

Klonierung und Charakterisierung eines ecotropen porzinen endogenen Retrovirus der Klasse C (PERV-C)

Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

von
Thomas Preuß
aus Bremen

Frankfurt am Main 2006
(DF 1)

Die vorliegende Arbeit wurde in dem Zeitraum von Januar 2003 bis Dezember 2006 am Paul-Ehrlich-Institut in Langen durchgeführt.

Einige Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht unter dem Titel:

Preuss, T., Fischer, N., Boller, K. and Tönjes, R.R. (2006). Isolation and Characterization of an Infectious Replication-Competent Molecular Clone of Ecotropic Porcine Endogenous Retrovirus Class C. *J. Virol.* 80: 10258-10261.

Dekan: Prof. Dr. Schwalbe

Gutachter. Prof. Dr. Dingermann
PD Dr. Tönjes

Datum der Disputation: 18.04.07

Inhaltsübersicht

Einleitung	1
Retroelemente	1
Retroviren	2
Porzine endogene Retroviren (PERV)	8
Rekombination von Retroviren	9
Xenotransplantation	13
Die Rolle von PERV in der Xenotransplantation	17
Zielsetzung der Arbeit	19
Material und Methoden	20
Organismen	20
Kulturbedingungen der Bakterienstämme	21
Zellkultur	22
Molekularbiologische Methoden	26
Proteinbiochemische Methoden	35
Ergebnisse	40
Klonierung und Charakterisierung eines replikationskompetenten ecotropen porzinen endogenen Retrovirus (PERV)	40
Rekombinationsversuche zwischen PERV-B(33)/ATG und PERV-C(1312)	53
Immunologische Detektion von PERV	60
Diskussion	72
Molekulare Charakterisierung replikationskompetenter PERV	72
Immunologische Detektion von PERV-C	77
Rekombination von endogenen Retroviren	81
Zusammenfassung	85
Literaturverzeichnis	86
Abkürzungsverzeichnis	104
Anhang	106

Inhaltsverzeichnis	I-V
1. Einleitung	1
1.1 Retroelemente	1
1.2 Retroviren	2
1.2.1 Klassifikation der Retroviren	6
1.2.2 Endogene Retroviren	8
1.3 Porzine endogene Retroviren (PERV)	8
1.4 Rekombination von Retroviren	9
1.5 Xenotransplantation	13
1.5.1 Geschichte der Xenotransplantation	14
1.5.2 Immunologische Barrieren	15
1.6 Die Rolle von PERV in der Xenotransplantation	17
1.7 Zielsetzung der Arbeit	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Organismen	20
2.1.1 Bakterienstämme	20
2.1.2 Insektenzelllinien	20
2.1.3 Säugerzellen	21
2.2 Kulturbedingungen der Bakterienstämme	21
2.2.1 Kulturmedien	21
2.2.2 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	21
2.3 Zellkultur	22
2.3.1 Kultivierung von Insektenzellen	22
2.3.2 Kultivierung von Säugerzellen	22

2.3.3 Einfrieren von Säugerzellen und Insektenzellen	22
2.3.4 Transfektion und Infektion von Zellen	23
2.3.4.1 Transfektion von Säugerzellen	23
2.3.4.2 Transfektion von Insektenzellen zur Herstellung rekombinanter Baculoviren	23
2.3.4.3 Infektion von Insektenzellen	23
2.3.4.4 Infektion von Säugerzellen	24
2.3.4.5 Infektion von Insektenzellen zur präparativen Proteinexpression	24
2.3.5 Plaque Assay zur Titration des Virusstocks	24
2.3.6 Aufreinigung von Viruspartikeln	25
2.3.7 Aktivitätsbestimmung der reversen Transkriptase (RT-Test)	25
2.4 Molekularbiologische Methoden	26
2.4.1 Isolierung von Nukleinsäuren	26
2.4.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus Zellen	26
2.4.1.2 Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien	26
2.4.1.2.1 Minipräparation durch alkalische Lyse	26
2.4.1.2.2 Midipräparation	27
2.4.1.3 Isolation von λ -Phagen DNA	27
2.4.1.4 Isolierung von Gesamt RNA aus Zellen	27
2.4.2 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäuren	28
2.4.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	28
2.4.3.1 Verwendete Primer	29
2.4.4 Agarosegelelektrophorese	30
2.4.5 DNA Aufreinigung aus Agarosegelen	30
2.4.6 Anlegen einer λ -Phagenbank aus der Zelllinie MAX-T	30
2.4.7 Durchmusterung einer Phagenbibliothek	31
2.4.8 Auffüllreaktion von überhängenden Restriktionsschnittstellen	32
2.4.9 Dephosphorylierung von DNA	32
2.4.10 Ligation	32
2.4.11 T/A-Klonierung von PCR-Amplifikaten	32
2.4.12 Transformation von Bakterien	33
2.4.13 Sequenzierung von DNA	33
2.4.14 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren durch Random	33

Prime Labelling	
2.4.15 Transfer von Nukleinsäuren	34
2.4.16 Hybridisierung mit DNA Fragment Sonden	34
2.4.17 PERV Fragment Sonde	35
2.4.18 Datenbank Nummern	35
2.5 Proteinbiochemische Methoden	35
2.5.1 Herstellung von Zelllysaten	35
2.5.2 Proteingelektrophorese	35
2.5.3 Western Blotting	36
2.5.4 Enhanced chemiluminescence (ECL).Verfahren	37
2.5.5 Induktion der Proteinexpression	37
2.5.6 Aufreinigung rekombinanter Proteine	37
2.5.7 Enzymgekoppelter Immuntest (ELISA)	38
2.5.8 Herstellung eines synthetischen Peptids	38
2.5.9 Immunisierung von Kaninchen mit einem synthetischen Peptid	39
2.5.10 Indirekte Immunfluoreszenzen	39
3 Ergebnisse	40
3.1 Klonierung und Charakterisierung eines replikationskompetenten ecotropen porzinen endogenen Retrovirus (PERV)	40
3.1.1 Klonierung einer PERV-C spezifischen Sonde	40
3.1.2 Southern Blot zur Häufigkeitsanalyse von PERV-C Sequenzen in genomischer DNA verschiedener Zellen	41
3.1.3 RT-Nachweis von PERV auf zellfreiem Überstand	42
3.1.4 Durchmusterung einer MAX-T- λ -Phagenbibliothek	43
3.1.5 Analyse der PERV Sequenzen	44
3.1.6 Struktur und Aufbau der PERV Long Terminal Repeats (LTR)	47
3.1.7 Nachweis von PERV-C RNA in infizierten Zellen	49
3.1.8 Morphologie von PERV Partikeln	50

3.1.9	Nachweis von RT-Aktivität im Überstand nach Infektion durch den Molekularklon PERV-C(1312)	51
3.1.10	Integrationsnachweis des retroviralen Molekularklons PERV-C(1312)	53
3.2	Rekombinationsversuche zwischen PERV-B(33)/ATG und PERV-C(1312)	53
3.3	Immunologische Detektion von PERV	60
3.3.1	Generierung eines spezifischen Antiserums gerichtet gegen das Hüllprotein von PERV-C	60
3.3.2	Analyse zur Funktionalität des Antiserums mittels ELISA	60
3.3.3	Nachweis des Env-C Proteins in Zelllysaten mit dem Antiserum Anti gp70_c1	63
3.3.4	Nachweis des Env-C Proteins auf Viruspartikeln mit dem Antiserum Anti gp70_c1 und dem monoklonalen Antikörper Anti Env-C	64
3.3.5	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse unter Verwendung des Antiserums Anti gp70_c1	66
3.3.6	Expression rekombinanter PERV Proteine	67
3.3.6.1	Klonierung eines prokaryotischen Expressionsvektors	67
3.3.6.2	Klonierung eines eukaryotischen Expressionsvektors	68
3.3.6.3	Generierung und Analyse rekombinanter Bacmid-DNA	69
3.3.6.4	Nachweis von rekombinant exprimierten PERV-C Proteinen in Insektenzellen	70
4	Diskussion	72
4.1	Molekulare Charakterisierung replikationskompetenter PERV	72
4.2	Immunologische Detektion von PERV-C	77
4.2.1	Env-C spezifische Antikörper	77
4.2.2	Expression von rekombinantem Env-C Protein	80

4.3	Rekombination von endogenen Retroviren	81
5	Zusammenfassung	85
6	Literaturverzeichnis	86
7	Abkürzungsverzeichnis	104
8	Anhang	106

1 Einleitung

1.1 Retroelemente

Im Genom aller Eukaryoten befinden sich eine Vielzahl von DNA-Sequenzen, die transponierbare mobile Elemente darstellen, die RNA-Intermediate zur Replikation nutzen (Wilkinson et al., 1994). Diese Retroelemente besitzen genstrukturelle und sequenzspezifische Übereinstimmungen zu exogenen infektiösen Retroviren. Außerdem können sie auch Integrationsprodukte aufgrund von revers transkribierter zellulärer mRNA darstellen (Brosius, 1991; Boeke and Stoye, 1997). Ein Merkmal dieser Retroelemente ist also ihre vorangehende Umschreibung von RNA zu DNA durch reverse Transkription (Löwer et al., 1996). Das humane Genom besteht nach Schätzungen zu acht Prozent aus Retroelementen (Baltimore, 1985; Zhang et al., 2003), die hinsichtlich ihrer Komplexität Unterschiede aufweisen (Abb. 1.1) und aufgrund ihrer strukturellen Merkmale wie folgt klassifiziert werden können (Löwer et al., 1996; Andersson et al., 1998):

1. Pseudogene: Sind Sequenzen prozessierter, zellulärer Gene, die revers transkribiert und anschließend in das Genom reintegriert wurden. Diese Bereiche sind transkriptionell inaktiv, da ihnen Promotorelemente fehlen.
2. Retrogene sind Sequenzen von Pseudogenen, die zusätzlich einen zellulären Promotor besitzen und somit einer aktiven Transkription unterliegen. Zu den Retrogenen gehören die SINEs (short interspersed nuclear elements) mit einer Länge zwischen 90-300 Basenpaaren. Bei diesen hoch repetitiven Sequenzen sind die *Alu*-Elemente wichtige Vertreter (Deininger and Batzinger, 1993; Smit and Riggs, 1995; Li et al., 2001).
3. Zu den Retroposons gehören die LINEs (long interspersed nuclear elements). Diese Sequenzen sind mit bis zu 6 Kilobasen (kb) deutlich größer als die SINEs und besitzen einen internen RNA-Polymerase-II-Promotor (Swergold, 1990), kodieren für zwei offene Leserahmen (ORF) (Dombroski et al., 1991) und sind am 3`Ende polyadenyliert (Boeke and Stoye, 1997). Der erste offene Leserahmen kodiert für ein RNA-bindendes Protein, das entweder ein Leucin-Zipper- oder Zinkfinger-Motiv besitzt (Covey, 1986; Holmes et al., 1992). Das Genprodukt des zweiten offenen Leserahmens ist eine Reverse Transkriptase (RT) (Ivanov et al., 1991) und ist somit adäquat zum *pol*-Gen der Retrotransposons und Retroviren. Es wird vermutet, dass die von Retrotransposons *in trans* bereitgestellte Transkriptionsmaschinerie von den Pseudogenen und SINEs genutzt wird (Weiner, 2000).

4. Retrotransposons gleichen den Retroviren mit der Ausnahme, dass ihnen das *envelope*-Gen (*env*-Gen) fehlt und sie somit wie die SINES, LINES und Retrotransposons nicht infektiös sind. Entsprechend der Retroviren enthalten die Retrotransposons die Long Terminal Repeats (LTRs) eine Primer Bindestelle (PBS), einen Polypurin Trakt (PPT) für die Umschreibung von RNA in DNA, sowie das Verpackungssignal (Ψ „psi-site“), welches für die Verpackung der viralen RNA in die Viruspartikel verantwortlich ist (Löwer et al., 1996).

5. Retroviren, die eine eigene Klasse der Retroelemente darstellen (siehe 1.2).

Die Abb. 1.1 zeigt eine Zusammenstellung der Retroelemente.

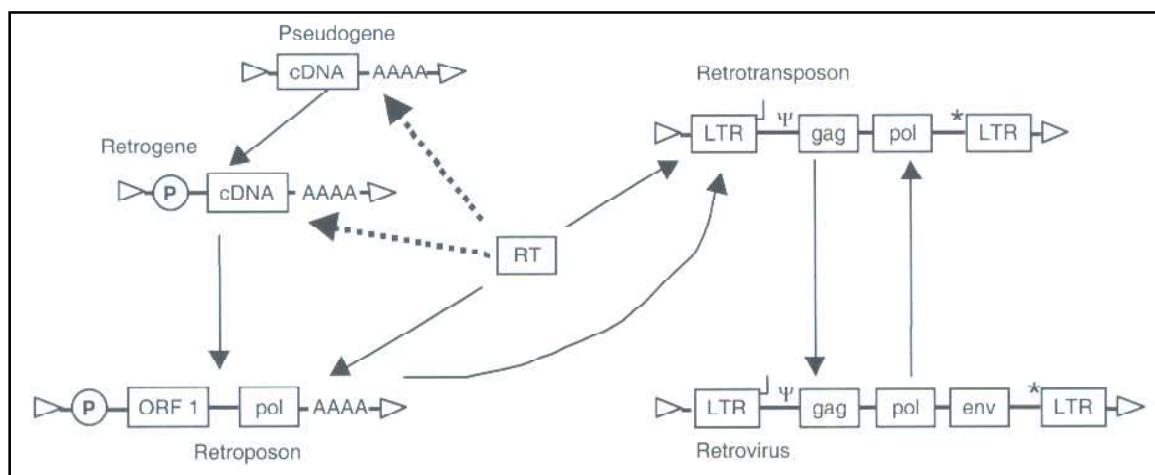


Abb. 1.1 Klassifizierung von Retroelementen.

Schematische Darstellung von Retroelementen. Die gestrichelten Pfeile stehen für die Bildung von Retroelementen durch reverse Transkription, die durchgezogenen Pfeile für die Rekombination und den Neuerwerb von Retroelementen. LTR, Long Terminal Repeat; *gag*, Kapsidprotein-Gen; *pol*, Polymerase-Gen, das für die RT kodiert; *RNaseH*, kodiert für Intergrase und andere Enzyme; *env*, Hüllprotein-Gen; RT, Reverse Transkriptase-Gen; Ψ , retrovirales Verpackungssignal; *, Polypurin Trakt; PBS, Primer Bindestelle; P, Promotor; AAAA, poly(A)-Schwanz (aus Löwer et al., 1996).

1.2 Retroviren

Retroviren stellen die komplexesten Vertreter unter den Retroelementen dar. Das Genom hat eine Größe von 7-12 kb und besteht aus zwei RNA-Molekülen. Zusätzlich zum *gag*- und *pol*-Gen kodieren die Retroviren mit dem *env*-Gen (Envelope) für ein Hüllprotein (Abb. 1.2). Dieses Protein interagiert mit dem Rezeptor der Zielzelle und ermöglicht somit den Eintritt des Virions in die Wirtszelle (Löwer et al., 1996). Dadurch sind Retroviren in der

Lage infektiöse Partikel zu bilden. Die Genomstruktur, die sich aus 5`LTR-*gag-pro-pol-env*-3`LTR zusammensetzt, ist bei den einfachen Retroviren gleich (Abb. 1.2) (Coffin et al., 1997). Komplexere Viren, wie z.B. das humane Immundefizienz-Virus (HIV) oder das humane T-lymphotrope Virus (HTLV) besitzen zusätzliche Gene, die für regulatorische und akzessorische Proteine kodieren (Coffin et al., 1997). Die drei Gene der einfachen Retroviren werden im proviralen Zustand von zwei LTRs flankiert, in der 5` LTR befinden sich die viralen Promotorsequenzen. Die LTR ist in drei Teile strukturiert, U3, R und U5 Region, wobei die *cis*-aktiven Kontrollelemente in der U3-Region lokalisiert sind (Abb. 1.2) (Rabson and Graves, 1997). Durch die Bindung von zellulären Transkriptionsfaktoren an U3 erfolgt zusätzlich eine transkriptionelle Regulation der Retroviren (Coffin et al., 1997, Rabson and Graves, 1997). Vier grundlegende Eigenschaften sind charakteristisch für Retroviren:

1. Sie besitzen ein diploides Genom.
2. Die Synthese und Prozessierung erfolgt durch die zelleigene Transkriptionsmaschinerie.
3. Die Assoziation des Genoms erfolgt mit zelleigener tRNA an die Primer Bindestelle.
4. Retroviren besitzen ein (+)-Strang RNA-Genom, welches nach der Infektion nicht direkt zur Proteinsynthese verwendet wird.

Die Abb. 1.2 zeigt schematisch die Genomstruktur der viralen Gene mit den dazugehörigen Proteinen und den Aufbau eines Viruspartikels.

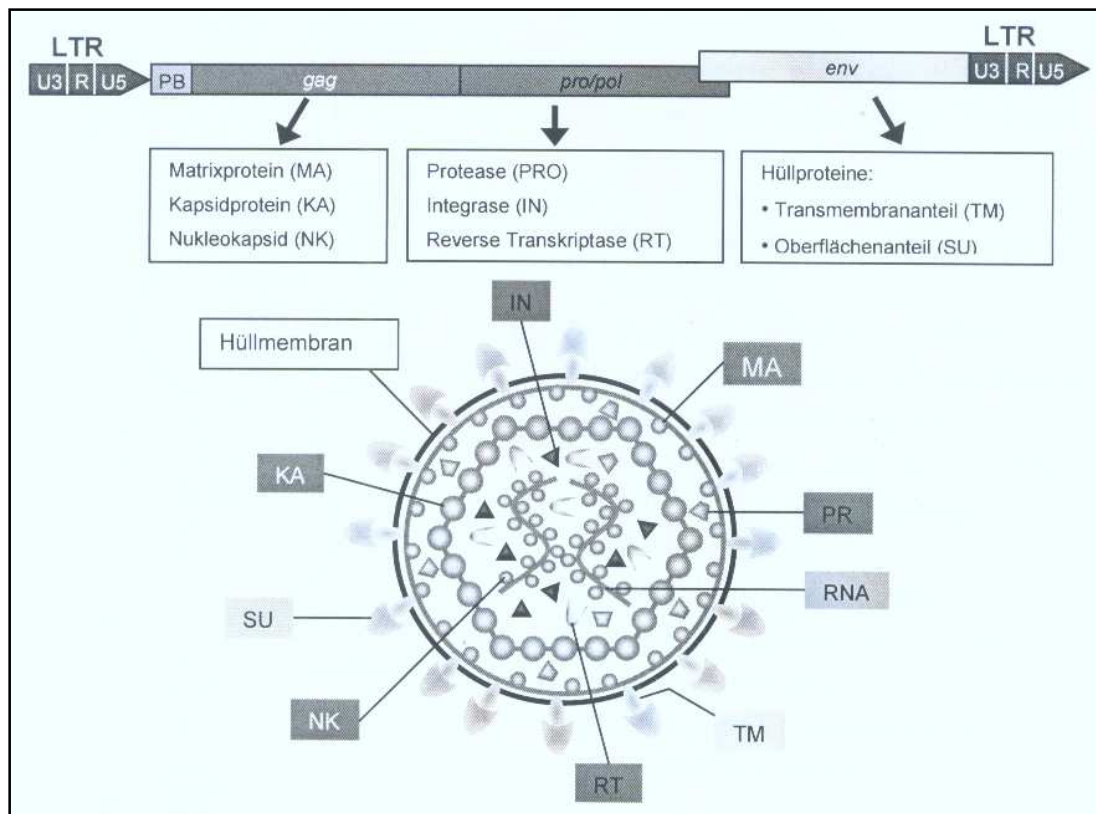


Abb. 1.2: Genomische Struktur eines Provirus und struktureller Aufbau eines Virions. Die Genprodukte, die im Virion dargestellt sind, sind in der Abbildung der Genstruktur entsprechend in der Schriftfarbe und Kastenfarbe dargestellt. Das RNA-Genom ist im Virion mit dem Nukleokapsid assoziiert. Die umschließende Hüllmembran des Virions entstammt der Wirtszelle (verändert nach Vogt, 1997).

Die Viruspartikel sind von einer Doppelmembran umgeben und haben einen Durchmesser von 80-100 nm (Nermut and Hockley, 1996). Die Membran entstammt der Wirtszelle und ist mit viruseigenen Glykoproteinen, den Hüllproteinen (Envelope-Proteinen) besetzt (Nermut and Hockley, 1996). Die Envelope-Proteine sind in der elektronenmikroskopischen Aufnahme in Form von „Spikes“ zu erkennen und formen an der Oberfläche des Virions Oligomere, die zwischen 5 nm (Mason-Pfizer monkey virus, M-PMV) und 10 nm (HIV) lang sind (Gelderblom, 1987; Coffin, 1992; Nermut and Hockley, 1996). An die Membran schließt sich unterhalb die Matrix an, eine mit der Membran assoziierte Schale. Innerhalb dieser Hülle befindet sich der Kern, das Kapsid, welches in zylindrischer, konischer oder ikosaedrischer Form vorliegen kann (Nermut and Hockley, 1996). Es enthält neben den retroviralen Enzymen Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und der Protease (PRO) den Ribonukleoproteinkomplex, der sich aus dem viralen Genom und dem Nukleokapsid zusammensetzt. Der allgemeine Replikationszyklus der Retroviren ist in der Abbildung 1.3 dargestellt. Als erster Schritt erfolgt die Anheftung

des Virions an den zellulären Oberflächenrezeptor der Wirtszelle. Anschließend erfolgt die Verschmelzung der viralen Hüllmembran mit der Zytoplasmamembran der Zielzelle. Dabei wird das Kapsid in das Zytoplasma freigegeben. Dort findet die reverse Transkription der viralen genomischen RNA durch die RT statt. Nach der Transkription integriert die DNA durch die virale Integrase zufällig in das Wirtsgenom und kann als Provirus vertikal weiter vererbt werden. Das Provirus dient als Template für die zelluläre RNA Polymerase II, es erfolgt die Transkription und Synthese der viralen RNA, die zum einen als Template für die Synthese der viralen Proteine fungiert und zum anderen als virales Genom in die Partikel inkorporiert wird. Die Synthese der Hüllproteine erfolgt als Polypeptid, kodiert durch das *env*-Gen. Im endoplasmatischen Retikulum der Wirtszelle erfolgt die proteolytische Spaltung der Polypeptide in den Oberflächenanteil (*surface unit*, SU) und den Transmembranteil (*transmembrane*, TM) (Hunter, 1997). Im Zytoplasma formen sich die Virionen, lagern sich an die Zytoplasmamembran und werden durch Knospung freigesetzt (Modrow und Falke, 1997). Zellen, die mit einem Retrovirus infiziert sind, können nicht mehr durch Viren, die den gleichen Rezeptor benutzen, überinfiziert bzw. superinfiziert werden. Diese Art der Resistenz wird als Interferenz bezeichnet. Diese Zellen sind aber weiterhin empfänglich für eine Infektion mit Retroviren, die einen anderen Rezeptor für den Eintritt in die Wirtszelle benutzen. (Reizer et al., 1994; Saier, 2000).

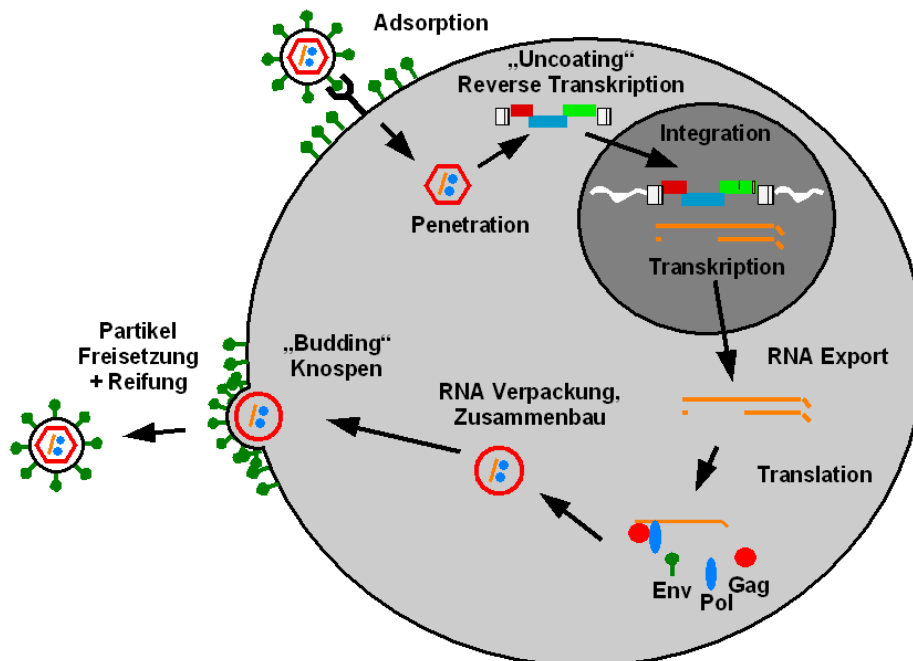


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des retroviralen Replikationszyklus (verändert nach Coffin et al., 1997 und Modrow et al., 1997).

1.2.1 Klassifikation der Retroviren

Retroviren können grob eingeteilt werden in einfache Retroviren, die lediglich die Gene *gag*, *pro/pol* und *env* tragen (z.B. MLV, PERV), und in komplexe Retroviren (z.B. HIV). Letztere besitzen zusätzlich noch weitere Gene (Coffin, 1997).

Eine konventionelle Möglichkeit der Klassifikation der Retroviren ist durch eine elektronenmikroskopische Analyse gegeben. Dabei wird die Klasse der *Retroviridae* aufgrund ihrer Morphologie in vier Typen eingeteilt (Teich, 1984):

A-Typ Viren können intrazellulär nachgewiesen werden und zeigen keine Infektiösität.

B-Typ Partikel bilden intrazytoplasmatische toroidale Strukturen an der Stelle der Knospung und elektronendichte Kerne in reifen Partikeln aus.

C-Typ Viren zählen zu den am meisten isolierten Retroviren. Bis zum Knospen der Viren aus der Wirtszelle ist bei diesem Typ keine zytoplasmatische Virusstruktur erkennbar. Die reifen Partikel besitzen einen zentral gelegenen, elektronendichten Kern.

D-Typ Viren zeigen ähnliche Strukturen wie die B-Typ Viren, bei den reifen Partikeln sind die „Spikes“ auf der Oberfläche der Virionen allerdings kürzer.

Die Einteilung der *Retroviridae* in sieben Gattungen durch das „*International Committee on Taxonomy of Viruses*“ (ICTV) ist in Tabelle 1.1 dargestellt.

Gattungen		Beispiel für Viren dieser Gattung
Neue Bezeichnung nach ICTV** (von 1998)	Einteilung nach Coffin	
α -Retroviren	Vogel C-Typ Viren	Aviäres Leukosevirus (ALV)
β -Retroviren	Säuger B-Typ Viren D-Typ Viren	Maus Mammary Tumor Virus (MMTV) Mason Pfizer Monkey Virus (MPMV)
γ -Retroviren	- Säuger C-Typ Viren - Reptilien C-Typ Viren - Retikuloendotheliose Viren	Maus-Leukämieviren (MuLV) Viper-Retrovirus Milz-Nekrose Virus (SNV)
δ -Retroviren	BLV- und HTLV Retroviren	T-Zell Leukämievirus 1 und 2 des Menschen (HTLV-1/2) Bovines Leukämievirus (BLV)
ϵ -Retroviren	Fisch	Walauge-Dermal-Sarkoma Virus (WDSV)
Spumaviren	Spumaviren	Affen-Foamyvirus (SFV)
Lentiviren	Lentiviren des Menschen: Lentiviren der Tiere:	Humanes Immundefizienzvirus (HIV) Rinder-Immundefizienzvirus (BIV) Pferde-Immundefizienzvirus (EIAV) Katzen-Immundefizienzvirus (FIV) Affen-Immundefizienzvirus (SIV) Visna/Maedi-Virus der Schafe

** ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses

Tab. 1.1: Klassifikation der *Retroviridae*.

Retroviren sind weit verbreitet und konnten in Mollusken, Fischen, Reptilien, Vögeln und Säugern nachgewiesen werden. Sie können sowohl horizontal (Infektion) als auch vertikal (Keimbahn) übertragen werden. Bei endogenen Retroviren handelt es sich um Vertreter der Retroviren, deren Genom im Wirtsgenom stabil integriert ist (Boeke et al., 1997). Das erste Retrovirus, das aviäre Leukose Virus (ALV), wurde 1908 von Ellermann und Bang aus Hühnern isoliert, die an Leukämie und Lymphomen erkrankt waren (Ellermann and Bang, 1908). 1911 wurde durch Pyton Rous mit dem Rous-Sarcoma-Virus (RSV) das infektiöse Agens isoliert, das bei Hühnern für spontane Sarkome verantwortlich ist (Rous, 1911). In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurden in fast allen Eukaryoten Retroviren entdeckt (Herniou et al., 1998), 1964 wurde die Hypothese der reversen Transkription durch Temin aufgestellt, sechs Jahre später erfolgte die Entdeckung der RT, was somit diese Hypothese bestätigte (Baltimore, 1970).

1.2.2 Endogene Retroviren

Die meisten der endogenen Retroviren enthalten trunkierte Leserahmen oder besitzen Stopmutationen in den verschiedenen Leserahmen. Dies führt dazu, dass die meisten endogenen Retroviren keine viralen Partikel bilden können und in der Regel apathogen für den Wirtsorganismus sind (Coffin et al., 1997). Allerdings werden bei verschiedenen Spezies wie Hühnern, Mäusen und Pavianen infektiöse Partikel durch das Vorhandensein von endogenen Retroviren gebildet (Coffin et al. 1997; Todaro et al., 1976). Im humanen Genom befinden sich endogene retrovirusähnliche Elemente (Benveniste und Todaro, 1974). Zusätzlich ist die Existenz von unterschiedlichen humanen endogenen Retroviren (HERV) im Genom bekannt (Löwer et al., 1996). Für den Wirt hat das Vorhandensein endogener Retroviren verschiedene Konsequenzen. So kann die Expression des Envelope-Proteins eine Schutzfunktion gegenüber einer Infektion durch andere Viren besitzen, indem der Rezeptor durch das Hüllprotein blockiert wird (Boeke and Stoye, 1997), wie dies bei Mäusen gezeigt wurde (Buller et al., 1988; Gardner et al., 1991). Durch eine mögliche Rekombination von exogenen und endogenen Retroviren ist die Möglichkeit gegeben, daß sich neue pathogene Varianten bilden (Yoder et al., 1997). Durch ein Integrationsereignis eines endogenen Retrovirus wäre es möglich, daß es zur Insertionsmutagenese oder zur Aktivierung von Protoonkogenen kommt (Coffin, 1997; Fan, 1990).

1.3 Porzine endogene Retroviren (PERV)

Der erste Nachweis von γ -Retroviren, die als porzine endogene Retroviren (PERV) bezeichnet wurden (Torado et al., 1973), fand in Nierenzellen des Schweins statt (Breese, 1970; Armstrong et al., 1971). Diese Viruspartikel sind in der Lage *in vitro* humane Zellen zu infizieren (Le Tissier et al., 1997; Patience et al., 1997). Es gibt für PERV vier unterschiedliche Klassen (A, B, C und D), die sich in ihrer Sequenz des *env*-Gens unterscheiden (Le Tissier et al., 1997, Akiyoshi et al., 1998, Takeuchi et al., 1998; Patience et al., 2001). Während die Klassen PERV-A und PERV-B polytrope infektiöse Eigenschaften zeigen, ist die Klasse PERV-C ecotrop (Takeuchi et al., 1998). Von PERV-D sind lediglich 275 Nukleotide der *env*-Sequenz bekannt (Patience et al., 2001). In jüngster Vergangenheit wurden verschiedene Proviren der Klasse A und B isoliert und näher charakterisiert (Czuderna et al., 2000). Dabei konnten im Genom des Schweins der

Weißer Landrasse sechs intakte Proviren der Klasse A und B isoliert werden (Krach et al., 2001; Niebert et al., 2002, Niebert et al., 2003). 2001 wurde eine neue Nomenklatur vorgeschlagen, die γ -Retroviren PERV-A, PERV-B und PERV-C werden dabei in die Gruppe $\gamma 1$ zusammengefasst (Tidona et al., 2001). Bislang schätzt man, dass im Genom des Schweins zwischen 30-50 provirale Kopien von PERV vorkommen (Le Tissier et al., 1997, Akiyoshi et al., 1998). Durch PCR-Analysen der LTRs und in konservierten Regionen des *pol*-Gens konnte festgestellt werden, daß PERV-C evolutionär die jüngste Klasse der PERVs darstellt (Niebert et al., 2005).

1.4 Rekombination von Retroviren

Ein Charakteristikum der Retroviren ist ihre hohe Frequenz der Rekombination (Linial et al., 1984). Bei der retroviralen Replikation konnte ein hohes Ausmaß an genetischer Rekombination beobachtet werden, die nach Koinfektion einer Zelle durch zwei genetisch unterschiedliche Viren stattfand. Dieses Phänomen wurde erstmals bei Vogel-Tumor Viren, später bei Retroviren erkannt (Vogt, 1971) und in der Folge auch bei anderen Retroviren (Clavel et al., 1989; Wyke et al., 1975). Aufgrund der steigenden Zahl an sequenzierten HIV-Genomen wurde deutlich, daß die Rekombination in der Forschung an Retroviren eine wichtige Rolle darstellt. Mindestens 10 % der infektiösen Stämme von HIV entstanden durch Rekombination zwischen unterschiedlichen viralen Subtypen (McCutchan, 2000; Peeters et al., 2000; Sharp et al., 1999). In der Maus konnte gezeigt werden, daß die Rekombination zwischen endogenen Retroviren zur Generierung von pathogenen Virusstämmen führt (Stoye et al., 1991). Die meistens Rekombinationsereignisse, die stattfinden, sind homologe Rekombinationen. Diese Art der Rekombination findet in der höchsten Frequenz, als Basis für ein genetisches Rearrangement, in Retroviren statt (Tab. 1.2). Die Frequenz ist mindestens so hoch wie das kumulative Erscheinen aller anderer genomischen Arrangements (Tab. 1.2). Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß die Rekombination in homologen Bereichen nur zwischen einigen Nukleotiden eintritt, dies führt zur „nicht-homologen Rekombination“ (Cheslock et al., 2000, Zhang et al., 1994). Obwohl diese Art der Rekombination 100- bis 1000-fach weniger effizient ist (Zhang et al., 2000) als die homologe Rekombination *in vivo*, ermöglicht sie eine großflächige Art eines genetischen Arrangements. Die nicht-homologe Rekombination fand zu vielen Zeitpunkten während der retroviralen Evolution statt (Goldfarb et al., 1981; Swain et al., 1992; Swanstrom et al., 1983).

