

5 Diskussion

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Untersuchung der Eigenschaften des EHV-2-IL-10, seiner Bedeutung für die natürliche und experimentelle EHV-2-Infektion, sowie dessen Einsatz in der Diagnostik und Therapie.

Um sich dieser für EHV-2 sehr unzureichend untersuchten Thematik zu nähern, wurde zunächst eine Nachweismethode zur Bestimmung der transkriptionalen Aktivität des EHV-2-IL-10 etabliert. Unter Verwendung dieser Methode erfolgte daran anschließend die Untersuchung der Genexpression des EHV-2-IL-10 in experimentell mit EHV-2 infizierten Zellkulturen sowie in natürlich infizierten equinen PBMC, jeweils eingebettet in flankierende Untersuchungen zu Art und Umfang der EHV-2-Infektion in diesen Systemen. Einige Aspekte zur Homologie und Bedeutung des EHV-2-IL-10 wurden zusätzlich mit Hilfe computergestützter Vergleiche der IL-10-NS- und -AS-Sequenzen verschiedener EHV-2-Isolate untereinander und mit bekannten vIL-10- und cIL-10-Genen erarbeitet.

5.1 EHV-2-IL-10-Expression in experimentell und natürlich infizierten Zellen

Am Beginn der Untersuchungen stand zunächst die Etablierung einer Methode, mit deren Hilfe die transkriptionale Aktivität des EHV-2-IL-10 sensitiv und spezifisch nachzuweisen war. Aus diesem Grund wurde unter Verwendung der bekannten EHV-2-DNA-Sequenz (Telford et al., 1995) eine sensitive und für das EHV-2-IL-10 spezifische snPCR etabliert. Durch die Verknüpfung mit einer reversen Transkription konnte diese snPCR zum Transkriptnachweis eingesetzt werden. Falsch positive Befunde, die durch die Anwesenheit von Resten viraler DNA in den RNA-Präparationen hervorgerufen werden könnten, wurden durch einen DNase I-Verdau mit anschließender Untersuchung in der IL-10-snPCR ausgeschlossen.

In Anlehnung an die Expression der IL-10-Gene des EBV, HCMV und des Orf-Virus während der lytischen Infektion *in vitro* (Touitou et al., 1996; Fleming et al., 1997; Lockridge et al., 2000), wurde die Expression des EHV-2-IL-10 zunächst während der produktiven Infektion in EHV-2-permissiven ED-Zellen untersucht.

Durch die Anwendung der EHV-2-IL-10-spezifischen snRT-PCR auf Gesamt-RNA aus experimentell mit einer Infektionsmultiplizität (MOI) von 2 PFU pro Zelle des EHV-2-Referenzstammes LK-4 infizierten ED-Zellen konnte erstmals gezeigt werden, dass das EHV-2-IL-10 *in vitro* exprimiert wird. Des Weiteren wurde festgestellt, dass die Amplifikate der EHV-2-IL-10-snRT-PCR der Größe der Amplifikate der EHV-2-IL-10-snPCR mit genomischer EHV-2-DNA entsprechen. Daraus lässt sich ableiten, dass diese Transkripte in dem Bereich der PCR-Amplifikate nicht gespleißt werden, also nur aus codierenden Sequenzen bestehen. Eine kontinuierliche Transkription wurde auch für das EBV-IL-10 und das Orf-Virus-IL-10 beschrieben (Touitou et al., 1996; Fleming et al., 1997), während das CMV-IL-10, ähnlich wie das cIL-10, aus 3-4 Exons mit dazwischen liegenden, nicht-

kodierenden Sequenzen besteht (Lockridge et al., 2000). Da von Rode et al. (1994) klassische Polyadenylierungssignale für das EHV-2-IL-10 beschrieben wurden, wurde die RT-Reaktion mit T20 Random-Hexamer-Primern durchgeführt, so dass für die anschließende snPCR ausschließlich in cDNA umgewandelte polyadenylierte RNA zur Verfügung stand. Anhand des positiven Nachweises der EHV-2-IL-10-Transkripte mit dieser Methode konnte bestätigt werden, dass das EHV-2-IL-10 als messenger RNA (mRNA) exprimiert wird, also als translatierbares Transkript vorliegt.

Da die Transkription herpesviraler Gene während des Replikationszyklus einem streng regulierten Programm folgt wurde unter Verwendung der genannten RT-PCR untersucht, in welchem Stadium der Virusreplikation die Expression des EHV-2-IL-10 *in vitro* einsetzt.

