

## **1 Einleitung**

Diese Arbeit dient der weiteren Erforschung der Ätiopathogenese, der durch das Equine Herpesvirus Typ 2 (EHV-2) bedingten Keratokonjunktivitis. In der Einleitung werden zunächst die Familie der Herpesviridae (Kapitel 1.1) und die Unterfamilie der  $\gamma$ -Herpesvirinae (Kapitel 1.2), zu der auch EHV-2 zählt, kurz betrachtet. Danach wird näher auf die Equinen Herpesviren (EHV) (Kapitel 1.3) mit dem Schwerpunkt EHV-2 (Kapitel 1.4) eingegangen.

### **1.1 Die Familie der Herpesviridae**

Von der Familie der Herpesviridae wurden bisher mehr als 100 Spezies von Herpesviren bei Säugern, Vögeln, Amphibien und Fischen entdeckt (White & Fenner, 1994), die alle morphologische Gemeinsamkeiten (Kapitel 1.1.1) aufweisen. Auch im biologischen Verhalten lassen sich viele Übereinstimmungen finden (Kapitel 1.1.2). An Hand von charakteristischen, genetischen Strukturen und biologischen Verhaltensweisen lassen sich die Herpesviridae in verschiedene Klassen einteilen (Kapitel 1.1.3).

#### **1.1.1 Morphologische Gemeinsamkeiten der Familie der Herpesviridae**

Das 124-235 Kilobasenpaare (kbp) große, lineare, doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA) -Molekül wird von einem Core umgeben, das einen Durchmesser von 75 nm hat. Dieses liegt wiederum in einem ikosaedrischen Kapsid von circa (ca.) 100 nm Durchmesser (Knopf, 2000). Das aus 162 symmetrischen Kapsomeren (150 Hexamere und 12 Pentamere) zusammengesetzte Kapsid ist seinerseits von der mit Glykoproteinfortsätzen - den so genannten Spikes - besetzten Virushülle umgeben. Den Raum zwischen Kapsid und Hülle füllt das amorphe Tegument aus.

Der Durchmesser eines Herpesviruspartikels beträgt 120 bis 300 nm (Roizman et al., 1992).

#### **1.1.2 Biologische Gemeinsamkeiten der Familie der Herpesviridae**

##### **Infektionsweg**

Die Virusübertragung erfordert stets engen Kontakt zwischen 2 Individuen und erfolgt zumeist über direkten Schleimhautkontakt, aber auch über Tröpfcheninfektionen (Regenmortel et al., 2000). Nach der Adhäsion an eine Wirtszelle gelangt das Kapsid durch Fusion der viralen Hülle mit der Zellmembran oder durch Endophagozytose in die Zelle. Die virale DNA penetriert zusammen mit einigen viralen Proteinen den Wirtszellkern.

##### **Virusvermehrung**

Die lineare Virus-DNA zirkuliert im Kernplasma und liegt dann als Episom vor. Im Zellkern findet die Transkription in 3 zeitlich getrennten Phasen statt, und im Zytoplasma erfolgt die Translation der viralen messenger Ribonukleinsäuren (mRNA). In den 3

Transkriptionsphasen werden sehr frühe ( $\alpha$ ), frühe ( $\beta$ ) und späte ( $\gamma$ ) Gene abgelesen und die dort kodierten Proteine synthetisiert. Bei den sehr frühen Proteinen handelt es sich um Enzyme, welche die Expression der frühen und späten Proteine aktivieren und somit die Virusvermehrung regulieren. In der frühen Phase werden die frühen Proteine gebildet, bei denen es sich um Enzyme und nukleinsäurebindende Proteine handelt, die essentiell für die Replikation der viralen DNA sind. Die Replikation der viralen DNA findet nach dem Rolling-Circle-Prinzip statt. In der späten Phase werden die viralen Strukturproteine gebildet, aus denen das Kapsid im Kern zusammengebaut wird. Anschließend wird die virale DNA in das Kapsid integriert. Die äußere Hülle entsteht durch das Budding an der inneren Kernmembran, die mit glykosylierten Envelope-Proteinen besetzt ist. Die Viruspartikel werden über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat zur Zellmembran transportiert, wo sie die Zelle durch Exozytose oder Zellyse verlassen (Roizman, 1996).

### Latenz

Ferner können alle Herpesviren lebenslange, persistierende Infektionen bei dem jeweiligen natürlichen Wirt hervorrufen, indem das Virus nach überstandener, akuter Erstinfektion in latenter Form in Zellen verbleibt. Latenz ist definiert als „eine reversible, nicht produktive Infektion einer Zelle durch ein replikationskompetentes Virus“ (Garcia-Blanco & Cullen, 1991). Während der Latenz liegt das Virus-Genom als extrachromosomales Episom im Kernplasma vor, das bei der Zellreplikation an die Tochterzelle weitergegeben wird. Die virale Proteinexpression ist in dieser Phase stark reduziert. Bei  $\alpha$ -Herpesviren werden in der Latenz nur latenz-assoziierte Transkripte (LAT) gebildet, die vermutlich eine regulatorische Funktion innehaben (Fraser et al., 1992). Die Regulationsmechanismen, die zur Etablierung und Aufrechterhaltung der Latenz führen, sind aber weitgehend ungeklärt.

Die Umstände, die zur Überführung von latentem zu infektiösem Virus führen, sind ebenfalls nicht geklärt, aber in jedem Fall begünstigt eine Immunsuppression des Wirtes diesen Prozeß. Somit können beispielsweise Streß oder Glukokortikoidgaben zum erneuten, extrazellulären Auftreten von infektiösem Virus führen, was wiederum die Manifestation klinischer Symptome zur Folge haben kann. *In-vitro* läßt sich diese Reaktivierung von latentem Virus unter anderem durch Phorbolsäureester forcieren, die die DNA-Replikation und die Expression sehr früher Gene stimulieren (Hausen et al., 1978; Tenny & Morahan, 1987).

### 1.1.3 Klassifizierung der Herpesviridae

Die Einteilung der Herpesviridae erfolgt im wesentlichen an Hand von 2 verschiedenen Charakteristika.

