

## 1 Einleitung

An dieser Stelle soll zunächst eine Literaturübersicht über die allgemeinen Eigenschaften der Herpes- und Gammaherpesviren mit besonderem Augenmerk auf das equine Herpesvirus Typ 2 (EHV-2) wiedergegeben werden. Anschließend werden die derzeitigen Erkenntnisse zu den wirtshomologen Genen der Gammaherpesviren dargestellt, um schließlich den aktuellen Stand der Forschung zu den bekannten viralen Interleukin-10- (IL-10-) homologen Genen, insbesondere dem EHV-2-IL-10, zu skizzieren.

### 1.1 Allgemeines über Herpesviren

Die Familie der Herpesviren (Herpesviridae) besteht aus einer großen Zahl von Viren, die sehr unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Dennoch zeichnen sich die bis heute bekannten ca. 120 Mitglieder dieser Virusfamilie durch verschiedene morphologische Gemeinsamkeiten aus.

Sie besitzen ein einzelnes, doppelsträngiges DNA-Genom aus 120 bis 190 Kilobasenpaaren (kbp) und replizieren sich im Zellkern. Das Genom ist in ikosaedrischen Nukleokapsiden verpackt, die von einem Proteintegument und einer Lipoproteinmembran umgeben sind. Der Durchmesser der infektiösen Herpesviruspartikel liegt zwischen 150 und 170 nm (Roizman et al., 1996).

Viele Mitglieder der Herpesviridae sind als Verursacher verschiedenster Erkrankungen bekannt. Eine ihrer beeindruckendsten Fähigkeiten ist jedoch die Latenzetablierung in ihrem Wirt, in deren Verlauf sie reaktiviert werden und zu rekurrierenden Infektionen führen können.

Sie haben außerdem eine Vielzahl unterschiedlicher Strategien entwickelt, um die virusinfizierte Zelle während der Infektion vor der Eliminierung durch das Immunsystem zu bewahren. In den letzten Jahren wird dabei den bei verschiedenen Herpesviren entdeckten wirtshomologen Genen eine besondere Rolle zugeschrieben. Von einigen dieser Gene wurde bereits gezeigt, dass die Viren sie einsetzen können, um die Immunantwort ihres Wirtes zu unterlaufen oder zu kontrollieren (zur Übersicht siehe Davis-Poynter & Farrell, 1996).

Die Herpesviren werden in 3 Unterfamilien unterteilt: Die **Alphaherpesvirinae**, **Betaherpesvirinae** und **Gammaherpesvirinae**.

Diese Einteilung basierte zunächst auf den biologischen Kriterien: Wirtsspezifität, Dauer des Replikationszyklus, Zytopathogenität und Charakteristika der latenten Infektion.

Die Einteilung der Herpesviren nach dem Aufbau des Genoms in die Gruppen A-F, die unter Berücksichtigung der Häufigkeit und der Verteilung einmalig und wiederholt vorkommender Sequenzabschnitte erfolgte, korreliert nicht mit der Einteilung nach biologischen Kriterien.

Neuere Erkenntnisse zur Molekularbiologie der Herpesviren, einschließlich der Bestimmung der DNA-Sequenzen und Genomorganisation konnten im Allgemeinen die Klassifizierungen unterstützen. Bei manchen Herpesviren mussten jedoch Reklassifizierungen vorgenommen werden.

### **Alphaherpesvirinae:**

Die Alphaherpesviren weisen einen relativ kurzen Replikationszyklus und eine schnelle Ausbreitung in der Zellkultur auf. Sie besitzen ein breites Wirtsspektrum und verursachen typischerweise akute Primärerkrankungen. Verschiedene Mitglieder dieser Gruppe sind dazu in der Lage, latente Infektionen in den Nervenzellen der sensorischen Ganglien zu etablieren.

Sie werden in die 4 Genera Simplexvirus, Varicellovirus, Mardivirus und Iltovirus unterteilt. Einige equine Alphaherpesviren, das equine Herpesvirus Typ 1 (EHV-1, equines Abortvirus), EHV-3 (equines Koitalexanthemvirus) und EHV-4 (equines Rhinopneumonitisvirus) sowie EHV-6 (asinines Herpesvirus Typ 1), EHV-8 (asinines Herpesvirus Typ 3) und EHV-9 (Gazellen-Herpesvirus) gehören dem Genus Varizellovirus an (ICTV Index of viruses, 2002).

### **Betaherpesvirinae:**

Die Betaherpesviren mit ihren 3 Genera, den Cytomegalo-, Muromegalo- und Roseoloviren, sind durch einen relativ langen Replikationszyklus mit langsamer Ausbreitung in der Zellkultur charakterisiert, wobei das Virus größtenteils zellassoziiert bleibt. Sie sind sowohl *in vivo* als auch in der Zellkultur hochgradig speziesspezifisch und verursachen geringgradige, prolongierte systemische Infektionen. Als Latenzorte wurden in erster Linie lymphoretikuläre Zellen aber auch sekretorische Drüsen, die Nieren und andere Gewebe beschrieben.

Dieser Unterfamilie gehören keine equinen Herpesviren an.

### **Gammaherpesvirinae:**

Die Mitglieder dieser auch als lymphotrope Klasse der Herpesviren bezeichneten Unterfamilie, weisen zumeist ein enges Wirtsspektrum auf, das auf die Familie oder die Ordnung des natürlichen Wirtes begrenzt ist.

Das Epstein-Barr-Virus (EBV, humanes Herpesvirus Typ 4) repräsentiert das Genus Lymphocryptovirus ( $\gamma_1$ -Herpesviren), das Herpesvirus Saimiri (saimirines Herpesvirus Typ 2, SaHV-2, HVS) den Genus Rhadinovirus ( $\gamma_2$ -Herpesviren). Die  $\gamma$ -Herpesviren etablieren eine

Latenz in lymphatischen Zellen. Den Rhadinoviren gehören 3 equine Herpesviren an, EHV-2, -5 und -7, wobei letzteres als asinines Herpesvirus Typ 2 (AHV-2) bezeichnet wird.

## 1.2 Die Unterfamilie der Gammaherpesviren

### 1.2.1 Mitglieder der Gammaherpesviren

Dem Genus Lymphocryptovirus, welches sich durch einen T- und B-Zell-Tropismus auszeichnet, gehören neben EBV 6 weitere Viren der Primaten an.