In den untersuchten LK-4-infizierten ED-Zellen wurden die Transkripte des EHV-2-IL-10 bereits 6 Stunden p. i., noch vor den zum lytischen Infektionszyklus von EHV-2 gehörenden Transkripten des EHV-2-ORF-50 und EHV-2-gB detektiert. Das EHV-2-gB wurde nach der Anwendung von Inhibitoren der Virusreplikation wie erwartet als γ_1 -Gen exprimiert, während die Expression des EHV-2-ORF-50 in Anwesenheit des Proteinsyntheseinhibitors CHX nicht immer zu beobachten war und damit nicht in jedem Fall den Kriterien eines α -Gens entsprach. Das EHV-2-IL-10 wurde dagegen unabhängig von der viralen Proteinsynthese und DNA-Replikation exprimiert. Die Kinetik der EHV-2-IL-10-Expression folgt damit eindeutig dem Muster, wie es für die Expression der α -Gene der Herpesviren beschrieben wird (Roizman & Sears, 1996). Demnach ist das EHV-2-IL-10 in dem hier untersuchten *in vitro* Modell offenbar als sehr frühes (α -) Gen einzuordnen.

Wie eingangs beschrieben, werden die bisher bekannten vIL-10-Gene *in vitro* ebenfalls im Rahmen der Virusreplikation exprimiert. Das IL-10-Gen des RhCMV wird durch CHX gehemmt und durch Phosphonoameisensäure, einem Inhibitor der viralen DNA-Replikation, nicht beeinflusst, weshalb es den β -Genen zugeordnet wurde (Lockridge et al., 2000). Die Transkription des EBV-IL-10 ist sowohl von der Proteinsynthese als auch von der viralen DNA-Replikation abhängig, entspricht also den γ_2 -Genen (Touitou et al., 1996). Lediglich das IL-10 des Orf-Virus wird, wie das EHV-2-IL-10, in Anwesenheit von CHX exprimiert (Fleming et al., 1997).

Zu Expression und Wirksamkeit des EHV-2-IL-10 existieren bisher keine Untersuchungen, allerdings wurden Ergebnisse zur Bedeutung der Expression des EBV-IL-10-Gens während der lytischen EBV-Replikation beschrieben. So zeigten Bejarano & Masucci (1998), dass die Expression des EBV-IL-10 *in vitro* in B-Zellen eine wichtige Rolle bei der akuten Infektion und der Etablierung der EBV-Latenz spielt, indem es die B-Zell-Proliferation fördert und die Immunantwort insbesondere von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) unterdrückt. Dadurch wird die Infektion einer ausreichenden Anzahl B-Zellen und der Übergang zur immunologisch

geschützten latenten EBV-Infektion ermöglicht. Auf ähnliche Weise könnte die sehr frühe Expression des EHV-2-IL-10 zur Immunevasion während der akuten EHV-2-Infektion beitragen und die Latenzetablierung von EHV-2 unterstützen.

Zur Überprüfung dieser Annahme und da keine Untersuchungen zur Bedeutung des EHV-2-IL-10 für die latente EHV-2-Infektion existieren, schlossen sich Untersuchungen der EHV-2-IL-10-Expression *in vivo* an. Experimentelle Infektionen am Pferd, dem natürlichen Wirt von EHV-2, waren im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Daher wurde die transkriptionale Aktivität des EHV-2-IL-10 im Rahmen der EHV-2-Feldinfektion untersucht.

Es ist bekannt, dass der Nachweis der hohen EHV-2-Prävalenz in den verschiedenen Pferdepopulation oftmals nicht nur serologisch, sondern auch durch die direkte Erregerisolierung und den Virusgenom-Nachweis aus den weißen Blutzellen der untersuchten Pferde möglich ist (Kemeny & Pearson, 1970; Roeder & Scott, 1975; Borchers et al., 1997). Außerdem ist die latente EHV-2-Infektion in peripheren B-Lymphozyten sowie in Zellen monozytären Ursprungs lokalisiert (Drummer et al., 1996; Wolfinger, 1998), wodurch deutliche Parallelen zu EBV gegeben sind, welches sowohl *in vivo* als auch *in vitro* B-Lymphozyten latent infiziert. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Expression des EHV-2-IL-10 in den PBMC von 3 Pferden über den Zeitraum von einem Jahr im monatlichen Abstand untersucht. Parallel wurde außerdem der EHV-2-Infektionsstatus dieser Tiere ermittelt. Dabei wurde bei allen 3 Pferden durch die Untersuchung in der EHV-2-nPCR das Vorliegen einer EHV-2-Infektion festgestellt.

Da die PBMC von Pferd A an 33 % der Untersuchungstermine in der Kokultivierung positiv waren und keine Hinweise für das Vorliegen einer lytischen EHV-2-Infektion in diesen Zellen detektiert wurden, kann man bei diesem Pferd von einer latenten Infektion ausgehen. Allerdings war zwischen 2 Untersuchungsterminen ein 4-facher Anstieg EHV-2-spezifischer Antikörper, also ein deutlicher Hinweis für das Vorliegen einer akuten EHV-2-Infektion, zu beobachten. Dieser Titeranstieg könnte entweder durch eine Reinfektion mit EHV-2 oder durch eine Reaktivierung des in den PBMC bereits latent vorhandenen Virus hervorgerufen worden sein. Als der Antikörpertiteranstieg gemessen wurde, war das infektiöse Virus jedoch wieder aus den Zellen verschwunden und nur noch latentes Virus nachweisbar.

