

4 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, Erkenntnisse zur Rolle des EHV-2-IL-10 während der akuten und latenten Phase der EHV-2-Infektion zu gewinnen, seine Eignung als Latenzmarker für die Diagnostik zu prüfen und durch vergleichende Untersuchungen der Primärstruktur Hinweise auf seine Funktionalität zu erhalten. Folgende Fragestellungen zu dieser Problematik wurden behandelt:

1. Wird das EHV-2-IL-10 während der lytischen Infektion *in vitro* exprimiert?

Es sollte eine experimentell mit EHV-2 infizierte equine Zelllinie in der RT-PCR auf das Vorhandensein EHV-2-IL-10-spezifischer Transkripte untersucht werden.

2. Wann wird das EHV-2-IL-10 *in vitro* exprimiert und lässt es sich in die für Herpesviren getroffene Einteilung der Genexpression in α -, β - und γ -Gene einordnen?

In der unter Punkt 1 genannten EHV-2-infizierten equinen Zelllinie sollte auf der Ebene der Transkription die Kinetik der IL-10-Expression untersucht werden. Die Ergebnisse sollten durch den parallelen Nachweis von 2, bezüglich ihrer zeitlichen Expression definierten, EHV-2-Genen (ORF-50 und gB) und mit Hilfe von 2 Inhibitoren der Virusreplikation präzisiert werden.

3. Unter welchen Bedingungen findet die Expression dieses Gens in natürlich mit EHV-2 infizierten equinen PBMC statt?

In natürlich infizierten PBMC des Pferdes sollten Transkripte des EHV-2-IL-10 in der RT-PCR nachgewiesen werden. Um gleichzeitig zwischen dem Vorliegen eines akuten oder latenten Infektionsstadiums differenzieren zu können, wurden die PBMC parallel mittels PCR, in der Virusanzucht aus lysierten Zellen, der Kokultivierung und der Gardella-Gel-Technik untersucht. Außerdem wurde die Anwesenheit von ORF-50- und gB-Transkripten in den PBMC mittels RT-PCR überprüft.

4. Gibt es Möglichkeiten, durch Sequenzvergleiche der IL-10-Gene verschiedener EHV-2-Stämme Rückschlüsse auf dessen Funktionalität und Bedeutung zu ziehen?

Sequenzen des IL-10-Gens verschiedener EHV-2-Isolate sollten unter Verwendung computergestützter Analysen untereinander und mit dem equinen IL-10 sowie anderen vIL-10 und cIL-10-Genen verglichen werden.

4.1 Untersuchungen zur EHV-2-IL-10-Expression in der Zellkultur

Die Existenz eines dem mL-10- und hIL-10-Gen homologen ORF wurde für EBV bereits 1990 durch Moore et al. (1990) und 1991 durch Vieira et al. (1991) gezeigt. 1993 gelang Rode et al. (1993) erstmals der Nachweis eines IL-10-ähnlichen Gens im Genom des EHV-2-Stammes T400, ein Ergebnis, das 1995 durch die komplette Sequenzierung des EHV-2-Stammes 86 / 67 von Telford et al. (1995) bestätigt wurde. Zur Expression dieses EHV-2-Gens liegen bislang keine Studien vor. In verschiedenen Arbeiten konnten allerdings sowohl *in vitro* als auch *in vivo* transkriptionale Aktivitäten verschiedener viraler (v-) IL-10-Gene (EBV-IL-10, CMV-IL-10 und Orf-Virus-IL-10) gezeigt werden (vgl. Kapitel 1.5).

In Anlehnung an für diese vIL-10-Gene beschriebene Ergebnisse sollte in der vorliegenden Arbeit das Auftreten EHV-2-IL-10-spezifischer Transkripte untersucht werden. Als Methode für den Nachweis der RNA wurde die RT-PCR ausgewählt.

Die RT-PCR, wie sie in dieser Arbeit eingesetzt werden sollte, stellt grundsätzlich eine aus 2 Arbeitsschritten zusammengesetzte Methode dar. Während im Verlauf der reversen Transkription die gesamte vorliegende mRNA unspezifisch in cDNA umgewandelt wird, sollte die sich anschließende PCR in der Lage sein, selektiv die EHV-2-IL-10-spezifische cDNA zu erkennen und diese auch in nur geringen Mengen nachzuweisen. Der Erfolg des Transkriptnachweises in der RT-PCR setzte also die Etablierung einer, für das EHV-2-IL-10-spezifischen, PCR voraus, deren Spezifität und Sensitivität durch die Verwendung als snPCR gesteigert werden sollte.

4.1.1 Etablierung einer EHV-2-IL-10-spezifischen PCR

4.1.1.1 Primerauswahl und Bestimmung der optimalen PCR-Bedingungen

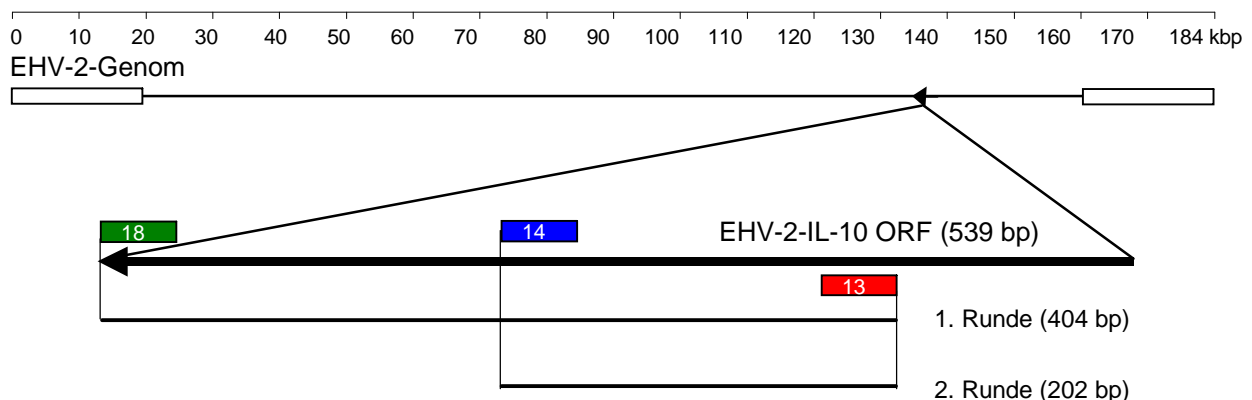
Anhand der veröffentlichten Sequenz des EHV-2-Genoms (Telford et al., 1995, GenBank accession number U20824) wurden aus dem codierenden Bereich des EHV-2-IL-10 mit Hilfe des Computerprogramms MacVector (Accelrys, Cambridge, UK) 3 aus 20 Nukleotiden bestehende Primer für eine EHV-2-IL-10-spezifische snPCR generiert. In der snPCR wird, ähnlich wie in der nPCR, aus dem Produkt des äußeren Primerpaares (Primer 13 und 18, Bild 1) in einer 2. PCR-Runde (Primer 13 und 14, Bild 1) ein in diesem liegendes kleineres Amplifikat erzeugt. Diese Primer wurden, ebenfalls unter Verwendung des genannten Computerprogramms, bezüglich ihrer Kreuzreaktivität mit den bekannten Sequenzen von EHV-1 („pathogenes britisches Isolat“, Telford et al., 1992, GenBank accession number NC001491), EHV-4 (Stamm NS80567, Telford et al., 1998, GenBank accession number AF030027) und der mRNA des equinen IL-10 (eIL-10) (Swiderski et al., 1999, GenBank accession number U38200) getestet. Dabei wurden keine Bindungsstellen gefunden. Die optimalen PCR-Bedingungen für jedes der beiden Primerpaare wurden unter Verwendung der „Taq DNA-Polymerase“ auf einem „Omnigene-Cycler“ ermittelt (3.9.2). Für die

Etablierung der PCR wurden in jedem Ansatz 20 µg der aufgereinigten DNA des EHV-2-Referenzstammes LK-4 verwendet (3.3.5). Dieser Stamm wurde von einem Pferd mit respiratorischer Erkrankung isoliert (Plummer & Waterson, 1963) und zeichnet sich durch eine hohe Vermehrungsrate in der Zellkultur aus, wobei Titer bis zu etwa 5×10^6 PFU / ml Zellkulturüberstand erreicht werden. Auf ED-Zellen erscheinen die cpEs etwa 48 Stunden p. i., nehmen im Vergleich zu Feldisolaten schnell an Größe zu und zeichnen sich durch zahlreiche Trauben von kleinen, abgerundeten Zellen und geringgradige Riesenzellbildung am Rand der zellfreien Bereiche aus.

Es wurden jeweils 35 Amplifikationszyklen, bestehend aus 30 Sekunden Denaturierung bei 94 °C, 30 Sekunden Annealing und einer Extension bei 72 °C für eine Minute, durchgeführt (3.9.2). Die geeignete Primerbindungs- (Annealing-) Temperatur für jedes der beiden Primerpaare wurde in Schritten von 3 °C über einen Temperaturbereich von 50 °C bis 65 °C getestet. Für beide Primerpaare wurde eine optimale Annealingtemperatur von 55 °C ermittelt.

Wie in Bild 1 zu erkennen ist, waren die mit Hilfe der bekannten EHV-2-Sequenz am Computer generierten PCR-Amplifikate des äußeren Primerpaares 404 Basenpaare (bp) und des inneren Primerpaares 202 bp groß. Die DNA des Referenzstammes LK-4 lieferte unter den beschriebenen PCR-Bedingungen sowohl in der 1. Runde (äußeres Primerpaar) als auch in der 2. Runde (inneres Primerpaar) diese erwarteten Amplifikatgrößen (siehe Bild 2).

Bild 1 Lokalisierung der Primer der EHV-2-IL-10-snPCR



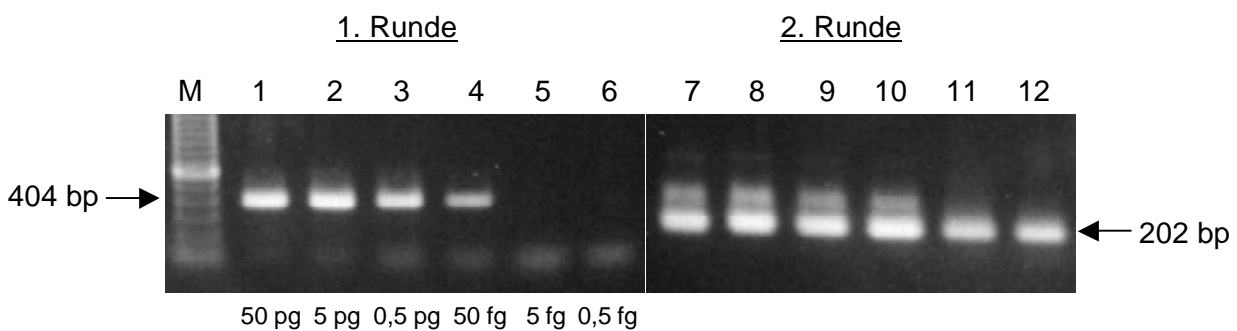
Schematische Darstellung des EHV-2-Genoms. Der Pfeil (◄) kennzeichnet die Lage und Orientierung des EHV-2-IL-10-ORF. Dieser wurde vergrößert, um die Lokalisierung der Primer der EHV-2-IL-10-snRT-PCR wiedergeben zu können. Das Amplifikat der ersten PCR-Runde (Primer 13 und 18) umfasst die Nukleotide 137910-138314 und ist 404 bp groß, das der zweiten Runde (Primer 13 und 14) umfasst die Nukleotide 138113-138314 und ist 202 bp groß.

4.1.1.2 Bestimmung der Nachweisgrenze der EHV-2-IL-10-snPCR

Die Nachweisgrenze der EHV-2-IL-10-snPCR wurde unter Verwendung aufgereinigter Gesamtgenom-DNA des EHV-2-Stammes LK-4 ermittelt (3.3.5). Von der verwendeten viralen DNA, deren Ausgangskonzentration etwa 50 ng / μ l betrug, ausgehend, wurden logarithmische Verdünnungsreihen zur Basis 10 hergestellt. Diese wurden in der snPCR eingesetzt und die höchste Verdünnungsstufe ermittelt, in der noch deutliche PCR-Amplifikate sichtbar waren.

Wie aus Bild 2 ersichtlich ist, konnten in der 1. Runde der IL-10-snPCR (Spuren 1-6) aus 50 fg Virus-DNA spezifische Amplifikate produziert werden. In der sich anschließenden 2. Runde waren 0,5 fg Virus-DNA, was etwa 2 Genomkopien von EHV-2 entspricht, deutlich nachweisbar (Spuren 7-12).

Bild 2 EHV-2-IL-10-snPCR unter Verwendung logarithmischer Verdünnungsreihen der DNA des EHV-2-Referenzstammes LK-4.



Die snPCR-Produkte wurden auf einem 1 %igen horizontalen Agarosegel aufgetrennt und im UV-Licht durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht. In den Spuren 1-6 sind die Amplifikate der 1. Runde der snPCR (Größe 404 bp), in den Spuren 7-12 die der 2. Runde (Größe 202 bp) aufgetragen worden. Die Menge der eingesetzten LK-4-DNA ist unter der Abbildung wiedergegeben worden. Marker M: 100 bp DNA-Leiter.

4.1.1.3 Einsatz verschiedener EHV-2-Stämme in der snPCR und Ausschluss der Kreuzreaktivität mit der DNA anderer equiner Herpesviren und Pferdespezifischen Gensequenzen

Verschiedene Autoren beschrieben Untersuchungen des Genoms unterschiedlicher EHV-2-Stämme mittels Restriktionsenzymanalysen, PCR bzw. Sequenzierung und stellten auffällige genomische Variabilitäten zwischen verschiedenen Isolaten fest (Browning & Studdert, 1987a; Borchers et al., 1997; Holloway et al., 2000; Kershaw et al., 2001). Zwar konnten Holloway et al. (2000) zeigen, dass die Unterschiede der NS-Sequenz im IL-10-Gen nicht sehr ausgeprägt sind (99 % Identität zwischen den DNA-Sequenzen von 4 EHV-2-Isolaten), dennoch musste die Nachweisbarkeit unterschiedlicher EHV-2-Stämme in der EHV-2-IL-10-snPCR sichergestellt werden. Aus diesem Grund sollten verschiedene EHV-2-Referenzstämme und -Feldisolate in der EHV-2-IL-10-snPCR auf ihre Nachweisbarkeit untersucht werden. Neben dem Stamm LK-4 wurde die DNA der Referenzstämme T16 und T400 sowie

der Feldisolate T13 und T25 aus dem Überstand von infizierten ED-Zellen gewonnen (3.3.5) und jeweils 20 pg dieser DNA in der EHV-2-IL-10-snPCR eingesetzt.

Die Kreuzreaktivität der EHV-2-IL-10-snPCR mit den bekannten DNA-Sequenzen von EHV-1 und -4, die zusammen mit EHV-2 in PBMC und Geweben vorkommen können, sowie der mRNA des eIL-10 war bereits theoretisch mit dem Computerprogramm MacVector ausgeschlossen worden (4.1.1.1). Dieses Ergebnis musste unter Laborbedingungen verifiziert und um den Einsatz der genomischen DNA des Pferdes und der DNA von EHV-5, deren vollständige Sequenz nicht bekannt ist, erweitert werden. Als Template für die PCR dienten jeweils 20 pg aufgereinigte Virus-DNA aus EHV-1-Stamm AIV, EHV-4-Stamm T252 oder EHV-5-Stamm KB-P48 infizierten Zellkulturüberständen (3.3.5) bzw. 1 µg Gesamt-DNA aus nicht infizierten ED-Zellen oder aus, zuvor in der EHV-2-spezifischen nPCR („repetitives Motiv“, 3.9.2) negativ auf EHV-2-DNA getesteteten, equinen PBMC.

PCR-Produkte wurden in der EHV-2-IL-10-snPCR weder mit der DNA der genannten EHV-1-, -4- und -5-Stämme, noch mit der Gesamt-DNA aus ED-Zellen und equinen PBMC gebildet, während die DNA der eingesetzten EHV-2-Referenzstämme und -Feldisolate in allen Fällen spezifische Amplifikate lieferte (Daten nicht gezeigt).

4.1.2 Verknüpfung der EHV-2-IL-10-snPCR mit einer reversen Transkription zum Nachweis von EHV-2-IL-10-Transkripten

Nachdem die EHV-2-IL-10-spezifische snPCR etabliert worden war, musste sie mit einer reversen Transkription verknüpft werden, um als RT-PCR für den Transkriptnachweis eingesetzt werden zu können.

4.1.2.1 Bestimmung der optimalen Bedingungen für die snRT-PCR

Als Ausgangsmaterial für die Etablierung der EHV-2-IL-10-spezifischen snRT-PCR dienten Gesamt-RNA-Präparationen aus etwa 5×10^5 einen Tag vor der Infektion auf Zellkultur-schalen ausgesäten und mit 2 PFU LK-4 pro Zelle infizierten ED-Zellen und aus nicht infizierten Kontrollzellen. Da der Zeitpunkt des Auftretens EHV-2-IL-10-spezifischer Transkripte unbekannt war, wurden die Zellen 24 und 48 Stunden post infectionem (p. i.) entsprechend Kapitel 3.8 der RNA-Präparation zugeführt. Die Gesamt-RNA-Ausbeute die durch photometrische Bestimmung der optischen Dichte (OD) auf einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen wurde (3.8.3), lag zwischen 40 und 50 µg pro Ansatz. Zur Überprüfung der RNA-Qualität wurde außerdem die OD bei 280 nm bestimmt und der Quotient aus der OD bei 260 nm und der OD bei 280 nm, der zwischen 1,7 und 2,1 liegen sollte (Sambrook et al., 1989), errechnet. Mit einem Verhältnis von 1,8 bis 2,0 lag die präparierte RNA in diesem Bereich. Zur Kontrolle der Integrität der RNA wurde außerdem eine denaturierende Agarosegelelektrophorese durchgeführt (3.8.4). Die getesteten RNA-

Proben zeigten das für intakte RNA typische Muster der 28 S und 18 S ribosomalen RNA (Simms et al., 1999) (Bild 3).

