

## 4 Diskussion

Die Gewährleistung der Virussicherheit in der Xenotransplantation ist neben der Beherrschung von Abstoßungsreaktionen ein vorrangiges Ziel, das es zu erreichen gilt, bevor Schweine als Organquelle für den Menschen genutzt werden können. Den bisher bekannten porzinen lymphotropen Herpesviren Typ 1, 2 und 3 (PLHV-1, -2 und -3) kommt dabei eine besondere Bedeutung zu, da von Gammaherpesviren bekannt ist, dass sie nach der Infektion zeitlebens im infizierten Tier verweilen. Sie liegen dabei in einem latenten Stadium vor, in dem kein infektiöses Virus gebildet wird und die infizierten Tiere keine Symptome einer Krankheit zeigen (Kap. 2.3). PLHV sind nicht nur in gesunden Schweinen verschiedener geographischer Herkunft weit verbreitet. PLHV-1 ist auch in die Pathogenese einer bei experimentell immunsupprimierten, transplantierten Miniaturschweinen beobachteten Erkrankung involviert, die mit hoher Mortalität einhergeht und die der EBV-assoziierten PTLD des Menschen in der Alлотransplantation ähnelt. Da gegenwärtig eine Übertragung von PLHV mit dem Transplantat auf den Menschen nicht ausgeschlossen werden kann und die daraus resultierenden Konsequenzen nicht absehbar sind, müssen PLHV-freie Schweine als Spendertiere gezüchtet werden. Dies erfordert die Entwicklung spezifischer und sensitiver Nachweismethoden, um PLHV-infizierte Schweine zu erkennen und als Spendertiere auszuschließen.

Das Ziel dieser Dissertation war, Antikörper-basierte Detektionssysteme zum direkten und indirekten Nachweis von PLHV-Infektionen bei Schweinen zu entwickeln. Im Vordergrund stand die Entwicklung eines ELISA und die Erprobung der Anwendung des Testes an Schweinen zur Bestimmung der Seroprävalenz von PLHV. Daneben sollten Methoden zum Nachweis von PLHV-Antigenen in Zellen und Geweben entwickelt werden. Um erste Hinweise auf eine mögliche Infektion mit PLHV bei Xenotransplantierten zu bekommen, wurden Humansenen mit dem in dieser Arbeit entwickelten ELISA untersucht. Die Validierung der ELISA-Ergebnisse erfolgte exemplarisch im Western Blot.

### 4.1 Auswahl, Expression und Reinigung immundominanter Proteine von PLHV

Für serologische Untersuchungen im Western Blot und im ELISA wurden verschiedene PLHV-Proteine ausgewählt, deren immunogene Wirkung bei anderen Vertretern der Familie *Herpesviridae* gezeigt (Kap. 2.3.3) und für das gB von PLHV-1 in dieser Arbeit durch einen Vorversuch bestätigt werden konnte. Neben gB aller drei PLHV wurden gM, gL und die durch ORF52 und ORF65 kodierten Kapsidproteine von PLHV-1

ausgewählt. Von anderen Herpesviren ist bekannt, dass die genannten Proteine während der späten Phase des lytischen Infektionszyklus gebildet werden und aufgrund ihrer exponierten Lage auf der Virus- oder Kapsidoberfläche eine humorale und/oder zelluläre Immunantwort bei Menschen und Tieren auslösen. Die Gen-Sequenzen von gB und gM waren zu Beginn dieser Arbeit bekannt, die von gL und der beiden Kapsidproteine wurden später bestimmt.