Ein stabiler Infektionsstatus schien in den PBMC von Pferd B vorzuliegen. Obwohl sie in der EHV-2-nPCR immer positiv waren, konnte weder infektiöses noch latentes Virus isoliert werden. ORF-50- und gB-Transkripte waren, ebenso wie neutralisierende Antikörper, bei diesem Pferd nicht nachweisbar und auch im IIFT bewegten sich die Antikörpertiter auf einem konstant niedrigen Niveau. Besonders die niedrigen Antikörpertiter sprechen gegen

eine EHV-2-Reaktivierung oder -Reinfektion der PBMC dieses Pferdes, seine PBMC waren wahrscheinlich über den ganzen Untersuchungszeitraum latent mit EHV-2 infiziert.

Mit den Blutproben von Pferd C wurden ähnliche Ergebnisse wie mit den Proben von Pferd A erzielt, wobei in den PBMC ebenfalls nur latentes Virus nachweisbar war und serologisch Hinweise für eine akute EHV-2-Infektion bzw. eine Reaktivierung zu beobachten waren.

Obwohl die PBMC der 3 untersuchten Pferde latent mit EHV-2 infiziert waren, konnte nicht an jedem Untersuchungstermin latentes Virus mit der Kokultivierung isoliert werden. Auch von Borchers et al. (1997) wurde festgestellt, dass EHV-2-infizierte equine PBMC häufig nur in der EHV-2-nPCR nicht aber in der Kokultivierung positiv sind.

Es stellte sich daher die Frage, warum die Kokultivierung mit den nachweislich persistent mit EHV-2 infizierten PBMC so häufig negativ verlief. In der PCR wurde die DNA aus etwa $1-2 \times 10^4$ PBMC eingesetzt, während in der Kokultivierung jeweils etwa 4×10^5 PBMC, also deutlich mehr Zellen untersucht werden konnten. Die Ursache für die negativen Ergebnisse in der Kokultivierung beruhte wahrscheinlich auf der mangelnden Reaktivierbarkeit des latent in den Zellen vorliegenden Virus.

Aus diesem Grund wurde 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA), eine, u. a. bei EBV (zur Hausen et al., 1978; Kieff, 1996), HHV-8 (Schulz, 1998) und MHV-68 (Usherwood et al., 1996b) zur Durchbrechung der Latenz verwendete Substanz, in der Kokultivierung eingesetzt. Tatsächlich konnten dadurch die positiven EHV-2-Nachweise aus den PBMC der Pferde A und C in der Kokultivierung erhöht werden. Bei den PBMC von Pferd B zeigte die TPA-Behandlung allerdings keine Wirkung. Durch den erfolgreichen Einsatz dieser Substanz an den PBMC der Pferde A und C konnte nachgewiesen werden, dass trotz negativer Kokultivierung latentes Virus in den PBMC der Pferde vorhanden war. Außerdem wurde durch diese Untersuchungen erstmals gezeigt, dass EHV-2 wie EBV, HHV-8 und MHV-68 mittels TPA aus latent infizierten PBMC reaktivierbar ist. Da der Einsatz von TPA nur an 4 Untersuchungsterminen bei den 3 Pferden erfolgte, müssen diese Ergebnisse allerdings durch Studien mit größeren Untersuchungszahlen abgesichert werden.

Um die Feststellung der latenten Infektion in den equinen PBMC durch zusätzliche Untersuchungen zu untermauern, wurde außerdem versucht, die Genomkonformation der EHV-2-DNA in den equinen PBMC zu ermitteln. Dieses wurde exemplarisch mit den PBMC von Pferd A durchgeführt. Die Unterscheidung zwischen linearer, zirkulärer und in das Wirtsgenom integrierter viraler DNA, sollte durch die Verwendung des *in situ* Lysisgel nach Gardella ermöglicht werden (Gardella-Gel, Gardella et al., 1984).

In 4 Versuchen konnte dabei weder lineare noch zirkuläre oder integrierte EHV-2-DNA mittels Southernhybridisierung in den EHV-2-nPCR-positiven PBMC von Pferd A

nachgewiesen werden. Um die Sensitivität der Methode zu erhöhen, wurde die Detektion der DNA im Gardella-Gel, wie von Decker et al. (1996b) beschrieben, auch mit Hilfe der PCR durchgeführt. Die virale DNA aus den PBMC von Pferd A zeigte dabei ein Wanderungsverhalten wie zelluläre DNA (Gardella et al., 1984). Für dieses Wanderungsverhalten im Gardella-Gel sind folgende Erklärungen möglich:

Entweder ist EHV-2 in der Lage sein Genom, wie für das Virus der Marekschen Krankheit (Delecluse & Hammerschmidt, 1993) und EBV (Hurley et al., 1991) durch Untersuchungen im Gardella-Gel nachgewiesen, in das Wirtszell-Genom zu integrieren, oder die Freisetzung der viralen DNA in das Gel wurde inhibiert.