Virus	Rekombinationsfrequenz	Kumulative Frequenz von Punktmutationen und anderen genomischen Aberrationen pro Nukleotid und Infektionszyklus
SNV	4×10^{-5}	$1,2 \times 10^{-5}$
MLV	$4,7 \times 10^{-5}$	
MoMLV		3×10^{-5}
HIV	$2,4 \times 10^{-4}$	3×10^{-5}
BLV		5×10^{-6}

Tab. 1.2: *In Vivo* Schätzungen der Frequenz von Erscheinungen verschiedener genomischer Modifikationen in Retroviren. SNV, Milz Nekrose Virus; MLV, Murines Leukämie Virus; MoMLV, Moloney Murines Leukämie Virus; HIV; Human Immundefizienz Virus; BLV, Rinder Leukämie Virus (nach Negroni et al., 2001).

Für eine Rekombination zwischen retroviralen Genomen wird mindestens ein Zyklus einer viralen Replikation benötigt, in dem jeder der parentalen RNA-Genome in das gleiche Virion verpackt wird und somit ein heterozygoter Partikel erzeugt wird (Hunter, 1978; Linial et al., 1982). In der Theorie existieren zwei verschiedene Modelle der Rekombination für Retroviren, das „Forced Copy-Choice“ Modell (Abb. 1.4) und das „Strand Assimilation“ Modell (Abb. 1.5).

Das „Forced Copy-Choice“-Modell wurde durch Coffin (1979; 1990) beschrieben und schlägt vor, daß die rekombinante retrovirale DNA durch Matrizenwechsel auf der viralen RNA während der Minusstrang DNA-Synthese stattfindet. Dieses Modell wurde formuliert, um die Existenz bzw. das Überleben der Retroviren trotz zahlreicher Brüche während der Virion RNA-Erstellung zu erklären. Bei diesem Modell besteht die Möglichkeit, dass der synthetisierte DNA-Strang aufgrund des Matrizenwechsel an verschiedenen RNA Brüchen durch einzelne RNA-Fragmentmatrizen entsteht. Somit entsteht bei diesem Modell durch ein Virus mit zwei unterschiedlichen RNA-Genomen nur ein DNA-Provirus (Hu et al., 1990; Panganiban et al., 1988). Die RT springt von einem RNA- zum anderen RNA-Molekül. Dies geschieht in dem homologen Bereich der R-Region. Es wird postuliert, dass während des Sprungs der RT die RNaseH-Aktivität der RT die Ribonukleotide des DNA-RNA Hybrids entfernt. Dies findet statt, um zu verhindern, daß homologe Bereiche des zweiten RNA-Strangs als Matrize fungieren, um somit eine wiederholte Bindung auf der DNA zu ermöglichen, um dadurch die homologe Rekombination zu fördern (Coffin, 1979).

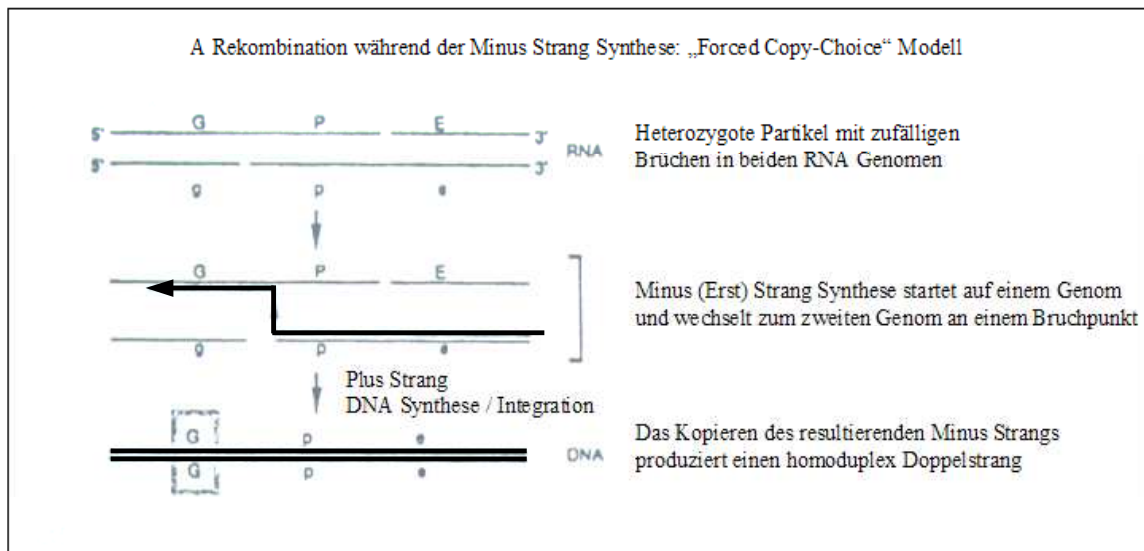


Abb. 1.4: „Forced Copy-Choice“ Modell. RNA, Schwach ausgeprägte Linien; DNA, stärker ausgeprägte Linien. Die Pfeile deuten die Richtung der DNA-Synthese an. Die umrandeten Boxen heben die Region der Rekombination hervor. RNA-Brüche sind als Lücken zwischen den Strängen dargestellt. *gag*-Gen, G/g; *pol*-Gen, P/p; *env*-Gen, E/e (nach Katz et al., 1990).

Bei dem „Strand Assimilation“ Modell wird davon ausgegangen, daß die Rekombination durch einen Austausch bei der viralen Plus-Strang-DNA stattfindet. Dieses Modell wurde vorgeschlagen, um den Ursprung der kombinierten viralen DNA Moleküle in ihrer „H“-Struktur, die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen nach Auflösen der Virionen als Voraussetzung für die Reverse Transkription beobachtet wurde, zu erklären. Bei der Bildung der kombinierten Doppelstrang DNA wird davon ausgegangen, daß durch die Strangablösung-Synthese, hervorgerufen durch die RT, die Generierung von freien Plus-Strang-Enden gefördert wird (Junghans et al., 1982a). Dieses Modell stimmt mit etlichen biochemischen Eigenschaften der retroviralen Replikation überein (Junghans et al., 1982a; Junghans et al., 1982b). Der DNA Minus-Strang startet an einem einzigartigem Primer (tRNA) und ist kontinuierlich. Die interne Plus-Strang-DNA-Synthese startet an mehreren Stellen auf dem DNA Minus-Strang, der als Matrize fungiert, durch RNA Primer, die sich durch den Abbau des genomischen RNA Plus-Strangs durch die RNaseH gebildet haben. Die neu synthetisierten DNA Plus-Stränge sind kurz und unvollständig, es sind noch einzelne Lücken vorhanden, die anschließend bei der Plus-Strang-Synthese aufgefüllt werden. Vermutlich benötigt die Strangassimilation keine viralen Proteine (Junghans et al., 1982a; Junghans et al., 1982b).

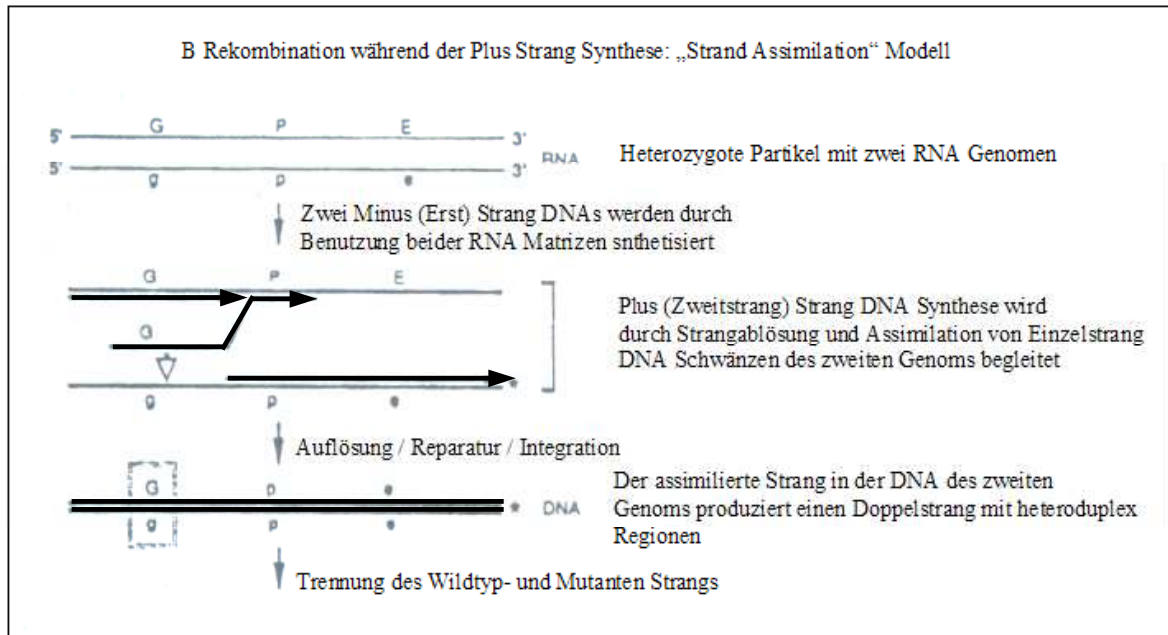


Abb. 1.5: “Strand Assimilation” Modell. RNA, Schwach ausgeprägte Linien; DNA, stärker ausgeprägte Linien. Die Pfeile deuten die Richtung der DNA-Synthese an. Die umrandeten Boxen heben die Region der Rekombination hervor. RNA-Brüche sind als Lücken zwischen den Strängen dargestellt. Der offene Pfeil deutet auf die Strangassimilation. *gag*-Gen, G/g; *pol*-Gen, P/p; *env*-Gen, E/e (nach Katz et al., 1990).

Eine andere Art der Rekombination zwischen Viren ist das phänotypische Mixen. Dies bezieht sich auf die Formation von Virionen, deren Proteine nicht von den enkapsidierten viralen Genom kodiert werden (Závada, 1976). Im Extremfall ist es sogar möglich, dass virale Genome anderer Viren in das enkapsidierte Genom des Virions eingebaut werden. Während des phänotypischen Mixens können Helfer-Viren eine stützende Funktion übernehmen, indem sie ein defektes Virus mit Proteinen unterstützen, um somit eine Replikation und Partikelformation zu ermöglichen. Dies wird als Komplementation bezeichnet (Hannafusa et al., 1970). Aufgrund eines neuartig eingebauten Glykoproteins, transkribiert durch ein unterschiedliches virales Genom in dem enkapsidierten Virion, ist das Virus in der Lage durch eine resultierende Formationsänderung des viralen Partikels einen neuen Wirtstropismus zu erlangen. Das phänotypische Mixen ist bei entfernt verwandten Retroviren auf das Envelope-Glykoprotein beschränkt (Linial et al., 1984). Es gibt viele Beobachtungen des phänotypischen Mixens zwischen endogenen und exogenen Retroviren. So besitzt HIV zum Beispiel die Fähigkeit das Oberflächenglykoprotein des murinen Leukämievirus (MLV) zu benutzen, was zur Folge hat, daß ein Virus gebildet wurde, das zusätzlich zu CD4-positiven Zellen weitere, CD4-negative Zellen infizieren kann (Canivet et al., 1990; Landau et al., 1991).

Durch eine Rekombination von Retroviren können Probleme für den Wirt auftreten. So ist es möglich, dass defekte exogene Retroviren durch Rekombination mit endogenen Retroviren wiederhergestellt werden und somit ihre Replikationskompetenz wieder erhalten (Martinelli et al., 1990). Die Schnelligkeit und Häufigkeit der Rekombination würde wahrscheinlich von der Verwandtschaft der retroviralen Sequenzen abhängen. Ein weiterer wichtiger Aspekt bezüglich der Rekombination von Retroviren entsteht bei der Gentherapie, die auf retroviralen Vektoren basiert. Bei dem Einsatz der Vektoren wäre durch eine mögliche Rekombination mit einem Helfervirus die Wahrscheinlichkeit gegeben, dass sich ein replikationskompetentes Retrovirus bildet. Weiterhin wäre eine Rekombination zwischen dem Vektor und endogenen retroviralen Sequenzen des Patienten denkbar. Im Bezug auf eine Xenotransplantation ist ebenfalls eine Risikoabschätzung in Erwägung zu ziehen, da es zu einer möglichen Rekombination zwischen endogenen Viren, die aus den Spenderorganen freigesetzt werden, mit bereits im Genom vorhandenen endogenen retroviralen Sequenzen des Rezipienten kommen könnte.

1.5 Xenotransplantation

Unter Xenotransplantation (XTx) versteht man die Übertragung von lebenden Zellen, Geweben oder Organen von einem nicht-humanen Spender auf einen Menschen zur therapeutischen Behandlung von Organversagen im Endstadium und anderer Erkrankungen (UNOS, 1995; Taniguchi et al., 1997)

Aufgrund der mangelnden humanen Spenderorgane bekommt die XTx immer weiter eine Bedeutung. Tabelle 1.3 zeigt den Verlauf von Organspenden verschiedener Organe und den tatsächlichen Bedarf in Deutschland (<http://www.organspende.de>).



Tab. 1.3: Zusammenfassung der wichtigsten transplantierten Organe in Deutschland 2004
(www.organspende.de)

1.5.1 Geschichte der Xenotransplantation

Die ersten Versuche der XTx liegen einige hundert Jahre zurück. 1682 soll einem russischen Adligen ein Knochenstück eines Hundes in den Schädel eingesetzt worden sein. Im Jahr 1902 übertrug Ullmann eine Hundeniere auf eine Ziege, stellte aber seine Forschung auf diesem Gebiet ein, nachdem eine gleichartige Übertragung vom Schwein auf eine nierenkranke Frau scheiterte (Nagy, 1999). 1905 wurden durch Princeteau Teile von Kaninchennieren auf ein an Urämie leidendes Mädchen transplantiert. 1907 wurde von Alexis Carrel vorgeschlagen, dass die Bekämpfung von Organfehlern in Zukunft durch „Heterotransplantation“ durchgeführt werden würde (Fishman et al., 2004). 1910 verpflanzte Unger die Niere eines Rhesusaffen. 1923 übertrug Neuhof eine Schafsniere und 1924 transplantierte Avramovici eine Niere einer Katze auf Hunde

(<http://www.organspende-und-transplantation.de/xenotransplantation.htm>). 1964 gelang es erstmals in New Orleans erfolgreich solide Organe zu verpflanzen. Es wurden insgesamt 13 Nieren von Schimpansen transplantiert. Bei dieser XT_x überlebte eine Patientin neun Monate bevor sie an den Nebenwirkungen der Immunsuppression verstarb (Reemstma et al., 1964). 1984 wurde einem als „Baby Fae“ bekannt gewordenen Säugling, der mit einem schweren Herzfehler zur Welt kam, ein Pavianherz transplantiert. Das Kind überlebte mit dem Spenderherz 20 Tage (Bailey et al., 1985). Ein Grund, weshalb Schweine als Donoren für Organe in Betracht gezogen wurden, war das US-Verbot der Verwendung von Primaten als Spender für die XT_x durch die Gesundheitsbehörde (FDA). Ein weiterer Grund war die anatomische und physiologische Ähnlichkeit der Schweineorgane zum Menschen (Sachs, 1994; Cozzi & White 1995; Dorling et al., 1997; Greenstein and Sachs, 1997). In der XT_x werden Studien für die Implantation von fötalem neuronalem Gewebe zur Behandlung von Parkinson- und Huntington-Erkrankungen (Deacon et al., 1997; Fink et al., 2000), die Infusion oder Implantation von (eingekapselten) Inselzellen zur Therapie von Diabetes mellitus (Tibell et al., 1994; Groth et al., 1994; Groth et al., 1998), extrakorporale Leberperfusion (Breimer et al., 1996) und die Perfusion durch oder Implantation von ganzen Leberpräparationen zur Behandlung von Leberversagen (Chari et al., 1994; Cramer, 1995) durchgeführt.

1.5.2 Immunologische Barrieren

Wie bei allen Transplantationen (mit Ausnahme von autologen Transplantationen) besteht auch bei der Xenotransplantation die Problematik der Abstoßung des Spenderorgans. Ursprünglich wurden zwei Arten der Xenotransplantation vorgeschlagen, die konkordante und diskordante XT_x (Calne, 1970). Bei einer hyperakuten Abstoßungsreaktion („hyperacute rejection“, HAR), die nach wenigen Minuten bis einigen Stunden eintritt (Bach et al., 1995), ist das Donor-Rezipienten Paar nicht übereinstimmend. Bei einer Abstoßung des Organs, die länger als 24 Stunden dauert und ähnlich (aber beschleunigt) verläuft wie bei einem Allotransplantat, also ein Transplantat der gleichen Spezies, spricht man einer Übereinstimmung des Donor-Rezipienten Paares. Der größte Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen ist bedingt durch das Vorkommen von präformierten natürlichen Antikörpern (pnAK) des Rezipienten, die gegen Antigene auf den Endothelzellen des Spenderorgans gerichtet sind. Diese Antikörper erkennen die Antigene und lösen die Aktivierung des Komplementsystems aus, was eine hyperakute

Abstoßungsreaktion zur Folge hat. Die pNAK sind in dem Rezipienten bereits ohne Immunisierung durch eine Organtransplantation vorhanden, sie werden als natürliche xenoreaktive Antikörper bezeichnet (Sachs, 1994). Der Grund für die hyperaktive Abstoßungsreaktion ist die Präsenz der xenoreaktiven Antikörper gegen den Zuckerrest Gal α (1-3)Gal (α Gal), der auf den Schweinezellen präsentiert wird. Der HAR folgt eine akute humorale Xenograft-Abstoßung („Acute Humoral Xenograft Rejection“, AHXR), die nach wenigen Tagen bis einigen Wochen auftreten kann und durch die Einbeziehung von Entzündungsmediatoren, Makrophagen und natürlichen Killerzellen vermittelt wird. Diese Stufe der Abstoßung ist bis dato die größte immunologische Barriere bei der XT_x (Bach et al., 1955, Knosalla et al., 2002). Die letzte Stufe ist die chronische Xenograft-Abstoßung, bei der eine durch T-Zellen vermittelte Abstoßung erfolgt (Bach et al., 1995). Zur Zeit wird in der Forschung versucht, die hyperakute Abstoßungsreaktion zu umgehen. Es konnte eine Reduktion des Titers der natürlichen xenoreaktiven Antikörper (Good et al., 1992; Ye et al., 1994) experimentell nachgewiesen werden, jedoch war die Dauer nur temporär (Dorling et al., 1997). Die Inhibierung der Komplementkaskade, die eine Abstoßungsreaktion hervorruft, wäre ein weiterer Ansatz, um den Verbleib des Spenderorgans im Rezipienten zu verlängern bzw. dauerhaft zu machen (Ryan, 1995). Drei wichtige Regulatoren in der Komplementkaskade sind CD55 (hDAF, „human decay-accelerating factor“), CD46 (MCP, „membrane cofactor protein“) und CD59 (MAC-Inhibitor, „inhibitor of membrane attacking complex“). Vor kurzem wurden fötale transgene Schweinezelllinien für alpha 1,3-Galactosyltransferase (GT) und CD55 etabliert (Takahagi et al., 2005). Ebenso ist gelungen Schweine zu züchten, die heterozygot für das alpha-1,3-Galactosyltransferase-Gen (Dai et al., 2002; Lai et al., 2002) und nur noch ein intaktes Allel des oben genannten Gens besitzen. Die Spenderorgane dieser Tiere überleben länger als Organe aus unmodifizierten Schweinen (Fishman et al., 2004). Ein Problem, das bei transgenen Schweinen, die in der Xenotransplantation verwendet werden, auftaucht, ist eine mögliche Tarnung von Pathogenen, die durch die porzinen Zellen in den Rezipienten freigesetzt werden und somit dem Komplementsystem entgehen (Takeuchi et al., 1996; Takeuchi et al., 1997; Weiss, 1998, Magre et al., 2004). Weiterhin bleibt die Frage, wie lange die Funktion des Spenderorgans im humanen Rezipienten andauert (Dorling et al., 1994). Zusammenfassend können einige wichtige Aspekte genannt werden, die, zusätzlich zu der Problematik der Abstoßung der Spenderorgans, eine XT_x erschweren (Fishman et al., 2004):

- Das Spenderorgan kann als Spender dienen für Faktoren, die eine Empfängerabwehr

- umgehen und somit eine Krankheit auf den Rezipienten übertragen können;
- fehlendes Wissen über das Verhalten der Spenderorgane in immunsupprimierten Empfängern;
- unerkannte Krankheitssymptome beim Rezipienten, die durch eine Infektion eines Pathogens aus dem Spenderorgan hervorgerufen wird;
- fehlende klinische Meßmethoden für Organe von nicht humanen Spezies;
- durch mögliche genetische Rekombination oder Mutationen kann es zu neuen Eigenschaften bzw. Verhaltensweisen des Rezipienten kommen;
- eine Donor-Rezipienten Inkompatibilität des MHC („major histocompatibility complex“)-Antigens kann die Immunantwort des Rezipienten auf eine Infektion verzögern bzw. herabsetzen.

1.6 Die Rolle von PERV in der Xenotransplantation

Bei der Xenotransplantation sind die Rezipienten immunsupprimiert, um eine mögliche Abstoßung des Spenderorgans zu unterdrücken. Dadurch entsteht die Möglichkeit, dass Pathogene aus den Zellen des Spenderorgans in den Körper des Rezipienten gelangen und es somit zu einer Infektion kommt (Michaelis et al., 1994; Stoye and Coffin, 1995; Fishman, 1997). Da für eine mögliche Anwendung in der Xenotransplantation das Schwein favorisiert wird, besteht somit die Möglichkeit, dass PERV humane Zellen infiziert, was *in vitro* nachgewiesen wurde (Le Tissier et al., 1997; Patience et al., 1997). Bei Partikeln, die aus einem genetisch modifiziertem Schwein stammen, besteht zusätzlich die Möglichkeit der Tarnung der Viren (Takeuchi et al., 1996), was zu einer Infektion der Rezipientenzellen führen könnte. Bislang konnte allerdings noch kein Krankheitsbild für PERV im Schwein nachgewiesen werden, was somit keine direkten Rückschlüsse auf eine eventuelle Pathogenität beim Menschen in Form einer Trans-Spezies Organübertragung zulässt. So infizieren PERV *in vitro* nicht-humane primäre Primatenzellen, sind aber nicht in der Lage in diesen Zielzellen zu replizieren (Ritzhaupt et al., 2002). Allerdings wirken tierische Retroviren immunsupprimierend (Denner, 1998), was zu einer Sekundärinfektion, hervorgerufen durch einen retroviralen Infekt, führen könnte. In Studien an Patienten, bei denen porcines Gewebe transplantiert wurde bzw. bei Personen, die dauerhaften Kontakt mit Schweineblut hatten, wurden bislang keine Übertragungen von PERV nachgewiesen, in einigen Fällen konnten Mikrochimärismen gezeigt werden (Heneine et al., 1998, Patience et al., 1998, Paradis et al., 1999, Dinsmore et al., 2000). In einem Tiermodell

konnte wiederum nachgewiesen werden, dass PERV in der Lage sind, nach Transplantation von porzinen Inselzellen in NOD/SCID (non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency) Mäuse diese zu infizieren (van der Laan et al., 2000). Allerdings wurde durch einen weiteren Ansatz diese Erkenntnis widerlegt, bei dem porzine Inselzellen in immunsupprimierte Ratten und diabetische Nacktmäuse transplantiert wurden. Per PCR konnte kein Nachweis einer Transmission von PERV in das umliegende Gewebe nach Transplantation der Inselzellen in die verschiedenen Tiere nachgewiesen werden (Goto et al., 2004). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass humane fetale Thymuszellen und Leberzellen, die parallel mit porzinen Knochenmarkszellen in NOD/SCID Mäuse transplantiert wurden, durch PERV infiziert wurden. Dabei konnte in den humanen Zellen das ecotrope PERV-C nachgewiesen werden. Der Grund für die Infektion mit dem nicht-humantropen PERV-C lag an einer Pseudotypisierung mit xenotropen MLV der Maus (Yang et al., 2004). Dieser Ansatz zeigte eine indirekte Infektion von humanen Zellen mit PERV. Bislang konnte keine direkte Infektion von humanen Zellen durch PERV nach Transplantation mit porzinen Zellen oder porzinen Organen im Rezipienten nachgewiesen werden.

Eine Rekombination von endogenen Sequenzen des humanen Empfängers mit porzinen endogenen Sequenzen von PERV konnte bislang noch nicht nachgewiesen werden (Suling et al., 2003). Trotz der Inaktivierung von PERV durch die Komplementaktivierung und dem bislang noch negativen Nachweis einer Rekombination mit humanen endogenen retroviralen Sequenzen des Rezipienten ist eine Zoonose durch eine Infektion mit PERV im Menschen nicht auszuschließen. So wurde kürzlich über Pseudotypisierung nachgewiesen, dass die drei PERV Klassen A, B und C in der Lage sind, humane Zellen und Nagerzellen über einen alternativen Weg zu infizieren (Lavilette and Kabat, 2004).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in drei thematische Schwerpunkte, die gemeinsam unter dem Aspekt der Sicherheitsevaluierung im Rahmen der Xenotransplantation betrachtet werden können. Die drei Teile dieser Arbeit behandeln die Charakterisierung und Evaluierung von PERV-C. Das erste Projekt umfasst die Isolation eines intakten replikationskompetenten PERV-C Provirus, das im Anschluß an die Isolation und Klonierung näher charakterisiert werden soll. Die Analysen umfassen Infektionsstudien von porzinen Zellen, die suszeptibel für PERV-C sind und die Effizienz der Replikationskompetenz in verschiedenen Zelllinien. Außerdem sollen Sequenzvergleiche zwischen dem isolierten PERV-C Molekularklon und bereits publizierten PERV Sequenzen der Klasse A und B durchgeführt werden. Anhand der zusätzlich isolierten genomischen Flanken soll ein Screening-Verfahren für den isolierten PERV-C Molekularklon in verschiedenen Schweinerassen durchgeführt werden, wie es bereits für verschiedene Molekularklone von PERV-A und PERV-B etabliert wurde, um somit ein mögliches Risikopotential, hervorgerufen durch das Vorhandensein dieses PERV-C Provirus bei Spendertieren, für die Xenotransplantation auszuschließen.

Das zweite Projekt befasst sich mit der Charakterisierung von Rekombinationsereignissen zwischen den verschiedenen PERV-Klassen. Eine Rekombinante zwischen PERV-A und PERV-C wurde in der Vergangenheit näher charakterisiert (Wilson et al., 1998). Dieses rekombinante PERV ist in der Lage humane Zellen *in vitro* zu infizieren. Aufgrund der Tatsache, dass der größte Teil der proviralen Sequenz von einem PERV-C Provirus stammt und lediglich die Rezeptor-Binde-Domäne spezifisch für PERV-A ist, soll als Ergänzung in dem zweiten Projekt eine mögliche Rekombination zwischen PERV-B und PERV-C charakterisiert werden.

Das dritte Projekt umfasst die Generierung eines Antiserums und eines monoklonalen Antikörpers, die beide spezifisch gegen das Hüllprotein von PERV-C gerichtet sind. Als positive Kontrolle zur Überprüfung der Funktionalität und Spezifität des Antiserums soll dabei rekombinant exprimiertes Hüllprotein aus Insektenzellen dienen. Durch ein spezifisches Antiserum bzw. Antikörper wäre es möglich sowohl Spendertiere als auch humane Rezipienten von Schweineorganen nach Xenotransplantation hinsichtlich einer PERV-C Expression zu überprüfen.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen

2.1.1 Bakterienstämme

DH5 α : *Escherichia coli* Stamm mit dem Genotyp: F⁻ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 *deoR recA1 endA1hsdR17*(r_K⁻, m_K⁺) *phoA sup E44 λ thi-1 gyrA96 relA1* (Invitrogen).

TOP10F⁻: *Escherichia coli* Stamm mit dem Genotyp: F⁻ {lacI^q, Tn10(Tet^R)} *mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 *deoR recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rspL*(Str^R) *endA1 nupG* (Invitrogen).*

DH10Bac: *Escherichia coli* Stamm mit dem Genotyp: (F⁻ *mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)*) ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 *recA1 endA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK λ -rpsL nupG/bMON14272/pMON7124* (Invitrogen).

XL1-Blue MRA (P2):*Escherichia coli* Stamm mit dem Genotyp: (Δ *mcrA*) 183 Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*) 173 *endA1 sup E44 thi-1 gyrA96 relA1 lac* (P2 lysogen) (Stratagene).

BL21DE3: *Escherichia coli* Stamm, Lysogen des Bakteriophagen DE3. Bei DE3 handelt es sich um ein λ Derivat mit der Immunitätsregion des Phagen 21. Es trägt ein DNA-Fragment mit dem *lacI*-Gen, dem *lac* UV5 Promotor und dem T7 RNA Polymerase Gen (Studier and Moffatt, 1986).

2.1.2 Insektenzelllinien

SF9: Zellen des Ovariums der Puppe des Herbst-Heerwurmes *Spodoptera frugiperda* (Invitrogen).

High FiveTM: Zellen des Ovariums des Nachtfalter *Trichoplusia ni* (Invitrogen).

2.1.3 Säugerzellen

- 293FT: Epitheliale Nierenzellen eines humanen Embryos (*Homo sapiens*). Die Zellen sind Adenovirus-5 transformiert und adhären (Invitrogen).
- 293T: humane Nierenzellen mit einem integrierten SV40T-Antigen (ATCC Nr. CRL 11268)
- 293PERV-PK: 293 Zellen nach Ko-Kultivierung mit porzinen PK15 Zellen (Patience et al. 1997).
- 293PERV-B(33)/ATG: 293 Zellen, die produktiv PERV-B Partikel freisetzen nach Transfektion / Infektion mit dem Moleklarklon pBS-PERV-B(33)/ATG (Czauderna et al. 2000).
- HeLa: Humane epitheliale Carcinoma-Zelllinie aus dem Gebärmutterhals (*Homo sapiens*), adhären Zellen (ECACC Nr. 85060701).
- ST-Iowa: Fibroblastoide Hodenzelllinie eines juvenilen Schweines (*Sus scrofa*), adhären Zellen (ATCC Nr. CRL-1746).
- MAX-T: Porzine Nierenzelllinie eines Minischweins mit dem SLA Haplotyp d/d (Pauly et al., 1995)
- PK15: Epitheliale Nierenzelle eines adulten Schweines (*Sus scrofa*), adhären Zellen (ATCC Nr. CCL-33).
- HT1080: Humane Fibrosarkomzellen, adhären Zellen (ATCC No. CCL-121),

2.2 Kulturbedingungen der Bakterienstämme

2.2.1 Kulturmedien

Die Zusammensetzung der Medien erfolgte in verschiedenen Zusammensetzungen nach Sambrook et al. (1989). Die Festmedien wurden mit 1,5 % Agarose (w/v) versetzt.

2.2.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

E. coli wurde in LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,0; autoklaviert) oder in TB-Medium (12 g/l Trypton, 24 g/l Hefeextrakt, 4 ml Glycerin, 17 mM KH_2PO_4 , 72 mM K_2HPO_4 ; autoklaviert) schüttelnd (200 rpm) bei 37 °C kultiviert. Durch

die Zugabe von Ampicillin (50 µg/µl, Boehringer Mannheim) wurden transformierte Bakterien positiv selektioniert.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Kultivierung von Insektenzellen

Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 27°C im Brutschrank. Die SF9 Zellen wurden in dem SF900IISFM Medium (Gibco) unter Zugabe von 5% Penicillin/Streptomycin kultiviert, die Kultivierung der HighFive Zellen erfolgte in Express Five[®]SFM Medium (Gibco) unter Zusatz von 200mM Glutamin. Die Passagierung der SF9 Zellen erfolgte in der Regel nach 2-3 Tagen, die der High Five Zellen nach 5-6 Tagen. Je nach Haftung an den Flaschenboden wurden die Zellen durch einen Zellschaber mit anschließendem leichtem Schütteln oder durch Abschlagen vom Boden vereinzelt.

2.3.2 Kultivierung von Säugerzellen

Die Kultivierung der Säugerzellen erfolgte in DMEM-Medium unter Zusatz von L-Glutamin (2mM), Penicillin (100 Units/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) (SP) und 10% FKS (Gibco). Die Zellen wurden in der Regel 1-2 mal pro Woche im Verhältnis 1:3 durch Zugabe von 4 ml 2,5 % Trypsin Melnick, 15 ml Versen (159 mM NaCl, 3mM KCl, 6,5 mM Na₂HPO₄, 1,5 M KH₂PO₄, 0,2 mM Titriplex) und 30 ml PBS ohne Mg/Ca gesplittet.

2.3.3 Einfrieren von Säugerzellen und Insektenzellen

Adhärente Zellen wurden in einer mittelgroßen Flasche bis zur Konfluenz kultiviert, dann trypsinisiert und in einem Gesamtvolumen von 10 ml aufgenommen. Nach Pelletierung (200 x g, 5 min, Raumtemperatur) wurde je nach Zellzahl das Zellpellet in 1,8-5,4 ml Gefrierlösung (90 % FKS, 10 % DMSO, Sigma) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Cryo Vials (Greiner) aliquotiert und bei -20°C für 2 h, im Anschluß bei -80°C über Nacht und final in flüssigen Stickstoff zur Lagerung überführt.