Zum Genus Rhadinovirus werden etwa 20 Viren gezählt. Neben HVS und den genannten equinen Herpesviren wurden diesem Genus weitere veterinär- und humanmedizinisch bedeutsame Viren zugeordnet. Zu nennen sind die Erreger des bösartigen katarrhalischen Fiebers des Rindes (BKF), das alcelaphine Herpesvirus Typ 1 (AIHV-1) sowie das ovine Herpesvirus Typ 2 (OvHV-2). Ein häufig beim Rind isoliertes Rhadinovirus ist das bovine Herpesvirus Typ 4 (BoHV-4) (zur Übersicht siehe Ludwig, 1983), welches zunächst als Cytomegalovirus bezeichnet (Storz et al., 1984), später jedoch den  $\gamma_2$ -Herpesviren zugeordnet wurde (Bublöt et al., 1992). Auch das erst 1994 entdeckte Kaposi-Sarkom-assoziierte humane Herpesvirus Typ 8 (KSHV oder HHV-8) (Chang et al., 1994), sowie das murine Herpesvirus 68 (MHV-68) (Blaskovic et al., 1980) gehören dem Genus Rhadinovirus an.

### 1.2.2 Pathogenese der Gammaherpesviren

Die meisten Gammaherpesviren infizieren zunächst epitheliale Zellen des Respirationstraktes, in denen sie sich vermehren. Nach der initialen Replikation gelangt das Virus in die lymphatischen Zellen des Blutes und in Zellen der regionären lymphatischen Gewebe. Dort erreicht es die für das jeweilige Virus typischen Zellen, die es in der Regel latent infiziert. Die Ausscheidung des Virus erfolgt zumeist nach erneuter Replikation in epithelialen Zellen.

Die akute Infektion verschiedener Gammaherpesviren geht mit einer lymphoproliferativen Erkrankung einher. Bei EBV tritt diese Phase der Erkrankung als akute infektiöse Mononukleose in Erscheinung (zur Übersicht siehe Kieff, 1996). Auch die akute MHV-68-Infektion führt zu einer Erkrankung, welche als „infektiöse Mononukleose-ähnliches Syndrom“ bezeichnet wird (Usherwood et al., 1996a). Das vom OvHV-2 und vom AIHV-1 verursachte bösartige katarrhalische Fieber des Rindes ist ebenfalls eine lymphoproliferative Erkrankung die jedoch immer fatal endet.

Einige Mitglieder der Gammaherpesviren verursachen Tumore in ihrem natürlichen oder mit diesem phylogenetisch verwandten Wirten. EBV verursacht B-Zell-Lymphome sowie nasopharyngeale Karzinome (zur Übersicht siehe Kieff, 1996). Auch HHV-8 wird mit verschiedenen Neoplasien in Verbindung gebracht. Für das Kaposi-Sarkom, das primäre effusive Lymphom (primary effusion lymphoma, PEL) und die multizentrische Castleman's-

Krankheit (multicentric castlemans disease, MCD) besteht eine ätiologische Bedeutung dieses Virus (zur Übersicht siehe Schulz, 1998 und Schulz, 2000b). HVS konnte keine Erkrankung in seinem natürlichen Wirt zugeordnet werden, während es bei verwandten Primaten T-Zell-Lymphome hervorruft (Knappe et al., 1998).

### 1.2.3 Replikation der Gammaherpesviren

Die Replikation der Herpesviren folgt einem regulierten Programm, in dessen Ablauf die für die Replikation und die Entstehung neuer Viruspartikel wichtigen Gene in verschiedenen Stadien aktiv sind (Roizman & Sears, 1996). Diese Gene sind bei den bekannten Gammaherpesviren in konservierten Gen-Blöcken lokalisiert (Baer et al., 1984; Albrecht et al., 1992; Telford et al., 1995).

Die sehr frühen ( $\alpha$ -) Gene kodieren in der Regel Transkriptionsfaktoren, während die frühen ( $\beta$ -) Gene Enzyme exprimieren, die an der DNA-Replikation beteiligt sind. Die Expression der späten ( $\gamma$ -) Gene ist hauptsächlich an die Bildung neuer Viruspartikel gebunden, sie kodieren daher strukturelle Komponenten. Die späten Gene können nach der Abhängigkeit ihrer Expression von der viralen DNA-Replikation in  $\gamma_1$ - (von der DNA-Synthese unabhängige) und  $\gamma_2$ - (von der DNA-Synthese abhängige) Gene unterteilt werden (zur Übersicht siehe Kieff, 1996 & Schulz, 1998).

### 1.2.4 Latenz der Gammaherpesviren

Die latente Infektion wurde definiert als reversible, nicht produktive Infektion einer Zelle durch ein replikationskompetentes Virus (Garcia-Blanco & Cullen, 1991). In der latent infizierten Zelle findet nur eine eingeschränkte virale Gen- bzw. Antigenexpression statt (Kieff, 1996; Schulz, 1998; Schulz, 2000b). Die latente Infektion der Gammaherpesviren ist in erster Linie in B- und / oder T-Zellen lokalisiert (Kieff, 1996; Schulz, 1998; Sunil-Chandra et al., 1992).

Bei der latenten Infektion von EBV, die in B-Lymphozyten etabliert wird, kommt es zur Expression von spezifischen Latenzgenen, wobei unterschiedliche Formen der Latenz in Abhängigkeit vom Expressionsmuster dieser Gene unterschieden werden. Es handelt sich dabei um die nukleären Antigene von EBV (EBNA LP, 1, 2, 3A, 3B und 3C), die latenz-assoziierten Membranproteine (LMP 1, 2A und 2B) und die EBV-kodierten, nicht polyadenylierten RNAs (EBERs) (zur Übersicht siehe Kieff, 1996).

Auch für HHV-8 wird die latente Infektion von B-Zellen beschrieben, wobei allerdings nur bei 10-20 % der infizierten Personen virale DNA in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) nachweisbar ist (Schulz, 2000a). Außerdem ist die Mehrzahl der Zellen in Kaposi-Sarkomen, PEL und MCD (Decker et al., 1996b) sowie in humanen B-Zelllinien aus an PEL erkrankten Patienten latent mit HHV-8 infiziert (Cesarman et al., 1995).

Während der Latenz von HHV-8 ist das latenzassoziierte nukleäre Antigen (LANA) immer nachweisbar. Dieses Protein soll außerdem eine Rolle bei der für HHV-8 typischen Transformation der infizierten Zellen spielen (zur Übersicht siehe Schulz, 2000b und Mattsson et al., 2002).

HVS, der Prototyp der Rhadinoviren, etabliert eine latente Infektion in T-Zellen (Fleckenstein & Desrosiers, 1982). Der ORF-73 von HVS ähnelt dem LANA von HHV-8 in Struktur und Funktion und wird wie dieser während der latenten HVS-Infektion exprimiert (Hall et al., 2000; Schäfer et al., 2003). HVS ist außerdem in der Lage in unterschiedlichen humanen Zelllinien zu persistieren. Einige HVS-Stämme führen dabei zur Proliferation der persistent infizierten Zellen (zur Übersicht siehe Whitehouse, 2003).