Gegen eine Hemmung der Freisetzung der viralen DNA sprechen allerdings die Ergebnisse mit den als Kontrollen mitgeführten B95-8-Zellen und LK-4-infizierten ED-Zellen. In diesen Zellen war die erwartete lineare und / oder zirkuläre Virus-DNA jedoch keine integrierte DNA nachweisbar. Es ist daher wahrscheinlich, dass die EHV-2-DNA in den PBMC von Pferd A in die zelluläre DNA integriert war, was somit als weiterer Hinweis für das Vorliegen einer latenten EHV-2-Infektion in den untersuchten PBMC bewertet werden kann. Da in dieser Arbeit erstmalig die Untersuchung von EHV-2-infizierten Zellen mit der Gardella-Gel-Technik beschrieben wurde, sollten diese Ergebnisse Anlass für weiterführende Untersuchungen zur Genomkonformation von EHV-2 in equinen PBMC mit dieser Methode sein.

Wie lässt sich die Expression des EHV-2-IL-10-Gens im Gesamtbild der Ergebnisse zum EHV-2-Infektionsstatus der Pferde A-C einordnen und interpretieren?

Bei Pferd A wurde die Expression des EHV-2-IL-10 an 3 Untersuchungsterminen in latent infizierten PBMC nachgewiesen. Zwar ergab sich am 3. Untersuchungstermin ein zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Transkriptnachweis und dem serologischen Nachweis einer stattgefundenen akuten EHV-2-Infektion, die PBMC waren zu diesem Zeitpunkt jedoch latent infiziert. Auch in den PBMC von Pferd B war eine EHV-2-IL-10-Expression im Rahmen der latenten Infektion zu beobachten. Dabei wurden an 5 über das ganze Jahr verteilten Terminen positive Reaktionen in der EHV-2-IL-10-snRT-PCR verzeichnet. In den latent mit EHV-2 infizierten PBMC von Pferd C konnte eine Expression des EHV-2-IL-10 zu keinem Zeitpunkt detektiert werden.

Die Expression des EHV-2-IL-10 in den PBMC der Pferde A und B zeigt, dass dieses Gen in der latent infizierten Zelle eine transkriptionale Aktivität aufweist. Warum der Nachweis dieser Transkripte nicht kontinuierlich erfolgte und in den PBMC von Pferd C gar nicht möglich war, könnte verschiedene Ursachen haben. Da die Untersuchungen immer mit der gleichen Zellzahl durchgeführt wurden, wäre es möglich, dass der Anteil infizierter Zellen an den Gesamt-PBMC in persistent infizierten Pferden Schwankungen unterliegt. Daneben könnte die Transkription des EHV-2-IL-10 während der latenten Infektion diskontinuierlich

erfolgen. In beiden Fällen wären EHV-2-IL-10-Transkripte, wie in den Untersuchungen dieser Arbeit beobachtet, nicht immer nachweisbar.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach der Bedeutung der Expression des EHV-2-IL-10 für die latente EHV-2-Infektion in equinen PBMC. Da zum EHV-2-IL-10 bisher keine funktionellen Studien existieren, ist nur der Vergleich mit Ergebnissen zu anderen viralen IL-10-Genen möglich.

Durch die EBV-IL-10-bedingte Hemmung der MHC-I-gekoppelten Antigenpräsentation wird die experimentell mit EBV infizierte B-Zelle vor einem Angriff durch CTL geschützt (Zeidler et al., 1997). Dadurch wird eines der wichtigsten Mittel des Organismus zur Kontrolle der latenten EBV-Infektion in B-Zellen (Saulquin et al., 2001) unterwandert. Auch Bejarano & Masucci (1998) zeigten, dass EBV-IL-10 und hIL-10 die Zerstörung EBV-infizierter B-Zellen durch CTL inhibieren. Da das EBV-IL-10 *in vitro* in der späten Phase der lytischen Infektion exprimiert wird (Hudson et al., 1985; Touitou et al., 1996), postulierten Bejarano & Masucci (1998) sowie Zeidler et al. (1997) allerdings, dass die Hemmung der CTL sowie die Hemmung der Antigenpräsentation in der latent infizierten B-Zelle vom hIL-10 übernommen werden und das EBV-IL-10 dann keine Rolle mehr spielt. Miyazaki et al. (1993) wiesen eine Expression des EBV-IL-10 jedoch auch in latent infizierten B-Zellen nach und zeigten dadurch, dass das EBV-IL-10 auch an der Latenzerhaltung beteiligt ist. Ebenso wurde kürzlich die Expression des HCMV-IL-10 während der latenten Infektion und damit eine Bedeutung für die Latenzerhaltung dieses Virus nachgewiesen (Jenkins et al., 2004).

Da EHV-2 wie EBV u. a. B-Lymphozyten latent infiziert weist die Expression in latent infizierten equinen PBMC auf ähnliche Wirkungsmechanismen wie für das EBV-IL-10 beschrieben, hin. Dabei könnte besonders die Unterdrückung der zellulären Abwehr für den Erhalt der latenten Infektion in equinen PBMC von Bedeutung sein.