2.3.4 Transfektion und Infektion von Zellen

2.3.4.1 Transfektion von Säugerzellen

Für die Transfektionen wurde das Reagenz Lipofectamine (Invitrogen) verwendet. Durch die Bildung eines DNA Liposomen-Komplexes wurde der Gentransfer in die eukaryotischen Zellen ermöglicht. Für die Transfektion wurden am Vortag ca. 2×10^5 Zellen in Sechs-Loch-Platten ausgesät und 24 h kultiviert. 1 μg DNA wurde mit 10 μl Lipofectamine Reagenz und 200 μl Optimem 1 (Invitrogen) für 40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Bildung des DNA Liposomen-Komplexes wurden die Zellen beginnend mit PBS (ohne Mg/Ca) und anschließend mit dem Medium Optimem1 gewaschen. Im Anschluß erfolgte für 4h die Inkubation der Zellen mit dem Transfektionsmedium (Lipofectamine und Optimem und Plasmid-DNA), das zuvor mit 800 μl Optimem1 auf ein Gesamtvolumen von 1 ml verdünnt wurde. Im Anschluß wurde das Transfektionsmedium durch das entsprechende Zellkulturmedium ersetzt und die Zellen wurden je nach Anwendung unterschiedlich lang kultiviert.

2.3.4.2 Transfektion von Insektenzellen zur Herstellung rekombinanter Baculoviren

Für die Transfektion von SF9 und HighFive Zellen wurden 9×10^5 Zellen in einer Sechsllochplatte ausgesät. Laut Herstellerangabe wurden 1 μg Bacmid-DNA in 100 μl Grace`s Medium (Invitrogen) und in einem separaten Ansatz 6 μl Cellfectin (Invitrogen) mit 100 μl Grace`s Medium (Gibco) verdünnt. Beide Ansätze wurden gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, im Anschluß mit 800 μl Grace`s Medium versetzt und auf die Zellen gegeben. 5 h nach der Transfektion (post-Transfektion, p.T.) wurde das Transfektionsmedium durch das dementsprechende Zellkulturmedium ersetzt.

2.3.4.3 Infektion von Insektenzellen

Vier bis fünf Tage post-Transfektion (p.T.) (siehe 2.3.4.2) wurde der P1 Virusstock generiert. Dazu wurde das Medium aus den Sechs-Loch-Platten in eine Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 500 x g zentrifugiert, um Zellreste zu pelletieren. Der Überstand (Virusstock P1) wurde in ein neues Gefäß überführt und bei 4°C

gelagert. Zur Amplifikation des Virusstocks P1 (1×10^6 bis 1×10^7 pfu/ml) für einen hochtitrigen Virusstock, wurden 2×10^6 Zellen mit 400 μ l des Virusstocks P1 infiziert und für 48 h bei 27°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und bei 500 x g für 5 min zentrifugiert. Der so erworbene Virusstock P2 wurde bei 4°C gelagert bzw. bei -80°C für eine längerfristige Lagerung eingefroren.

2.3.4.4 Infektion von Säugerzellen

Für Infektionsanalysen wurden 1×10^5 Zellen in ein Loch einer Sechs-Loch-Platte (Greiner) ausgesät und 24 h kultiviert. Anschließend wurde das Medium durch sterilfiltriertes virushaltiges Medium ersetzt und die Zellen infiziert. Je nach Anwendung wurden die Zellen einen Tag nach der Infektion (post-Infektion, p.I.) für Immunfluoreszenz-Analysen verwendet oder für Bestimmung der Infektionseffizienz weiter kultiviert.

2.3.4.5 Infektion von Insektenzellen zur präparativen Proteinexpression

Zur Expression größerer Mengen von rekombinanten Proteinen wurden 6×10^5 High Five Zellen pro Loch in einer Sechs-Loch-Platte ausgesät. Nach Absetzen der Zellen wurden diese mit 250 μ l des Virusstocks P2 infiziert. Die Inkubation erfolgte 1-4 Tage post-Infektion (p.I.) bis die Zellen im Anschluß an die Inkubationszeit geerntet, lysiert und mittels Western Blot analysiert wurden.

2.3.5 Plaque Assay zur Titration des Virusstocks

Zur Bestimmung des Baculovirustiters wurde der Plaque Assay verwendet. Dazu wurden 1×10^6 Zellen SF9 Zellen pro Loch in einer Sechs-Loch-Platte ausgesät und 1 h bei 27°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch 1 ml virushaltiges Medium des P2 Virusstocks ersetzt und die Zellen wurden 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluß wurde das virushaltige Medium durch Plaque Medium (3% Agarose (Invitrogen) in 200 ml SF900IISFM Medium) ersetzt. Nach Erstarren des Plaque Mediums wurden dieses mit 1 ml Medium überschichtet, um eine Austrocknung zu vermeiden. Die Platten wurden bis zur Auswertung 7-10 Tage bei 27°C inkubiert. Durch Überschichtung der Agarose und anschließender Inkubation mit 0,5 ml einer Neutralrot-Färbelösung (1 mg/ml, Sigma) wurde die Auswertung erleichtert, indem die lebenden Zellen rot gefärbt werden und tote

oder sterbende, virusinfizierte Zellen als hellen Bereich erscheinen lässt. Zur Berechnung der „plaque-forming units“ pro ml (pfu/ml) erfolgte die Multiplizierung der ausgezählten Plaques mit dem Verdünnungsfaktor und dem Faktor 0,5 (1 / 2 ml eingesetztes Volumen pro Loch der Sechs-Loch-Platte).

2.3.6 Aufreinigung von Viruspartikeln

Viruspartikel wurden über ein Sukrosekissen aufgereinigt. Das 20 % Sukrosekissen (gelöst in H₂O) wurde mit zellfreiem, sterilfiltriertem Überstand überschichtet und für 90 min bei 4°C mit 100.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde über Nacht in 500 µl PBS (ohne Mg/Ca) resuspendiert und am nächsten Tag wieder über ein Sukrosekissen aufgereinigt. Anschließend wurde das Viruspellet in 100-150 µl PBS (ohne Mg/Ca) resuspendiert und mittels Western Blot überprüft. Die Lagerung wurde bei -80°C durchgeführt.

2.3.7 Aktivitätsbestimmung der Reversen Transkriptase (RT-Test)

Mittels des C-type-RTTM Activity Assays (Cavidi Tech, Uppsala) erfolgte die Bestimmung der RT-Aktivität in zellfreiem, steril filtrierten (0,45 µm, Sartorius Minisart®) Zellkulturüberstand unter Verwendung des Protokolls B. Bei dem Assay wird im Reaktionsmix enthaltendes Bromo-deoxyuridintriphosphat (BrdUTP) durch die im Überstand befindliche RT in einen DNA Strang eingebaut. Dies geschieht durch Bindung der RT an ein immobilisiertes Template/Primer Konstrukt, an dem der DNA Strang synthetisiert wird. Im Detektionsschritt binden spezifische Antikörper, welche mit alkalischer Phosphatase gekoppelt sind, an das BrdUTP und ermöglichen so einen kolorimetrischen Nachweis, der proportional zu der RT-Aktivität in der Probe ist.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.4.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus Zellen

Mittelgroße Flaschen (80 cm², Nunc) wurden, nachdem sie konfluent mit Zellen bewachsen waren, mit PBS (ohne Mg/Ca) gewaschen und durch Zugabe von 10 ml kaltem PBS mit einem Zellschaber vom Boden abgelöst. Nach Zentrifugation (500 x g, 5 min, 4°C) erfolgte die Lyse der Zellen in 4 ml Lysispuffer (10mM Tris/HCl [pH 7,6], 1mM EDTA, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,5% NP40) durch vortexen. Nach anschließender Zentrifugation (1600 x g, 2 min, 4°C) erfolgte die Resuspendierung der pelletierten Zellkerne in 500 µl Proteinase K-Puffer (10 mM Tris [pH 7,8], 0,5 % SDS) und 2,5 µl Proteinase K (20 mg/ml; Boehringer Mannheim). Die Zellkerne wurden für 60 min bei Raumtemperatur in dem Resuspensionspuffer inkubiert. Die Isolierung der genomischen DNA wurde durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanolfällung durchgeführt.

2.4.1.2 Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien

2.4.1.2.1 Minipräparation durch alkalische Lyse

Die Plasmidaufreinigung erfolgte nach der Methode von Birnboim und Doly (1979). Zellen aus 1,5 ml einer 5ml Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation (13.000 x g, 30 sec., Raumtemperatur) pelletiert und in 100 µl kaltem GTE-Puffer (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl [pH 8,0], 10 mM EDTA) resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 200 µl Lysis Puffer (200 mM NaOH, 1 % SDS) auf Eis für 5 min RT inkubiert und dabei aufgeschlossen. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 150 µl Neutralisationspuffer (3 M Natriumacetat). Anschließend wurden die Zelltrümmer und die chromosomale DNA abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 2 Volumen 96% Ethanol und Inkubation auf Eis für 2 min gefällt und durch Zentrifugation (13.000 x g, 5 min, RT) pelletiert. Die DNA wurde in 50 µl RNase A (0,1 mg/ml, Boehringer Mannheim)-haltigem TE-Puffer resuspendiert.

2.4.1.2 Midipräparation

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mit dem QIAGEN Midikit nach Angaben des Herstellers. Dazu wurden die Zellen aus einer 50 ml Übernachtskultur durch Zentrifugation (5000 x g, 10 min, 4°C) pelletiert und durch die im Kit mitgelieferten Puffer resuspendiert bzw. lysiert. Die Aufreinigung erfolgte mittels Ionenaustauschsäulen.

2.4.1.3 Isolation von λ -Phagen DNA

Für die Isolation der λ -Phagen DNA nach Inkubation der Phagen auf einer 24x24 cm Platte (~500 cm², Nunc) wurden die Phagen in 40 ml SM Puffer (100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄•7H₂O, 50 mM Tris/HCl [pH 7,5], 10 % (w/v) Gelatine; autoklaviert) eluiert und mit 5 ml Chloroform gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden die Zellreste durch Zentrifugation (4000 x g, 15 min bei RT) pelletiert und der Überstand mit 20 μ l RNase (10 mg/ml) und 20 μ l DNase I (10 mg/ml) in einem schüttelnden Wasserbad für 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluß wurde der Suspension eine finale Konzentration von 1M NaCl hinzugefügt und der Ansatz wurde auf Eis für 1 h inkubiert. Nach Zentrifugation (4500 x g, 15 min, 4°C) wurde der Überstand mit 2 g PEG6000 (Roth) versetzt und für eine weitere Stunde auf Eis inkubiert, bis der Ansatz bei 10000 x g für 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Das Pellet wurde in 1,5 ml TM Puffer (50 mM Tris/ 10 mM MgSO₄ [pH 7,8]) resuspendiert und mit w/ 0,5 ml SEVAG extrahiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und nach Zugabe von 12 μ l 10% SDS, 10 μ l 0,5 M EDTA und 2,5 μ l Proteinase K (20 mg/ml, Invitrogen) bei 56°C für 30 min inkubiert. Zum Schluß erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion. Die DNA wurde final mit Lithiumchlorid und Ethanol gefällt und in einem RNase A haltigem Puffer (0,1 mg/ml, Invitrogen) resuspendiert.

2.4.1.4 Isolierung von Gesamt RNA aus Zellen

Die adhärennten Zellen wurden, nachdem der Boden einer mittleren Zellkulturflasche konfluent bewachsen war, dreimal mit eiskaltem PBS (ohne Calcium und Magnesium) gewaschen. Im Anschluß wurden die Zellen nach Zugabe von 10 ml eines sauren Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform Gemisches (TRIzol-Reagenz, Invitrogen) vom Flaschenboden abgekratzt. Die Zellyse und RNA-Extraktion erfolgte anschließend nach

Angaben des Herstellers. Die RNA wurde photometrisch auf ihre Reinheit überprüft (siehe 2.4.2), eine eventuelle Degradierung wurde durch Gelelektrophorese (siehe 2.4.4) festgestellt. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.4.2 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäuren

Aufgrund unterschiedlicher Adsorptionsmaxima von Nukleinsäuren (260 nm) und Proteinen (280 nm) ist es möglich eine photometrische Bestimmung auf Reinheit und Konzentration von Nukleinsäuren durchzuführen. Der Quotient für reine DNA liegt zwischen 1,6 und 1,8, für RNA zwischen 1,8 und 2,0. Für die Messungen am RNA / DNA Calculator (Pharmacia) wurde in der Regel Plasmid-DNA im Verhältnis 1:10 und genomische DNA bzw. RNA im Verhältnis 1:100 verdünnt.

2.4.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen wurden in der Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) die rekombinante thermostabile DNA-abhängige DNA Polymerase AmpliTaq (PE Applied Biosystems) oder die Phusion Polymerase (Finnzymes) verwendet. Ein Standardansatz (50 μl) bestand aus 1x PCR Puffer (10 mM Tris/HCl [pH 8,5], 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2 , 0,01 % Gelatine), jeweils 10 μM forward und 10 μM reverse Primer, 20 mM dNTP's und 1 Unit Polymerase. Entsprechend der PCR wurden 100 ng genomische DNA oder 20 ng Plasmid-DNA als Template verwendet. Den PCR-Programmen ging eine initiale Denaturierung bei 94°C für 3 min voraus. Der erste Zyklus einer Dreier-Zyklus-Schleife wurde in der Regel für 30 sec bei 94°C durchgeführt. Der Annealing-Schritt für die Bindung der Primer variierte zwischen $54-65^{\circ}\text{C}$ und dauerte 40 sec. Die Dauer der Elongation bei 72°C war abhängig von der Größe des Amplifikats. Diese Zyklusschleife wurde 25-35 mal wiederholt bis das PCR-Programm mit einer finalen Elongation für 10 min bei 72°C abschloß. Die PCR-Reaktionen wurden in dem Thermocycler Progene (Techne) oder dem Tgradient-cycler (Biometra) durchgeführt.

2.4.3.1 Verwendete Primer

In der Tabelle 2.1 sind sämtliche Primer, die in verschiedenen PCR-Ansätzen verwendet wurden, zusammengefasst. Die Datenbanknummern der PERV Sequenzen, anhand derer die Primer konstruiert wurden, sind unter 2.4.18 aufgeführt.

Bezeichnung Primer	Sequenz (5' → 3')	nt-Position
PERV-C for	CTGACCTGGATTAGAACTGGAAG	6130-6152 ^a
PERV-C rev	TATGTTAGAGGATGGTCCTGGTC	6389-6411 ^a
Rec B-C for	<i>ACACCGGCGGCCGCC</i> CCCCCTTAAGCTTCGCC	6254-6269 ^b
Rec B-C rev	<i>AGTCTAACTAGTCTAGCTGCTGTGGTC</i>	6161-6176 ^d 7650-7665 ^b 7503-7518 ^d
ENV_C for	<i>ATATTTGTCGAC</i> ATGCATCCCACGTTAAGCC	1-19 ^c
ENV_C rev	<i>TTATATGCGGCCGC</i> CTTTCATTCCCCTTCTTG	1953-1972 ^c
ENV_C_SU_rev	<i>ATACTAGCGGCCGC</i> CTTCTTTTGTTCGATGATTTCTG	1302-1323 ^c
Rec B(33) for	GATACGGGTGTCACTGTAAATAG	6385-6407 ^b
Rec B(33) rev	CATGGCCGCATGTAGCTCAC	7679-7698 ^b
Rec C(1312) for	CGGCACAGGTATTAATATCAA	6291-6312 ^d
Rec C(1312) rev	CTGTTACAATTCGATGTAGGTTAC	7532-7555 ^d
M13 for	GTTTTCCCAGTCACGAC	Bacmid-DNA
M13rev	CAGGAAACAGCTATGAC	Bacmid-DNA

Tabelle 2.1: Verwendete Primer zur Amplifizierung verschiedener Sequenzen porziner endogener Retroviren. Schnittstellen, die rekombinant in die Primer Sequenz eingefügt wurden, sind fett dargestellt, Puffersequenzen vor bzw. hinter der Schnittstelle des Primers sind kursiv dargestellt. nt, Nukleotid-Position.

- a nt-Position bezieht sich auf die Datenbank Nummer AF038600
- b nt-Position bezieht sich auf die Datenbank Nummer AJ133816
- c nt-Position bezieht sich auf das Plasmid pCINeo3.1.2ST-env c (mit freundlicher Unterstützung von C. Wilson)
- d nt-Position bezieht sich auf die Datenbank Nummer AM229312

2.4.4 Agarosegelelektrophorese

Nukleinsäuren wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose (Invitrogen) in 1x TAE Puffer (40 mM Tris/Acetat [pH 8,0], 1 M EDTA) aufgekocht und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Roth) versetzt.

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von RNA wurde die Agarose in BTPE-Puffer (10 mM PIPES, 30 mM Bis-Tris, 10 mM EDTA, pH 6,5) aufgekocht. Die RNA-Proben wurden vor der Elektrophorese glyoxiliert. 10 µg Total-RNA wurden mit 10 µl Glyoxal-Mix (60 % DMSO, 20 % 6 M Glyoxal (Serva), 12 % 10x BTPE-Puffer, 6 % 80%iges Glycerin und 2 % Ethidiumbromid (10 mg/ml) für 45 min bei 55°C denaturiert. Nach Zugabe von 3 µl Bromphenolblau-Puffer erfolgte die Elektrophorese in BTPE-Puffer, bei kontinuierlicher Umwälzung des Laufpuffers. Als Größenstandard wurde der 0.24-9.5 kb RNA Marker (Invitrogen) verwendet. Eine Qualitätskontrolle der RNA wurde vor der Durchführung des Northern Blots unter UV-Bestrahlung durchgeführt. Zur Untersuchung der RNA Qualität diente ein Vergleich der Proportionalität von 18s und 28s Bande.

2.4.5 DNA Aufreinigung aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mittels des GENE CLEAN Turbo Kits (QBIogene) aus der Agarose isoliert. Bei diesem Kit wurde die DNA nach Zersetzung der Agarose an eine Matrix gebunden, gewaschen und anschließend mit TE-Puffer von der Matrix eluiert.

2.4.6 Anlegen einer λ -Phagenbank aus der Zelllinie MAX-T

Genomische DNA der Zelllinie MAX-T wurde zur Herstellung einer Phagenbank partial mit dem Restriktionsenzym *Sau3AI* restringiert. Die Restriktion wurde so eingestellt, dass DNA-Fragmente mit einer Größe zwischen 9 und 23 kb entstanden. Diese Größe entspricht der natürlichen Insertkapazität im Lambda-Bakteriophagen des Lambda FIX/XhoI Partial Fill-In Vector-Systems (Stratagene). Zunächst wurde die restringierte DNA mit den Desoxynukleotidtriphosphaten dGTP und dATP aufgefüllt, um eine Ligation mit dem Vektor zu ermöglichen (siehe 2.4.8). Im Anschluß wurden 0,3 µg der aufgefüllten DNA-Fragmente in Gegenwart von 1 mM rATP und 1 Unit T4 Ligase (4,5 Weiss Einheiten) mit

1 µg Lambda-Vektor (Stratagene) bei 4°C über Nacht ligiert. Der Ligationsansatz wurde aliquotiert und zu Verpackungsextrakten (Gigapack II Gold, Stratagene) gegeben. Die Verpackungsreaktion wurde für 2 h bei Raumtemperatur durchgeführt und durch Zugabe von 500 µl SM-Puffer (siehe 2.4.1.3) und 20 µl Chloroform abgestoppt. Die Zelltrümmer wurden durch anschließende Zentrifugation pelletiert und der Überstand bei 4°C gelagert. Für die Titration des Überstands wurden Bakterien des Stammes *E.coli* XL1-Blue MRA (P2) in 50 ml LB (supplementiert mit 0,2 % Maltose und 10 mM MgSO₄) kultiviert. Die Bakterien wurden geerntet und mit 10 mM MgSO₄ auf eine OD₆₀₀ von 0,6 eingestellt. Anschließend wurden 200 µl der Bakteriensuspension mit 1 µl verschiedener Verdünnungen (10⁰, 10⁻¹, 10⁻²) des Verpackungsüberstandes für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Bakterien mit den adhären Phagen wurden mit 3 ml 48°C warmer NZY-Top-Agarose vermischt und auf eine NZY-„Bottom“-Agarplatte (5 g NaCl, 2 g MgSO₄•7H₂O, 5 g Hefeextrakt), 10 g NZ Amine, ad 1 l deionisiertes H₂O, [pH 7,5], autoklaviert) ausplattiert. Nach Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht wurde der Titer durch Auszählen der Plaques im Bakterienrasen bestimmt. Zur Amplifikation der Bibliothek wurde der restliche Verpackungsansatz analog zur Titration auf 24x24 cm NZY-„Bottom“-Agarplatten (Nunc) mit NZY-Top-Agarose ausplattiert. Die Elution der Phagen auf den konfluent lysierten Platten erfolgte durch Überschichtung des Agars mit SM-Puffer und anschließender Inkubation bei 4°C über Nacht. Das Phageneluat wurde gepoolt und mit 1 µl / ml Chloroform für eine dauerhafte Lagerung bei 4°C versetzt.

2.4.7 Durchmusterung der Phagenbibliothek

Zur Durchmusterung der Phagenbibliothek wurden sechs 24x24 cm NZY-Agarplatten, deren Bakterienrasen nahezu durchlysiert war, mit Nylonmembranen bedeckt. Die Membranen wurden von der Platte abgezogen und mit der anhaftenden Phagen-DNA 2 min in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl), 5 min in Neutralisierungslösung 1 (0,5 M Tris-HCl [pH 7,5], 1,5 M NaCl) und zum Schluß maximal 30 Sekunden in Neutralisierungslösung 2 (2xSSC, 0,5 M Tris-HCl [pH 7,5]) geschwenkt. Durch UV-Bestrahlung in dem UV-Auto Crosslinker (Stratagene) wurde die DNA auf der Membran fixiert. Bis zur Auswertung der Autoradiogramme wurden die Platten bei 4°C gelagert. Positive Phagenplaques wurden mit der großen Öffnung einer Pasteurpipette aus dem Agar ausgestochen und zur Elution der Phagen in SM-Puffer überführt. Die Durchmusterung erfolgte in vier Runden bis zur Homogenität der Klone.

2.4.8 Auffüllreaktion von überhängenden Restriktionsschnittstellen

Für die Klonierung der Phagenbibliothek war es erforderlich nicht kompatible Restriktionsschnittstellen partial aufzufüllen. Hierzu wurden 50 µg der aufzufüllenden restringierten genomischen DNA mit 2 Units Klenow-Fragment (die große Untereinheit der DNA-Polymerase I, NEB), 0,2 mM dNTPs bei 37°C für 30 min inkubiert. Im Anschluß erfolgte eine Phenol/Chloroform-Aufreinigung mit anschließender Ethanolfällung. Danach wurde die DNA für weitere Ligationsschritte verwendet.

2.4.9 Dephosphorylierung von DNA

Um eine mögliche Religation linearisierter Vektoren zu verhindern, erfolgte die Dephosphorylierung der Vektor-DNA. Restringierte Vektor-DNA wurde für 20 min bei 37°C mit 0,5 Units einer alkalischen Phosphatase des Kalbs (Pharmacia) und anschließend für weitere 20 min bei 65°C mit 1 Unit bakterieller alkalischer Phosphatase (Invitrogen) inkubiert. Im Anschluß wurde die DNA für die Ligation mit Ethanol präzipitiert.

2.4.10 Ligation

Die Verknüpfung von Vektor-DNA und Insert-DNA erfolgte durch Verwendung von T4-DNA-Ligase (Invitrogen). Hierzu wurde 10-50 ng Vektor-DNA mit 4 µl 5 x Ligase-Puffer, 1 µl T4-DNA-Ligase (1 Unit) und der äquimolaren Menge Insert-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei 16° über Nacht oder bei 4°C für 3 Tage inkubiert.

2.4.11 T/A-Klonierung von PCR-Amplifikaten

Durch die Verwendung der Taq-DNA-Polymerase (siehe 2.4.3) wurde dem Amplifikat ein Template-unabhängiger Desoxyadenosin-Überhang am 3`-Ende hinzugefügt. Durch diesen Überhang war es möglich die Amplifikate direkt mit Vektoren zu ligieren, die über einen Desoxythymidin-Überhang verfügten. Auf diese Weise wurden PCR-Amplifikate wie unter 2.4.10 beschrieben in den Vektor pGEM-T Easy (Promega) ligiert.

2.4.12 Transformation von Bakterien

Der Ligationsansatz (siehe 2.4.10) wurde komplett mit 50 µl aufgetauten chemisch kompetenten Bakterien vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 sec bei 42°C wurden die Zellen für 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde dem Transformationsansatz 1 ml SOC-Medium (2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,05 % NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Glucose [pH 7,0]) hinzugefügt und die Zellen wurden für eine Stunde bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert, auf Selektivnährböden mit Kanamycin- oder Ampicillin-Antibiotika ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.4.13 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte durch die Firmen SeqLab (Göttingen) oder AGOWA (Berlin). Hierzu wurden die Proben nach Angaben der Firmen vorbereitet und zugesandt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programms Vector NTI (Invitrogen).

2.4.14 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren durch Random Prime Labelling

Das radioaktive Random Prime Labelling wurde mittels des Megaprime DNA Labelling System (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. 25 ng DNA wurden mit 5 µl eines randomisierten Hexanukleotidgemisches für 5 min bei 100°C denaturiert und bei Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden 10 µl eines 5x Puffer und 5 µl [α -³²P] dCTP (3.000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech) und 2 Units des Enzyms Klenow-Fragment dem Ansatz hinzugefügt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl EDTA gestoppt. Im Anschluß erfolgte die Aufreinigung der markierten Sonde über Sephadex G50 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) mittels Fraktionierung. Die Messung der spezifischen Aktivität der einzelnen Fraktionen (jeweils 2 µl für jede Fraktion) wurde über einen Szintillationszähler per Cerenkov-Messung (Einheit: counts per minute [cpm]) bestimmt.

2.4.15 Transfer von Nukleinsäuren

Durch Southern Blot (Southern, 1975) bzw. Northern Blot erfolgte der Transfer von Nukleinsäuren aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran durch Kapillarblot. Nach Fertigstellung der Elektrophorese erfolgte die Denaturierung der Gele für 30 min in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl). Für Southern Blot (Übertragung von DNA) Anwendungen wurde die DNA für 10 min in 0,25 N HCl depuriniert, bei Northern Blot (Übertragung von RNA) Anwendungen wurde keine Depurinierung durchgeführt. Anschließend erfolgte eine zweimalige Neutralisation in 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl [pH 7,5]. Der Transfer auf die Porablot NY Amp Nylon Membran (Macherey-Nagel) wurde in 20x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat [pH 7,0] über Nacht durchgeführt. Der Blot-Aufbau erfolgte nach Sambrook et al. (1989). Nach Transfer wurden durch UV-Bestrahlung (UV Stratalinker, Stratagene) die Nukleinsäuren kovalent an die Membran gebunden. Beim Northern Blot wurde die Membran im Anschluß an die UV-Fixierung zusätzlich für 2 h bei 80°C gebacken, um das Glyoxal zu entfernen.

2.4.16 Hybridisierung mit DNA Fragment-Sonden

Blot-Membranen wurden initial zur Unterdrückung unspezifischer Bindungen für eine Stunde bei 65°C in Hybridisierungslösung (5x Denhardt, 6x SSC, 0,5 % SDS, 50 µg / ml Hefe tRNA (Invitrogen)) im Rollerofen prähybridisiert. Die Sonden wurden für die Hybridisierung für 5 min in einem kochenden Wasserbad denaturiert und danach 5 min auf Eis abgekühlt. Für die Hybridisierung wurden $1-1,5 \times 10^6$ cpm / ml Sonde auf die prähybridisierte Membran gegeben und diese bei 65° über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte das Waschen der Membran zweimal mit Waschpuffer I (2x SSC, 0,1 % SDS) für 30 min bei 65°C und einmal mit Waschpuffer II (0,2x SSC, 0,1 % SDS) für 30 min bei 65°C bevor die Membran in Folie eingeschweißt wurde und die Hybridisierungssignale durch Autoradiographie bei -80°C unter Verwendung von Verstärkerfolie detektiert wurden.

2.4.17 PERV Fragment-Sonde

Zur Hybridisierung von Membranen in Southern Blot und Northern Blot Analysen wurde mittels PCR durch Verwendung der Primer PERV-C for und PERV-C rev (siehe Tab 2.1) eine Sonde generiert (*env*-C-Sonde, 281 bp), die in den Vektor pGEM-T Easy kloniert wurde.

2.4.18 Datenbank Nummern

AF038600	PERV-MSL cDNA (Akiyoshi et al., 1998)
AJ133816	293-PERV-B(33)ATG Molekularklon (Czuderna et al., 2000)
AM229312	PERV-C(1312) Molekularklon (Preuß et al., 2006)
AM229311	PERV-C(1211) Molekularklon (Preuß et al., 2006)
AM229313	PERV-C(6121) Molekularklon (Preuß et al., 2006)

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Herstellung von Zelllysaten

Mittelgroße konfluent bewachsene Flaschen (80 cm²) wurden nach dreimaligen Waschen mit kaltem PBS (ohne Mg/Ca) in 10 ml kaltem PBS mit einem Zellschaber abgelöst und im Anschluß für 10 min bei 4°C bei 500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Lysispuffer (20 mM Tris [pH 7,4], 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP40), welcher mit Protease-Inhibitoren versetzt war (100 mM PMSF, 1 mg/ml Aprotinin, 1 mg/ml Leupeptin, 1 mg/ml Pepstatin A), resuspendiert und für 1 h auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Proben bei 14.000 x g für 7 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.5.2 Proteingelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinlösungen wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewandt (Laemmli, 1970). Es wurden dafür diskontinuierliche Gele verwendet, die sich aus einem niederprozentigem Sammelgel und einem höherprozentigem

Trenngel zusammensetzten. Die Zusammensetzung der Sammelgele (5%) bestand aus 30 % Acrylamid (Roth), 0,8 % Bisacrylamid, (Roth) und 25 % (v/v) Lösung C (0,5 M Tris/HCl [pH 6,8], 0,4 % SDS). Die Trenngele (10%) setzten sich aus 25 % (v/v) Lösung B (1,5 M Tris/HCl [pH 8,8], 0,4 % SDS) zusammen. Durch Zugabe von 0,1 % APS (Gibco) und 0,05 % TEMED (Serva) wurde die Polymerisation durchgeführt.

Die Proben wurden in 1x Probenpuffer (4x Probenpuffer: 0,25 M Tris/HCl [pH 6,8], 4 % SDS, 10 % MercaptoEthanol, 20 % Glycerin, 20 mg/l Bromphenolblau) aufgenommen und für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend bis zum Beladen des Gels auf Eis gelagert. Die Elektrophorese erfolgte in 1x Elektrophorese-Laufpuffer (4x Elektrophorese-Laufpuffer: 0,1 M Tris/HCl [pH 8,3], 0,77 M Glycin, 0,4 % SDS).

Zur Färbung der Proteine wurde das Gel für 2 min in PBS (ohne Mg/Ca) in der Mikrowelle für 30 sec. erhitzt. Nach kurzem Abkühlen wurde das PBS durch 10 ml SimplyBlueSafestain (Invitrogen) ersetzt und erneut in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde das Gel nach Ersetzen der SimplyBlueSafestain-Lösung durch H₂O für 5 min bei Raumtemperatur gewaschen. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt und zum Schluß die Proteinmenge anhand der Färbeintensität bestimmt.

2.5.3 Western Blotting

Für den Transfer von in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen (siehe 2.5.2) auf eine Membran wurde das Western Blot-Verfahren angewandt. Das Gel wurde auf eine mit Methanol präinkubierte PVDF-Membran (Immobilon-P; Millipore) überführt, welche auf Filterpapier (Whatmann-3mm) auflag. Das Gel wurde anschließend ebenfalls mit einem Filterpapier bedeckt. Das Gel und die Filterpapiere wurden vor dem Blot in Blotting Puffer (25 mM Tris/HCl [pH 8,3], 192 mM Glycin, 20 % Methanol) inkubiert. Der Transfer wurde für 55 min bei 0,18 Ampere in der Blotting Apparatur BIO-RAD Trans-Blot®SD Semi-Dry Transfer Cell durchgeführt.

Nach Blotten wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in Blocking Puffer (1x TBST (1x TBS, 0,1 % Tween 20), 20 % Pferdeserum) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran mit den Primärantikörpern (in 1x TBST, 5 % Pferdeserum) bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach anschließendem dreimaligen Waschen mit 1x TBST erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper (in 1x TBST, 5 % Pferdeserum) für 1,5 h bei Raumtemperatur. Als Zweitantikörper wurde Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekoppeltes

G-Protein (BIORAD) oder ein monoklonaler Anti HisTag Antikörper (Sigma) verwendet. Die verwendete Verdünnung der Antikörper für die Inkubation der Membranen wurde entsprechend angepasst. Abschließend wurde die Membran erneut dreimal gewaschen, entsprechend den Waschschritten nach Inkubation mit dem Primärantikörper, und die Proteine mittels des Enhanced chemiluminescence (ECL)-Systems (Amersham) (siehe 2.5.4) nachgewiesen.

2.5.4 Enhanced chemiluminescence (ECL)-Verfahren

Für die ECL-Reaktion wurde der ECL-Detection Kit (Amersham Pharmacia Biotech) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Der Kit beruht auf der Freisetzung von Chemilumineszenz, deren Detektion mit Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech) erfolgte. Die benötigte Energie in Form von Chemilumineszenz entsteht durch die Spaltung des Substrats (ECL Solution 1 und 2 im Verhältnis 1:1) durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase.