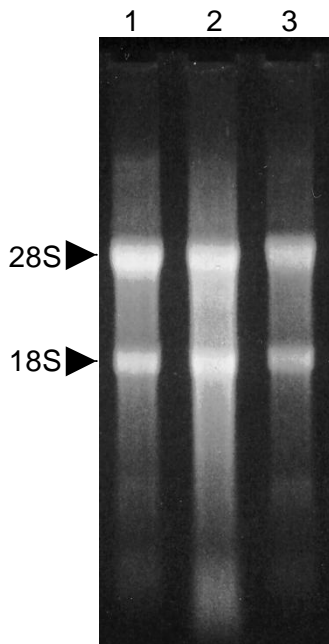


Bild 3 Denaturierende Agarosegelelektrophorese zur Kontrolle der Integrität der RNA-Präparationen

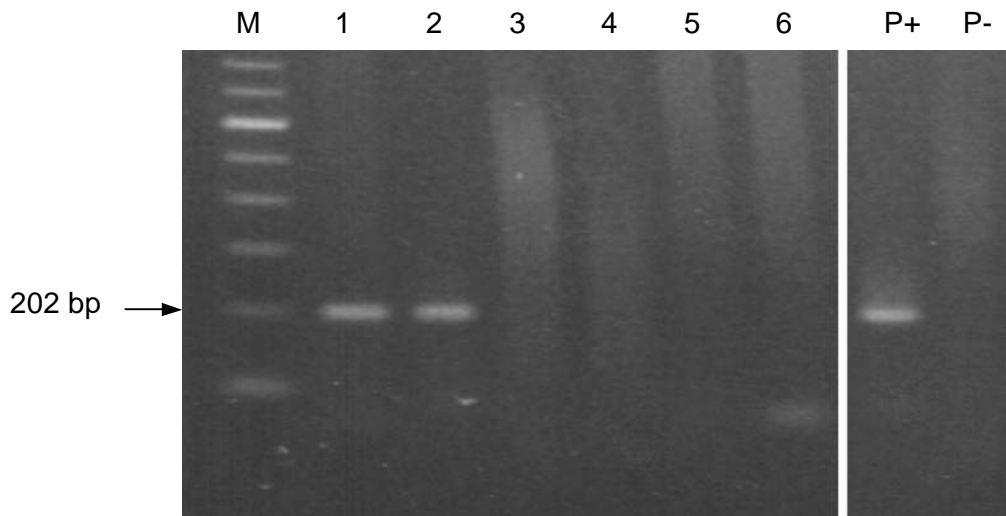
8 µg Gesamt-RNA aus EHV-2-infizierten und nicht-infizierten ED-Zellen wurde wie in Kapitel 3.8.4 beschrieben in der Agarosegelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und mit Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht. In Spur 1 wurde die Gesamt-RNA aus LK-4-infizierten ED-Zellen 24 Stunden p. i. und in Spur 2 48 Stunden p. i. sowie in Spur 3 Gesamt-RNA aus nicht-infizierten Kontrollzellen aufgetragen.

Deutlich zu erkennen sind die Banden der 28 S und 18 S ribosomalen RNA (Pfeile).

Zum Nachweis kontaminierender Reste viraler DNA wurden 2 µg der als qualitativ geeignet beurteilten RNA-Präparationen in der EHV-2-IL-10-snPCR eingesetzt. Da in dieser PCR die Gesamt-RNA infizierter Zellen sowohl 24 Stunden p. i. als auch 48 Stunden p. i. positiv, die Proben aus nicht infizierten Zellen jedoch negativ reagierten, war klar, dass Reste viraler DNA detektiert wurden und weitere Schritte zu ihrer Entfernung nötig waren. Dazu wurden die RNA-Proben einem 60-minütigen DNase I-Verdau bei 37 °C unterzogen und der Erfolg dieser Behandlung durch den erneuten Einsatz der RNA in der EHV-2-IL-10-snPCR überprüft (3.9). Dieses Vorgehen wurde daraufhin bei allen zu testenden RNA-Präparationen konsequent angewandt und nur Proben, die frei von viraler DNA waren, in der snRT-PCR verwendet.

Für die sich anschließende snRT-PCR wurden 2 µg der jeweiligen RNA-Präparation nach Zusatz von 2 µl einer T-20 Random-Hexamer-Primerlösung (50 pMol / µl) bei 75 °C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Das Umschreiben der mRNA in cDNA erfolgte in einem 20 µl Ansatz bei 42 °C unter Verwendung der Expand Reversen Transkriptase (Roche Diagnostics, Mannheim). Die Reverse Transkriptase wurde danach bei 94 °C inaktiviert und ein Zehntel des Reaktionsgemisches in der EHV-2-IL-10-snPCR eingesetzt (3.9). Bild 4 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der snRT-PCR mit RNA-Präparationen aus EHV-2-infizierten ED-Zellen 24 und 48 Stunden p. i. (Spur 1 und 2). Der erfolgreiche Verdau viraler DNA in diesen Präparationen ist durch die Darstellung der snPCR ohne RT (Spuren 4 und 5) mit jeweils negativen Resultaten dokumentiert.

Bild 4 Nachweis EHV-2-IL-10-spezifischer Transkripte in der EHV-2-IL-10-snRT-PCR und Ausschluss der Anwesenheit viraler DNA in den RNA-Präparationen.



In den Spuren 1-3 sind die Amplifikate der EHV-2-IL-10-snRT-PCR, in den Spuren 4-6 die Amplifikate der Kontroll-PCR ohne RT in einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt worden. Die Sichtbarmachung erfolgte mit Ethidiumbromid im UV-Licht. Es wurden jeweils 2 µg der Gesamt-RNA aus LK-4-infizierten ED-Zellen 24 Stunden p. i. (Spuren 1, 4) und 48 Stunden p. i. (Spuren 2, 5) sowie aus nicht-infizierten ED-Zellen (Spuren 3, 6) eingesetzt. In der snPCR wurden eine Reagenzienkontrolle (P-) und 20 pg LK-4-DNA als Positivkontrolle (P+) mitgeführt. Als Marker (M) wurde eine 100 bp DNA-Leiter aufgetragen.

Damit konnte gezeigt werden, dass sich in der EHV-2-IL-10-snRT-PCR sowohl 24 als auch 48 Stunden p. i. spezifische Transkripte nachweisen lassen.

4.1.3 Kinetik der EHV-2-IL-10-Expression

Aufbauend auf dem in Kapitel 4.1.2.1 beschriebenen Nachweis EHV-2-IL-10-spezifischer Transkripte in LK-4-infizierten ED-Zellen 24 und 48 Stunden p. i., sollte das Auftreten der Expression des EHV-2-IL-10 in mit dem EHV-2-Referenzstamm LK-4-infizierten ED-Zellen eingehender untersucht werden. Die exakte zeitliche Einordnung der Expression dieses Gens stand dabei im Mittelpunkt.

4.1.3.1 Studien zur Kinetik der EHV-2-IL-10-Expression in experimentell infizierten ED-Zellen am Beispiel des EHV-2-Referenzstammes LK-4

Die viralen Genprodukte Herpesvirus-infizierter Zellen werden nach ihrem zeitlichen Auftreten in sehr frühe (α -), frühe (β -) und späte (γ_1 -, γ_2 -) Transkripte unterteilt (Roizman & Sears, 1996). Um den Zeitpunkt der EHV-2-IL-10-Expression zu bestimmen wurde diese mit dem Auftreten von 2 weiteren, einer der genannten Transkriptklassen zugeordneten, EHV-2-Genen verglichen. Dazu wurden als α -Gen der virale ORF-50 (Biggin et al., 1987) und als γ_1 -Gen das virale Glykoprotein B (gB, Roizman et al., 1996) ausgewählt.

Die für den viralen ORF-50 spezifische nRT-PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert, die nRT-PCR für den Nachweis des EHV-2-gB entstammt der Arbeit von Borchers et al. (2002) (3.9). Die Primerauswahl und Spezifitätsbestimmung der ORF-50-nPCR wurden in der im Kapitel 4.1.1 beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt. Dabei zeigte die ORF-50-nPCR keine Kreuzreaktionen mit der DNA aus ED-Zellen, equinen PBMC, EHV-1, -4 und -5 und erwies sich damit als EHV-2-spezifisch. Die Bestimmung der Nachweisgrenze erfolgte wie in Kapitel 4.1.1.2 beschrieben auf der Ebene der nPCR und zur besseren Vergleichbarkeit parallel zur Sensitivitätsbestimmung der EHV-2-IL-10-snPCR und -gB-nPCR. Dazu wurde die Verdünnungsreihe der LK-4-DNA aus Kapitel 4.1.1.2 eingesetzt.

Für jeden Erntezeitpunkt wurden jeweils 1×10^5 ED-Zellen mit 2 PFU LK-4 pro Zelle infiziert (3.3.7) und Gesamt-RNA 0, 2, 6, 12, 24 und 48 Stunden p. i. im Doppelansatz gewonnen, um parallel von jedem Erntezeitpunkt 2 Untersuchungen durchführen zu können (3.8.2, 3.8.3). Nach Überprüfung der Qualität und Quantität der RNA in der denaturierenden Agarosegelelektrophorese (3.8.4) bzw. mittels photometrischer Messung (3.8.3) wurden 10 µg aus jedem Ansatz mit DNase I behandelt (3.9.1) und in der EHV-2-IL-10-snPCR auf Freiheit von EHV-2-DNA getestet (Daten nicht gezeigt). Da EHV-2-DNA nicht nachgewiesen wurde, konnten die Gesamt-RNAs anschließend in der EHV-2-IL-10-snRT-PCR sowie den EHV-2-gB- und -ORF-50-nRT-PCRs untersucht werden (3.9).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 4 zusammengefasst und in Bild 5 dargestellt worden. Da die Ergebnisse der Doppelansätze von den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten in allen RT-PCRs übereinstimmten, wurde auf eine getrennte Darstellung verzichtet.

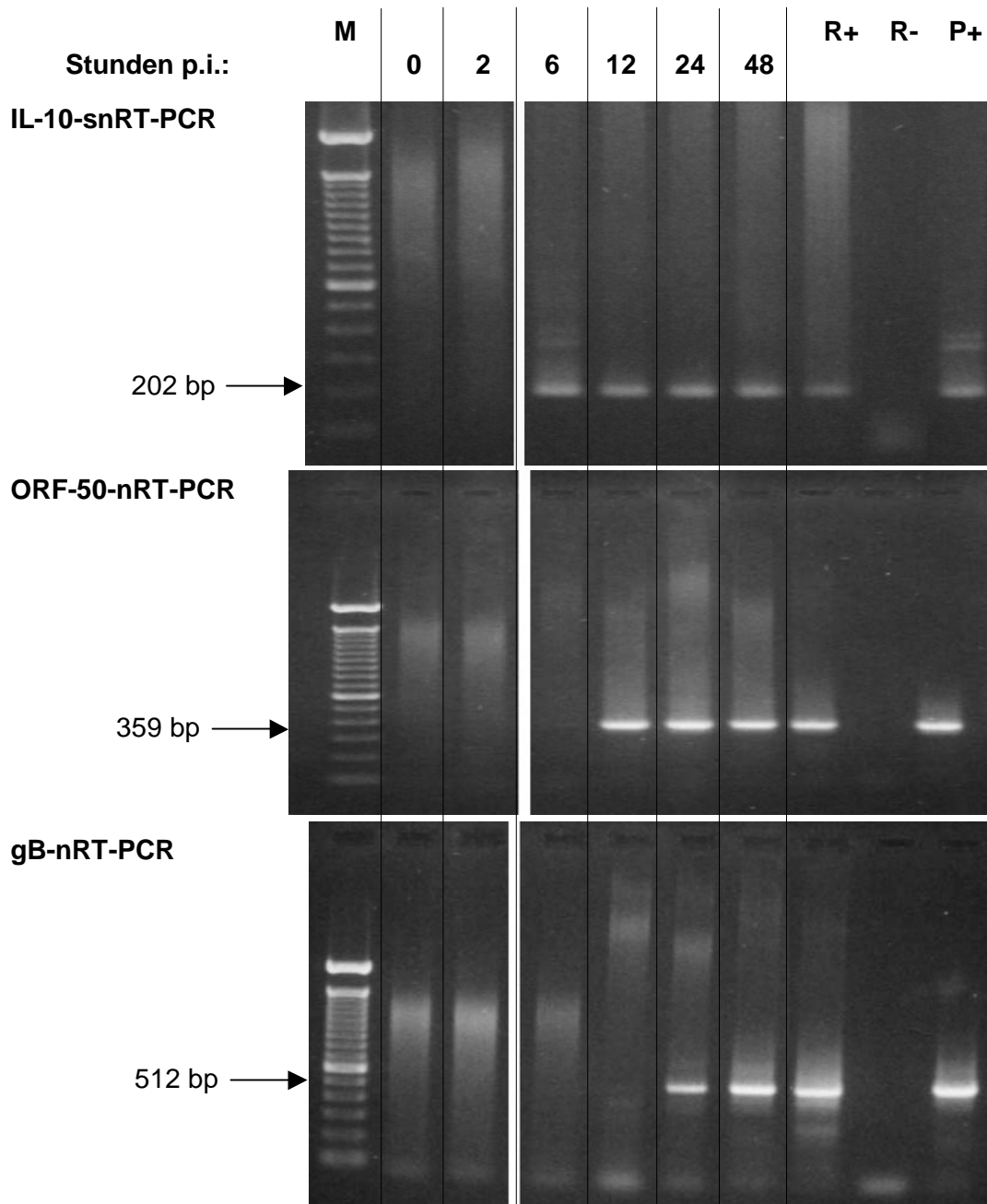
In keinem Fall konnten 0 Stunden p. i. EHV-2-spezifische Transkripte detektiert werden. Der Nachweis IL-10-spezifischer Transkripte gelang erstmals 6 Stunden p. i.. ORF-50-spezifische Transkripte traten in den LK-4-infizierten Zellen erstmals 12 Stunden p. i. und gB-Transkripte ab 24 Stunden p. i. in Erscheinung.

Tabelle 4 Zeitliches Auftreten EHV-2-gB-, -ORF-50- und -IL-10-spezifischer Transkripte.

RT-PCR	Stunden p. i.					
	0	2	6	12	24	48
IL-10	-	-	+	+	+	+
Orf-50	-	-	-	+	+	+
gB	-	-	-	-	+	+

1×10^5 ED-Zellen wurden mit 2 PFU LK-4 pro Zelle infiziert (3.3.7) und die zu den verschiedenen Zeitpunkten im Doppelansatz präparierte Gesamt-RNA (3.8) in den EHV-2-IL-10-, -gB- und -ORF-50-sn bzw. nRT-PCRs untersucht (3.9). Da die Ergebnisse aus den Doppelansätzen jeweils übereinstimmten, wurden sie nicht separat dargestellt (siehe Text).

Bild 5 Darstellung der Amplifikate der EHV-2-IL-10-snRT-PCR und der gB- und ORF-50-nRT-PCR aus LK-4-infizierten ED-Zellen 0, 2, 6, 12, 24 und 48 Stunden p. i.



Gesamt-RNA aus mit 2 PFU LK-4 pro Zelle infizierten ED-Zellen wurde 0, 2, 6, 12, 24 und 48 Stunden p. i. gewonnen und in den 3 RT-PCRs eingesetzt (siehe Text). Die PCR-Produkte wurden in 1 %igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung im UV-Licht sichtbar gemacht. Als Positivkontrolle der RT-Reaktion (**R+**) wurde RNA aus LK-4-infizierten ED-Zellen (72 Stunden p. i.) und als Positivkontrolle der PCR (**P+**) LK-4-DNA eingesetzt. **R-** ist die Reagenzienkontrolle der RT-PCR. Als Größenstandard (**M**) wurde jeweils eine 100 bp DNA-Leiter eingesetzt.

In LK-4-infizierten Zellen setzte die ORF-50-Expression wie erwartet vor der gB-Expression ein, wobei IL-10-spezifische Transkripte noch vor den ORF-50-spezifischen gezeigt werden konnten. Ein Ergebnis, das auf eine sehr frühe Expression des EHV-2-IL-10 in diesen Zellen hinweist.

Zur Überprüfung dieser Daten wurden weiterführende Untersuchungen der Expression des EHV-2-IL-10 in experimentell mit dem EHV-2-Referenzstamm LK-4 infizierten ED-Zellen durchgeführt.

4.1.3.2 Untersuchung der Kinetik der EHV-2-IL-10-Expression unter Verwendung von Inhibitoren der Virusreplikation

Der Einsatz von Inhibitoren der Virusreplikation stellt eine in zahlreichen Veröffentlichungen beschriebene Methode zur Einordnung der Kinetik der Expression verschiedener Herpesvirus-Gene in die Transkriptklassen der α -, β - und γ -Gene dar (zur Übersicht siehe Roizman & Sears, 1996 und Kieff, 1996). Dabei wird die Abhängigkeit der Expression der β - und γ -Gene von der zellulären Proteinsynthese sowie der Expression der γ_2 -Gene von der viralen DNA-Replikation ausgenutzt.

Es wurden Versuche mit Cycloheximid (CHX), einem Inhibitor der Proteinsynthese in eukaryonten Zellen, und Phosphonoessigsäure (Phosphonoacetic acid, PAA), einem Inhibitor der viralen DNA-Polymerase, durchgeführt.

CHX unterbindet durch die Hemmung der Peptidyltransferaseaktivität der großen Untereinheit der 80 S Ribosomen eukaryonter Zellen die Proteinsynthese und damit die Bildung der viralen aber auch der zellulären Proteine (Stryer, 1994; Scott & Mercer, 1997). Nach der Synthese der sehr frühen (α -) viralen Transkripte wird deren Translation verhindert und die als Aktivatoren der Transkription der β -Gene erforderlichen α -Proteine nicht gebildet, wodurch der virale Replikationszyklus abgebrochen wird.

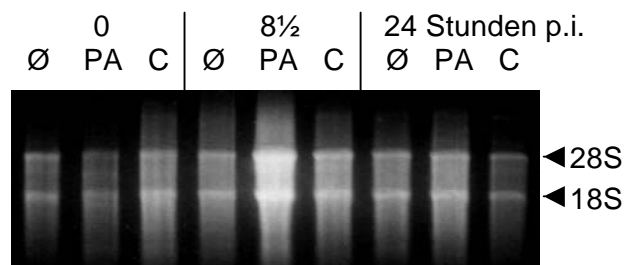
PAA ist ein nicht nukleosidischer Hemmstoff der herpesviralen DNA-Replikation (Mao & Robishaw, 1975). Als Pyrophosphat-Analogon interagiert es nichtkompetitiv mit der Phosphatbindungsstelle der viralen DNA-Polymerase, wodurch diese gehemmt wird (Kurokawa et al., 2001). Späte (γ_2 -) Transkripte, deren Expression die virale DNA-Replikation voraussetzt, können nicht gebildet werden. Im Gegensatz zu CHX sollte die Anwendung von PAA keinen Einfluss auf den Stoffwechsel der Zelle haben, da es nur mit der viralen, nicht aber mit den zellulären DNA-Polymerasen reagiert (Overby et al., 1977).