Da die Phasen der akuten EHV-2-Infektion und der Latenzetablierung in equinen PBMC im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden, kann keine Aussage zur Bedeutung des EHV-2-IL-10 für diese Infektionsstadien *in vivo* getroffen werden. Allerdings haben die Ergebnisse dieser Arbeit zur *in vitro*-Expression des EHV-2-IL-10 gezeigt, dass es während der lytischen EHV-2-Infektion aktiv ist. Die in dieser Arbeit beschriebenen Methoden zur Untersuchung der EHV-2-IL-10-Expression und zur Feststellung des EHV-2-Infektionsstatus sollten daher genutzt werden, um die Expression des EHV-2-IL-10 z. B. in experimentell mit EHV-2 infizierten equinen PBMC zu untersuchen. Sollte EHV-2 in diesen Zellen eine Latenz etablieren, so könnte, ähnlich wie für EBV beschrieben, dadurch die Rolle des EHV-2-IL-10 für die EHV-2-Latenzetablierung aufgeklärt werden. Da bisher für die Untersuchung der EHV-2-Infektion kein adäquates Versuchstiermodell existiert (Borchers et

al., 2002), wäre der sichere Nachweis der EHV-2-IL-10-Expression während der Primärinfektion *in vivo* nur in experimentell infizierten Pferden möglich.

Durch die Herstellung einer IL-10-deletierten EHV-2-Mutante könnte *in vitro* und *in vivo* überprüft werden, ob das EHV-2-IL-10 für die akute Infektion und die Latenzetablierung essentiell ist. Untersuchungen mit IL-10-deletierten EBV-Mutanten zeigten jedoch, dass das EBV-IL-10 *in vitro* weder für die lytische EBV-Infektion noch für die Latenzetablierung in B-Zellen essentiell ist (Swaminathan et al., 1993).

Bejarano & Masucci (1998) weisen außerdem darauf hin, dass die immunsuppressiven Wirkungen des EBV-IL-10 wahrscheinlich nicht nur für die Primärinfektion sondern auch für die Reaktivierung von EBV aus latent infizierten B-Zellen von Bedeutung sind. Obwohl in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bei 2 der untersuchten Pferde serologisch Anzeichen für den Ablauf einer EHV-2-Reinfektion bzw. -Reaktivierung festgestellt wurden, konnte, bedingt durch den monatlichen Untersuchungsintervall, in den PBMC kein infektiöses Virus nachgewiesen werden. Versuche, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit an TPA-behandelten PBMC von Pferd A durchgeführt wurden, lieferten jedoch erste Hinweise für eine EHV-2-IL-10-Expression im Rahmen einer EHV-2-Reaktivierung (Daten nicht präsentiert). Die Möglichkeit der Reaktivierung einer latenten EHV-2-Infektion beim Pferd wurde von Borchers et al. (1998) beschrieben und könnte zur gezielten Untersuchung der EHV-2-IL-10 Expression zum Zeitpunkt einer EHV-2-Reaktivierung genutzt werden. Einfacher wären solche Untersuchungen allerdings an einer latent mit EHV-2 infizierten Zelllinie, wie sie für experimentelle Untersuchungen der Latenz von EBV, HHV-8 und MHV-68 etabliert wurden. An einer solchen Zelllinie könnte man experimentell, z. B. durch eine TPA-Behandlung, eine Reaktivierung herbeiführen. Leider steht eine solche Zelllinie derzeit nicht zur Verfügung.

Untersuchungen an solchen Zellen würden auch hilfreich bei der Beantwortung der Frage nach der Bedeutung von EHV-2-IL-10 als diagnostischer Latenzmarker sein. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigten zwar, dass das EHV-2-IL-10 im Rahmen der latenten EHV-2-Infektion exprimiert wird. Auf Grund der diskontinuierlichen Expression des EHV-2-IL-10 in den PBMC der Pferde A und B, dem fehlenden Nachweis dieser Transkripte bei Pferd C, sowie der hier nicht möglichen Untersuchung der akuten EHV-2-Infektion *in vivo* ist eine abschließende Beurteilung dieser Fragestellung anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit allerdings nicht möglich.

5.2 Vergleichende Untersuchungen der Primärstruktur des EHV-2-IL-10

Die bisherigen Befunde zeigen, dass das EHV-2-IL-10 *in vitro* als sehr frühes Gen exprimiert wird und in natürlich infizierten PBMC während der latenten Infektion eine Rolle spielt. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Funktionsstudien vorgesehen waren, sollten weitere indirekte Hinweise auf die Funktion des EHV-2-IL-10 gesammelt werden. Dazu wurden NS-

und AS-Sequenzanalysen sowie Strukturvergleiche mit anderen bekannten viralen und zellulären IL-10-Genen vorgenommen. Dabei wurden insbesondere Positionen beachtet, die für die Funktionen dieser IL-10-Proteine von Bedeutung sind. Dadurch sollten u. a. Rückschlüsse auf eine, wie für das EBV-IL-10 beschriebene (Apparailly et al., 1998; Henke et al., 2000), potenzielle therapeutische Verwendung des EHV-2-IL-10 ermöglicht werden.