2.5.5 Induktion der Proteinexpression

Zur Induktion der Proteinexpression wurde eine Bakterienkolonie, die mit dem Expressionsvektor transformiert wurde, in 50 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum angeimpft. Die Bakterien wurden schüttelnd bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,6 (gemessen bei 205 nm) kultiviert. Anschließend erfolgte durch Zugabe von 0,1 M IPTG Endkonzentration (Roth) die Induktion der Proteinexpression. Die Zellen wurden unter leichtem Schütteln bei 30°C inkubiert. Im Zeitintervall von jeweils einer halben Stunde wurden insgesamt sechs Proben entnommen. Drei Stunden nach Induktion wurden die Bakterien der restlichen Zellsuspension bei 13.000 x g bei 4°C pelletiert. Die Zellen der Proben wurden durch Ultraschall aufgeschlossen und im Anschluß zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.5.6 Aufreinigung rekombinanter Proteine

Rekombinante Fusionsproteine mit His-Tag aus Zelllysaten von Insektenzellen (infiziert mit rekombinanten Baculoviren) oder aus induzierten BL21De3 *E.coli* Zellen wurden

mittels des HisTrap HP Kit (Amersham) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie, bei der der His-Tag des Fusionsproteins an die Ni²⁺-Agarose der Säulen des Kits bindet. Durch Verwendung einer Konzentrationsreihe mit verschiedenen (ansteigenden) Imidazolkonzentrationen wurde das Fusionsprotein ab einer bestimmten Konzentration von der Säule eluiert und für spätere Anwendungen über SDS-PAGE analysiert.

2.5.7 Enzymgekoppelter Immuntest (ELISA)

ELISAs wurden zur Qualitätskontrolle von Peptidantiseren verwendet. Die ELISA-Platten (MAXISORP NUNC) wurden mit 100 µg verschiedener Peptide (in PBS ohne Mg/Ca) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit 0,5 % BSA (in PBS ohne Mg/Ca) für 2 h bei 37°C inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen zu besetzen. Das Waschen erfolgte dreimal mit 0,05 % Tween 20 (in PBS ohne Mg/Ca). Der Primärantikörper bzw. das Antiserum wurde in verschiedenen Verdünnungen (in PBS ohne Mg/Ca, 0,5 % BSA) für eine Stunde bei 37 °C auf der Platte inkubiert und anschließend erfolgte ein erneutes dreimaliges Waschen mit 0,05 % Tween 20 (in PBS ohne Mg/Ca). Der Inkubation mit dem Zweitantikörper (Meerrettich-Peroxidase gekoppelt) mit einer Verdünnung von 1:5000 (in PBS ohne MG/Ca, 0,5 % BSA) folgte ein dreimaliges Waschen mit 0,05 % Tween 20 (in PBS ohne Mg/Ca). Für die Färbereaktion wurde eine Färbelösung (90,2 µg Na-Acetat [pH 5,5], 4,008 µg TMB, 8 µl H₂O₂ ad 40 H₂O) hergestellt, von der in jede Vertiefung der ELISA-Platte 100 µl gegeben wurden. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 25 µl 1 M H₂SO₄ gestoppt. Die Auswertung wurde erfolgte in einem Easy Reader (EAR 400 AT, SLT Labinstruments) bei 450 nm.

2.5.8 Herstellung eines synthetischen Peptids

Zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums durch Immunisierung von Kaninchen wurde ein synthetisches Peptide kommerziell durch die Firma Eurogentec (Belgien) hergestellt. Das Peptid war durch HPLC aufgereinigt und zur Immunisierung an KLH (keyhole limpets hemocyanin) als Trägermolekül gekoppelt worden (Eurogentec).

2.5.9 Immunisierung von Kaninchen mit einem synthetischen Peptid

Zur Produktion von polyklonalen Antisera wurden Kaninchen verwendet. Die Herstellung der Antisera gegen das Oberflächenmolekül gp70 des porcinen endogenen Retrovirus (PERV) der Klasse C erfolgte durch die Firma Eurogentec (Belgien). Die Immunisierung wurde mit 200 µg an KLH gekoppeltem Peptid durchgeführt. Insgesamt wurden drei Immunisierungen (boost) der Kaninchen durchgeführt. Der erste bzw. zweite boost wurden jeweils nach 14 Tagen, der finale boost nach 28 Tagen durchgeführt. Die finale Blutung der Tiere erfolgte drei Monate nach dem ersten boost. Die Lagerung der Antisera wurde bei -80°C durchgeführt. Für immunologische Arbeiten wurde ein Gemisch mit Glycerin im Verhältnis 1:1 angefertigt und bei -20°C gelagert.

2.5.10 Indirekte Immunfluoreszenzen

2×10^5 Zellen aus serieller Passagierung wurden aus einer Kulturflasche auf Objektträger übertragen und kultiviert. Nach annähernder Konfluenz der Zellen auf dem Objektträger wurden die Zellen für 30 min mit 2 % (w/v) Formaldehyd (in PBS ohne Mg/Ca) fixiert und im Anschluß dreimal mit PBS (ohne Mg/Ca) gewaschen. Danach erfolgte eine Permeabilisierung der Zellen durch Inkubation für 10 min mit 0,5 % Triton X-100 in PBS (ohne Mg/Ca). Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit 1 % BSA (in PBS ohne Mg/Ca) blockiert. Die Verdünnungen der Antikörper (entsprechend der Antikörperkonzentration in der Stammlösung angepasst) wurden in PBS Dulbecco angesetzt. Die Inkubation erfolgte 1 h bei Raumtemperatur. Nach drei Waschschritten mit PBS Dulbecco erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 (Anti Kaninchen, gekoppelt mit Indokarbocyanin, Cy3, Dianova) für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Abschließend wurden die Zellen (nach dreimaligem Waschen mit PBS Dulbecco) mit Mowiol-Lösung (Hoechst) eingedeckt und auf den Objektträgern fixiert. Die Auswertung der Immunfluoreszenzen erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss).

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung und Charakterisierung eines replikations- kompetenten ecotropen porzinen endogenen Retrovirus (PERV)

Ein Ziel der Arbeit bestand in der Isolierung und Klonierung eines vollständigen und intakten Provirus der Klasse C aus der Familie der porzinen endogenen Retroviren (PERV-C). Bislang ist erst eine annähernd komplette PERV-C spezifische Sequenz isoliert worden, die als PERV-MSL bezeichnet wird (Akiyoshi et al., 1998). Eine nähere funktionale Charakterisierung erfolgte bei dieser isolierten mRNA Sequenz nicht.

3.1.1 Klonierung einer PERV-C spezifischen Sonde

Für die Isolierung des PERV-C Provirus wurde wie unter 2.4.6 beschrieben eine genomische Phagenbibliothek der MAX-T Zelllinie angelegt, die mit einer spezifischen Sonde durchmustert wurde. Aufgrund der hohen Homologien in der DNA-Sequenz zwischen den verschiedenen PERV Klassen im Bereich des *gag*- bzw. *pol*-Gens wurde die Sonde in den Sequenzbereich des Oberflächenanteils im Hüllprotein (*env*-Gen) gelegt, da sich in diesem Bereich die Sequenzen der verschiedenen PERV Klassen stark unterscheiden. Die Position der Sonde ist in Abb. 3.1 schematisch dargestellt. Die Sonde wurde mit sequenzspezifischen Primern mittels PCR auf genomischer DNA von MAX-T Zellen generiert und in den T/A-Vektor pGEMTEasy kloniert und sequenziert. Die Sequenz war zu 100 % homolog zu der bereits publizierten mRNA Sequenz von PERV-MSL (Akiyoshi et al., 1998) und besitzt eine Größe von 281 Basenpaaren. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird sie als *env*-C-Sonde bezeichnet.

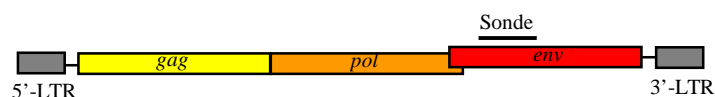


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Position der *env*-C-Sonde. *gag*, Strukturgen, das für das Capsid, Nukleokapsid und das Matrixprotein kodiert; *pol*, Gen, welches für die Polymerase, die Integrase und die

RNaseH kodiert; *env*, Hüllprotein-Gen, welches für das Oberflächenprotein (SU) und die Transmembrandomäne (TM) kodiert.

3.1.2 Southern Blot zur Häufigkeitsanalyse von PERV-C Sequenzen in genomischer DNA verschiedener Zellen

Für die Isolierung eines replikationskompetenten PERV-C Provirus aus einer Phagenbibliothek wurde initial eine Southern Blot Analyse durchgeführt, um die Existenz und Häufigkeit von PERV-C spezifischen Sequenzen in verschiedenen Zelllinien zu überprüfen. Von besonderem Interesse war die MAX-T Zelllinie. Es handelt sich hierbei um Nierenzellen eines Miniaturschweins, das den Haplotypen d/d des Schweine Leukozyten-Antigens (swine leukocyte antigen, SLA) besitzt (Pauly et al., 1995). Aus diesem Grund wären somit die Organe dieses Schweins für die Xenotransplantation aufgrund der immunologischen Prädisposition gut geeignet, da sie eine hohe Anzahl an Nachkommen haben und ihre physiologischen und immunologischen Eigenschaften dem Menschen sehr ähnlich sind. Durch den Einsatz dieser Minischweine mit haplotypen SLA ist es möglich die Effekte von Transplantationen quer durch die selektiven MHC-Barrieren zu analysieren (Sachs 1994). Für die Analyse wurden 10 µg genomische DNA von verschiedenen Zelllinien mit dem Restriktionsenzym *AflIII* restringiert und für eine Southern Blot Analyse verwendet (Abb. 3.2). Als Negativkontrolle wurde DNA von humanen 293FT Zellen verwendet. Zur Kontrolle, ob die Sonde auch an PERV-B spezifischen DNA-Sequenzen bindet, wurde für die Analyse DNA von 293 Zellen, die mit dem Moleklarklon PERV-B(33)ATG infiziert sind, verwendet. DNA von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) des Yucatan Schweins und des Deutschen Landrasse Schweins wurden verwendet, um festzustellen, ob eine unterschiedliche Häufigkeit von PERV-C Sequenzen in den verschiedenen Schweine DNA's besteht. Die Sonde, die für die Southern Blot Analyse eingesetzt wurde, bindet spezifisch an PERV-C Sequenzen, sowohl bei der Negativkontrolle als auch bei der Spezifitätskontrolle ist kein Signal zu sehen (Abb. 3.2). Der Vergleich in der Southern Blot Analyse zeigt deutlich eine polymorphe Distribution von PERV-C Sequenzen in den Genomen der verschiedenen Schweine, aus denen die DNA isoliert wurde.

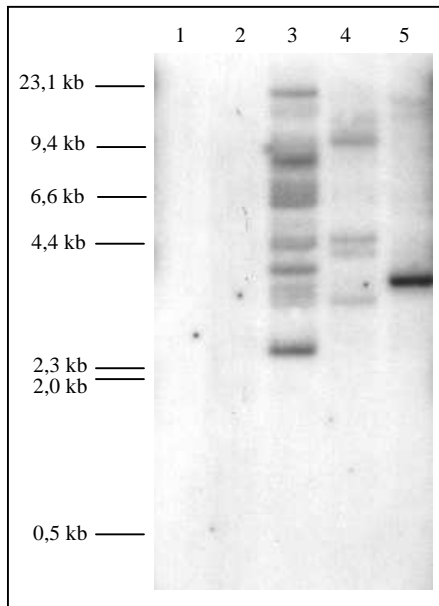


Abb. 3.2: Southern Blot Analyse auf genomischer DNA mit der *env*-C-Sonde. 1, 293FT; 2, 293B(33)ATG; 3, MAX-T; 4, Yucatan Schwein; 5, Deutsches Landrasse Schwein

Anhand der Southern Blot Analyse zeigt sich, daß die Häufigkeit von PERV-C Sequenzen im Genom der MAX-T Zellen am Größten ist und somit diese Zelllinie am besten zur Generierung einer Phagenbibliothek geeignet ist, um provirale PERV-C zu isolieren.

3.1.3 RT-Nachweis von PERV auf zellfreiem Überstand

Als zusätzliche Kontrolle erfolgte der Nachweis von RT in zellfreiem Kulturüberstand von MAX-T Zellen durch einen RT-Test (siehe 2.3.7). Als Negativkontrolle wurde Überstand von naiven humanen 293FT Zellen verwendet, dieser zeigt keine messbare Aktivität (Abb. 3.3). Die Positivkontrolle von 293 PERV-PK (Überstand von 293 Zellen, die PERV-A und PERV-B Partikel freisetzen (Patience et al., 1997, Czauderna et al., 2000), zeigt deutlich eine Aktivität von reverser Transkriptase, ebenso ist in dem Überstand von MAX-T Zellen eine vergleichbar hohe RT-Aktivität detektierbar (Abb. 3.3).

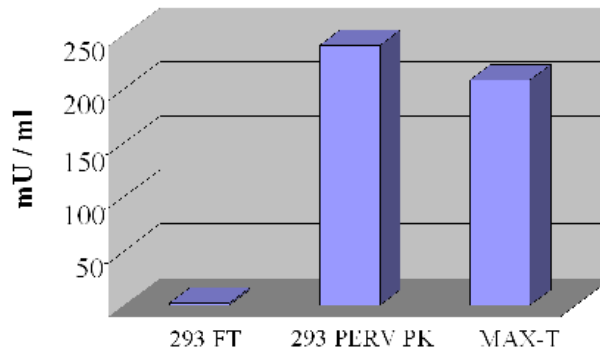


Abb. 3.3: Bestimmung der RT-Aktivität auf zellfreiem Zellkulturüberstand. Balkendiagramm zur Darstellung der gemessenen Aktivität von reverser Transkriptase in zellfreiem Zellkulturüberstand verschiedener Zelllinien. mU / ml, milli Units pro Milliliter

3.1.4 Durchmusterung einer MAX-T- λ -Phagenbibliothek

Zur Klonierung eines proviralen replikationskompetenten PERV-C wurde eine genomische λ -Phagenbibliothek der Zelllinie MAX-T generiert. Im Vorfeld wurde die DNA partial mit dem Restriktionsenzym *Sau3AI* restringiert, so dass die Mehrheit der Restriktionsfragmente zwischen 9 und 23 kb lag. Nach Auffüllreaktion der restringierten DNA und Ligation mit dem Vektor erfolgte die Titrierung der verpackten DNA in Phagenpartikel. Der Primärtiter, der durch Zählen der Plaques unter Berücksichtigung der eingesetzten Verdünnungsstufen der Phagen (10^0 bis 10^{-4}) ermittelt wurde, lag bei ca. $1,9 \times 10^6$ unabhängigen Klonen. Bei einer durchschnittlichen Insertgröße von 15 kb sind somit $2,85 \times 10^{10}$ Basenpaare verpackt worden. Das Genom des Schweins wird auf ca. 3×10^9 Basen geschätzt, das bedeutet, dass die Bibliothek das Genom von MAX-T Zellen ungefähr 9,5 mal repräsentiert. Nach Durchmusterung der Bibliothek mit der *env-C*-Sonde konnten vier Klone bis zur Homogenität aufgereinigt werden. Die Isolierung der Phagen-DNA erfolgte wie unter 2.4.1.3 beschrieben. Nach Restriktionsanalyse der λ -Klone 1211, 1312, 4112 und 6121 mit verschiedenen Restriktionsenzymen konnte festgestellt werden, dass es sich um vier unterschiedliche provirale Integrationsorte handelt. Die DNA-Fragmente wurden mit dem Restriktionsenzym *NotI* in den Vektor pBluescript(SK+) (Clontech) kloniert. Durch Southern Blot Analyse mit einer *gag*- und der *env-C*-Sonde wurde festgestellt, ob bei den subklonierten proviralen Sequenzen alle retroviralen Strukturgene vorhanden sind, welches anhand des Signals und der dazu korrespondierenden Größe des Markers auf dem Film analysiert wurde. Für die Klone

1211, 1312 und 6121 konnten beide PERV Sequenzen spezifisch nachgewiesen werden, lediglich der Klon 4112 zeigte ausschließlich für das *env*-Gen ein Signal (Abb. 3.4).

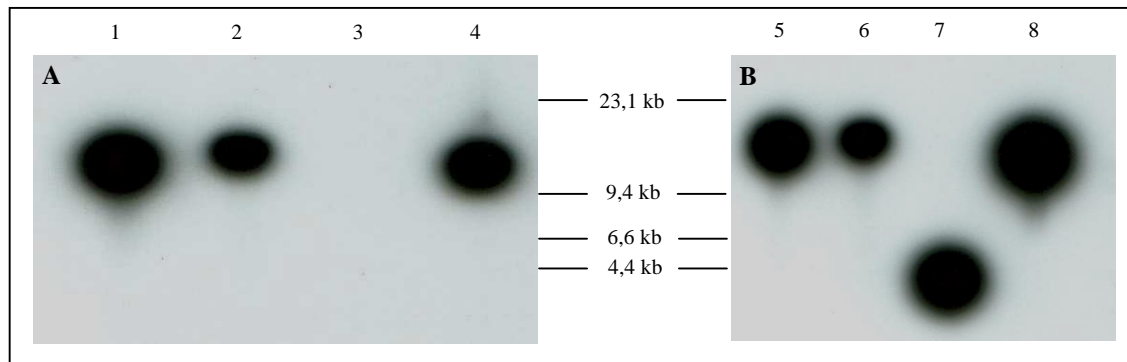


Abb. 3.4: Southern Blot Analysen auf Plasmid-DNA nach Restriktion mit dem Enzym *NotI*.

A Auswertung der Autoradiographie nach Hybridisierung mit der *gag*-Sonde. **B** Signale nach Hybridisierung mit der *env*-C-Sonde. Spuren 1 und 5 entsprechen Plasmid-DNA mit dem Insert von Klon 1211, Spuren 2 und 6 entsprechen Klon 1312, Spuren 3 und 7 zeigen Klon 4112 und die Spuren 4 und 8 zeigen *gag* und *env*-C Signale bei Klon 6121.

3.1.5 Analyse der PERV Sequenzen

Die Sequenzen der vier subklonierten Phagen-Inserts in den pBluescript Vektor wurde mit Hilfe des Programms VectorNTI[®] (Invitrogen) eine Analyse für offene Leserahmen und weitere retrovirale Sequenzen bei den Klonen 1211, 1312 und 6121 durchgeführt. Ein vierter Klon, 4112, wurde nicht weiter berücksichtigt, da er lediglich Teile der *env*-C Sequenz enthielt. Als Referenzsequenz diente die publizierte Sequenz PERV-MSL (Akiyoshi et al., 1998) und die Sequenz des Molekularklons PERV-B(33)/ATG (Czuderna et al., 2000). Der Klon 1211 zeigt einen kolinearen offenen Leserahmen zu PERV-MSL für das *gag*- und das *pol*-Gen. Das *env*-Gen ist trunziert, was auf die Klonierungsstrategie der Phagenbibliothek (siehe 2.4.6) zurückzuführen ist. Der Klon beinhaltet insgesamt 7560 Nukleotide retrovirale Sequenz und 5' stromaufwärts 5268 Basenpaare genomische Flanke. Stromabwärts konnte keine 3' Flanke isoliert werden, da die Sequenz durch die Schnittstelle *Sau3AI* im *env*-Gen endet. Der Klon 6121 zeigt einen verkürzten offenen Leserahmen für das *gag*-Gen und jeweils zwei offene Leserahmen im Bereich des *pol*-Gens. Dies ist bedingt durch ein Stopkodon an Position 5612 (bezogen auf die Nukleotidsequenz des Klons 1312). Das *env*-Gen zeigt eine kolineare Länge zu der PERV-MSL Sequenz. Der Klon beinhaltet an retroviraler Sequenz 7005 Nukleotide und 3'

stromabwärts 4179 Basenpaare genomische Flanke. Der einzige Klon, der alle drei offene Leserahmen für die *gag*-, *pol*-, und *env*-Gene enthält und zudem eine 5` genomische Flanke und eine 3` genomische Flanke aufweist, ist der Phagen-Nummer 1312. Die drei offenen Leserahmen für die drei Strukturgene bei einfachen Retroviren (Coffin et al., 1997) entsprechen in ihrer Länge der PERV-MSL-Sequenz. Flankiert werden die drei Strukturgene von einer LTR mit jeweils 611 Basenpaaren. 5` stromaufwärts der proviralen Sequenz wurden 2819 Basenpaare genomische Flanke isoliert und 3` stromabwärts 2503 Nukleotide. Die Sequenzen der drei isolierten proviralen Sequenzen mit den offenen Leserahmen sind in Abb. 3.5A schematisch dargestellt. In der Sequenz von Klon 1312 finden sich alle wichtigen retroviralen Merkmale. Der Transkriptionsstartpunkt (cap site) befindet sich an Position 457, die Primer Bindestelle bei Nukleotid 614-631. Eine Splicedonor-Position (856-864) und eine Spliceakzeptor-Stelle (nt 5857) konnten ebenfalls identifiziert werden. Die Spaltstelle des Hüllproteins in Oberflächenprotein und Transmembrandomäne ist bei Nukleotid 7417 lokalisiert. Der Polypurintrakt befindet sich bei Position (8049-8061) und das Polyadenylierungssignal (pA) ist in der 3`LTR bei Nukleotid (8573-8578) lokalisiert (Abb. 3.5B).

Ein Vergleich der Nukleotidsequenz von PERV-MSL (Akiyoshi et al., 1998) und PERV-C(1312) zeigt einen Austausch von 10 Nukleotiden, die verteilt in dem *gag*, *pol* und *env*-Gen vorkommen. Die häufigste Punktmutation stellt ein Austausch von Guanin zu Adenin dar. Die restliche Sequenz ist homolog zu der von PERV-MSL. Der Nukleotidaustausch führt an sieben Positionen zu einer veränderten Aminosäure. Die Punktmutationen und daraus resultierende veränderte Aminosäuren sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

nt Position	PERV-MSL	PERV-C(1312)	Gen	AS Austausch PERV-MSL > PERV-C(1312)	AS Position
1259	G	A	<i>gag</i>	V > I	67
3808	A	G	<i>pol</i>	-	391
4650	G	A	<i>pol</i>	G > E	672
5563	C	G	<i>pol</i>	H > Q	976
5842	T	C	<i>pol</i>	-	1069
6916	G	A	<i>env</i>	S > N	274
7022	A	G	<i>env</i>	-	308
7386	G	A	<i>env</i>	E > K	431
7755	G	A	<i>env</i>	E > K	554
7828	T	C	<i>env</i>	L > P	578

Tab. 3.1: Nukleotid- und Aminosäureaustausch in PERV-C(1312). Linke Spalte, Nukleotidpositionen, an denen ein Austausch einer Base stattgefunden hat; Spalten "PERV-MSL" und "PERV-C(1312)" zeigen die

jeweilige ausgetauschte Base. Spalte "Gen", Lokalisation der Base in dem entsprechenden Gen; Spalte "AS Austausch", Austausch der spezifischen Aminosäure bezogen auf die dementsprechende Base. Der Strich deutet an, dass es trotz Punktmutation in der Nukleotidsequenz zu keinem AS Austausch kam. Spalte „AS Position“, Lokalisation der ausgetauschten Aminosäure bezüglich des entsprechenden Proteins; nt, Nukleotid; AS, Aminosäure.

Aufgrund der Tatsache, dass lediglich der Klon 1312 alle retroviralen Gensequenzen umschließt, wurde dieser funktional charakterisiert, während Klon 1211 und 6121 nicht weiter untersucht wurden.

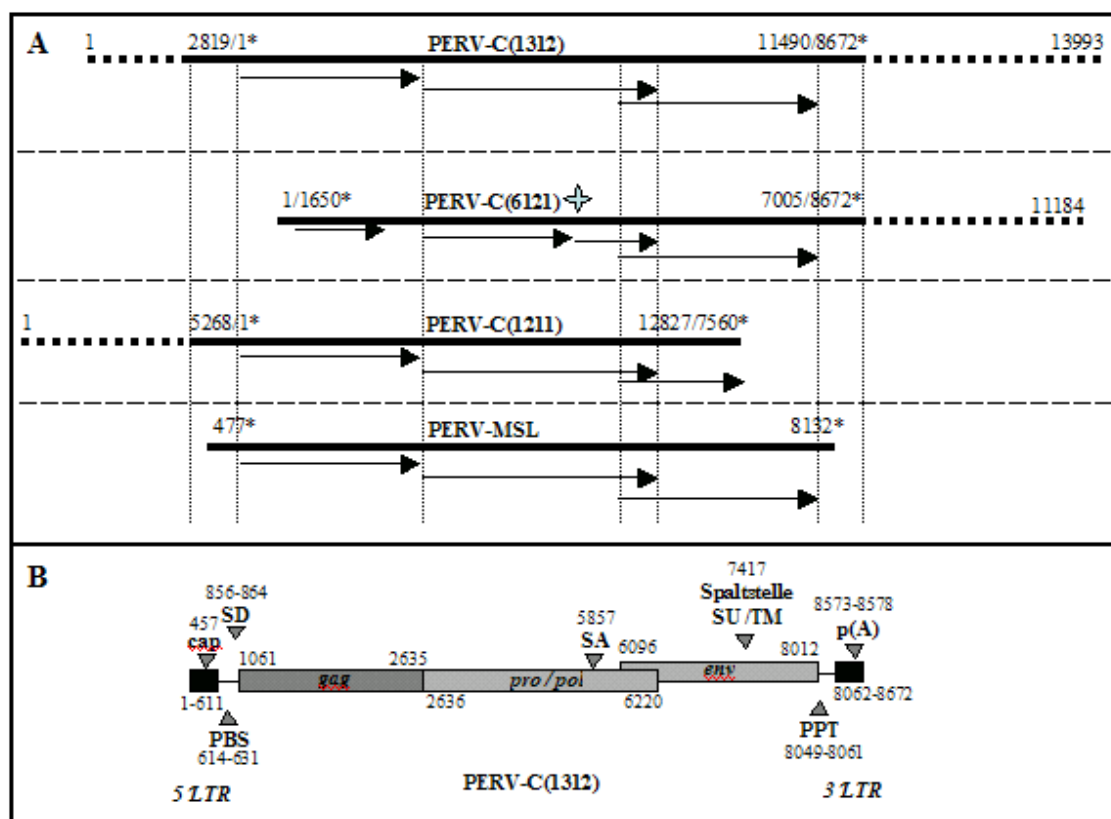


Abb. 3.5: Analyse von PERV Sequenzen. **A** Durchgezogene Linien, proviralen Sequenzen; gestrichelten Linien, genomischen Flanken, die aus der genomischen Phagenbibliothek isoliert worden sind; Zahlen ohne Stern, Nukleotidanzahl der jeweiligen Klone; Zahlen mit den Sternchen, Nukleotide in der PERV-MSL-Sequenz; Pfeile; offene Leserahmen der retroviralen Gene **B** Schematische Struktur des Klons 1312. Die Gene sind in Rechtecken dargestellt. Die Zahlen beziehen sich auf die jeweiligen Start- und Endpunkte der retroviralen Sequenzen. cap, Transkriptionsstartpunkt; PBS, Primer Bindestelle; SD, Splicedonor; SA, Spliceakzeptor; PPT, Polypurintrakt; pA, Polyadenylierungssignal.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen der PERV-MSL und der PERV-C(1312) Sequenz zeigt in einem Aminosäurebereich im SU des Env-Proteins an der ersten Aminosäureposition einen Austausch zu der publizierten PERV-C Sequenz (Abb.3.6). Dieser Aminosäurebereich ist verantwortlich für die Anheftung von PERV-C Partikeln an humane Zellen (Gemeniano et al., 2006).

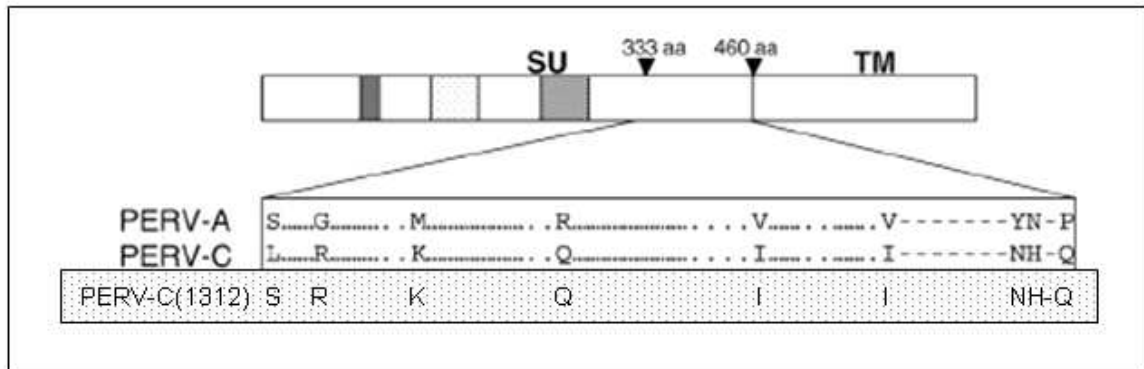


Abb. 3.6: Aminosäurevergleich zwischen PERV-A, PERV-C und PERV-C(1312) im Oberflächenanteil des Env-Proteins. Die Regionen VRA, VRB und PRR sind in dem Obeflächenanteil als graue und schraffierte Boxen dargestellt. SU, Oberflächenanteil; TM, Transmembranprotein, aa, Aminosäure (modifiziert nach Gemeniano et al., 2006).

Ein Sequenzvergleich auf Aminosäureebene zwischen dem Env von MLV und PERV-C(1312) zeigt zwischen Env-C und einem polytropen Env von MLV (Evans et al., 2003) eine Homologie von 39,3 %, die größte Übereinstimmung liegt im Transmembranprotein. Ein Vergleich mit einem ecotropen Env von MLV (Lund et al., 1999) zeigt eine Homologie von 39,7 %, dessen Schwerpunkt der Homologie ebenfalls im TM liegt.

3.1.6 Struktur und Aufbau der PERV Long Terminal Repeats (LTR)

Im Genom von Schweinen befinden sich zahlreiche Kopien der LTR Sequenzen. Dabei scheint die Häufigkeit dieser Sequenzen nicht extrem zwischen den Schweinerassen zu differieren (Patience et al., 1997; Czauderna et al., 2000). Bislang wurde die LTR des Molekularklons PERV-B(33)/ATG funktional charakterisiert (Scheef et al., 2001, Scheef et al., 2002). Die LTR für PERV-B(33)/ATG, wie auch die von PERV-A(42), enthalten mehrere repetitive DNA-Sequenzen (Repeats) die jeweils eine Länge von 39 bp aufweisen. Diese Wiederholungen werden weiter unterteilt in Teilwiederholung 1 und 2 (Subrepeat 1

und 2). Die LTR Sequenzen unterscheiden sich hauptsächlich in dem Vorhandensein dieser Repeats und somit in ihrer Gesamtlänge. Im R- und U5-Bereich sind die Sequenzen zwischen PERV-A(42), PERV-B(33)/ATG und PERV-MSL bzw. PERV-C(1312) annähernd homolog. Die LTR von PERV-B(33)/ATG weist viereinhalb Repeats auf, PERV-A(42) enthält dreieinhalb Repeats (Abb. 3.6). In der PERV-MSL Sequenz kommt insgesamt ein Repeat vor, wobei die Subrepeats nicht zusammenhängen und im 5` Anteil bzw. am Ende des 3` Anteils im U3-Bereich verteilt sind. Die LTR des Molekularklons PERV-C(1312) enthält eine zusammenhängende Wiederholung im U3-Bereich (Abb. 3.7). Die LTR von PERV-MSL wurde vervollständigt, da es sich bei der publizierten Sequenz um eine mRNA handelt (Akiyoshi et al., 1998).

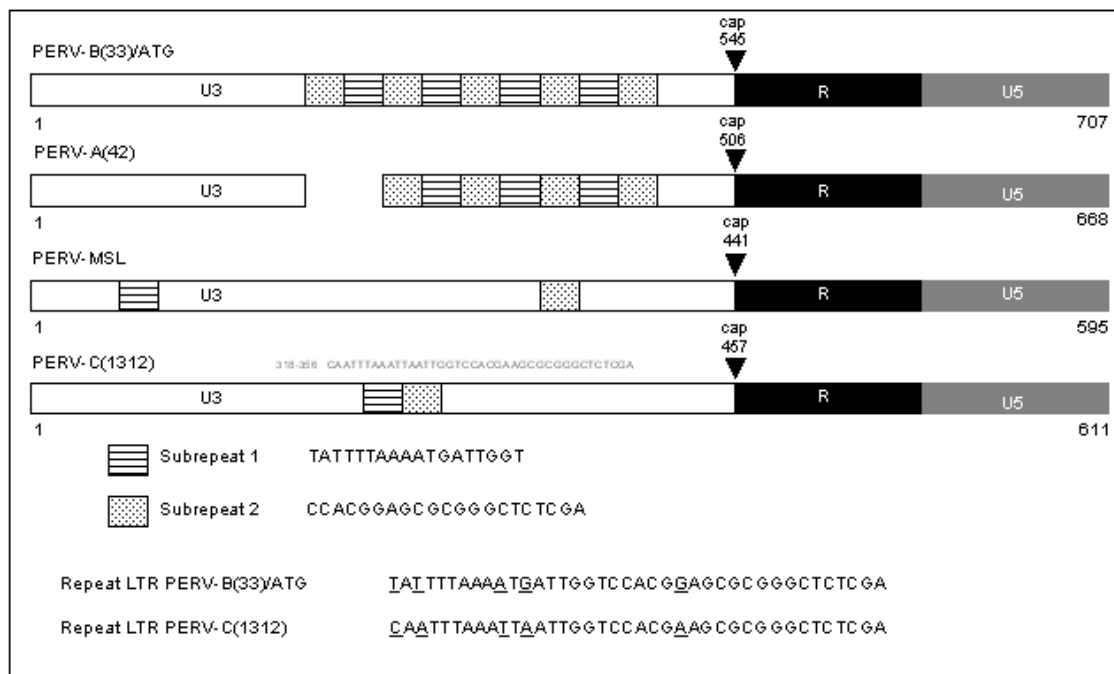


Abb. 3.7: Aufbau und Organisation verschiedener PERV LTR. Schematischer Vergleich der LTR von PERV-B(33)/ATG, PERV-A(42), PERV-MSL und PERV-C(1312). Im unteren Bereich ist ein Vergleich einer Repeat Sequenz von PERV-B(33)/ATG und PERV-C(1312) aufgeführt. Die unterstrichenen Nucleotide zeigen den Austausch einzelner Basen innerhalb der Repeat Sequenz. Weißer Kasten, U3-Bereich mit Repeats; gepunkteter Kasten, Subrepeat 1; Kasten mit horizontal durchgezogenen Linien, Subrepeat 2; schwarzer Kasten, R-Region; graue Box, U5-Bereich; cap site, schwarzer Pfeil. Die Subrepeats 1 und 2 zeigen die Nucleotidsequenz des Molekularklons PERV-B(33)/ATG.