Als erstes wäre die Genomstruktur zu nennen. Das Herpesvirus-Genom besteht aus unigenen Sequenzen, die in jedem Genom nur einmal vorkommen und aus Repetitionen, das sind Gensequenzen, die sich unterschiedlich oft wiederholen. Die Einteilung der Herpesviren in die Gruppen A-F erfolgt an Hand der Lokalisation und der Orientierung der verschiedenen unigenen und repetitiven Gensequenzen im Genom.

Eine andere Einteilung, die nicht mit der in die Gruppen A-F korreliert, ist die Klassifizierung an Hand des biologischen Verhaltens in  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Herpesviren.

Die Unterfamilie der  $\alpha$ -Herpesvirinae zeichnet sich durch ein breites Wirtsspektrum, Latenz in Ganglienzellen, akute, primäre Erstinfektionen und durch ein schnelles zytolytisches *in-vitro* Wachstum aus.

Das Wirtsspektrum der  $\beta$ -Herpesvirinae ist *in-vitro* und *in-vivo* wesentlich enger als das der  $\alpha$ -Herpesviren. Als Latenzorte kommen vor allem sekretorisches Drüsen- und Nierengewebe sowie lymphoretikuläres Gewebe in Frage. Das *in-vitro*-Wachstum ist langsamer als das von  $\alpha$ -Herpesviren und führt typischerweise zu Riesenzellbildung, was dieser Unterfamilie auch den Namen Zytomegalieviren einbrachte.

Auf die  $\gamma$ -Herpesvirinae wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

## 1.2 Die Unterfamilie der $\gamma$ -Herpesvirinae

### 1.2.1 Biologie

Die Unterfamilie der Gammaherpesvirinae unterteilt sich an Hand genomischer Kriterien in die Genera Lymphocryptovirus ( $\gamma_1$ -Herpesvirus) und Rhadinovirus ( $\gamma_2$ -Herpesvirus). Das Genus der Lymphocryptoviren enthält zum Beispiel das Baboon Herpesvirus, das Cercopithecine Herpesvirus 14 und als Prototyp das Humane Herpesvirus 4 (Epstein-Barr Virus [EBV]). Dem Genus Rhadinovirus gehören beispielsweise das Alcelaphine Herpesvirus, das Bovine Herpesvirus (BHV) -4, EHV-2, EHV-5 und EHV-7 (Asinine Herpesvirus [AHV] -2), das Humane Herpesvirus (HHV) -8, das Murine Herpesvirus 68 (MHV 68), das Ovine Herpesvirus 2 (OvHV-2) und als Prototyp das Saimirine Herpesvirus 2 (Herpesvirus Saimiri [HVS]) an. Die meisten  $\gamma$ -Herpesviren betreiben eine „ausgeprägte Piraterie“ von zellulären, immunmodulierenden Genen. Da das virale Genom viele repetitive, extronische Gensequenzen beinhaltet, können zelluläre DNA-Sequenzen - ohne eine Veränderung von Introns - aufgenommen werden (Albrecht et al., 1998).

### 1.2.2 Epidemiologie

Das Wirtsspektrum der *in-vitro* langsam wachsenden  $\gamma$ -Herpesviren, die in den empfänglichen Spezies eine hohe Prävalenz aufweisen, ist typischerweise eng. Einige  $\gamma$ -Herpesviren, wie OvHV-2, MHV 68 und EHV-2, können allerdings auch Tiere anderer Familien oder sogar anderer Unterordnungen infizieren (Ackermann, 2006). So wurde beispielsweise OvHV-2, welches als Hauptwirt das Schaf infiziert (Unterfamilie: Ruminantia), auch bei Schweinen (Unterfamilie: Nonruminantia) nachgewiesen (Albini et al., 2003). Erstinfektionen kommen häufig relativ früh im Leben des Wirts vor, wobei sie meist asymptomatisch verlaufen und das Virus rasch in Latenz übergeht. In den infektiösen Phasen sind  $\gamma$ -Herpesviren oft in Epithelzellen und Fibroblasten zu finden.

Beim Menschen (EBV und HHV-8) und bei anderen Primaten (HVS und Herpesvirus Ateles [HVA]) können  $\gamma$ -Herpesviren unter bestimmten Voraussetzungen Zelltransformationen hervorrufen. Dies bewirkt, daß zelluläre Signale nicht mehr richtig erkannt werden, so daß der Wirt die Autonomie über diese Zellen verliert und sich diese dann neoplastisch-proliferativ vermehren (Meinl et al., 1998).

### 1.2.3 Latenz von $\gamma$ -Herpesviren

$\gamma$ -Herpesviren können unterschiedlichste Zellen latent infizieren. Besonders häufig wurde die Latenz von  $\gamma$ -Herpesviren in lymphatischen Zellen wie Makrophagen (MHV 68: Weck et al., 1999; BHV-4: Osorio et al., 1985), in B-Zellen (EHV-2: Gleeson & Coggins, 1985; Drummer et al., 1996; MHV 68: Sunil-Chandra et al., 1992; EBV: Babcock et al., 1998; Rhesus Rhadinovirus: Bergquam et al., 1999; HHV-8: Schulz, 2000) und in T-Zellen (HVS und HVA: Fleckenstein & Desrosiers, 1982) nachgewiesen. Es wurden aber auch neurologische Gewebe wie Ganglien (EHV-2: Thein 1978; 1996; Rizvi et al., 1997) und dendritische Zellen (MHV 68: Flano et al., 2000) sowie Epithelzellen (EBV: Robertson et al., 1996; MHV 68: Stewart et al., 1998) als Latenzort beschrieben.

Über das bereits in Kapitel 1.1.2 Gesagte hinaus gilt für die Latenz von  $\gamma$ -Herpesviren, daß es während der Latenzphase - im Gegensatz zu den  $\alpha$ -Herpesviren die lediglich LAT bilden - häufig zur Expression von spezifischen Latenzgenen kommt. Dieser Vorgang wurde am intensivsten für das EBV untersucht. Hierbei zeigte sich, daß maximal 11 Genprodukte, zu denen sowohl Proteine als auch nicht translatierte RNA gehören, expremiert werden. EBV tritt in 3 verschiedenen Latenzformen auf (Rowe et al., 1992), die sich in dem Set der expremierten Gene unterscheiden. Die Genexpression ist abhängig vom Phänotyp der infizierten Zelle und dem Immunstatus des Wirtes (zur Übersicht siehe Kieff, 1996).