Die Wahl des Expressionssystems wurde durch die Zielsetzung beeinflusst, möglichst zügig eine Vielzahl von PLHV-Genen in universell einsetzbare Expressionsvektoren zu klonieren, um diese sowohl in Bakterien als auch in Mammalier- und Insektenzellen zu exprimieren. Dieses Ziel sollte durch Verwendung des Echo™ Cloning Systems erreicht werden. Die Konstruktion rekombinanter Plasmide mit diesem System zur Expression von His-Fusionsproteinen gestaltete sich allerdings sehr schwierig. Nur zwei rekombinante Plasmide konnten erzeugt werden. Die Ursache für die geringe Ausbeute im Echo™ Cloning System war vermutlich eine eingeschränkte Aktivität der Cre-Rekombinase, wie sie auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet wurde (Dr. J. Rziha (BfAV, Tübingen), persönliche Mitteilung). Es wurde deshalb auf zwei andere Expressionssysteme ausgewichen, die in der Arbeitsgruppe bereits erfolgreich zur Klonierung verschiedener Gene eingesetzt worden waren. Es handelte sich dabei um das GST-Gene-Fusion-System bzw. den pTriEx-Multisystem-Vektor. Die Strategie, gB-GST-Fusionsproteine für die Gewinnung polyklonaler Antiseren zu exprimieren und die Reaktivität der Antiseren durch Western-Blot-Analysen mit gB-His-Fusionsproteinen zu untersuchen, die den gleichen Sequenzbereich wie die GST-Fusionsproteine umfassten, konnte durch die Verwendung der Vektoren pGEX-6P-1 und pTriEx-1.1 umgesetzt werden. Durch die Verwendung von Proteinen mit vergleichbarer Primärstruktur, aber unterschiedlichem Marker (GST bzw. His), wurden falsch-positive Reaktionen der polyklonalen Antiseren durch Bindung von anti-GST-Antikörpern vermindert.

Die rekombinanten PLHV-Proteine wurden in Form von "*inclusion bodies*" in den Bakterienzellen abgelagert. Die Bildung von "*inclusion bodies*", hervorgerufen durch hohe Proteinkonzentrationen oder durch Fehlfaltung exprimierter Proteine, ist ein häufig beobachtetes Phänomen bei der Überexpression in *E. coli* (Georgiou und Valax, 1996). Die Aufreinigung exprimierter Proteine über verschiedene Matrizes (Glutathion Sepharose, Ni-NTA-Agarose) gelang nicht. Als Ursachen wurden die schwache Bindung zwischen den Tags und den Matrizes bzw. die unvollständige Renaturierung der Glutathion S-Transferase angesehen, über die die Bindung an Glutathion Sepharose erfolgen sollte. Zudem wurde eine Abnahme der Proteinlöslichkeit während

der Dialyse beobachtet, wodurch die Proteine ausfielen. Allerdings wurde durch die Aufreinigung der Fusionsproteine mit dem BugBuster® Protein Extraction Reagent eine hohe Reinheit erreicht, so dass auf weitere Versuche zur Erhöhung der Bindungskapazität und der Proteinlöslichkeit verzichtet wurde.

#### **4.2 Reaktivität und Spezifität erzeugter polyklonaler PLHV-1-gB-Antisera**

Zur Untersuchung ihrer Reaktivität im Western Blot wurden die in Mäusen erzeugten Antisera gegen PLHV-1-gB1 und PLHV-1-gB2 mit rekombinantem gB1- bzw. gB2-His-Fusionsprotein inkubiert. Es zeigte sich, dass die Immunantwort gegen PLHV-1-gB1 intensiver war als gegen PLHV-1-gB2. Die gegen PLHV-1-gB1 gerichteten Maus-Antisera wurden daher zu einem positiven PLHV-1-gB1-Kontrollserum gepoolt. Dieses Serum wurde nach Untersuchung der Spezifität als Referenzserum für den indirekten ELISA verwendet. Das entsprechende His-Fusionsprotein wurde als Antigen zur Beschichtung von Mikrotiterplatten verwendet.

Aus der Untersuchung der Spezifität des positiven Maus-anti-gB1-Antisera wurden folgende Schlüsse gezogen:

1. Die Antikörper des anti-PLHV-1-gB1-GST-Antisera reagierten spezifisch mit gB1-His.
2. Das anti-PLHV-1-gB1-GST-Antiserum enthielt Antikörper, die im Western Blot an kreuzreagierende Epitope von PLHV-2-gB1-His und PLHV-3-gB1-His banden. Kreuzreaktionen werden auch bei anderen, nahverwandten Herpesviren beobachtet (Pereira, 1994). Aufgrund der Existenz kreuzreagierender Antikörper kann postuliert werden, dass Sera von Schweinen, die mit PLHV-2 und/oder PLVH-3 infiziert sind, Antikörper enthalten, die Epitope auf PLHV-1-gB erkennen.
3. Die Bindung von Antikörpern an Epitope von PLHV-3-gB1-His war schwächer ausgeprägt als an Epitope von PLHV-2-gB1-His. Diese schwächere Bindung lässt sich durch größere Sequenzunterschiede zwischen PLHV-1 und PLHV-3 im gB-Gen erklären, die so bei PLHV-2 nicht vorkommen und die vermutlich Auswirkungen auf die Proteinstruktur haben, wodurch sich die antigenen Epitope beider Viren unterscheiden.

