

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Klonierung in Expressionsvektoren

3.3.1.1 Amplifikation viraler DNA für Klonierung in Expressionsvektoren

Mittels PCR wurden verschiedene virale Gene bzw. Genabschnitte von PLHV-1, -2 und -3 amplifiziert. Die Amplifikate wurden in Expressionsvektoren kloniert und zur Expression von GST- und His-Fusionsproteinen für die Gewinnung von Antisera und für Western-Blot- und ELISA-Analysen verwendet. Die ausgewählten Sequenzabschnitte, die für Glykoproteine und Kapsidproteine kodieren und für die bei anderen Vertretern der Familie *Herpesviridae* eine immunogene Wirkung gezeigt werden konnte (Kap. 2.3.3), sind in Abb. 8 für PLHV-1 dargestellt. Es handelte sich um den ORF08 (Glykoprotein B, gB), ORF39 (gM) und ORF47 (gL) sowie um den ORF52 und den ORF65, die für zwei Kapsidproteine kodieren.

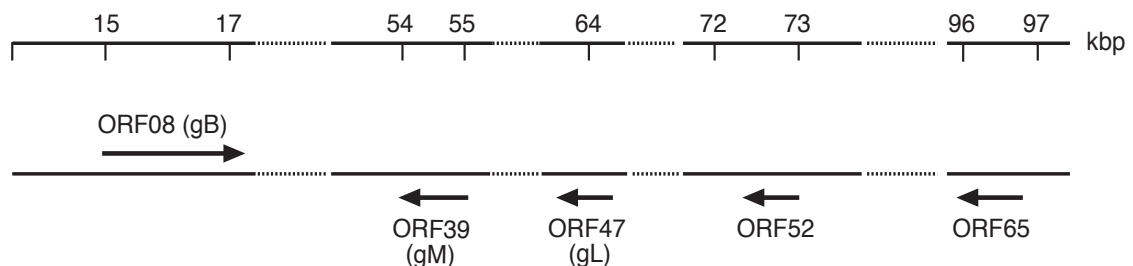


Abb. 8: Übersicht der mittels PCR amplifizierten ORF von PLHV-1

Im oberen Teil der Abbildung ist der bisher von PLHV-1 sequenzierte Genombereich dargestellt. Der Übersicht wegen wurden weite Bereiche ausgespart, die als gepunktete Linie dargestellt sind. Die Zahlen geben die Sequenzposition im PLHV-1-Genom in Kilobasenpaaren (kbp) an. Darunter sind die durch PCR amplifizierten ORF08, 39, 47, 52 und 65 dargestellt. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an. Während der ORF08 auf dem sense-Strang kodiert wird, liegen die anderen ORF auf dem Gegenstrang.

Von PLHV-1 wurden zwei nicht-überlappende Sequenzbereiche des gB-Gens, bezeichnet als gB1 (N-terminal) und gB2 (C-terminal), und die vollständigen Sequenzabschnitte des gM- und des gL-Gens sowie die für Kapsidproteine kodierenden ORF52 und ORF65 amplifiziert. Von PLHV-2 und PLHV-3 wurden nur die gB1- bzw. gB2-Gene amplifiziert. Die Amplifikatgrößen lagen zwischen 420 bp und 1143 bp. Die Benennung der Amplifikate erfolgte nach dem Virusnamen und dem amplifizierten Gen. Wurden von einem Gen mehrere Amplifikate erzeugt, wurde zusätzlich noch der Name des verwendeten sense-Primers angegeben. Tabelle 17 zeigt eine Übersicht der Ziel-Gene und der für die PCR verwendeten Primer. Außerdem sind Größe und Bezeichnung der erzeugten Amplifikate angegeben.

Tabelle 17: Übersicht der amplifizierten Gene von PLHV-1, -2 und -3

Virus-DNA	Ziel-Gen	Primer	Amplifikatgröße (bp)	Amplifikatbezeichnung
PLHV-1	ORF08 (gB1)	829s/829as	707	PLHV-1-gB1-829*
		2097s/1889as	716	PLHV-1-gB1-2097
		1583s/1583as	713	PLHV-1-gB1-1583
	ORF08 (gB2)	831s/831as	696	PLHV-1-gB2-831*
		2098s/1890as	683	PLHV-1-gB2-2098
		1584s/1584as	688	PLHV-1-gB2-1584
	ORF39 (gM)	1907s/1907as	1143	PLHV-1-gM
ORF47 (gL)	1908s/1908as	420	PLHV-1-gL	
ORF52	1909s/1909as	434	PLHV-1-ORF52	
ORF65	1910s/1910as	516	PLHV-1-ORF65	
PLHV-2	ORF08 (gB1)	1469s/1469as	723	PLHV-2-gB1
	ORF08 (gB2)	1470s/1470as	694	PLHV-2-gB2
PLHV-3	ORF08 (gB1)	1754s/1754as	745	PLHV-3-gB1-1754
		1891s/1891as	738	PLHV-3-gB1-1891
	ORF08 (gB2)	1472s/1472as	702	PLHV-3-gB2-1472
		1892s/1892as	696	PLHV-3-gB2-1892

*: Amplifikate waren bereits vor Beginn dieser Arbeit in den Donorvektor pUni/V5-His-TOPO® kloniert worden

Durch Basenaustausch an den 5'-Enden sequenzspezifischer Primer (Primersequenzen siehe Tabelle 8, Kap. 3.1.5), wurden Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme in die Zielgene eingebaut, die zur Klonierung der PCR-Amplifikate in die Expressionsvektoren pTriEx™-1.1 und pGEX-6P-1 erforderlich waren.

3.3.1.1.1 Amplifikation von PLHV-1-ORF08, 39, 47, 52 und 65

Zur Amplifikation von PLHV-1-Genen bzw. -Genabschnitten wurde die PLHV-1-positive Milzprobe #56a eines spanischen Schweines verwendet (Ehlers, Ulrich und Goltz, 1999; Goltz et al., 2002). Das 716 bzw. 713 bp umfassende gB1-Gen wurde mit dem Primerpaar 2097s/1889as für die Klonierung in pTriEx-1.1 bzw. zur Klonierung in pGEX-6P-1 mit dem Primerpaar 1583s/1583as amplifiziert. Für die Amplifikation des ähnlich großen gB2-Fragments (683 bzw. 688 bp) wurden die Primerpaare 2098s/1890as bzw. 1584s/1584as zur Klonierung in die entsprechenden Vektoren verwendet. Aufgrund mangelnder Ausbeute bei Verwendung der Primerpaare 2097s/1889as für die Amplifikation des gB1-Gens und 2098s/1890as für die Amplifikation des gB2-Gens wurden diese PCR als *nested* PCR durchgeführt. Dafür wurden in einer ersten PCR (1. Runde) die externen Primerpaare 417s/417as und 432s/464as verwendet, die ausserhalb der zu klonierenden Bereiche an die Virus-DNA binden. In einer darauffolgenden zweiten PCR (2. Runde) wurden 2 µl des

Reaktionsansatzes der 1. Runde mit den internen Primerpaaren 2097s/1889as und 2098s/1890as in einem 50 µl Ansatz versetzt, die nur die Amplifikation des zu klonierenden Sequenzbereiches erlaubten. In Abb. 9 ist die Strategie zur Amplifikation von gB1 und gB2 von PLHV-1 mittels *nested* PCR dargestellt.

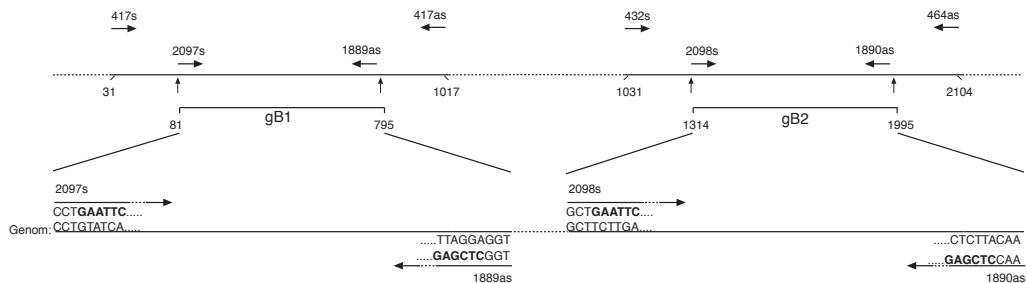


Abb. 9: nested PCR zur Amplifikation des gB1- und gB2-Gens von PLHV-1

Die Abbildung zeigt im oberen Teil einen Ausschnitt des ORF08 (gB) von PLHV-1. Dargestellt ist die Amplifikation der beiden gB-Gen-Fragmente gB1 und gB2 durch *nested* PCR. Die Bindungsregion der externen (417s/417as und 432s/464as) und internen Primerpaare (2097s/1889as und 2098s/1890as) und die Syntheserichtung des neuen DNA-Stranges ist durch Pfeile gekennzeichnet. Flankierende Sequenzbereiche sind als gepunktete Linien dargestellt. Die kursiv gedruckten Zahlen geben die Sequenzposition innerhalb des gB-Gens in Basenpaaren (bp) an. Die 5'- und 3'-Enden der amplifizierten gB1- und gB2-Fragmente sind im unteren Teil der Abbildung vergrößert dargestellt. Dabei ist das 5'-Ende der internen Primersequenzen der genomischen Sequenz gegenübergestellt. Die fett gedruckten Buchstaben kennzeichnen die Erkennungsregion für Restriktionsenzyme, die durch Basenaustausch in die 5'-Enden der Primer eingebaut wurde.

Durch die Verwendung der Primerpaare 2097s/1889as und 2098s/1890as wurden die gB1- und gB2-Amplifikate an ihren 5'-Enden mit Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XhoI* versehen. Eine Erkennungssequenz für die Restriktionsenzyme *BamHI* und *EcoRI* wurde durch Verwendung der Primerpaare 1583s/1583as und 1584s/1584as an den 5'-Enden der Amplifikate eingebaut. Zur Amplifizierung von ORF39 (gM), 47 (gL), 52 und 65 in ihrer gesamten Länge wurden Primer verwendet, die durch Basenaustausch an ihrem 5'-Ende mit Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *SacI* und *XhoI* versehen wurden. Dadurch wurden Amplifikate mit einer *SacI*- und *XhoI*-Schnittstelle erzeugt, über die sie in den Expressionsvektor pTriEx-1.1 kloniert werden konnten. Die Amplifikation des 1143 bp großen ORF39 (PLHV-1-gM) erfolgte mit dem Primerpaar 1907s/1907as, die des 420 bp großen ORF47 (PLHV-1-gL) mit dem Primerpaar 1908s/1908as. Die im ORF52 und ORF65 kodierten Kapsidproteine wurden durch die Primerpaare 1909s/1909as und 1910s/1910as amplifiziert (PLHV-1-ORF52 und PLHV-1-ORF65). Die Größe der Amplifikate betrug 434 bp bzw. 516 bp. Abb. 10 veranschaulicht, welche Primerpaare für die Amplifikation der jeweiligen PLHV-1-Gene verwendet wurden.

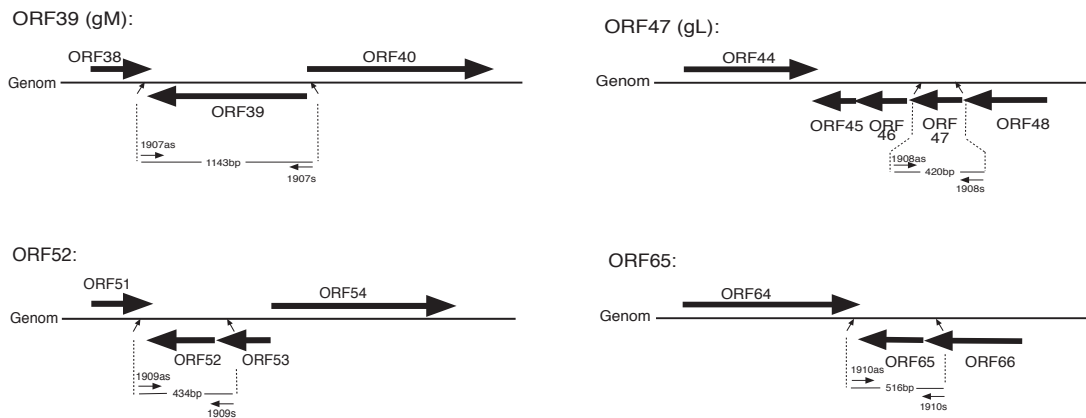


Abb. 10: PLHV-1-Gene und ihre Amplifikation

Die Abbildung zeigt die auf dem Gegenstrang des PLHV-1-Genoms lokalisierten Genbereiche des ORF39 (gM), ORF47 (gL), ORF52 und ORF65 von PLHV-1 und die sie umgebende Genomorganisation. Für jeden amplifizierten Bereich sind die Primerpaare, deren Bindungsregion durch Pfeile gekennzeichnet ist, und die Amplifikatlänge angegeben.

3.3.1.1.2 Amplifikation von PLHV-2-ORF08

Das gB1- und gB2-Gen von PLHV-2 wurden aus der Tonsille eines Wildschweines (Probe #546) amplifiziert (Chmielewicz et al., 2003). Das 723 bp umfassende PLHV-2-gB1 wurde durch Verwendung des Primerpaars 1469s/1469as amplifiziert. Mit dem Primerpaar 1470s/1470as wurde PLHV-2-gB2 mit einer Nukleotidgröße von 694 bp amplifiziert. Über die sense- und antisense Primer wurden Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *SacI* und *XhoI* in die Amplifikate eingebaut. Die an ihren 5'-Enden modifizierten gB1- und gB2-Amplifikate wurden in den Expressionsvektor pTriEx-1.1 kloniert.

3.3.1.1.3 Amplifikation von PLHV-3-ORF08

Aus der Milz eines Schlachttieres (Probe #489) (Chmielewicz et al., 2003) wurden die beiden gB-Genbereiche gB1 und gB2 amplifiziert. Für die Amplifikation von PLHV-3-gB1 wurden die Primerpaare 1754s/1754as und 1891s/1891as verwendet. Mit dem ersten Primerpaar wurde ein 745 bp großes Fragment erzeugt, in das durch Verwendung von modifizierten sense- und antisense-Primern Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *SacI* und *XhoI* zur Klonierung in den Expressionsvektor pTriEx-1.1 eingebaut wurden. Zur Klonierung in den Expressionsvektor pGEX-6P-1 wurden über das Primerpaar 1891s/1891as Erkennungssequenzen für die Enzyme *BamHI* und *EcoRI* in das 738 bp große PLHV-3-gB1-1891-Amplifikat eingebaut. Das 702 bp große Amplifikat PLHV-3-gB2 wurde mit dem Primerpaar 1472s/1472as erzeugt, das ebenso wie PLHV-3-gB1-1754 durch PCR an seinen 5'-Enden mit einer Erkennungssequenz für die Restriktionsenzyme *SacI* und *XhoI* versehen wurde. Durch

das Primerpaar 1892s/1892as wurde das 696 bp große, mit Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Eco*RI versehene PLHV-3-gB2-1892-Amplifikat erzeugt. Über die eingefügten Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme wurden die PLHV-3-gB2-Amplifikate in die gleichen Expressionsvektoren kloniert wie die PLHV-3-gB1-Amplifikate.

3.3.1.2 Klonierung von Genen von PLHV-1, -2 und -3 in Expressionsvektoren

Die durch PCR erzeugten Amplifikate von Genen bzw. Genbereichen von PLHV-1, -2 und -3 wurden zur Expression heterologer Proteine in *E. coli* in Expressionsvektoren kloniert. Zu Anfang wurde mit dem Echo™ Cloning System gearbeitet. Mit diesem System ließen sich die Donorvektoren mit den Amplifikaten PLHV-1-gB1-829 und PLHV-1-gB2-831 (zur Benennung der Amplifikate siehe Tabelle 17, Kap. 3.3.1.1) erst nach großem materiellen und zeitlichen Aufwand mit dem Akzeptorvektor fusionieren. Deshalb wurde auf zwei andere Klonierungssysteme ausgewichen: auf den pTriEx-Multisystem-Vektor und auf das GST-Gene-Fusion-System. Die verfolgte Strategie war, mit dem einen System GST-Fusionsproteine zu exprimieren, die zur Gewinnung von Antisera verwendet werden sollten. Mit dem anderen System sollten His-Fusionsproteine exprimiert werden für Analysen im Western Blot und im ELISA. Da nicht mit drei unterschiedlichen Klonierungssystemen gearbeitet werden sollte, wurden die bereits mit dem Echo™ Cloning System klonierten Amplifikate PLHV-1-gB1-829 und PLHV-1-gB2-831 nur für einen Immunisierungsvorversuch verwendet und eine Neuklonierung der beiden Genbereiche vorgenommen. Bis auf das gM-Gen, das sich auch nach mehrmaliger Versuchswiederholung nicht klonieren ließ, konnten für alle ausgewählten viralen Proteine korrekte Klone erzeugt werden. Diese wurden zur anschließenden Expression in unterschiedliche *E. coli* Stämme transformiert.

3.3.1.2.1 Das Echo™ Cloning System

Die etwa 700 bp umfassenden Amplifikate PLHV-1-gB1-829 und PLHV-1-gB2-831 waren bereits vor Beginn dieser Arbeit in den Donorvektor pUni/V5-His-TOPO® kloniert worden. Dabei wurden die Amplifikate durch einen von der Topoisomerase I katalysierten Schritt C-terminal im Leserahmen mit einem V5-Epitop und einem Histidin-Tag kloniert. Bei der anschließenden *Cre*-Rekombinase vermittelten Fusionsreaktion wurden die gB-tragenden Donorvektoren mit dem Akzeptorvektor pBAD/Thio-E™ ligiert. Dadurch wurden das gB1- und das gB2-Gen zusätzlich am N-Terminus im Leserahmen mit Thioredoxin und einer Enterokinase kloniert. Dieses Konstrukt, bestehend aus Donorvektor mit inseriertem gB-Gen-Fragment und Akzeptorvektor, wurde in *E. coli* TOP 10 transformiert. Positive Klone wurden durch Restriktionsenzym-

analyse mit *EcoRV* identifiziert. Nach Präparation der Plasmid-DNA aus einer Übernachtkultur wurden positive Klone zur Kontrolle der Nukleotidabfolge und des korrekten Leserahmens mit den Primern Trxfor, Unifor und Unirev sequenziert.