In Vorversuchen waren verschiedene, in der Literatur beschriebene, Inhibitorkonzentrationen im Zellkulturmedium an LK-4-infizierten ED-Zellen getestet und deren Toxizität und Wirksamkeit anhand der Zellmorphologie und dem Entstehen von cpEs überprüft worden. Für CHX wurden 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ und für PAA 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$ als geeignete Konzentrationen ermittelt, bei denen die Zellmorphologie erhalten blieb und das Auftreten virusbedingter Zellveränderungen verhindert wurde (Daten nicht gezeigt).

Die folgenden Versuche wurden 3 mal unter identischen Bedingungen durchgeführt. Wie in Kapitel 3.3.8 beschrieben, wurden 1×10^5 ED-Zellen mit einer Infektionsdosis von 2 PFU LK-4 pro Zelle infiziert, wobei immer LK-4 infizierte Zellen ohne Inhibitor als Kontrollen mitgeführt wurden. Das Zellkulturmedium wurde jeweils eine Stunde vor der Infektion durch inhibitorhaltiges Medium ersetzt und auch nach der Infektion wurden die Zellen bis zu ihrer Ernte mit dem entsprechenden Inhibitor inkubiert. Die Erntezeitpunkte wurden auf 0, 8½ und 24 Stunden p. i. festgelegt. Nach der RNA-Präparation wurde die RNA-Ausbeute photometrisch quantifiziert und die Qualitätskontrolle in der denaturierenden Agarosegelelektrophorese durchgeführt (Bild 6, 3.8.3, 3.8.4).

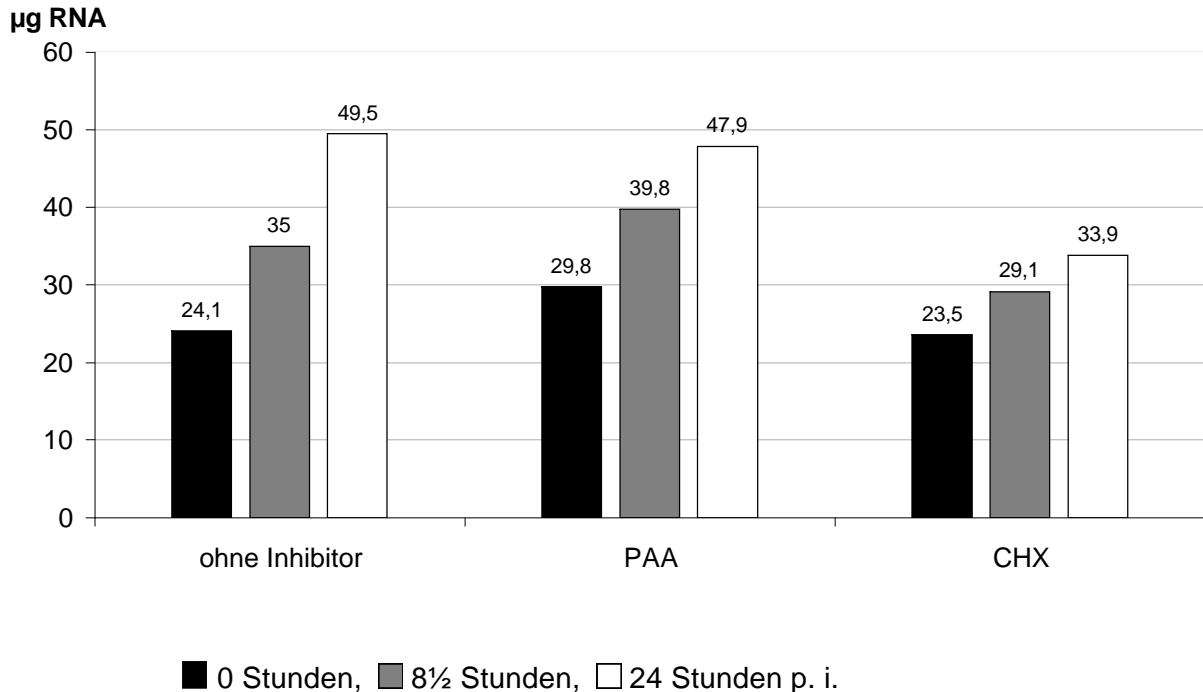
Bild 6 Denaturierende Agarosegelelektrophorese zur Kontrolle der Integrität der RNA-Präparationen aus Zellen mit und ohne Inhibitorbehandlung

8 µg Gesamt-RNA aus LK-4-infizierten ED-Zellen wurden, wie in Kapitel 3.8.4 beschrieben, in der Agarosegelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und durch Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht. In den mit Ø gekennzeichneten Spuren wurde die RNA der ohne Inhibitor infizierten, in den mit **C** gekennzeichneten die RNA der unter Zusatz von **CHX** und in den mit **PA** gekennzeichneten die RNA der unter Zusatz von **PAA** infizierten Zellen aufgetragen.



Da die Zellen bei ihrer Ernte direkt auf der Zellkulturplatte lysiert wurden (3.8.2) und deshalb nicht gezählt werden konnten, sollte die gemessene RNA-Ausbeute als Indikator für die Zellvermehrung genutzt werden. Aus Bild 7, in dem die durchschnittliche Gesamt-RNA-Menge aus allen 3 Versuchsdurchgängen dargestellt wurde, geht hervor, dass die RNA-Ausbeute aus den Zellen, die mit CHX inkubiert worden waren, bis 24 Stunden p. i. weniger stark zunahm als in den beiden anderen Gruppen. Dieses wurde als Hinweis für eine Hemmung des Zellwachstums bewertet. Zwischen unbehandelten und mit PAA inkubierten Zellen traten diese Unterschiede nicht so deutlich in Erscheinung, da sich die PAA-Behandlung nur auf die Virusreplikation und nicht auf den Zellstoffwechsel auswirkt.

Bild 7 Mittlere Gesamt-RNA-Ausbeute aus LK-4-infizierten ED-Zellen mit und ohne Inhibitorbehandlung 0, 8½ und 24 Stunden p. i.



Mittlere Gesamt-RNA-Ausbeute aus 3 Versuchen, in denen für jeden Untersuchungszeitpunkt jeweils 1×10^5 ED-Zellen mit 2 PFU LK-4 pro Zelle ohne Inhibitor bzw. unter Zusatz von 100 µg CHX oder 200 µg PAA pro ml Zellkulturmedium infiziert wurden. Aus den 3 Messwerten eines Untersuchungszeitpunktes wurde der Durchschnittswert ermittelt.

Sämtliche RNA-Präparationen aus den 3 Versuchen wurden nach DNase I-Behandlung (3.9.1) und dem Ausschluss kontaminierender Virus-DNA in der EHV-2-IL-10-snPCR in den 3 beschriebenen EHV-2-spezifischen RT-PCRs (IL-10, ORF-50 und gB) eingesetzt und die Ergebnisse daraus in Tabelle 5 zusammengefasst. In Bild 8 sind die PCR-Amplifikate aus einem der 3 Versuche exemplarisch dargestellt worden.

Direkt nach der Infektion der Zellen (0 Stunden p. i.) wurden in keinem Versuch EHV-2-spezifische Transkripte detektiert.

IL-10-spezifische Transkripte erschienen in allen 3 Gruppen und in jedem der 3 Versuche 8½ Stunden p. i.. Im Vergleich dazu waren ORF-50-Transkripte, wenn auch in allen Gruppen ab 8½ Stunden p. i. nachweisbar, so doch unter der Einwirkung von CHX und ohne Inhibitor nur jeweils in einem von 3 Versuchen zu finden. EHV-2-gB-spezifische Transkripte traten in CHX-behandelten Zellen nicht auf, wohingegen in den RNA-Präparationen der beiden anderen Gruppen ab 8½ Stunden p. i. mindestens 2 von 3 Nachweisen positiv verliefen.

Tabelle 5 EHV-2-IL-10-, -gB- und -ORF-50-Expression in LK-4-infizierten ED-Zellen mit und ohne Inhibitorbehandlung

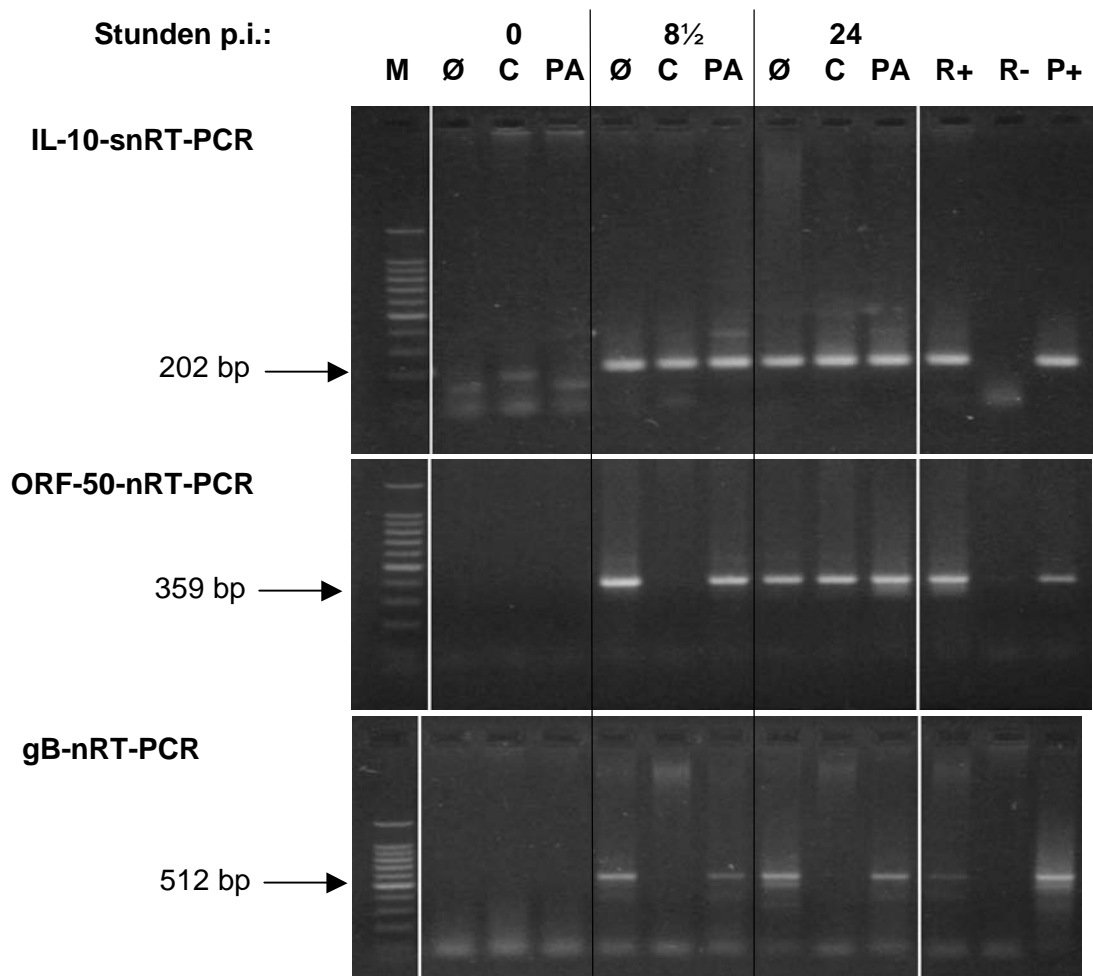
	RT-PCR	Stunden p. i.		
		0	8½	24
ohne Inhibitor	ORF-50	---	+ - -	+++
	IL-10	---	+++	+++
	gB	---	++ -	+++
CHX (100 µg / ml)	ORF-50	---	+ - -	+ - -
	IL-10	---	+++	+++
	gB	---	---	---
PAA (200 µg / ml)	ORF-50	---	+++	+++
	IL-10	---	+++	+++
	gB	---	++ -	++ -

Ergebnisse aus 3 Versuchen. ED-Zellen wurden mit 2 PFU LK-4 pro Zelle mit oder ohne Inhibitorzusatz infiziert (3.3.8). Nach den oben angegebenen Zeitintervallen erfolgte die RNA-Präparation und die Untersuchung in den sn- bzw. nRT-PCRs (3.8 und 3.9). (+++ in 3, ++ - in 2, + - - in einem, - - - in keinem von 3 Versuchen positive Ergebnisse).

Erwartungsgemäß wurde die Expression des EHV-2-gB, das als γ_1 -Gen abhängig von der Proteinsynthese und unabhängig von der DNA-Replikation auftreten sollte (Roizman & Sears, 1996), durch den Proteinsyntheseinhibitor CHX gehemmt und durch den DNA-Replikationshemmer PAA nicht beeinflusst. Die Expression fand allerdings zu einem früheren Zeitpunkt als in den Ergebnissen aus Kapitel 4.1.3.1 beschrieben, statt.

Die Ergebnisse zum viralen ORF-50 entsprachen dagegen nicht völlig den Erwartungen. Als α -Gen sollte seine Transkription durch die Anwendung von CHX, das die Translation, nicht aber die Transkription der sehr frühen Gene verhindert, unbeeinflusst bleiben. In den mit CHX behandelten Zellen wurden ORF-50-Transkripte jedoch 8½ und 24 Stunden p. i. nur in einem von 3 Versuchen nachgewiesen. Der dreimalige Nachweis dieser Transkripte 24 Stunden p. i. in Zellen ohne Inhibitoren entspricht allerdings den Ergebnissen aus den Versuchen in Kapitel 4.1.3.1. Dort verlief der Nachweis ORF-50-spezifischer Transkripte 6 Stunden p. i. negativ und 12 Stunden p. i. positiv. Da der hier gewählte Untersuchungszeitpunkt mit 8½ Stunden p. i. dazwischen liegt, steht der nur einmal gelungene Nachweis dieser Transkripte in Zellen ohne Inhibitor 8½ Stunden p. i. dazu nicht im Widerspruch. Unter der Einwirkung von PAA verliefen alle ORF-50-Nachweise ab 8½ Stunden p. i. positiv.

Bild 8 Amplifikate der EHV-2-IL-10-snRT-PCR und der gB- und ORF-50-nRT-PCR aus einem Versuch mit LK-4-infizierten ED-Zellen mit bzw. ohne Inhibitoren der Virusreplikation



Aus den mit 2 PFU LK-4 pro Zelle infizierten ED-Zellen mit oder ohne Inhibitorzusatz wurde 0, 8½ und 24 Stunden p. i. Gesamt-RNA gewonnen und in den 3 RT-PCRs eingesetzt. In 1 %igen Agarosegelen wurden die PCR-Produkte elektrophoretisch aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung im UV-Licht sichtbar gemacht. In den mit ∅ gekennzeichneten Spuren wurden die Amplifikate der ohne Inhibitor infizierten Zellen, in den mit **C** gekennzeichneten die Amplifikate der unter Zusatz von **CHX** und in den mit **PA** gekennzeichneten der unter Zusatz von **PAA** infizierten Zellen aufgetragen. Als Positivkontrolle der RT-Reaktion (**R+**) wurde RNA aus LK-4-infizierten ED-Zellen (72 Stunden p. i.) und als Positivkontrolle der PCR (**P+**) LK-4-DNA mitgeführt. **R-** ist die Reagenzienkontrolle der RT-PCR. Als Größenstandard (**M**) diente jeweils eine 100 bp DNA-Leiter.

Das EHV-2-IL-10 verhielt sich wie in den Versuchen aus 4.1.3.1 beschrieben. Seine Transkripte wurden schon 8½ Stunden p. i. in allen Fällen nachgewiesen und zwar unabhängig von der Hemmung der Proteinsynthese bzw. der viralen DNA-Replikation.

Der Vergleich der EHV-2-IL-10-Expression mit der Expression des EHV-2-ORF-50 und gB und die Anwendung von Inhibitoren der Virusreplikation in Kapitel 4.1.3.1 und 4.1.3.2 sprechen dafür, dass das EHV-2-IL-10 in experimentell mit dem EHV-2-Referenzstamm LK-4 infizierten ED-Zellen als sehr frühes Gen exprimiert wird.

4.2 Expression des EHV-2-IL-10 in natürlich infizierten equinen PBMC

In verschiedenen Arbeiten konnte EHV-2 aus zirkulierenden Blutleukozyten isoliert werden (Kemeny & Pearson, 1970; Roeder & Scott, 1975), wobei Makrophagen (Dutta & Campbell, 1978; Schlocker et al., 1995; Wolfinger, 1998) und B-Zellen (Agius et al., 1994; Drummer et al., 1996; Wolfinger, 1998) als Träger des Virus identifiziert wurden. In Anlehnung an die in der Literatur beschriebenen Studien zur *in vivo* Expression des EBV-IL-10 in verschiedenen Zellen bzw. Geweben und unterschiedlichen Infektionsphasen (siehe Kapitel 1.5) sollte in der vorliegenden Arbeit die Expression des EHV-2-IL-10 in natürlich infizierten equinen PBMC untersucht werden. Parallel sollte außerdem der EHV-2-Infektionsstatus der untersuchten PBMC festgestellt werden.

Für die Studien wurden Blutproben von 3 Stuten (siehe 3.2.1) aus der Klinik für Fortpflanzung (FU-Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin) über den Zeitraum von einem Jahr im monatlichen Abstand untersucht.

Zur Feststellung einer EHV-2-Infektion wurden die PBMC zunächst in der EHV-2-nPCR untersucht. Anschließend wurde die Differenzierung zwischen einer akuten und einer latenten EHV-2-Infektion durch die Untersuchung der PBMC in der Virusanzucht nach Frieren-Tauen und der Kokultivierung, sowie dem Nachweis von EHV-2-Transkripten des lytischen Replikationszyklus und der Bestimmung EHV-2-spezifischer Antikörper vorgenommen. Desweiteren sollte die Genomkonformation von EHV-2 in den PBMC bestimmt werden, um weitere Hinweise über den Status der EHV-2-Infektion in diesen Zellen zu erhalten. Parallel wurde die EHV-2-IL-10-Expression unter Verwendung der beschriebenen EHV-2-IL-10-snRT-PCR untersucht und geprüft, ob sie sich einem bestimmten EHV-2-Infektionsstadium zuordnen lässt.

Die Ergebnisse zur Untersuchung der equinen PBMC aus den folgenden Kapiteln sind in den Tabellen I-IV des Anhangs zusammengefasst worden.

4.2.1. Nachweis einer EHV-2-Infektion mittels nested PCR

In verschiedenen Arbeiten, in denen Untersuchungen zum Vorkommen von EHV-2 in equinen PBMC durchgeführt wurden, stellte sich die PCR als zuverlässige Nachweismethode einer EHV-2-Infektion heraus (Drummer et al., 1996; Borchers et al., 1997; Kershaw et al., 2001; Borchers et al., 2002).