### 1.3 Equine Herpesviren

Bei Equiden konnten bislang 9 Herpesviren identifiziert werden. Dabei handelt es sich um 6  $\alpha$ - und 3  $\gamma$ -Herpesviren (Tabelle 1).

**Tabelle 1** Zusammenstellung der Equinen Herpesviren

Abkürzung	Hauptwirt	Unterfamilie
EHV-1	Pferd	$\alpha$ -Herpesvirinae
EHV-2	Pferd	$\gamma$ -Herpesvirinae
EHV-3	Pferd	$\alpha$ -Herpesvirinae
EHV-4	Pferd	$\alpha$ -Herpesvirinae
EHV-5	Pferd	$\gamma$ -Herpesvirinae
EHV-6 (AHV-1)	Esel	$\alpha$ -Herpesvirinae
EHV-7 (AHV-2)	Esel	$\gamma$ -Herpesvirinae
EHV-8 (AHV-3)	Esel	$\alpha$ -Herpesvirinae
EHV-9 (GHV-1)	Gazelle	$\alpha$ -Herpesvirinae

#### 1.3.1 Equine $\alpha$ -Herpesviren

Der natürliche Wirt der  $\alpha$ -Herpesviren EHV-1, EHV-3 und EHV-4 ist das Pferd. AHV-1 und AHV-3 kommen bei Eseln vor und EHV-9 (Gazelle Herpesvirus [GHV] -1) wurde aus einer Thomson Gazelle isoliert (Fukushi et al., 1997), kann aber auch Pferde infizieren (Taniguchi et al., 2000).

##### 1.3.1.1 Das Equine Herpesvirus Typ 1 und das Equine Herpesvirus Typ 4

Auf Grund der engen phänotypischen Verwandtschaft von EHV-1 und EHV-4 wurden diese beiden Viren zunächst nicht differenziert, sondern als EHV-1 bezeichnet. Da sie aber bei so unterschiedlichen Krankheitskomplexen wie respiratorischen Erkrankungen, Aborten, perinatalen Erkrankungen und Myeloenzephalitiden von Pferden nachgewiesen werden konnten, wurden weiterführende Untersuchungen durchgeführt. An Hand von Bestimmungen der Dichte und des Guanin- und Cytosin (G/C) -Gehaltes und mittels Kreuzneutralisationstests wurden zunächst 2 Subtypen von EHV-1 postuliert (Mayr et al., 1965; Ludwig, 1972; Borgen & Ludwig, 1974), die 1982 in die Nomenklatur Einzug nahmen (Allen & Turtinen, 1982). Durch Restriktionsenzymanalysen (REA) wurden zwischen Viren, die vor allem Aborte verursachen und Viren, die Rhinopneumonien hervorrufen, genotypische Unterschiede festgestellt. Diese Unterschiede rechtfertigten eine Einteilung in EHV-1 (Equines Abortvirus) und EHV-4 (Rhinopneumonitisvirus) (Sabine et al., 1983; Studdert et al., 1981; Turtinen et al., 1981).

Beide Viren sind weltweit verbreitet und führen oft zu asymptomatischen Erstinfektionen, an die sich eine Latenzphase anschließt. Als Latenzorte wurden für EHV-1 das Trigeminalganglion, Lymphknoten, T-Lymphozyten und die Nasenschleimhaut (Edington et al., 1985; 1994; Slater et al., 1994; Baxi et al., 1995; Chesters et al., 1997; Borchers et al., 1999a) und für EHV-4 Lymphknoten des Respirationstraktes, das Trigeminalganglion und das Bronchial- und Alveolarepithel (Welch et al., 1992; Edington et al., 1994; Borchers et al., 1999b) beschrieben. Latent infizierte Tiere scheiden - auch ohne klinische Symptome zu zeigen - intermittierend Virus über verschiedene Sekrete aus, so daß sich der Erreger über Aerosole oder direkten Kontakt schnell in den einzelnen Beständen ausbreitet. Weitere angenommene Infektionswege sind horizontal von Mutterstuten auf Fohlen und vertikal zwischen den einzelnen Fohlen (Murray et al., 1996; Gilkerson et al., 1999), so daß bis zu 100% der Tiere in einem Fohlenbestand erkranken können (Thein, 1996).

### Abort

EHV-1 ist der häufigste Grund für virusbedingte Stutenaborte im letzten Drittel der Trächtigkeit (Allen & Bryans, 1986; Wolff et al., 1986). EHV-4 wurde nur selten in abortierten Geweben nachgewiesen (Crabb & Studdert, 1995; Gerst et al., 2003). Der Abort findet meist komplikationslos und ohne weitere klinische Symptome statt. In seltenen Fällen werden lebensschwache Fohlen geboren.

### Rhinopneumonie

Rhinopneumonien infolge von Infektionen mit equinen  $\alpha$ -Herpesviren werden vor allem durch EHV-4 und seltener durch EHV-1 hervorgerufen. Nach einer 2- bis 3-tägigen Inkubationszeit kommt es zu Fieber, Anorexie und Entzündungen der Atemwege mit serösem, später auch mukösem Nasenausfluß. Das von EHV-1 hervorgerufene Krankheitsbild geht meist mit leichteren, respiratorischen Symptomen einher und tritt vor allem im Winter auf (Matsumura et al., 1992).

### Myeloenzephalitis

Diese Verlaufsform geht infolge von neurologischen Ausfällen mit Paresen und Paralysen einher, die wiederum Ataxien zur Folge haben (Ludwig et al., 1987; Thein & Brown, 1988; zur Übersicht siehe Borchers et al., 2006a). Die Symptome treten teilweise einige Tage nach einem Abort auf, können aber auch davon unabhängig sein. Als Ursache wurde öfter EHV-1 als EHV-4 genannt.