3.3.1.2.2 Das GST-Gene-Fusion-System

Zur Erzeugung spezifischer polyklonaler Antiseren gegen gB1 und gB2 von PLHV-1 und PLHV-3 wurden die gB-Gen-Fragmente beider Viren in den Expressionsvektor pGEX-6P-1 kloniert. Dabei wurden sie an ihrem N-Terminus im Leserahmen mit GST und einer Protease-Erkennungsregion zur enzymatischen Abspaltung des GST vom erwünschten Protein nach Expression kloniert. Die Insertion der PCR-Amplifikate PLHV-1-gB1-1583, PLHV-1-gB2-1584, PLHV-3-gB1-1891 und PLHV-3-gB2-1892 erfolgte über die mit den Primern eingeführten *Bam*HI- und *Eco*RI-Restriktionschnittstellen in den durch Verdau mit *Bam*HI und *Eco*RI linearisierten Expressionsvektor pGEX-6P-1. In Abb. 11 ist das pGEX-6p-1-gB-Konstrukt dargestellt.

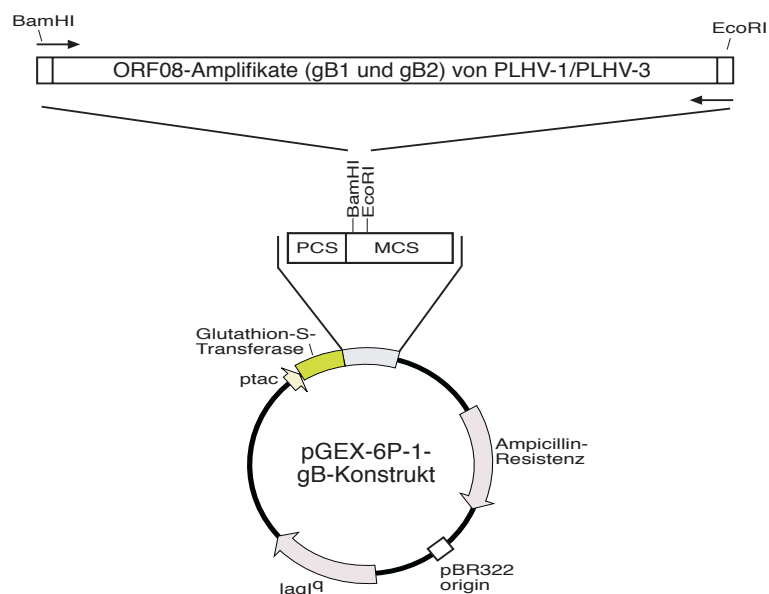


Abb. 11: pGEX-6P-1-gB-Konstrukt

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurde der Vektor pGEX-6P-1 verwendet. Zu seinen strukturellen Elementen zählen eine Promotorregion (*ptac*) für die durch IPTG-induzierbare Expression in *E. coli*, das *laqI^q*-Gen, das eine Expression in unterschiedlichen *E. coli* Stämmen ermöglicht, eine GST-kodierende Region, eine Protease-Erkennungsstelle (PCS), die *multiple cloning site* (MCS), ein Ampicillin-Resistenzgen und der Replikationsursprung (*pBR322 origin*). In der Abbildung ist die MCS mit den Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Eco*RI und die N-terminale Protease-Erkennungsregion herausvergrößert. Im oberen Teil der Abbildung sind die ORF08-Amplifikate (gB1 und gB2) von PLHV-1 und PLHV-3 dargestellt. Die Pfeile am 5'- und 3'-Ende der gB-Genabschnitte kennzeichnen die Bindungsstelle der PCR-Primer, denen durch Basenaustausch Erkennungssequenzen für *Bam*HI und *Eco*RI eingefügt wurden.

Zur Kontrolle von Nukleotidabfolge und Leserahmen wurden die pGEX-6P-1-gB-Klone nach Transformation in *E. coli* DH5 α und Kolonie-PCR mit dem Vektor-spezifischen

Primerpaar 1970/191 (Tabelle 9, Kap. 3.1.5) und den Insert-spezifischen PCR-Primerpaaren 1583s/1583as, 1584s/1584as, 1891s/1891as und 1892s/1892as (Tabelle 8, Kap. 3.1.5) sequenziert. Erst danach erfolgte die Transformation in *E.coli* Rosetta™ für die Expression von GST-Fusionsproteinen.

3.3.1.2.3 Der pTriEx-Multisystem-Vektor

Zur Expression von His-Fusionsproteinen von PLHV-1, -2 und -3 wurde der Expressionsvektor pTriEx-1.1 verwendet. Die in diesen Vektor inserierten Gene wurden am C-Terminus im Leserahmen mit einem Polyhistidinrest aus acht Histidinen kloniert. Die erzeugten Fusionsproteine wurden für Western-Blot- und ELISA-Analysen verwendet. Die durch PCR mit Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme *SacI* und *XhoI* versehenen Amplifikate PLHV-1-gL, PLHV-1-ORF52, PLHV-1-ORF65, PLHV-2-gB1, PLHV-2-gB2, PLHV-3-gB1-1754 und PLHV-3-gB2-1472 wurden nach Verdau mit *SacI* und *XhoI* mit dem durch die gleichen Enzyme linearisierten Expressionsvektor pTriEx-1.1 ligiert. Die Amplifikate PLHV-1-gB1-2097 und PLHV-1-gB2-2098 wurden durch die mit den Primern eingeführte *EcoRI*- und *XhoI*-Restriktionsschnittstelle in pTriEx-1.1 inseriert. Abb. 12 zeigt die verfolgte Klonierungsstrategie.

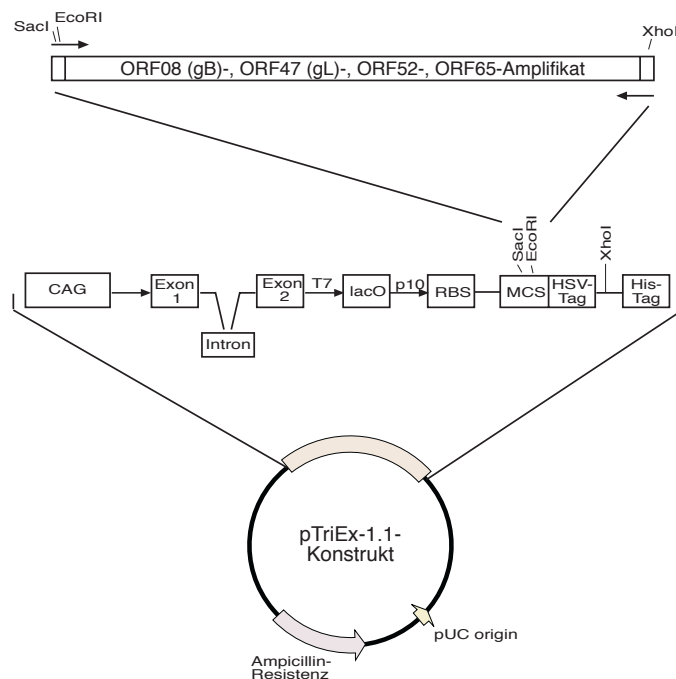


Abb. 12: pTriEx-1.1-Konstrukt

Für die Expression von His-Fusionsproteinen wurde der Vektor pTriEx-1.1 verwendet. Dieser Vektor verfügt über einen bakteriellen Replikationsursprung (pUC origin), ein Ampicillin-Resistenzgen und über mehrere regulatorische Komponenten, die für die Transkription und Translation in unterschiedlichen Organismen erforderlich sind. Die regulatorischen Struktureinheiten sind in der Abbildung vergrößert dargestellt. Neben Steuerungselementen für die Transkription in Mammalien- (CAG = CMV immediate early enhancer + chicken β -actin) und in Insektenzellen (p10) besitzt der Vektor einen T7-Promotor für die Transkription in *E. coli*. Weitere Komponenten des pTriEx-1.1 sind eine MCS sowie die Sequenzinformation für einen HSV-Tag und einen His-Tag für die Expression C-terminaler

Fusionsproteine. Im oberen Teil der Abbildung sind die PCR-Amplifikate des ORF08 (gB), ORF47 (gL), ORF52 und des ORF65 für die Insertion in den Vektor schematisch dargestellt. Die Pfeile an ihren 5'- und 3'-Enden kennzeichnen die Lage der PCR-Primer mit den durch Basenaustausch eingebauten Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *SacI*, *EcoRI* und *XhoI*.

Nach der Klonierung wurden die pTriEx-Klone in *E. coli* DH5 α transformiert. Korrekte Klone wurden durch Kolonie-PCR identifiziert. Der Einbau fehlerhafter Nukleotide und die Verschiebung des Leserahmens wurde durch Sequenzierung mit den PCR-Primerpaaren (Tabelle 8, Kap. 3.1.5) und dem Vektor-spezifischen Primerpaar 1971s/1971as (Tabelle 9, Kap. 3.1.5) ausgeschlossen. Für die Expression wurden die Konstrukte in *E. coli* Rosetta (DE3) pLacI transformiert.

3.3.2 Expression der in ORF08, 52 und 65 kodierten Proteine

Es wurden His- und GST-Fusionsproteine von PLHV-1, -2 und -3 in *E. coli* exprimiert. Die Expression der gB-Teilproteine gB1 und gB2 von PLHV-1, -2 und -3 und der Vollängen-Produkte des ORF52 und ORF65 von PLHV-1 erfolgte in den Expressionsvektoren pGEX-6P-1 und pTriEx-1.1. Auf die Expression von PLHV-1-gL musste verzichtet werden, da sich das gL-Gen-tragende, rekombinante Plasmid trotz mehrerer Versuche nicht in den Expressionsstamm transformieren ließ. Die mit dem Echo™ Cloning System exprimierten Proteine PLHV-1-gB1-His-Echo und PLHV-1-gB2-His-Echo wurden in einem Vorversuch zur Gewinnung von Antiseren eingesetzt. Die mit pGEX-6P-1 exprimierten GST-Fusionsproteine wurden für die Gewinnung von Antiseren Mäusen und Kaninchen inokuliert. Die His-Fusionsproteine, die mit dem Expressionsvektor pTriEx-1.1 exprimiert wurden, wurden für die Analyse polyklonaler Seren und monoklonaler Antikörper im Western Blot und im ELISA eingesetzt. Tabelle 18 zeigt eine Übersicht exprimierter Proteine. Dargestellt sind die Molekulargewichte in kDa und der Verwendungszweck der Proteine. Die Benennung der Proteine erfolgte durch Angabe des Virusnamens, des exprimierten Gens und des Tags. Bei Verwendung gleicher Gene in unterschiedlichen Expressionssystemen mit gleichem Tag wurde dem Proteinnamen noch ein Teil des Vektornamens (Echo bzw. pTriEx) angefügt.

Tabelle 18: Rekombinante Proteine und ihre Verwendung

Protein	Größe in kDa	Verwendungszweck
PLHV-1-gB1-His-Echo	45	Vorversuch Immunsierung
PLHV-1-gB2-His-Echo	45	Vorversuch Immunsierung
PLHV-1-gB1-GST	55	Gewinnung von Antiseren
PLHV-1-gB2-GST	55	Gewinnung von Antiseren
PLHV-1-gB1-His-pTriEx	32	Western Blot, ELISA
PLHV-1-gB2-His-pTriEx	31	Western Blot
PLHV-1-ORF52-His	17-18	Western Blot
PLHV-1-ORF65-His	19	Western Blot
PLHV-2-gB1-His	31	Western Blot
PLHV-2-gB2-His	31	Western Blot
PLHV-3-gB1-His	31	Western Blot
PLHV-3-gB2-His	31	Western Blot
PLHV-3-gB1-GST	55	Gewinnung von Antiseren
PLHV-3-gB2-GST	55	Gewinnung von Antiseren

3.3.2.1 Expression von His-Fusionsproteinen mit dem Echo™ Cloning System

Durch Verwendung des Vektors pBAD/Thio-E-gB-pUni/V5-His, einem Fusionsprodukt aus dem Vektor pBAD/Thio-E™ und aus dem gB-Genfragment tragenden pUni/V5-His-TOPO®, wurden die Proteine PLHV-1-gB1-His-Echo und PLHV-1-gB2-His-Echo in *E. coli* TOP10 exprimiert. Mit diesen Proteinen sollten Mäuse zum Nachweis der immunogenen Wirkung von gB-Teilproteinen in einem Vorversuch immunisiert werden. Die unter Kontrolle des durch Arabinose induzierbaren *araBAD*-Promotors (pBAD) liegende Expression von PLHV-1-gB1-His-Echo und PLHV-1-gB2-His-Echo erfolgte bei 37°C und wurde nach Zugabe von 0,2% Arabinose für 5 h induziert. Die Expressionsrate und die Löslichkeit der exprimierten gB-Proteine wurde durch Immundetektion nach Elektrotransfer auf PVDF-Membranen untersucht. Dazu wurden Aliquots der Bakterienkultur aufgereinigt und Gesamtfraction sowie lösliche und unlösliche Fraction auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Immundetektion erfolgte mit einem Maus-anti-His-Antikörper und einem AP-konjugiertem, Ziege-anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper. Durch Vergleich mit einem Proteinmarker wurden beide Proteine als etwa 45 kDa große Proteinbanden ausschließlich in der unlöslichen Fraction nachgewiesen. Sie lagen dabei als dichte, unlösliche Aggregate, sogenannte "*inclusion bodies*", vor. Durch Erniedrigung der Induktionsdauer von 5 h auf 4 h und 3 h, durch Austesten verschiedener Induktorkonzentrationen (0,00002% bis 0,02% Arabinose) und durch Expression bei 30°C wurde versucht, die Löslichkeit

der Proteine zu erhöhen. Da dies jedoch nicht gelang, wurde die Expression unter den ursprünglich gewählten Bedingungen (37°C, 0,2% Arabinose) durchgeführt, da damit die größten Expressionsraten erzielt wurden (Ergebnisse nicht gezeigt). Nur die Induktionsdauer wurde von 5 h auf 4 h reduziert, da die 60-minütige Verlängerung der Expression zu keiner deutlich größeren Expressionsrate führte.

3.3.2.2 Expression von GST-Fusionsproteinen mit dem GST-Gene-Fusion-System

Die unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren T7-Promotors stehende Expression von PLHV-1-gB1-GST, PLHV-1-gB2-GST, PLHV-3-gB1-GST und PLHV-3-gB2-GST erfolgte in *E. coli* Rosetta™ und diente dazu, Antigene für die Erzeugung von Antisera in Mäusen und Kaninchen zu gewinnen. Die Expression der GST-Fusionsproteine wurde bei 37°C durchgeführt und 2 h nach Induktion mit 0,5 M IPTG beendet. Nach Aufreinigung von Aliquots wurden die exprimierten Proteine durch Immundetektion auf PVDF-Membranen mit einem Ziege-anti-GST-Antikörper und einem AP-konjugiertem, Kaninchen-anti-Ziege-IgG-Sekundärantikörper als etwa 55 kDa große Proteine nur in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen. Die exprimierten Proteine wurden, wie PLHV-1-gB1-His-Echo und PLHV-1-gB2-His-Echo (Kap. 3.3.2.1), in Form unlöslicher "inclusion bodies" in den Bakterienzellen abgelagert. Durch Reduktion der IPTG-Konzentration auf 0,2 M und 0,1 M und durch Erniedrigung der Inkubationstemperatur auf 30°C und 25°C wurde versucht, die Löslichkeit exprimierter Proteine zu erhöhen. Diese Veränderungen bewirkten jedoch keine Erhöhung des löslichen Proteinanteils, so dass folgende Expressionen unter den zu Anfang gewählten Bedingungen (37°C, 2 h Induktion) erfolgte. Nur die IPTG-Konzentration wurde von 0,5 M auf 0,1 M reduziert, da die Expressionsrate durch die größere Menge an IPTG nicht positiv beeinflusst wurde.

3.3.2.3 Expression von His-Fusionsproteinen mit dem pTriEx-Multisystem-Vektor

Die Expression C-terminaler His-Fusionsproteine in *E. coli* Rosetta(DE3)pLacI erfolgte bei 37°C und wurde 2 h nach Induktion mit 1 mM IPTG beendet. Ein Aliquot der Bakterienkultur wurde aufgereinigt und Gesamtfraction sowie lösliche und unlösliche Fraktion auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion exprimierter Proteine durch Immunfärbung mit einem Maus-anti-His-Antikörper und einem AP-konjugiertem, Ziege-anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper. Exprimiert wurden die PLHV-1-Proteine gB1-His (32 kDa), gB2-His (31 kDa), ORF52-His (17-18 kDa) und ORF65-His (19 kDa) sowie gB1-His und gB2-His von PLHV-2 und PLHV-3 (alle 31 kDa). Alle genannten

Proteine waren nur in der unlöslichen Fraktion nachweisbar. Auf Optimierungsversuche zur Erhöhung des löslichen Proteinanteils wurde verzichtet, da diese bereits bei den anderen beiden Expressionssystemen zu keinem Erfolg führten. Das PLHV-1-Protein gB1-His wurde zur Untersuchung polyklonaler Seren und monoklonaler Antikörper im Western Blot und im ELISA verwendet. Die Anwendung der anderen PLHV-1-Proteine erfolgte in Western-Blot-Analysen. Mit den Proteinen gB1-His und gB2-His von PLHV-2 und PLHV-3 wurden polyklonale anti-PLHV-1-gB-Antiseren auf Kreuzreaktivität untersucht (Kap. 3.3.4.4).

3.3.3 Reinigung rekombinanter Fusionsproteine

Zu Anfang wurde versucht, Fusionsproteine über Wechselwirkung ihres Tag mit verschiedenen Matrixes aufzureinigen. Für die Aufreinigung von His-Fusionsproteinen wurde Ni-NTA-Agarose verwendet. GST-Fusionsproteine sollten nach Aufreinigung mit dem BugBuster® Protein Extraction Reagent zusätzlich durch Bindung an Glutathion Sepharose 4B aufgereinigt werden. Dadurch sollte die Bildung von anti-*E.coli*-Antikörpern bei der Immunisierung mit GST-Fusionsproteinen verhindert werden. Die GST-Fusionsproteine mussten dazu vor Inkubation mit Glutathion Sepharose 4B durch Dialyse renaturiert werden. Dabei bildete sich ein weisses Präzipitat, dass durch Zentrifugation entfernt wurde. Nach Inkubation mit Ni-NTA-Agarose bzw. Glutathion Sepharose 4B wurden bakterielle Kontaminationen durch mehrere Waschstschritte entfernt, bevor das gewünschte Protein eluiert wurde. Während sich in den Durchflussfraktionen größere Mengen der rekombinanten Proteine befanden, enthielten die Eluate nur sehr geringe Mengen der erwünschten Proteine. Auch Versuchswiederholungen erhöhten nicht die Ausbeute an gereinigtem Protein. Deshalb wurde auf diese Methoden der Proteinaufreinigung verzichtet und stattdessen nur mit dem BugBuster® Protein Extraction Reagent unter Zugabe von Benzonase Nuklease und rLysozym™ Solution gearbeitet. Da sich bei der Aufreinigung von Aliquots nach der Expression gezeigt hatte, dass alle in *E. coli* überexprimierten Proteine in Form von "inclusion bodies" in den Bakterienzellen abgelagert werden, wurden zur Aufreinigung rekombinanter Proteine gezielt nur die "inclusion bodies" angereichert und gereinigt.