### **4.3 Indirekter ELISA zum serologischen Nachweis von PLHV bei Schweinen: Entwicklung und Anwendung**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein indirekter ELISA zum Nachweis von anti-PLHV-Antikörpern etabliert, der die epidemiologische Untersuchung von Schweinen auf PLHV-Infektionen ermöglicht. Eine Differenzierung zwischen Infektionen mit PLHV-1, -2 und/oder -3 war aufgrund kreuzreagierender Antikörper (Kap. 4.2) nicht zu erwarten. Aufgrund der nahen Verwandtschaft dieser drei Spezies kann davon ausgegangen werden, dass neben PLHV-1 auch PLHV-2 und PLHV-3 ein pathogenes Potenzial besitzen und der Nachweis von Antikörpern gegen eines der Viren zum Ausschluss der Tiere für eine Xenotransplantation führt. Mit der Entwicklung des ELISA wurden die Voraussetzungen geschaffen, zukünftige Spendertiere für die Xenotransplantation auf PLHV-Infektionen zu untersuchen. Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wird mit der serologischen Untersuchung eine ähnliche oder höhere Prävalenz von PLHV in Schweinen ermittelt wie mit der PCR?
2. Kann der Zeitraum, in dem sich die Nachkommen mit PLHV infizieren, eingegrenzt werden? Das heißt, findet die Übertragung pränatal oder postnatal statt?
3. Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem anti-PLHV-Antikörpertiter im Serum und der Entwicklung von PTLD in immunsupprimierten und experimentell transplantierten Miniaturschweinen?
4. Eignet sich der ELISA zum Nachweis von maternalen Antikörpern im Kolostrum?

Bis zum Beginn dieser Arbeit existierten keine Daten zur Seroprävalenz von PLHV bei Schweinen. In früheren Untersuchungen von Schweinen mittels PCR konnte PLHV mit hohen Prävalenzen (86-93%) detektiert werden. Die untersuchten Blut- und Milzproben stammten von Schweinen aus verschiedenen Teilen Europas sowie aus den USA, so dass von einer weltweiten Verbreitung auszugehen ist (Kap. 2.4).

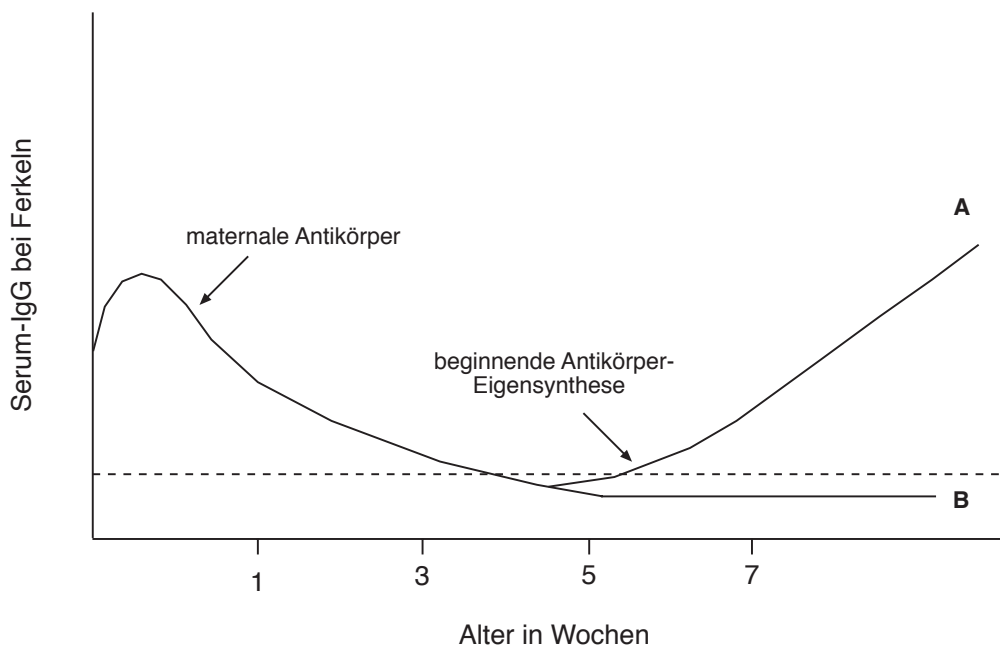
#### Seroprävalenz von PLHV bei Schweinen unterschiedlicher Herkunft und verschiedenen Alters