Die latente Infektion von MHV-68 ist in B-Lymphozyten der Milz lokalisiert (Sunil-Chandra et al., 1992). Von Stewart et al. (1998) konnte außerdem eine Persistenz von MHV-68 in Lungenepithelzellen nachgewiesen werden. Als weitere Kandidatenzellen für die Latenz von MHV-68 wurden peritoneale Makrophagen (Weck et al., 1999) sowie Makrophagen und Dendritische Zellen der Milz (Flano et al., 2000) identifiziert. Von Willer & Speck (2003) konnte gezeigt werden, dass die initiale Latenzetablierung in unterschiedlichen Zellen möglich ist, eine Langzeitlatenz jedoch nur in B-Zellen der Milz auftritt.

Für BoHV-4 wurden bisher PBMC und lymphatische Organe als wahrscheinlichste Kandidaten für die Lokalisierung latent infizierter Zellen diskutiert (Castrucci et al., 1987; Börner et al., 1999). Dabei sollen monozytäre Zellen eine besondere Rolle spielen (Osorio et al., 1985; Lopez et al., 1996).

Im Schaf kann das OvHV-2 in epithelialen Geweben sowie in B-Zellen nachgewiesen werden, während es im Rind und in experimentell infizierten Kaninchen in T-Zellen persistiert (zur Übersicht siehe Rosbottom et al., 2002).

Bei den verschiedenen Gammaherpesviren wurde das Vorliegen episomaler, also zirkularisierter DNA als Charakteristikum der latenten Infektion beschrieben. So beinhalten latent mit MHV-68- (Stewart et al., 1998), BoHV-4- (Donofrio & van Santen, 2001), EBV- (Kaschka-Dierich et al., 1981; Gardella et al., 1984; Decker et al., 1996a), OvHV-2- (Rosbottom et al., 2002) und HVS- (Ablashi et al., 1985) infizierte Zellen zirkuläre virale Genome.

*In vivo* können latente Herpesvirusinfektionen durch die Applikation von Dexamethason reaktiviert werden (Borchers et al., 1998; Börner et al., 1999). Die *in vitro*-Reaktivierbarkeit von Gammaherpesviren durch eine Behandlung latent infizierter Zellen mit dem Tumorpromoter 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) ist schon seit langem bekannt (zur Hausen et al., 1978; Fresen et al., 1978; Modrow & Wolf, 1983). Sie wird bei EBV und HHV-8 in erster Linie zur Induktion des lytischen Replikationszyklus in persistent infizierten Zelllinien genutzt. Auch Gammaherpesviren, die sich mit cpE-Bildung in Zellkulturen

vermehrten, wie z. B. MHV-68, können mittels TPA aus der Latenz reaktiviert werden (Usherwood et al., 1996b).

### 1.3 Das equine Herpesvirus Typ 2 (EHV-2)

EHV-2 wurde wie EHV-5 ursprünglich den Betaherpesvirinae zugeordnet (Browning & Studdert, 1987a). Diese Einordnung basierte auf einer relativen Spezifität für equine Zellen, langsamem Wachstum in der Zellkultur, der Tendenz zellassoziiert zu bleiben und der Anwesenheit intranukleärer, DNA-enthaltender Einschlusskörper in infizierten Zellen (zur Übersicht siehe Agius & Studdert, 1994).

Sie erfolgte allerdings unter Vorbehalt, da beide Viren einige biologische Eigenschaften aufweisen, die sie mit den Gammaherpesviren in Verbindung bringen.

So ist EHV-2 häufig in peripheren Blutleukozyten nachweisbar (Kemeny & Pearson, 1970; Roeder & Scott, 1975; Borchers et al., 1997). Außerdem ist das Wachstum von EHV-2 *in vitro* im Gegensatz zu den Mitgliedern der Betaherpesviren nicht auf Zellkulturen aus dem natürlichen Wirt beschränkt. Permissiv für die Virusvermehrung sind neben equinen Zellen u. a. Kaninchen- und Affen-Nierenzellen (zur Übersicht siehe Agius & Studdert, 1994). *In vivo* weist EHV-2 zwar eine ausgeprägte Wirtsspezifität auf, allerdings wurde die Möglichkeit der experimentellen Infektion der Maus beschrieben (Rizvi et al., 1997a).

Die Sequenzierung von 39 kbp des Genoms des EHV-2-Stammes 86 / 67 und von 42 kbp aus dem Genom des EHV-5-Stammes 2-141 zeigte schließlich, dass EHV-2 und -5 enger mit EBV und HVS verwandt sind, als mit anderen Herpesviren (Telford et al., 1993). Da sie außerdem eine ausgeprägtere Ähnlichkeit mit HVS aufweisen, musste eine Reklassifizierung zum Genus Rhadinovirus der Unterfamilie Gammaherpesvirinae vorgenommen werden. Innerhalb dieses Genus ähnelt das Genom von EHV-2 am stärksten dem Genom von HHV-8 (Albrecht, 2000). Die ersten Sequenzierungen des EHV-2- und -5-Genoms zeigten außerdem, dass sie enger untereinander verwandt sind als mit anderen Gammaherpesviren (Telford et al., 1993).

#### 1.3.1 Das Genom von EHV-2

EHV-2 besitzt ein durchgängiges Genom, in das indirekte Wiederholungen eingefügt sind und das von 18 kbp langen direkten Wiederholungen flankiert wird. Es weist den Genomtyp der Gruppe A auf (Browning & Studdert, 1989). Die gesamte Nukleinsäure- (NS-) Sequenz des EHV-2-Stammes 86 / 67 wurde 1995 von Telford et al. (1995) veröffentlicht. Das Genom besteht aus 184.427 Basenpaaren (bp) und hat einen Guanin- / Cytosin- (G / C-) Gehalt von 57,5 %.

Die 79 offenen Leserahmen (ORF), die im EHV-2-Genom identifiziert wurden, kodieren 77 Proteine, da der ORF-E1 in einer 2 mal vorkommenden Wiederholungssequenz lokalisiert ist und die ORFs 29a und b als 2 Exons eines Proteins beschrieben wurden.

Die Nummerierung der ORFs wurde in Anlehnung an die Nummerierung von HVS durchgeführt (Albrecht et al., 1992). Die 10 ORFs, welche im Genom des HVS nicht zu finden sind, wurden als E1 bis E10 bezeichnet. Entsprechungen der für EBV typischen Latenzgene sind im Genom von EHV-2 nicht vorhanden (Telford et al., 1995).

Eine ausgeprägte Heterogenität im Genom verschiedener EHV-2-Isolate wurde mittels Restriktionsenzymanalyse (REA) festgestellt (Browning & Studdert, 1987a). Von Rode et al. (1994) wurde außerdem ein repetitives Motiv beschrieben, das bei verschiedenen EHV-2-Stämmen bzw. -Isolaten in unterschiedlicher Zahl vorhanden ist (Borchers et al., 1997). Allerdings konnte bisher kein Zusammenhang zur Pathogenität unterschiedlicher Isolate festgestellt werden, es wird jedoch als mögliches Werkzeug zur Differenzierung von EHV-2-Isolaten diskutiert (Borchers et al., 1997; Borchers et al., 1998).