Ein Vergleich der LTR Sequenzen von PERV-MSL und PERV-C(1312) zeigt 17 Punktmutationen in der Wiederholung und in der restlichen U3-Region (Tab. 3.2). Im

Bereich der Nukleotidsequenz 229-387 (bezogen auf die PERV-MSL LTR) sind die beiden LTRs sehr unterschiedlich in ihrer Sequenz (siehe Anhang).

Nukleotidposition in der PERV-MSL LTR	Nukleotid in PERV-MSL	Nukleotid in PERV-C(1312)
42	T	A
83	G	A
95	T	-
137	T	C
147	A	G
150	C	T
184	C	A
207	C	T
224	C	G
393	T	C
440	C	G
441	C	G
471	T	C
560	C	T
571	A	G
574	A	G
581	C	T

Tab. 3.2 Nukleotidvergleich der LTR Sequenzen von PERV-MSL und PERV-C(1312). Der Strich an Position 95 zeigt eine Deletion der Base im Vergleich zu PERV-MSL.

3.1.7 Nachweis von PERV-C RNA in infizierten Zellen

Durch eine Northern Blot Analyse sollte festgestellt werden, ob eine transkriptionelle Aktivität von PERV-C(1312) nach Infektion von ST-IOWA Zellen nachweisbar ist (Abb. 3.8). Hierfür wurden gleiche Mengen an gesamt-cytoplasmatischer RNA glyoxiliert und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Membran wurde mit der *env*-C-Sonde hybridisiert. Die Negativkontrolle, bei der RNA von 293 Zellen verwendet wurde, zeigt kein Signal, bei der Spezifitätskontrolle ist ebenfalls kein Signal auf RNA von 293B(33)/ATG Zellen nachweisbar. Weiterhin konnte in der RNA aus uninfizierten ST-IOWA Zellen keine transkriptionelle Aktivität nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu wurden auf RNA von

ST-IOWA Zellen, infiziert mit dem Moleklarklon PERV-C(1312), zwei starke Signale detektiert, die jeweils den Größen der genomischen PERV RNA mit einer Größe von 8121 bp und der gespleißten *env*-RNA (2,721 bp) entsprechen. RNA aus MAX-T Zellen diente als Positivkontrolle, für die, korrelierend zu den Signalen aus infizierten ST-IOWA, ebenfalls zwei starke Hybridisierungssignale detektierbar sind.

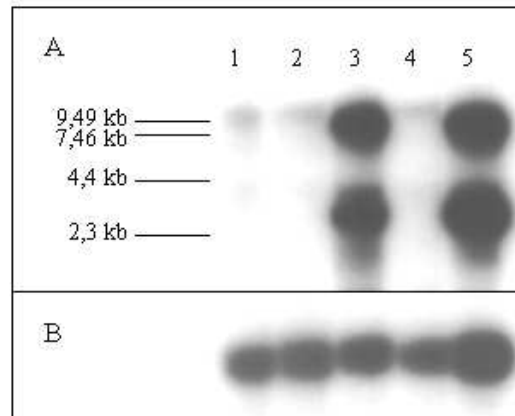


Abb. 3.8: Nachweis transkriptioneller Aktivität des Moleklarklons PERV-C(1312). Gleiche Mengen an cytoplasmatischer RNA wurden mit der *env*-C-Sonde hybridisiert. **A** Die drei RNAs von 293FT- (Spur 1), 293B(33)/ATG- (Spur 2) und uninfizierten ST-IOWA-Zellen (Spur 4) zeigen keine Hybridisierungssignale. Bei MAX-T-Zellen (Spur 3) und ST-IOWA-Zellen, infiziert mit PERV-C(1312) (Spur 5), sind Signale detektierbar. **B** Die Hybridisierung mit einer β -Aktin Sonde (Stratagene) als Ladekontrolle zeigt, dass gleiche Mengen an RNA für die Northern Blot Analyse eingesetzt wurden.

3.1.8 Morphologie von PERV Partikeln

Zur Überprüfung, ob MAX-T Zellen PERV Partikel freisetzen, die in der Lage sind ST-IOWA Zellen produktiv zu infizieren, wurden EM-Analysen durchgeführt (mit freundlicher Unterstützung von Dr. Klaus Boller). Abb. 3.9 zeigt unterschiedliche Stadien der Viruspartikel, es werden sowohl reife Partikel, als auch knospende Partikel aus unterschiedlichen Zelllinien gezeigt, die der Morphologie von PERV entsprechen (Armstrong et al., 1971). Die Struktur der Envelope-Proteine aus MAX-T Zellen entspricht in der Morphologie den Partikeln, die aus infizierten ST-IOWA Zellen freigesetzt werden. Im Vergleich zeigen PERV-B Partikel, die aus 293 Zellen knospen (Czauderna et al., 2000), eine glatte Struktur der Env-Proteine. Während der Reifung der Partikel ist zu erkennen, dass der Kern kondensiert wie es bei C-Typ Retroviren der Fall ist (Coffin et al., 1997).

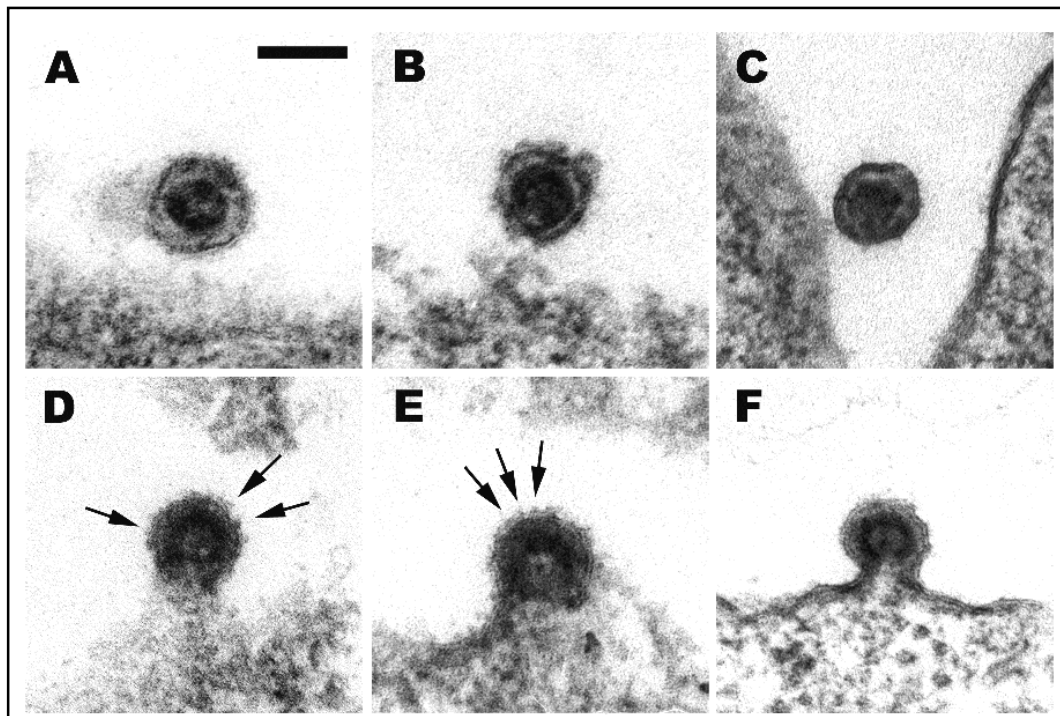


Abb. 3.9: Elektronenmikroskopische Struktur nativer PERV (mit freundlicher Unterstützung von Dr. Klaus Boller). Die Abbildung zeigt unreife knospende Partikel aus MAX-T (D), infizierten ST-IOWA (E) und 293B(33)/ATG Zellen (F) und reife Partikel von MAX-T (A), infizierten ST-IOWA (B) und 293B(33)/ATG Zellen (C). Die Pfeile deuten auf die Struktur der Envelope-Proteine auf den PERV-C Partikeln. Der Maßstab entspricht 100 nm (A).

3.1.9 Nachweis von RT-Aktivität im Überstand nach Infektion durch den Moleklarklon PERV-C(1312)

Um das Replikationspotential des isolierten Moleklarklons PERV-C(1312) zu testen, wurde ein RT-Test durchgeführt. Initial wurde RT-positiver zellfreier Überstand von MAX-T Zellen mit 1800 milli Units auf uninfizierte ST-IOWA Zellen gegeben, um generell zu überprüfen, ob MAX-T Zellen infektiöse Partikel freisetzen. Ab Tag sechs nach der Infektion ist ein Anstieg der RT-Aktivität zu beobachten, der sich fortsetzt bis Tag 20 (Abb. 3.10, Linie mit Sternen). Für den Nachweis der Replikationskompetenz von PERV-C(1312) wurde als Negativkontrolle 1 µg Plasmid-DNA in 293 und HT1080 Zellen transfiziert. Für die Infektionsstudie wurden in zwei Ansätzen jeweils 1 µg Plasmid bzw. 2 µg Plasmid DNA in ST-IOWA Zellen transfiziert. Für die beiden humanen Zelllinien HT1080 und 293 konnte kein Anstieg der RT-Aktivität gemessen werden, was den

ecotropen Wirtstropismus von PERV-C bestätigt (Takeuchi et al., 1998). Eine weitere Negativkontrolle bestand in der Zugabe von RT-positivem Überstand von MAX-T Zellen auf 293 Zellen. Hierfür konnte ebenfalls nach Kultivierung der 293 Zellen keine RT-Aktivität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Bei untransfizierten ST-IOWA Zellen konnte keine RT-Aktivität gemessen werden (Abb. 3.10, Linie mit Punkten). Die transfizierten ST-IOWA Zellen wurden für 24 Tage post-Transfektion kultiviert. Im Anschluß wurde der zellfreie Überstand von beiden Transfektionsansätzen unabhängig mit jeweils 239 mU/ml gemessener RT-Aktivität verwendet, um naive ST-IOWA Zellen zu infizieren. Die Kurve für die infizierten ST-IOWA Zellen zeigt den gebildeten Mittelwert der beiden Infektionsansätze. 15 Tage nach der Infektion war eine RT-Aktivität detektierbar, die im weiteren Verlauf der Kultivierung der infizierten ST-IOWA Zellen anstieg und ab Tag 38 nach der Infektion wieder zurückging (Abb. 3.10, Linie mit Quadraten).

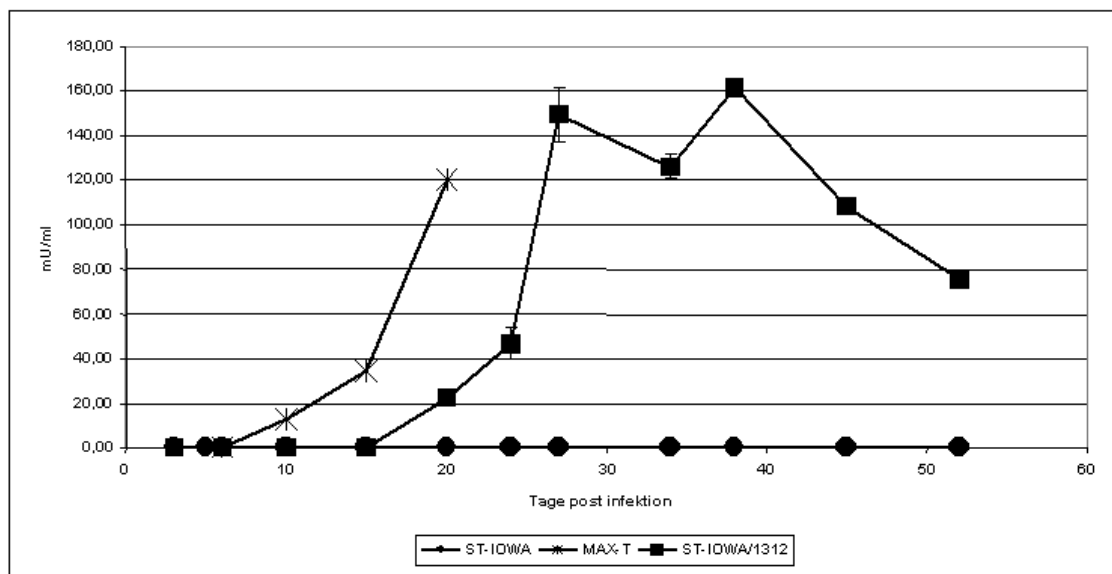


Abb. 3.10: Replikationskompetenz von PERV-C(1312). Kultivierung von ST-IOWA Zellen mit RT-positivem Überstand von MAX-T Zellen (Linie mit Sternen). RT-Aktivität der infizierten ST-IOWA Zellen nach Kultivierung mit RT-positivem Überstand von transfizierten ST-IOWA Zellen mit dem Molekularklon PERV-C(1312), Linie mit Quadraten; untransfizierte ST-IOWA Zellen, Linie mit Punkten.

3.1.10 Integrationsnachweis des retroviralen Molekularklons PERV-C(1312)

Nach dem Nachweis der Replikationskompetenz des Molekularklons PERV-C(1312) durch gemessene RT-Aktivität in zellfreiem Zellkulturüberstand von infizierten ST-IOWA Zellen (siehe 3.1.9) wurde durch eine PCR die Integrationsfähigkeit von PERV-C(1312) nach Infektion von ST-IOWA Zellen verifiziert. Hierfür wurden die PCR-Primer der *env*-C-Sonde verwendet (siehe 2.4.3.1 und 3.1.1). Als Negativkontrolle wurde die PCR ohne DNA (Wasserkontrolle) und auf genomischer DNA von naiven ST-IOWA Zellen durchgeführt. Für beide Kontrollansätze war kein Signal nachweisbar (Abb. 3.11). Als Positivkontrolle wurde Plasmid-DNA des Molekularklons PERV-C(1312) eingesetzt. Hierfür war das spezifische Signal mit einer Größe von 281 Basenpaaren nachweisbar. Genomische DNA von infizierten ST-IOWA Zellen zeigt ebenfalls wie die Positivkontrolle das erwartete Signal, allerdings ist die Bande von der Intensität schwächer (Abb. 3.11).

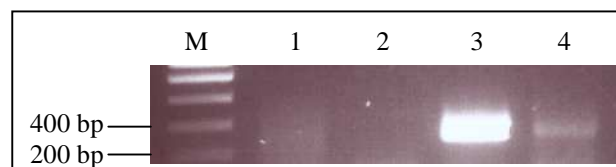


Abb. 3.11: Integrationsnachweis durch PCR auf genomischer DNA und Plasmid-DNA. M, Smart ladder Marker (Eurogentec). Spur 1, genomische DNA aus uninfizierten ST-IOWA-Zellen; Spur 2, Negativkontrolle mit H₂O; Spur 3, Positivkontrolle auf Plasmid-DNA des Molekularklons PERV-C(1312); Spur 4, genomische DNA aus mit PERV-C(1312) infizierten ST-IOWA Zellen; PCR-Produkt: 281 Basenpaare.

3.2 Rekombinationsversuche zwischen PERV-B(33)/ATG und PERV-C(1312)

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand in der Untersuchung von Rekombinationsereignissen zwischen verschiedenen PERVs. Da bereits statistische Auswertungen von Rekombinationen zwischen den drei PERV Klassen publiziert wurden (Klymiuk et al., 2002; Klymiuk et al., 2003) und eine Rekombinante zwischen PERV-A und PERV-C näher charakterisiert wurde (Wilson et al., 1998), war das Ziel eine mögliche

Rekombinante zwischen PERV-B und PERV-C zu finden und diese dann zu charakterisieren. Dazu wurden die Sequenzen der beiden Moleklarklone PERV-B(33)/ATG und PERV-C(1312) als Basis genutzt, um bekannte Nukleotidsequenzen für den Ansatz zu verwenden und um dadurch Rückschlüsse ziehen zu können in welchen definierten Bereichen eventuelle Rekombinationen am häufigsten stattfinden. Ziel und Erwartung dabei war, dass die Partikel so rekombinieren, dass PERV-C(1312) als Donor für die provirale Sequenz fungiert und lediglich die Rezeptor-Binde-Domäne (RBD) im *env*-Gen durch die Sequenz von PERV-B(33)/ATG durch Rekombination ausgetauscht wird.

Hierzu wurde 1 µg Plasmid DNA des Moleklarklons PERV-C(1312) in 293 Zellen transfiziert, die konstitutiv PERV-B(33)/ATG Partikel freisetzen (Czuderna et al., 2000). Die transfizierten Zellen wurden für insgesamt vier Wochen kultiviert. Jeweils nach einer Woche wurden die Zellen gesplittet und mit naiven, uninfizierten 293FT Zellen im Verhältnis 1:1 gemischt. Aus den 50 % der Zellen, die durch das splitten wegfielen, wurde genomische DNA präpariert. Anschließend wurde auf dieser DNA eine PCR mit Primern durchgeführt, die sowohl PERV-B als auch PERV-C spezifisch waren. Die Amplifikate wurden in den Vektor pGEMTEasy kloniert. Pro Woche wurden 10 Klone sequenziert. Die Auswertung der Sequenzen über vier Wochen zeigt, dass nach der ersten Woche jeweils 5 Sequenzen für PERV-C(1312) und PERV-B(33)/ATG nachgewiesen werden können. In der zweiten Woche zeigt ein Klon die PERV-C(1312) und 9 Klone die PERV-B(33)/ATG spezifische Sequenz. Nach drei bzw. vier Wochen zeigen die Klone ausschließlich die spezifische PERV-B(33)/ATG Sequenz. (Tab. 3.4). Die Ergebnisse zeigen, daß der Moleklarklon PERV-C(1312) die Fähigkeit besitzt, nach Transfektion der 293B(33)/ATG Zellen in das Genom der Zelle zu integrieren. Die Auswertung der Sequenzen zeigt vier Punktmutationen in den neu erhaltenen PERV-B Sequenzen, die für die vier Wochen nachgewiesen werden können. (Tab. 3.3).

Nukleotidposition in PERV-B(33) <i>env</i> -Gen	Nukleotid in PERV(B)33/ATG <i>env</i> -Sequenz	Nukleotid in sequenzierten Klonen
374	A	G
380	G	A
817	T	C
1215	G	C

Tab. 3.3: Nukleotidaustausche im *env*-Gen von PERV-B(33)/ATG.

	<u>PERV-B</u>	<u>PERV-C</u>
Woche 1:	5	5
Woche 2:	1	9
Woche 3:	-	10
Woche 4:	-	10

Tab. 3.4: Vorkommen von spezifischen PERV Sequenzen in genomischer DNA von 293FT Zellen. Nach PCR auf genomischer DNA wurden die Amplifikate subkloniert und anschließend sequenziert. Die Tabelle beschreibt die Häufigkeit von PERV in genomischer DNA nach Sequenzierung.

Aufbauend auf dem Sequenzierungsansatz wurden verschiedene PCR auf den präparierten genomischen DNAs über die vier Wochen durchgeführt. Dabei wurden jeweils PERV-B(33)/ATG und PERV-C(1312) spezifische Primer verwendet. Insgesamt wurden vier PCR-Ansätze durchgeführt, ein Ansatz bestand in der Verwendung der beiden PERV-C(1312) spezifischen Primer, ein weiterer in der Anwendung der PERV-B(33)/ATG spezifischen Primer. Bei den zwei zusätzlichen Versuchen wurde jeweils ein Primer für PERV-C(1312) mit einem PERV-B(33)/ATG spezifischen Primer verwendet, um festzustellen, ob eine Rekombination stattgefunden hat, die als Folge eine Bindung von zwei unabhängigen sequenzspezifischen Primern in einem PCR-Ansatz hat. Eine Übersicht der verwendeten Primer ist in Abb. 3.12 dargestellt. Das Amplifikat für die spezifische PERV-C(1312) Sequenz (Positivkontrolle für die PERV-C Primer, Abb. 3.13, B Spur 2) zeigt eine Größe von 1264 bp, die Größe des PERV-B(33)/ATG spezifischen Amplifikats (Positivkontrolle für die PERV-B Primer, Abb. 3.13, A Spur 1) beträgt 1313 bp. Für beide sequenzspezifischen PCR-Ansätze ist für alle vier Wochen ein Signal detektierbar (Abb. 3.13, A und B, Spur 4-7). Bei der PERV-B(33)/ATG spezifischen Sequenz bleibt die Intensität des Signals gleich während bei der PERV-C(1312) spezifischen PCR das Signal mit zunehmendem zeitlichem Verlauf des Kulturansatzes schwächer wird. Für Woche 4 ist lediglich ein sehr schwaches Signal detektierbar (Abb. 3.13, B Spur 7). Dieses Ergebnis korreliert mit den Sequenzierungsdaten, wo mit fortschreitendem Verlauf des Versuchs die PERV-C Sequenzen ab Woche 3 nicht mehr nachweisbar sind. Durch die PCR ist es möglich noch für die dritte Woche PERV-C spezifische Sequenzen zu amplifizieren. Für den Nachweis von Rekombinationsereignissen wurden zwei verschiedene Ansätze durchgeführt. Zum einen wurde eine PCR mit dem PERV-B spezifischen forward Primer

und dem PERV-C spezifischen reverse Primer durchgeführt (Abb. 3.12, C; Abb. 3.13, C). Es zeigt sich bei den Kontrollen kein Signal, was die Spezifität der Primer bestätigt. Ein Signal zwischen 1264 und 1313 bp, welches bei einer möglichen Rekombination zu erwarten wäre, ist für alle Proben nicht detektierbar. Bei dem zweiten Ansatz wurden die Primer vertauscht, so dass der forward PERV-C und der reverse Primer PERV-B spezifisch binden (Abb. 3.12, D; Abb. 3.13, D). Auch in diesem Ansatz ist kein Signal detektierbar. Stattdessen zeigt die PCR unspezifische Amplifikate bei allen Proben mit Ausnahme der Wasserkontrolle (Abb. 3.13, D Spur 3).

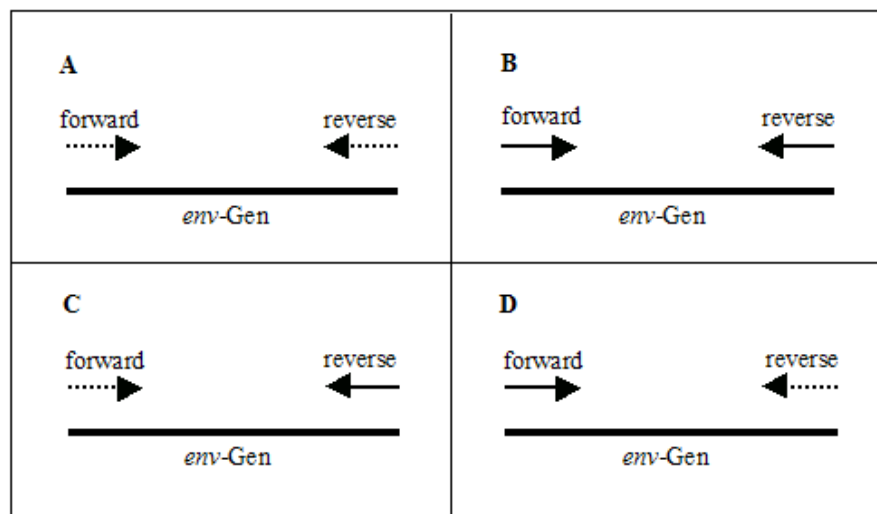


Abb. 3.12: Verwendete Primer-Paare zur Rekombinationsanalyse auf genomischer DNA. Gestrichelte Pfeile, PERV-B(33)/ATG spezifische Primer; durchgezogene Pfeile, PERV-C(1312) spezifische Primer; forward, forward Primer; reverse, reverse Primer; *env-Gen*; Bereiche im *env-Gen* wurden als DNA-Template für die PCR verwendet **A** PERV B(33)/ATG spezifische PCR **B** PERV-C(1312) spezifische PCR **C** Rekombinationsanalyse mit PERV-B(33)/ATG forward und PERV-C(1312) reverse Primer **D** Rekombinationsanalyse mit PERV-C(1312) forward und PERV-B(33)/ATG reverse Primer.

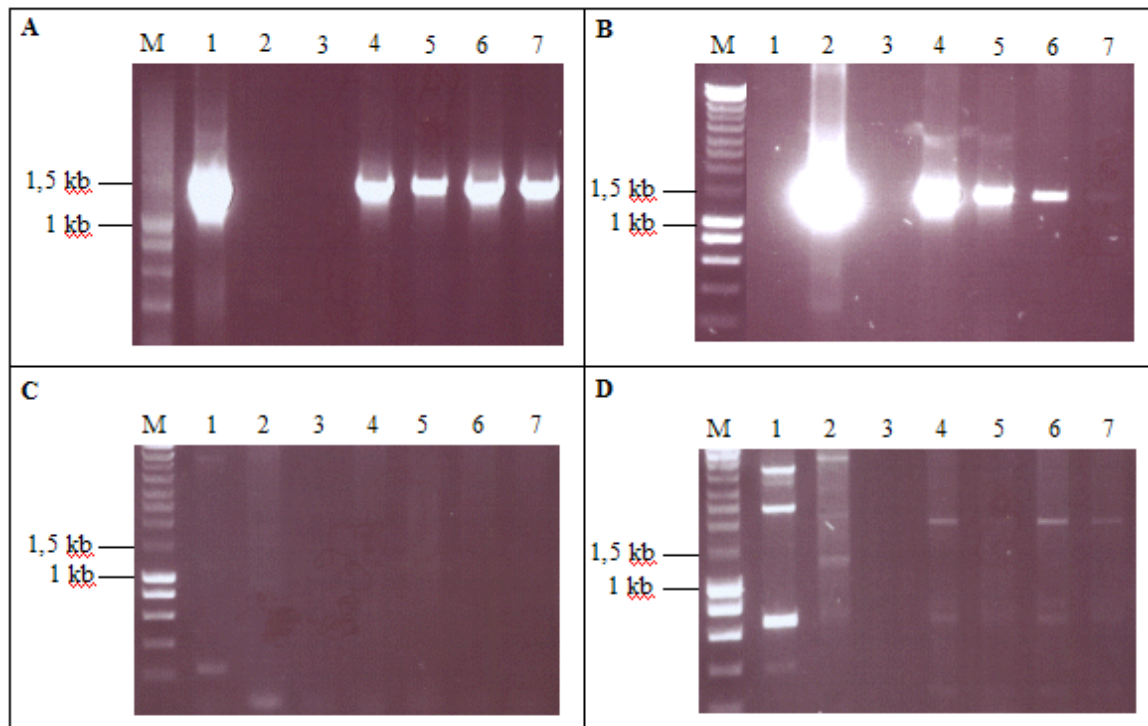


Abb. 3.13: Nachweis von PERV Sequenzen auf genomischer DNA und Plasmid-DNA. M, Smart ladder Marker. Spur 1, Kontroll-PCR auf Plasmid-DNA des Molekularklons PERV-B(33)/ATG; Spur 2, Kontrolle auf Plasmid-DNA des Molekularklons PERV-C(1312); Spur 3, Negativkontrolle mit Wasser; Spuren 4-6, PCR auf genomischer DNA von infizierten 293-Zellen im Verlauf des Rekombinationsexperiments. Spur 4, Woche 1; Spuren 5 und 6 entsprechen Woche 2 und 3, Spur 7, Woche 4. **A** Nachweis von PERV-B(33)/ATG spezifischen Sequenzen **B** Nachweis von PERV-C(1312) spezifischen Sequenzen **C** Nachweis von PERV-Sequenzen mit einem PERV-B spezifischen forward und einem PERV-C spezifischen reverse Primer **D** Nachweis von PERV-Sequenzen mit einem PERV-C spezifischen forward und einem PERV-B spezifischen reverse Primer.

Ein dritter Ansatz wurde zur Analyse der Pseudotypisierung von PERV-C Partikeln mit dem Envelope-Protein des Molekularklons PERV-B(33)/ATG durchgeführt. Hierzu wurde eine Transfektion eines Plasmids, das für den offenen Leserahmen des Env-Proteins der Klasse B von PERV kodiert, in MAX-T Zellen durchgeführt. Da MAX-T Zellen konstitutiv PERV-C Partikel freisetzen, bestand der Ansatz darin, dass diese gebildeten Partikel zusätzlich zum Env-C Protein teilweise das Envelope-Protein der Klasse B von PERV während der Knospung der Partikel aus den Zellen inkorporieren. Diese Virionen sollten somit in der Lage sein, humane Zellen aufgrund des Vorhandenseins des polytropen Envelope B Proteins infizieren zu können (Patience et al., 1997). Zur Generierung des Plasmids für die Transfektion wurde mittels des Restriktionsenzym *MscI* das *gag*-Gen und das *pol*-Gen aus dem Plasmid pBS-PERV-B(33)/ATG zum größten Teil deletiert, wodurch

diese beiden Gene funktionsunfähig wurden. Lediglich der offene Leserahmen des *env*-Gens blieb in diesem Konstrukt intakt. Das Plasmid wurde in verschiedenen Konzentrationen (0,5-1,5 µg DNA) in MAX-T Zellen transfiziert (siehe 2.3.4.1). Fünf Tage nach Transfektion wurden die verschiedenen Transfektionsansätze zusammengeführt und kultiviert. Der Überstand bei der Zusammenführung der Zellen (Ansatz mit DNA und die Mock-Kontrolle, Transfektion ohne DNA) wurde sterilfiltriert und für eine mögliche Infektion auf naive humane 293T-Zellen gegeben. Als Negativkontrolle wurde parallel der Versuch mit einer Mock-Kontrolle durchgeführt. Die 293T Zellen wurden nach Zugabe des Überstands für zehn Tage kultiviert und passagiert. Dabei wurde an den Tagen, an denen die Zellen gesplittet wurden, Überstand für eine Messung der RT entnommen. Eine Aktivität der RT wäre messbar, wenn die PERV-C Virionen zusätzlich Env-B Proteine auf ihrer Oberfläche präsentieren und somit in der Lage wären die humanen Zellen zu infizieren. Für die MAX-T Zellen konnte während der gesamten Durchführung des Experiments eine relativ konstante Aktivität der RT gemessen werden. Dies entspricht den Erwartungen, da MAX-T Zellen konstitutiv PERV-C Partikel freisetzen, deren RT im Überstand detektierbar ist. Für die potentiell infizierten 293T Zellen ist keine RT-Aktivität detektierbar, die Messwerte entsprechen der Mock-Kontrolle bzw. dem Hintergrund, bei dem kein Transfektionsmedium bzw. keine DNA eingesetzt wurde. Die Werte der Messung sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

	Tage nach Transfektion	Extinktion / mU pro ml bei 405 nm	Mock
MAX-T Zellen	5	1,08 / 206	0,7
	7	0,87 / 124	0,65
	11	1,03 / 203	0,83
	15	1,17 / 230	1,06
	18	1,05 / 206	0,88
	20	1,19 / 230	1
	Tage nach potentieller Infektion	Extinktion / mU pro ml bei 405 nm	Mock
293T Zellen	5	0,06 / 0	0,06
	9	0,06 / 0	0,06
	12	0,06 / 0	0,06
	14	0,06 / 0	0,06
Kontrollen	Extinktion / mU pro ml bei 405 nm		
293 PERV-PK	1,07 / 206		
ST-IOWA PERV-C	0,39 / 77		
293T untransfiziert	0,06 / 0		
MAX-T untransfiziert	1,09 / 206		
Hintergrund	0,06 / 0		

Tabelle 3.5: RT-Aktivität in zellfreien Überständen verschiedener Zelllinien. Die Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt. 293 PERV-PK, 293 Zellen, infiziert mit PERV-A und PERV-B Partikeln aus der Zelllinie PK15 (Patience et al., 1997); ST-IOWA PERV-C, ST-IOWA Zellen, infiziert mit Virionen des Molekularklons pBS-PERV-C(1312); Mock, Messwert der Extinktion bei 405 nm, es handelt sich dabei um eine Negativkontrolle, in der Transfektionsmedium ohne DNA verwendet wurde. mU pro ml, Milliunits pro Milliliter.

3.3 Immunologische Detektion von PERV

3.3.1 Generierung eines spezifischen Antiserums gerichtet gegen das Hüllprotein von PERV-C

Zum Nachweis von PERV-C spezifischen Proteinen wurde eine Generierung und Analyse der Funktionalität eines Antiserums, das gegen den Oberflächenanteil des Envelope Proteins von PERV-C gerichtet ist, durchgeführt. Das Antiserum sollte zum einen Verwendung im Nachweis des isolierten Moleklarklons PERV-C(1312) und zum anderen zur Durchmusterung von Patienten nach Xenotransplantation finden, um so ein Vorhandensein von PERV-C nachzuweisen. Mit Hilfe des Computerprogramms VectorNTI (Invitrogen) wurde anhand der publizierten PERV-MSL Sequenz (Akiyoshi et al., 1998) eine spezifische Peptidsequenz aus dem Envelope Protein von PERV-C ausgewählt. Die Peptidsequenz H₂N-TGQRPPTQGPGSSNI-COOH ist in der Rezeptor-Binde-Domäne des Envelope-Proteins an Aminosäureposition 249 – 264 lokalisiert. Dieses Peptid wurde synthetisch durch die Firma Eurogentec (Belgien) hergestellt und diente zur Immunisierung von Kaninchen zur Generierung des Antiserums. Das Antiserum wird im Verlauf der Arbeit als Anti gp70_c1 bezeichnet. Zusätzlich zu dem polyklonalen Antiserum wurde durch die Firma Morphosys (Martinsried) ein monoklonaler Antikörper generiert, der das Hüllprotein von PERV-C detektiert. Für die Synthese des Antikörpers wurden die Aminosäuren 41-279 des Envelope-Proteins als Basissequenz verwendet. An die schwere Kette des Antikörpers ist ein 6x His-Tag gekoppelt, um somit einen immunologischen Nachweis durchführen zu können. Im Folgenden wird dieser Antikörper als Anti Env-C bezeichnet.