3.3.4 Erzeugung polyklonaler anti-PLHV-gB-Antiseren und Untersuchung der Reaktivität und Spezifität im Western Blot

3.3.4.1 Nachweis der immunogenen Wirkung von Glykoprotein B

In einem Vorversuch, der in Zusammenarbeit mit Priv. Doz. Dr. Kerstin Borchers (Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin) erfolgte, wurde die

immunogene Wirkung von PLHV-gB im Western Blot bestätigt (Ergebnisse nicht gezeigt). Für den Nachweis, dass gB Auslöser einer humoralen Immunantwort im infizierten Tier ist, wurden zwei gB-Proteine von PLHV-1, das gB1-His-Echo und das gB2-His-Echo (zur Nomenklatur der Proteine siehe Tabelle 18, Kap. 3.3.2), als heterologe His-Fusionsproteine in *E.coli* exprimiert. Je Antigen wurden drei sechs bis acht Wochen alte weibliche Balb/c Mäuse immunisiert und die Bildung gB-spezifischer Antikörper durch regelmäßige Blutentnahmen aus der Schwanzvene im Western Blot kontrolliert. Die gewonnenen Blutvolumina waren sehr gering, so dass für folgende Immunisierungen eine höhere Tierzahl eingesetzt wurde und die Blutentnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus erfolgte.

3.3.4.2 Gewinnung von Antiseren gegen PLHV-1-gB und PLHV-3-gB

Nachdem durch einen Vorversuch die immunogene Wirkung von PLHV-1-gB bestätigt werden konnte, wurden zur Gewinnung polyklonaler Antiseren gegen PLHV-1-gB und PLHV-3-gB je Antigen acht weibliche sechs bis acht Wochen alte Balb/c Mäuse mit den in *E. coli* exprimierten GST-Fusionsproteinen PLHV-1-gB1-GST, PLHV-1-gB2-GST, PLHV-3-gB1-GST und PLHV-3-gB2-GST über einen Zeitraum von etwa zwölf Wochen immunisiert. Die beiden PLHV-1-Antigene wurden außerdem zur Immunisierung von Chinchilla Kaninchen (je Antigen ein Kaninchen) verwendet. Durch den Einsatz einer höheren Tierzahl und der Anwendung einer anderen Blutentnahmetechnik bei den Mäusen (aus dem retroorbitalen Venenplexus) konnten größere Blutvolumina als bei dem Vorversuch gewonnen werden. Mit den gegen PLHV-1-gB1 gerichteten Antiseren sollte ein ELISA zum serologischen Nachweis von PLHV-1-Infektionen beim Schwein aufgebaut werden. Die PLHV-3-gB-Antiseren sollten für die Entwicklung eines Immunfluoreszenztests an Blutlymphozyten PTLD-erkrankter Miniaturschweine verwendet werden. Zur Kontrolle der Antikörperbildung nach Grundimmunisierung und Boosterinjektion wurde die Reaktivität der PLHV-gB-Antiseren im Western Blot untersucht.

3.3.4.3 Reaktivität von anti-PLHV-1-gB-Antiseren und des anti-PLHV-3-gB2-Antiserums

Für die Untersuchung der Reaktivität des anti-PLHV-1-gB1-GST-Antiserums und des anti-PLHV-1-gB2-GST-Antiserums im Western Blot wurden gB-His-Fusionsproteine von PLHV-1-gB1 und PLHV-1-gB2 in *E. coli* Rosetta(DE3)pLacI exprimiert, die die gleichen gB-Bereiche überspannten wie die für die Immunisierung eingesetzten gB-GST-Fusionsproteine von PLHV-1. Neben dem Prä-Immuserum als Negativserum wurden die Seren von Tag 39, 67 und 85 nach der Erstimmunisierung auf ihre Reaktivität mit gB1-His und gB2-His untersucht.

Die zu verschiedenen Zeitpunkten während der Immunisierung gewonnenen Maus-anti-gB1-Antiseren zeigten eine deutliche und ähnlich stark ausgeprägte Reaktion mit dem 32 kDa großen gB1-His (Abb. 13 A), die zügig nach Substratzugabe eintrat. Das Prä-Immuneserum reagierte, wie erwartet, nicht mit gB1-His. Das Maus-anti-gB2-Antiserum zeigte an Tag 39 nur eine sehr schwache Reaktivität mit dem 31 kDa großen gB2-His (Abb. 13 B). Eine deutliche Reaktion war erst nach der dritten Boosterungsimmunisierung (Tag 67) zu erkennen, wobei die Intensität der Reaktion geringer war und langsamer eintrat als bei dem anti-gB1-Antiserum. Das Prä-Immuneserum war negativ.

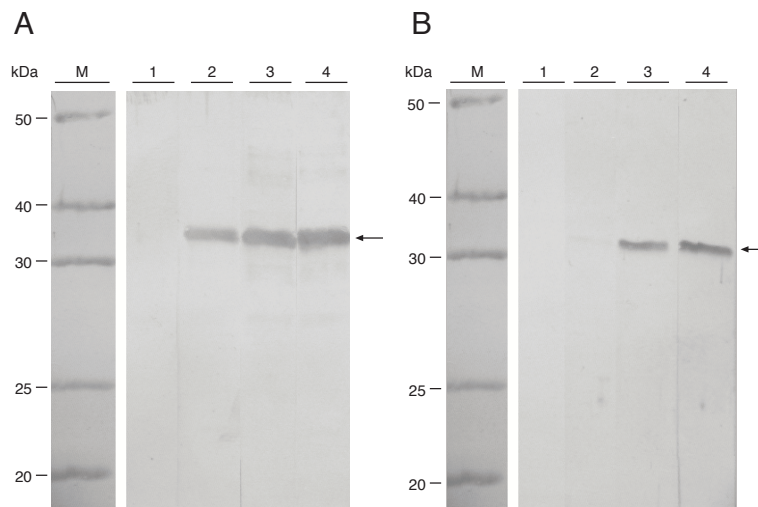


Abb. 13: Reaktivität von anti-gB1-GST mit gB1-His und anti-gB2-GST mit gB2-His

Zur Untersuchung der Reaktivität der Antiseren anti-gB1-GST und anti-gB2-GST, erzeugt gegen die GST-Fusionsproteine gB1 und gB2 von PLHV-1, wurden die 1:1000 verdünnten Mäuseseren mit in *E. coli* exprimiertem gB1-His und gB2-His (1 µg Protein pro Membranstreifen) inkubiert. Gebildete Immunkomplexe wurden durch Inkubation mit 1:2500 verdünntem, AP-konjugiertem, Ziege-anti-Maus-IgG-Zweitantikörper visualisiert. (A) Reaktivität von anti-gB1-GST mit gB1-His. (B) Reaktivität von anti-gB2-GST mit gB2-His. Es wurden folgende Proben aufgetragen: (M) 10 µl Mark12™ Unstained Standard, irreversibel gefärbt mit Amidoschwarz 10B, (1) Prä-Immuneserum, (2) Serum nach 2. Boosterung (Tag 39), (3) Serum nach 3. Boosterung (Tag 67) und (4) Serum vom Tag der Entblutung (Tag 85). Neben den aufgetrennten Proteinbanden des Markers sind die Molekulargewichte in kDa angegeben. Die Pfeile kennzeichnen gB1-His (A) und gB2-His (B).

Aufgrund der Beobachtung, dass die anti-gB1-GST-Antiseren stärker reaktiv waren als die anti-gB2-GST-Antiseren wurden nur die anti-gB1-GST-Antiseren für weitere Untersuchungen verwendet. Dazu wurden alle reaktiven anti-gB1-Antiseren zu einem Positivserum gepoolt. Die in Kaninchen erzeugten Antiseren gegen gB1 und gB2 zeigten trotz Adsorption an "*E. coli*-Proteinpuder" eine starke Hintergrundfärbung (Ergebnisse nicht gezeigt), die weitere Untersuchungen erheblich beeinflusst hätten. Deshalb wurde auf die weitere Verwendung dieser Seren verzichtet.

Die Untersuchung des anti-PLHV-3-gB2-Antiserums erfolgte analog zur Untersuchung der anti-PLHV-1-gB-Antiseren. Das Prä-Immuneserum zeigte eine sehr schwache

Reaktion mit PLHV-3-gB2-His, während die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Erstimmunisierung gewonnenen Antiseren eine deutliche Reaktion zeigten (Abb. 14).

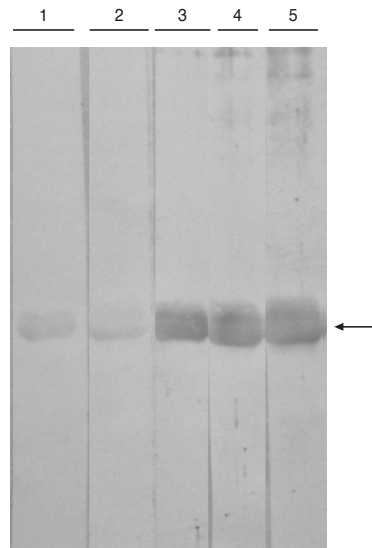


Abb. 14: Reaktivität von anti-PLHV-3-gB2-GST mit PLHV-3-gB2-His

Zur Untersuchung der Reaktivität des anti-gB2-GST-Antiserums, erzeugt gegen das GST-Fusionsprotein gB2 von PLHV-3, wurden die 1:100 verdünnten Mäuseseren mit in *E. coli* exprimiertem gB2-His (1 µg Protein pro Membranstreifen) inkubiert. Gebildete Immunkomplexe wurden durch Inkubation mit 1:2500 verdünntem, AP-konjugiertem, Ziege-anti-Maus-IgG-Zweitantikörper visualisiert. Zur Kontrolle, in welcher Höhe gB2-His bei Positivität der Seren zu erwarten ist und zur Identifikation einer positiven Antwort, wurde ein Streifen, ganz links in der Abbildung, mit einem anti-His-Antikörper und einem AP-konjugierten, Ziege-anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper (beide 1:5000 verdünnt) inkubiert. Es wurden folgende Proben aufgetragen: (1) Kontrolle, (2) Prä-Immuneserum, (3) Serum nach 2. Boosterung (Tag 39), (4) Serum nach 3. Boosterung (67) und (5) Serum vom Tag der Entblutung (Tag 85). Der Pfeil kennzeichnet das gB2-His.

3.3.4.4 Spezifität des Maus-anti-PLHV-1-gB1-GST-Antiserums

Zur Untersuchung der Spezifität des anti-PLHV-1-gB1-GST-Antiserums wurde die Reaktivität des gepoolten Positivserums (Kap. 3.3.4.3) mit den His-Fusionsproteinen PLHV-1-gB2-His-pTriEx, PLHV-2-gB1-His, PLHV-2-gB2-His, PLHV-3-gB1-His und PLHV-3-gB2-His im Western Blot untersucht. Zur qualitativen Kontrolle wurde ein Membranstreifen mit PLHV-1-gB1-His-pTriEx mitgeführt.

Das anti-PLHV-1-gB1-GST-Antiserum aus der Maus erkannte neben gB1 von PLHV-1 auch gB1 von PLHV-2 und PLHV-3 (Abb. 15), wobei die Reaktivität mit gB1 von PLHV-3 trotz gleicher transferierter Proteinmenge und identischer Inkubationszeit mit dem Substrat schwächer ausfiel, als mit gB1 von PLHV-1 und PLHV-2. Das anti-gB1-Antiserum reagierte, wie erwartet, nicht mit den gB2-Proteinen von PLHV-1, -2 und -3, die bei einem Molekulargewicht von etwa 30 kDa erwartet wurden. Die sehr schwach sichtbaren Nebenbanden waren vermutlich durch unspezifische Bindung von Serumbestandteilen an Bakterienproteine entstanden. Bei den beiden Nebenbanden

auf dem Membranstreifen mit PLHV-3-gB1-His könnte es sich auch um Abbauprodukte von PLHV-3-gB1-His oder nicht vollständig translatiertes PLHV-3-gB1-His gehandelt haben.

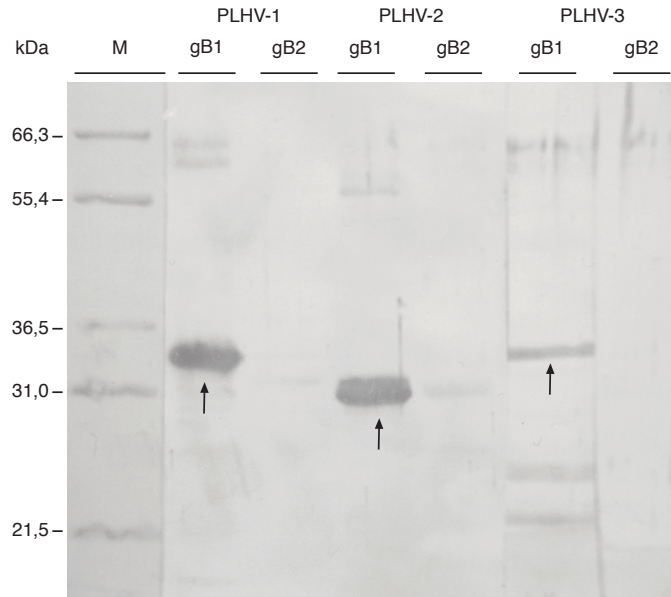


Abb. 15: Reaktivität von anti-PLHV-1-gB1-GST mit gB1-His und gB2-His von PLHV-1, -2 und -3

Zur Untersuchung der Spezifität der in Mäusen erzeugten Antiseren gegen PLHV-1-gB1 wurde das 1:100 verdünnte, gepoolte Positivserum mit rekombinanten gB1- und gB2-His-Fusionsproteinen von PLHV-1, -2 und -3 inkubiert (jeweils 1 µg). Das Konjugat wurde in einer Verdünnung von 1:2500 eingesetzt. Als qualitative Kontrolle wurde das PLHV-1-gB1-His mitgeführt. Die Pfeile kennzeichnen die Lage von gB1-His aller drei PLHV. In der linken Spur wurden 10 µl eines Proteinstandards (Mark12™ Unstained Standard) aufgetragen und die aufgetrennten Proteinbanden nach Western Blot mit Amidoschwarz 10B irreversibel angefärbt. Das Molekulargewicht der Proteinbanden des Markers ist in kDa angegeben.

3.3.5 Untersuchung monoklonaler Antikörper auf ihre Reaktivität mit PLHV-1-gB

Monoklonale Antikörper (mAk) gegen PLHV-1-gB1 wurden von Herrn Dr. Stitz (BfAV/Tübingen) in Mäusen erzeugt. Diese sollte für die immunhistochemische Untersuchung von Lymphknoten PTLD-erkrankter Miniaturschweine verwendet werden. Vor Anwendung in der Immunhistochemie wurden die Überstände von 78 Hybridomazellen im ELISA auf ihre Reaktivität mit PLHV-1-gB1-His-pTriEx untersucht. Die höchsten absoluten Extinktionen bei einer Wellenlänge von 405 nm zeigten dabei die Überstände B1H9 (1,091), B5B3 (0,838), B11C12 (0,706), G7D3 (0,986), G8D8 (0,821) und G8E9 (0,789). Diese sechs Überstände sowie drei Kontrollüberstände (anti-X63, anti-38/17C1 und anti-38/15H7), die durch Immunisierung von Mäusen mit nicht-PLHV-1-Antigen erzeugt worden waren, wurden anschließend im Western Blot auf ihre Reaktivität mit PLHV-1-gB1-GST untersucht.

Während für die Überstände B11C12, G7D3 und B5B3 keine Reaktivität mit PLHV-1-gB1-GST im Western Blot nachgewiesen werden konnte, waren die Überstände B1H9, G8E9 und B5B3 reaktiv (Abb. 16). Diese drei Überstände detektierten zwei Proteinbanden, eine bei 50 kDa und eine bei etwa 45 kDa. Die 50 kDa Proteinbande entsprach dem PLHV-1-gB1-GST. Bei der 45 kDa Proteinbande handelte es sich vermutlich um ein Abbauprodukt von PLHV-1-gB1-GST oder um nicht vollständig translatiertes PLHV-1-gB1-GST.

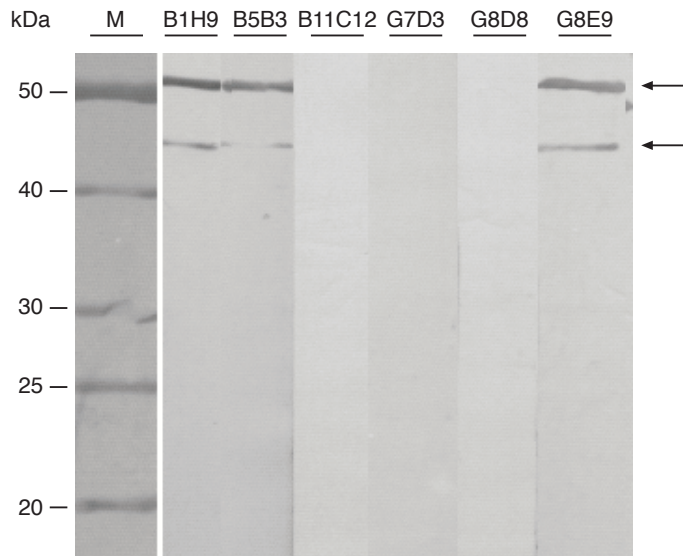


Abb. 16: Reaktivität von anti-PLHV-1-gB1-Überständen von Hybridomazellen im Western Blot

Sechs Überstände von Hybridomazellen wurden im Western Blot auf ihre Reaktivität mit PLHV-1-gB1-GST (1 µg je Streifen) getestet. Untersucht wurden die Überstände B1H9, B5B3, B11C12, G7D3, G8D8 und G8E9 (jeweils 1:50 verdünnt). Als Sekundärantikörper wurde ein AP-konjugiertes, anti-Maus-IgG-Antiserum (1:2500 verdünnt) aus der Ziege verwendet. Links in der Abbildung wurden die Banden eines Proteinstandards (Protein Ladder 10-200 kDa) nach Western Blot irreversibel mit Amidoschwarz angefärbt. Die Molekulargewichte der einzelnen Banden sind in kDa angegeben. Die Pfeile kennzeichnen die Lage von PLHV-1-gB1-GST (etwa 50 kDa) und von einer Nebenbande bei etwa 45 kDa.

Die Kontrollüberstände anti-38/17C1 und anti-38/15H7 zeigten eine sehr schwache Reaktion mit PLHV-1-gB1-GST, während der anti-X63-Überstand keine Reaktion zeigte (Abb. 17) und deshalb für die Durchführung von Kontrollen in die immun-histochemische Untersuchung miteinbezogen wurde.