Holloway et al. (2000) stellten eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenz (AS-Sequenz) der gB-Gene von 4 EHV-2-Isolaten von 94 bis 96 % fest, wobei Unterschiede nicht über das gesamte Protein verteilt sind, sondern in einzelnen Abschnitten gehäuft auftreten.

Im Genom von EHV-2 wurden verschiedene wirtshomologe Gene identifiziert (Telford et al., 1995). Dabei handelt es sich um Gene, die zellulären Chemokin-Rezeptoren, Apoptose-regulierenden Genen sowie Zytokinen homolog sind (Telford et al., 1995; Camarda et al., 1999; Thome et al., 2001). Die Bedeutung dieser Gene wird im Kapitel 1.4 ausführlich beschrieben.

### **1.3.2 Pathogenese und klinische Eigenschaften der EHV-2-Infektion**

EHV-2 weist eine hohe Prävalenz in den Pferdepopulationen auf und wurde sowohl aus gesunden Pferden als auch aus Pferden mit unterschiedlichen Krankheitsbildern isoliert (Kemeny & Pearson, 1970; Roeder & Scott, 1975; Schlocker et al., 1995; Borchers et al., 1997; Nordengrahn et al., 2002). Neben dem Pferd wurden als natürliche Wirte von EHV-2 auch Zebras und Przewalskipferde beschrieben (Borchers & Frölich, 1997; Borchers et al., 1999a).

Konkrete Krankheitsbilder konnten dem Virus zumeist nur empirisch zugeordnet werden. Die häufigsten Symptome, die mit einer EHV-2-Infektion in Verbindung gebracht werden, sind Keratokonjunktivitis, respiratorische Erkrankungen mit Pneumonie und Pharyngitis, Fieber, vergrößerte Lymphknoten, Inappetenz, Anorexie sowie Leistungsschwäche („poor performance syndrome“) (Thein & Böhm, 1976; Thein & Härtl, 1976; Browning & Studdert, 1987b; Browning & Studdert, 1988; Agius & Studdert, 1994; Borchers et al., 1997; Kershaw et al., 2001).

Aus EHV-2-infizierten Pferden konnte das Virus aus Nasentupfern, Nieren, Knochenmark, Milch- und Speicheldrüsen, Milz und Vaginalschleimhaut (Browning & Studdert, 1988) sowie

aus trachealer Schleimhaut, Kornea und Konjunktiva (Thein, 1974; Thein & Böhm, 1976; Thein, 1976; Thein & Härtl, 1976; Thein, 1978) isoliert werden.

Im Rahmen einer Feldstudie an 172 Pferden konnte von Borchers et al. (1997) und Wolfinger (1998) eine erhöhte Prävalenz von EHV-2 in Beständen mit respiratorischen Problemen sowie in Beständen mit vermehrten Aborten nachgewiesen werden. Nordengrahn et al. (2002) fanden in einem Pferdebestand mit respiratorischen Problemen bei 71 % der Pferde EHV-2-Antikörper, während in einem parallel untersuchten Pferdebestand ohne respiratorische Symptomatik nur 28 % der Pferde EHV-2-Antikörper aufwiesen. In beiden Beständen konnte bei einem vergleichbaren Prozentsatz der Pferde EHV-2-DNA in PBMC nachgewiesen werden.

Auch andere Arbeiten weisen darauf hin, dass EHV-2 eine pathogene Bedeutung zukommt. So wurde beschrieben, dass EHV-2 eine Rolle als prädisponierender Faktor für die *Rhodococcus equi* Infektion bei Fohlen spielt. Durch eine passive und aktive Immunisierung gegen EHV-2 konnte ein Schutz gegen eine Infektion mit diesen Bakterien erzielt werden (Palfi et al., 1978; Belak et al., 1980; Nordengrahn et al., 1996).

Von Borchers et al. (1998) wurde nach experimenteller Infektion von Pferden mit dem EHV-2-Referenzstamm LK-4 4 Tage post infectionem (p. i.) eine Konjunktivitis und 5 Tage p. i. die Entwicklung einer Lymphadenopathie sowie respiratorischer Symptome beobachtet. Infektiöses Virus konnte dabei bis 12 Tage p. i. in Nasensekret und bis 10 Tage p. i. in Augentupfern nachgewiesen werden, die PBMC waren über den gesamten Untersuchungszeitraum in der Kokultivierung positiv. Außerdem wurde ein Lympho- und Neurotropismus von EHV-2 festgestellt. Allerdings wurde dieser nur nach experimenteller Infektion mit dem EHV-2-Referenzstamm LK-4 beobachtet, welcher ursprünglich aus einem Pferd mit respiratorischer Erkrankung isoliert wurde (Plummer & Waterson, 1963). Der zweite zur Infektion verwendete Referenzstamm T16, der aus einem Pferd mit Keratokonjunktivitis stammt (Thein & Böhm, 1976), konnte nur in konjunktivalem Gewebe detektiert werden. Von Kershaw et al. (2001) konnte in Augentupfern von Pferden, die an verschiedenen Formen der Keratokonjunktivitis erkrankt waren, signifikant häufiger EHV-2 nachgewiesen werden als bei gesunden Pferden.

Wie bereits beschrieben, ist für verschiedene Gammaherpesviren die Transformation und Tumorentwicklung in infizierten Zellen charakteristisch. Für EHV-2 konnten zwar nach der Infektion semipermissiver Hamsterzellkulturen mit UV-bestrahltem EHV-2 Anzeichen einer Transformation festgestellt werden (Staczek et al., 1984), für eine Transformation equiner Zellen durch EHV-2 existieren bisher jedoch keine Hinweise.



### 1.3.3 Latenz von EHV-2

EHV-2 ist wie andere Herpesviren in der Lage, persistente Infektionen zu etablieren (Blakeslee et al., 1975). Da der Nachweis von EHV-2 in zahlreichen Geweben geführt werden konnte, werden in der Literatur verschiedene Latenzorte von EHV-2 diskutiert.

Als Virusreservoir wird von verschiedenen Autoren das lymphatische Gewebe des Respirationstraktes angesehen (Roeder & Scott, 1975; Edington et al., 1994). Hinweise ergaben sich außerdem für eine Bedeutung des zentralen und peripheren Nervensystems bei der Latenz von EHV-2. So beschrieben Edington et al. (1994), Borchers et al. (1997) und Rizvi et al. (1997b) die Anwesenheit von EHV-2 im Trigeminalganglion. Da die Infektion über den Respirationstrakt allgemein anerkannt wird (Borchers et al., 1998), ist es möglich, dass das Virus über sensible Bahnen des Nervus Maxillaris durch retrograden axonalen Transport in das Trigeminalganglion gelangt. Da auch EHV-1 eine Latenz im Trigeminalganglion etabliert (Slater et al., 1994; Borchers et al., 1999c) und EHV-2 eine Bedeutung für die Latenzreaktivierung von EHV-1 zugesprochen wird (Welch et al., 1992; Purewal et al., 1993; Edington et al., 1994; Wolfinger, 1998), könnte es zu einer Ko-Latenz beider Viren in diesem Gewebe kommen. Der Nachweis von EHV-2-DNA im Trigeminalganglion und Bulbus Olfactorius EHV-2-infizierter Mäuse (Rizvi et al., 1997a) konnte von uns bestätigt werden (Kershaw, 2001; Borchers et al., 2002), wobei jedoch die pathogenetische Bedeutung von EHV-2 für die Maus und die Latenzetablierung in der Maus fraglich ist (Borchers et al., 2002).