3.3.2 Analyse zur Funktionalität des Antiserums mittels ELISA

Initial wurde ein ELISA Test durchgeführt, um festzustellen, ob die beiden Antiseren mit den Nummern 497 und 498 spezifisch gegen das Envelope Protein von PERV-C reagieren und keine unspezifische Reaktivität gegen andere Proteine zeigen. Hierfür wurde eine 96 Loch-Platte mit 1 mg des Peptids, das zur Immunisierung der Kaninchen verwendet wurde, beschichtet. Anschließend wurde diese beschichtete Platte mit verschiedenen Verdünnungen des jeweiligen Antiserums Anti gp70_c1 des Kaninchen 497 und 498 inkubiert. Beide Antiseren zeigen in dem ELISA Test sehr ähnliche Ergebnisse. Das

Präimmunsersum, also das Serum vor Immunisierung der Kaninchen mit dem spezifischen Peptid, zeigt kein distinktes Signal für die verschiedenen Verdünnungsstufen des jeweiligen Antiserums. Die Werte der gemessenen Extinktion entsprechen der Negativkontrolle, bei der die Löcher der Platte mit PBS (ohne Ca^{2+}) beschichtet wurden. Für die verschiedenen Zeitpunkte, an denen aus dem Kaninchen Antiserum nach Immunisierung gewonnen wurde, ist eine Zunahme der Extinktion messbar. Die Extinktion und somit die Anzahl an Antikörpern gegen das Env-C Peptid in den beiden Antiseren nimmt mit fortschreitender Dauer der Immunisierung der Kaninchen zu und zeigt den maximalen Extinktionswert nach der dritten und finalen Blutung bei einer Verdünnung des Antiserums von 1:100 (Kaninchen 497) und 1:500 (Kaninchen 498). Obwohl die ansteigenden Messwerte nach den verschiedenen Blutungen des Kaninchens den Erwartungen entsprechen, zeigen die verschiedenen Verdünnungen des Antiserums für die jeweiligen Blutentnahmen nicht die erwartete Abnahme der Extinktion bedingt durch die erhöhte Verdünnung des Antiserums (Abb. 3.14 und 3.15).

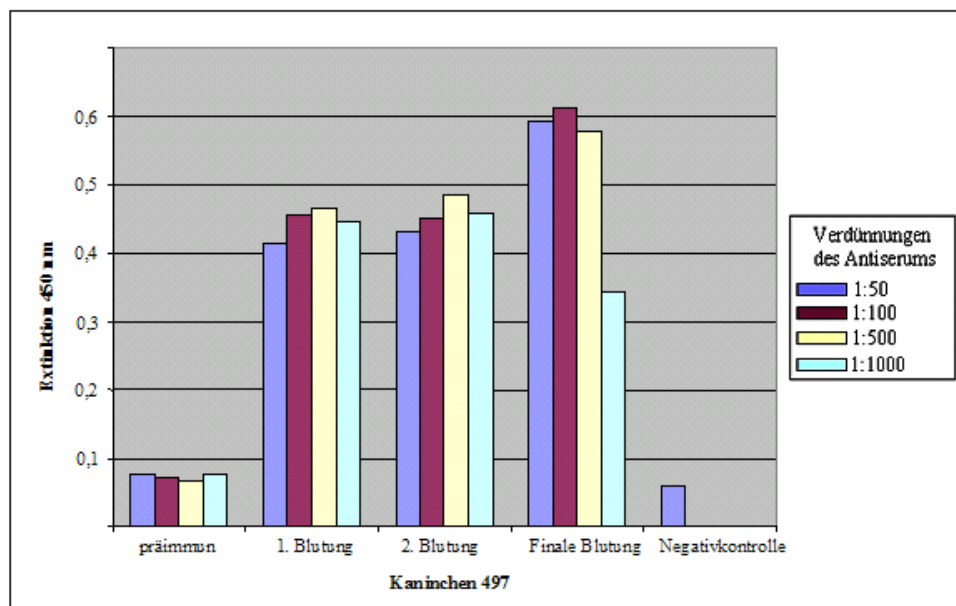


Abb. 3.14: ELISA-Test auf Funktionalität mit dem Antiserum gp70_c1 des Kaninchens 497. Das Diagramm zeigt die Extinktion der verschiedenen Blutungen des Kaninchens 497 vor bzw. nach Immunisierung mit dem Peptid gp70_c1.

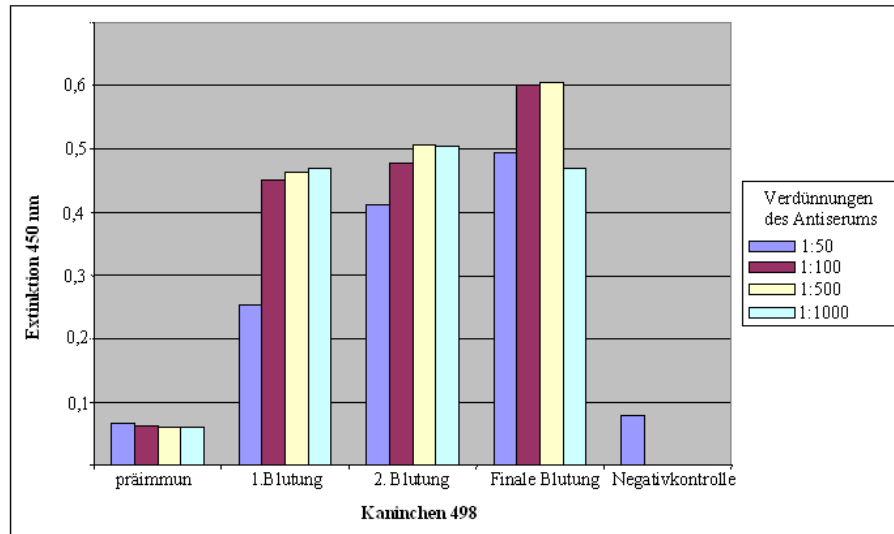


Abb. 3.15: ELISA-Test auf Funktionalität mit dem Antiserum gp70_c1 des Kaninchens 498. Das Diagramm zeigt die Extinktion der verschiedenen Blutungen des Kaninchens 498 vor bzw. nach Immunisierung mit dem Peptid gp70_c1.

Für die Analyse einer eventuellen unspezifischen Bindung des Antiserums Anti gp70_c1 wurde die 96 Loch-Platte mit verschiedenen Peptiden beschichtet. Das Peptid, mit dem die Kaninchen immunisiert wurde, diente hierbei als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurde die Platte mit PBS (ohne Ca^{2+}) beschichtet. Das erste Testpeptid, mit dem eine eventuelle unspezifische Bindung des Antiserums Anti gp70_c1 nachgewiesen werden sollte, ist 3' stromabwärts des gp70_c1 ebenfalls in dem Oberflächenanteil des Hüllproteins von PERV-C lokalisiert und wird als gp70_2 bezeichnet. Es hat die Aminosäuresequenz $\text{H}_2\text{N-TSGSDPTESSTTKM-COOH}$. Das zweite Testpeptid entspricht in seiner Aminosäuresequenz dem gesamten R-Peptid ($\text{H}_2\text{N-VLRQQYQSPSSREAGR-COOH}$) (Abb. 3.16). Beide Spezifitätskontrollen zeigen eine geringe Hintergrundaktivität, die Extinktion entspricht der Negativkontrolle mit PBS (ohne Ca^{2+}). Die Analyse bestätigt somit eine hohe Spezifität des Antiserums Anti gp70_c1 und eine geringe unspezifische Bindung gegen andere PERV-Peptide.

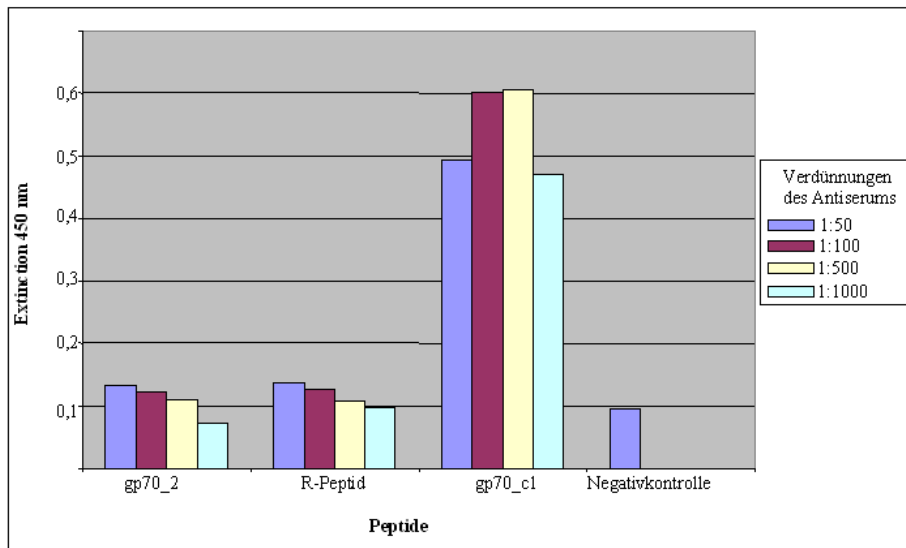


Abb. 3.16: ELISA-Test auf Spezifität des Antiserums gp70_c1. Extinktion nach Inkubation des Antiserums mit verschiedenen Peptiden der verschiedenen Blutungen des Kaninchens 498 vor bzw. nach Immunisierung mit dem Peptid gp70_c1.

3.3.3 Nachweis des Env-C Proteins in Zelllysaten mit dem Antiserum Anti gp70_c1

Zur Analyse der Funktionalität des Antiserums Anti gp70_c1 des Kaninchens 498 wurden Lysate (siehe 2.5.1) von verschiedenen Zelllinien hergestellt. Die Zelllysate wurden mit Hilfe der SimplyBlueSafestain-Lösung normalisiert. Nach Semi-Dry Blot des SDS-Page Gels wurde die Membran mit einer Verdünnung von 1:250 des Antiserums inkubiert. Zelllysate von 293FT Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet, es ist kein Signal erkennbar (Abb. 3.17). Als Spezifitätskontrolle wurde das Zelllysate von 293-PERV-PK Zellen verwendet. Diese Zellen setzen konstitutiv PERV-A und PERV-B Partikel frei. Bei diesem Zelllysate konnte kein PERV-C Hüllprotein nachgewiesen werden, was die spezifische Reaktivität des Antiserums im ELISA-Test (siehe 3.3.2) bestätigt. Als Positivkontrolle wurde Zelllysate von MAX-T Zellen analysiert. Das Signal für das ungespaltene Env-C Hüllprotein ist hier sehr deutlich detektierbar (Abb. 3.14, Spur 3). Als weitere Positivkontrolle wurde Zelllysate von TelCeB6-PERV-C verwendet. Diese Zellen produzieren Partikel des murinen Leukämievirus (MLV), die das PERV-C Hüllprotein tragen (Takeuchi et al., 1998). Hier zeigt sich das erwartete Signal des Envelope-Vorläuferproteins bei einer Größe von 71 kDa (Abb. 3.17, Spur 4). Eine Analyse mit dem

Präimmunsereum zeigte in keinem Zelllysate Signale (Daten nicht gezeigt). Das Antiserum detektiert in keinem der verwendeten Zelllysate den proteolytisch abgespaltenen Oberflächenanteil (gp70) des Hüllproteins von PERV-C mit einer Größe von 50 kDa. Das Antiserum gp70_c1 des Kaninchens 497 zeigte eine deutliche geringe Reaktivität in der Western Blot Analyse und wurde deshalb nicht weiter verwendet (Daten nicht gezeigt). Desweiteren war der monoklonale Antikörper Anti Env-C nicht in der Lage spezifisch mit dem Env-C Protein.

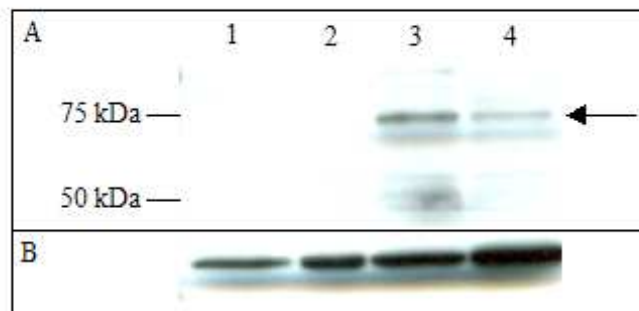


Abb. 3.17: Western Blot Analyse mit dem Antiserum Anti gp70_c1 auf Zelllysaten verschiedener Zelllinien. A Spur 1, 293FT und Spur 2, 293-PERV-PK zeigen kein Env-C Protein. In Spur 3, MAX-T und Spur 4, TelCeB6-PERV-C ist ein Signal bei ca. 71 kDa detektierbar. B Ladekontrolle, β -Aktin Antikörper. Pfeil, Env-C Vorläufer Protein.

3.3.4 Nachweis des Env-C Proteins auf Viruspartikeln mit dem Antiserum Anti gp70_c1 und dem monoklonalen Antikörper Anti Env-C

Ein weiterer Nachweis des Hüllproteins von PERV-C mit Hilfe des Antiserums Anti gp70_c1 wurde auf Viruspartikeln durchgeführt. Hierfür wurden Viruspartikel über ein Sukrosekissen aufgereinigt (siehe 2.3.6) und mit einer Verdünnung von 1:250 des Antiserums inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Partikel von 293-PERV-PK Zellen, für die kein Signal nachgewiesen werden kann. Auf Partikeln, die von MAX-T Zellen freigesetzt werden, ist das Hüllprotein von PERV-C mit einer Masse von 71 kDa detektierbar (Abb. 3.18, Spur 2). Zur Verifizierung, ob Viruspartikel auf der Membran vorhanden waren, wurde die Membran nach Entfernen der Antikörper mit einem β -Aktin Antikörper in einer Verdünnung von 1:10000 inkubiert. Für beide Virusisolate war ein Signal nachweisbar (Abb. 3.18). Als weitere Kontrolle wurde die Membran mit einem Gag-spezifischen Antikörper inkubiert, der spezifisch das Capsid Protein (p27) von PERV

detektiert (Fischer et al., 2003). Es konnte ebenfalls für beide Virusisolate ein Signal detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Der proteolytisch abgespaltene Oberflächenanteil des Hüllproteins ist mit dem Antiserum nicht nachweisbar (Abb. 3.18).

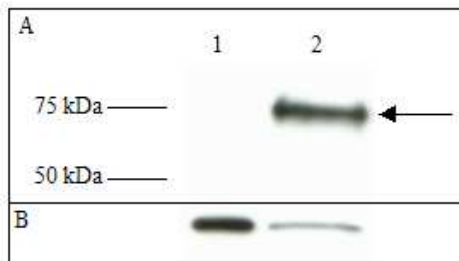


Abb. 3.18: Western Blot Analyse mit dem Antiserum Anti gp70_c1 auf verschiedenen Virusisolaten. A Spur 1, 293-PERV-PK Partikel; Spur 2, MAX-T Partikel. Pfeil, Hüllprotein von PERV-C B Ladekontrolle mit β -Aktin Antikörper.

Zusätzlich zum polyklonalen Antiserum gp70_c1 sollte das Env-C Protein durch einen monoklonalen Antikörper (Morphosys) nachgewiesen werden. Dieser Antikörper (Nummer 03046.1) wurde in *E.coli* generiert und besitzt einen 6xHis Tag, über den er mittels eines adäquaten Zweitantikörpers detektiert werden kann. Die Western Blot Analyse mit dem Antikörper wurde methodisch analog zu dem Antiserum gp70_c1 auf verschiedenen Virusisolaten aus Zellkulturüberstand durchgeführt. Der Primärantikörper Anti Env-C wurde in einer Verdünnung von 1:500 in der Analyse verwendet. Der monoklonale Anti-His Zweitantikörper (Sigma) wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Abb. 3.19 zeigt die Western Blot Analyse. Für die beiden Negativkontrollen in Zellkulturüberstand von 293PERV-B(33) Zellen, die konstitutiv PERV-B Partikel freisetzen (Czuderna et al., 2000), und Partikeln aus PK15 Zellen, die auch gleichzeitig die Spezifität des Antikörpers bestätigen sollten, ist kein Envelope Protein nachweisbar. Bei Virionen von MAX-T Zellen ist das erwartete spezifische Signal für das Vorläufer Env-C Protein nachweisbar. Allerdings reagiert der monoklonale Antikörper, ebenfalls wie das polyklonale Antiserum gp70_c1, nicht mit dem solitären Oberflächenanteil des Hüllproteins. Die Ladekontrolle gegen das p27 Protein (Fischer et al., 2003) wurde durch Anwendung des polyklonalen Antiserums auf den Viruspartikeln durchgeführt.

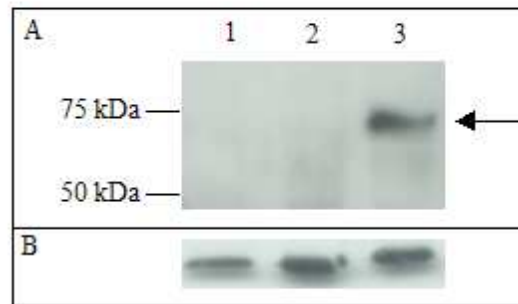


Abb. 3.19: Western Blot Analyse mit dem Antikörper Anti Env-C auf verschiedenen Virusisolaten. A Spur 1, PERV-B Partikel aus 293PERV-B(33); Spur 2, Partikel aus PK15 Zellen; Spur 3, MAX-T Partikel. Pfeil, Hüllprotein von PERV-C B Ladekontrolle mit p27 Antiserum (Fischer et al., 2003).

3.3.5 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse unter Verwendung des Antiserums Anti gp70_c1

Zur weiteren Verifizierung der Funktionalität des Antiserums gp70_c1 und zur Analyse PERV-spezifischer Proteine wurde eine Immunfluoreszenzanalyse auf verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Nachgewiesen wurde zum einen das Capsid Protein von PERV und zum anderen das Hüllprotein von PERV-C. Abb. 3.20 A zeigt MAX-T Zellen, bei denen das Capsid (p27) Protein nachgewiesen werden kann. Die Negativkontrolle mit dem präimmun-Serum für das p27 Protein hingegen zeigt keine Signale (Abb. 3.20 B). Als Positivkontrolle dienten 293 Zellen, die mit dem Molekularklon PERV-B(33)/ATG infiziert sind. Nach Inkubation mit dem p27 Antiserum können starke Signale detektiert werden (Abb. 3.20 C). Zur Analyse des Antiserums Anti gp70_c1 wurden MAX-T Zellen mit dem Antiserum inkubiert. Bei diesen Zellen kann das Env-Protein nachgewiesen werden (Abb. 3.20 D). Bei 293 Zellen, die mit PERV-B(33)/ATG infiziert sind, ist kein Hüllprotein nach Inkubation mit dem Antiserum Anti gp70_c1 nachweisbar, was die Spezifität des Antiserums bestätigt (Abb. 3.20 E). Das präimmun-Serum zeigt keinen Nachweis von Hüllproteinen in MAX-T Zellen (Abb.3.20 F). Nach Infektion von ST-IOWA Zellen mit dem Molekularklon PERV-C(1312) kann mit Hilfe des p27 Antiserums das Capsid Protein in den infizierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.20 G). Die Immunfluoreszenzen bestätigen sowohl die Spezifität des p27 (Abb. 3.20 A, C, G) als auch des Anti gp70_c1 Antiserums (Abb. 3.20 D). Weiterhin wurde die Funktionalität des Molekularklons PERV-C(1312) durch den Nachweis der Expression des p27 Proteins bestätigt.

Eine Analyse auf MAX-T Zellen mit dem monoklonalen Antikörper Anti Env-C in einer Verdünnung von 1:50 ergab keine Detektion von PERV-Proteinen (Daten nicht gezeigt).

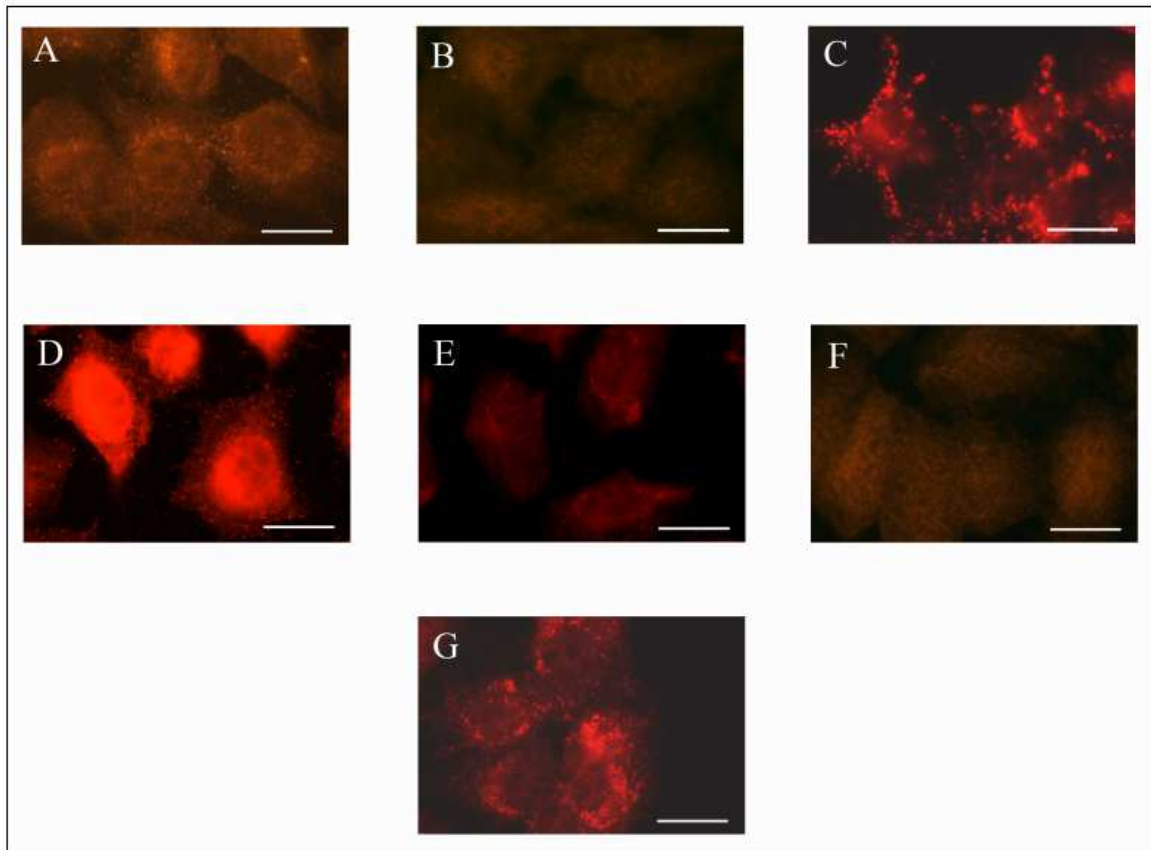


Abb. 3.20: Indirekte Immunfluoreszenzanalysen unter Verwendung verschiedener Antiseren. A MAX-T Zellen, inkubiert mit p27 Antiserum B MAX-T Zellen, inkubiert mit p27 präimmun-Serum. C 293 Zellen, infiziert mit Molekularklon PERV-B(33), Inkubation mit dem Antiserum p27 D MAX-T Zellen, Anti gp70_c1 Antiserum. E Antiserum gp70C_c1 auf 293PERV-B(33)/ATG Zellen. F MAX-T Zellen, gp70_c1 präimmun-Serum G ST-IOWA Zellen, infiziert mit dem Molekularklon PERV-C(1312), p27 Antiserum. Balken entspricht dem Maßstab von 20 μm .

3.3.6 Expression rekombinanter PERV Proteine

3.3.6.1 Klonierung eines prokaryotischen Expressionsvektors

Ein Ziel der Arbeit bestand in der Produktion eines spezifischen Antiserums gegen das PERV-C Hüllprotein, um somit das virale Protein in verschiedenen Assays nachweisen zu können. Das Antiserum sollte weiterhin auf rekombinant exprimiertem Protein analysiert

werden. Für eine spätere Anwendung sollte ein Fusionsprotein exprimiert werden, das N-terminal einen 6xHis-Tag für die Aufreinigung besitzt. Hierfür wurde das Plasmid pCINeo3.1.2ST-env C verwendet, das als Donor zur Generierung des prokaryotischen Expressionsvektors diente. Dieses Plasmid enthält den kompletten Leserahmen des PERV-C Hüllproteins. Mittels der sequenzspezifischen Primer ENV_C for, ENV_C rev und ENV_C_SU_rev wurde zum einen der vollständige Leserahmen und zum anderen partial nur der Oberflächenanteil des Hüllproteins über PCR amplifiziert und mittels der Restriktionsenzyme *SalI* und *NotI* in den Zielvektor pETDuet1 (Novagen) kloniert. Für beide Ansätze wurden einige Klone nach der Transformation von der Selektionsantibiotikumplatte gepickt und die präparierte Plasmid-DNA wurde im Anschluß sequenziert. Für beide Klonierungsstrategien zeigten sich nach Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA mehrere positive Klone mit den erwarteten Größen des Vektors (5420 bp) und der Inserts. Das Amplifikat mit dem kompletten Leserahmen des Hüllproteins umfasst eine Größe von 1972 bp, das Insert des Oberflächenanteils umschließt 1323 bp. Abb. 3.21 zeigt exemplarisch jeweils einen Klon der Restriktionsanalyse. Beide Sequenzen der Inserts sind homolog zu der Ausgangssequenz in dem Donorplasmid pCINeo3.1.2ST-env C (Abb. 3.21).

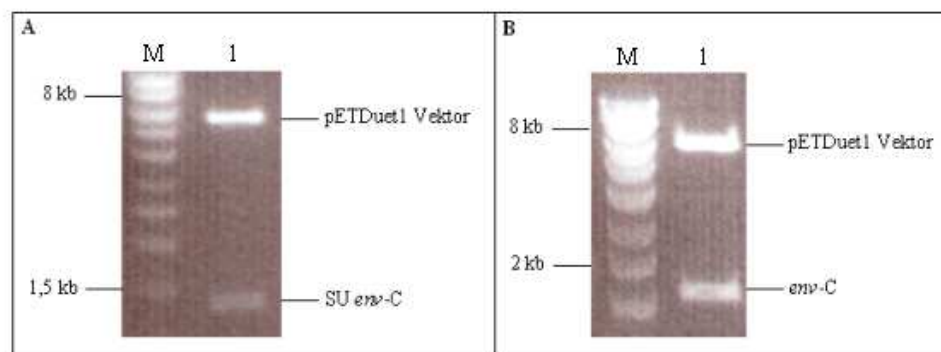


Abb. 3.21: Restriktionsanalyse von verschiedenen Plasmid-DNA. M, Smart ladder Marker (Eurogentec). **A** Spur 1, Klonierung des Oberflächenanteils des *env-C* Gens. **B** Spur 1, Klonierung des vollständigen *env-C* Leserahmens.

3.3.6.2 Klonierung eines eukaryotischen Expressionsvektors

Für die rekombinante Expression des Hüllproteins von PERV-C und des Oberflächenanteils des Hüllproteins wurde als zweiter experimenteller Ansatz das Bac-to-Bac System von Invitrogen verwendet. In drei Schritten fand die Expression des

rekombinant erzeugten Proteins statt: 1. Klonierung des zu exprimierenden Proteins in den Zielvektor, 2. Erzeugung von rekombinanter Bacmid-DNA und 3. Generierung von rekombinanten Baculoviren zur Infektion und Expression von Proteinen.

Als Zielvektor wurde der Vektor pFASTBacHTA (Invitrogen) verwendet. Mittels der sequenzspezifischen Primer ENV_C for, ENV_C rev und ENV_C_SU_rev wurde zum einen der vollständige Leserahmen des Hüllproteins von PERV-C und zum anderen nur der Oberflächenanteil des Hüllproteins (gp70) amplifiziert und mittels der Restriktionsenzyme *SalI* und *NotI* in den Zielvektor kloniert. Die Größen der Amplifikate sind analog zu der Klonierung in 3.3.6.1. Die Abb. 3.22 zeigt die erwarteten Banden nach Restriktion mit den Restriktionsenzymen *SalI* und *NotI*. Der Vektor läuft bei einer Größe von 4783 bp, der Oberflächenanteil besitzt eine Größe von 1323 bp und das gesamte Hüllprotein-Insert zeigt die erwartete Bande bei 1972 bp.

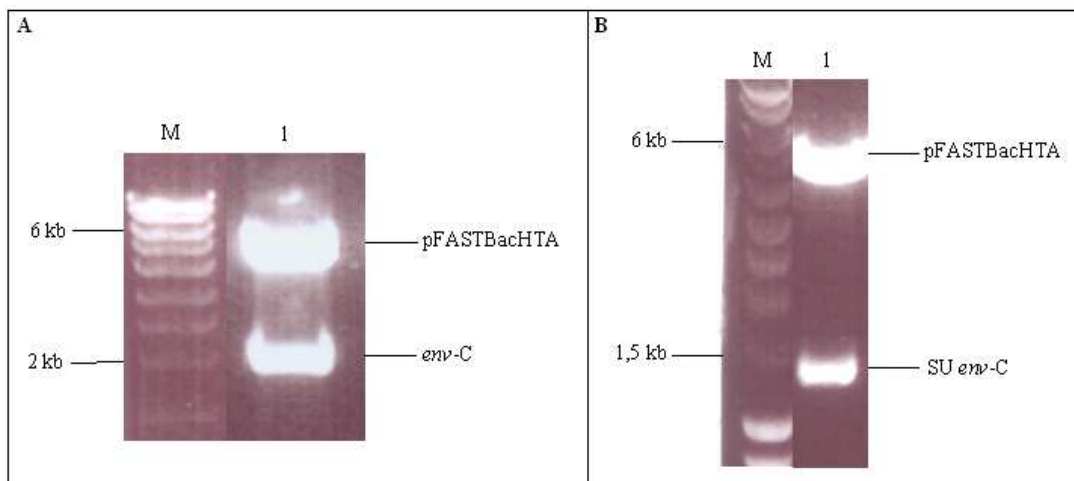


Abb. 3.22: Restriktionsanalyse von verschiedenen Plasmid-DNA. M, Smart ladder Marker (Eurogentec). **A** Spur 1, Klonierung des Oberflächenanteils des *env-C* Gens. **B** Spur 1, Klonierung mit dem vollständigen *env-C* Leserahmen.

3.3.6.3 Generierung und Analyse rekombinanter Bacmid-DNA

Nach der erfolgreichen Klonierung des Oberflächenanteils und des kompletten Leserahmens des Hüllprotein Gens in den Vektor pFASTBacHTA erfolgte die Erzeugung von rekombinanter Bacmid-DNA zur Generierung von rekombinanten Baculoviren. Hierzu wurde die Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E.coli* DH10Bac Bakterien transformiert. Über eine Transposition erfolgte die Übertragung und Integration der

porzinen DNA-Sequenzen in die Bacmid-DNA kompetenten Bakterien. Während dieser Transposition erfolgte zusätzlich der Transfer der 6xHis-Tag Sequenz, die N-terminal der *env-C* Sequenzen in dem Klonierungsvektor lokalisiert war. Mittels einer PCR unter Verwendung des M13for und M13rev Primers konnte die Integration der porzinen DNA-Sequenzen in die Bacmid-DNA nachgewiesen werden. Bei einer erfolgreichen Aufnahme des Inserts in die Bacmid-DNA war die Größe des zu erwartenden Amplifikats bei dem kompletten Leserahmen des Env-C Hüllproteins 4230 bp und bei dem SU-Env-C Oberflächenanteil 3630 bp. (Abb. 3.23).

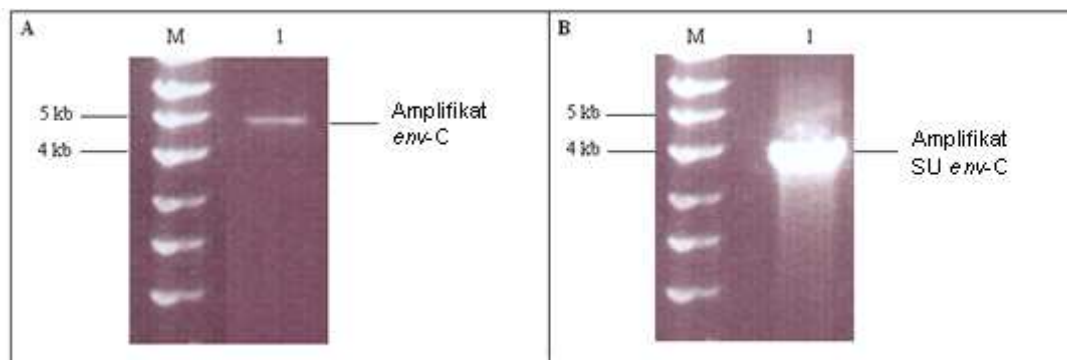


Abb. 3.23: PCR-Analyse auf rekombinanter Bacmid-DNA. Die Analyse zeigt für beide rekombinanten Bacmid-DNA das erwartete Signal für das entsprechende Insert, **A1** entspricht dem kompletten Leserahmen für das *env-C* Hüllprotein Gens, **B1** zeigt das Ergebnis für den Oberflächenanteil des Hüllprotein Gens. M, Smart ladder Marker.