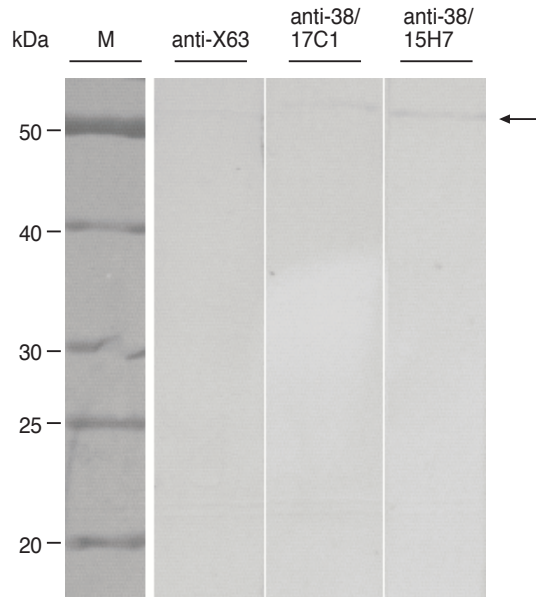


Abb. 17: Reaktivität von monoklonalen Kontrollantikörpern im Western Blot

Monoklonale Kontrollantikörper wurden im Western Blot auf ihre Reaktivität mit PLHV-1-gB1-GST getestet. Dazu wurden die monoklonalen Antikörper 1:50 verdünnt und mit jeweils 1 µg PLHV-1-gB1-GST für 1h bei 37°C inkubiert. Das Konjugat wurde in einer Verdünnung von 1:2500 eingesetzt. Untersucht wurden die Überstände anti-X63, anti-38/17C1 und anti-38/15H7. Links in der Abbildung wurden die Banden eines Proteinstandards (Protein Ladder 10-200 kDa) nach Western Blot irreversibel mit Amidoschwarz angefärbt. Die Molekulargewichte der einzelnen Banden sind in kDa angegeben. Der Pfeil kennzeichnet die Lage von PLHV-1-gB1-GST (etwa 50 kDa).

3.3.6 Entwicklung eines ELISA zum Nachweis von PLHV-Infektionen beim Schwein

Für den Nachweis von anti-PLHV-Antikörpern in Blut- und Milchserum von Schweinen wurde ein indirekter ELISA entwickelt. Da weder positive noch negative Referenzseren vom Schwein existierten wurden Referenzseren durch Immunisierung von Mäusen mit gB-Teilproteinen von PLHV-1 erzeugt. Für den ELISA wurden alle reaktiven Maus-anti-PLHV-1-gB1-GST-Antiseren zu einem Positivserum (PS) gepoolt. Die gepoolten Prä-Immunsereen aller Tiere dieser Behandlungsgruppe wurden als Negativserum (NS) eingesetzt. Als feste Phase wurden Ni-NTA-HisSorb-Mikrotiterplatten verwendet, an denen als Antigen das His-Fusionsprotein von PLHV-1-gB1 (PLHV-1-gB1-His-pTriEx) gebunden wurde. Als Konjugat wurde ein mit AP-gekoppelter, Ziege-anti-Maus-IgG-Zweitantikörper verwendet. Vor Verwendung der Seren wurden diese an "E.coli-Proteinpuder" adsorbiert. Da sich die Extinktionen der Seren vor und nach Adsorption allerdings nicht unterschieden, wurde die Bindung kreuzreagierender anti-E.coli-Antikörper an das auf der Mikrotiterplatte fixierte Antigen ausgeschlossen und die Adsorption von Testseren an "E.coli-Proteinpuder" bei den folgenden Untersuchungen nicht mehr durchgeführt. Nach Optimierung in Vorversuchen wurde mit dem ELISA die Seroprävalenz von PLHV-1 in Schweinen bestimmt (Kap. 3.3.7.2). PTLD-erkrankte

Miniaturschweine wurden auf anti-PLHV-Antikörper (Kap. 3.3.7.4) und Kolostrumproben von Zuchtsauen auf maternale Antikörper untersucht (Kap. 3.3.7.5). Jungtiere wurden über einen Zeitraum von fünf Monaten serologisch beobachtet (Kap. 3.3.7.3). Humanseren wurden auf anti-PLHV-1-Antikörper untersucht (Kap. 3.3.8).

3.3.6.1 Vorversuche zur Optimierung des ELISA

Durch Schachbrett-Verdünnung (Abb. 6, Kap. 3.2.4.1.1) über eine 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden die optimale Antigenmenge und die günstigste Serum- und Konjugatverdünnung zur Durchführung zukünftiger ELISA bestimmt. Zuerst wurde das Antigen (Ag) gegen PS und NS titriert, dann das Konjugat (K) gegen PS und NS. Von den Extinktionen jeder Kombination Ag/PS bzw. K/PS wurden die Extinktionen der entsprechenden Kombination Ag/NS bzw. K/NS subtrahiert, um diejenige Kombination der beiden Reaktanden zu bestimmen, die die größtmöglichen Extinktionsunterschiede zwischen PS und NS bei gleichzeitig möglichst geringer Hintergrundreaktion ergab.

3.3.6.1.1 Ermittlung der geeigneten Antigenmenge und Serumverdünnung

Zur Ermittlung der geeigneten Antigenmenge für die Plattenbeschichtung und der optimalen Verdünnung von NS und PS wurden verschiedene Antigenmengen (0,03 µg bis 1,25 µg PLHV-1-gB1-His-pTriEx pro Vertiefung) so mit den Serumverdünnungen (1:10 bis 1:1600) kombiniert, dass man die einzelnen Paarungen miteinander vergleichen konnte. Die größte Extinktionsdifferenz zwischen PS und NS betrug 1,120 und ergab sich bei einer Antigenmenge von 1,25 µg pro Vertiefung in Kombination mit einer Serumverdünnung von 1:10 (Abb. 18). Allerdings betrug die Extinktion der Serum-Kontrolle bei dieser Serumverdünnung 0,305 (Abb. 19) und lag damit deutlich über dem Plattenbackground (um 0,070). Deshalb musste auf ein stärker verdünntes Serum zurückgegriffen werden, bei dem die Differenz in der Extinktion zwischen PS und NS ausreichend groß war, die unspezifischen Reaktionen aber in einem akzeptableren Rahmen lagen. Diese Bedingungen waren bei einer Serumverdünnung von 1:50 gegeben. Bei dieser Serumverdünnung in Verbindung mit einer Antigenmenge von 1,25 µg pro Vertiefung betrug der Extinktionsunterschied zwischen PS und NS 0,912 (Abb. 18) bei einer Extinktion der Serum-Kontrolle von 0,116 (Abb. 19). Die Extinktionen der Antigen-, Konjugat- und Substrat-Kontrolle lagen unter den genannten Bedingungen bei 0,070.

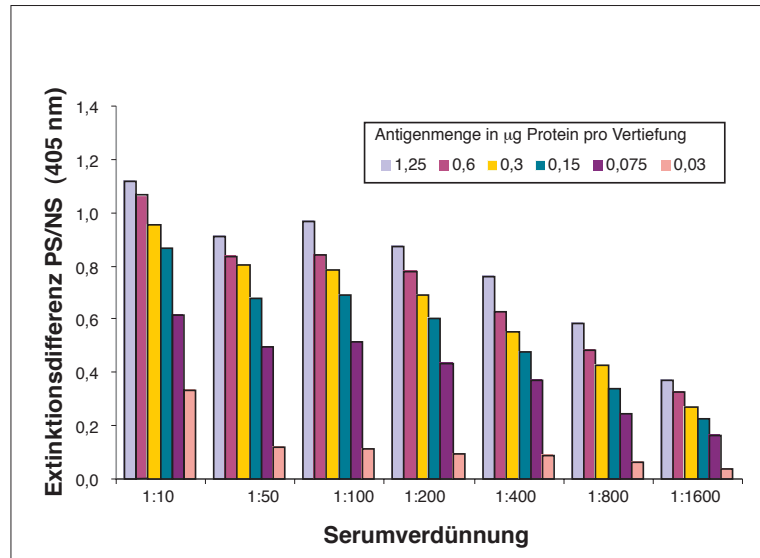


Abb. 18: Titration von Antigen gegen Serum

Dargestellt sind die relativen Extinktionsdifferenzen zwischen Positiv- und Negativserum in Abhängigkeit von der Antigenmenge und der Serumverdünnung. Auf der Abszisse sind die Serumverdünnungen aufgetragen (1:10 bis 1:1600), auf der Ordinate sind die Extinktionsdifferenzen bei einer Wellenlänge von 405 nm angegeben. Die unterschiedlichen Proteinmengen (0,03 µg bis 1,25 µg je Vertiefung) sind durch verschiedene Graustufen der Säulen gekennzeichnet.

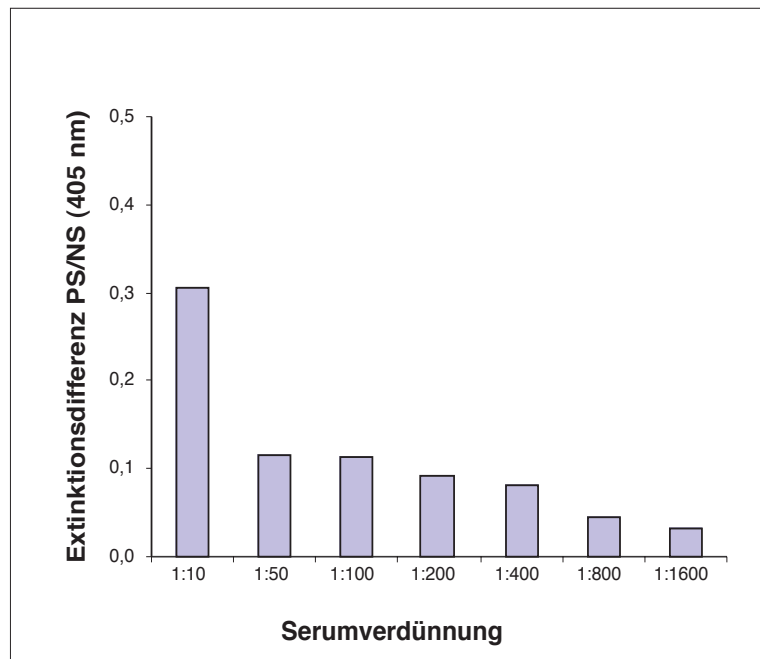


Abb. 19: Serum-Kontrolle in Abhängigkeit von der Serumverdünnung

Zur Kontrolle, ob das Serum unspezifisch an die Platten bindet, wurden Vertiefungen ohne Antigen mit verschiedenen Serumverdünnungen inkubiert (= Serum-Kontrolle). Die Differenz zwischen der Extinktion des PS und des NS auf unbeschichteten Platten bei 405 nm ist in Abhängigkeit von der Serumverdünnung dargestellt.

3.3.6.1.2 Ermittlung der optimalen Konjugatverdünnung

Ebenfalls in einer Schachbrett-Verdünnung wurde die geeignete Konjugatverdünnung für nachfolgende ELISA-Untersuchungen bestimmt. Das Konjugat wurde dabei in Verdünnungen von 1:625 bis 1:40000 gegen das 1:50 bis 1:51200 verdünnte Serum titriert. Die Platten waren mit einer konstanten Antigenmenge von 1,25 µg pro Vertiefung beschichtet. Es wurden wieder die Extinktionsunterschiede zwischen PS und NS bestimmt. Bei einer Serumverdünnung von 1:50 und einer Konjugatverdünnung von 1:625 hatte die Differenz ihren maximalen Wert und lag bei 1,699 (Abb. 20). Allerdings hatte die Substrat-Kontrolle bei dieser Paarung eine Extinktion von 0,129 (nicht gezeigt). Bei gleichbleibender Serumverdünnung und einer Konjugatverdünnung von 1:1250 lag die Extinktion der Substrat-Kontrolle bei 0,092 bei immer noch ausreichender Differenz zwischen PS und NS von 0,971 (Abb. 20). Bei weiterer Verdünnung des Konjugats nahm auch die Extinktion der Substrat-Kontrolle weiter ab, allerdings auf Kosten der Differenz zwischen PS und NS, die bei einer Konjugatverdünnung von 1:2500 nur noch 0,546 betrug (Abb. 20). Deshalb und aus rein verdünnungstechnischen Gründen wurde eine Konjugatverdünnung von 1:1000 für alle folgenden Untersuchungen als geeignet angesehen.

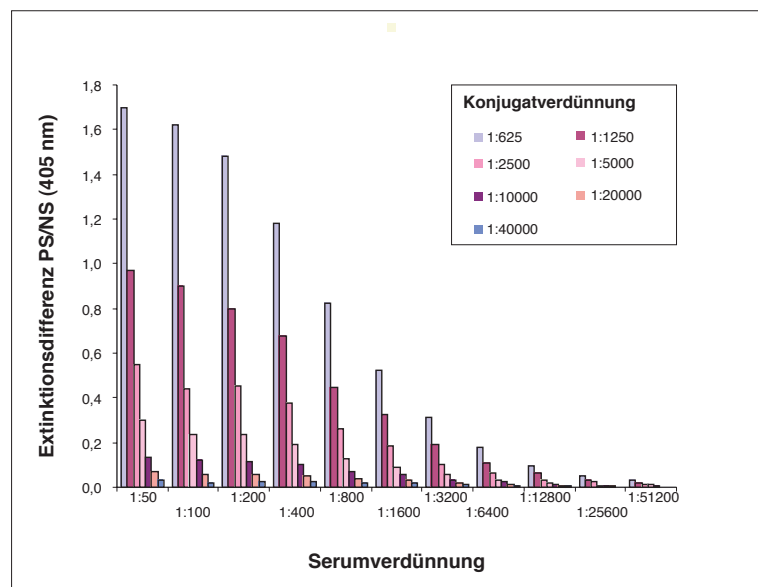


Abb. 20: Titration von Serum gegen Konjugat

Dargestellt sind die Extinktionsdifferenzen zwischen Positivserum (PS) und Negativserum (NS) in Abhängigkeit von der Serum- und Konjugatverdünnung. Die Serumverdünnungen (1:50 bis 1:51200) sind auf der Abszisse aufgetragen, die Ordinate zeigt die Differenz der Extinktionen von PS und NS bei 405 nm. Die unterschiedlichen Konjugatverdünnungen sind durch unterschiedliche Graustufen der Säulen gekennzeichnet.

Aus den Vorversuchen ergab sich, dass für alle folgenden ELISA-Untersuchungen die Platten mit 1,25 µg PLHV-1-gB1-His-pTriEx pro Vertiefung beschichtet wurden, dass

das negative und das positive Mäuseserum als Referenzseren in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt wurden und dass das Konjugat (Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper, AP-konjugiert) in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet wurde.

3.3.7 Untersuchung von Schweineseren

3.3.7.1 ELISA-Auswertung

Für die Auswertung wurden die Mittelwerte der Extinktionen jeder Serumprobe gebildet und die gemittelten Extinktionen der Serum-Kontrollen subtrahiert. Um die gemessenen Extinktionen von verschiedenen Mikrotiterplatten miteinander vergleichen zu können, wurden die relativen Extinktionen aller Serumproben berechnet. Als Bezugswert diente dazu die Extinktion des positiven anti-PLHV-1-gB1-GST-Referenzserums von der Maus (= PS), die gleich 100% gesetzt wurde. Neben dem PS wurde zur qualitativen Kontrolle der Versuchsdurchführung das Prä-Immuserum aus der Maus als negatives Referenzserum mitgeführt (beide in Dreifachbestimmung). Als weitere Kontrollen wurden neben der Serum-Kontrolle auf jeder Platte die Antigen-Kontrolle und die Konjugat-Kontrolle in Doppelansätzen bestimmt. Aufgrund geringer Extinktion der Substrat-Kontrolle in den Vorversuchen wurde auf diese Kontrolle in den Folgeversuchen verzichtet. Bei der Untersuchung von Schweineseren waren mehrere Seren aufgefallen, deren Extinktionen im Bereich der Extinktion des negativen Maus-Referenzserums lagen. Von diesen Tieren wurde angenommen, dass sie anti-PLHV-Antikörper-negativ waren oder Antikörper in nicht messbaren Mengen enthielten. Vier dieser Seren wurden zu einer seronegativen Vergleichsgruppe zusammengefasst und bei allen nachfolgenden ELISA-Untersuchungen von Schweineseren als Vergleichs-seren auf der Platte mitgeführt (Doppelansatz einschließlich Serum-Kontrollen). Es handelte sich dabei um die Serumprobe eines Neugeborenen (Probe 39), von zwei 18 Tage alten Ferkeln (Proben 2232 und 2233) und von einem 26 Tage alten Ferkel (Probe 461). Für die Auswertung wurden „*Box-and-Whisker-Plots*“ angefertigt (zur Erläuterung siehe Kap. 3.2.5) und die Medianwerte, die Interquartilsabstände und die Spannweiten der untersuchten Gruppe mit den Werten der Vergleichsgruppe verglichen. Außerdem wurde der *cut-off* der seronegativen Vergleichsgruppe berechnet nach folgender Formel (Crowther, 2001):

$$\textit{cut-off} = \text{Mittelwert der relativen Extinktionen negativer Seren aller Versuche} + 3 \times \text{Standardabweichung.}$$

Der danach berechnete *cut-off* betrug 6,3%. Alle Seren, deren mittlere relative Extinktion unterhalb des *cut-off* lag bzw. gleich dem *cut-off* war, wurden als anti-PLHV-

Antikörper-negativ bewertet. Alle Seren mit einer relativen Extinktion über dem *cut-off* wurden als seropositiv eingestuft.

3.3.7.2 Seroprävalenz von PLHV in Schweinen

Für die Untersuchung der Seroprävalenz von PLHV in Schweinen wurden Serumproben von Schlachttieren (BB), SPF-Miniaturschweinen (DK), Zuchtsauen (Zs), Jungsaugen (Js) und Ferkeln (F) herangezogen. Als Vergleichsseren wurden vier Seren verwendet, die aufgrund ihrer geringen relativen Extinktion als anti-PLHV-Antikörper-negativ betrachtet wurden (Kap. 3.3.7.1). Diese wurden als Negativkontrollen (NK) auf jeder Platte mitgeführt. Die durch die serologische Untersuchung erhobenen Daten sollten anschließend mit den Ergebnissen der PCR-Untersuchung (Kap. 3.3.12.1) verglichen werden. Die relativen Extinktionen aller Tiere einer Gruppe wurden in Form von *“Box-and-Whisker-Plots”* dargestellt (Abb. 21).