Als weiterer möglicher Latenzort in neuronalem Gewebe wurde der Bulbus Olfactorius (Rizvi et al., 1997b; Borchers et al., 1998) sowie das Ganglion Ciliare (Thein, 1976; Thein, 1978) genannt. Von Kershaw (2001) konnte EHV-2-DNA außerdem im Rückenmark von natürlich infizierten Pferden nachgewiesen werden.

Als wahrscheinlichster Latenzort für EHV-2 werden jedoch unterschiedliche Leukozyten-Populationen diskutiert, da die persistente Infektion zirkulierender PBMC mit EHV-2 durch verschiedene Untersuchungen belegt werden konnte (Kemeny & Pearson, 1970; Roeder & Scott, 1975; Wolfinger, 1998).

So wurde EHV-2 in B-Zellen (Agius et al., 1994; Drummer et al., 1996; Wolfinger, 1998), in Makrophagen (Schlocker et al., 1995; Dutta & Campbell, 1978) sowie in Monozyten (Wolfinger, 1998) nachgewiesen. Von Drummer et al. (1996) wurde die EHV-2-Infektion in equinen Leukozyten intensiv untersucht und eine latente Infektion in B-Zellen festgestellt. Da das Virus bei einem großen Anteil der Pferde in diesen Zellen vorhanden und ausschließlich mit der Kokultivierung oder mittels PCR nachweisbar ist, sind sie die wichtigsten Kandidaten für den Latenzort von EHV-2.

Da die latente EHV-2-Infektion u. a. in B-Lymphozyten lokalisiert ist, könnte man Gemeinsamkeiten mit der latenten EBV-Infektion in diesen Zellen vermuten. Das Fehlen der für EBV

charakteristischen Latenzgene im Genom von EHV-2 weist jedoch auf grundlegend verschiedene Latenzmechanismen beider Viren hin (Telford et al., 1995).

#### **1.4 Wirtshomologe Gene der Gammaherpesviren**

Die meisten der bekannten Gammaherpesviren besitzen in ihrem Erbgut ORFs mit deutlicher Homologie zu bekannten zellulären Genen (Neipel et al., 1997b). Diese codieren Proteine, welche die Komplementaktivität hemmen, zellulären Chemokin-Rezeptoren oder Zytokinen homolog sind, die Apoptose regulieren oder mit der Antigenpräsentation interferieren (zur Übersicht siehe Spriggs, 1996; Davis-Poynter & Farrell, 1996; Schulz, 1998). Einige dieser ORFs sind bei verschiedenen Gammaherpesviren zu finden und in konservierten Gen-Blöcken lokalisiert, andere wurden wiederum nur bei einem Virus beschrieben.

Da in der vorliegenden Arbeit die Genexpression des EHV-2-IL-10 untersucht werden soll, wird an dieser Stelle eine Übersicht der wirtshomologen Gene der Gammaherpesviren wiedergegeben. Dabei wird besonders auf ihre Bedeutung für die Pathogenese sowie die Expression dieser Gene eingegangen.

##### **Mit Mechanismen der Apoptose interagierende Gene**

Ein bei EHV-2 vorkommendes anti-apoptotisches Gen ist der ORF-E8 (Bertin et al., 1997). Ähnliche Gene wurden auch bei HVS und BoHV-4 (ORF-71) sowie HHV-8 (ORF-K13) unter dem Namen virale FLICE- (Caspase-8-) hemmende Proteine (vFLIP) beschrieben (Russo et al., 1996; Neipel et al., 1997a; Zimmermann et al., 2001).

EHV-2 besitzt mit seinem ORF-E10 ein weiteres Gen, für das eine Beeinflussung der Apoptose beschrieben wurde. Das E10 ähnelt dem zellulären „B-Zell Lymphom Gen Typ 10“ (bcl-10). Man vermutet, dass es zur Proliferation von Lymphozyten in EHV-2-infizierten Pferden beiträgt (Thome et al., 2001).

Die Eigenschaft von EHV-2 und anderen Gammaherpesviren, apoptosehemmende Gene zu besitzen, könnte für die persistente Infektion von Lymphozyten wichtig sein. Man nimmt an, dass die Viren mit Hilfe dieser Gene in der Lage sind, natürlicherweise auftretende pro-apoptotische Vorgänge zu verhindern und dadurch die Lebensdauer der infizierten Zelle zu erhöhen (Thome et al., 2001).

##### **Virale Chemokin-Rezeptoren**

Eine weitere Gruppe Zell-homologer Gene stellen die viralen Chemokin-Rezeptoren, auch virale G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (vGPCRs) genannt, dar. EHV-2 besitzt 3 dieser Gene (Telford et al., 1995). Chemokine sind proinflammatorische Proteine, die als Attraktoren unterschiedlicher Leukozyten bekannt sind (zur Übersicht siehe Davis-Poynter & Farrell, 1996).

Der ORF-74 ist ein vGPCR mit ausgeprägter Homologie zum IL-8-Rezeptor der Säugetiere, der in verschiedenen Gammaherpesviren präsent ist (HHV-8, HVS, HVA, MHV-68 und

EHV 2) (Albrecht et al., 1992; Cesarman et al., 1996; Russo et al., 1996; Neipel et al., 1997a; Albrecht, 2000; Telford et al., 1995). Für den HVS- und HHV-8-ORF-74 wurde gezeigt, dass es sich um einen multifunktionalen Rezeptor für  $\alpha$ -Chemokine handelt (Ahuja & Murphy, 1993; Arvanitakis et al., 1997; Nicholas, 2003). Die Expression des HHV-8-ORF-74 ist in lytisch infizierten Zellen sowie in Kaposi-Sarkomen beobachtet worden (Schulz, 1998). Der EHV-2-ORF-74 ist kolinear und homolog mit dem HVS-ORF-74 (Telford et al., 1995), seine Funktionalität wurde bisher nicht untersucht.

Der EHV-2-ORF-E6 kodiert ebenfalls für ein Protein, welchem 7 transmembrane Domänen und andere Eigenschaften von GPCRs zugesprochen werden, der unter den bekannten vGPCRs jedoch die geringste Ähnlichkeit mit zellulären GPCRs aufweist (Telford et al., 1995). Seine Eigenschaften wurden bisher nicht untersucht.