Für die Untersuchung der Primärstruktur des EHV-2-IL-10 standen außerdem die IL-10-NS-Sequenzen von 6 EHV-2-Feldisolaten aus der Arbeit von Kershaw et al. (2001) und des EHV-2-Referenzstammes LK-4 zur Verfügung. Unter Verwendung dieser Sequenzen waren Vergleiche der NS- und AS-Sequenzen verschiedener EHV-2-Feldisolate untereinander und mit bekannten EHV-2-Referenzstämmen möglich.

Die AS-Sequenzen dieser EHV-2-Feldisolate wiesen untereinander nur geringe Unterschiede auf. Mit den EHV-2-Referenzstämmen 86 / 67 und T400 (Rode et al., 1993; Telford et al., 1995), deren IL-10-Proteine sich vollständig gleichen, wurde ein hoher Grad an Übereinstimmung (98 %) festgestellt. Auch von Holloway et al. (2000) wurde eine ausgeprägte Homologie (99 %) der IL-10-Proteine verschiedener EHV-2-Isolate beschrieben. Auf Grund dieser ausgeprägten Übereinstimmungen scheint das EHV-2-IL-10 ein konserviertes Gen zu sein. Eine Ausnahme stellte der EHV-2-Referenzstamm LK-4 dar, indem die von seinem IL-10-Gen kodierte AS-Sequenz dem IL-10-Protein des Referenzstammes 86 / 67 nur zu etwa 96 % gleicht. Ähnliches wurde auch von Rode et al. (1994) beim Vergleich der IL-10-Proteine der EHV-2-Stämme LK und T400 beobachtet. Das Genom von LK-4 weist allerdings unter verschiedenen Gesichtspunkten eine Sonderstellung auf. So besitzt es das repetitive Motiv, das auf dem *EcoRI*N Fragment des EHV-2-Genoms lokalisiert ist (Rode et al., 1994), 16 mal, während es im Genom der EHV-2-Referenzstämmen T400 bzw. 86 / 67 nur 9 bzw. 7 mal vorhanden ist (Telford et al., 1995; Borchers et al., 1997; Wolfinger, 1998). Außerdem weicht die Sequenz dieses Motivs bei LK-4 an Position 8 von den beiden anderen Referenzstämmen ab (T statt G) (Telford et al., 1995; Borchers et al., 1997; Wolfinger, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem erstmals die AS-Sequenz des equinen IL-10 (eIL-10) (Swiderski et al., 1999) mit dem EHV-2-IL-10 verglichen. Dabei wurde mit ca. 85 % eine deutliche Übereinstimmung beider Proteine festgestellt. Die größten Unterschiede waren im Bereich der N-terminalen AS zu beobachten, wobei die ersten 32 AS nur zu etwa 37,5 % übereinstimmten. Ohne Berücksichtigung des N-Terminus sind das equine und das EHV-2-IL-10 sogar zu ca. 95 % identisch. Das EHV-2-IL-10 weist demnach eine höhere Übereinstimmung mit dem eIL-10 auf als für das EBV-IL-10 und das hIL-10 beschrieben, deren AS-Sequenzen zu ca. 78 % übereinstimmen (Vieira et al., 1991). Für das EBV-IL-10

konnte vielfach gezeigt werden, dass es die immunsupprimierenden Wirkungen des hIL-10-Proteins teilt (zur Übersicht siehe Moore et al., 1993 und Moore et al., 2001). Die ausgeprägte Ähnlichkeit zwischen dem EHV-2-IL-10 und dem eIL-10 ist daher ein starker Hinweis dafür, dass auch das EHV-2-IL-10 im Pferd eine dem eIL-10 ähnliche Wirkung aufweist.

Um einen Überblick über die Lokalisierung der übereinstimmenden und differierenden Sequenzen zu erhalten, wurde ein AS-Sequenzalignment erstellt. Dabei fiel auf, dass Unterschiede der EHV-2-Stämme bzw. -Isolate untereinander nur an 3 Positionen im zentralen Bereich des Proteins vorkommen (Ausnahme wiederum der Stamm LK-4 mit 9 Abweichungen) und Differenzen zum eIL-10 im zentralen und C-terminalen Bereich des Proteins auf 6 bzw. 7 Positionen beschränkt bleiben. Diese Positionen könnten also neben dem N-Terminus für potenzielle Wirkungsunterschiede zwischen dem EHV-2-IL-10 und dem eIL-10 verantwortlich sein. Deshalb wurden sie bei dem Vergleich mit dem EBV-IL-10 und hIL-10 besonders berücksichtigt.

Dabei zeigte sich, dass im zentralen und C-terminalen Bereich lediglich 2 Positionen zu finden sind, in denen sich sowohl EBV als auch EHV-2 vom IL-10 ihres Wirtes unterscheiden. Eine dieser Positionen wurde in der Arbeit von Ding et al. (2000) als AS 87 bezeichnet. Der Unterschied zwischen dem EBV-IL-10 und dem hIL-10 in dieser Position wurde von diesen Autoren für das Fehlen der immunstimulierenden Eigenschaften des EBV-IL-10 verantwortlich gemacht. Interessanterweise besitzt das eIL-10 an dieser Stelle genauso wie das hIL-10 ein Isoleucin, das EHV-2-IL-10 wie das EBV-IL-10 jedoch nicht.