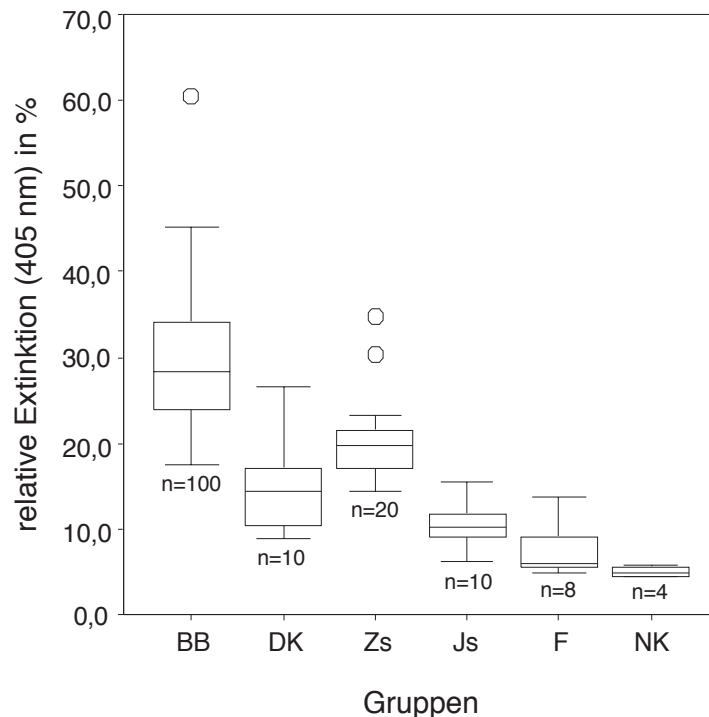


Abb. 21: Relative Extinktionen von Schweineseren unterschiedlicher Herkunft

Zur Untersuchung der Seroprävalenz von PLHV bei Schweinen standen Seren von Tieren unterschiedlicher Herkunft und verschiedenen Alters zur Verfügung. Bei den untersuchten Proben handelte es sich um Seren von Schlachttieren (BB), von SPF-Miniaturschweinen (DK), von Zuchtsauen (Zs), von Jungsaugen (Js) und von Ferkeln (F). Für den ELISA wurden die Seren 1:50 verdünnt und mit in 96-Loch-Platten immobilisiertem PLHV-1-gB1-His (1,25 µg je Vertiefung) inkubiert. Der AP-konjugierte Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Die Abbildung gibt die Verteilung der relativen Extinktionen bei 405 nm innerhalb einer Gruppe wieder. Ganz rechts in der Abbildung sind die relativen Extinktionen der Vergleichsgruppe (NK) dargestellt. Die Probenanzahl (n) innerhalb einer Gruppe ist unter den *“Box-Plots”* angegeben. Kreise (o) markieren Ausreisser. Der Übersicht wegen ist der *cut-off* (6,3%) nicht eingezeichnet.

Die einzelnen Gruppen wurden durch Bestimmung der Lage- und Streuungsmaße (Tabelle 19) mit der Vergleichsgruppe (NK) verglichen. Der Medianwert - der Wert, über und unter dem 50% der Werte liegen - ist bei allen Gruppen höher als der Medianwert der Vergleichsgruppe (4,9%) und schwankt zwischen 6% und 28,3%. Die Streuung der gemessenen Extinktionen wurde durch die Spannweite (Differenz zwischen maximal und minimal gemessenen Wert) und dem Interquartilsabstand (IQR) (Abstand zwischen 1. und 3. Quartil, in dem 50% der Wert liegen) ausgedrückt. Die Spannweite war vor allem bei der Gruppe BB sehr hoch und lag bei 43%, während die Spannweiten der anderen Gruppen zwischen 9% und 20,3% lagen. Die Spannweite der NK betrug nur 1,4%. Der IQR lag bei den Gruppen Js, F, Zs und DK zwischen 3,4% und 7,7% (entsprach etwa dem 3- bis 6-fachen der Vergleichsgruppe) und bei der Gruppe BB über 10%.

Tabelle 19: Lage- und Streuungsmaße (in %) zur Untersuchung der Seroprävalenz von PLHV-1

Gruppe	Probenanzahl (n)	Minimum	Maximum	Perzentile			Spannweite	Interquartilsabstand
				25 (= 1.Quartil)	50 (= Median)	75 (= 3.Quartil)		
BB	100	17,5	60,5	24,0	28,3	34,2	43,0	10,3
DK	10	8,9	26,6	10,1	14,4	17,8	17,7	7,7
Zs	20	14,4	34,7	16,4	19,7	21,6	20,3	5,1
Js	10	6,1	15,6	8,6	10,3	12,0	9,5	3,4
F	8	4,8	13,8	5,5	6,0	9,5	9,0	4,0
NK	4	4,4	5,8	4,5	4,9	5,7	1,4	1,2

Die Messwerte aller Seren der Gruppen BB, DK und Zs lagen oberhalb des *cut-off*, der 6,3% betrug (Kap. 3.3.7.1). Die Seroprävalenz in diesen Gruppen betrug 100%. Bei der Gruppe Js lag der niedrigste gemessene Wert bei 6,1% und damit unterhalb des *cut-off* von 6,3%. Dieses Serum wurde als anti-PLHV-Antikörper-negativ deklariert. Die relativen Extinktionen aller anderen Seren dieser Gruppe lagen über dem *cut-off*. Die Seroprävalenz betrug in dieser Gruppe demnach 90%. Bei näherer Betrachtung der Einzelmesswerte der Gruppe F (nicht dargestellt) fielen fünf Seren auf, deren relative Extinktionen zwischen 4,8% und 6,1% und damit ebenfalls unter dem *cut-off* von 6,3% lagen. Diese Seren wurden als anti-PLHV-Antikörper-negativ beurteilt. Alle anderen Seren dieser Gruppe waren anti-PLHV-Antikörper-positiv. Die Seroprävalenz in dieser Gruppe betrug 38%.

3.3.7.3 Serologische Beobachtung von Jungtieren

Für die serologische Beobachtung von zwölf Jungtieren über einen Zeitraum von etwa fünf Monaten, beginnend um den Zeitpunkt der Geburt, wurden je Tier acht bis neun Serumproben untersucht. Die Proben wurden entsprechend ihres Entnahmepunktes verschiedenen Altersklassen zugeordnet. Da in den ersten vier Lebenswochen mit den größten Veränderungen zu rechnen war, wurden in diesem Zeitraum einwöchige Intervalle gewählt, danach 4-Wochen-Intervalle. Die durch ELISA-Untersuchung gewonnenen Daten sollten anschließend mit den durch PCR erhobenen Daten (Kap. 3.3.12.1) verglichen werden. Die Verteilung der relativen Extinktionen jeder Altersklasse wurde als "Box-and-Whisker-Plot" dargestellt (Abb. 22).

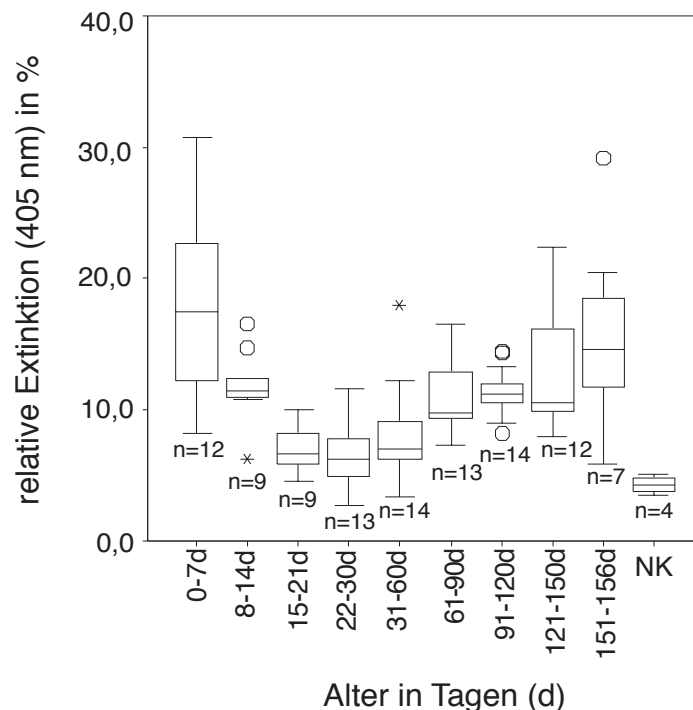


Abb. 22: Relative Extinktionen der Seren von Jungtieren in Abhängigkeit vom Alter

Für die serologische Beobachtung von Jungtieren von der Geburt bis zu einem Alter von etwa fünf Monaten wurden von jedem Tier acht bis neun Serumproben im ELISA untersucht. Dazu wurden die Seren 1:50 verdünnt und mit PLHV-1-gB1-His (1,25 µg pro Vertiefung) inkubiert. Die Visualisierung gebildeter Immunkomplexe erfolgte nach Inkubation mit einem AP-konjugiertem Sekundärantikörper und Substratzugabe (p-Dinitrophenylphosphat). Die Platten wurden in einem Multiskan Plus bei 405 nm ausgewertet. Die Abbildung zeigt die relativen Extinktionen der Serumproben in Abhängigkeit vom Alter der Tiere. Die Proben sind in neun Altersklassen eingeteilt: 0-7d, 8-14d, 15-21d, 22-30d, 31-60d, 61-90d, 91-120d, 121-150d und 151-156d. Auf der Abszisse ist das Alter der Tiere in Tagen (d) angegeben. Ganz rechts in der Abbildung sind die relativen Extinktionen der anti-PLHV-1-Antikörper-negativen Kontrollgruppe (NK) dargestellt. Die Anzahl der Serumproben pro Altersklasse (n) stehen unterhalb der "Box-Plots". Ausreisser (o) und Extremwerte (x) sind ebenfalls dargestellt. Der cut-off (6,3%) wurde der Übersicht wegen nicht eingezeichnet.

Die Medianwerte aller Altersklassen lagen über dem Medianwert der seronegativen Kontrollgruppe (NK), der einen Wert von 4,3% einnahm (3.3.7.3). In der ersten Woche

(0-7d) lag der Medianwert bei 17,4%. Er nahm dann ab und hatte in der vierten Woche (22-30d) seinen niedrigsten Wert (6,3%) erreicht. Ab dem zweiten Lebensmonat (31-60d) stieg der Medianwert bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes (151-156d) wieder an. Auch die Streuungsmaße der einzelnen Altersklassen, Spannweite und IQR, lagen über den Werten der NK, die in dieser Gruppe 1,6% bzw. 1,3% betragen. Die Spannweiten waren vor allem in der ersten (0-7d) und letzten Altersklasse (151-156d) sehr hoch und lagen über 20%. In den dazwischen liegenden Altersklassen lag die Spannweite zwischen 5,5% (15-21d) und 14,6% (31-60d). Der IQR erreichte seine höchsten Werte in der ersten Woche (11,7%) und zum Ende des Beobachtungszeitraumes zwischen den Tagen 121-156 (8,2-8,9%). In den Wochen dazwischen schwankte der IQR zwischen 2,0% (91-120d) und 4,2% (61-90d).

Tabelle 20: Lage- und Streuungsmaße (in %) bei Jungtieren

Alters- klassen (d=Tage)	Proben- anzahl (n)	Minimum	Maximum	Perzentile			Spann- weite	Interquartils- abstand (IQR)
				25 (= 1.Quartil)	50 (= Median)	75 (= 3.Quartil)		
0-7d	12	8,2	30,8	12,2	17,4	23,9	22,6	11,7
8-14d	9	6,3	16,5	10,9	11,5	13,6	10,2	2,7
15-21d	9	4,5	10,0	5,3	6,6	9,1	5,5	3,8
22-30d	13	2,8	11,6	4,7	6,3	8,2	8,8	3,5
31-60d	14	3,4	18,0	5,9	7,0	9,1	14,6	3,2
61-90d	13	7,3	16,6	9,4	9,8	13,6	9,3	4,2
91-120d	14	8,2	14,5	10,4	11,3	12,3	6,3	2,0
121-150d	12	8,0	22,4	9,8	10,6	18,0	14,4	8,2
151-156d	7	5,8	29,2	11,5	14,6	20,4	23,4	8,9
NK	4	3,5	5,1	3,7	4,3	5,0	1,6	1,3

Bei Betrachtung der Einzelwerte (nicht dargestellt) und Vergleich mit dem *cut-off* wurden insgesamt dreizehn Seren als anti-PLHV-Antikörper-negativ eingestuft und 90 Seren als positiv. Tabelle 21 zeigt eine Übersicht der Verteilung negativer und positiver Seren in absoluten Zahlen und als relativer Anteil der Altersklasse, ausgedrückt in Prozent. In den ersten zwei Lebenswochen sowie ab dem dritten Lebensmonat bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes betrug der Anteil positiver Seren in den jeweiligen Altersklassen 86-100%. Von der dritten Lebenswoche bis zum Ende des zweiten Lebensmonats lag der Anteil positiver Seren zwischen 31% und 43%.

Tabelle 21: Verteilung negativer und positiver Seren in den Altersklassen

Altersklasse	Anzahl Seren	negative Seren	positive Seren
0-7d	12	0	12 (100%)
8-14d	9	1 (11%)	8 (89%)
15-21d	9	4 (44%)	5 (56%)
22-30d	13	7 (54%)	6 (46%)
31-60d	14	5 (36%)	9 (64%)
61-90d	13	0	13 (100%)
91-120d	14	0	14 (100%)
121-150d	12	0	12 (100%)
151-156d	7	1 (14%)	6 (86%)

rel. Ext. = relative Extinktion

In Abb. 23 sind der zeitliche Verlauf der IgG-Antwort gegen PLHV und die PCR-Ergebnisse für jedes einzelne Schwein dargestellt. Nach Abfall der maternalen Antikörper wurde bei allen Tieren ein Wiederanstieg der anti-PLHV-Antikörper beobachtet und die Tiere deshalb als seropositiv beurteilt. Bei fünf Tieren wurde ein deutlicher Anstieg beobachtet (Tier 447, 468, 472, 478 und 479), während bei zwei Tieren der anti-PLHV-Antikörper-Gehalt nur langsam, aber kontinuierlich zunahm (448, 526). Bei fünf Tieren nahm der Gehalt anti-PLHV-Antikörpern nach einem flachen Wiederanstieg ein annähernd konstantes Niveau oberhalb des *cut-off* ein (383, 416, 466, 477, 528). Bei zwei Tieren fielen die anti-PLHV-Antikörper wieder ab (Tier 468 und 478), nahmen aber bei Tier 468 erneut zu. Sieben Tiere waren in der PCR PLHV-1-positiv, die restlichen fünf Tiere PLHV-1-negativ (Kap. 3.3.12.1).

Ergebnisse

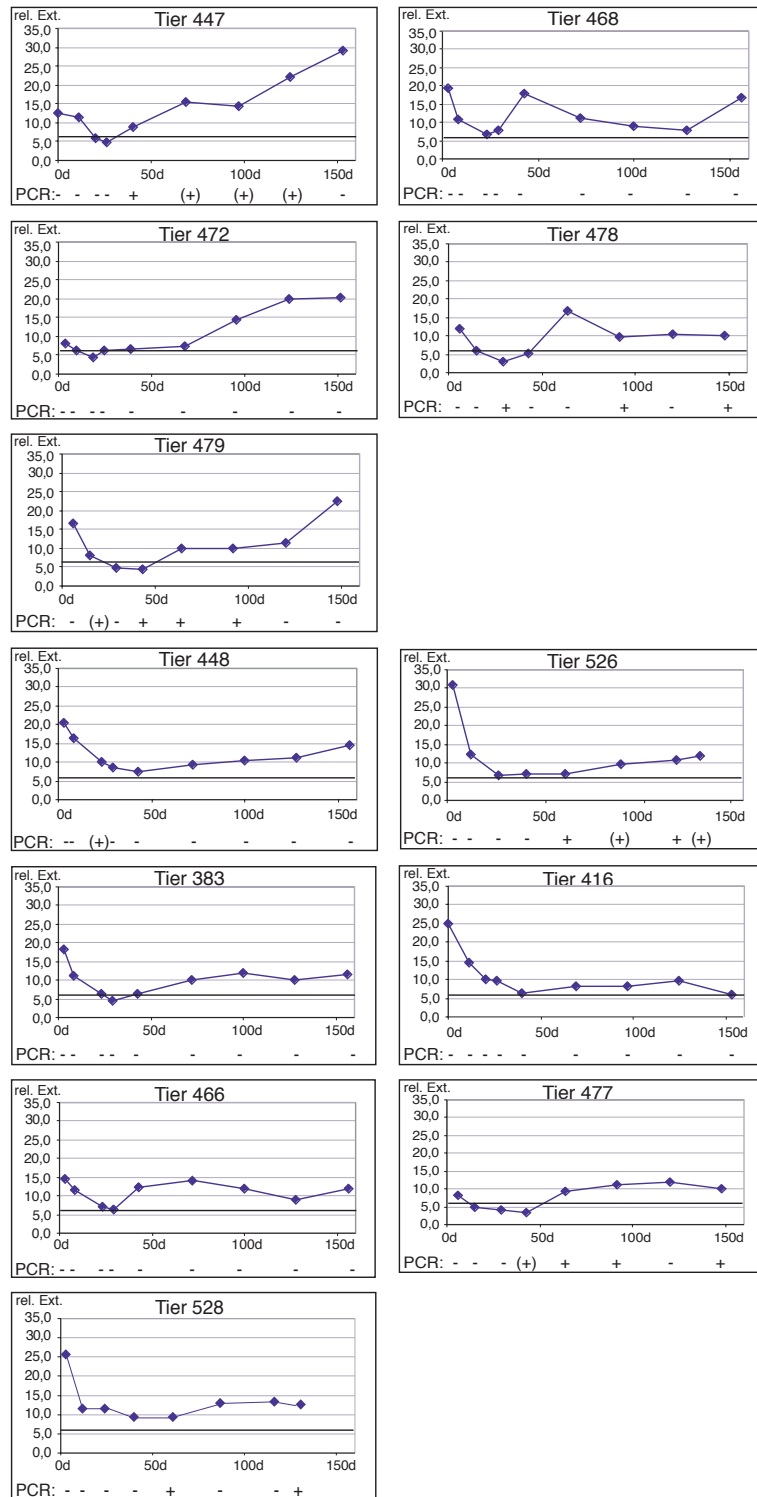


Abb. 23: Zeitlicher Verlauf der IgG-Antwort gegen PLHV-1 bei Jungtieren

In der Abbildung sind die relativen Extinktionen (Ordinate) der Serumproben bei einer Wellenlänge von 405 nm in Abhängigkeit vom Alter der Tiere (Abszisse) als Punktdiagramm dargestellt. Jedes Diagramm zeigt den Verlauf der IgG-Antwort eines einzelnen Tieres. Die Tier-Nummer ist als Diagramm-Überschrift vermerkt. Die horizontale Linie beschreibt die Lage des *cut-off* (6,3%). Unterhalb der Abszisse sind die Ergebnisse der PCR-Untersuchung (Kap. 3.3.12.1) der entsprechenden Probe dargestellt. Dabei bedeuten: -, PLHV-1-negativ, +, PLHV-1-positiv, (+): schwach PLHV-1-positiv.