Ein weiterer vGPCR von EHV-2 ist im E1-Gen lokalisiert, welches 2 mal im EHV-2-Genom zu finden ist, da es in den terminalen Wiederholungssequenzen lokalisiert ist (Telford et al., 1995). Dieses Gen weist unter allen bekannten vGPCRs den höchsten Grad an Übereinstimmung mit zellulären Genen auf (Camarda et al., 1999). Von diesen Autoren konnte gezeigt werden, dass E1 einen funktionellen Chemokinrezeptor kodiert, der das Chemokin Eotaxin bindet. Außerdem wird es *in vitro* während der lytischen EHV-2-Infektion exprimiert. Davis-Poynter & Farrell (1996) vermuten, dass die viralen Chemokinrezeptoren eine immunmodulierende Rolle bei der Durchbrechung der Entzündungsantwort auf die Virusinfektion spielen.

### **Virale Zytokine**

Unter dem Begriff Zytokine wird eine Vielzahl von Faktoren zusammengefasst, die für die Initiation und Koordinierung der Immunantwort verantwortlich sind. Auch die bereits beschriebenen Chemokine werden zu den Zytokinen gezählt. Bei verschiedenen Gamma-herpesviren, aber auch bei anderen Viren wurden Proteine entdeckt, deren NS- und AS-Sequenz eine ausgeprägte Ähnlichkeit mit zellulären Zytokinen aufweist. Diese Proteine werden auch als Virokine bezeichnet. Die viralen IL-10- (vIL-10-) Gene, denen auch das EHV-2-IL-10 angehört, werden ebenfalls zur Gruppe der Virokine gezählt. Im Folgenden werden der Beschreibung ihrer Eigenschaften jeweils eigene Kapitel gewidmet (1.5 und 1.6). Ein Gen, welches dem zellulären Interleukin-6 (IL-6) homolog ist, wird vom HHV-8-ORF-K2 kodiert und als virales IL-6 (vIL-6) bezeichnet (Neipel et al., 1997a). Da es in lymphatischen Geweben exprimiert wird, in Kaposi-Sarkomen von HHV-8-infizierten Menschen jedoch nur selten nachzuweisen ist, wird eine Bedeutung für die Proliferation von hämatopoetischen, nicht aber endothelialen Zellen angenommen (Neipel et al., 1997b; Schulz, 1998). Da das vIL-6 im Gegensatz zum zellulären IL-6 infizierte Zellen vor der Immunabwehr schützt, wird eine Bedeutung für die Persistenz und die akute Infektion postuliert. In neueren

Veröffentlichungen wird außerdem eine Beteiligung an der Transformation und dem Tumorwachstum diskutiert (zur Übersicht siehe Nicholas, 2003).

Der ORF-13 von HVS codiert ein Protein, das eine ausgeprägte Ähnlichkeit zum zellulären IL-17 aufweist (Yao et al., 1995). Es wird nur während der lytischen Infektion exprimiert (Knappe et al., 1998). Von diesen Autoren konnte eine Bedeutung des vIL-17 weder für die akute Infektion und die Tumorentwicklung *in vitro* noch für die *in vivo* Pathogenese von HVS festgestellt werden. Daher wird eine mögliche Bedeutung für die perinatale Infektion oder die apathogene Persistenz im natürlichen Wirt (Totenkopffaffe, *Saimiri sciureus*) von HVS postuliert (Knappe et al., 1998).

### 1.5 vIL-10-Gene

Das zelluläre IL-10 (cIL-10) ist ein Zytokin, das sowohl immunstimulierende als auch immun-supprimierende Effekte auf unterschiedliche Zelltypen hat. Nach der Entdeckung im Jahr 1989 wurde es auf Grund seiner Eigenschaft, die Synthese von Zytokinen zu hemmen zunächst als cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF) bezeichnet (Fiorentino et al., 1989). Es ist in der Lage, Antigen-präsentierende Zellen und Makrophagen zu hemmen und die Immunantwort durch die Hemmung der Interferon- $\gamma$ - (IFN- $\gamma$ -) Produktion von Lymphozyten zu beeinflussen. Es stimuliert außerdem die Proliferation von Thymozyten, B-Lymphozyten und Mastzellen (zur Übersicht siehe Moore et al., 2001).

Gene, die dem cIL-10 homolog sind, wurden in den Genomen des Epstein-Barr-Virus (EBV-IL-10, BCRF-1), des Parapoxvirus Orf (Orf-Virus-IL-10), des humanen Cytomegalovirus (HCMV-IL-10), des Rhesusaffen Cytomegalovirus (RhCMV-IL-10) und von EHV-2 gefunden (EHV-2-IL-10) (Moore et al., 1990; Vieira et al., 1991; Rode et al., 1993; Fleming et al., 1997; Kotenko et al., 2000; Lockridge et al., 2000).

#### **Funktion der vIL-10-Proteine:**

Das EBV-IL-10 imitiert verschiedene Aktivitäten des cIL-10, u. a. die Hemmung der Interferonsynthese, die Wirkung als Makrophagen-deaktivierender Faktor in murinen und menschlichen Zellen (Vieira et al., 1991; de Waal Malefyt et al., 1991; Hsu et al., 1992) sowie die stimulierenden Eigenschaften auf murine und menschliche B-Zellen (Go et al., 1990; Rousset et al., 1992). Einige der immunstimulierenden Eigenschaften des cIL-10 fehlen dem EBV-IL-10 jedoch. So ist es nicht in der Lage die Expression des Haupthistokompatibilitätskomplexes Klasse 2 (MHC-II) in murinen B-Zellen zu verstärken (Go et al., 1990) und vermag *in vitro* weder die Proliferation von Maus-Thymozyten noch von Mastzellen zu stimulieren (Vieira et al., 1991; MacNeil et al., 1990).

Unterschiede wurden auch in Tiermodellstudien beobachtet, in deren Verlauf ein Gentransfer des murinen IL-10 (mIL-10) bzw. EBV-IL-10 in Maustumorzellen durchgeführt wurde (Berman et al., 1996; Suzuki et al., 1995). Dabei wurden Tumoren, die das mIL-10

exprimierten, schneller abgestoßen als unbehandelte Kontrollen. EBV-IL-10 exprimierende Tumoren wiesen dagegen eine signifikant erhöhte Überlebenszeit auf.

Die Ergebnisse solcher Studien zeigen, dass das EBV-IL-10 durch den Erwerb bzw. Erhalt ganz bestimmter Eigenschaften einen grundsätzlich vom cIL-10 differierenden Einfluss auf die Entstehung der Immunantwort besitzt.