Daher wurden die PBMC der 3 Pferde in der EHV-2-spezifischen nPCR („repetitives Motiv“, 3.9) auf das Vorhandensein von EHV-2-DNA untersucht. Dazu wurden sie zunächst mittels

Dichtegradientenzentrifugation über ein Ficoll-Kissen aus den Natriumcitratblutproben gewonnen (3.5) und gezählt (3.3.3). Zur Freisetzung der DNA wurden jeweils ca. 1×10^6 Zellen in einem Proteinase K-Verdau für 12 bis 16 Stunden bei 56 °C aufgeschlossen (3.7). Nachdem die Menge der DNA photometrisch bestimmt worden war (3.7), wurden 1-2 µg in einem 50 µl Ansatz der EHV-2-nPCR eingesetzt (3.9.2). Als Negativkontrollen wurden Reagenzienkontrollen der DNA-Präparation sowie des PCR-Ansatzes und als PCR-Positivkontrolle 20 pg aufgereinigte DNA des EHV-2-Referenzstammes LK-4 (3.3.5) mitgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind Tabelle 6 zu entnehmen. Die Pferde A und B waren an allen 12 Blutentnahmetermen und Pferd C vom 4. bis zum 12. Untersuchungstermin EHV-2-nPCR positiv. Durch den stichprobenartigen Einsatz von jeweils 1-2 µg dieser DNA in einer EHV-1- (ICP0, Borchers et al., 1999c) und einer EHV-4- (gB, Borchers & Slater, 1993) spezifischen nPCR (3.9.2) konnte außerdem eine Doppelinfektion mit diesen Viren ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 6 Untersuchung der DNA aus equinen PBMC in der EHV-2-nPCR über den Zeitraum von einem Jahr

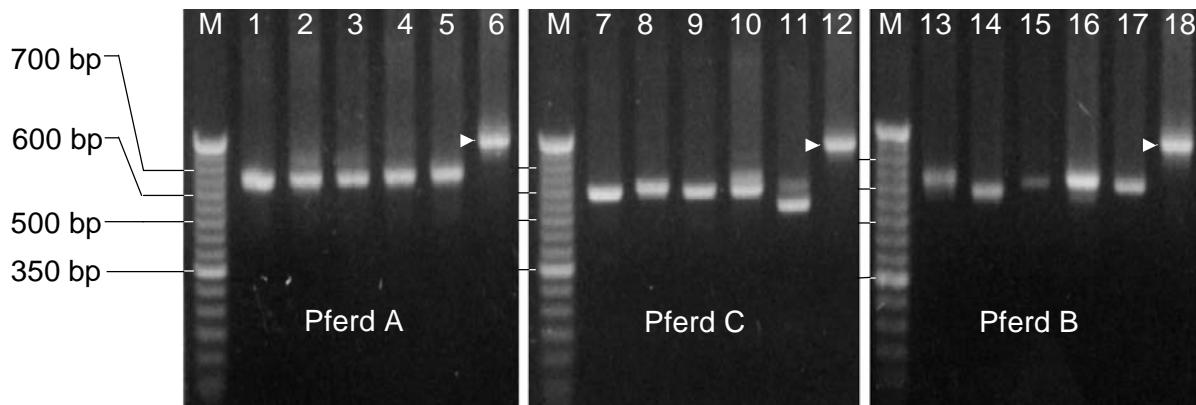
Monatliche Blutentnahme	Pferd A	Pferd B	Pferd C
1	+	+	-
2	+	+	-
3	+	+	-
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+	+	+
7	+	+	+
8	+	+	+
9	+	+	+
10	+	+	+
11	+	+	+
12	+	+	+

1-2 µg der DNA aus den PBMC der Pferde A-C wurden in der EHV-2-nPCR („repetitives Motiv“, 3.9) untersucht. Die Untersuchungen fanden im monatlichen Abstand im Zeitraum von einem Jahr statt (Blutentnahme 1-12). Positive PCR-Nachweise sind durch + und negative durch - gekennzeichnet worden.

Die Darstellung der Amplifikate von 5 ausgewählten Untersuchungszeitpunkten in Bild 9 zeigt die Größenvariabilitäten, die für diese EHV-2-nPCR charakteristisch sind und durch die unterschiedliche Häufigkeit eines aus 19 bp bestehenden repetitiven Motivs im Genom unterschiedlicher EHV-2-Isolate hervorgerufen werden (Borchers et al., 1997). Dieses Motiv ist in der DNA des EHV-2-Referenzstammes T400 9 mal (Amplifikatgröße 621 bp) und des Referenzstammes LK-4 16 mal (Amplifikatgröße 773 bp) enthalten, wobei die Ursache und die Bedeutung dieses Phänomens nicht bekannt, die Anzahl der repetitiven Motive jedoch

eventuell EHV-2-Stamm-spezifisch ist (Borchers et al., 1997). Die Auflösung der in der Abbildung gezeigten Agarosegele ist zwar nicht für eine exakte Größenbestimmung der Amplifikate geeignet, allerdings ist erkennbar, dass die PCR-Produkte aus den PBMC deutlich kleiner sind als die für die Kontroll-DNA des Referenzstammes LK-4 sichtbaren. Während die Amplifikate von Pferd A einheitlich ca. 650 bp groß sind, bewegen sich die Amplifikate von Pferd B im Bereich zwischen 600 und 650 bp bzw. von Pferd C im Bereich zwischen 550 und 600 bp.

Bild 9 Amplifikate der EHV-2-nPCR („repetitives Motiv“, 3.9) mit DNA aus den PBMC der Pferde A, B und C von 5 Untersuchungszeitpunkten.



Die Produkte der EHV-2-nPCR („repetitives Motiv“, 3.9) wurden auf einem 1,5 %igen horizontalen Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. In den Spuren 1-5, 7-11 und 13-17 wurden die Amplifikate aus der DNA der PBMC des jeweiligen Pferdes (A, C bzw. B), in den Spuren 6, 12 und 18 die Amplifikate des Referenzstammes LK-4 (weißer Pfeil) aufgetragen. Marker M: 50 bp DNA-Leiter.

Durch die Anwendung der EHV-2-nPCR wurde demnach über den gesamten Untersuchungszeitraum die Anwesenheit von EHV-2-DNA in den PBMC der Pferde A und B und nach dem 4. Untersuchungstermin auch in den PBMC von Pferd C gezeigt. Unterschiede in der Größe der PCR-Amplifikate ließen sich sowohl zwischen den untersuchten Pferden als auch bei Pferd B und C zwischen den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten finden, eine exakte Größenbestimmung wurde allerdings nicht vorgenommen. Für die Anwesenheit von EHV-1 und -4 in den untersuchten PBMC ergaben sich keine Hinweise.

4.2.2. Untersuchung des EHV-2-Infektionsstatus und Differenzierung zwischen einer akuten und einer latenten Infektion

4.2.2.1 Nachweis von infektiösem und latentem Virus in der Zellkultur

Zur Feststellung des EHV-2-Infektionsstatus wurden die PBMC parallel mit permissiven ED-Zellen kokultiviert und in der Virusanzucht nach Frieren-Tauen auf ED-Zellen eingesetzt

(3.6). Beim Vorliegen einer akuten Infektion ist in beiden Verfahren das Erscheinen eines cpE zu erwarten, wohingegen latentes Virus nur mit Hilfe der Kokultivierung nachweisbar ist (Slater et al., 1994; Drummer et al., 1996; Usherwood et al., 1996b; Borchers et al., 1998).

Für diese Untersuchungen wurden die PBMC der Pferde A und B an allen und die PBMC von Pferd C an 10 der 12 in Kapitel 4.2.1 genannten Blutentnahmetermine (vgl. Tabelle 6) verwendet. Jeweils 4×10^5 frisch gewonnene und gezählte PBMC (3.5, 3.3.3) wurden auf die gleiche Anzahl von am Vortag in den Löchern einer 6-Lochplatte ausgesäten ED-Zellen gegeben (3.6). Um eventuell vorhandenes infektiöses Virus nachzuweisen, wurden die PBMC vor der Virusanzucht durch dreimaliges Frieren-Tauen zerstört (3.6.1), während diese in der Kokultivierung in nativem Zustand auf die ED-Zellen gegeben wurden (3.6.2). Die ED-Zellen wurden täglich auf das Erscheinen von cpE untersucht und nach 5-6 Tagen passagiert. Blieb nach dreimaliger Passagierung das Erscheinen von cpE aus, wurden die Proben als negativ beurteilt.

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt worden. Alle Virusnachweise aus lysierten PBMC (VA) waren negativ. In der Kokultivierung (K) konnte aus den PBMC von Pferd A in 4 von 12 (33 %), von Pferd B in keiner von 12 und von Pferd C in 2 von 10 Untersuchungen (20 %) zytopathogenes Virus nachgewiesen werden. In positiven Fällen traten die cpE nach der 2. oder 3. Passage, also zwischen dem 12. und 24. Tag nach dem Ansetzen der Probe, in Erscheinung. Sie zeichneten sich durch langsames Wachstum, variable Größe und eine ausgeprägte Zellsynzytienbildung aus. Die Isolate erreichten nach einer weiteren Passage auf ED-Zellen Virustiter von etwa 1×10^4 bis $2,5 \times 10^5$ PFU pro ml Zellkulturüberstand.

In den Fällen des positiven Virusnachweises aus den EHV-2-nPCR positiven PBMC in der Kokultivierung bei gleichzeitig negativer Virusanzucht aus lysierten Zellen sprechen die Ergebnisse für das Vorliegen einer latenten Infektion. Da dieser Nachweis jedoch nicht zu jedem Untersuchungszeitpunkt und in keinem Fall bei Pferd B gelang, obwohl dessen PBMC in der EHV-2-nPCR immer positiv getestet worden waren, wurden weiterführende Untersuchungen durchgeführt.

Bei der Arbeit mit verschiedenen Gammaherpesviren, wie zum Beispiel EBV, HHV-8 und MHV-68, wird **12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA)**, ein Phorbolester, verwendet, um die Latenz dieser Viren zu durchbrechen und die lytische Virusreplikation anzuregen (zur Hausen et al., 1978; Kieff, 1996; Usherwood et al., 1996b; Schulz, 1998). In der Zelle aktiviert TPA über die Protein-Kinase C den Transkriptionsfaktor „Activation protein-1“ (AP1), der daraufhin mit dem TPA-responsive element (TRE), einer Konsensussequenz, die in der Promotorsequenz verschiedener eukaryonter und viraler Gene lokalisiert ist, interagiert und dadurch deren Transkription induziert (zur Übersicht siehe Kieff, 1996 und Lewin, 2000). Es

ist bekannt, dass dieser Mechanismus auch an der durch TPA induzierten Aktivierung des lytischen Replikationszyklus in latent mit EBV infizierten Zellen beteiligt ist (Flemington & Speck, 1990; Gao et al., 2001).

Da EHV-2 eng mit den genannten Gammaherpesviren verwandt ist, sollte überprüft werden, ob TPA auf latentes EHV-2 ebenfalls eine induzierende Wirkung ausübt und die Nachweis­häufigkeit von EHV-2 aus equinen PBMC in der Kokultivierung erhöht. Die Reaktivierbarkeit von EHV-2 durch TPA wäre außerdem ein weiteres Zeichen dafür, dass die equinen PBMC tatsächlich latent mit EHV-2 infiziert sind.

Deshalb wurden im Rahmen der letzten 4 Untersuchungstermine die EHV-2-nPCR positiven equinen PBMC unter Zugabe von TPA auf ED-Zellen kokultiviert und die Häufigkeit des Virusnachweises mit der Kokultivierung ohne TPA verglichen. Jeweils 4×10^5 PBMC der Pferde A-C wurden parallel zur Virusanzucht aus lysierten Zellen und der Kokultivierung ohne TPA unter Zusatz von 20 ng TPA pro ml Zellkulturmedium mit der gleichen Zahl ED-Zellen kokultiviert (3.6.3). Da die ED-Zellen sich in der Kokultivierung mit TPA frühzeitig abzulösen begannen, mussten sie bereits nach 4-5 Tagen mit Medium ohne TPA passagiert werden. Sie wurden täglich auf das Erscheinen von cpE untersucht und nach 3 Passagen ohne sichtbare virusbedingte Zellveränderungen als negativ beurteilt.

Der Virusnachweis aus den PBMC von Pferd A gelang mit TPA in 100 %, von Pferd C in 75 % und von Pferd B in keiner der 4 Untersuchungen (Tabelle 7).

Die unter Zugabe von TPA angezüchteten Viren zeigten die bereits für die Isolate aus der Kokultivierung ohne TPA dargestellten Charakteristika (s.o.). In den Fällen des parallelen Nachweises in der Kokultivierung mit und ohne TPA erschienen die cpE mit TPA allerdings etwa eine Zellkulturpassage früher als ohne.

Da die 13 isolierten Viren (Pferd A 8 und Pferd C 5 Isolate) aus EHV-2-nPCR positiven equinen PBMC stammten und ein für EHV-2 typisches Wachstumsverhalten in der Zellkultur zeigten (s.o.), war es naheliegend, dass es sich um EHV-2 handelte. Die Identität der Virusisolate wurde dennoch durch molekularbiologische Untersuchungen überprüft.

Tabelle 7 Nachweis von EHV-2 aus equinen PBMC in der Zellkultur

		Pferd A			Pferd B			Pferd C		
		VA	K	TPA	VA	K	TPA	VA	K	TPA
monatliche Blutentnahme	1	-	-	n. d.	-	-	n. d.	-	-	n. d.
	2	-	-	n. d.	-	-	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	3	-	+ (A1)	n. d.	-	-	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	4	-	-	n. d.	-	-	n. d.	-	-	n. d.
	5	-	+ (A2)	n. d.	-	-	n. d.	-	+ (C1)	n. d.
	6	-	-	n. d.	-	-	n. d.	-	-	n. d.
	7	-	-	n. d.	-	-	n. d.	-	-	n. d.
	8	-	-	n. d.	-	-	n. d.	-	+ (C2)	n. d.
	9	-	-	+ (A3)	-	-	-	-	-	+ (C3)
	10	-	-	+ (A4)	-	-	-	-	-	+ (C4)
	11	-	+ (A5a)	+ (A5b)	-	-	-	-	-	+ (C5)
	12	-	+ (A6a)	+ (A6b)	-	-	-	-	-	-
%+		0 %	33 %	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %	20 %	75 %

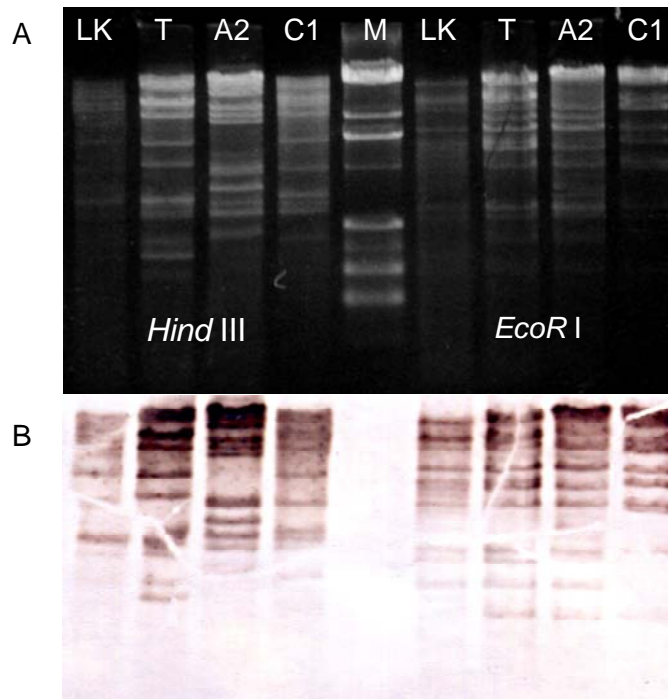
Jeweils 4×10^5 PBMC der Pferde A-C wurden in der Virusanzucht nach Frieren-Tauen (VA) und der Kokultivierung ohne (K) und mit TPA (TPA) auf ED-Zellen eingesetzt (3.6). Die monatlichen Blutentnahmetermine entsprechen Tabelle 6. Positive Virusnachweise wurden durch +, negative durch - dargestellt. In Klammern ist die Bezeichnung der Virusisolate angegeben (z. B. A1 = 1. Isolat von Pferd A).
n. d.: Untersuchung nicht durchgeführt.

4.2.2.1.1 Charakterisierung der gewonnenen Virusisolate

Alle Virusisolate wurden auf ED-Zellen vermehrt und aus dem virushaltigen Zellkulturüberstand nach Zentrifugation über ein 50 %iges Sucrosekissen die virale DNA präpariert (3.3.4 und 3.3.5). Jeweils 20 pg dieser DNA wurden in der EHV-2-nPCR („repetitives Motiv“ 3.9) eingesetzt und als EHV-2 bestätigt (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurde die DNA der Isolate A1, A2, A3, C1 und C4 in der Restriktionsenzymanalyse mit den Restriktionsenzymen *Hind* III und *Eco*R I verdaut (3.10). Nach der Auftrennung der geschnittenen DNA in der Agarosegelelektrophorese wurde diese auf eine Nylonmembran transferiert (3.11.1) und mit einer EHV-2-spezifischen digoxigeninmarkierten LK-4-Gesamtgenomsonde hybridisiert (3.11.3). In Bild 10 wurden die Ergebnisse exemplarisch für die Isolate A2 und C1 dargestellt.

Die Restriktionsenzym-Schnittmuster der Isolate ähnelten zwar den mitgeführten Referenzstämmen LK-4 und T16, waren mit diesen aber nicht identisch. Da ihre DNA in der Southernhybridisierung jedoch ebenso wie die DNA der EHV-2-Referenzstämmen mit der eingesetzten EHV-2-Sonde reagierte, handelte es sich bei allen Isolaten um EHV-2.

Bild 10 Restriktionsenzymanalyse und Southernhybridisierung der Isolate A2 und C1 sowie der EHV-2-Referenzstämmen LK-4 und T16



A: Virale DNA der EHV-2-Referenzstämmen LK-4 (LK) und T16 (T) sowie der Isolate A2 und C1 wurde aus dem Zellkulturüberstand infizierter ED-Zellen gewonnen (3.3.4, 3.3.5). 100-200 ng der DNA wurden mit den Restriktionsenzymen *Hind* III und *Eco*R I geschnitten (3.10), in einem 0,7 %igen Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung im UV-Licht sichtbar gemacht. **B:** Die DNA wurde auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer EHV-2-LK-4-Gesamtgenomsonde hybridisiert (3.11).