3.3.7.4 Untersuchung von PTLD-erkrankten Miniaturschweinen

Die Seren von vier an PTLD erkrankten Miniaturschweinen stammten aus einer Studie des Massachusetts General Hospital in Boston/USA, in der an einem Tiermodell die Pathogenese der EBV-assoziierten PTLD untersucht wurde, um dadurch mögliche Präventionsmaßnahmen und Therapieansätze für die Allotransplantation zu entwickeln. Zur Induktion der PTLD, in deren Pathogenese PLHV-1 involviert ist, wurden den immunsupprimierten Miniaturschweinen allogene Blutstammzellen transplantiert. Durch die serologische Untersuchung erkrankter Tiere sollte die Existenz von anti-PLHV-Antikörpern nachgewiesen werden und untersucht werden, ob sich der Gehalt an anti-PLHV-Antikörpern nach der Transplantation verändert und ob zwischen dieser Veränderung und der Immunsuppression durch Cyclosporin A und der Entwicklung von PTLD ein Zusammenhang besteht. Dafür konnte nur auf eine geringe Anzahl von Seren zurückgegriffen werden. Von drei Tieren (14203, 14801 und 15005) standen Serumproben vor und nach der Transplantation zur Verfügung, von einem Tier (14806) nur ein Serum nach der Transplantation. PCR-Daten zu den Tieren existierten nur unvollständig, so dass hier keine vergleichende Untersuchung der Ergebnisse aus der PCR und der Serologie erfolgten.

Bei allen Seren bis auf eins (Tier 14203/d=-6) lagen die relativen Extinktionen oberhalb des *cut-off* (Abb. 24). Die Seren von Tier 15005 und ein Serum von Tier 14801 (d=26) lagen nur knapp über dem *cut-off*. Während bei Tier 14203 eine deutliche Zunahme der anti-PLHV-Antikörper nach der Transplantation beobachtet wurde, fiel der Gehalt an anti-PLHV-Antikörpern bei Tier 14801 ab. Bei Tier 15005 waren vor und nach Transplantation ähnliche Mengen an anti-PLHV-Antikörpern im Serum vorhanden. Für Tier 14806 konnte kein Vergleich zwischen den Antikörpermengen vor und nach Transplantation erfolgen, da ein Prä-Serum nicht zur Verfügung stand.

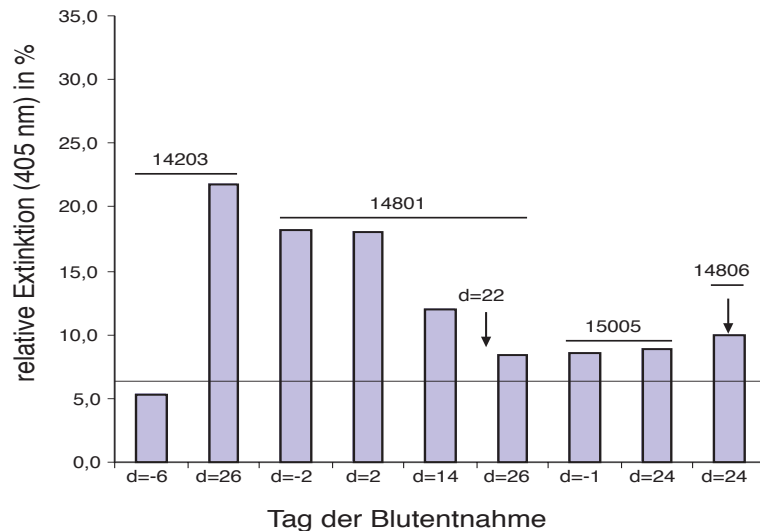


Abb. 24: Relative Extinktionen von Seren PTLD-erkrankter Schweine

Die Seren von vier Miniaturschweinen (14203, 14801, 15005 und 14806) wurden im ELISA auf anti-PLHV-Antikörper untersucht. Dazu wurden die Seren 1:50 verdünnt und mit PLHV-1-gB1-His (1,25 µg je Vertiefung) inkubiert. Der AP-konjugierte Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:2500 eingesetzt. Die Abszisse gibt die Zeitpunkte der Blutentnahmen an (Tag 0 = Tag der Transplantation). Die Pfeile kennzeichnen den Tag, an dem die ersten Symptome der PTLD bei den Tieren auftraten. Der Ausbruch der PTLD bei den Tieren 14203 und 15005 erfolgte erst nach dem Beobachtungszeitraum (Tag 45 bzw. Tag 40) und wurde deshalb nicht dargestellt. Die durchgezogene Linie gibt die Lage des *cut-off* (6,3%) an.

3.3.7.5 Untersuchung von Kolostrum auf maternale anti-PLHV-Antikörper

Kolostrumproben von zwanzig Zuchtsauen wurden im ELISA auf anti-PLHV-Antikörper untersucht und mit den Ergebnissen der Blutserologie (Kap. 3.3.7.2) verglichen. Die relative Extinktion des Milchserums ist vergleichend zu der relativen Extinktion des Blutserums für jedes untersuchte Tier in Abb. 25 dargestellt.

Die relativen Extinktionen der Blutseren lagen alle über dem *cut-off* und betragen 14,4% bis 34,7%. Die relativen Extinktionen der Milchserumproben schwankten zwischen 2,9% und 18,9% und lagen damit deutlich niedriger als die Extinktionen der Blutseren. Nur die Kolostrumproben der Zuchtsauen 2386 (7,3%), 2390 (18,9%), 2395 (10,4%), 2396 (8%), 2397 (6,9%), 2398 (8,3%) und 2401 (11,3%) lagen über dem *cut-off* und wurden als seropositiv bewertet. Im Vergleich zur serologischen Untersuchung von Blutseren, die eine PLHV-Prävalenz von 100% ergab, betrug die Prävalenz von PLHV in Milchserum nur 35%.

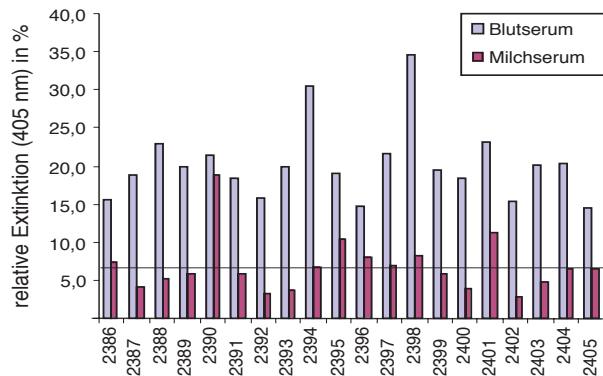


Abb. 25: Relative Extinktionen der Blut- und Milchseren von Zuchtsauen

Blut- und Milchserum von zwanzig Zuchtsauen (Tier 2386-2405) wurden im ELISA auf anti-PLHV-Antikörper untersucht. Die Seren wurden dazu 1:50 verdünnt und mit PLHV-1-gB1-His (1,25 µg pro Vertiefung) inkubiert. Das Ziege-anti-Schweine-IgG-Konjugat wurde in einer 1:1000 Verdünnung eingesetzt. Nach fünfminütiger Inkubation mit dem Substrat (p-Dinitrophenylphosphat) wurden die 96-Loch-Platten im Multiskan Plus bei 405 nm ausgewertet. Die relativen Extinktionen von Blut- und Milchserum sind für jede Zuchtsau nebeneinander als Säulen dargestellt. Die Linie gibt die Lage des *cut-off* (6,3%) an.

3.3.7.6 Untersuchung PCMV-positiver Schweine auf kreuzreagierende Antikörper

Zum Ausschluss einer möglichen Reaktion kreuzreagierender anti-PCMV-Antikörper mit PLHV-1-gB1-His-pTriEx im ELISA wurden drei PCMV-positive Schweineseren (Probe 166K, 166B und VLA-98) getestet. Probe 166K und 166B stammten von experimentell PCMV-infizierten Schweinen (Tag 42 bzw. 83 nach Infektion). Bei der Probe VLA-98 handelte es sich um ein Feldserum. Zum Vergleich wurden fünf PCMV-negative Seren (Probe 1-5) parallel mitgetestet. Die relativen Extinktionen sind in Abb. 26 dargestellt. Während die relativen Extinktionen der PCMV-negativen Seren alle über dem *cut-off* lagen und damit als PLHV-seropositiv bewertet wurden, hatte nur ein PCMV-positives Serum (Probe 166K) eine relative Extinktion knapp über dem *cut-off* und war damit ebenfalls anti-PLHV-Antikörper positiv. Kreuzreaktivitäten wurden nicht beobachtet.

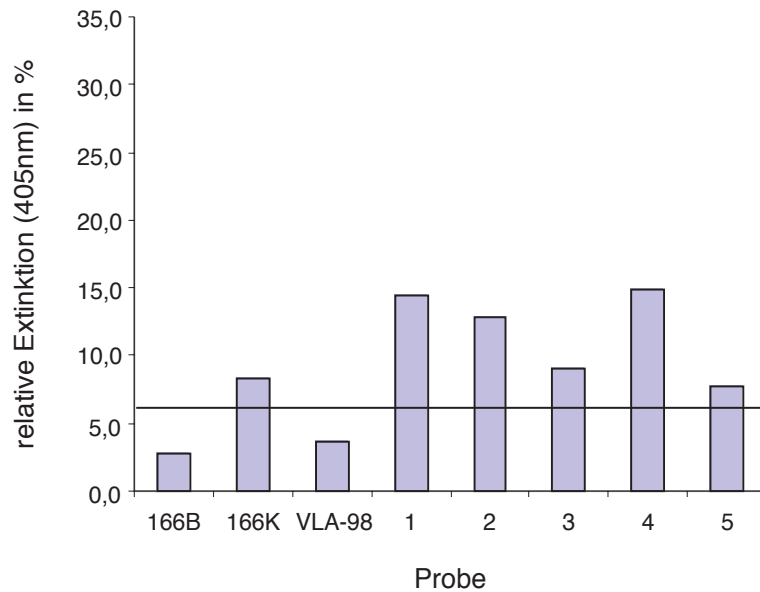


Abb. 26: Relative Extinktionen von PCMV-positiven und PCMV-negativen Schweineseren

Zum Ausschluss, dass kreuzreagierende PCMV-Antikörper zu ELISA-positiven Ergebnissen führen, wurden PCMV-positive und zur Kontrolle PCMV-negative Schweineseren im ELISA untersucht. Dazu wurden die 1:50 verdünnten Seren mit PLHV-1-gB1-His (1,25 µg pro Vertiefung) inkubiert. Nach Inkubation mit einem 1:1000 verdünntem, AP-konjugiertem Sekundärantikörper und Substratzugabe (p-Dinitrophenylphosphat) wurden die 96-Loch-Platten in einem Multiskan Plus bei 405 nm ausgewertet. Das Säulendiagramm zeigt die relativen Extinktionen von drei PCMV-positiven (166B, 166K und VLA-98) und fünf PCMV-negativen Schweineseren (1-5). Die durchgezogene Linie kennzeichnet die Lage des *cut-off* (6,3%).

3.3.8 Untersuchung von Humanseren auf anti-PLHV-Antikörper

Folgende Serumproben wurden auf anti-PLHV-Antikörper untersucht:

- 25 Seren von **Schlachtern** mit direkten Blut-zu-Blut-Kontakt zu Schweinen, die auf verschiedenen Schlachthöfen in Deutschland tätig sind = **Gruppe S**
- Seren von sechs Patienten mit akutem Leberversagen, die bis zur Transplantation einer menschlichen Leber an einen **Bioreaktor** angeschlossen worden waren (Dauer: 8-46 h), der mit Schweineleberzellen ausgekleidet war; die Seren wurden vor der Verbindung mit dem Bioreaktor, vor der Transplantation einer menschlichen Leber und ein Jahr nach der Behandlung gewonnen = **Gruppe BR**
- Seren von elf Diabetikern, denen porcine Pankreas-Inselzellen transplantiert worden waren (Expositionszeit: 1-460 Tage); Seren wurden vor und nach Transplantation der Inselzellen gewonnen = **Gruppe IZ**
- 20 **Kontrollseren** von gesunden Blutspendern = **Gruppe KS**

Zur Untersuchung, ob es Unterschiede in der Immunantwort auf PLHV-1-gB1-His-pTriEx zwischen Gesunden (KS-Gruppe), Personen mit engen Kontakt zu Schweinen (S-Gruppe) und Xenotransplantierten (BR- und IZ-Gruppe) gab, wurden die relativen Extinktionen der Serumproben der einzelnen Untersuchungsgruppen in Form von "Box-and-Whisker-Plots" dargestellt (Abb. 27). Dabei wurden von den Xenotransplantierten jeweils nur die Serumproben nach Kontakt mit porzinen Zellen in die Untersuchung miteinbezogen. Die Seren der Inselzell-Empfänger wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe (IZ1) umfasste Seren, die bis acht Wochen nach Transplantation gewonnen wurden. Seren, die 13 bis 460 Wochen nach der Transplantation gewonnen wurden, wurden zu Gruppe 2 (IZ2) zusammengefasst. Die relativen Extinktionen innerhalb der einzelnen Gruppen, auch der Kontrollgruppe aus gesunden Blutspendern, lagen deutlich höher als die bei den Schweinen beobachteten relativen Extinktionen. Vergleichbare Extinktionen wurden nur bei den Schlachttieren gemessen. Bei fünf Personen lagen die relativen Extinktionen der Seren über dem *cut-off*, der durch die relativen Extinktionen der Kontrollseren berechnet wurde. Dazu zählten ein Patient mit akutem Leberversagen, zwei Diabetiker und zwei Schlachter.

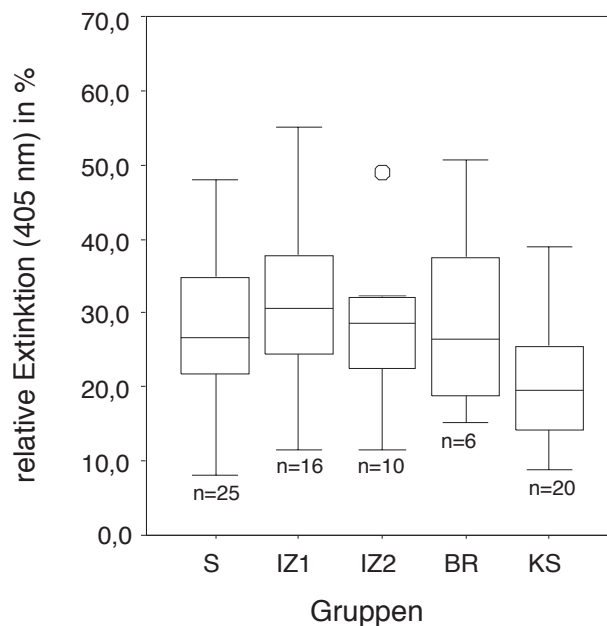


Abb. 27: Relative Extinktionen von Humanseren

Um einen ersten Hinweis auf eine mögliche PLHV-Infektion bei Blut-zu-Blut-Kontakt mit Schweinen und in der Xenotransplantation zu bekommen, wurden Humanseren im ELISA untersucht. Dazu wurden die Seren 1:50 verdünnt und mit PLHV-1-gB1-His (1,25 µg pro Vertiefung) inkubiert. Der AP-konjugierte, Ziege-anti-Mensch-IgG-Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Die relativen Extinktionen von Seren von Schlachtern (S), von Empfängern porziner Inselzellen (IZ1, IZ2) und von Patienten, deren Blut kurzzeitig durch einen mit porzinen Leberzellen ausgekleideten Bioreaktor geleitet worden war (BR), sind gruppenweise als "Box-and-Whisker-Plots" dargestellt. Rechts in der Abbildung sind die relativen Extinktionen gesunder Blutspender (KS) zu sehen. Die Probenanzahl je untersuchter Gruppe (n) ist unterhalb der "Box-Plots" dargestellt. Der Kreis (o) kennzeichnet einen Ausreisser. Der *cut-off*, der 44,1% betrug, wurde der Übersicht wegen nicht eingezeichnet.

Von allen Gruppen wurden die Lage- und Streuungsmaße bestimmt (Tabelle 22) und mit denen der Kontrollgruppe (Gruppe KS) verglichen. Die Medianwerte der untersuchten Proben von Schlachtern (S), Inselzell-Empfängern (IZ1 und IZ2) und von Patienten, die an einen mit Leberzellen ausgekleideten Bioreaktor angeschlossen waren (BR), lagen über dem Medianwert der gesunden Blutspender (KS). Die Streuung der Messwerte, ausgedrückt durch die Spannweite, war bei allen Gruppen sehr hoch und lag zwischen 30,2% (Gruppe KS) und 43,5% (Gruppe IZ1). Der IQR lag besonders bei der Gruppe BR hoch (22,9%). Bei den anderen Gruppen betrug der IQR 11,5% (IZ2) bis 14,3% (IZ1).

Tabelle 22: Lage- und Streuungsmaße (in %) bei Schlachtern und Xenotransplantierten

Gruppe	Probenanzahl (n)	Minimum	Maximum	Perzentile			Spannweite	Interquartilsabstand (IQR)
				25 (=1.Quartil)	50 (=Median)	75 (=3.Quartil)		
S	25	8,0	47,9	21,4	26,6	35,4	39,9	14,0
IZ1	16	11,6	55,1	24,0	30,7	38,3	43,5	14,3
IZ2	10	11,6	49,0	20,6	28,6	32,1	37,4	11,5
BR	6	15,2	50,7	17,9	26,6	40,8	35,5	22,9
KS	20	8,8	39,0	13,8	19,7	25,9	30,2	12,1

In Abb. 28 sind die Ergebnisse der serologischen Untersuchung auf anti-PLHV-Antikörper für jeden Patienten der Gruppe BR einzeln dargestellt. In dieser Untersuchung wurden auch Proben miteinbezogen, die vor Kontakt mit porzinen Zellen gewonnen worden waren. Von den Patienten der Gruppe BR standen je Patient folgende drei Seren zur Verfügung: das prä-BR-Serum (vor Anschluß an Bioreaktor gewonnen), das prä-LT-Serum (vor der Transplantation einer humanen Spenderleber gewonnen) und das post-12-Monate-Serum (zwölf Monate nach Anschluss an Bioreaktor gewonnen).