Das Orf-Virus-IL-10 besitzt die immunstimulierenden Eigenschaften der zellulären IL-10-Proteine und trägt wie diese an Position 87 die AS Isoleucin (Fleming et al., 2000). Ursprünglich wurde angenommen, dass die Ursache für die immunstimulierenden Eigenschaften des Orf-Virus-IL-10 ebenfalls in dieser AS determiniert ist (Fleming et al., 2000). Neuere Untersuchungen des Orf-Virus-IL-10 zeigten jedoch, dass diese Lokalisation nicht für die immunstimulierenden Eigenschaften dieses Virokins verantwortlich ist (Haig et al., 2002). Obwohl die Untersuchungen von Ding et al. (2000) und Haig et al. (2002) in unterschiedlichen Systemen durchgeführt wurden, wird durch dieses Ergebnis die Bedeutung der Position 87 für die Wirkung der bekannten IL-10-Proteine in Frage gestellt. Da sich in dieser AS jedoch sowohl das EHV-2-IL-10 wie auch das EBV-IL-10 vom Wirts-IL-10 unterscheiden, erscheint es wahrscheinlich, dass sie für das Fehlen der immunstimulierenden Eigenschaften der IL-10-Proteine beider Gammaherpesviren von Bedeutung ist.

In einer weiteren Studie zur Identifikation funktioneller AS-Abschnitte wurde ein Nonapeptid am N-Terminus für Wirkungsunterschiede zwischen dem EBV-IL-10 und hIL-10 verantwortlich gemacht (Gesser et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass die Sequenz dieses Nonapeptides im h- und eIL-10 konserviert ist, das EHV-2-

IL-10 wie das EBV-IL-10 jedoch ausgeprägte Unterschiede zum IL-10 seines Wirtes aufweist.

Die Einbeziehung der AS-Sequenzen des EBV-IL-10, des hIL-10 und des eIL-10 in die Untersuchungen der AS-Sequenz des EHV-2-IL-10 ergab somit, dass sich die in den Arbeiten von Ding et al. (2000) und Gesser et al. (1997) genannten AS-Sequenzunterschiede auch beim EHV-2-IL-10 und eIL-10 wiederfinden lassen.

Die immunsuppressiven Eigenschaften, die das hIL-10 und das EBV-IL-10 gemeinsam haben, zeichnen sich *in vitro* durch die Hemmung der Synthese verschiedener Zytokine (u. a. IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12), der MHC-II-Expression, der CTL-Abwehr sowie der Immunglobulin-Produktion aus (zur Übersicht siehe Moore et al., 1993 und Moore et al., 2001). Die Stimulation der Proliferation von Thymozyten und Makrophagen ist Teil der immunstimulierenden Eigenschaften, die dem hIL-10 im Gegensatz zum EBV-IL-10 zugesprochen werden (zur Übersicht siehe Ding et al., 2000 und Moore et al., 2001). An Genpositionen, die diese immunstimulierende Eigenschaften kodieren, sind dem EBV-IL-10 auf Grund der höheren Sequenzabweichungen funktionelle Bereiche verloren gegangen. NS-Sequenzen, welche die immunsuppressiven Funktionen kodieren, wurden dagegen konserviert. EHV-2 hat im Verlauf seiner Evolution wahrscheinlich ebenfalls nur die für die Unterdrückung der Wirtsabwehr bedeutenden Eigenschaften seines IL-10-Proteins konserviert, die weniger nützlichen immunstimulierenden Eigenschaften sind jedoch wie beim EBV-IL-10 verloren gegangen. Haig et al. (2002) vermuten, dass das Orf-Virus auf Grund der Replikation in Keratinozyten und dem Fehlen einer systemischen Infektion im Gegensatz zu EBV auch die immunstimulierenden Eigenschaften in seinem IL-10-Gen beibehalten konnte.

Die rein immunsuppressiven Eigenschaften des EBV-IL-10 wurden auch therapeutisch eingesetzt. So wirkt sich das EBV-IL-10 im Mausmodell hemmend auf immunpathologische Prozesse, wie z. B. rheumatoide Arthritis, stromale Keratitis und andere chronische Entzündungen aus (Apparailly et al., 1998; Henke et al., 2000). Sollte das EHV-2-IL-10 wie das EBV-IL-10 nur die immunsuppressiven Funktionen des Wirts-IL-10 besitzen, wofür sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit Hinweise ergaben, so wäre ein therapeutischer Einsatz analog zum EBV-IL-10 denkbar. Dabei könnte das EHV-2-IL-10 möglicherweise u. a. zur Behandlung der equinen rezidivierenden Uveitis oder der rheumatischen Arthritis des Pferdes verwendet werden. Das EHV-2-IL-10 könnte entweder zur direkten Anwendung rekombinant hergestellt oder, wie u. a. von Apparailly et al. (1998) für das EBV-IL-10 beschrieben, durch die Verwendung in einem Vektor in der Gentherapie eingesetzt werden.