Bei Pferden wurde über diese 3 Symptomkomplexe hinaus das sporadische Auftreten von Augenerkrankungen im Zusammenhang mit EHV-1 und -4 festgestellt. Bei EHV-1-infizierten

Tieren kam es zwar sowohl zu Konjunktividen (Mayr & Thein, 1984) als auch zu Keratitiden (Riis, 1981), aber bei experimentell infizierten, spezifiziert pathogenfreien Pferden wurde am Auge ausschließlich eine Chorioreinitis beobachtet (Slater et al., 1992). Klinische Symptome am Auge können auch durch EHV-4 hervorgerufen werden (Lavach, 1992; Stiles, 1999).

### **1.3.1.2 Das Equine Herpesvirus Typ 3**

EHV-3 ist der Auslöser für eine weltweit enzootisch auftretende Krankheit, die unter den Namen Mosaikausschlag, Deckexanthem des Pferdes, Equines Koitalexanthem oder Equines Herpesexanthem bekannt ist (Thein, 1996). Die Virusätiologie wurde von Petzoldt (1970) geklärt, und eine Charakterisierung des Erregers wurde von Ludwig et al. (1971) durchgeführt. Man geht davon aus, daß die Übertragung des Erregers vor allem durch Kontakt beim Deckakt, aber auch horizontal von der Mutterstute auf ihr Fohlen verläuft (Crandell & Davis, 1985). Das klinische Bild tritt erst nach einer Reaktivierung von latentem Virus auf und ist von Effloreszenzen der Genitalhaut an Vulva, Penis und Präputium geprägt. Die Veränderungen können auch auf benachbarte Hautbezirke übergreifen. Es wurde sogar der Nachweis von EHV-3 bei einem Fohlen mit Uveitis beschrieben (Cullinane et al., 1994). Ohne Sekundärinfektion heilen die Veränderungen innerhalb von 2-3 Wochen ab und lassen unpigmentierte, weiße Narben (white spots) zurück.

### **1.3.2 Equine $\gamma$ -Herpesviren**

Für die  $\gamma$ -Herpesviren EHV-2 und EHV-5 ist das Pferd der Hauptwirt. AHV-2 läßt sich bei Eseln nachweisen.

Die  $\gamma$ -Herpesviren des Pferdes, die zunächst ausschließlich als EHV-2 identifiziert worden waren, wurden mittels Restriktionsenzymanalysen und Hybridisierungsversuchen in die 2 Genotypen EHV-2 und EHV-5 unterteilt (Browning & Studdert, 1987b; 1989a; Agius et al., 1992). Die so differenzierten Herpesviren EHV-2 und EHV-5 wurden ursprünglich als  $\beta$ -Herpesviren klassifiziert, da es sich bei beiden Viren um Zytomegalie hervorrufende Erreger handelt. Allerdings wurden beide Viren an Hand von Genomstudien dem Genus Rhadinovirus der Subfamilie der  $\gamma$ -Herpesvirinae zugeordnet (Telford et al., 1993; 1995), wobei EHV-2 innerhalb des Genus die größte Homologie auf Proteinebene zu HVS aufweist (Telford et al., 1993). Interessant ist, daß in dem Genom aller Rhadinoviren Regionen mit unterschiedlich hohen G/C-Gehalten vorkommen. So schwankt beispielsweise der G/C-Gehalt bei HVS zwischen 36% und 71% (Bankier et al., 1985; Stamminger et al., 1987). Bei EHV-2 und EHV-5 liegt der G/C-Gehalt hingegen in dem gesamten Genom konstant bei etwa 58% (Browning & Studdert 1989b; Agius et al., 1992). Hieraus leiteten Telford et al. (1993) ab, daß es sich bei EHV-2 und EHV-5 möglicherweise um ein neues Genus der  $\gamma$ -Herpesvirinae, nämlich um  $\gamma_3$ -Herpesviren, handeln könnte.

### **1.3.2.1 Das Equine Herpesvirus Typ 2**

Auf EHV-2 wird in dem Kapitel 1.4 ausführlich eingegangen.

### **1.3.2.2 Das Equine Herpesvirus Typ 5**

Das EHV-5-Genom ist linear, doppelsträngig und etwa 179 kbp groß. Es wurde der Genomgruppe F zugeordnet, das heißt, es beinhaltet keine Wiederholungssequenzen.

Vor dem Jahre 1993 wurde bei den meisten Publikationen der EHV-2-Nachweis lediglich mittels serologischer Tests geführt. Dabei wurden zum einen Antikörpertiter aus dem Blut bestimmt, zum anderen wurden isolierte Viren mittels serologischer Tests charakterisiert. Da eine große Homologie zwischen EHV-5 und EHV-2 besteht, kann es sein, daß bei einigen älteren Untersuchungen, bei denen EHV-2 nachgewiesen worden war, es sich tatsächlich um EHV-5 gehandelt hatte. So sind beispielsweise 67-68% der Gensequenz des Glykoproteins B (gB) bei den beiden Viren identisch (Dunowska et al., 2000). Diese Homologie zeigt sich auch in der Aminosäuresequenz des gB. So wurde eine 66%ige Übereinstimmung und eine 79%ige Ähnlichkeit zwischen einem EHV-5- und einem EHV-2-Referenzstamm festgestellt, wobei die Unterschiede nur in der Substitution einzelner oder im Fehlen von 2-3 Aminosäuren lagen (Holloway et al., 1998; 1999). Heutzutage können mittels molekularbiologischer Tests, wie der PCR, beide Viren schnell und sicher unterschieden werden.

Eine Beteiligung von EHV-5 an respiratorischen Symptomen wird diskutiert (Dunowska et al., 1999). Ferner wurde EHV-5 bei Pferden mit Hornhauttrübung häufiger nachgewiesen als EHV-2 (Borchers, 2006). Ein Beweis für eine ätiopathologische Beteiligung von EHV-5 an einem bestimmten Krankheitsgeschehen steht allerdings noch aus.

## **1.4 Das Equine Herpesvirus Typ 2**

Im Jahre 1963 gelang erstmals der Nachweis eines langsam wachsenden Equinen Herpesvirus aus dem Magen der Stute „Lady Kells“ (Plummer & Waterson, 1963). Dieses Virus wurde später als Erstisolat von EHV-2 angesehen und trägt den Namen „EHV2.LK“.