In dieser Studie wurde eine Seroprävalenz von 38-100% festgestellt, wobei die niedrigste Prävalenz bei den drei Wochen alten Ferkeln gefunden wurde. Im Vergleich dazu betrug die mittels PCR ermittelte Prävalenz in den einzelnen Schweinepopulationen 20-90% und lag damit niedriger als die Seroprävalenz. Dieses Ergebnis ist typisch für subklinische Infektionen mit Herpesviren. In der akuten Phase der

Infektion, in der infizierte Menschen und Tiere klinische Symptome zeigen und Virus ausscheiden (z.B. über Schleimhäute), kann das Virus isoliert werden. Gleichzeitig zum Auftreten klinischer Symptome wird die zelluläre und humorale Immunantwort induziert. Bei Immunkompetenten gehen Herpesviren dann in einen Latenzzustand in verschiedenen Geweben über, wo ihr Genom episomal in den Zellen vorliegt. Zu diesem Zeitpunkt fällt der Virusnachweis in den Ausscheidungen und im Blut mit der PCR häufig negativ aus.

#### Seroprävalenz von PLHV bei Jungschweinen

Bei der Untersuchung der Seren von Jungschweinen stellte sich heraus, dass 100% der Neugeborenen PLHV-positiv waren. Dieser Anteil fiel bis zum Ende der vierten Lebenswoche auf 46% ab und stieg danach wieder an. Am Ende des Beobachtungszeitraumes betrug die Seroprävalenz 86%. Dieser Verlauf des IgG-Gehaltes wird auch bei anderen Infektionen des Schweines beobachtet und ist schematisch in Abb. 34 dargestellt.



**Abb. 34: Schematische Darstellung des Immunglobulin-Spiegels im Serum von Jungtieren**

Der Immunglobulin-Spiegel (vor allem IgG) von Neugeborenen steigt durch Aufnahme maternalen Antikörper über das Kolostrum nach der Geburt steil an und erreicht 12-24 Stunden nach der Geburt seinen maximalen Wert (Tizard, 2000). Nach dem ersten Lebenstag nehmen die maternalen Antikörper durch katabole Prozesse bis zur fünften Lebenswoche kontinuierlich ab (Glodek und Bollwahn, 1992). Unterschreiten sie einen bestimmten Schwellenwert, kann es zu einer Infektion kommen (A) und die Antikörper-Eigensynthese der Ferkel beginnt. Unterbleibt eine Infektion (B) bleibt der IgG-Gehalt auf einem niedrigen Niveau.

Der Verlauf der Antikörpertiter in der Neugeborenenpopulation zeigte, dass die Ferkel maternale anti-PLHV-Antikörper über das Kolostrum aufgenommen haben. Dies war zu

erwarten, da die Seroprävalenz von PLHV bei den Muttersauen 100% betrug. Nach dem Verlust der maternalen Antikörper durch katabole Prozesse kam es zu einer Erstinfektion mit PLHV. Die Antikörper-Eigensynthese setzte ein, wie die steigende Seroprävalenz zum Ende des Beobachtungszeitraumes belegte.

In den ersten zwei Lebenswochen waren die Ferkel PCR-negativ für PLHV-1. Mit Beginn der dritten Lebenswoche waren 17% der Tiere PLHV-1-positiv. Ab dem zweiten Lebensmonat wurde bei 50% der Tiere PLHV-1 in den Blutlymphozyten nachgewiesen.

Die Untersuchungsergebnisse sprechen für eine postnatale Infektion mit PLHV. Als wahrscheinliche Infektionsquelle kommen die Muttersauen in Frage. Daraus ist zu schließen, dass PLHV-freie Schweine für die Xenotransplantation durch eine vom Muttertier getrennte Aufzucht der Nachkommen erzeugt werden können.