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Anwesenheit von infektiösem und latentem EHV-2 in den PBMC der Pferde A-C lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Da die Untersuchung der PBMC in der Virusanzucht aus lysierten Zellen zu allen Zeitpunkten negativ verlief ergaben sich keine Hinweise für das Vorliegen einer akuten EHV-2-Infektion in diesen Zellen.

Mittels Kokultivierung konnte aus den PBMC der Pferde A und C in einem Teil der Untersuchungen Virus isoliert werden. Durch die Anwendung von TPA wurde der Anteil der positiven Nachweise aus den PBMC dieser Pferde erhöht. Die gewonnenen Isolate wurden mit Hilfe der EHV-2-nPCR und teilweise auch durch eine Restriktionsenzymanalyse mit Southernhybridisierung als EHV-2 typisiert. Diese Ergebnisse weisen auf das Vorliegen einer, durch eine TPA-Behandlung reaktivierbaren, latenten Infektion in den PBMC dieser Pferde hin. Aus den PBMC von Pferd B konnte weder lytisches noch latentes Virus isoliert werden, obwohl diese in der EHV-2-nPCR immer positiv waren.

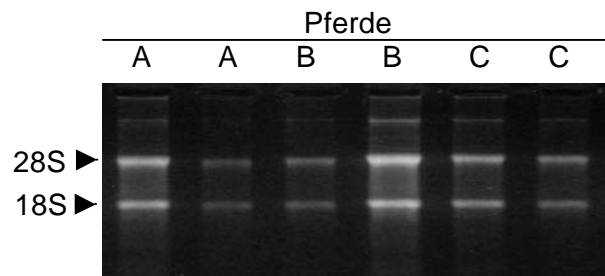
4.2.2.2. Nachweis von EHV-2-Transkripten des lytischen Replikationszyklus

Zusätzlich zu den beschriebenen Untersuchungen zum Nachweis von lytischem und latentem Virus in der Zellkultur wurden die PBMC der Pferde A-C auf die Anwesenheit der zum lytischen Replikationszyklus von EHV-2 gehörenden Transkripte des ORF-50 und gB untersucht.

Dazu wurde die Expression des EHV-2-gB an den Untersuchungszeitpunkten 2-12 und die Expression des EHV-2-ORF-50 aus organisatorischen Gründen nur an den Terminen 8-12 mittels nRT-PCR untersucht. An diesen Blutentnahmetermen wurden ca. 1×10^7 der mittels Dichtegradientenzentrifugation aus dem Blut der 3 Pferde gewonnenen PBMC (3.5) in der RNA-Präparation eingesetzt, wobei jedes Pferd im Doppelansatz untersucht wurde. Um die Degeneration der RNA so gering wie möglich zu halten, erfolgte nach dem Auszählen und Aliquotieren (3.3.3) die sofortige Lysierung der PBMC in Trizol™ (3.8.2). Die RNA-Präparation wurde wie in Kapitel 3.8.3 beschrieben durchgeführt und die Reinheit und Quantität der gewonnenen Gesamt-RNA mittels photometrischer Messung bestimmt. Zusätzlich wurde ihre Integrität in der denaturierenden Agarosegelelektrophorese überprüft (3.8.4, Bild 11).

Bild 11 Denaturierende Agarosegelelektrophorese mit Gesamt-RNA aus equinen PBMC

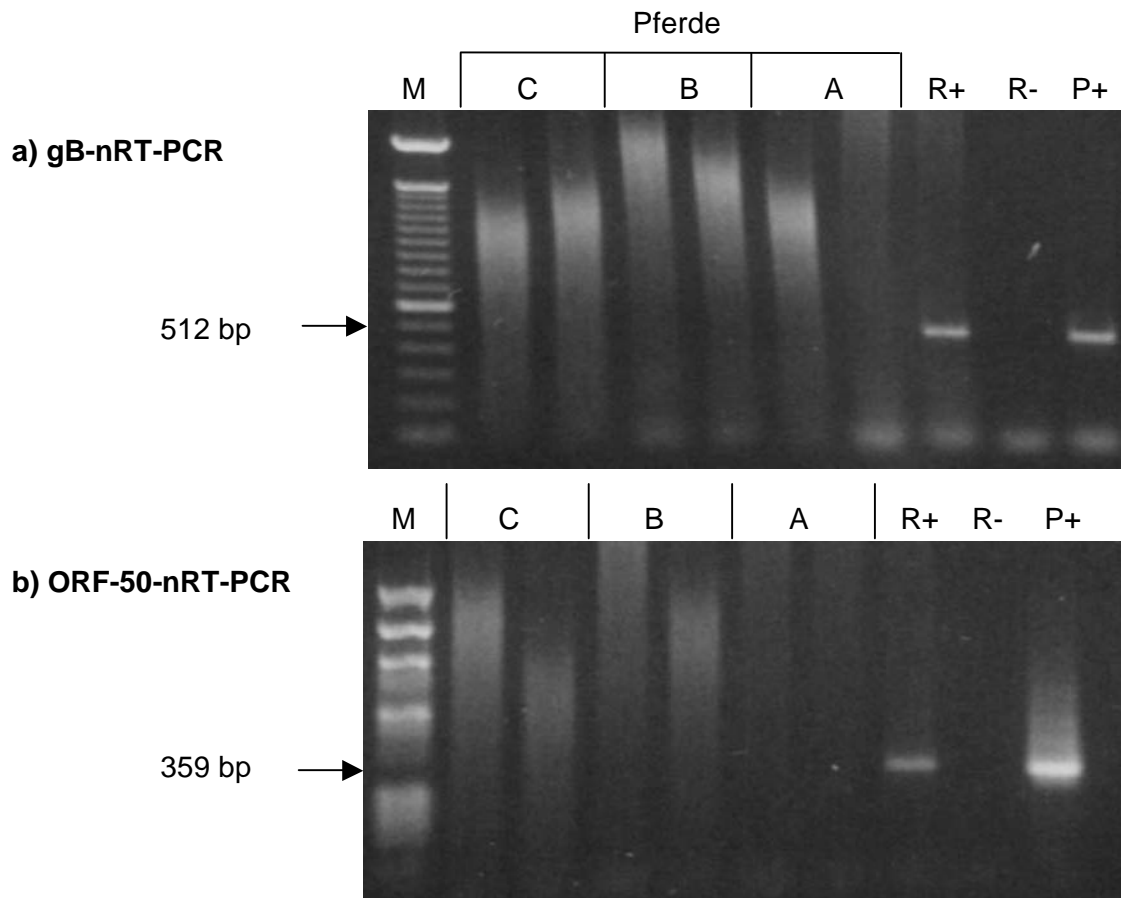
8 µg der im Doppelansatz durchgeführten RNA-Präparationen aus den PBMC der Pferde A-C von einem Blutentnahmetermin wurden in der denaturierenden Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Die Visualisierung erfolgte nach Ethidiumbromidfärbung im UV-Licht. Mit Pfeilen wurden die Banden der 18 S und 28 S ribosomalen RNA gekennzeichnet.



Aus jedem Ansatz war genügend Gesamt-RNA in guter Qualität hervorgegangen, um ein Aliquot von 10 µg mit DNase I zu behandeln (3.9.1) und anschließend in der EHV-2-IL-10-snPCR zur Prüfung der Freiheit von EHV-2-DNA einzusetzen (Daten nicht gezeigt). Da EHV-2-DNA nicht nachgewiesen wurde, konnten die Gesamt-RNAs anschließend in der gB- und ORF-50-nRT-PCR untersucht werden (3.9). Als Positivkontrolle wurden immer RNA-Präparationen aus LK-4-infizierten ED-Zellen (72 Stunden p. i.) im DNase-Verdau und in der RT-PCR mit positivem Resultat mitgeführt (Bild 12).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 8 zusammengefasst und vom 5. Untersuchungstermin exemplarisch in Bild 12 wiedergegeben worden. Über den gesamten Untersuchungszeitraum konnten bei den 3 Pferden keine Transkripte des viralen gB bzw. ORF-50 in der jeweiligen nRT-PCR detektiert werden.

Bild 12 **Amplifikate der EHV-2-ORF-50- und -gB-nRT-PCR aus der Gesamt-RNA der PBMC der Pferde A-C vom 5. Untersuchungstermin.**



Aus den EHV-2-nPCR positiven PBMC der Pferde A-C wurde Gesamt-RNA gewonnen, mit DNase I verdaut und in den 2 nRT-PCRs eingesetzt. Die Amplifikate wurden in 1 %igen Agarosegelen aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht fotografiert. In den mit A, B bzw. C gekennzeichneten Spuren wurden die Produkte der im Doppelansatz durchgeführten nRT-PCRs des jeweiligen Pferdes aufgetragen. Als Positivkontrolle der nRT-PCR (R+) wurde RNA aus LK-4-infizierten ED-Zellen (72 Stunden p. i.) und als Positivkontrolle der nPCR (P+) 20 pg LK-4-DNA eingesetzt. In R- wurde die Reagenzienkontrolle der nRT-PCR aufgetragen. M: 100 bp DNA-Leiter (a) bzw. λ -DNA / *Hind* III und ϕ X 174-DNA / *Hae* III (b).

Tabelle 8 Ergebnisse der ORF-50- und gB-nRT-PCR-Untersuchung equiner PBMC

		Pferd A		Pferd B		Pferd C	
		nRT-PCR		nRT-PCR		nRT-PCR	
		gB	ORF-50	gB	ORF-50	gB	ORF-50
Monatliche Blutentnahme	2	-	n. u.	-	n. u.	-	n. u.
	3	-	n. u.	-	n. u.	-	n. u.
	4	-	n. u.	-	n. u.	-	n. u.
	5	-	n. u.	-	n. u.	-	n. u.
	6	-	n. u.	-	n. u.	-	n. u.
	7	-	n. u.	-	n. u.	-	n. u.
	8	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-
	11	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-

Die RNA-Präparationen aus den PBMC der Pferde A-C, die an den Blutentnahmetermeninen 2-12 gewonnen worden waren, wurden in der EHV-2-gB- bzw. -ORF-50-nRT-PCR eingesetzt. Die Untersuchung erfolgte immer im Doppelansatz. - : kein Ansatz positiv. n. u.: nicht untersucht.

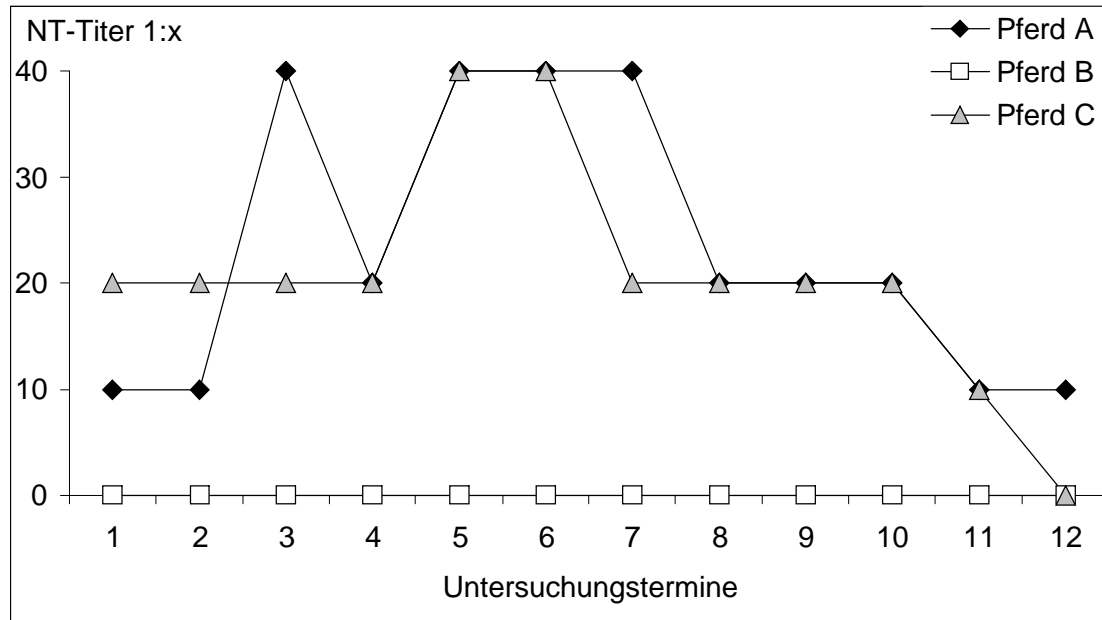
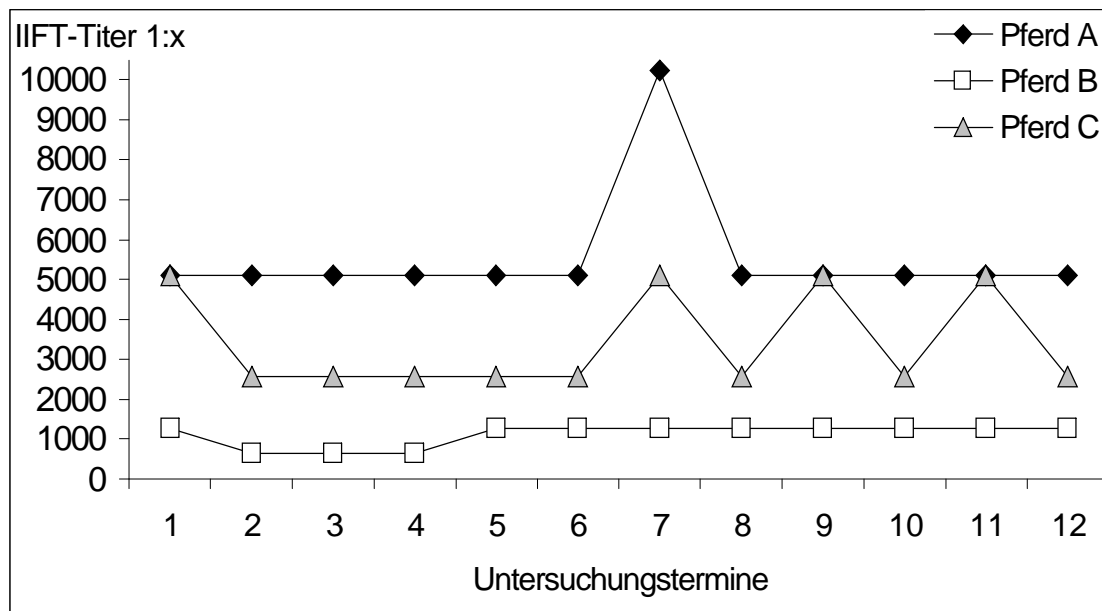
In den RNA-Präparationen aus den PBMC der Pferde A-C konnten keine Transkripte des zum lytischen Infektionszyklus von EHV-2 gehörenden viralen gB bzw. ORF-50 nachgewiesen werden. Daher ergaben sich auch in diesen Untersuchungen keine Anhaltspunkte für das Vorliegen einer akuten Infektion in den PBMC der Pferde A-C.

4.2.2.3 Nachweis EHV-2-spezifischer Antikörper

Ergänzend zu den beschriebenen Untersuchungen zum EHV-2-Infektionsstatus der Pferde A-C, wurde aus dem Blutplasma der monatlich gewonnenen Citratblutproben (siehe Kapitel 4.2.1) zusätzlich der EHV-2-Antikörperstatus ermittelt.

Dazu wurden aus dem inaktivierten Blutplasma logarithmische Verdünnungsreihen zur Basis 2 hergestellt und mittels indirektem Immunfluoreszenztest (IIFT, 3.4.2) und Neutralisationstest (NT, 3.4.1) auf Antikörper gegen EHV-2 untersucht. Die Antikörpertiter wurden im IIFT als höchste Plasmaverdünnungsstufe mit positiver Antigenfluoreszenz und im NT als die Verdünnungsstufe mit einer 50 %igen Plaquereduktion definiert. Als auffällig gelten NT-Titer ab 1:20 und IIFT Titer ab 1:5120 (Borchers et al., 1999a). Bei Serumpaaruntersuchungen im Abstand von 3 bis 4 Wochen sind Antikörpertiteranstiege um das 4-fache und mehr als Hinweis auf das Vorliegen einer akuten Infektion zu bewerten (Borchers et al., 1998).

Die Titerverläufe für den gesamten Untersuchungszeitraum sind in den Diagrammen 1 A und B dargestellt worden.

Diagramm 1 Verlauf der EHV-2-Antikörpertiter der Pferde A-C**A** Im Neutralisationstest**B** Im indirekten Immunfluoreszenztest

Für die Untersuchungen wurden die Blutproben der 12 Untersuchungstermine aus Kapitel 4.2.1 verwendet.

Aus den Ergebnissen der serologischen Untersuchungen der Pferde A-C geht hervor, dass an sämtlichen Untersuchungszeitpunkten bei allen 3 Pferden im IIFT nachweisbare EHV-2-Antikörpertiter vorhanden waren. Dieses war allerdings zu erwarten, da EHV-2 in der Pferdepopulation weit verbreitet ist und nahezu alle älteren Pferde Antikörper gegen EHV-2 besitzen (Borchers et al., 1997).

Pferd A wies im EHV-2-IIFT konstant hohe Antikörpertiter von 1:5120 bis 1:10240 auf. Im EHV-2-NT zeigte dieses Pferd ebenfalls immer Antikörper. Zu Beginn der Studien befanden sich diese auf einem niedrigen Niveau (1:10) und stiegen dann vom 2. zum 3. Untersuchungstermin innerhalb von etwa 4 Wochen um das 4-fache auf 1:40 an. Anschließend blieb der Antikörpertiter für etwa 4 Monate auf einem hohen Level, um zum Ende der Untersuchungsperiode wieder auf 1:10 abzufallen. Der 4-fache Titeranstieg vom 2. zum 3. Untersuchungstermin ist als Hinweis für den Ablauf einer akuten EHV-2-Infektion bei diesem Pferd zu bewerten.

Auch Pferd C zeigte im Verlauf der Studien einen leichten NT-Titeranstieg von 1:20 auf 1:40. Die neutralisierenden Antikörper sanken nach 2 Monaten wieder auf 1:20, um schließlich vom 10. bis zum 12. Untersuchungstermin unter die Nachweisgrenze des Tests abzufallen. Die EHV-2-IIFT-Titer dieses Pferdes lagen konstant zwischen 1:2560 und 1:5120. Bei diesem Pferd konnte demnach kein signifikanter Titeranstieg verzeichnet werden, dennoch weisen die schwankenden Titer der neutralisierenden Antikörper auf eine akute EHV-2-Infektion in diesem Pferd hin. Dabei muss ferner bedacht werden, dass die Blutentnahmen im monatlichen Abstand erfolgten und zwischen dem 5. und 6. Termin durchaus höhere Antikörpertiter vorhanden gewesen sein können.