3.3.6.4 Nachweis von rekombinant exprimierten PERV-C Proteinen in Insektenzellen

Nach Transfektion von Sf9 und HighFive-Zellen mit der rekombinanten Bacmid-DNA wurde der Titer der rekombinant erzeugten Baculoviren mittels Plaque Assay ermittelt. Für das Konstrukt mit dem Oberflächenanteil des Hüllproteins wurde ein Titer von $6,8 \times 10^8$ pfu/ml bestimmt, eine Analyse des Konstrukts für das gesamte Hüllprotein war mit dem Plaque Assay nicht möglich. Der Virusstock wurde im Anschluß für die Infektion von Sf9 und HighFive Zellen verwendet, um die Proteine in den Insektenzellen rekombinant zu exprimieren. Über den N-terminal angehängten 6xHisTag erfolgte die Aufreinigung der Proteine. Vier Tage nach der Transfektion wurde die Expression durch Western Blot Analyse auf zellfreiem Überstand mit dem Anti gp70_c1 Antiserum durchgeführt. Im Überstand beider infizierten Zelllinien konnte sowohl der rekombinant exprimierte Oberflächenanteil, als auch das gesamte Hüllprotein von PERV-C nachgewiesen werden.

Ein Vergleich zeigt für das komplette Hüllprotein eine geringfügig stärkere Intensität des Signal und somit ein stärkeres Vorhandensein des Proteins im Überstand von HighFive Zellen. Die Menge an Oberflächenprotein ist in den Überständen beider Zelllinien gleich (Abb. 3.24).

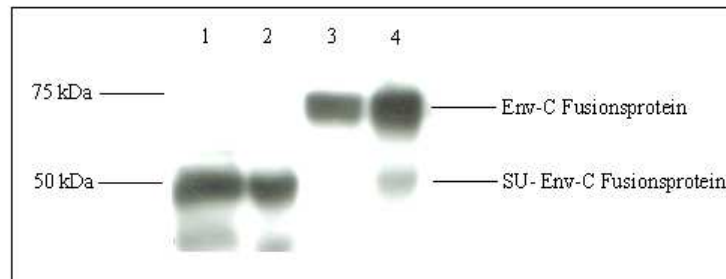


Abb. 3.24: Western Blot Analyse auf zellfreiem Überstand mit dem Antiserum Anti gp70_c1. Spuren 1 und 3, Sf9 Zellen; Spuren 2 und 4, HighFive Zellen. Überstände wurden 96 h nach der Infektion analysiert.

4 Diskussion

4.1 Molekulare Charakterisierung replikationskompetenter PERV

Durch den Nachweis der Vermehrung von PERV in menschlichen Zellen (Patience et al., 1997) ist für geplante Xenotransplantationen das Infektionsrisiko von gesteigertem Interesse (Stoye and Coffin, 1995). Ein Ziel ist somit die Generierung von „PERV-freien“ Schweinen als Donoren für Organe, um das Risiko von Virusinfektionen auszuschließen. Aufgrund der hohen Anzahl an Integrationsorten von proviralen Sequenzen der verschiedenen Klassen von PERV gestaltet sich dieser Ansatz als sehr schwierig. Im Augenblick gibt es Studien über transgene Schweine, um die Abstoßungsreaktion des transplantierten Schweineorgans im Rezipienten zu unterdrücken, ohne dabei verstärkt eine mögliche Pathogenität von PERV zu berücksichtigen (Lee et al., 2006). Durch Züchtungen ist es gelungen Minischweine zu erhalten, die nur noch den Haplotypen d/d für das Schweine Leukozyten Antigen (SLA) besitzen (Sachs, 1994). Zellen dieser Schweinerasse setzen lediglich ecotrope PERV-C Partikel frei (Takeuchi et al., 1998), die nicht infektiös für humane Zellen sind (Oldmixon et al., 2002). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass durch Stimulation von peripheren mononukleären Blutzellen von Yucatan Minischweinen PERV-Partikel aus diesen Zellen freigesetzt werden, die in der Lage sind humane Nierenzellen zu infizieren (Wilson et al., 1998). Eine Sequenzanalyse zeigte, dass es sich dabei um rekombinante PERV handelt, die als Basissequenz ein Provirus von PERV-C besitzen und lediglich die Rezeptor-Binde-Domäne von PERV-A tragen (Wilson et al., 1998). Pseudotypisierte Viren, basierend auf einem MLV Vektor, die das Env-Protein einer PERV-A/C Rekombinante tragen, zeigen in einem RT-Test eine höhere RT-Aktivität als die nativen PERV (Wilson et al., 2000, Harrison et al., 2004). Somit entsteht ein zusätzliches Risikopotential durch die Rekombination von PERV-C mit anderen PERV Klassen, was einerseits zu einem möglicherweise veränderten Wirtstropismus und andererseits zu einer potentiellen Pathogenität aufgrund einer stärkeren Expression des rekombinanten Provirus in der Zielzelle führen könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, das erste intakte replikationskompetente PERV-C Provirus aus einer Phagenbibliothek der MAX-T Zelllinie, einer Nierenzelllinie des Schweins mit dem Haplotypen d/d des SLA (Pauly et al., 1995), zu isolieren, zu klonieren

und zu sequenzieren. Die Sequenz dieses Provirus, des Klons 1312, zeigt bei allen drei Strukturgenen eine sehr hohe Homologie zu der publizierten mRNA Sequenz PERV-MSL (Akiyoshi et al., 1998), die bis dahin die einzige bekannte Sequenz von PERV-C aus Lymphozyten von Minischweinen war und nicht näher charakterisiert wurde. Die beiden oben genannten Sequenzen unterscheiden sich durch zehn Punktmutationen in der Nukleotidsequenz. Während der Translation haben sieben der zehn Punktmutationen Auswirkungen für die Proteinsequenz und führen somit zu sieben unterschiedlichen Aminosäuren. Weiterhin wurden drei Klone PERV-C(6121), PERV-C(1211) und PERV-C(4112) aus der gleichen Phagenbibliothek isoliert und kloniert. Ein Vergleich der chromosomalen Flanken dieser oben genannten vier Klone, die entweder stromaufwärts oder stromabwärts bzw. beidseitig an die proviralen Sequenzen anschließen, zeigt große Nukleotidunterschiede. Dies deutet auf die Existenz von mindestens vier verschiedenen chromosomalen Integrationsorten proviraler PERV-C Sequenzen im Genom der MAX-T Zelllinie hin. Aufgrund der Klonierungsstrategie der Phagenbibliothek sind PERV-C(6121), PERV-C(1211) und PERV-C(4112) jeweils unvollständig in ihrer proviralen Sequenz. Der Klon PERV-C(1211) besitzt für das *gag*- und das *pol*-Gen offene Leserahmen, das *env*-Gen ist in der Sequenz verkürzt. Der Klon PERV-C(6121) besitzt ein verkürztes *gag*-Gen und innerhalb der Sequenz des *pol*-Gens befindet sich durch eine Punktmutation ein Stop-Kodon, was in zwei Leserahmen für das *pol*-Gen resultiert. Das *env*-Gen ist in diesem isolierten Klon vollständig (Abb. 3.5). Klon PERV-C(4112) besitzt als retrovirale Sequenz lediglich das *env*-Gen (nicht gezeigt). Es lässt sich vermuten, dass es sich bei den Sequenzen der Klone 1211, 4112 und 6121 um vollständige Proviren in dem Genom der MAX-T Zellen handelt, die für replikationskompetente Viren kodieren können. Aufgrund der unvollständigen Sequenz wurden die Klone 1211, 6121 und 4112 funktional nicht näher charakterisiert. Die durchgeführten Southern Blot Analysen mit einer spezifischen *env*-C-Sonde lassen vermuten, dass noch, zusätzlich zu den oben genannten, weitere eventuell intakte Proviren von PERV-C in dem Genom der MAX-T Zellen vorhanden sind (Abb. 3.2). Für das Yucatan Schwein, dessen genomische DNA ebenfalls in der Analyse verwendet wurde, konnten auch PERV-C Sequenzen nachgewiesen werden. Dies war zu erwarten, da der erste Nachweis auf einer PERV-A/C Rekombinante aus stimulierten peripheren mononukleären Zellen von Yucatan Minischweinen basierte (Wilson et al., 1998). Die Zahl der nachgewiesenen Sequenzen in Yucatan Schweinen war allerdings nicht so groß wie für die MAX-T Zelllinie. Die PERV-A/C Rekombinante zeigt in einem Nukleotidvergleich des *env*-Gens zu PERV-C(1312)

eine Homologie von nur 87,1 %, wofür die Rezeptor-Binde-Domäne von PERV-A verantwortlich ist. Allerdings waren außerhalb dieser Region viele Punktmutationen zu finden, was andeutet, dass es sich bei PERV-C(1312) und dem PERV-C Hintergrund aus der A/C-Rekombinante um zwei unterschiedliche Proviren handelt. Die Detektion von PERV-C Sequenzen in der verwendeten DNA aus einem Deutschen Landrasse Schwein deutet wahrscheinlich auf trunkierte bzw. nicht intakte provirale PERV-C Sequenzen hin, da bislang in verschiedenen Studien noch kein Vollängen PERV-C in dieser Schweinerasse nachgewiesen werden konnten (Akiyoshi et al., 1998; Bosch et al., 2000; Herring et al., 2001; Quinn et al., 2004).

Eine Analyse auf zellfreiem Zellkulturüberstand zeigt eine deutliche RT-Aktivität für MAX-T Zellen (Abb. 3.3), was auf die Freisetzung von PERV-C Partikeln zurückzuführen ist. Dass es sich bei den freigesetzten Virionen um PERV-C Partikel handelt, zeigt der vergleichende Unterschied in der RT-Aktivität zu 293PERV-PK Zellkulturüberstand, der signifikant höher ist, als bei der MAX-T Zelllinie (Abb. 3.3). Bei der letztgenannten Zelllinie handelt es sich um humane Nierenzellen, die mit PERV-A und PERV-B Viruspartikeln, die wiederum aus porzinen Nierenzellen (PK15) freigesetzt wurden, infiziert sind (Patience et al., 1997). Ein Grund für die höhere RT-Aktivität könnte in Zusammenhang mit den Promotorelementen gebracht werden, die sich in der U3-Region der 5'LTR befinden. An Repeats, bei denen es sich um repetitive DNA-Sequenzen mit einer Länge von 39 bp handelt, kann der Transkriptionsfaktor NF-Y (nuclear factor Y) binden, der die Transkription des Provirus erhöht. Je nach Anzahl dieser Repeats können mehr oder weniger Transkriptionsfaktoren an die LTR binden und somit die Expression erhöhen (Scheef et al., 2002). Ein Vergleich der LTR Sequenzen von PERV-C(1312) mit anderen PERV Klassen zeigt deutliche Unterschiede im U3-Bereich. Zwischen der LTR der publizierten mRNA Sequenz PERV-MSL und PERV-C(1312) gibt es einen Unterschied von 17 Nukleotiden. In dem U3-Bereich der LTR unterscheiden sich die drei PERV Klassen am meisten. Der Molekularklon PERV-C(1312) besitzt lediglich einen vollständigen Repeat von 39 bp (Abb. 3.7), wobei die beiden Sequenzen der Subrepeats (21 und 18 bp) nicht zusammenhängen und an unterschiedlichen Stellen im U3-Bereich der LTR lokalisiert sind. Ein Vergleich eines Repeats in der U3-Region der LTR zwischen PERV-B(33)/ATG und PERV-C(1312) zeigt fünf Nukleotidaustausche. Die Unterschiede in der LTR Sequenz zwischen den PERV Proviren könnte ein Grund für die geringere transkriptionelle Aktivität sein, die in dem RT-Test (Abb. 3.3) analysiert wurde. Ein weiterer Aspekt, der die niedrigere RT-Aktivität begründen könnte, liegt im

Zusammenhang mit den chromosomalen Flanken des Molekularklons. In vergleichenden RT-Tests auf Zellkulturüberstand zeigt die MAX-T Zelllinie eine höhere Aktivität als die ST-IOWA Zelllinie, die mit PERV-C(1312) infiziert ist. Nach Infizierung weiterer ST-IOWA Zellen mit dem Molekularklon PERV-C(1312), dem die chromosomalen Flanken entfernt wurden, ist der RT-Wert nochmals weitaus geringer als bei ST-IOWA Zellen, die mit dem Molekularklon infiziert wurden, der noch die chromosomalen Flanken besitzt (Daten nicht gezeigt). Dies deutet auf Promotorelemente oder Enhancer hin, die in einer Länge bis 2819 bp die provirale Sequenz auf dem Chromosom flankieren (Abb. 3.5).

Der isolierte Molekularklon PERV-C(1312) ist in der Lage porzine ST-IOWA Zellen *in vitro* produktiv zu infizieren. Vorangegangene Studien zeigten, daß diese Zelllinie suszeptibel für eine Infektion durch PERV-C ist (Takeuchi et al., 1998). Ein RT-Test auf viralem, zellfreiem Überstand zeigt ab Tag 15 nach Infektion einen Anstieg der RT-Aktivität, die den maximalen Wert an Tag 38 nach Infektion erreicht. Anschließend sinkt der RT-Wert wieder (Abb. 3.10). Dies liegt wahrscheinlich an der Adaption des Virus an die Wirtszelle. Zu Beginn der Zellkultur sind nur geringe Zellen mit dem Virus infiziert, im Anschluß steigt der Virustiter, da die Zahl an infizierten Zellen und dadurch auch die Menge an freigesetzten Viren ansteigt. Nachdem die Zellkultur durchinfiziert wurde, nimmt der Virustiter wieder ab, zum einen aufgrund von viraler Interferenz (Nethe et al., 2005) und zum anderen aufgrund der möglichen Pathogenität des Virus für seine Wirtszelle. Durch eine zu hohe Synthese an viralen Proteinen ist die Wirtszelle nicht mehr in der Lage die essentiellen Proteine zu synthetisieren, die sie zum Überleben benötigt. Somit wird die Expression des Provirus reduziert, das Virus adaptiert an die Wirtszelle, wie dies für die LTR von PERV beschrieben ist (Scheef et al., 2001). Zusätzlich wurde eine Northern Blot Analyse auf Gesamt-RNA von ST-IOWA Zellen infiziert mit dem Molekularklon PERV-C(1312) durchgeführt. Dazu wurde eine spezifische *env*-C-Sonde verwendet (Abb. 3.1), die auch für die Durchmusterung der Phagenbibliothek verwendet wurde. Die Freisetzung von PERV-C Partikeln aus der genomischen Phagenbibliothek konnte zusätzlich durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt werden. Die Oberfläche der PERV-C Partikel aus MAX-T Zellen entspricht strukturell dem Env-Protein der Partikeln, die aus ST-IOWA Zellen, infiziert mit dem Molekularklon PERV-C(1312), freigesetzt werden. Entscheidend dabei ist die biophysikalische Struktur der Env-Proteine. Diese besitzen bei Viruspartikeln aus MAX-T und aus infizierten ST-IOWA Zellen eine spikeartige Struktur, Env-B Proteine zeigen im Vergleich eine glatte

Oberfläche auf den Viruspartikel (Abb. 3.9), was bereits durch Studien mit PERV-B Partikeln gezeigt wurde (Czuderna et al., 2000).

Aufgrund der Isolierung des replikationskompetenten PERV-C(1312) Klons und den trunkierten Klonen PERV-C(6121), PERV-C(1211) und PERV-C(4112) ist ein mögliches Screening von Schweine DNA bezüglich der Präsenz bzw. Abwesenheit von PERV-C im Vorfeld einer möglichen XT_x durchführbar. Hierfür müsste anhand der durch die Isolierung bekannten chromosomalen Flanken (Abb. 3.5) eine spezifische Sonde generiert werden, die im Provirus und in der Flanke bindet, um somit DNAs verschiedener Schweine bezüglich des Vorhandenseins dieser bekannten Sequenzen hin zu überprüfen.

Bei einer längeren Passagierung von infizierten ST-IOWA Zellen mit dem Molekularklon PERV-C(1312) wäre zu vermuten, dass eine Adaption der Virus LTR in der Wirtszelle erfolgt. Dies wurde *in vitro* für den Molekularklon PERV-B(33)/ATG gezeigt. Eine längere Kultivierung von infizierten humanen 293 Zellen mit PERV-B(33)/ATG resultierte maximal in einer Anzahl von viereinhalb Repeats in der 5'LTR, die meisten Viren beinhalteten nach Adaption in der Zellkultur dreieinhalb LTRs (Scheef et al., 2001).

Aufgrund der hohen Anzahl an Integrationsstellen von PERV im Schweinengenom gestaltet sich der Ansatz zur Generierung von „PERV-freien“ Schweinen für die Anwendung in der XT_x als sehr problematisch. Deshalb ist die Kenntnis über die verschiedenen genutzten Rezeptoren der PERV ein wichtiger Aspekt für eine mögliche XT_x. Bislang wurde der humane PERV-A Rezeptor identifiziert (Ericsson et al., 2003). In dieser Studie wurden MLV Pseudotypen mit dem PERV-A/C *env*-Gen verwendet. Trotz des ecotropen Wirtstropismus von PERV-C wäre die Identifikation des Rezeptors von Bedeutung, um Schweinezellen auf das Vorhandensein dieser Rezeptoren hin zu analysieren. Falls die PERV-C Partikel in der Lage sein sollten Schweinezellen trotz fehlender spezifischer Rezeptoren zu infizieren, so wäre ein alternativer Infektionsweg vorhanden, der ein neues Potential schaffen würde. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass der Oberflächenteil (SU) des Env-C Proteins auf humanen 293 Zellen binden kann und lediglich ein Unterschied von neun Aminosäuren, in den für die Bindung wichtigen Sequenzen zwischen PERV-A und PERV-C, vorhanden ist (Gemeniano et al., 2006). In dem Vergleich zwischen den neun Aminosäuren zwischen der publizierten PERV-C Sequenz und PERV-C(1312) zeigte sich an der ersten Aminosäureposition eine Übereinstimmung mit der PERV-A Sequenz (Abb. 3.6). Es stellt sich die Frage, ob PERV-C(1312) aufgrund der einen unterschiedlichen Aminosäure, die homolog zu der von PERV-A ist, in der Lage

ist, an die humanen Zellen *in vitro* anzuheften. Über Immunfluoreszenzanalysen könnten man die Bindefähigkeit überprüfen.

Ein wichtiger Sicherheitsaspekt für die XTx wäre die chromosomale Lokalisierung der Integrationsorte. In einer kürzlich durchgeführten Studie wurde diese Fragestellung analysiert (Moalic et al., 2006). Dabei konnte durch PCR-Analysen festgestellt werden, das PERV, genau wie das murine Leukämievirus (MLV), vorzugsweise in CpG-reichen Regionen im Genom von humanen 293 Zellen integriert. Dabei wurde gezeigt, dass sich direkt neben dem Integrationsort eine palindromische Sequenz von acht Basenpaaren befindet. Diese Sequenz konnte bei einer Durchmusterung der genomischen Flanken des isolierten Klons PERV-C(1312) nicht identifiziert werden. Für MLV ist bekannt, dass die Insertion des Virusgenoms in das Genom der infizierten Zelle zu einer Aktivierung von Protoonkogenen führt, wodurch das Potential einer Tumorbildung erhöht wird (Yoshimura et al., 1999; Wu et al., 2003). Bislang wurde diese Beobachtung für PERV infizierte Zellen noch nicht gemacht, doch ist dieses Risiko nicht auszuschließen. Verstärkt werden muß die Analyse eines alternativen Infektionswegs, da durch Inkorporation des immunregulatorischen Proteins (hDAF bzw. CD55) in PERV Partikel das Virus in immunsupprimierten Rezipienten vor Inaktivierung durch das Komplementsystem geschützt ist. Dadurch bestünde die Möglichkeit einer Infektion durch z.B. rekombinante PERV-A/C oder PERV-B/C, die zusätzlich hDAF auf ihrer Virusoberfläche präsentieren. Weiterhin könnte durch PERV-Partikel, die aus porzinem Gewebe freigesetzt werden, welches von α -Gal Knock-out Schweinen stammt, ein doppeltes Risiko für den Rezipienten bestehen. Immunologisch wären Schweineorgane, transgen für hDAF und mit einem Knock-out für α -Gal optimal, da sie eine immunologische Antwort in Form einer Abstoßungsreaktion des Spenderorgans oder Spendergewebes verzögern würden. Virologisch betrachtet würde dies die Barrieren ausschalten, die eine PERV-Infektion verhindern würden.

4.2 Immunologische Detektion von PERV-C

4.2.1 Env-C spezifische Antikörper

Ein Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von immunologischen Assays zum Nachweis von PERV-C Proteinen. Diese Werkzeuge sollen eventuell zur Überprüfung von potentiellen PERV-Infektionen oder zur frühzeitigen Detektion von PERV Proteinen vor

bzw. nach einer Xenotransplantation dienen. Hierzu wurden ein polyklonales Antiserum aus Kaninchen und ein monoklonaler Antikörper aus *E.Coli* generiert. Beide Antikörper sind gegen den Oberflächenanteil des Env-Proteins von PERV-C gerichtet.

Für die Generierung des polyklonalen Antiserums wurden zwei Kaninchen mit einem 16 Aminosäure langen Peptid immunisiert. Die grundlegenden Funktionalitätstests der Antikörper zu den verschiedenen Blutentnahmen bei den Kaninchen wurden mittels ELISA (Abb. 3.14 und 3.15) durchgeführt. Bei der ELISA-Analyse gegen das spezifische Peptid, das zur Immunisierung eingesetzt wurde, zeigt sich im Verlauf der Blutentnahmen in den Antiseren beider immunisierten Kaninchen (Nr. 497 und 498) ein ansteigender Titer der Antikörper, was den Erwartungen entspricht. Die Reaktivität des Antiserums gegen das Immunisierungspeptid, im Vergleich zu randomisierten Peptiden, die an anderen Stellen des Env-Proteins lokalisiert sind, ist spezifisch (Abb. 3.16).

In den verschiedenen Assays waren die Antikörper unterschiedlich funktional. Für das polyklonale Antiserum konnte das Env-C Vorläuferprotein in Zelllysaten von MAX-T Zellen nachgewiesen werden. Ebenso ist die Detektion des Env-Proteins in TelCeB6 Zellen nachweisbar (Abb. 3.17). Diese humanen 293 Zellen produzieren MLV Partikel, die mit dem Env-C-Protein pseudotypisiert sind (Takeuchi et al., 1998). Das Signal in der Western Blot Analyse ist bei diesen Zellen deutlich schwächer, als bei den MAX-T Zellen. Dies kann durch eine langfristige Kultivierung der Zellen hervorgerufen worden sein in deren Verlauf es zu einer Konzentrationsschwankung des Selektionsantibiotikums Phleomycin kommen kann. Durch eine zu geringe Antibiotikumkonzentration könnte es zum Verlust des *env-C* Expressionsplasmids, auf dem sich das Resistenzgen für Phleomycin befindet, in den Zellen kommen. Aufgrund dessen würden keine Env-C-Proteine, mangels Vorhandensein, in die Viren eingebaut werden können. Bei der Synthese des Env-Proteins wird eine gespleißte *env* mRNA zu den Ribosomen transportiert, an denen die Translation stattfindet und eine Signalsequenz angeheftet wird, die den Transport des Polyproteins zu dem rauen endoplasmatischen Retikulum vermittelt. Dort erfolgt die Glykosilierung und Faltung des Polyproteins und die Bildung von Env-Trimeren. Im Golgi-Apparat erfolgt durch eine zelluläre Protease die Spaltung des Polyproteins in SU und TM. Im Anschluß werden die Proteine zur Zelloberfläche transportiert, um dort in die Viren eingebaut zu werden (Coffin, 1997). Das polyklonale Antiserum ist lediglich in der Lage das Env-C-Polyprotein zu detektieren. Dies kann eventuell an einer verminderten Bildung bzw. verminderten Prozessierung des Env-Polyproteins liegen. Die elektronenmikroskopischen Analysen zeigen eine deutlich

geringere Bildung von PERV-C Viruspartikeln, im Vergleich zu PERV-A oder PERV-B Virionen, was an dem verminderten prozessierten Env-Protein in den Zelllysaten der Wirtszelle liegen kann.

Die Spezifität des polyklonalen Antiserums gp70_c1 ist auch beim Nachweis des Env-C-Proteins in Viruspartikeln vorhanden, die aus MAX-T Zellen freigesetzt wurden. Die Negativkontrolle auf PERV-A bzw. auf PERV-B Partikeln aus 293 Zellen zeigt keine Reaktivität des Antiserums, was auf den Aminosäureunterschied in der Rezeptorbindedomäne zwischen den PERVs zurückzuführen ist, in der das Epitop des Antiserums lokalisiert ist (Abb. 3.18). Die Überprüfung der Spezifität des monoklonalen Antikörpers zeigte das gleiche Ergebnis wie für das polyklonale Antiserum. Er reagierte spezifisch mit PERV-C Partikeln aus MAX-T Zellen, zeigte aber keine Reaktivität mit Partikeln von PERV-A oder PERV-B (Abb. 3.19). Mit beiden Antikörpern konnte nur das Vorläuferprotein von Env-C nachgewiesen werden. Dies deutet auf einen sehr hohen Anteil an unreifen Viruspartikeln im Zellkulturüberstand hin. Während der Reifung der Partikel wird durch eine virale Protease am N-terminalen Ende des TM-Proteins, welches im Virion über Disulfidbrücken mit dem SU verbunden ist, das R-Peptid abgespalten (Coffin, 1997). Dadurch wird die Infektiosität des Viruspartikels ermöglicht. Die Größe des nachgewiesenen Proteins im Western Blot wäre somit bei reifen Partikeln aufgrund des abgespaltenen R-Peptids geringer, was in den durchgeführten Analysen nicht der Fall ist. In Immunfluoreszenz Analysen mit dem Antiserum gp70_c1 konnten in MAX-T Zellen und mit PERV-C(1312) infizierten ST-IOWA Zellen randständige Signale detektiert werden, die auf das Vorhandensein des Env-C Proteins im Zytoplasma und an der Zellmembran hindeuten (Abb. 3.20 A und D). Allerdings zeigt das Antiserum bei den ST-IOWA Zellen einen sehr starken Hintergrund. Unter Berücksichtigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen und den Western Blot Analysen in Zelllysaten liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den Signalen um Env-Vorläuferproteine handelt, die kurz vor der proteolytischen Spaltung stehen oder sich noch im ER befinden (Einfeld, 1996). PERV-Proteine konnten durch den monoklonalen Antikörper in Immunfluoreszenzen nicht detektiert werden, in Zelllysaten zeigte er Kreuzreaktivitäten mit Env-A und Env-B Proteinen. Ein Grund für die unterschiedlichen Spezifitäten der Antikörper könnte der 6x HisTag sein, der N-terminal an den monoklonalen Antikörper gekoppelt ist. Durch diese zusätzlichen Aminosäuren kann eventuell die Sensivität des monoklonalen Antikörpers negativ beeinflusst werden. Dieser Rest fehlt dem polyklonalen Antiserum.

4.2.2 Expression von rekombinantem Env-C Protein

Als Größenvergleich für die nachgewiesenen Env-C Proteine in den verschiedenen oben erwähnten immunologischen Assays und zur Anwendung als Positivkontrolle bzw. Spezifitätstest des polyklonalen Antiserums erfolgte die Expression von rekombinanten PERV-C Proteinen. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Systeme verwendet. Für beide Expressionssysteme war eine Klonierung von Expressionsvektoren notwendig. Für die prokaryotische Expression in *E.coli* Zellen wurden zwei Vektoren kloniert, die zum einen den gesamten offenen Leserahmen für das Env-C Protein und zum anderen lediglich den Oberflächenanteil des Env-C Proteins enthalten (Abb. 3.21). Die Sequenzierungen beider *env-C* Sequenzen zeigten über die gesamte Länge eine komplette Homologie zu PERV-MSL, die als Vergleichssequenz verwendet wurde. Nach Transformation und Induktion der *E.coli* Zellen mit dem Expressionsplasmid bei 30°C und 37°C konnte in einem Polyacrylamidgel nach SymplyBlueSafestain Färbung keines der beiden rekombinant exprimierten Proteine als Fusionsprotein mit einem 6x HisTag in Lysaten der Bakterienzellen drei Stunden nach Induktion mit IPTG (10mM Endkonzentration) nachgewiesen werden. Dies kann unter anderem auf die Temperatur während der Induktion und die Endkonzentration des zur Induktion der Expression benötigten IPTG zurückgeführt werden.

Der zweite Ansatz zur rekombinanten Expression von Env-C Proteinen bestand in der Verwendung des Bac-to-Bac Systems (Invitrogen), das auf der Expression von rekombinanten Proteinen in Insektenzellen beruht. Nach erfolgreicher Klonierung der beiden *env-C* Sequenzen (Abb. 3.22) wurden rekombinante Baculoviren erzeugt, mit denen anschließend SF9 und HighFive Insektenzellen infiziert wurden. Der Nachweis der in den infizierten Insektenzellen rekombinant exprimierten Proteine wurde durch Western Blot Analyse mit dem polyklonalem Antiserum gp70_c1 durchgeführt. Für beide Zelllinien konnte 96 Stunden nach Infektion das stärkste Signal beobachtet werden. Für die HighFive Zellen war das Signal in den Western Blot Analysen für das rekombinant exprimierte Oberflächenprotein und für das gesamte Env-C Protein im Verlauf der Expression, sowohl in Zelllysaten als auch in Zellkulturüberstand, stärker als in den SF9 Zellen (Daten nicht gezeigt). Da es sich bei den rekombinant erzeugten Proteinen um Fusionsproteine mit einem 6xHisTag handelt, wurde eine Kontrolle mit einem Anti HisTag Antikörper durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Bei dieser Analyse korrelierten die Größen der Signale mit denen des polyklonalen Antiserums, somit konnte nachgewiesen werden, dass

rekombinante Fusionsproteine hergestellt wurden. Da den Insektenzellen Furin als Serinprotease fehlt (Morikawa et al., 1993; Einfeld, 1996), die für die proteolytische Spaltung des Env-Vorläuferproteins in Transmembranteil und Oberflächenprotein (SU) verantwortlich ist, kann in dem Assay zur Expression des gesamten Env-C-Proteins nur das Vorläuferprotein, aber kein SU nachgewiesen werden.

Eine Analyse auf Kreuzreaktivität der Antikörper mit anderen γ -Retroviren wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt, wäre jedoch für ein Screening Verfahren für die XT_x essentiell, um z.B. auszuschließen, dass dieser Antikörper eventuell mit Proteinen der verschiedenen HERV Familien in dem human Rezipienten interagiert. Weiterhin dürften diese generierten Antikörper nicht mit γ -Retroviren z.B. der Maus oder der Katze kreuzreagieren, um somit eine Anwendung für ein eventuelles Tiermodell zu ermöglichen.

Auch wenn ein Nachweis von PERV-Proteinen nicht so sensitiv ist wie eine analytische PCR, so ist es trotzdem ein wichtiger Nachweis der Präsenz von viralen PERV-C Proteinen. In den meistens Geweben wird PERV mRNA transkribiert, allerdings werden nur selten Viren gebildet (Patience et al., 1997, Akiyoshi et al., 1998, Krach et al., 2000). Somit bedeutet der Nachweis von viralen PERV-C Proteinen wahrscheinlich die Detektion von vorhandenen Virionen und stellt ein Nachweisbindeglied zwischen RNA Expression und Proteintranslation dar.

4.3 Rekombination von endogenen Retroviren

Durch die Tatsache, daß γ -Retroviren in der Lage sind zu rekombinieren, sollte in dieser Arbeit das Rekombinationsvermögen des isolierten replikationskompetenten Moleklarklons PERV-C(1312) mit bekannten PERV-Sequenzen untersucht werden. Gammaretroviren unterliegen häufig einer Rekombination. Die Rekombinationsrate für das murine Leukämievirus (MLV) beträgt $4,7 \times 10^{-5}$ pro Nukleotid und Replikationszyklus (Negroni et al., 2001). Bei einer durchschnittlichen Größe des viralen Genoms von neun Kilobasen entspricht dies einer Replikationsrate von 4,23 %. In einer statistischen Auswertung von publizierten PERV Sequenzen konnten Rekombinationen in allen Bereichen des *env*-Gens identifiziert werden. Die Sequenzen, die bei dieser Analyse aus Minischweinen stammten, waren zum größten Teil *env*-A/C Rekombinationen, *env*-B/C konnte zum geringen Teil ebenfalls nachgewiesen werden (Klymiuk et al., 2003). Für die XT_x werden Schweine benötigt, die möglichst frei von funktionellen PERV sind oder keine polytropen Viruspartikel freisetzen können, die in der Lage wären humane Zellen

des immunsupprimierten Rezipienten zu infizieren. Zellen aus Schweinen mit dem Haplotypen d/d des SLA bilden lediglich ecotrope PERV (Oldmixon et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass die PERV Partikel, die in der Lage waren humane Zellen *in vitro* zu infizieren, exogene rekombinante PERV-A/C Virionen waren (Wood et al., 2004). Diese Viren waren allerdings nicht in der Keimzellbahn dieser Schweine verankert, sondern entstanden durch Rekombination von exogenen Retroviren. Die offenen Leserahmen für *env-A*, die durch genomische Kartierung in diesen Schweinen identifiziert wurden, waren nicht funktional (Scobie et al., 2004). Die Annahme der exogenen Rekombination wurde kürzlich durch die Identifizierung von zwei PERV-A/C Sequenzen mittels PCR im Genom der oben genannten Minischweine widerlegt (Martin et al., 2006). Aufgrund der Tatsache, dass bisher die PERV-A/C Rekombination analysiert wurde, war ein Ziel dieser Arbeit die Generierung eines exogenen rekombinanten PERV-B/C, um vergleichen zu können, ob dieses Virus ein vergleichbares Potential wie PERV-A/C Rekombinanten besitzt. Die Sequenzgrundlagen bildeten der Moleklarklon PERV-B(33)/ATG und PERV-C(1312). Wie bei der A/C-Rekombination sollte analysiert werden, ob PERV-C die Grundlage für eine Rekombinante bilden kann, in der die Rezeptor Binde Domäne (RBD) von PERV-B vorhanden ist, in der die variable Region A und B (VRA, VRB), sowie die Prolin-reiche Region (PRR) lokalisiert sind (Abb. 4.1).