### Seroprävalenz von PLHV bei PTLD-erkrankten Miniaturschweinen

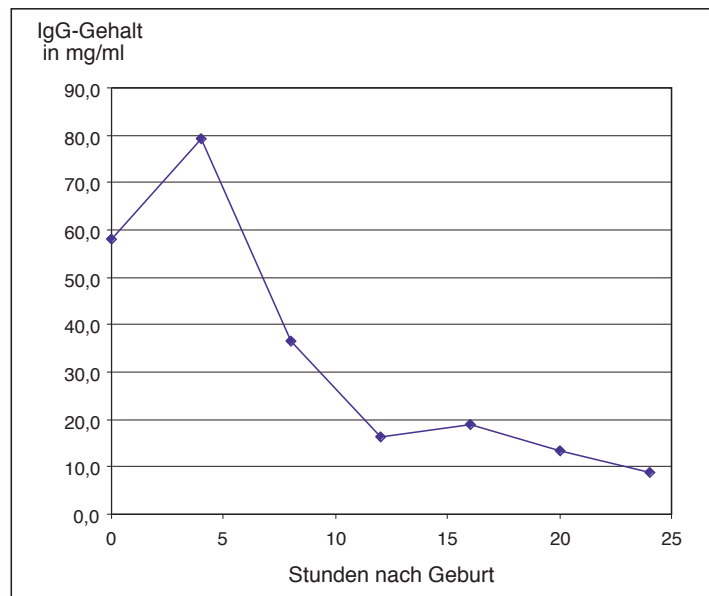
Die untersuchten Schweine zeigten unterschiedliche Immunantworten vor und nach Transplantation. Ein einheitliches Reaktionsmuster wurde nicht beobachtet. Nur ein Tier (14801) war vor der Transplantation PLHV-seropositiv. Während bei diesem Tier nach der Transplantation ein Abfall der anti-PLHV-Antikörper beobachtet wurde, blieb bei den anderen Tieren der Gehalt an anti-PLHV-Antikörper entweder konstant (Tier 15005) oder stieg an (Tier 14203). Der Anstieg der anti-PLHV-Antikörper bei Tier 14203 war eventuell die Folge einer B-Zellaktivierung nach Transplantation. Eine Erklärung für die Abnahme der Antikörper nach Transplantation, wie sie bei Tier 14801 beobachtet wurde, konnte nicht gefunden werden. Ein Zusammenhang mit der Verabreichung des Immunsuppressiva Cyclosporin A bestand nicht, da Cyclosporin A durch Hemmung der IL-2-Synthese der T-Helferzellen die Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen verhindert (Orosz et al., 1982), aber keinen Einfluss auf die B-Zellen hat.

Ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an anti-PLHV-Antikörpern im Serum und der Entwicklung von PTLD konnte nicht festgestellt werden.

### Seroprävalenz von PLHV in Kolostrum von Zuchtsauen

Bei Kolostrum handelt es sich um eine besonders proteinreiche Milch (bis zu 19% Gesamteiweiß), die zu Laktationsbeginn von der Sau produziert wird. Sie zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an  $\gamma$ -Globulinen aus (30-50% des Gesamteiweiß), die aus dem Blutplasma der Sau stammen und deren Gehalt im Kolostrum zwischen einzelnen Sauen beträchtlich schwanken kann (Glodek und Bollwahn, 1992). Das IgG macht mit 75% den Hauptanteil der Immunglobuline im Kolostrum aus. Aufgrund der beobachteten Seroprävalenz von 100% bei der Untersuchung von Blutseren wurde

erwartet, dass das Kolostrum ebenfalls anti-PLHV-Antikörper enthält. Nur in 35% der untersuchten Kolostrumproben wurden anti-PLHV-Antikörper nachgewiesen. Vermutlich wurden die Kolostrumproben mehrere Stunden nach der Geburt entnommen, so dass der Gehalt an anti-PLHV-Antikörpern bereits unter der Nachweisgrenze des ELISA lag. Die Zeitpunkte der Kolostrum-Entnahmen haben einen wesentlichen Einfluss auf die Zusammensetzung des Kolostrums. Der IgG-Gehalt des Kolostrums liegt vier Stunden nach der Geburt am höchsten und nimmt dann kontinuierlich ab (Abb. 35).



**Abb. 35: IgG-Gehalt im Kolostrum (in mg/ml) nach der Geburt**

Die Abbildung zeigt den Verlauf des IgG-Gehaltes im Kolostrum in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probenentnahme nach der Geburt. Nach vier Stunden erreicht der IgG-Gehalt sein Maximum von 79,2 mg/ml. Innerhalb der nächsten 20 Stunden sinkt der IgG-Gehalt auf etwa ein Neuntel des höchsten Wertes und beträgt 24 Stunden nach der Geburt nur noch 8,7 mg/ml (aus Bland (1999)).