Pferd B, das schon in Kapitel 4.2.2.1 dadurch aufgefallen war, dass sich aus seinen EHV-2-nPCR-positiven PBMC kein Virus isolieren ließ, unterschied sich auch in den serologischen Untersuchungen von den beiden anderen Pferden, indem es nur niedrige EHV-2-Antikörperspiegel zeigte. Während im IIFT Titer zwischen 1:640 und 1:1280 nachgewiesen wurden, besaß es keine nachweisbaren neutralisierenden Antikörper gegen EHV-2. Ein Anstieg der neutralisierenden Antikörper zwischen den Untersuchungsterminen, wie bei Pferd C vermutet, ist auf Grund der konstant negativen Nachweise unwahrscheinlich.

Entsprechend den Ergebnissen aus Kapitel 4.2.1 konnte auch serologisch festgestellt werden, dass alle 3 Pferde sich vor bzw. während der Untersuchungen mit EHV-2 auseinandergesetzt haben.

Die Pferde A und C zeigten relativ hohe, zum Teil auffällige EHV-2-Antikörpertiter und damit Anzeichen für das Vorliegen einer akuten EHV-2-Infektion. Dies scheint im Widerspruch zu den Ergebnissen der Untersuchungen des Infektionsstatus der PBMC dieser Pferde aus den vorangegangenen Kapiteln zu stehen, da diese eindeutig keine Hinweise für das Vorliegen

einer akuten EHV-2-Infektion ergaben. Allerdings geben die Untersuchungen an den PBMC nur den Infektionsstatus der PBMC zum Zeitpunkt der monatlichen Blutentnahmen wieder. Dagegen bleiben die hohen Antikörpertiter als Folge einer akuten EHV-2-Infektion bzw. einer EHV-2-Reaktivierung über längere Zeit bestehen und somit länger als Transkripte der Virusreplikation und infektiöse Viruspartikel nachweisbar.

In den Plasmaproben von Pferd B ließen sich nur sehr niedrige EHV-2-Antikörpertiter nachweisen, für eine akute EHV-2-Infektion ergaben sich bei diesem Pferd damit wiederum keine Hinweise.

4.2.2.4 Untersuchung der Genomkonformation von EHV-2 in natürlich infizierten PBMC von Pferd A

Für verschiedene Gammaherpesviren konnte eine zirkuläre oder integrierte Genomkonformation während der latenten Infektion und eine lineare Genomkonformation während der lytischen Infektion festgestellt werden (Gardella et al., 1984; Stewart et al., 1998; Donofrio & van Santen, 2001). In diesen Arbeiten bediente man sich dem *in situ* Lysisgel nach Gardella (Gardella-Gel, Gardella et al., 1984), einem Verfahren, das durch den schonenden Aufschluss virusinfizierter Zellen im Agarosegel zur sensitiven Differenzierung zwischen linearer, zirkulärer und in das Wirtsgenom integrierter Virus-DNA geeignet ist. Da, wie bereits erwähnt, EHV-2 wie andere Gammaherpesviren die PBMC seines Wirtes infiziert und dort auch in Latenz geht, sollte diese Methode zur Bestimmung der Virus-Genomkonformation und damit als weiteres Kriterium für die Latenz in EHV-2-infizierten PBMC angewendet werden. Für diese Untersuchungen wurden exemplarisch die PBMC von Pferd A verwendet.

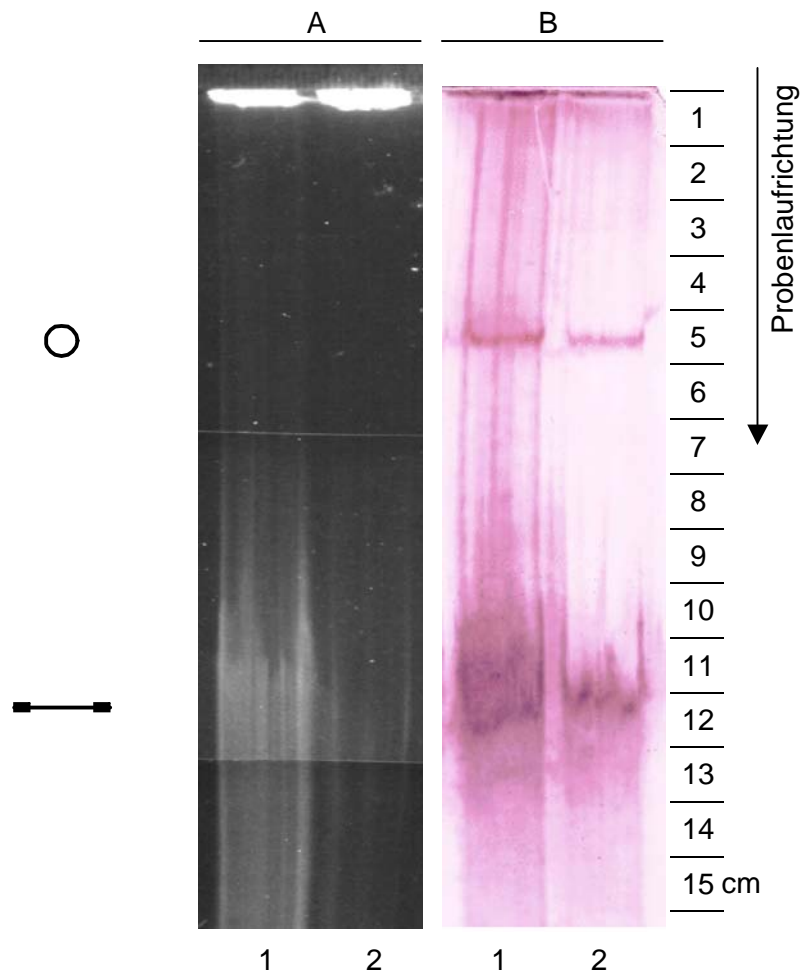
Wie in Kapitel 3.12 beschrieben, wurden die im Probenpuffer suspendierten Zellen direkt in die Taschen eines horizontalen Agarosegels pipettiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte bei 4 °C und niedriger Stromspannung (28 V) über einen Zeitraum von 4 Stunden in den Geltaschen durch Freisetzung von SDS und Pronase aus dem Lysisgel. Daran schloss sich die Elektrophorese der freigesetzten viralen und zellulären DNA im Trenngel bei 162 V für ca. 18 Stunden an. Die kovalent zu einem Ring geschlossene Virus-DNA bewegt sich dabei langsamer durch das Agarosegel als die lineare DNA gleicher Größe, während integrierte Virus-Genome mit der zellulären DNA in den Geltaschen verbleiben (Gardella et al., 1984). Der Nachweis viraler DNA im Gel wurde entweder durch eine sich anschließende Southernhybridisierung mit virusspezifischen digoxigenin-markierten DNA-Sonden (3.11) oder in der EHV-2-nPCR nach Extraktion der DNA durch den Verdau der Agarose aus dem zuvor in definierte Blöcke geschnittenen Agarosegel (3.12.1), geführt. Der DNA-Nachweis in der nPCR kann die Sensitivität der Methode erhöhen, wodurch der Einsatz von Zellen, die nur wenige Genomkopien enthalten, möglich wird (Decker et al., 1996b).

4.2.2.4.1 Etablierung der Gardella-Gel-Technik mit EBV-infizierten Zellen

Zur Etablierung der Methode wurden zunächst 2×10^6 bzw. 5×10^6 Zellen der persistent mit EBV infizierten und transformierten Affen-B-Zelllymphomlinie B95-8 verwendet (3.3.1). Diese Zellen sind latent mit EBV infiziert und partiell permissiv für die EBV-Virusreplikation, so dass sie sowohl episomale (zirkuläre) als auch lineare EBV-Genome enthalten, die sich mit Hilfe der Gardella-Gel-Technik nachweisen lassen (Decker et al., 1996b).

Nach der Färbung des Trenngels mittels Ethidiumbromid und dessen Betrachtung unter UV-Licht, war neben der großen Menge zellulärer DNA, die auf Grund ihrer Größe in den Geltaschen verblieb, lediglich eine 11 bis 13 cm weit gewanderte, 2 cm breite und unscharf begrenzte Bande zu erkennen (Bild 13A). Diese Bande besteht aus unterschiedlich großen Fragmenten freigesetzter zellulärer DNA, enthält aber auch eventuell vorhandene lineare Virus-DNA (Gardella et al., 1984). Um EBV-DNA nachzuweisen wurde das Gel anschließend in einer Southernhybridisierung mit der digoxigeninmarkierten EBV-spezifischen DNA-Sonde p135.16 eingesetzt (3.11). Wie in Bild 13B zu sehen ist, wurden in beiden Spuren die ca. 5 cm von den Geltaschen entfernt liegenden scharfen Banden der zirkulären Virus-DNA sichtbar. Außerdem wurde lineare virale DNA in der bereits beschriebenen breiten Bande ungefähr bei 12 cm nachgewiesen. Diese stellte sich nicht so gut konturiert wie die Bande der zirkulären DNA dar, was jedoch durch einen zu hohen DNA-Gehalt im Gel bedingt gewesen sein kann.

In 2 bzw. 5×10^6 EBV-infizierten B95-8-Zellen konnte mit Hilfe der Gardella-Gel-Technik in Verbindung mit einer Southernhybridisierung erwartungsgemäß sowohl zirkuläre als auch lineare EBV-DNA nachgewiesen werden. Dadurch konnten in der Literatur beschriebene Ergebnisse reproduziert (Decker et al., 1996b), die Methode also erfolgreich etabliert werden.

Bild 13 Gardella-Gel mit EBV-infizierten B95-8-Zellen

5×10^6 (**Spur 1**) bzw. 2×10^6 (**Spur 2**) B95-8-Zellen wurden in 100 μ l Probenpuffer A aufgenommen und in die Taschen eines vorbereiteten horizontalen Gardella-Gels pipettiert (3.12). Die Elektrophorese erfolgte bei ca. 4 °C für 3 Stunden mit 28 V und weiteren 18 Stunden mit 162 V. Das Gel wurde gewaschen, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht fotografiert (**A**). Anschließend wurde die DNA auf eine Nylonmembran transferiert, mit einer EBV-spezifischen digoxigeninmarkierten Sonde (p135.16) hybridisiert und gefärbt (**B**, Farbreaktion 2 Stunden, 3.11).

Banden linearer DNA
Banden zirkulärer DNA



4.2.2.4.2 Anwendung der Gardella-Gel-Technik auf EHV-2-infizierte PBMC von Pferd A

Nachdem die Methode erfolgreich für EBV etabliert worden war, wurde die Gardella-Gel-Technik für die Analyse der PBMC von Pferd A angewendet. Da diese Methode sehr zeit- und arbeitsaufwendig ist, wurden die Untersuchungen an Blutproben durchgeführt, die nicht im Rahmen der monatlichen Blutentnahmen (vgl. Tabelle 6) entnommen und nicht mit den unter 4.2.2.1. bis 4.2.2.3. genannten Methoden untersucht wurden.

In 4 Versuchen wurden jeweils 1×10^6 - 1×10^7 frisch gewonnene (3.5) PBMC eingesetzt. Parallel wurden sie, wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, in der EHV-2-nPCR getestet, wobei immer positive Resultate erzielt wurden (Daten nicht gezeigt). Als Positivkontrollen wurden jeweils 1×10^6 B95-8-Zellen und 1 - 2×10^6 LK-4-infizierte ED-Zellen (3 Tage p. i.) mitgeführt. In einem Versuch wurden zusätzlich ca. 100 ng aufgereinigte LK-4-DNA als Positivkontrolle eingesetzt (Tabelle 9).

Tabelle 9 Übersicht der mit der Gardella-Gel-Technik untersuchten Proben

Versuch Nr.	eingesetzte Zellen / DNA			
	EBV	EHV-2		
	B 95-8	LK-4 infizierte ED- Zellen	LK-4 DNA	PBMC Pferd A
I				
integriert	-	-	n. u.	-
linear	+	+		-
zirkulär	+	-		-
II				
integriert	-	-	n. u.	-
linear	+	+		-
zirkulär	+	-		-
III				
integriert	-	-	-	-
linear	+	+	+	-
zirkulär	+	-	-	-
IV				
integriert	-	-	n. u.	-
linear	+	+		-
zirkulär	+	-		-

Dargestellt wurden die eingesetzten Zellen bzw. die Virus-DNA und die Ergebnisse der Versuche I-IV (Erklärung siehe Text). Der Nachweis integrierter, linearer bzw. zirkulärer Virus-DNA wurde mit + gekennzeichnet, negative Nachweise mit -. n. u.: nicht untersucht.

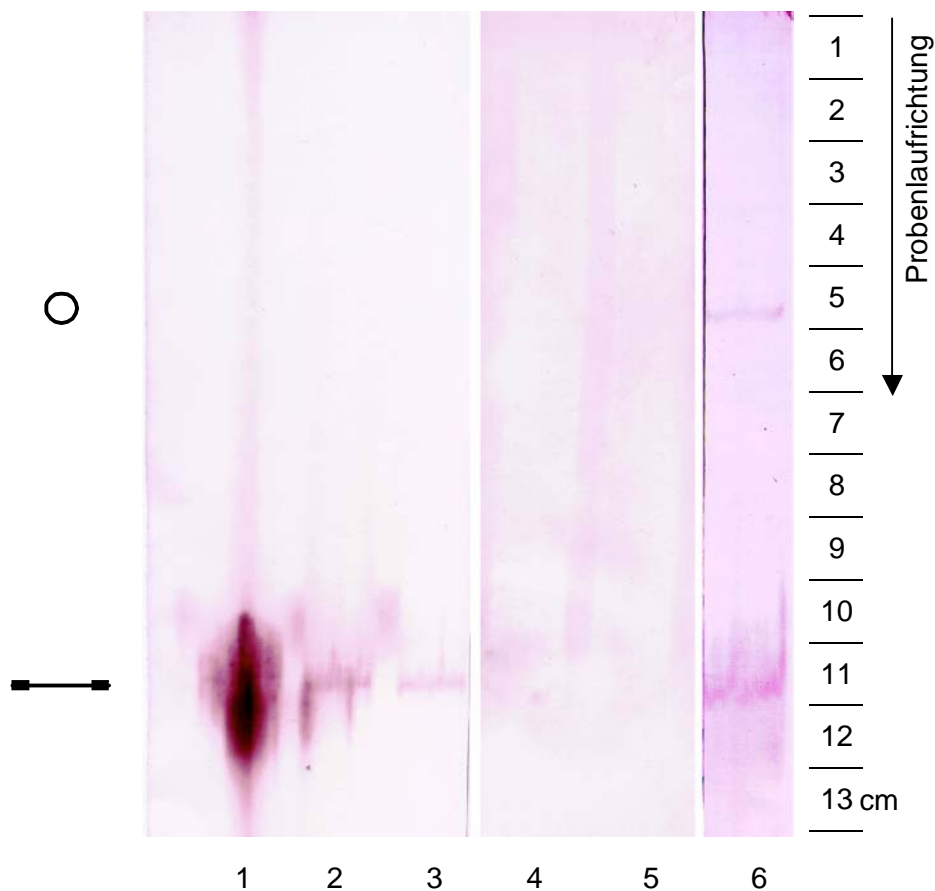
Die Trenngele zeigten nach Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht immer die in den Geltaschen verbliebene zelluläre DNA und die ca. 11 bis 13 cm weit gewanderte, etwa 2 cm breite und unscharf begrenzte Bande (nicht gezeigt). Die Ergebnisse der EHV-2- und EBV-Southernhybridisierungen mit diesen Gelen sind in Tabelle 9 zusammengefasst und in Bild 14 aus einem Versuch exemplarisch dargestellt worden.

In allen Fällen konnten in den B95-8-Zellen durch Southernhybridisierung mit der EBV-Sonde p135.16 die beschriebenen EBV-spezifischen Banden der zirkulären und linearen

DNA nachgewiesen werden (Bild 14, Spur 6). Nach Southernhybridisierung mit einer digoxigeninmarkierten LK-4-Gesamtgenomsonde erschienen spezifische Banden auf Höhe der linearen DNA sowohl für die aufgereinigte LK-4-DNA als auch für LK-4-infizierte ED-Zellen (Bild 14, Spuren 1 und 2).

In keinem Versuch konnten EHV-2-spezifische Banden in der DNA aus EHV-2-nPCR-positiven PBMC von Pferd A nachgewiesen werden (Bild 14, Spuren 4 und 5).

Bild 14 Southernhybridisierung eines Gardella-Gels zur Bestimmung der Genomkonformation in EHV-2-infizierten Zellen



Der Versuchsablauf entspricht Bild 13. Als Kontrolle wurden in **Spur 1** ca. 100 ng Gesamtgenom DNA des Referenzstammes LK-4 und in **Spur 2** bzw. **3** 2×10^6 bzw. 1×10^6 LK-4-infizierte ED-Zellen (3 Tage p. i.) aufgetragen. Frisch gewonnene EHV-2-nPCR positive PBMC von Pferd A wurden in den **Spuren 4 und 5** aufgetragen (1×10^7 bzw. 2×10^7 Zellen). In **Spur 6** wurden 1×10^6 B95-8-Zellen eingesetzt.

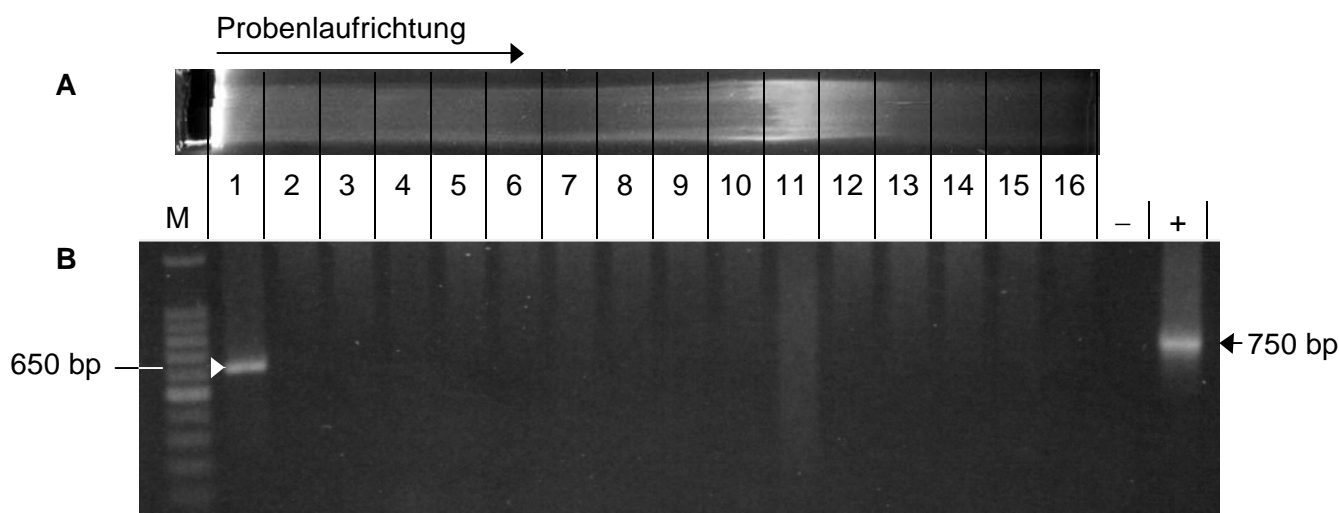
Die auf eine Nylonmembran transferierte DNA wurde mit einer digoxigeninmarkierten Gesamtgenomsonde des EHV-2-Referenzstammes LK-4 bzw. Spur 6 mit der EBV-Sonde p135.16 hybridisiert und gefärbt (3.11, Farbreaktion Spuren 1-3 und 6 für 2 Stunden, Spuren 4 und 5 für 15 Stunden).