Im Gegensatz dazu sind im Orf-Virus-IL-10 auch die immunstimulierenden Eigenschaften des cIL-10 konserviert, da es die Proliferation von Thymozyten und Mastzellen fördert (Fleming et al., 1997; Fleming et al., 2000; Imlach et al., 2002; Haig et al., 2002). Diese Autoren konnten *in vitro* keine Wirkungsunterschiede zwischen dem Orf-Virus-IL-10 und dem ovinen IL-10 (ovIL-10) feststellen. Die Unterschiede zwischen dem EBV-IL-10 und dem Orf-Virus-IL-10 sollen in der Pathogenese beider Viren begründet sein:

Da das Orf-Virus-IL-10 in ovinen Keratinozyten exprimiert wird und die Orf-Virus-Infektion auf die Haut beschränkt bleibt, konnte das Orf-Virus möglicherweise alle IL-10-Wirkungen konservieren, wohingegen für EBV, welches eine systemische Infektion mit einer Latenz verursacht, der Verlust einiger immunstimulierender Eigenschaften seines IL-10-Gens vorteilhaft war (Haig et al., 2002).

#### **Molekulare Basis der Funktionsunterschiede des EBV-IL-10 und cIL-10:**

Die AS-Sequenzen der vIL-10-Proteine des EBV und des Orf-Virus weisen deutliche Übereinstimmungen mit den entsprechenden Proteinen ihrer Wirte auf. Die Identität der AS-Sequenz des humanen IL-10 (hIL-10) und des EBV-IL-10 liegt bei 78 %, ohne Berücksichtigung der ersten 20 AS des Aminoterminus (N-Terminus), die sich stärker unterscheiden, beträgt die Homologie 84 %. Auch das Orf-Virus-IL-10 unterscheidet sich vom ovIL-10 am stärksten im Bereich des N-Terminus, in den beiden carboxyterminalen (C-terminalen) Dritteln sind sie identisch (Fleming et al., 1997).

Die AS-Sequenz des CMV-IL-10 stimmt mit dem hIL-10 nur zu 27 % überein. Allerdings hat es die Introns 1 und 3 des hIL-10 konserviert, was bei keinem der anderen vIL-10-Gene der Fall ist (Kotenko et al., 2000; Lockridge et al., 2000).

Christallographische Untersuchungen zeigten, dass die funktionelle Form des hIL-10 und des EBV-IL-10 als Homodimer aus 2 identischen IL-10-Molekülen auftritt (Zdanov et al., 1995; Zdanov et al., 1997). Jedes Monomer besteht aus 6  $\alpha$ -Helices, die in 2 Domänen angeordnet sind, wodurch sie der Struktur des IFN- $\gamma$  ähneln. Außerdem konnte von Hoover et al. (1999) gezeigt werden, dass die Homodimere beider IL-10-Proteine an den IL-10-Rezeptor IL-10-R1 binden. Allerdings ist die Affinität des EBV-IL-10 zu diesem Rezeptor im Vergleich zum hIL-10 etwa 1000-fach vermindert (Liu et al., 1997).

Es ist naheliegend, dass den N-terminalen 20 AS, in denen sich Sequenz und Struktur des EBV-IL-10 vom cIL-10 am stärksten unterscheiden (Vieira et al., 1991, Zdanov et al., 1997)

eine besondere Bedeutung für die Rezeptor-Affinitätsunterschiede und damit auch für die Wirkungsunterschiede zukommt (Gesser et al., 1997).

Es zeigte sich jedoch, dass die Position 87 der AS-Sequenz des EBV-IL-10, an der das hIL-10 ein Isoleucin und das EBV-IL-10 ein Alanin trägt, in besonderem Maße für die Wirkungsunterschiede beider Proteine verantwortlich ist (Ding et al., 2000). Durch den Austausch des Isoleucins des hIL-10 mit einem Alanin in dieser Position (die Mutante wurde als hIL-10 (I87A) bezeichnet) verlor es nahezu die gesamte Fähigkeit die Proliferation muriner Thymozyten und Mastzellen zu stimulieren. Die Zytokin-hemmende Aktivität blieb jedoch erhalten. Dementsprechend erhielt das EBV-IL-10 durch die Substitution mit Isoleucin in dieser Position (EBV-IL-10 (A87I) genannt) eine Mastzellen-stimulierende Aktivität. Außerdem zeigte das hIL-10 (I87A) wie das EBV-IL-10 eine etwa 100-fach verminderte Bindungsaffinität zum IL-10-Rezeptor R1. Die Bindungsaffinität des EBV-IL-10 (A87I) zu diesem Rezeptor war im Vergleich zum hIL-10 nur noch 30-fach vermindert.

Diese *in vitro* Aktivitäten der hIL-10- und EBV-IL-10-Mutanten wurden von Ding et al. (2000) auch anhand der Überlebenskinetik von Maus-Herztransplantaten, die Wild-Typ- bzw. Mutanten-IL-10 exprimierten, untersucht:

Das hIL-10 (I87A) verstärkte, wie für das EBV-IL-10 bekannt, das Überleben der Transplantate, während das EBV-IL-10 (A87I) gegenüber dem Wild-Typ EBV-IL-10 einen deutlichen Verlust der Fähigkeit das Überleben der Transplantate zu verlängern, aufwies.

Wie bereits erwähnt, wurden bisher zwischen dem Orf-Virus-IL-10 und dem ovIL-10 keine funktionellen Unterschiede festgestellt (Haig et al., 2002). Untersuchungen zur Beziehung der AS-Sequenz und der Funktion beider Proteine zueinander führten zu keinen Übereinstimmungen mit den von Ding et al. (2000) zur AS 87 des EBV und hIL-10 genannten Ergebnissen.

Als Fazit wurde von diesen Autoren formuliert, dass die Suche nach AS, die für bestimmte Funktionen der vIL-10- und cIL-10-Proteine verantwortlich sind, nicht abgeschlossen ist. Diese Annahme wird unterstützt durch die Ergebnisse von Josephson et al. (2001), wonach keine der IL-10-Rezeptorbindungsstellen von der genannten Position 87 beeinflusst wird.

### **Expression der vIL-10-Gene:**

#### Expression *in vitro*:

Die Expression des EBV-IL-10 erfolgt nach Induktion der Virusreplikation in EBV-infizierten B-Zelllinien in der späten Phase des viralen Replikationszyklus. Daher wurde es als  $\gamma$ -Gen eingeordnet (Hudson et al., 1985; Touitou et al., 1996). Ungespleißte Transkripte des EBV-IL-10 wurden von Hudson et al. (1985), Lau et al. (1993), Ryon et al. (1993) und Touitou et al. (1996) während der lytischen Infektion detektiert. Diese Transkripte weisen eine Größe von 0,8 bis 1,7 kb auf. Sie sind kollinear mit dem EBV-Genom und am 3'-Ende polyadenyliert, weshalb es sich bei ihnen um mRNA handelt (Touitou et al., 1996).

Die Expression der EBV-IL-10-Transkripte beginnt 6 bis 9 Stunden nach der Induktion des lytischen Vermehrungszyklus des Virus und erreicht ein Maximum bis 15 Stunden, um dann abzufallen und bis 24 Stunden unverändert zu bleiben (Touitou et al., 1996). In *in vitro*-infizierten primären humanen B-Lymphozyten wird das EBV-IL-10 schon kurz nach der Infektion exprimiert (Zeidler et al., 1997).