### **1.4.1 Biologie**

Das lineare, doppelsträngige, 192 kbp große EHV-2-Genom liegt als Isomer vor. Bei der Sequenzierung des gesamten Genoms von dem EHV-2-Stamm 86/67 zeigten sich 79 Offene Leserahmen (open reading frame [ORF]), die für 77 Proteine kodieren (Telford et al., 1995). Das EHV-2-Genom konnte eindeutig der Genomgruppe A zugeordnet werden. Dies bedeutet, daß das Genom durchgängig ist, es interne, indirekte, kurze Wiederholungen aufweist und daß es an den Enden von direkten, 18 kbp langen Wiederholungssequenzen

flankiert wird (Browning & Studdert, 1989b). Wie an Hand von REA-Schnittmustern gezeigt werden konnte, weist EHV-2 eine genetische Variabilität auf, die stärker als bei allen anderen Herpesviren ausgeprägt ist (Browning & Studdert, 1987b; 1989b; Collinson et al., 1994). Auch bei serologischen Untersuchungen wurden, in Abhängigkeit von dem verwendeten EHV-2-Referenzstamm, unterschiedliche Titerhöhen bei ein und demselben Pferdeserum festgestellt, was auf stammspezifische, antigenetische Variabilität bei EHV-2 hindeutet (Plummer et al., 1973; Rose et al., 1974; Mumford & Thomson, 1999).

Die von einigen  $\gamma$ -Herpesviren hervorgerufenen Zelltransformationen (Meinl et al., 1998) sind für EHV-2 nur bei *in-vitro*-Versuchen an - mit UV-Licht bestrahlten - Hamster Embryozellen beschrieben (Staczek et al., 1984).

Bei Pferden konnte EHV-2 in einer großen Vielzahl von Geweben nachgewiesen werden. Als Latenzorte werden die B-Lymphozyten (Gleeson & Coggins, 1985; Drummer et al., 1996) angenommen. Als weitere Latenzorte werden das Trigeminalganglion (Rizvi et al., 1997), das Ziliarganglion (Thein, 1978; 1996) sowie Makrophagen (Dutta & Campbell, 1978; Schlocker et al., 1995) diskutiert.

#### **1.4.2 Epidemiologie**

EHV-2 konnte weltweit in den verschiedensten Geweben von natürlich und experimentell infizierten Pferden zum Beispiel im Respirationstrakt (Turner et al., 1970; Rose et al., 1974; Wilks & Studdert, 1974; Fu et al., 1986; Borchers et al., 1998), in Milz, Niere, Uterus, Knochenmark, Milch- und Speicheldrüsen (Browning & Studdert, 1987a; Edington et al., 1994), in lymphatischen Geweben (Harden et al., 1974; Edington et al., 1994; Rizvi et al., 1997; Borchers et al., 1998), in Geweben des zentralen und peripheren Nervensystems (Rizvi et al., 1997; Borchers et al., 1998) und in okulären Geweben (Studdert, 1971; Thein & Böhm, 1976; Thein, 1978; Miller et al., 1990; Collinson et al., 1994; Borchers et al., 1998; Kershaw et al., 2001) nachgewiesen werden (zur Übersicht siehe Agius & Studdert, 1994).

In den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells [PBMC]) von Pferden lag die Prävalenz von EHV-2 bei Untersuchungen mittels Polymerase-Kettenreaktionen (polymerase chain reaction [PCR]) in Deutschland bei 30%-63% (52/172 klinisch gesunde Tiere [Borchers et al., 1997]; 17/27 augenkrankte Tiere [Kershaw et al., 2001]), in Australien bei 31% (25/83 Pferde [Reubel et al., 1995]), in Schweden bei 68% (26/38 Tiere [Nordengrahn et al., 2002]) und in Großbritannien bei 71% (15/21 Tiere [Nordengrahn et al., 2002]). Die Isolierung von EHV-2 aus den PBMC gelang in Deutschland bei 23%- 31% (11/48 [Kershaw et al., 2001]; 53/172 [Borchers et al., 1997]), in Polen bei

24% (34/139 [Ruszczuk et al., 2004]) und in den USA sowie in Großbritannien bei 89% (71/80 [Kemeny & Pearson, 1970]; 17/19 [Roeder & Scott, 1975]) der untersuchten Pferde.

Ferner lässt sich EHV-2 aus Nasen- und Vaginalsekret isolieren (Browning & Studdert, 1987a). Es ließ sich kein EHV-2 in der Milch oder im Urin von experimentell infizierten Stuten finden (Harden et al., 1974).

Der Virusnachweis wurde bei Pferden mit unterschiedlichen Symptomen, aber auch bei klinisch unauffälligen Tieren geführt (Kapitel 1.4.4). Andere Studien haben die Vermutung nahegelegt, daß es sich bei EHV-2 um einen Ko-Faktor für andere virale und bakterielle Infektionen handeln könnte (Kapitel 1.4.3).

Die Infektionswege von EHV-2 sind noch nicht zufriedenstellend geklärt. Es wird angenommen, daß direkte, horizontale Infektionen (Browning & Studdert, 1987a), die über die oberen Atemwege verlaufen (Bagust et al., 1972; Blakeslee et al., 1975; Sherman et al., 1977), die Regel sind.

Natürliche, intrauterine EHV-2-Infektionen wurden nur selten beschrieben. Bei zwei abortierten Föten (Petzoldt, 1967; Galosi et al., 2005) und bei einem gesund geborenen Fohlen (Thein et al., 1983) konnte EHV-2 allerdings detektiert werden. Nach experimenteller, intrauteriner Infektion konnte EHV-2 bis zum 65. Tag *post-partum* bei einem Fohlen nachgewiesen werden (Gleeson & Studdert, 1977).