Der Einsatz der Southernhybridisierung als Detektionssystem für EHV-2-DNA im Gardella-Gel schien demnach für die Untersuchung lytisch mit EHV-2 infizierter Zellen jedoch nicht für die verwendeten frisch gewonnenen und natürlich infizierten PBMC geeignet zu sein.

Um zu prüfen, ob der fehlende Nachweis von EHV-2-DNA aus den natürlich infizierten PBMC auf der mangelnden Sensitivität der Southernhybridisierung beruhte, wurden 2×10^7 frisch gewonnene PBMC von Pferd A in einem Gardella-Gel eingesetzt, dessen Trenngel aus einer Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt (low melting point bzw. L.M.P. Agarose) gegossen worden war (3.12). Die Detektion der EHV-2-DNA erfolgte mittels EHV-2-nPCR („repetitives Motiv“, 3.9) aus Gelstücken, die jeweils einem Zentimeter der Spur des Agarosegels entsprachen (Bild 15, 1-16), und aus denen die enthaltene DNA durch einen Gelase™-Verdau (3.12.1) freigesetzt wurde. Um Kontaminationen mit EHV-2-DNA zu verhindern, wurde dieses Gel in einer separaten, zuvor mit UV-Licht bestrahlten Elektrophoresekammer angesetzt und nur die PBMC von Pferd A aufgetragen. Als Positivkontrolle diente ein zweites Gardella-Gel aus Standard-Agarose mit B95-8-Zellen und LK-4-infizierten ED-Zellen, das parallel lief und in dem durch die anschließende Southernhybridisierung die erwarteten Banden gezeigt werden konnten (nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der nPCR sind in Bild 15 dargestellt worden, wobei in A die untersuchte Spur aus dem Gardella-Gel quer über das Agarosegel der EHV-2-nPCR (B) gelegt wurde, um die Aufteilung des Gardella-Gels für die PCR zu verdeutlichen.

Bild 15 EHV-2-nPCR („repetitives Motiv“) nach Gelase™-Verdau eines Gardella-Gels mit PBMC von Pferd A



A: 2×10^7 frisch gewonnene PBMC von Pferd A wurden in 100 μ l Probenpuffer aufgenommen und auf ein Gardella-Gel, dessen Trenngel aus L.M.P. Agarose gegossen worden war, aufgetragen (3.12). Nach Elektrophorese und Waschen des Gels wurden die ersten 16 cm der Spur in 1 cm lange Blöcke geschnitten und die daraus extrahierte DNA in der EHV-2-nPCR eingesetzt.

B: Die Amplifikate der EHV-2-nPCR wurden auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung im UV-Licht visualisiert. Die Spuren 1-16 entsprechen dem 1. bis 16. cm des Gardella-Gels (A). – ist die Reagenzienkontrolle und + die Positivkontrolle der PCR (20 pg der DNA des EHV-2-Referenzstammes LK-4). M: 100 bp DNA-Leiter (die intensivere Bande hat eine Größe von 500 bp).

EHV-2-spezifische DNA wurde mit der EHV-2-nPCR nur im ersten Zentimeter des Gardella-Gels gefunden, was auf eine mögliche Integration in das Wirtsgenom und damit auf eine latente EHV-2-Infektion hindeutet. Die Größe der Amplifikate lag bei ca. 650 bp und entsprach damit etwa der in Kapitel 4.2.1 für die PBMC von Pferd A beschriebenen Amplifikatgröße. Da sie außerdem kleiner als die Amplifikate der LK-4-DNA waren, konnte eine Kontamination mit der DNA von diesem, in den Gardella-Gelen als Positivkontrolle verwendeten, EHV-2-Stamm ausgeschlossen werden.

4.2.3 Untersuchung der Expression des EHV-2-IL-10 in equinen PBMC

Parallel zu den bisher genannten Untersuchungen zur Feststellung des EHV-2-Infektionsstatus wurde die Gesamt-RNA aus den PBMC der 3 Pferde an den Blutentnahmeterminen 2-12 (vgl. Tabelle 6) in der EHV-2-IL-10-snRT-PCR eingesetzt. Zum Nachweis der EHV-2-IL-10-Transkripte wurden die in Kapitel 4.2.2.2 beschriebenen, mit DNase I behandelten und negativ auf die Anwesenheit von EHV-2-DNA getesteten RNA-Präparationen jeweils im Doppelansatz untersucht. Als Kontrolle wurden RNA-Präparationen aus LK-4-infizierten ED-Zellen (72 Stunden p.i.) jeweils mit positivem Resultat mitgeführt (Daten nicht gezeigt).

In den PBMC von Pferd A wurden an 3 Untersuchungsterminen (3, 5 und 7) EHV-2-IL-10-spezifische Transkripte, zweimal in beiden Ansätzen des Doppelansatzes und einmal nur in einem Ansatz, nachgewiesen. In den RNA-Präparationen von Pferd B wurden an 5 Zeitpunkten (Termine 2, 3, 5, 7 und 9) EHV-2-IL-10-Transkripte detektiert, wobei dieser Nachweis jedoch nur in einem Fall bei beiden, ansonsten immer nur in einem Ansatz gelang. In den RNA-Präparationen aus den PBMC von Pferd C konnten keine EHV-2-IL-10-spezifischen Transkripte detektiert werden.

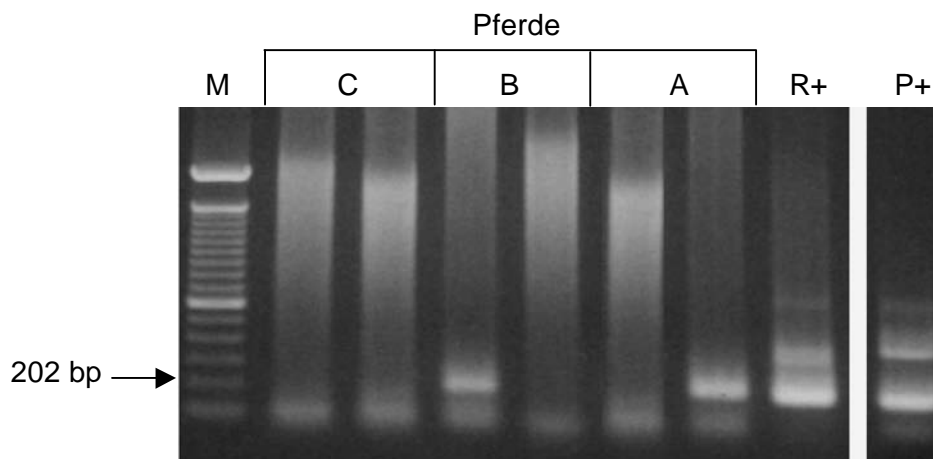
Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 10 zusammengefasst und vom 5. Untersuchungstermin exemplarisch in Bild 16 wiedergegeben worden.

Tabelle 10 Ergebnisse der IL-10 snRT-PCR-Untersuchung

		Pferd A	Pferd B	Pferd C
Monatliche Blutentnahme	2	-	+/-	-
	3	+/+	+/+	-
	4	-	-	-
	5	+/-	+/-	-
	6	-	-	-
	7	+/+	+/-	-
	8	-	-	-
	9	-	+/-	-
	10	-	-	-
	11	-	-	-
	12	-	-	-

Die RNA-Präparationen aus den PBMC der Pferde A-C, die an den Blutentnahmetermenen 2-12 gewonnen worden waren, wurden in der EHV-2-IL-10-snRT-PCR eingesetzt. Die Untersuchung erfolgte immer im Doppelansatz. +/+ : beide Ansätze, +/- : ein Ansatz, - : kein Ansatz positiv.

Bild 16 Amplifikate der EHV-2-IL-10-snRT-PCR aus der Gesamt-RNA der PBMC der Pferde A-C vom 5. Untersuchungstermin.



Aus den EHV-2-nPCR positiven PBMC der Pferde A-C wurde Gesamt-RNA gewonnen, mit DNase I verdaut und in der EHV-2-IL-10-snRT-PCR eingesetzt. Die Amplifikate wurden in 1 %igen Agarosegelen aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht fotografiert. In den mit A, B bzw. C gekennzeichneten Spuren wurden die Produkte der im Doppelansatz durchgeführten snPCRs des jeweiligen Pferdes aufgetragen. Als Positivkontrolle der snRT-PCR (R+) wurde RNA aus LK-4-infizierten ED-Zellen (72 Stunden p. i.) und als Positivkontrolle der snPCR (P+) 20 pg LK-4-DNA eingesetzt. M: 100 bp DNA-Leiter.

Durch diese Untersuchungen konnte erstmals die Expression des EHV-2-IL-10 in natürlich mit EHV-2 infizierten equinen PBMC gezeigt werden. Diese Transkripte wurden an einigen Untersuchungsterminen in den PBMC der Pferde A und B detektiert, wobei allerdings keine kontinuierliche Expression erfolgte. In den RNA-Präparationen aus den PBMC von Pferd C konnten mit Hilfe der EHV-2-IL-10-snRT-PCR keine Transkripte des EHV-2-IL-10 nachgewiesen werden.

Um zu prüfen, ob die EHV-2 IL-10-Expression einem bestimmten Stadium der EHV-2-Infektion zuzuordnen ist, sollen diese Ergebnisse im Folgenden noch einmal den Ergebnissen zur Untersuchung des EHV-2-Infektionsstatus gegenüber gestellt werden. Dazu wurden alle Ergebnisse in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11 Zusammenstellung der Ergebnisse der Untersuchungen mit den Blutproben der Pferde A-C

Pferd	EHV-2 nPCR	VA	K	TPA	IL-10	gB	ORF-50	Gardella-Gel	EHV-2 NT	EHV-2 IIFT
A	100 %	0 %	33 %	100 %	27 %	0 %	0 %	Integriert	1:10-1:40	1:5120-1:10240
B	100 %	0 %	0 %	0 %	45 %	0 %	0 %	n. u.	<1:10	1:640-1:1280
C	75 %*	0 %	20 %	75 %	0 %	0 %	0 %	n. u.	<1:10-1:40	1:2560-1:5120

Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen aus den Kapiteln 4.2.1 und 4.2.2.1 bis 4.2.2.4. Positive Nachweise wurden in Prozent angegeben, wobei die Anzahl der Einzeluntersuchungen variiert (detaillierte Angaben sind in den entsprechenden Kapiteln zu finden). VA: Virusanzucht aus lysierten PBMC; K: Kokultivierung; TPA: Kokultivierung mit TPA; IL-10: IL-10-snRT-PCR; gB: gB-nRT-PCR; ORF-50: ORF-50-nRT-PCR; NT: Neutralisationstest; IIFT: Indirekter Immunfluoreszenztest; n. u.: nicht untersucht.

*Bis zum 3. Untersuchungstermin negativ, danach 100 % positive Nachweise.

Die Untersuchung der PBMC von **Pferd A** in der EHV-2-nPCR, der Kokultivierung mit und ohne TPA und der Gardella-Gel-Technik zeigten, dass diese **latent mit EHV-2 infiziert** waren. Allerdings wiesen die **serologischen Untersuchungen auf eine Reinfektion bzw. eine Reaktivierung von EHV-2 hin**. An den Untersuchungsterminen 3 und 5 konnten in den PBMC dieses Pferdes EHV-2-IL-10-spezifische Transkripte parallel zu einem positiven Virusnachweis in der Kokultivierung detektiert werden. Am 7. Termin waren diese Transkripte ebenfalls nachweisbar, die Kokultivierung jedoch negativ. Neutralisierende Antikörper waren bei diesem Pferd an den Terminen 3, 5 und 7 jeweils mit hohem Titer vorhanden. Besonders hervorzuheben ist der 4-fache Titeranstieg vom 2. zum 3. Untersuchungstermin, weil sich dadurch ein zeitlicher Zusammenhang zwischen einer akuten EHV-2-Infektion und der IL-10-Expression ergibt.

Obwohl sich aus den PBMC von **Pferd B** zu keinem Zeitpunkt Virus aus den PBMC reaktivieren ließ, spricht der kontinuierliche Nachweis von EHV-2-DNA für das **Vorliegen einer latenten EHV-2-Infektion**. Bei diesem Pferd konnten die häufigsten Nachweise einer EHV-2-IL-10-Expression geführt werden.

Die PBMC von **Pferd C** waren in der EHV-2-nPCR und der Kokultivierung mit und ohne TPA positiv und daher **latent infiziert**. Ähnlich wie bei Pferd A ergaben sich in der serologischen Untersuchung **Hinweise für eine akute EHV-2-Infektion bzw. eine EHV-2-Reaktivierung**. EHV-2-IL-10-spezifische Transkripte ließen sich bei diesem Pferd zu keinem Zeitpunkt nachweisen.

Demzufolge ließ sich die EHV-2-IL-10-Expression im Rahmen der latenten Infektion equiner PBMC nachweisen. Bei Pferd A ergaben sich außerdem Hinweise für einen zeitlichen Zusammenhang zwischen einer Reaktivierung der latenten EHV-2-Infektion bzw. einer EHV-2-Reinfektion und der Expression des EHV-2-IL-10.

4.3 Vergleichende Untersuchungen der Nuklein- und Aminosäuresequenzen der IL-10-Gene verschiedener EHV-2-Isolate untereinander und mit bekannten vIL-10- und Wirts-IL-10-Genen

Die Nukleinsäure- (NS-) und Aminosäure- (AS-) Sequenz des EHV-2-IL-10 weist Übereinstimmungen sowohl mit bekannten IL-10-Genen verschiedener Viren, als auch mit den IL-10-Genen unterschiedlicher Eukaryonten auf. So besteht zwischen dem EHV-2-IL-10 und dem EBV-IL-10, dem hIL-10, dem mLIL-10 und dem IL-10 des Orf-Virus auf Proteinebene eine Identität von 70,6 %, 76,4 %, 68,5 % bzw. 67 % (Moore et al., 1990; Vieira et al., 1991; Rode et al., 1993; Fleming et al., 1997). Unterschiede in den AS-Sequenzen dieser IL-10-Gene sind nicht über das gesamte Protein verteilt, sondern kommen gehäuft im Bereich der N-Termini vor, während die zentralen und C-terminalen Bereiche weitgehend identisch sind. Besondere Übereinstimmungen wurden auch zwischen verschiedenen vIL-10-Proteinen und den IL-10-Proteinen des entsprechenden Wirtes festgestellt. So entspricht das Protein des EBV-IL-10 dem IL-10 des Menschen zu 78 %, ohne Berücksichtigung der ersten 21 AS sogar zu 84 % (Vieira et al., 1991) und das IL-10 des Orf-Virus dem des Schafes zu 80 %, über eine Länge von 148 AS sogar zu 96 % (Fleming et al., 1997).

Untersuchungen zu Sequenzunterschieden zwischen den IL-10-Genen verschiedener EHV-2-Isolate wurden bereits von Rode et al. (1994) und Holloway et al. (2000) durchgeführt, wobei in der erstgenannten Arbeit zwischen den EHV-2-Referenzstämmen T400 und LK eine 95,4 bzw. 96,1 %ige Homologie der NS- bzw. AS-Sequenz und in der letztgenannten eine 99 %ige Übereinstimmung der AS-Sequenzen der IL-10-Gene von 3 EHV-2-Isolaten untereinander und mit dem Referenzstamm 86 / 67 ermittelt wurde.

Um Rückschlüsse auf die Funktionalität und Bedeutung des EHV-2-IL-10 zu ermöglichen, sollten in dieser Arbeit die NS- und AS-Sequenzen der IL-10-Gene verschiedener EHV-2-

Feldisolate untereinander, mit bekannten EHV-2-IL-10-Sequenzen sowie mit den IL-10-Genen anderer Viren und Säugetiere verglichen werden.

4.3.1 Untersuchte Sequenzen und methodisches Vorgehen

In den Untersuchungen wurden verschiedene vIL-10 und cIL-10-Gene bzw. Proteine verglichen. Die EHV-2-Isolate K13, K9, K7-1, K7-2, T24 und T13 entstammten der Arbeit von Kershaw et al. (2001) und wurden aus PBMC von klinisch gesunden (K) bzw. augenkranken (T) Pferden isoliert (siehe 3.3.1, Tabelle 1). Die IL-10-Sequenzen dieser Isolate und des EHV-2-Referenzstammes LK-4 gingen aus der Kooperation mit Dr. N. Davis-Poynter (Animal Health Trust, UK) hervor.

Zur Sequenzierung wurden PCR-Amplifikate aus der DNA dieser Isolate verwendet, deren Primer den codierenden Bereich des EHV-2-IL-10 umfassen (3.13). Alle weiteren verwendeten IL-10-Sequenzen befinden sich in der Genbank des nationalen Zentrums für Biotechnologieinformationen (Entrez database, NCBI, USA, www.ncbi.nlm.nih.gov/) und sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Die Größe der offenen Leserahmen (open reading frames, ORF) und der resultierenden IL-10-Proteine war bei den aus der Genbank stammenden Sequenzen vorgegeben, für die neu sequenzierten EHV-2-Isolate wurde sie durch den Vergleich mit den bekannten Sequenzen ermittelt. Die untersuchten IL-10-Proteine bestanden aus 170 (EBV) bis 186 (Orf-Virus) AS, sämtliche EHV-2-IL-10-Gene waren 539 bp und die entsprechenden Proteine 179 AS lang.

Die vergleichenden Untersuchungen der IL-10-NS- und AS-Sequenzen wurden mit dem Computerprogramm „MacVector“ (Accelrys, Cambridge, UK) durchgeführt (siehe 3.13).