Miyazaki et al. (1993) konnten außerdem eine Expression des EBV-IL-10 in latent infizierten B-Zellen nachweisen und zeigten dadurch, dass das EBV-IL-10 auch an der Latenzerhaltung von EBV beteiligt ist.

Das RhCMV-IL-10 wird in der Zellkultur 12 Stunden post infectionem (p. i.) als 0,9 kb großes Transkript exprimiert (Lockridge et al., 2000). Durch den Einsatz von Inhibitoren der Proteinsynthese und der viralen DNA-Replikation konnte es den  $\beta$ -Genen zugeordnet werden. Auch das HCMV-IL-10 wird als  $\beta$ -Gen exprimiert. Wie bereits beschrieben, werden die polyadenylierten CMV-IL-10-Transkripte gespleißt, da sie Introns enthalten (Lockridge et al., 2000; Kotenko et al., 2000). In einer neueren Arbeit wurde die Expression des HCMV-IL-10 auch in latent infizierten Zellkulturen nachgewiesen (Jenkins et al., 2004).

In mit den Orf-Virus-Stämmen NZ2 und NZ7 infizierten Kälberhodenzellen wurden in Anwesenheit von Proteinsyntheseinhibitoren 6 Stunden p. i. Orf-Virus-IL-10-spezifische Transkripte nachgewiesen, weshalb es den frühen Genen zugeordnet wurde (Fleming et al., 1997).

#### Expression *In vivo*:

Bei 9 von 50 untersuchten Patienten, die an einer akuten, EBV-induzierten, infektiösen Mononukleose litten, konnten Taga et al. (1995) im Blut zirkulierendes EBV-IL-10 nachweisen. Außerdem wurde in Blutproben von Personen, die an einer chronisch aktiven EBV-Infektion (CAEBV) erkrankt waren, sowohl EBV-IL-10-Protein als auch Antikörper gegen das EBV-IL-10 nachgewiesen (Tanner et al., 1997; Kanegane et al., 1997).

Ryon et al. (1993) führten den Nachweis der Expression des EBV-IL-10-Gens in Läsionen der EBV-assoziierten oralen Haarleukoplakie bei 5 untersuchten Patienten. Die Expression des EBV-IL-10 fand dabei in lytisch infizierten Zellen statt. Xu et al. (2001) konnten feststellen, dass in Gewebeproben progressiv verlaufender Fälle von kutanen Natürlichen-Killer-Zell-Lymphomen (NK-Zell-Lymphomen) neben latenzassoziierten EBV-Transkripten auch EBV-IL-10-spezifische mRNA zu finden ist.

#### **Bedeutung der vIL-10-Gene:**

Die meisten Autoren gehen von einer Beeinflussung der EBV-Infektion durch die immunsupprimierenden Wirkungen des EBV-IL-10 aus.

So wird die antivirale Immunantwort durch die Fähigkeit des EBV-IL-10, die Proliferation von Makrophagen bzw. Monozyten sowie die Produktion von IFN- $\gamma$  zu hemmen, unterdrückt (zur

Übersicht siehe Moore et al., 2001). Da das EBV-IL-10 während der lytischen Infektion exprimiert wird, kann es daher sowohl die Virusreplikation als auch die Latenzetablierung unterstützen. Die Latenzetablierung von EBV wird außerdem durch die EBV-IL-10-bedingte Unterdrückung der zytotoxischen T-Lymphozyten-Abwehr ermöglicht (Zeidler et al., 1997; Bejarano & Masucci, 1998). Die Eigenschaft des EBV-IL-10, das Wachstum und die Differenzierung von B-Zellen zu fördern, soll außerdem dazu führen, dass eine größere Zahl dieser Zellen für die akute und die latente Infektion zur Verfügung stehen (Go et al., 1990; Rousset et al., 1992).

Da das EBV-IL-10 auch während der Latenz in B-Zellen exprimiert wird (Miyazaki et al., 1993), ist es vermutlich auch an der Latenzerhaltung beteiligt. Auch das HCMV-IL-10 spielt eine Rolle bei der Unterdrückung der Wirts-Abwehr während der latenten HCMV-Infektion (Jenkins et al., 2004).

Die Rolle des EBV-IL-10 bei der EBV-induzierten Transformation von B-Zellen wird kontrovers diskutiert (Swaminathan et al., 1993; Miyazaki et al., 1993). Xu et al. (2001) bewerten den Nachweis von EBV-IL-10-Transkripten in progressiven NK-Zell-Lymphomen als Hinweis für eine Bedeutung des EBV-IL-10 für die Unterwanderung der Wirtsimmunität bei der Tumorentwicklung. Diese Ergebnisse zeigen außerdem, dass das EBV-IL-10 möglicherweise als diagnostischer Marker für bestimmte (in diesem Fall progressive) Krankheitsverläufe einsetzbar ist.

## **1.6 Das EHV-2-IL-10**

Die Anwesenheit von NS-Sequenzen mit einer ausgeprägten Ähnlichkeit zum EBV-IL-10 und hIL-10 im Genom des EHV-2-Stammes T400 wurde 1993 erstmalig von Rode et al. (1993) beschrieben.

Das IL-10-homologe Gen befindet sich auf dem *EcoR* I DNA-Fragment N und codiert ein Protein aus 179 AS. Im Rahmen der Sequenzierung des gesamten Genoms des EHV-2-Stammes 86 / 67 wurde dieser ORF als E7 bezeichnet (Telford et al., 1995). Die Übereinstimmung mit den AS-Sequenzen des hIL-10, mL-10 und EBV-IL-10 liegt bei 76,4 %, 68,5 % bzw. 70,6 % (Rode et al., 1993). Mit dem Orf-Virus-IL-10 stimmt die AS-Sequenz des EHV-2-IL-10 zu 67 % überein (Fleming et al., 1997).

Das EHV-2-IL-10 ist im Genom aller bisher untersuchten EHV-2-Isolate vorhanden (Rode et al., 1994; Holloway et al., 2000). Während Rode et al. (1994) eine 96,1 %ige Übereinstimmung der AS-Sequenz der beiden EHV-2-Stämme LK und T400 feststellten, beschrieben Holloway et al. (2000) eine 99 %ige Übereinstimmung der AS-Sequenz bei 4 untersuchten EHV-2-Isolaten.

Das EHV-2-IL-10 weist einen hohen Grad an Übereinstimmung mit dem EBV-IL-10, hIL-10 und mL-10 in den zentralen und C-terminalen Abschnitten auf (AS 47-178), während die



N-terminalen Bereiche nur wenig konserviert sind (Rode et al., 1994). Außerdem besitzt das EHV-2-IL-10 wie das EBV-IL-10 und die cIL-10-Proteine ein hydrophobes Signalpeptid, weshalb es aus der Zelle freigesetzt werden kann (Rode et al., 1994).