Das Wirtsspektrum von EHV-2 beschränkt sich nicht auf das Hauspferd, sondern es sind auch andere Equiden für das Virus permissiv. So konnten bei 95% von 21 freilebenden Bergzebras (*Equus zebra*) in Namibia im indirekten Immunfluoreszenztest (IFT) Antikörpertiter gegen EHV-2 festgestellt werden (Borchers & Fröhlich, 1997). Auch bei in deutschen Zoologischen Gärten gehaltenen Equiden - darunter Przewalski-Pferde (*Equus przewalskii*), Zebras (*Equus quagga antiquorum*, *Equus quagga boehmi*, *Equus zebra burchelli*) sowie wilde und domestizierte Esel (*Equus hemionus onager*, *Equus asinus asinus*) - wurden bei 93% der Tiere EHV-2-Antikörpertiter im IFT festgestellt. Bei derselben Studie konnte mittels EHV-2-PCR bei 16 von 34 und mittels Kokultivierung bei 7 von 14 Przewalski-Pferden EHV-2 direkt aus PBMC nachgewiesen werden (Borchers et al., 1999c). In einer anderen Studie konnte hingegen bei keinem von 51 wild in der Serengeti (Tansania) lebenden Zebras (*Equus burchelli*) EHV-2 mittels serologischer Methoden detektiert werden (Borchers et al., 2005). In diesem Zusammenhang muß stets bedacht werden, daß es vor allem bei dem indirekten, serologischen EHV-2-Nachweis zu Kreuzreaktionen mit AHV-2 kommen kann.

### 1.4.3 Immunantwort auf EHV-2 Infektionen

Die spezifische Immunantwort von Pferden auf EHV-2-Infektionen kann an Hand von Antikörpertitern ermittelt werden, wobei der indirekte EHV-2-Nachweis von virusspezifischen (neutralisierenden) Antikörpern mit einer sehr hohen Prävalenz weltweit erbracht wurde (Bagust et al., 1972; McGuire et al., 1974; Rose et al., 1974; Jolly et al., 1986; Borchers et al., 1997; Craig et al., 2005). Dies könnte sich durch häufige Re- und Superinfektionen mit verschiedenen EHV-2-Stämmen (Studdert, 1974; Browning & Studdert, 1987a) erklären, die immer wieder die Antikörperbildung stimulieren. Signifikante Titeranstiege um den Faktor 4 sind bei natürlich infizierten Tieren eher selten (Wilks & Studdert, 1976; Telford et al., 1993; Kershaw et al., 2001).

#### Wirtshomologe Gene von EHV-2

In dem EHV-2-Genom wurden 6 Gene, die für zellhomologe Proteine kodieren, entdeckt. Sequenzanalysen zeigten weitgehende Homologien dieser Gene mit den Genen von eukaryotischen Zellen, die für 2 Apoptose-hemmende Proteine, für 3 Glykoprotein-gekoppelte Rezeptoren (glycoprotein-coupled receptors [GPCR]) und für ein Zytokin kodieren.

Der ORF E8 kodiert für ein virales flice inhibitory protein (v-FLIP). Das gebildete Protein inhibiert vor allem in Lymphozyten und Epithelzellen die Procaspase 8, welche ein zentrales Enzym der Apoptosekaskade ist (Thome et al., 1997).

Das von dem ORF E10 gebildete Protein ist ein virales caspase-recruiting domain-like apoptotic protein (v-CLAP) und erhöht die Transkriptionsrate von Enzymen und Faktoren, die ihrerseits Apoptosehemmer wie B-cell lymphoma/leukemia-2 (bcl-2) und das Zinkfingerprotein A20 aktivieren (Thome et al., 1999; Poyet et al., 2001).

Die Hemmung der Apoptose von infizierten Zellen bewirkt, daß das Virus über längere Zeit intrazellulär vorliegen kann und stellt somit eine das Immunsystem unterwandernde Überlebensstrategie dar.

Bei den 3 GPCR handelt es sich um membrangebundene Chemokinrezeptoren.

Der ORF 74 ist ein bei den verschiedenen EHV-2-Stämmen sehr variables Gen, das Ähnlichkeit mit einem Interleukin (IL) -8-Rezeptor hat und kolinear zum ORF 74 des HVS ist (Telford et al., 1995). Für die von dem ORF 74 von HVS und HHV-8 kodierten Proteine ist die Fähigkeit zur  $\alpha$ -Chemokinbindung nachgewiesen (Ahuja & Murphy, 1993; Arvanitakis et al., 1997).

Der ORF E1 kodiert für ein Eotaxin-bindendes Molekül und vermindert dadurch die Kalziummobilisation und die Chemotaxis beim Wirt (Camarda et al., 1999).

Die Funktionsweise des ORF E6 ist noch nicht geklärt, die Proteinstruktur weist aber diverse Übereinstimmungen mit membrangebundenen Proteinen auf (Telford et al., 1995).

Vermutlich wirken sich die viralen Chemokinrezeptoren immunmodulierend aus, indem sie die Entzündungsreaktionen hemmen, die die Folge von Virusinfektionen sind (Davis-Poynter & Farrell, 1996).

Der ORF E7 kodiert für ein 179 Aminosäuren großes Peptid, bei dem es sich um ein IL-10-Analogon (v-IL-10) handelt. Die Wirkungsmechanismen dieses Proteins sind noch unklar (Rode et al., 1993). Obwohl EHV-2 genetisch höchst heterogen ist, weist dieses Gen bei verschiedenen Stämmen eine Homologie von 96-99% auf (Rode et al., 1994; Holloway et al., 2000) und ist demnach hoch konserviert. Das v-IL-10 von EHV-2 ähnelt mit 71% übereinstimmender Aminosäuren dem von EBV gebildeten v-IL-10 am stärksten (Rode et al., 1993). Demnach könnte das von EHV-2 kodierte v-IL-10 ähnlich wie das von EBV exprimierte v-IL-10 wirken, nämlich über die Inhibierung der Proliferation von antigenspezifischen T-Zellen durch die Hemmung der antigenpräsentierenden Eigenschaften von Monozyten (de Waal Malefyt et al., 1991) und über eine Verminderung der Interferon- $\gamma$ -Produktion (zur Übersicht siehe Moore et al., 2001). Das v-IL-10 von EHV-2 besitzt, ebenso wie das zelluläre IL-10, ein hydrophobes Signalpeptid, welches die Freisetzung des IL-10-Analogons aus der Zelle ermöglicht. Vor dem ORF E7 befindet sich eine extronische, 19 bp (Basenpaare) große Repeatsequenz. Dieses Repeat wiederholt sich bei verschiedenen EHV-2-Stämmen unterschiedlich oft, so daß es zwischen 171 und 304 bp groß ist.