Diese Untersuchung zeigte, dass sich der ELISA auch zur Untersuchung von Kolostrum zum Nachweis von maternalen Antikörpern gegen PLHV eignet. Die Untersuchung muss allerdings um den Zeitpunkt der Geburt erfolgen, da ansonsten damit zu rechnen ist, dass der IgG-Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze des ELISA liegt.

#### 4.4 Entdeckung eines zweiten immunogenen Proteins von PLHV-1

Für die Untersuchung der Reaktivität ELISA-positiver Schweineseren im Western Blot wurden verschiedene Seren herangezogen. Damit sollte untersucht werden, ob sich die Ergebnisse des ELISA in einem zweiten, unabhängigen serologischen Testsystem bestätigen lassen. Untersucht wurden Seren von Schlachttieren mit geringer, mittlerer

und hoher Extinktion im ELISA. Außerdem wurden die Seren zweier Jungtiere aus der serologischen Beobachtungsstudie einbezogen, die sich in ihrem Gehalt an anti-PLHV-Antikörpern deutlich unterschieden. Insgesamt wurden 19 Seren auf ihre Reaktivität mit den drei folgenden PLHV-1-Proteinen untersucht: gB1, ORF52-Protein und ORF65-Protein. Die Seren zeigten ein unterschiedliches Reaktionsmuster mit den eingesetzten Proteinen, vermutlich aufgrund unterschiedlicher Antikörpertiter. Bei den Untersuchungen im Western Blot wurde festgestellt, dass PLHV-infizierte Schweine neben anti-gB-Antikörpern auch Antikörper gegen das ORF52-Protein aufwiesen, aber keine, oder nur geringe Mengen gegen das ORF65-Protein. Das ORF52-Protein kommt deshalb als zweites PLHV-Protein in Frage, um PLHV-Infektionen beim Schwein serologisch nachzuweisen. Die beobachteten Intensitäten der gB1-Banden entsprachen nicht immer den Erwartungen, die aufgrund der ELISA-Ergebnisse angenommen wurden. Eine mögliche Ursache könnte eventuell die unterschiedliche Präsentation antigener Epitope auf Mikrotiterplatten und PVDF-Membranen sein.

#### **4.5 Untersuchung von Xenotransplantierten mittels ELISA und Western Blot**

Die serologische Untersuchung von Humansenen auf anti-PLHV-Antikörper im ELISA und exemplarisch im Western Blot sollte Hinweise geben, ob bei Personen mit engen Kontakt zu Schweineblut und Schweinezellen eine Infektion mit PLHV möglich ist. Die Untersuchungsergebnisse sollten eine erste Einschätzung des Infektionsrisikos mit PLHV in der Xenotransplantation ermöglichen. Dazu wurden Seren von Schlachtern und von Xenotransplantierten untersucht. Von den Xenotransplantierten wurden Seren vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Kontakt zu porzinen Zellen untersucht. Zum Vergleich wurden Seren von zwanzig gesunden Blutspendern untersucht.

Es ergaben sich keine Hinweise auf eine Infektion mit PLHV bei Schlachtern und Xenotransplantierten. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bezüglich eines möglichen Infektionsrisikos mit PERV erzielt. Es wurde diskutiert, dass ein Virusübertritt vom Schwein auf den Menschen unter den gegebenen Bedingungen (kurze Kontaktzeiten, geringe Zellzahlen, kein direkter Zellkontakt, schwache Immunsuppression) als ein seltenes oder nicht eintretendes Ereignis eingeschätzt werden kann (Kap. 2.2.2). Die Seren der Schlachter und der Xenotransplantierten zeigten im Vergleich zu den Seren gesunder Blutspender keine wesentlichen Unterschiede in den ELISA-Untersuchungen. Sowohl bei den Blutspendern als auch bei den Schlachtern und Xenotransplantierten wurden hohen Extinktionen im ELISA und intensive Reaktionen im Western Blot beobachtet. Da durch umfassende PCR-Untersuchungen von humanen Blutlymphozyten weder PLHV noch ein PLHV-