Die relativen Extinktionen der Patientenserum aus der Gruppe BR waren untereinander sehr unterschiedlich. Die relativen Extinktionen der prä-BR-Seren schwankten zwischen 13% (Patient 7) und 39,6% (Patient 4). Das prä-LT-Serum hatte bei einigen Patienten (Patient 1, 4, 6, 8) eine niedrigere relative Extinktion als das prä-BR-Serum. Nur bei den Patienten 5 und 7 lag die relative Extinktion des prä-LT-Serums über der des prä-BR-Serums, bei Patient 7 allerdings nur minimal. Die relative Extinktion des post-12-Monate-Serums lag bei den Patienten 1, 4, 5 und 7 über der relativen Extinktion des prä-BR-Serums. Das Serum von Patient 4 lag als einziges Serum über dem *cut-off*, der aus den mittleren relativen Extinktionen der Seren der Kontrollgruppe

(KS) berechnet wurde und 44,1% betrug (zur Berechnung des *cut-off* siehe auch Kap. 3.3.7.1).

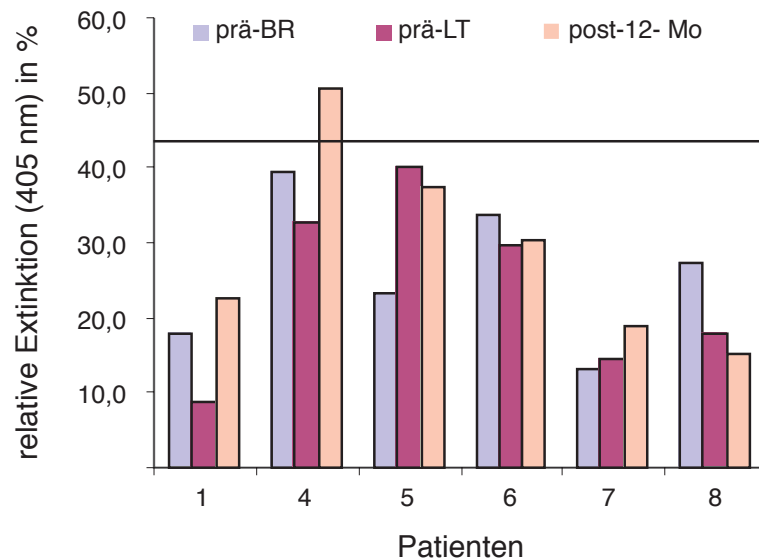


Abb. 28: Relative Extinktionen der Seren von Bioreaktor-Patienten

Zum Nachweis von Veränderungen in der Immunantwort gegenüber PLHV-1-gB1-His vor und nach Kontakt zu Leberzellen vom Schwein wurden die Seren von sechs Patienten (1, 4, 5-8; Nummerierung übernommen aus Irgang (2003)) mit akutem Leberversagen im ELISA untersucht. Dazu wurden von jedem Patienten das prä-BR-Serum (prä-BR), das prä-LT-Serum (prä-LT) und das post-12-Monate-Serum (post-12-Mo) 1:50 verdünnt und mit 1,25 µg PLHV-1-gB1-His inkubiert. Nach Inkubation mit einem 1:1000 verdünnten, AP-konjugierten Sekundärantikörper wurden die 96-Loch-Platten in einem Multiskan Plus bei 405 nm ausgewertet. Die relativen Extinktionen der Patientenserum sind als Säulendiagramm dargestellt. Die horizontale Linie zeigt die Lage des *cut-off* (44,1%) an.

Neben den Patienten der Gruppe BR wurden auch die Seren von Empfängern porziner Pankreas-Inselzellen vor und nach Transplantation untersucht und die anti-PLHV-Antworten miteinander verglichen (Abb. 29). Von jedem Empfänger porziner Pankreas-Inselzellen wurde ein Serum untersucht, das vor der Transplantation gewonnen wurde (prä-XT-Serum), sowie ein bis drei Seren, die eine bis 460 Wochen nach der Transplantation gewonnen wurden (post-XT-Serum). Während bei den zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnenen Seren der einzelnen Patienten ähnliche Extinktionen gemessen wurden, traten zwischen den Patienten teilweise deutliche Unterschiede auf. Die relativen Extinktionen des prä-XT-Serums schwankten zwischen den Patienten im Bereich von 15,8% (Patient A3) bis 39,4% (Patient M3). Die post-XT-Seren der Patienten A1 (460 Wochen nach XT) und M2 (zwei und sechs Wochen nach XT) lagen deutlich über der relativen Extinktion des prä-XT-Serums und auch über dem *cut-off* von 44,1%.

Ergebnisse

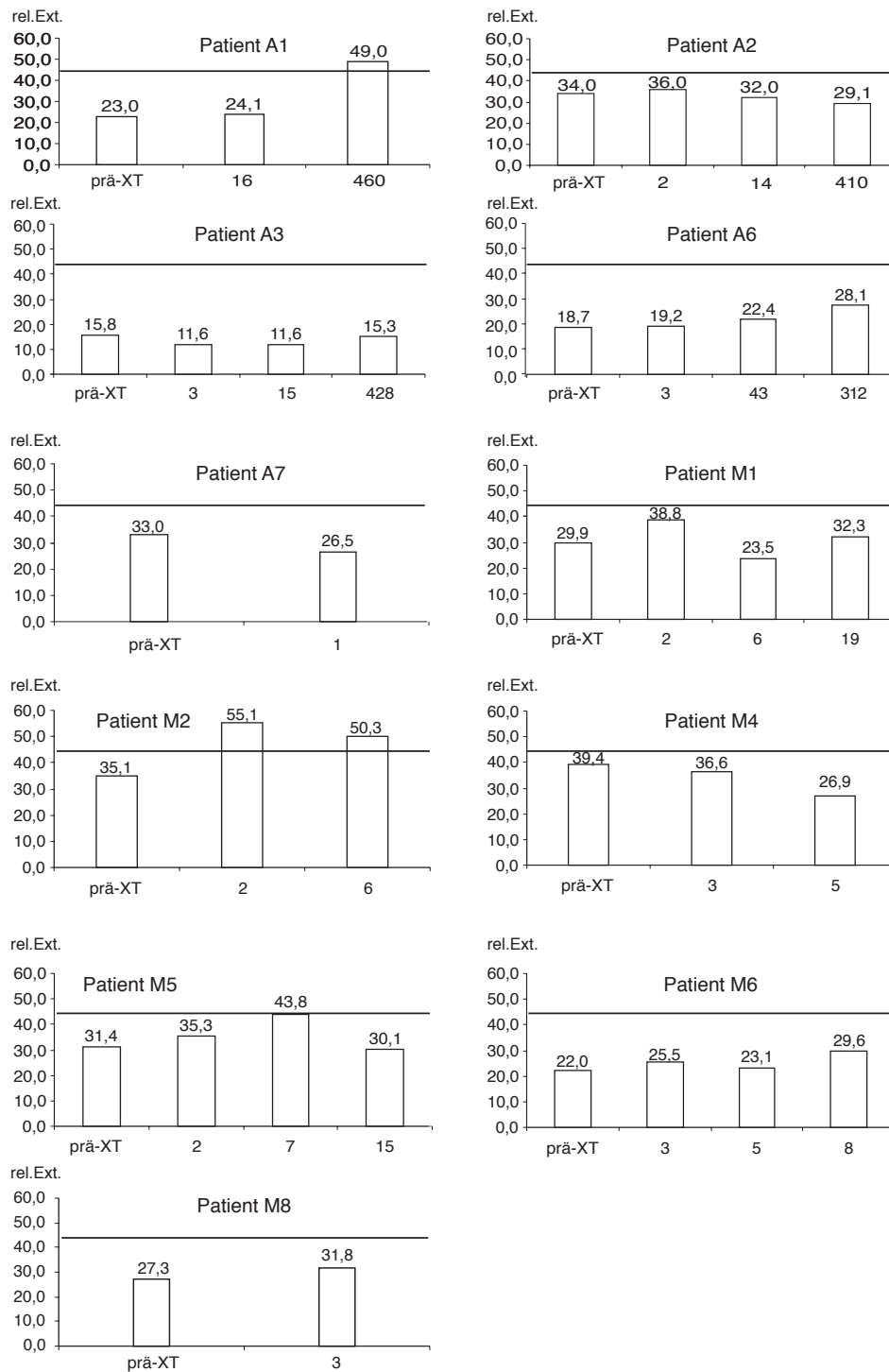


Abb. 29: Relative Extinktionen der Seren von Empfängern von Inselzelltransplantaten

Elf Diabetiker wurden vor und nach Transplantation porziner Inselzellen mittels ELISA auf anti-PLHV-gB-Antikörper untersucht. Die 1:50 verdünnten Seren wurden dazu in einer 96-Loch-Platte mit PLHV-1-gB1-His (1,25 µg pro Vertiefung) inkubiert. Das Konjugat wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Die Platten wurden nach fünfminütiger Inkubation mit dem Substrat (p-Dinitrophenylphosphat) in einem Multiskan Plus bei 405 nm ausgewertet. Für jeden Patienten (A1-A3, A6, A7, M1, M2, M3-M5, M8; Nummerierung übernommen von Irgang, unveröffentlichte Daten) wurde ein Säulendiagramm entworfen, das die relativen Extinktionen der einzelnen Seren vor (prä-XT) und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation darstellt (Angaben in Wochen nach XT). Oberhalb der Säulen ist die relative Extinktion in Prozent angegeben. Die horizontale Linie in jedem Diagramm kennzeichnet die Lage des *cut-off* (44,1%).

3.3.9 Reaktivität ELISA-positiver Schweineseren im Western Blot

Um die Ergebnisse des ELISA in einem anderen Testsystem zu reproduzieren, wurden ELISA-positive Schweineseren im Western Blot getestet. Neben Seren von neun Schlachttieren wurden auch ausgewählte Seren von zwei Jungtieren aus der serologischen Beobachtungsstudie untersucht. Dazu wurden die Seren neben ihrer Reaktivität auf PLHV-1-gB1-His-pTriEx (= gB1-His) auch auf ihre Reaktivität mit zwei Kapsidproteinen von PLHV-1, mit dem ORF52-His und dem ORF65-His, untersucht.

Untersucht wurden Seren von Schlachttieren mit geringer (Probe 237, 294 und 298; Abb. 30A), mittlerer (Probe 254, 334 und 341; Abb. 30B) und hoher relativer Extinktion (Probe 300, 308, 318; Abb. 30C) im ELISA. Die Seren 237, 294 und 298 erkannten gB1-His. Die Reaktion von Serum 237 mit gB1-His fiel etwas stärker aus als die der beiden anderen Seren mit gB1-His. Alle drei Seren reagierten zügig nach Substratzugabe mit ORF52-His, schneller als mit gB1-His. Auch die Intensität der Reaktion mit ORF52-His war stärker als die Intensität bei der Reaktion mit gB1-His. Eine Reaktion mit ORF65-His wurde nur bei Serum 294 beobachtet, die allerdings sehr schwach ausfiel. Die Seren mit mittlerer relativer Extinktion im ELISA - die Seren 254, 334 und 341 - reagierten alle mit gB1-His. Die Reaktion war von der Farbintensität ähnlich zu der Reaktion von Serum 237. Die drei Seren erkannten auch ORF52-His, allerdings nur schwach. Eine Reaktion der Seren mit ORF65-His wurde nicht beobachtet. Die Seren 300, 308 und 318, deren relative Extinktion im ELISA hoch lag, reagierten alle mit gB1-His und mit ORF52-His. Die Intensität der Reaktion von Serum 300 mit gB1-His war deutlich geringer als die der Seren 308 und 318. Eine Reaktion mit ORF65-His konnte nur bei Serum 300 beobachtet werden.

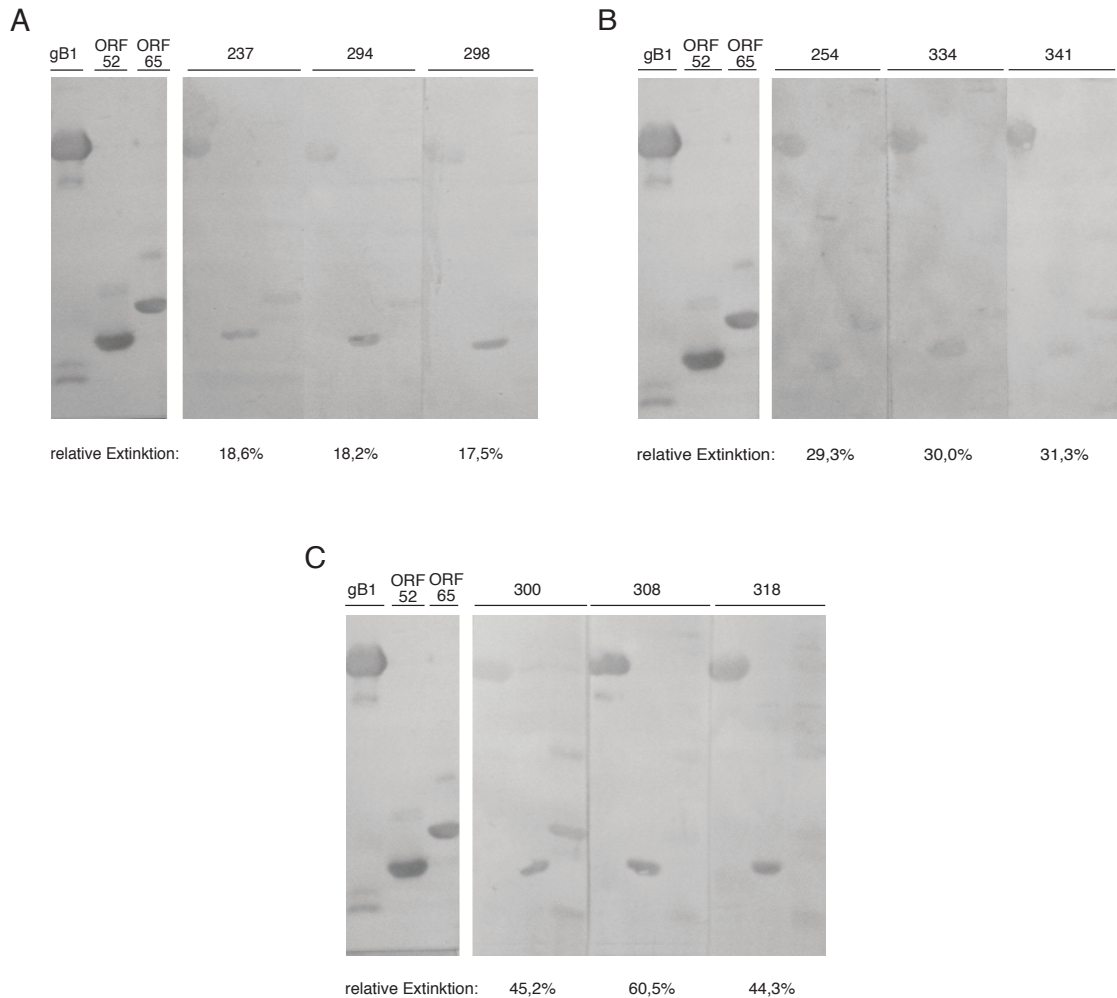


Abb. 30: Reaktivität ELISA-positiver Seren von Schlachtieren im Western Blot

Die Ergebnisse der ELISA-Untersuchung von Schlachtierseren wurden exemplarisch im Western Blot reproduziert. Dazu wurden die PLHV-1-Proteine gB1-His, ORF52-His und ORF65-His (je 1 µg) auf eine PVDF-Membran transferiert und mit den 1:50 verdünnten Schweineseren für 1 h bei 37°C inkubiert. Der AP-konjugierte, Ziege-anti-Schweine-IgG-Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Untersucht wurden Seren mit geringer (A), mittlerer (B) und hoher relativer Extinktion (C) im ELISA. Zur Kontrolle, in welcher Höhe die drei Proteine gB1-His, ORF52-His und ORF65-His bei Positivität der Seren zu erwarten sind und zur Identifikation einer positiven Antwort, wurde ein Streifen, ganz links in den Abbildungen, mit einem anti-His-Antikörper und einem AP-konjugierten, Ziege-anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper (beide 1:2500 verdünnt) inkubiert. Die Zahlen über den Membranstreifen kennzeichnen die Proben-Nummer. Die relativen Extinktionen der Seren im ELISA sind unterhalb der Membranstreifen in Prozent angegeben.

Für die Untersuchung von Serumproben aus der serologischen Beobachtungsstudie im Western Blot wurden zwei Jungtiere ausgewählt. Eins der ausgewählten Jungtiere zeigte in der ELISA-Untersuchung nur einen flachen Wiederanstieg der Extinktion nach Abnahme der maternalen Antikörper (Tier 416), während bei dem anderen Jungtier ein deutlicher Anstieg beobachtet wurde (Tier 479).

Die Reaktivität der Seren von Jungtier 416 mit gB1-His war an den Tagen 97 und 153 nach der Geburt deutlich zu erkennen, während an den Tagen 0, 20 und 40 eine nur sehr schwache Färbung sichtbar war (Abb. 31). Die fünf Seren reagierten alle mit

ORF52-His, am stärksten die Seren von Tag 97 und Tag 153. Eine Reaktion mit ORF65-His war nur andeutungsweise bei den Seren von Tag 97 und Tag 153 erkennbar.

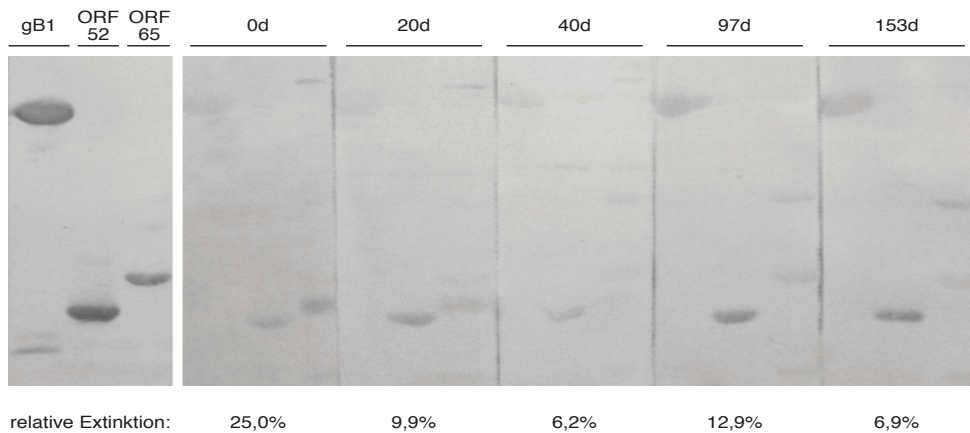


Abb. 31: Reaktivität der Seren von Jungtier 416 im Western Blot

Gezeigt ist die Reaktivität der 1:50 verdünnten Seren von Tag 0 (Tag der Geburt) und von Tag 20, 40, 97 und 153 nach der Geburt mit den drei PLHV-1-Proteinen gB1-His, ORF52-His und ORF65-His (je 1 µg). Das Konjugat, ein AP-konjugierter, Ziege-anti-Schweine-IgG-Sekundärantikörper, wurde für diese Untersuchung 1:1000 verdünnt. Links in der Abbildung wurde ein Streifen mit einem anti-His-Antikörper und einem AP-konjugierten, Ziege-anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper (beide 1:2500 verdünnt) inkubiert, zur Kontrolle, in welcher Höhe die drei Proteine bei Positivität der Seren zu erwarten sind und zur Identifikation einer positiven Antwort. Unter den Membranstreifen ist die relative Extinktion der Seren im ELISA angegeben (in %).