Um die verwandtschaftlichen Beziehungen des equinen und EHV-2-IL-10 näher zu untersuchen, wurde eine phylogenetische Analyse der AS-Sequenzen der zur Verfügung stehenden viralen und eukaryonten IL-10-Proteine durchgeführt.

Dabei zeigte sich, dass die EHV-2-IL-10-Proteine mit dem eIL-10 gemeinsam von dem erstellten phylogenetischen Baum abzweigen. Diese Feststellung unterstreicht die Hypothese von Rode et al. (1994), wonach das EHV-2-IL-10 im Verlauf der Evolution des Virus direkt vom Pferd erworben wurde. Da auch das EBV-IL-10 mit dem hIL-10 und das Orf-Virus-IL-10 mit dem ovIL-10 gemeinsam abzweigen, konnten gleichzeitig die von Fleming et al. (2000) beschriebenen phylogenetischen Beziehungen dieser IL-10-Proteine reproduziert werden.

Der Mechanismus, mit dessen Hilfe die Viren die IL-10-Gene ihrer Wirte übernehmen konnten, wurde noch nicht geklärt. Da die bekannten vIL-10-Gene des Orf-Virus und der Gammaherpesviren im Gegensatz zu eukaryonten IL-10-Genen keine Introns enthalten, wird jedoch vermutet, dass zelluläre IL-10-mRNA durch die reverse Transkriptase eines Retrovirus in DNA umgeschrieben und diese dann vom DNA-Virus aufgenommen wurde (Fleming et al., 2000). Beim Pferd ist ein Virus aus der Familie der Retroviridae (Genus Lentivirus), das Virus der equinen infektiösen Anämie, bekannt (ICTV Index of viruses, 2002).

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit mit der EHV-2-IL-10-spezifischen snRT-PCR ein wirkungsvolles Werkzeug zur Untersuchung der EHV-2-IL-10-Expression *in vitro* und *in vivo* entwickelt. Die Ergebnisse zur Expression des EHV-2-IL-10 während der lytischen und latenten Infektion, die unter Verwendung dieser Methode erarbeitet wurden, weisen gemeinsam mit den durch AS-Sequenzvergleiche erhaltenen Anhaltspunkten auf eine Bedeutung dieses Virokins für die verschiedenen Formen der EHV-2-Infektion hin. Im Zusammenspiel mit anderen wirtshomologen EHV-2-Genen ist das EHV-2-IL-10 daher wahrscheinlich Bestandteil der viralen Mechanismen zur Unterwanderung der Wirtsimmunität.

Da die Expression *in vitro* schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt stattfand ist es naheliegend, dem EHV-2-IL-10, wie für andere bekannte vIL-10-Gene beschrieben, eine Bedeutung für die akute Phase der EHV-2-Infektion zuzusprechen. Daher sollten diese Ergebnisse Anlass sein, entsprechende Versuche mit experimentell infizierten equinen PBMC durchzuführen.

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Untersuchungen zur akuten EHV-2-Infektion *in vivo* vorgenommen werden konnten, sollte die Klärung der Rolle des EHV-2-IL-10 für dieses Stadium der Infektion außerdem Teil weiterführender Analysen sein. Dabei könnte in experimentell infizierten Pferden die Untersuchung der IL-10-Expression während der initialen Virusreplikation und der Latenzetablierung in equinen PBMC erfolgen. Zusätzlich könnten in solchen Versuchen die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zur Genomkonformation von EHV-2 während der verschiedenen Infektionsstadien sowie der Reaktivierbarkeit von latentem EHV-2 mittels TPA-Behandlung überprüft und weitergeführt werden. Besonders geeignet wäre außerdem der Einsatz einer IL-10-deletierten EHV-2-Mutante *in vitro* und *in vivo*, um die Bedeutung des EHV-2-IL-10 für die akute EHV-2-Infektion, die Latenzetablierung sowie die Latenzerhaltung zu prüfen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zur EHV-2-IL-10-Expression in latent infizierten equinen PBMC müssen unter Verwendung der hier beschriebenen Methode bei einer größeren Tierzahl überprüft werden, um eine abschließende Aussage zum Einsatz des EHV-2-IL-10 als Marker für die latente EHV-2-Infektion zu ermöglichen. Ob das EHV-2-IL-10-Protein während der Latenz in PBMC zu finden ist oder frei im Blut zirkuliert, sollte ebenfalls Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein. Würde es gelingen, equine PBMC unter Laborbedingungen latent zu infizieren, könnte man die IL-10-Expression im Rahmen der latenten EHV-2-Infektion *in vitro* verifizieren. Die theoretisch, an Hand von Sequenzanalysen ermittelten Ergebnisse zur potenziellen Wirksamkeit des EHV-2-IL-10 könnten durch Funktionsstudien mit rekombinant hergestelltem EHV-2-IL-10 überprüft werden. Auch die therapeutische Anwendbarkeit wäre mit rekombinantem EHV-2-IL-10 *in vitro* zu prüfen.