ähnliches Virus nachgewiesen werden konnte (Dr. Bernhard Ehlers, persönliche Mitteilung), wurde die Existenz von anti-PLHV-Antikörpern ausgeschlossen. Vermutlich wurden die Reaktionen durch kreuzreagierende Antikörper humaner Gammaherpesviren hervorgerufen. Aufgrund der weiten Verbreitung von EBV und seiner hohen Seroprävalenz, die bei gesunden Erwachsenen etwa 70% beträgt (Kangro et al., 1994; Morris et al., 2002), handelte es sich dabei höchstwahrscheinlich um anti-EBV-Antikörper, die antigene Epitope des PLHV-gB erkannt haben. Kreuzreaktionen mit HHV-8 waren aufgrund der niedrigen Seroprävalenz von HHV-8 in Deutschland unwahrscheinlich.

Der im ELISA beobachtete Anstieg des IgG-Gehaltes bei drei Xenotransplantierten wurde vermutlich durch eine allgemeine B-Zell-Aktivierung ausgelöst, wie sie häufig bei Immunsupprimierten nach Transplantation beobachtet wird.

Der in dieser Arbeit entwickelte indirekte ELISA kann auch zur Untersuchung von Humanseren nach Xenotransplantation verwendet werden. Aufgrund der vermutlich durch kreuzreagierende Antikörper hervorgerufenen Reaktion müssen positive Resultate jedoch immer noch durch eine zweite Methode, wie zum Beispiel der PCR, abgeklärt werden.

#### **4.6 Nachweis von PLHV-Antigen in PTLD-erkrankten Schweinen und in PLHV-3-infizierter B-Zelllinie**

Mittels Immunfluoreszenztest und Immunhistochemie sollten Studien zum Tropismus von PLHV an Zellen und Geweben von PTLD-erkrankten Miniaturschweinen erfolgen. Damit sollte erstmals der direkte Nachweis von PLHV-Infektionen auf Proteinebene erbracht werden. Bisher existieren nur Untersuchungen mittels PCR, in denen virale DNA vor allem im Blut und in lymphoiden Organen detektiert wurde (Kap. 2.4).

Der direkte Nachweis von Virusantigen sollte über die Detektion von Glykoprotein B (gB) in Blutlymphozyten und in Lymphknoten erkrankter Tiere erbracht werden. Diese Untersuchungen sollten die Basis bilden für die Untersuchung potenzieller Spenderorgane vom Schwein, um eine bessere Abschätzung des Gefährdungspotenzials des PLHV für den humanen Rezipienten zu ermöglichen. Parallel dazu wurde versucht, gB in einer PLHV-3 infizierten B-Zelllinie mittels Western Blot nachzuweisen.

Durch diese Untersuchungen konnte Virusantigen weder im Lymphknoten noch in den Blutlymphozyten oder in der B-Zelllinie nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache war, dass PLHV-gB nicht oder nur in sehr geringen Mengen exprimiert wurde und die gB-Menge unterhalb der Nachweisgrenzen der angewendeten Methoden lag. Transkripte des gB-Gens wurden zwar mittels PCR in pathologisch veränderten

Lymphknoten und in Blutlymphozyten PTLD-erkrankter Tiere (Huang et al., 2001; Goltz et al., 2002) sowie in der PLHV-3 infizierten B-Zelllinie nachgewiesen (Chmielewicz, 2002). Die Bildung infektiöser Viruspartikel konnte allerdings mittels Elektronenmikroskopie nicht gezeigt werden. Desweiteren bestand die Möglichkeit, dass die erzeugten polyklonalen Antiseren und monoklonalen Antikörper gegen Epitope gerichtet waren, die in den Zellen und Geweben für Antikörper nicht zugänglich waren.

#### **4.7 Abschließende Betrachtung**

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass die "Porzinen lymphotropen Herpesviren Typ 1-3" weit verbreitet sind und die Seroprävalenz bei Schweinen sehr hoch ist. Der in dieser Arbeit etablierte ELISA eignet sich neben der Untersuchung von Schweineseren auch zur Untersuchung von Kolostrum und Humanseren. Da die in dieser Arbeit durchgeführten Studien zeigten, dass die Infektion mit PLHV postnatal erfolgt, kann das Ziel, PLHV-freie Schweine für die Xenotransplantation zu züchten, als realisierbar angesehen werden.