Die Ergebnisse der Western-Blot-Untersuchung der Seren von Tier 479 sind in Abb. 32 dargestellt. Bis auf das Serum von Tag 29 nach der Geburt detektierten alle untersuchten Seren gB1-His. Am intensivsten war die Reaktion an Tag 148. Das ORF52-His wurde ebenfalls von den fünf Seren erkannt. Hier fiel die Reaktion am stärksten bei den Seren von Tag 6 und von Tag 148 aus. Eine Reaktion mit ORF65-His war nur andeutungsweise sehr schwach bei den Seren von Tag 6, Tag 92 und Tag 148 erkennbar.

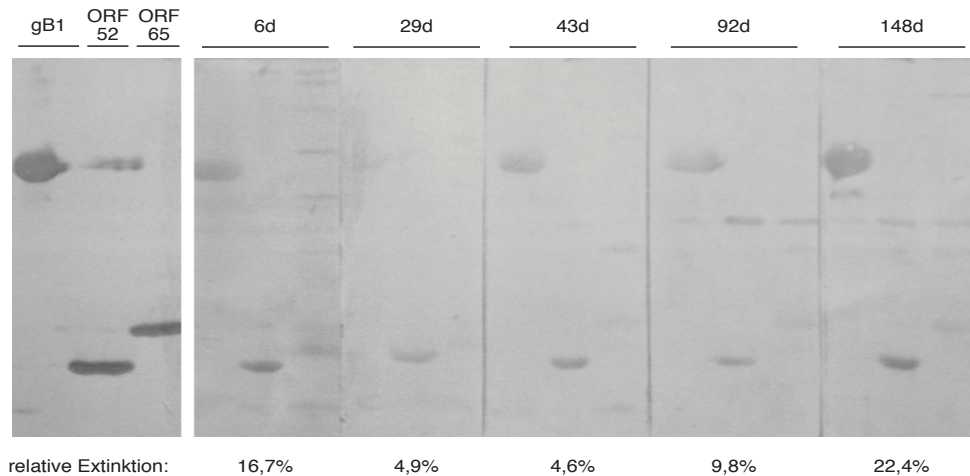


Abb. 32: Reaktivität der Seren von Jungtier 479 im Western Blot

Die Abbildung zeigt die Reaktivität der 1:50 verdünnten Seren von Tag 6, 29, 43, 92 und 148 nach der Geburt mit den rekombinanten PLHV-1-Proteinen gB1-His, ORF52-His und ORF65-His (je 1 µg). Die Bildung von Immunkomplexen wurde durch Inkubation mit einem 1:1000 verdünnten, Ziege-anti-Schweine-IgG-Sekundärantikörper und nach Substratzugabe visualisiert. Zur Kontrolle, in welcher Höhe die drei Proteine bei Positivität der Seren für anti-PLHV-1-Antikörper zu erwarten wären, wurde ein Membranstreifen, links in der Abbildung, mit einem anti-His-Antikörper und einem AP-konjugierten, Ziege-anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper (beide 1:2500 verdünnt) inkubiert. Unter den Membranstreifen ist die relative Extinktion der Seren im ELISA angegeben (in %).

3.3.10 Reaktivität ELISA-positiver Humansenen im Western Blot

ELISA-positive Humansenen wurden ähnlich wie ELISA-positive Schweineseren auf ihre Reaktivität mit PLHV-1-Proteinen im Western Blot untersucht. Für die Untersuchung wurden die vor und nach Kontakt zu porzinen Leber- bzw. Inselzellen gewonnenen Seren von drei Xenotransplantierten (Patient 4, A1 und M2) und die Seren von zwei Schlachtern (Gi16 und Gi17) herangezogen. Ein Vorserum von Patient A1 stand nicht mehr zur Verfügung. Auf die Untersuchung der Reaktivität mit ORF65-His wurde aufgrund seiner schwachen Immunogenität (Kap. 4.4) verzichtet.

Die ELISA-positiven Humansenen zeigten ähnlich wie die Schweineseren ein unterschiedliches Reaktionsmuster mit beiden PLHV-Proteinen im Western Blot. Die Seren der Inselzellempfänger (Patient A1 und M2) reagierten stärker mit gB1-His als die Seren der Schlachter und des Patienten mit Kontakt zu porzinen Leberzellen (Patient 4). Die Reaktion mit ORF52-His fiel bei Patient 4 und bei Patient A1 deutlicher aus als bei Patient M2 und den beiden Schlachtern. Reaktionsunterschiede zwischen den vor und nach Transplantation untersuchten Seren fielen nicht auf (Abb. 33).

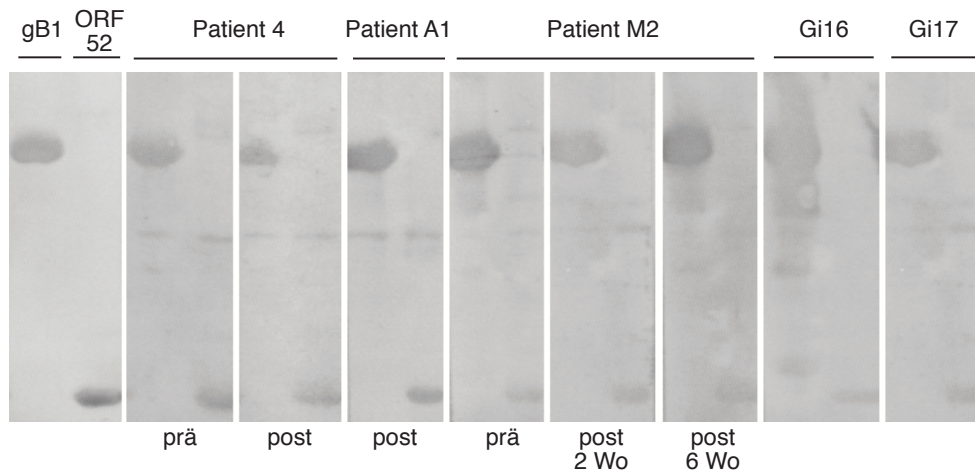


Abb. 33: Reaktivität von Humanseren im Western Blot

ELISA-positive Humanseren wurden auf ihre Reaktivität mit den PLHV-1-Proteinen gB1-His und ORF52-His im Western Blot untersucht. Die Seren wurden dazu 1:50 verdünnt und mit jeweils 1 µg Protein für 1h bei 37°C inkubiert. Das Konjugat wurde für diese Untersuchung in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Untersucht wurden Seren eines Patienten mit akutem Leberversagen (Patient 4), von zwei Diabetikern (Patient A1 und M2) und von zwei Schlachtern (Gi16 und Gi17). Es wurden Seren vor (prä) und nach (post) Kontakt zu porzinen Leber- bzw. Inselzellen untersucht. Zur Identifizierung der Proteine wurde ein Membranstreifen mit einem anti-His-Antikörper und einem AP-konjugierten, Ziege-anti-Maus-IgG-Sekundäntikörper inkubiert.

3.3.11 Nachweis von PLHV-Antigen (gB) in Zellen und Gewebe

Für den Nachweis von Virusantigen wurden verschiedene Methoden angewendet. Zur Detektion von PLHV-3-gB in einer PLHV-3-infizierten B-Zelllinie des Schweines wurden Zelllysate im Western Blot untersucht. Mit dem indirekten Immunfluoreszenztest sollte PLHV-1-gB in Blutlymphozyten von PTLD-erkrankten Schweinen nachgewiesen werden. Der Nachweis von PLHV-1-gB in Paraffinschnitten vom Lymphknoten eines an PTLD erkrankten Miniaturschweines sollte mittels Immunhistochemie erfolgen. Zur Detektion von PLHV-gB wurden polyklonale Antiseren und monoklonale Antikörper verwendet, die durch die Immunisierung von Mäusen mit prokaryot exprimiertem PLHV-1-gB bzw. PLHV-3-gB erzeugt worden waren.

3.3.11.1 Nachweis von PLHV-3-gB in PLHV-3-infizierter B-Zelllinie im Western Blot

Für den Nachweis von PLHV-3-gB in einer PLHV-3-infizierten B-Zelllinie des Schweines (L23), deren Replikation durch verschiedene Reagenzien (Tetradecanoylphospholacetat, Ionomycin) stimuliert worden war, wurde das Lysat von 7×10^6 Zellen/ml auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und im Western Blot mit einem in Mäusen erzeugten polyklonalen anti-PLHV-3-gB2-Antiserum untersucht. Eine Expression von PLHV-3-gB in den infizierten Zellen konnte nicht nachgewiesen werden.

3.3.11.2 Indirekter Immunfluoreszenztest an Blutlymphozyten PTLD-erkrankter Schweine

Der indirekte Immunfluoreszenztest wurde an Blutlymphozyten durchgeführt, die durch Zytocentrifugation auf Objektträgern fixiert wurden. Die Zellen stammten von Miniaturschweinen, die nach experimenteller Transplantation allogener Blutstammzellen an PTLD erkrankt und gestorben waren. Die Detektion von PLHV-1-gB sollte durch ein polyklonales Antiserum, das in Mäusen erzeugt worden war, erfolgen. Bei der Auswertung mit der konfokalen Lasermikroskopie konnte allerdings keine Fluoreszenz in den Zellen beobachtet und damit eine Expression von PLHV-1-gB nicht nachgewiesen werden.

3.3.11.3 Nachweis von PLHV-1-gB-Antigen im Lymphknoten eines an PTLD erkrankten Schweines

Zum Nachweis von PLHV-1-Antigen in Paraffinschnitten von einem Lymphknoten eines an PTLD erkrankten Schweines wurde die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) angewendet. Als Primärantikörper wurden monoklonale Antikörper (mAK) verwendet, die gegen PLHV-1-gB1 gerichtet und in der BfAV erzeugt worden waren. Für die immunhistochemische Untersuchung wurde nur der anti-PLHV-1-gB1-Überstand B1H9 verwendet, der sich in ELISA- und Western-Blot-Analysen als reaktivster Überstand herausstellte (Kap. 3.3.5). Für die Austestung mehrerer Überstände war der Vorrat an Paraffinschnitten vom Lymphknoten des erkrankten Schweines zu gering. Der mAK anti-X63, der durch die Immunisierung von Mäusen mit PLHV-1-gB1-fremden Antigenen erzeugt worden war, wurde für Kontrollzwecke verwendet. Die optimale Verdünnung der Überstände wurde in einem Vorversuch durch Inkubation verschiedener Verdünnungen mit Paraffinschnitten eines gesunden Schlachtschwein-Lymphknotens bestimmt. Da bis zu einer Verdünnung von 1:80 noch leichte unspezifische Anfärbungen zu erkennen waren, bei einer Verdünnung von 1:160 allerdings nicht mehr, wurden die Überstände für die immunhistochemische Untersuchung in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Nach Entparaffinisierung und Blockade der endogenen Peroxidase wurden verschiedene Demaskierungstechniken angewendet. Dadurch sollten die antigenen Epitope, die während der Fixierung des Lymphknotens mit Formalin durch Ausbildung von Methylenbrücken zwischen freien Aminogruppen verdeckt worden waren, für den Primärantikörper wieder zugänglich gemacht werden. Die erste Methode, bei der die Objektträger in 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) für 10 min bei 121°C im Autoklaven inkubiert wurden, erwies sich als ungeeignet, da sich die Schnitte durch aufsteigende Luftbläschen teilweise oder vollständig von den Objektträgern ablösten. Als Alternative wurde das AntigenPlus™ Buffer Set verwendet,

bei der die Schnitte mit Puffern unterschiedlichen pH-Wertes entweder bei RT oder in der Mikrowelle inkubiert wurden. Es wurden alle drei Puffer (pH 6.0, pH 7.4 und pH 10.0) unter beiden Temperaturbedingungen ausgetestet.

Bei dieser Untersuchung konnten keine Unterschiede zwischen den parallel mitgelaufenen Kontrollen und dem mit dem monoklonalen anti-gB1-Antikörper inkubierten Lymphknotenpräparat festgestellt werden.

3.3.12 Nachweis von PLHV-Infektionen mittels PCR in serologisch untersuchten Schweinen

3.3.12.1 Prävalenz von PLHV-1, -2 und -3 in Schweinen

Die Untersuchung zur Prävalenz von PLHV in Schweinen erfolgte durch Nachweis von Virus-DNA in Leukozyten des Blutes. Die PCR-Daten sollten anschließend mit den Ergebnissen der serologischen Untersuchung (Kap. 3.3.7.2, Kap. 3.3.7.2) verglichen werden. Ein Teil der PCR-Daten lag bereits zu Beginn dieser Arbeit vor und wurde mittlerweile publiziert (Chmielewicz et al., 2003). Die restlichen, noch fehlenden Daten wurden nach Präparation der DNA aus Blutleukozyten durch Verwendung sequenzspezifischer Primer (Tabelle 23) erhoben. Für die Detektion von PLHV-1 wurden die Primerpaare 1125s/1125as (ORF08, gB) und 747s/747as (nicht kodierend) verwendet. Mit dem letztgenannten Primerpaar wurde auch eine nicht-kodierende Region zwischen ORF11 und ORF17 von PLHV-2 amplifiziert. Ein Größenunterschied der mit dem Primerpaar 747s/747as generierten Amplifikate erlaubte eine Differenzierung zwischen einer Infektion mit PLHV-1 oder PLHV-2. Zum alleinigen Nachweis von PLHV-2 wurde das Primerpaar 1155s/1155as (ORF08, gB) verwendet. Für die Amplifikation von PLHV-3 wurden PCR mit den Primerpaaren 886s/886as (ORF09, DNA-Polymerase) und 1156s/1156as (ORF08, gB) durchgeführt. Die Amplifikation viraler DNA mittels konventioneller PCR erfolgte mit der AmpliTaq Gold™ Polymerase. Die Blutleukozyten von Jungsaugen und Ferkeln wurden mittels quantitativer PCR (TaqMan-PCR) mit den Primerpaaren 1125s/1125as, 1155s/1155as und 1156s/1156as untersucht.

Tabelle 23: Verwendete Primer für die Amplifizierung von Herpesvirus-DNA

Primerpaar	Ziel-Gen/Virus
747s/747as* ¹	ORF11-17/PLHV-1 und -2
886s/886as* ²	DPOL/PLHV-3
1125s/1125as* ²	gB/PLHV-1
1155s/1155as* ²	gB/PLHV-2
1156s/1156as* ²	gB/PLHV-3

*¹: (Beckmann, 2000b)

*²: (Chmielewicz et al., 2003)

In Tabelle 24 ist der relative Anteil PCR-positiver Tiere für das jeweilige Virus in Prozent angegeben. Bei den Schlachttieren wurden die drei PLHV-Spezies mit unterschiedlicher Prävalenz nachgewiesen. Während in 16% der Tiere PLHV-1 oder PLHV-3 nachgewiesen werden konnte, waren nur 2% PCR-positiv für PLHV-2. Mehrfachinfektionen wurden bei 31% der Tiere beobachtet. Bei den SPF-Miniaturschweinen wurde PLHV nicht nachgewiesen. Die Zucht- und Jungsaunen zeigten eine hohe Prävalenz für PLHV-1. Während bei den Zuchtsauen bei 75% der Tiere PLHV-1 nachgewiesen werden konnte, waren 80% der Jungsaunen PCR-positiv für PLHV-1. Bei einer Jungsau wurde eine Doppelinfektion mit PLHV-1 und PLHV-2 beobachtet. Bei den drei Wochen alten Ferkeln wurden nur 20% der Tiere positiv getestet für PLHV-1. Weder PLHV-2 noch PLHV-3 konnten bei ihnen mittels PCR nachgewiesen werden.

Tabelle 24: Nachweis von PLHV-1, -2 und -3 in Schweinen mittels PCR

Proben	Anz.	PLHV-1	PLHV-2	PLHV-3	PLHV-1/-2	PLHV-1/-3	PLHV-2/-3	PLHV-1/-2/-3
Schlachttiere	100	16%	2%	16%	2%	17%	6%	6%
Miniaturschweine	10	0	0	0	0	0	0	0
Zuchtsauen	20	75%	0	n.g.	0	n.g.	n.g.	n.g.
Jungsaunen	10	80%*	0*	0*	10%*	0	0	0
Ferkel	10	20%*	0*	0*	0	0	0	0

Anz. = Anzahl

n.g. = nicht getestet

*= TaqMan-PCR

Neben der einmaligen Untersuchung von Blutleukozyten zum Nachweis einer PLHV-Infektion (Tabelle 24) wurden zwölf Jungtiere über einen Zeitraum von fünf Monaten regelmäßig auf Infektionen mit PLHV-1 und PLHV-2 untersucht. Mit dieser Studie sollte der Infektionszeitpunkt von Jungtieren mit PLHV eingegrenzt werden. Die Proben wurden wie bei der serologischen Untersuchung entsprechend ihres Entnahmzeitpunktes verschiedenen Altersklassen zugeordnet. In Tabelle 25 ist der relative Anteil PCR-positiver Tiere jeder Altersklasse angegeben. Die Untersuchung zeigte,

dass in den ersten 14 Tagen nach der Geburt alle Ferkel PLHV-1-negativ waren. In der dritten und vierten Lebenswoche wurde bei jeweils zwei Ferkeln PLHV-1 mittels PCR detektiert, wobei die gemessenen Signale bei den 15 bis 21 Tage alten Ferkeln sehr schwach waren. Ab einem Alter von einem Monat bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes wurde bei bis zu 50% der Tiere PLHV-1 mittels PCR nachgewiesen. Der PCR-Nachweis von PLHV-2 fiel bei allen Tieren und zu allen Untersuchungszeitpunkten negativ aus.

Tabelle 25: Nachweis von PLHV-1 und PLHV-2 in Blutleukozyten von Jungtieren in Abhängigkeit vom Alter

Altersklasse	PLHV-1	PLHV-2
> 7d	0	0
8-14d	0	0
15-21d	17%	0
22-30d	17%	0
31-60d	50%	0
61-90d	42%	0
91-120d	42%	0
121-150d	50%	0

d = Tage