Vermutlich wirken sich also alle der 6 beschriebenen Proteine immunmodulierend auf den Wirt aus. Eine weitere Veränderung des Immunsystems durch EHV-2 - deren Mechanismus noch nicht geklärt werden konnte - ist die Supprimierung des vom Wirt gebildeten monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in Zellkulturen (Dunowska et al., 2001).

Es deutet also vieles darauf hin, daß EHV-2 bei Pferden das Immunsystem moduliert und unterwandert. Dies könnte ein Grund dafür sein, daß EHV-2 häufig als prädisponierender Faktor für andere Infektionserreger beschrieben wurde (Palfi et al., 1978; Belak et al., 1980; Edington et al., 1994; Nordengrahn et al., 1996; Varga et al., 1997).

#### **1.4.4 Klinische Relevanz**

Als Symptomkomplexe, bei denen EHV-2 nachgewiesen wurde, wurden immer wieder Erkrankungen des oberen Respirationstraktes (Palfi et al., 1978; Jolly et al., 1986; Murray et al., 1996), Lungenerkrankungen (Ames et al., 1986; Fu et al., 1986; Lakritz et al., 1993; Schlocker et al., 1995), Konjunktivitis (Studdert, 1971) und Keratokonjunktivitis (Thein & Böhm, 1976; Thein, 1978; Collinson et al., 1994; Miller et al., 1990; Kershaw et al., 2001) seltener hingegen Leistungsschwäche (Rose et al., 1974; Jensen-Waern et al., 1998),

Pharyngitis (Blakeslee et al., 1975; McAllister & Blakeslee, 1977), Inappetenz, Lymphadenitis und Fieber (zur Übersicht siehe Browning & Studdert, 1988) beschrieben. Da EHV-2 aber auch häufig in klinisch unauffälligen Tieren nachgewiesen wurde (Kono & Kobayashi, 1964; Kemeny & Pearson, 1970; Turner et al., 1970; Borchers et al., 1997; Kershaw et al., 2001; Krüdwagen et al., 2001; Besthorn, 2002), ist weitere Forschungsarbeit nötig, um zu klären, ob EHV-2 eine Rolle als primäres, infektiöses Agens oder als Ko-Faktor in Mischinfektionen zukommt (Schlocker et al., 1995; Crabb & Studdert, 1995; Murray et al., 1996).

### Respiratorische Erkrankungen

Der EHV-2-Nachweis bei Pferden mit respiratorischen Symptomen wurde insbesondere bei Fohlen und Jährlingen beschrieben (Dunowska et al., 2002).

Beispielsweise wurden bei Erkrankungen, die mit leichtem Fieber, Apathie und serösem Nasenausfluß einhergingen und die infolge erfolgloser Antibiotikatherapie wohl nicht bakteriell bedingt waren, signifikante Antikörpertiteranstiege gegen EHV-2 bei bis zu 4 Monate alten Fohlen beobachtet (Palfi et al., 1978).

Einen indirekten Beweis für die Beteiligung von EHV-2 an respiratorischen Erkrankungen haben passive Vakzinationsversuche von Fohlen erbracht. Hierbei zeigten sich bei der gegen EHV-2 geimpften Testgruppe keine Atemwegserkrankungen. Die Pferde der Kontrollgruppe und Tiere, bei denen der Impfschutz nicht alle 4 Wochen erneuert worden war, litten hingegen unter respiratorischen Symptomen (Belak et al., 1980). Auch durch aktive Immunisierung gegen EHV-2 ließen sich die Morbidität und Mortalität von respiratorischen Erkrankungen (Morein & Merza, 1991; Nordengrahn et al., 1996; Varga et al., 1997) senken.

Mittels Virusanzucht aus Trachealsekret konnte EHV-2 signifikant häufiger bei Tieren gefunden werden, die unter Atemwegserkrankungen litten als bei gesunden Pferden, wobei sich hingegen in den PBMC keine Unterschiede beim EHV-2-Nachweis mittels Anzucht zeigten (Murray et al., 1996). Die Virusanzucht gelang auch aus Nasentupferproben von 2/22 (10%) Fohlen, die respiratorische Symptome zeigten (Craig et al., 2005).

Bei experimentellen Infektionsstudien mit einem EHV-2-Stamm, der von einem Tier mit Atemwegserkrankungen stammte, traten allerdings nur milde Symptome auf (Borchers et al., 1998).

### Keratokonjunktivitis

Eine Entzündung von Konjunktiva und/oder Kornea kann beim Pferd durch Traumen, Infektionen mit Bakterien, Pilzen, Viren und Parasiten (zur Übersicht siehe Nasisse & Nelms, 1992; Hamor & Whelan, 1999) und durch Autoimmunerkrankungen (Collins et al., 1994; Ramsey et al., 1994) hervorgerufen werden. Als virale Erreger von systemischen

Erkrankungen des Pferdes, die mit einer Augenerkrankung einhergehen können, wurden Adenoviren (McChesney et al., 1973; Gleeson et al., 1978), das Equine Arteritis Virus (EAV) (Holyoak et al., 1993; Paweska et al., 1997), equine Influenzaviren (Abd El-Rahim & Hussein, 2004), EHV-1 (Riis, 1981; Mayr & Thein, 1984), EHV-3 (Cullinane et al., 1994) und EHV-4 (Lavach, 1992; Stiles, 1999) beschrieben.

Die klinische Einteilung von Keratitiden erfolgte nach der anatomischen Lokalisation (Barnett et al., 1998) in:

- Keratitis superficialis (betrifft Hornhautepithel und vorderes Stroma)
- Keratitis profunda (betrifft das Hornhautepithel bis zur Descemetschen Membran)
- Keratitis interstitialis (betrifft nur Stroma und Descemetsche Membran).

Bei Viruskeratitiden erfolgte eine Einteilung an Hand des klinischen Bildes (Barnett et al., 1998) in:

- Keratitis punctata
- Ulzerative Viruskeratitis
- Keratitis maculosa
- weitere, vermutlich virusbedingte Keratopathien.

Barnett ordnete den klinischen Bildern folgende Symptome zu:

Die Keratitis punctata wird am häufigsten diagnostiziert, ist oft sehr schmerzhaft, tritt meist einseitig auf und geht mit einer ödematösen, hyperämischen Konjunktiva einher. Kornealäsionen mit einem Stromaödem, die unregelmäßig mit Fluoreszein anfärbbar sind, führen zu einer oberflächlichen Trübung der Kornea.