Tabelle 12 Quellen der verwendeten, bereits veröffentlichten vIL-10- und cIL-10-Sequenzen

Organismus (Virusstamm)	Referenz	Genbank Nummer
EHV-2 (T400)	Rode et al., 1993	L08504
EHV-2 (86 / 67)	Telford et al., 1995	U20824
EBV (B95-8)	Baer et al., 1984	NC_001345
Orf-Virus (NZ 2)	Fleming et al., 1997	U60552
Pferd	Swiderski et al., 1999	U38200
Mensch	Vieira et al., 1991	X78437
Schaf	Dutia et al., 1994	Z29362

4.3.2 Vergleich der IL-10-Gene bzw. -Proteine verschiedener EHV-2-Isolate untereinander und mit dem IL-10 des Pferdes

Zunächst wurden die NS- und AS-Sequenzen der IL-10-ORFs der EHV-2-Isolate K13, K9, K7-1, K7-2, T24 und T13 sowie der EHV-2-Referenzstämme T400 und LK-4 und des Pferdes mit dem Referenzstamm 86 / 67 verglichen. Dazu wurden die prozentualen Identitäten der IL-10-NS- und AS-Sequenzen zum Stamm 86 / 67 ermittelt (Tabelle 13).

Tabelle 13 Prozentuale Übereinstimmung der IL-10-NS- und -AS-Sequenzen verschiedener EHV-2-Isolate und des Pferdes mit dem EHV-2-Referenzstamm 86 / 67

	86 / 67	
	NS	AS
T400	99,1 %	100 %
K13	98,3 %	98 %
K7-2	98,3 %	98 %
T24	98 %	98 %
K9	98 %	98 %
K7-1	98 %	98 %
T13	97,8 %	98 %
LK-4	95,6 %	96 %
Pferd	85 %	85 %

Die ORFs der IL-10-Gene der verschiedenen EHV-2-Isolate und des Pferdes sowie die zugehörigen Proteine wurden in einem Alignment verglichen und daraus die prozentualen Übereinstimmungen mit dem IL-10 des EHV-2-Stammes 86 / 67 ermittelt.

Der Referenzstamm T400 entsprach diesem zu 99,1 % auf der NS- und zu 100 % auf der AS-Ebene, während die EHV-2-Feldisolate auf der NS-Ebene eine 97,8 bis 98,3 %ige und auf der AS-Ebene eine 98 %ige Homologie aufwiesen. Die IL-10-Sequenz des Referenzstammes LK-4 zeigte mit 95,6 bzw. 96 % eine deutlicher ausgeprägte Abweichung vom Stamm 86 / 67. Zur NS-Sequenz des gespleißten Genprodukts des eIL-10 sowie zur AS-Sequenz des entsprechenden Proteins bestand jeweils eine 85 %ige Homologie.

Die NS- und AS-Sequenzen der IL-10 Gene der untersuchten EHV-2-Isolate und -Referenzstämme wiesen demnach eine hohe prozentuale Übereinstimmung untereinander und zum IL-10-Gen des Pferdes auf. Zur Lokalisierung übereinstimmender und differierender Sequenzabschnitte wurde anschließend ein Aminosäuresequenzalignment durchgeführt.

4.3.3 Aminosäuresequenzalignment verschiedener vIL-10- und cIL-10-Proteine

Um die IL-10-Proteine der verschiedenen EHV-2-Isolate sowie der ausgewählten Viren und der entsprechenden Wirte detailliert vergleichen zu können, wurde ein AS-Sequenzalignment

erstellt. Dadurch sollten Positionen mit besonders ausgeprägten Unterschieden bzw. Übereinstimmungen aufgezeigt und auf eine mögliche funktionelle Bedeutung überprüft werden. Für die Untersuchungen wurden die NS-Sequenzen der verschiedenen IL-10-ORFs mit Hilfe des Computerprogramms MacVector in die entsprechenden AS-Sequenzen translatiert und anschließend in einem Clustal W Alignment verglichen. Da sie sich in ihrer Länge unterscheiden, entspricht die Nummerierung der einzelnen AS im hier dargestellten Alignment (Bild 17) nicht den Nummerierungen, die für das jeweilige Protein in der Literatur zu finden sind. Die Positionsangaben im Text beziehen sich immer auf das Bild 17.

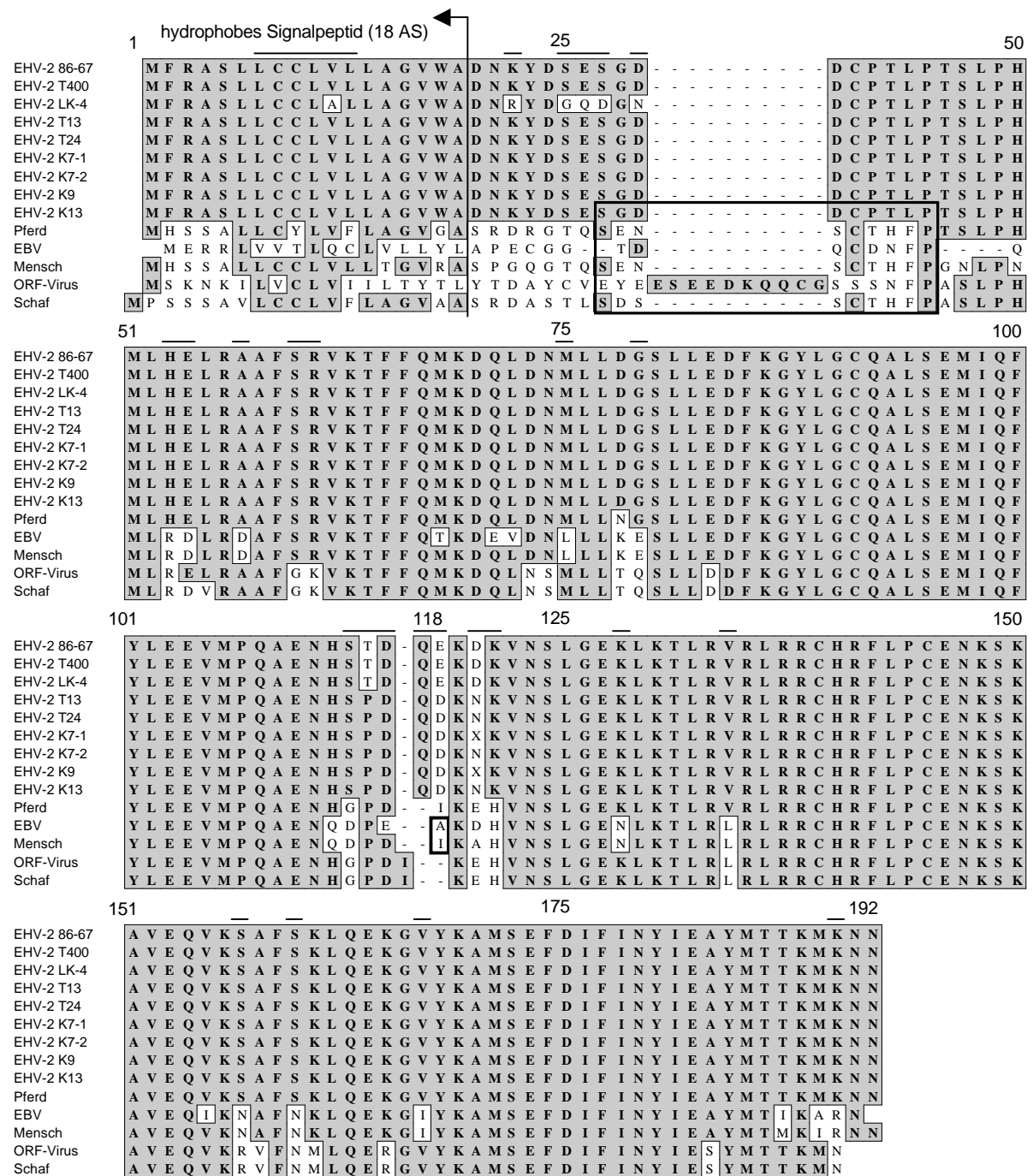
Aus dem in Bild 17 dargestellten Alignment geht hervor, dass sich die AS-Sequenzen der verschiedenen EHV-2-Isolate nur in wenigen Positionen unterscheiden. Während die Isolate von Kershaw et al. (2001) identisch sind, weichen die Referenzstämme T400 und 86 / 67 lediglich in den Positionen 114, 118 und 120 von diesen ab. Der Referenzstamm LK-4 weist an mehreren Positionen des N-Terminus zusätzliche Differenzen auf (AS 12, 22, 25, 26, 27 und 29). Der Vergleich der EHV-2-IL-10-Sequenzen mit dem eIL-10 ergab, dass diese sich im zentralen und C-terminalen Bereich (etwa ab AS 51) nur an 6 bzw. 7 Positionen unterscheiden (AS 78, 113, 114, 117, 118, 120 und 121). Die ausgeprägte Heterogenität im Bereich der N-Termini (etwa bis AS 50) zwischen den AS-Sequenzen der IL-10-Proteine von Mensch, Schaf, EBV, Orf-Virus und EHV-2 ist aus der Literatur bekannt (Moore et al., 1990; Vieira et al., 1991; Rode et al., 1993; Fleming et al., 1997), allerdings weisen die EHV-2-Sequenzen im Bereich des möglichen hydrophoben Signalpeptids (AS 1-18) weniger ausgeprägte Differenzen zur Sequenz des Pferdes auf, als die entsprechenden Abschnitte des EBV-IL-10 zum hIL-10. Beim Vergleich der EHV-2- und EBV-Sequenzen fällt weiterhin auf, dass zahlreiche Positionen, an denen sie sich unterscheiden dadurch gekennzeichnet sind, dass die AS-Sequenz des jeweiligen Virus mit der Sequenz des entsprechenden Wirtes übereinstimmt (AS 53, 54, 57, 60, 61, 75, 79, 112, 121, 128, 134, 157, 160, 167 und 191).

Das besondere Augenmerk wurde auf die Position 118, welche der Position 87 des EBV-IL-10 in der Arbeit von Ding et al. (2000) entspricht, gerichtet, an der das hIL-10 die AS Isoleucin (I) und das EBV-IL-10 die AS Alanin (A) besitzt, da diese Aminosäuresubstitution für die Wirkungsunterschiede beider Proteine verantwortlich gemacht wird (Ding et al., 2000). Das eIL-10 und das EHV-2-IL-10 weisen an dieser Position ebenfalls Differenzen auf, wobei das eIL-10 hier wie das humane ein Isoleucin besitzt, das EHV-2-IL-10 jedoch Asparagin- (D) bzw. Glutaminsäure (E). Außerdem ist dies neben AS 120 die einzige Position (nach AS 50) an der sich sowohl EBV als auch EHV-2 vom IL-10 ihres Wirtes unterscheiden. Die IL-10-Proteine von Schaf und Orf-Virus weisen in der Position 118 keine Differenzen auf, sie besitzen dort beide ein Isoleucin. Auch in dem von Gesser et al. (1997) beschriebenen, als IT9403 bezeichneten Nonapeptid am Amino-terminus, unterscheidet sich das EHV-2-IL-10 wie das EBV-IL-10 von seinem Wirt (Bild 17),

während das hIL-10 und das eIL-10 in diesem Bereich identisch sind. Dieses Nonapeptid soll ebenfalls für die Wirkungsunterschiede zwischen dem EBV-IL-10 und hIL-10 verantwortlich sein (Gesser et al., 1997).

Bild 17 Alignment der AS-Sequenzen verschiedener vIL-10- und cIL-10-Proteine

Die AS-Sequenzen der ORFs der verschiedenen vIL-10- und cIL-10-Proteine wurden mit Hilfe des Computerprogramms MacVector in einem Clustal W Alignment untersucht. Übereinstimmungen wurden grau unterlegt und die im Text genannten Positionen durch schwarze Balken gekennzeichnet. Die AS 118 des hIL-10 und des EBV-IL-10 sind durch einen schwarzen Kasten markiert worden. Auf gleiche Weise wurden die AS 27 bis 45, die das von Gesser et al. (1997) beschriebene Nonapeptid IT9403 enthalten, hervorgehoben.

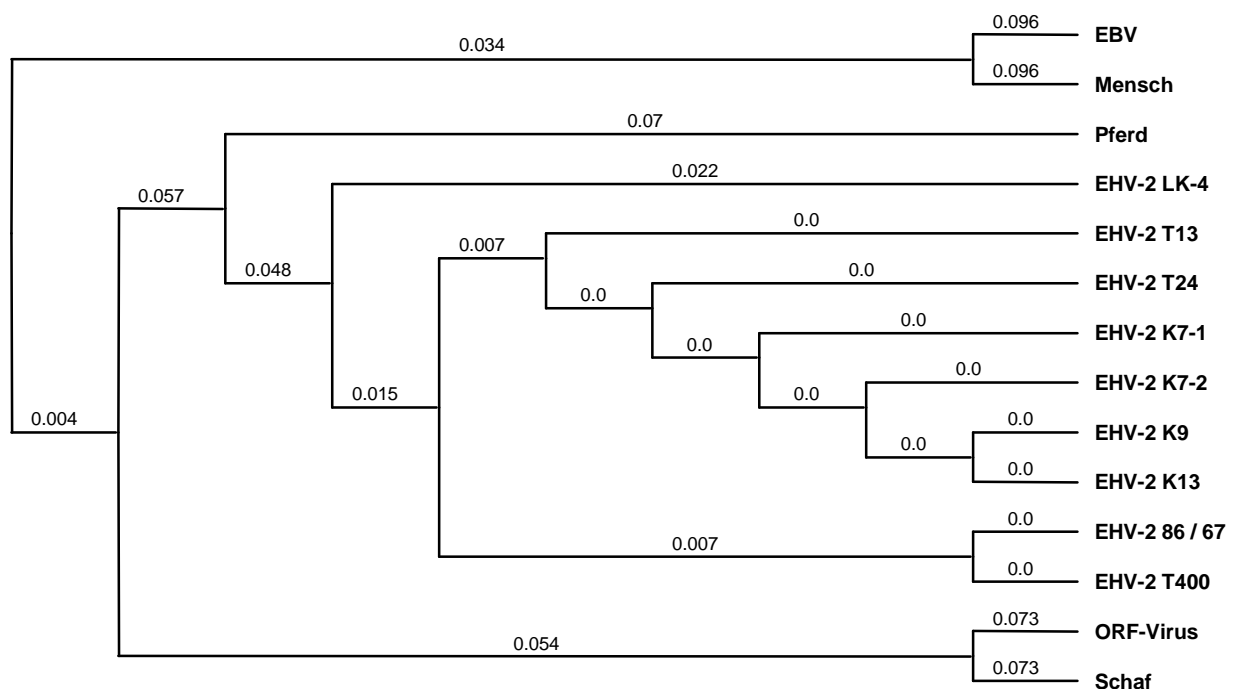


4.3.3 Phylogenetische Untersuchungen verschiedener vIL-10- und cIL-10-Proteine

Um den evolutionären Status und die phylogenetischen Beziehungen der EHV-2-IL-10-Proteine im Vergleich zu bekannten vIL-10- und cIL-10-Proteinen zu ermitteln, wurden die Funktionen des Programms MacVector zur Durchführung phylogenetischer Analysen eingesetzt (siehe 3.13). Bei vergleichbaren Untersuchungen konnte bereits von Rode et al. (1994) und Fleming et al (2000) gezeigt werden, dass das Orf-Virus-IL-10 phylogenetisch eng mit dem IL-10 des Schafes und das EBV-IL-10 mit dem IL-10 des Menschen verwandt ist. Ob zwischen dem EHV-2 und dem eIL-10 ähnliche verwandtschaftliche Beziehungen bestehen, sollte in dieser Arbeit überprüft werden.

Das Ergebnis der Computeranalyse ist als Dendrogramm in Bild 18 zu sehen. Wie aus der Abbildung hervor geht, liegen die IL-10-Proteine des Pferdes und der EHV-2-Isolate evolutionär eng beieinander und lassen sich deutlich von EBV und Mensch bzw. Orf-Virus und Schaf, die jeweils eigene Gruppen ausbilden, abgrenzen.

Bild 18 Phylogenetischer Baum zur Darstellung der Verwandtschaft der IL-10-Proteine der EHV-2-Isolate untereinander und mit anderen viralen und eukaryonten IL-10-Proteinen



Die Erstellung des phylogenetischen Baumes erfolgte mit der UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) Methode im "Best Tree" Modus mit folgenden Einstellungen: tie breaking = systematic; Gaps distributed proportionally; Rectangular cladogram. Distanz: p-Distanzen sind als Zahlenwerte über den Linien dargestellt worden

Obwohl bereits vergleichende Untersuchungen zu verschiedenen zellulären und viralen IL-10-Genen bzw. -Proteinen vorliegen, führte die Einbeziehung der neuen EHV-2-IL-10-Sequenzen und der IL-10-Sequenz des Pferdes zu einigen neuen Erkenntnissen.

So konnte gezeigt werden, dass sich sowohl die NS- als auch die AS-Sequenzen verschiedener EHV-2-Isolate mit Ausnahme des Referenzstammes LK-4 nur geringgradig voneinander unterscheiden und eine Homologie zum eIL-10 von etwa 85 % besteht. Durch das Alignment der AS-Sequenzen konnte weiterhin festgestellt werden, dass Unterschiede der EHV-2-Isolate untereinander nur an 3 Positionen vorkommen (Ausnahme wiederum der Stamm LK-4) und Differenzen zum eIL-10 im zentralen und C-terminalen Bereich des Proteins auf 6 bzw. 7 Positionen beschränkt bleiben.

Der Vergleich der AS-Sequenzen der EHV-2-IL-10-Proteine mit dem EBV-IL-10 ergab, dass diese zwar an zahlreichen Positionen differieren, dann aber oftmals eine Übereinstimmung mit dem jeweiligen Wirts-IL-10 besteht. Besonders hervorzuheben ist die AS 118 in Bild 17 (AS 87 bei Ding et al., 2000). Diese Lokalisation wird für den Funktionsunterschied des EBV und des hIL-10 verantwortlich gemacht (Ding et al., 2000), wobei das hIL-10 hier ein Isoleucin und das EBV-IL-10 ein Alanin besitzt. Das EHV-2-IL-10 unterscheidet sich in dieser Position ebenfalls vom IL-10 seines Wirtes, wobei das eIL-10 hier ebenfalls die AS Isoleucin trägt, die verglichenen EHV-2-Isolate jedoch die AS Glutamin- oder Asparaginsäure.

Schließlich konnte mittels phylogenetischer Analysen gezeigt werden, dass das EHV-2-IL-10 dem eIL-10 evolutionär sehr nahe steht, dieses also wahrscheinlich direkt vom Pferd erworben wurde.