Bei der ulzerativen Viruskeratitis bildet sich ein flaches, gut abgrenzbares, anfärbbares und hochgradig schmerzhaftes Ulkus, welches von einem Stromaödem umgeben ist.

Die Keratitis maculosa geht mit einer dichten, oberflächlichen, fokalen, nicht anfärbaren Hornhauttrübung und Gefäßeinsprossung einher. Sie stellt die Folge einer rezidivierenden Keratitis punctata oder ulzerativen Keratitis dar.

Der erste Nachweis von EHV-2 in einem Pferdeauge gelang mittels Virusanzucht aus einem Augentupfer bei einem Fohlen, das unter respiratorischen Symptomen und Konjunktivitis litt (Studdert, 1971). Durch Kokultivierung von einem Korneabioptat eines 4 Wochen alten Fohlens, das an einer Keratokonjunktivitis superficialis erkrankt war, konnte EHV-2 erstmals aus einem Pferdeauge isoliert werden, welches das Bild einer klassischen Viruskeratitis zeigte. Das Tier stammte aus einem Bestand, in dem schon zuvor häufig Augenerkrankungen aufgetreten waren. Serologisch wurden bei dem Fohlen hohe Titer von

neutralisierenden Antikörpern gegen EHV-2 nachgewiesen. Im Laufe der Therapie des Auges mit einem desoxyuridinhaltigen Augenpräparat kam es nach etwa 10 Tagen zum Abklingen der Symptome und später zur kompletten Heilung (Thein & Böhm, 1976). Thein hat das Auftreten von Augenerkrankungen bei 6% von 100 Araberfohlen ebenfalls mit EHV-2-Infektionen in Verbindung gebracht (Thein, 1978; Thein et al., 1983).

In einer rein therapeutischen Untersuchung führte eine Virostatika-Therapie von 6 Pferden, die an Keratitis superficialis litten - von denen einige nicht auf Antibiotika ansprachen - nach 1-6 Wochen zur Heilung, wobei es bei einem Tier zu Rezidiven kam (Matthews & Handscombe, 1983). Es folgten weitere Fallberichte von einer Vollblutstute (Miller et al., 1990) und einer Fohlengruppe (Collinson et al., 1994), bei denen sowohl der EHV-2-Nachweis als auch eine erfolgreiche Virostatikatherapie die Annahme bekräftigten, daß EHV-2 in direktem Zusammenhang mit Keratokonjunktivitiden steht.

Experimentelle Infektionen von Pferden mit EHV-2-Stämmen, welche aus an Keratokonjunktivitis superficialis erkrankten Augen stammten, führten nach einer mittels Glukokortikoiden herbeigeführten Immunsuppression zu Konjunktivitiden ohne Beteiligung der Kornea (Thein, 1996; Borchers et al., 1998).

In weiteren Untersuchungen wurden die Ergebnisse verschiedener EHV-2-spezifischer PCR bei augenkranken Testtieren und klinisch unauffälligen Kontrolltieren miteinander verglichen. In den 3 bisher publizierten Studien, in denen - im Gegensatz zu den meisten zuvor veröffentlichten Berichten - nicht ausschließlich Fohlen und Vollbluttiere als Patienten untersucht worden waren, kam es zu uneinheitlichen Resultaten. EHV-2 konnte in 2 Studien häufiger bei augenkranken als bei gesunden Pferden nachgewiesen werden (Kershaw et al., 2001; Krüdwagen et al., 2001), wobei sich nur bei Kershaw ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen EHV-2-Nachweis und einer Augenerkrankung zeigte. Besthorn (2002) wies EHV-2 hingegen öfter in gesunden als in erkrankten Augen nach.

Da die hier vorliegende Arbeit der Hypothese nachgeht, daß EHV-2 in einem direkten Zusammenhang mit der equinen Keratokonjunktivitis steht, wird im folgenden die Untersuchung von Kershaw et al. (2001) ausführlicher erörtert.

Unter anderem wurden 2mal im Abstand von 2-4 Wochen Blut- und Watteaugentupferproben von 29 augenkranken und 21 gesunden Pferden entnommen und diese intensiv virologisch, serologisch und molekularbiologisch auf EHV-2 untersucht. Wie die serologischen Tests ergaben, konnten in beiden Gruppen nur geringfügige Unterschiede in den Antikörpertiterhöhen gegen EHV-2 festgestellt werden. Mittels Kokultivierung ließ sich EHV-2

etwa gleich oft aus den PBMC der Test- und Kontrolltiere anzüchten. Aus Watteaugentupfern gelang die Kokultivierung von EHV-2 allerdings weder bei Test- noch bei Kontrollpferden. Am interessantesten sind die Ergebnisse der Wattetupferuntersuchungen, die mittels nested PCR (nPCR) durchgeführt wurden. Hierbei zeigte sich, daß sich EHV-2 zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung in den Watteaugentupfern der Testtiere (12/27 [44%]) signifikant häufiger nachweisen ließ als in den Watteaugentupfern von Pferden der Kontrollgruppe (2/21 [10%]). Somit handelte es sich hierbei um die erste und bisher einzige Studie, bei der ein direkter Zusammenhang zwischen dem EHV-2-Nachweis und der equinen Keratokonjunktivitis hergestellt werden konnte. Zur Zweituntersuchung zeigte sich dieser Zusammenhang nicht mehr, was auf eine bei einigen Patienten durchgeführte Virostatikatherapie zurückgeführt wurde.

Um diese Ergebnisse aufzugreifen und weiterzuführen, wurden in der hier vorliegenden Arbeit erneut augenranke Testtiere und gesunde Kontrolltiere mit denselben Methoden untersucht wie sie auch von Kershaw et al. (2001) angewendet wurden. Zusätzlich wurden einige Änderungen vorgenommen, um beispielsweise Daten über mögliche Latenzorte von EHV-2 zu sammeln oder um genetische Merkmale in Bezug auf Gewebetropismus und Virulenz verschiedener EHV-2-Stämme herauszuarbeiten. Außerdem wurde versucht, die Probennahme zu optimieren.