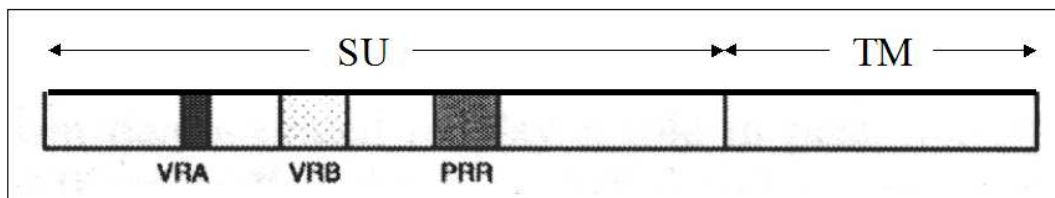


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des Env-Proteins. SU, Oberflächenprotein; TM, Transmembranprotein; VRA, variable Region A; VRB, variable Region B; PRR, Prolin-reiche Region (modifiziert nach Gemeniano et al., 2006).

In dem ersten Ansatz wurde Plasmid-DNA des Moleklarklons PERV-C(1312) in PERV-B(33)/ATG produzierende Zellen transfiziert. Das Virus war in der Lage in das Genom der humanen 293 Zellen zu integrieren (Tab. 3.4). Die Kultivierung der Zellen erfolgte über vier Wochen. Im Verlauf dieser Kultivierung konnten ab der zweiten Woche der Kultivierung keine PERV-C Sequenzen mehr nachgewiesen, ausschließlich PERV-B(33)/ATG wurden bis zum Ende der Kultivierung detektiert. In den PERV-B(33)/ATG

Sequenzen kam es lediglich zu Punktmutationen. In den vier Wochen der Kultivierung der transfizierten 293 Zellen konnte keine PERV-B/C Sequenz im Genom identifiziert werden. Dies kann im Zusammenhang mit der Anzahl der sequenzierten Klone liegen, die nicht ausreichend war, um eine Integration einer rekombinanten Virus nachzuweisen. Während der Kultivierung der Zellen wurden jede Woche aus 50 % der Zellen DNA genomische DNA präpariert, die als Template für die Nachweis-PCR diente, dessen Amplifikat sequenziert wurde. Die restlichen Zellen wurde im Verhältnis 1:1 mit naiven humanen 293FT Zellen vermischt, um somit einer möglichen PERV-Rekombinante diese Zellen zur Infektion bereitzustellen. Dieses Mischverhältnis der Zellen, zusätzlich zu einer geringen Transfektionseffizienz des Plasmids PERV-C(1312), könnte ein weiterer Grund sein, weshalb bei diesem Ansatz keine Integration einer PERV-B/C Rekombinante nachgewiesen werden konnte. Durch das Vermischen mit uninfizierten Zellen sollte eine virale Interferenz verhindert werden, bei der nach Infektion eine Zweitinfektion mit homo- oder heterologen Viren durch Replikationshemmung verhindert wird (Coffin, 1997). Dies wäre bei 293 Zellen infiziert mit PERV-B(33)/ATG der Fall, da diese, wie eine potentielle Rekombinante, den gleichen Rezeptor für die Infektion verwenden würden. Durch den erhöhten Titer eines PERV-A/C Virus (Harrison et al., 2004) war die Erwartung, dass eine PERV-B/C Rekombinante ebenfalls replikationskompetenter als ein natives PERV-Virus ist. Somit sollten im Verlauf nur noch 293 Zellen, infiziert mit PERV-B/C nachweisbar sein, die gegenüber PERV-B(33)/ATG in der Zellkultur dominieren. Da die Sequenzierung die Hypothese nicht bestätigen konnten und durch die limitierte Sequenzierung von Sequenzen, wurde ein genereller Nachweis mittels PCR durchgeführt. Die erhaltenen Signale korrelieren mit den Analysen der Sequenzierung. Die PERV-B(33)/ATG PCR zeigt für den Verlauf der Kultivierung eine gleichbleibende Intensität des Signals, während das Signal für die PERV-C(1312) PCR abnahm. Dies könnte im Zusammenhang mit dem oben erwähnten Verdünnen der PERV-infizierten Zellen stehen. Ein zusätzlicher Grund für den negativen Nachweis einer PERV-B/C Rekombinante kann die geringere transkriptionelle Aktivität aufgrund fehlender Promotorelemente in der 5`LTR sein. Die Expression an PERV-C(1312) genomischer RNA ist nicht auszureichend, um in PERV-Partikel eingebaut zu werden. Ein Western Blot auf Zellkulturüberstand könnte zeigen, ob generell PERV-C Partikel freigesetzt wurden.

Durch Transfektion eines Deletetionsplasmids des Moleklarklons PERV-B(33)/ATG in MAX-T Zellen sollte analysiert werden, ob eine Pseudotypisierung von PERV-C Partikeln mit PERV Env-B Proteinen möglich ist. Durch die Verwendung der MAX-T Zelllinie

sollte ausgeschlossen werden, dass polytrope PERV-Partikel gebildet werden, was bedeutet, dass diese Zelllinie keine funktionsfähigen offenen Leserahmen für das *env-A* oder *-B* Gen besitzt. Während der Kultivierung der transfizierten Zellen für vier Wochen wurden an verschiedenen Zeitpunkten Überstände entnommen, die anschließend in einem RT-Test analysiert wurden. Die Positivkontrollen entsprachen den Erwartungen. Die 293PERV-PK Zellen und MAX-T Zellen zeigten vergleichbar hohe RT-Aktivität, der Nachweis von RT aus den mit PERV-C infizierten ST-IOWA Zellen war deutlich geringer. Für die Kultivierung war die Hypothese, dass sich entweder PERV-B Partikel bilden, die in der Lage wären anschließend humane Zellen zu infizieren oder Viruschimären entstehen, die sowohl das Env-C als auch das Env-B Protein in die Partikel inkorporiert haben. In Pseudotypisierungsansätzen in immundefizienten Mäusen inkorporierten alle drei Klassen von PERV (nach XTx von porzinen Inselzellen) das xenotrope Env-Protein von MLV, wodurch PERV-C in der Lage war, humane Zellen zu infizieren. Außerdem konnte durch diese Pseudotypisierung der Wirtstropismus von PERV auf nicht humane Primatenzellen erweitert werden (Martina et al., 2005). Weiterhin wurde für Lentiviren eine Pseudotypisierung durch MLV Env-Proteine nachgewiesen (Cronin et al., 2005).

In beiden Fällen wäre ein Nachweis in dem Überstand von 293 Zellen nachweisbar, die mit dem RT-positivem Zellkulturüberstand der transfizierten MAX-T Zellen für 48 Stunden inkubiert wurden. Mit dieser Inkubationszeit sollte sichergestellt sein, dass der virale Replikationszyklus mindestens einmal durchlaufen wurde (Coffin et al., 1997). Anschließend erfolgte die Kultivierung der Zellen für 10 Tage. An unterschiedlichen Tagen wurden, wie zuvor für die MAX-T Zellen, Überstände entnommen und in einem RT-Test analysiert. Dabei konnte zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung der 293 Zellen eine signifikante RT-Aktivität nachgewiesen werden. Eine Ursache könnte eine verminderte Transfektionseffizienz des *env-B* tragenden Plasmids sein und weiterhin die Expression des Env-B Proteins. Eine Immunfluoreszenzanalyse oder Western Blot auf Zelllysaten der transfizierten MAX-T Zellen könnte aufklären, ob eine verringerte oder gar keine Expression von Env-B stattgefunden hat. Dieser Ansatz erst einmal durchgeführt, eine Wiederholung mit Variationen bei der Transfektion und anderen Teilungsverhältnissen bei der Kultivierung der Zellen könnte eventuell bessere Voraussetzungen schaffen.

5 Zusammenfassung

Durch die vertikale Vererbung von endogenen Retroviren, deren Fähigkeit humane Zellen *in vitro* zu infizieren und ihrer Rekombinationsfähigkeit besteht ein Risikopotential bei der Verwendung porziner Gewebe bzw. Organe im Rahmen der XT_x, weshalb ein Screening auf PERV im Genom von Spendertieren und eine immunologische Kontrolle von Xenotransplantatempfängern von Bedeutung ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten vier native, teilweise unvollständige, provirale Sequenzen aus einer Genbibliothek einer Zelllinie von Minischweinen isoliert werden. Der Molekularklon PERV-C(1312) zeigt die vollständigen Leserahmen für das *gag*-, *pol*- und *env*-Gen, die 5`LTR Sequenz beinhaltet einen Repeat mit 39 bp. Das Virus ist in der Lage produktiv porcine ST-IOWA Zellen *in vitro* zu infizieren und nach Transfektion in humane Nierenzellen in das Genom zu integrieren.

Eine Rekombination mit PERV-B(33)/ATG Partikeln konnte nicht gezeigt werden. Nach Transfektion von Deletionsmutanten von PERV-B(33)/ATG in MAX-T Zellen, denen das *gag*- und *pol*-Gen fehlte und lediglich der offene Leserahmen für das *env*-Gen intakt war, konnte keine Rekombination bzw. Inkorporation von Env-B Proteinen in PERV-C Partikeln nachgewiesen werden.

Für eine immunologische Detektion des Env-C Proteins wurde ein polyklonales Antiserum in Kaninchen generiert und ein monoklonaler Antikörper hergestellt. Die Epitope für beide Antikörper sind im SU des *env*-C Gens lokalisiert. Das Env-C Protein kann durch das polyklonale Antiserum durch Western Blot Analyse in Zelllysaten und in immunhistochemischen Analysen in verschiedenen Zelllinien detektiert werden.

In PERV-C Partikeln wird das Env-Protein sowohl durch das polyklonale Antiserum als auch durch den monoklonalen Antikörper spezifisch detektiert.

Durch den immunologischen Nachweis von PERV-C Proteinen ist es möglich im Hinblick auf eine XT_x den Nachweis dieser Proteine in möglichen Rezipienten durchzuführen. Durch die zusätzlich isolierten Flankensequenzen des replikationskompetenten Molekularklons PERV-C(1312) wäre eine Screening Methode, durch die Verwendung einer spezifischen Flankensonde, möglich, um genomische Integrationsorte und somit die Präsenz dieses Provirus in den Zellen des Spendertieres vorab zu überprüfen, um möglichst Spendertiere für eine XT_x zu verwenden, die frei von PERV-C(1312) sind. Somit leistet diese Arbeit einen Beitrag zur besseren Evaluierung des Risikopotentials zukünftiger Xenotransplantationen.

6 Literaturverzeichnis

Akiyoshi, D.E., Denaro, M., Zhu, H., Greenstein, J.L., Banerjee, P.T. and Fishman, J.A. 1998. Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine. *J. Virol.* **72**:4503–4507.

Andersson, G., Svensson, A.C., Setterblad, N. and Rask, L. 1998. Retroelements in the human MHC class II region. *Trends Genet.* **14**:109-114.

Armstrong, J.A., J.S. Porterfield, and A.T.D. Madrid. 1971. C-type virus particles in pig kidney cell lines. *J. gen. Virol.* **10**:195-198

Bach, F.H., Roson, S.C., Winkler, H., Ferran, C., Stuhlmeier, K.M., Wrighton, C.J., Hacock, W.W. 1995. Barriers to xenotransplantation. *Nature Med.* **1**:869-873.

Bailey, L.L., Nehlsen-Cannarella, S.L. Concepcion, W. Jolley, B.W. 1985. Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate. *JAMA* **254**:3321-3329.

Baltimore, D. 1970. RNA-dependent DNA polymerase4 in virions of RNA tumor viruses. *Nature Med.* **226**:1209-1211.

Baltimore, D. 1985. Retroviruses and retrotransposons: the role of reverse transcription in shaping the eukaryotic genome. *Cell* **40**:481-482.

Benveniste, R.E. and Todaro, G.J. 1974. Evolution of type C viral genes. I. Nucleic acid from baboon type C virus as a measure of divergence among primate species. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **71**:4513.

Birnboim, H.C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombination plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.

Blair, D.G., Mason, W.S., Hunter, E. and Vogt, P.K. 1976. Temperature-sensitive mutants of avian sarcoma viruses: genetic recombination between multiple or coordinate mutants and avian leukosis viruses. *Virology* **75**: 48-59.

Boeke, J.D., Stoye, J.P. 1997. Retrotransposons, endogenous retroviruses, and the evolution of retroelements. Retroviruses. Edit.: Coffin J.M., Huges S.H., Varmus H.E. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, S.343-436.

Bosch, S., Arnauld, C. and Jestin, A. 2000. Study of full-length porcine endogenous retrovirus genomes with envelope gene polymorphism in a specific-pathogen-free Large White swine herd. *J. Virol.* **74**:8575-8581.

Breimer, M.E., Björck, E., Svalander, C.T., Bengtsson, A., Rydberg, L., Lie-Karlsen, K., Attman, P.-O., Aurell, M., Samuelsson, B.E. 1996. Extracorporeal ("ex vivo") connection of pig kidneys to humans. I. Clinical data and studies of platelet destruction. *Xenotransplantation* **3**:328-339.

Breese, S.S. Jr. 1970. Virus-like particles occurring in cultures of stable pig kidney cell lines. Brief report. *Arch. Gesamte Virusforschung* **30**:401-414.

Brosius, J. 1991. Retroposons-Seeds of Evolution. *Science* **251**:753.

Buller, R.S., Sitbon, M., Portis, J.L. 1988. The endogenous mink cell focus-forming (MCF) gp70 linked to the Rmcf gene restricts MCF virus replication in vivo and provides partial resistance to erythroleukemia induced by Friend murine leukemia virus. *J. Exp. Med.* **167**:1535-1546.

Calne, R.Y. 1970. Organ transplantation between widely disparate species. *Transplant. Proc.* **2**: 550-556.

Canivet, M., Hoffman, A.D., Hardy, D., Sernatinger, J., Levy, J.A. 1990. Replication of HIV-1 in a wide variety of animal cells following phenotypic mixing with murine retroviruses. *Virology* **178**:543-551.

Chari, R.S, Collins, B.H., Magee, J.c., DiMaio, J.M., Kirk, A.D., Harland, R.C., McCann, R.L., Platt, J.,L., Meyers, W.C. 1994. Treatment of hepatic failure with ex vivo pig-liver perfusion followed by liver transplantation. *N. Engl. J. Med.* **331**:234-237.

- Cheslock, S.R., Anderson, J.A., Hwang, C.K., Pathak, V.K., Hu, W.S.** 2000. Utilization of nonviral sequences for minus-strand DNA transfer and gene reconstitution during retroviral replication. *J. Virol.* **74**:9571-9579.
- Clavel, F., Hoggan, M.D., Willey, R.L., Strebel, K., Martin, M.A., Repaske, R.** 1989. Genetic recombination of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **63**:1455-59.
- Coffin, J.M.** 1979. Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes : some unifying hypotheses. *J. Gen. Virol.* **42** :1-26.
- Coffin, J.M.** 1990. Genetic variation in retroviruses. In *Applied Virology Research, Virus Variation and Epidemiology*, ed. Kurstak, E., Marusyk, R.G., Murphy, F.A., Van Regenmortel, M.H.V. Vol. 2.
- Coffin, J.M.** 1992. Structure and classification of retroviruses. In: *The retroviridae*. Edit.: Levy, J.A. Plenum, New York. S. 19-50.
- Coffin, J.M., Hughes, S.H., Varmus, H.E.** 1997. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Covey, S.N.** 1986. Amino acid sequence homolgy in gag region of reverse transcribing elements and the coat protein of cauliflower mosaic virus. *Nucleic Acids Res.* **14**:623-633.
- Cozzi, E., White, D.J.G.** 1995. The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nature Med.* **1**:964-966.
- Cramer, D.V.** 1995. The use of xenograft for acute hepatic failure. *Transplant. Proc.* **27**:80-82.
- Cronin, J., Zhang, X.-Y. and Reiser, J.** 2005. Altering the Tropism of Lentiviral Vectors through Pseudotyping. *Curr. Gene Ther.* **5**:387-398.

Czauderna, F., Fischer, N., Boller, K., Kurth, R., Tönjes, R.R. 2000. Establishment and characterization of molecular clones of porcine endogenous retroviruses replicating on human cells. *J. Virol.* **74**:4028-4038.

Dai, Y., Vaught, T.D., Boone, J., Chen, S.-H., Phelps, C.J., Ball, S., Monahan, J.A., Jobst, P.M., McCreath, K.J., Lamborn, A.E., Cowell-Lucero, J.L., Wells, K.D., Colman, A., Polejaeva, I.A. and Ayares, D. 2002. Targeted disruption of the α 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nature biotech.* **20**:251-255.

Deacon, T., Schumacher, J., Dinsmore, J. Thomas, C., Palmer, P., Kott, S., Edge, A., Penny, D., Kassissieh, S., Dempsey, P., Isacson, O. 1997. Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. *Nature Med.* **3**:350-353.

Deininger, P.L. and Batzer, M.E. 1993. in *Evolutionary Biology*. Edit: Hecht M.K., MacIntyre, R.J. & Cleggs, M.T. Plenum, New York, Ausgabe 27, S.157-196.

Denner, J. 1998. Immunosuppression by retroviruses: Implications for xenotransplantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **30**:75-86.

Dinsmore, J.N., Manhart, C., Raineri, R., Jacoby, D.B., Moore, A. 2000. No evidence for infection of human cells with porcine endogenous retrovirus (PERV) after exposure to porcine fetal neuronal cells. *Transplantation* **70**:1382-1389.

Dombroski, B., A., Mathias, S.L., Nanthakumar, e., Scott, A.F., Kazazian, H.H. Jr. 1991. Isolation of an active human transposable element. *Science* **64**:1-30.

Dorling, A., Riesbeck, K., Warrens, A., Lecher, R. 1997. Clinical xenotransplantation of solid organs. *Lancet* **349**:867-871.

Einfeld, D. 1996. Maturation and assembly of retroviral glycoproteins. IN: *Morphogenesis and maturation of retroviruses*. Edit: Kräusslich H-G. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 133-176.

Ellermann, V., and Bang, O. 1908. Experimentelle Leukämie bei Hühnern., Zentralabl. Bakteriolog. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. **46**:595-609.

Ericsson, T.A., Takeuchi, Y., Templin, C., Quinn, G., Farhadian, S.F., Wood, J.C., Oldmixon, B.A., Suling, K.M., Ishii, J.K., Kitagawa, Y., Miyazawa, T., Salomon, D.R., Weiss, R.A. and Patience, C. 2003. Identification of receptors for pig endogenous retrovirus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**:6759-6764.

Evans, L.H., Alamgir, A.S.M. and Lavignon, M. 2003. Antigenic subclasses of polytropic Murine Leukemia Virus (MLV) isolates reflect three distinct groups of endogenous polytropic MLV-related sequences in NFS/N mice. J. Virol. **77**:10327-10338.

Fan, H. 1990. Influences of the long terminal repeats on retroviruses pathogenicity. Sem. Virol. **1**:165-174.

Fink, J.S., Schumacher, J.N., Ellias, S.L., Palmer, E.P., Saint-Hilaire, M., Shannon, K., Penn, R., Starr, P., VanHorne, C., Kott, H.S., Dempsey, P.K., Fishman, J.A., Raineri, R., Manhart, C., Dinsmore, J., Isacson, O. 2000. Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. Cell Transplantation **9**:372-378.

Fischer, N., Krach, U, Niebert, M., Tönjes, R.R. 2003. Detection of porcine endogenous retrovirus (PERV) using highly specific antisera against Gag and Env. Virology **308**:222-228.

Fishman, J.A. 1997. Xenosis and xenotransplantation: addressing the infectious risks posed by an emerging technology. Kidney Int. Suppl. **58**:41-45.

Fishman, J.A. and Patience, C. 2004. Xenotransplantation: Infectious Risk Revisited. American Journal of Transplantation. **4**:1383-1390.

Gardner, M.B, Kozak, C.A., O'Brien, S.J. 1991. The Lake Casitas wild mouse: Evolving genetic resistance to retroviral disease. Trends. Genet. **7**:2-27.

Gelderblom, H.R. 1987. Oncovirinae: type C oncoviruses. In: Animal virus structure, Edit.: Nermut M.V. & Steven A.C. Elsevier Science Publishers B.V.; aus "Perspectives in medical virology", Vol. 3, S. 273-287.

Gemeniano, M, Mpanju, O., salomon, D.R., Eiden, M.E., Wilson, C.A. 2006. The infectivity and host range of the ecotropic porcine endogenous retrovirus, PERV-C, is modulated by residues in the C-terminal region of its surface envelope protein. *Virology* **346**:108-117.

Goldfarb, M.P., Weinberg, R.A. 1981. Generation of novel, biologically active Harvey sarcoma viruses via apparent illegitimate recombination. *J. Virol.* **38**:136-150.

Good, A.H., Cooper, D.K., Malcolm, A.J., Ippolito, R.M., Koren, E., Neethling, F.A., Ye, Y., Zuhdi, N. and Lamontage, L.R. 1992. Identification of carbohydrate structures that bind human antiporcine antibodies: implications for discordant xenografting in humans. *Transplant. Proc.* **24**:559-562.

Goto, M., Maeda, A., Elfman, L., Suling, K.M., Wood, J.C., Patience, C., Groth, C.G. and Wennberg, L. 2004. No transmission of porcine endogenous retrovirus after transplantation of adult porcine islets into diabetic nude mice and immunosuppressed rats. *Xenotransplantation* **11**:340-346.

Greenstein, J.L., Sachs, D.H. 1997. The use of tolerance for transplantation across xenogeneic barriers. *Nature Biotechnol.* **15**:235-238.

Groth, C.G, Korsgren, O., Tibell, A., Tollemar, J., Möller, E., Bolinder, J., Östman, J., Reinholt, F.P., Hellerström, C., Andersson, A. 1994. Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. *Lancet* **344**:235-238.

Groth, C.G., Korsgren, O., Wennberg, O., Song, Z., Wu, G., Reinholt, F., Tibell, A. 1998. Pig-to-human islet transplantation. *Transplant. Proc.* **30**:3809-3810.

Hanafusa, H., Miyamoto, T. Hanafusa, T. 1970. A cell associated factor essential for formation of an infectious form of Rous sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **66**:314-321.

Harrison, I., Takeuchi, Y., Bartosch, B. and Stoye, J.P. 2004. Determinants of High Titer in Recombinant Porcine Endogenous Retroviruses. *J. Virol.* **78**:13871-13879.

Heneine, W., Tibell, A., Switzer, M., Sandstrom, P., Rosales, V.G., Mathews, A., Korsgren, O., Chapman, L.E., Folks, T.M., Groth, C.G. 1998. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenograft. *The Lancet* **352**:695-699.

Herniou, E., Martin, J., Miller, K. Cook, J., Wilkinson, M. and Tristem, M. 1998. Retroviral diversity and distribution in vertebrates. *J. Virol.* **72**:5955-5966.

Herring, C., Quinn, G., Bower, R., Parsons, N., Logan, N.A., Brawley, A., Elsome, K., Whittam, A., Fernandez-Suarez, X.M., Cunningham, D., Onions, D., Langford, G. and Scobie, L. 2001. Mapping Full-Length Porcine Endogenous Retroviruses in a Large White Pig. *J. Virol.* **75**:12252-12265.

Holmes, S., Singer, M. 1992. Studies on p40, the leucin zipper motif-containing protein encoded by the first open reading frame of an active human LINE-1 transposable element. *J. Biol. Chem.* **267**:19765-19768.

Hu, W.S., Emin, H.M. 1990. Genetic consequences of packaging two RNA genomes in one retroviral particle: pseudodiploidy and high rate of genetic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:1556-1560.

Hunter, E. 1978. The mechanism for genetic recombination in the avian retrovirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **79**:295-309.

Hunter, E. 1997. Viral Entry and Receptors. In *Retroviruses*. Coffin, J.M., Hughes, S.H., Varmus, H.E. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 71-120.

- Ivanov, V.A., Melnikov, A.A., Siunov, A.V., Fodor, J.J., Ilyin, Y.V.** 1991. Authentic reverse transcriptase is encoded by *jockey*, a mobile *Drosophila* element related to mammalian LINES. EMBO J. **149**:1099-1116.
- Junghans, R.P., Boone, L.R., Skalka, A.M.** 1982a. Retroviral DNA H structures: Displacement-assimilation model of recombination. Cell **30**:53-62.
- Junghans, R.P., Boone, L.R., Skalka, A.M.** 1982b. Products of reverse transcription in avian retrovirus analysed by electron microscopy. J. Virol. **43**:544-554.
- Katz, R.A. and Skalka, A.M.** 1990. Generation of Diversity in Retroviruses. Annu. Rev. Genet. **24**:409-445.
- Klymiuk, N., Muller, M., Brem, G., and Aigner, B.** 2002. Characterization of porcine endogenous retrovirus pro-pol nucleotide sequences. J. Virol. **76**:11738–11743.
- Klymiuk, N., Muller, M., Brem, G., and Aigner, B.** 2003. Recombination analysis of human-tropic porcine endogenous retroviruses. J. Gen. Virol. **84**:2729–2734.
- Knosalla, C., Cooper, D.K.C.** 2002. Xenotransplantation and tolerance. Frontiers in Bioscience **7**:1280-1287.
- Krach, U., Fischer, N., Czauderna, F., Kurth, R. and Tönjes, R.R.** 2000. Generation and testing of a highly specific anti-serum directed against porcine endogenous retrovirus nucleocapsid. Xenotransplantation **7**:221-229.
- Krach, U., Fischer, N., Czauderna, F. and Tönjes, R.R.** 2001. Comparison of replication-competent molecular clones of porcine endogenous retrovirus class A and class B derived from pig and human cells. J. Virol. **75**:5465-5472.
- Laemmli, UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**:680-685.

Lai, L., Kolber-Simonds, D., Park, K.W. et al. 2002. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* **295**:1089-1092.

Landau, N.R., Page, K.A., Littman, D.R. 1991. Pseudotyping with human T-cell leukemia virus type I broadens the human immunodeficiency virus host range. *J. Virol.* **65**:162-169.

Lavillette, D., Kabat, D. 2004. Porcine Endogenous Retroviruses Infect Cells Lacking Cognate Receptors by an Alternative Pathway: Implications for Retrovirus Evolution and Xenotransplantation. *J. Virol.* **78**:8868-8877.

Le Tissier, P., J. P.Stoye, Y. Takeuchi, C. Patience, and R. A. Weiss. 1997. Two sets of human-tropic pig retrovirus. *Nature* **389**: 681-682.

Lee, J.M., Tu, C.F., Tai, H.C., Chou, N.K., Yang, T.S., Weng, C.N., Lee, J.C., Lee, C.J., Lee, P.H. 2006. The hDAF exogene protects swine endothelial and peripheral blood mononuclear cells from xenoreactive antibody mediated cytotoxicity in hDAF transgenic pigs. *Transplant. Proc.* **38**:2270-2272.

Li, W.-H., Gu, Z., Wang, H., Nekrutenko, A. 2001. Evolutionary analyses of the human genome. *Nature* **409**:847-849.

Linial, M., Blair, D. 1982. Genetics of Retroviruses. In Weiss, R. Teich, N., Varmus, H., Coffin, J., eds. 1982. *RNA Tumor Viruses, Vol. 1.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor. pp. 649-783.

Linial, M., Blair, D. 1984. Genetics of retroviruses. In: Weiss, R., Teich, N., Varmus, H, Coffin, J. eds. *RNA Tumor Viruses, Vol 1.* New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 649-783.

Lund, A.H. and Pedersen, F.S. 1999. The nucleotide sequence of the high-leukemogenic murine retrovirus SL3-3 reveals a patch of mink cell focus forming-like sequences upstream of the ecotropic envelope gene. Brief report. *Arch. Virol.* **144**: 2207-2212.

Löwer, R., Löwer, J., Kurth, R. 1996. The virus in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 5177-5184.

Magre, S, Takeuchi, Y, Langford, G., Richards, A., Patience, C. and Weiss, R. 2004. Reduced Sensivity to Human Serum Inactivation of Enveloped Viruses Produced by Pig Cells Transgenic for Human CD55 or deficient for the Galactosyl- α (1-3) Galactosyl Epitope. *J. Virol.* **78**:5812-5819.

Martin, S.I., Wilkinson, R.A., Fishman, J.A. 2006. Genomic presence of recombinant porcine endogenous retrovirus in transmitting miniature swine. *Virology* **3**: ahead of print.

Martina, Y., Kurian, S., Cherqui, S., Evanoff, G., Wilson, C., Salomon, D.R. 2005. Pseudotyping of porcine endogenous retrovirus by xenotropic murine leukaemia virus in a pig islet xenotransplantation model. *Am. J. Transplant.* **5**:1837-47.

Martinelli, S.C., Goff, S.P. 1990. Rapid reversion of a deletion mutation in Moloney murine leukemia virus by recombination with a closely related endogenous provirus. *Virology* **174**: 135-144.

McCutchan, F.E. 2000. Understanding the genetic diversity of HIV-1. *AIDS* **14**:31-44.

Michaels, M.G., McMichael, J.P., Brasky, K., Kalter, S., Peters, R.L., Starzl, T.E. and Simons, R.L. 1994. Screening donors for xenotransplantation. The potential for xenozoonoses. *Transplantation* **57**:1462-1465.

Moalic, Y., Blanchard, Y., Felix, H., Jestin, A. 2006. Porcine endogenous retrovirus integration sites in the human genome: features in common with those of murine leukemia virus. *J. Virol.* **80**:10980-10988.

Modrow, S. und Falke, D. 1997. *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.

Morikawa, J., Barsov, E. and Jones, I. 1993. Legitimate and Illegitimate of Human Immunodeficiency Virus Glycoproteins by Furin. *J. Virol.* **67**:3601-3604.

Nagy, J. 1999. A note on the early history of renal transplantation. Emerich (Imre) Ullmann. *Am. J. Nephrol.* **19**:346-349.

Negroni, M. and Buc, H. 2001. Mechanisms of Retroviral Recombination. *Annu. Rev. Genet.* **35**:275-302.

Nermut, M.V. and Hockley, D.J. 1996. Comparative morphology and structural classification of retroviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **214**:1-24.

Nethe, M., Berkhout, B., van der Kuyl, A.C. 2005. Retroviral superinfection resistance. *Retrovirology* **2**:52.

Niebert, M., Rogel-Gaillard, C., Chardon, P., Tönjes, R.R. 2002. Characterization of chromosomally assigned replication-competent gamma porcine endogenous retroviruses derived from a large white pig and expression in human cells. *J Virol.* **76**: 2714-20.

Niebert, M., Tönjes, R.R. 2003. Analyses of prevalence and polymorphisms of six replication-competent and chromosomally assigned porcine endogenous retroviruses in individual pigs and pig subspecies. *Virology* **313**:427-434.

Niebert M., Tönjes, R.R. 2005. Evolutionary Spread and Recombination of Porcine Endogenous retrovirus in the Suiformes. *J. Virol.* **79**:649-654.

Oldmixon, B.A., Wood, J.C., Ericsson, T.A., Wilson, C.A., White-Scharf, M.E., Andersson, G., Greenstein, J.L., Schuurman, H.-J. and Patience, C. 2002. Porcine Endogenous Retrovirus Transmission Characteristics of an Inbred Herd of Miniature Swine. *J. Virol.* **76**:3045-3048

Panganiban, A.T., Fiore, D. 1988. Ordered intrastrand DNA transfer during reverse transcription. *Science* **241**:1064-1069.

Paradis, K., Langford, G., Long, Z., Heneine, W., Sandstrom, P., Switzer, W.M., Chapman, L.E., Lockey, C., Onions, D., Otto, E. 1999. Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. *Science* **285**:1236-1241.

Patience, C., Takeuchi, Y. & Weiss, R.A. 1997. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nature medicine* **3**:282-286.

Patience, C., Patton, G.S., Takeuchi, Y., Weiss, R.A., McClure, M.O., Rydberg, L., Breimer, M.E. 1998. No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidney. *The Lancet* **352**:699-701.

Patience, C., Switzer, W.M. Takeuchi, Y., Griffiths, D.J. Goward, M.E., Heneine, W. Stoye, J.P., Weiss, R.A. 2001. Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species. *J. Virol.* **75**:2771-2775.

Pauly, T., Elbers, K., König, M., Lengsfeld, T., Saalmüller, A., and Thiel, H.-J. 1995. Classical swine fever virus-specific cytotoxic T lymphocytes and identification of a T cell epitope. *Journal of General Virology* **76**:3039-3049.

Peeters, M, Sharp, P.M., 2000. Genetic diversity of HIV-1: the moving target. *AIDS* **14**:129-40.

Quinn, G., Wood, J., Suling, K., Arn, S., Sachs, D.H., Schurman, H.-J. and Patience, C. 2004. Genotyping of Porcine Endogenous Retroviruses from a Family of Miniature Swine. *J. Virol.* **78**:314-319.

Rabson, A.B. and Graves, B.J. 1997. Synthesis and processing of viral RNA. In *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes and H.E. Varmus, eds. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press)), pp. 205-261.

Reemstma, K., McCracken, B.H., Schlegel, J.U. et al. 1964. Renal heterotransplantation in man. *Ann. Surg.* **160**:384-410.

Reizer, J., Reizer, A., and Saier, M., Jr. 1994. A functional superfamily of sodium/solute symporters., *Biochimica et Biophysica Acta* **1197**:133-166.

Ritzhaupt, A., van der Laan, L.J.W., Salomon, D.R. and Wilson, C.A. 2002. Porcine Endogenous Retrovirus Infects but Does Not Replicate in Nonhuman Primate Primary Celss and Cell Lines. *J. Virol.* **76**:11312-11320.

Rous, P. 1911. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent seperatable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* **13**:397-411.

Ryan, U.S. 1995. Complement inhibitory therapeutics and xenotransplantation. *Nature Med.* **1**:967-968.

Sachs, D.H. 1994. The pig as a xenograft donor. *Path. Biol.* **42**:217-219.

Saier, M., Jr. 2000. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters., *Microbiol Mol Bio Rev* **64**:354-411.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, N.Y.

Scheef, G., Fischer, N., Krach, U., and Tönjes, R. R. 2001. The number of a U3 repeat box acting as an enhancer in long terminal repeats of polytropic replication-competent porcine endogenous retroviruses dynamically fluctuates during serial virus passages in human cells. *J. Virol.* **75**:6933–6940.

Scheef, G., Fischer, N., Flory, E., Schmitt, I., Tönjes, R.R. 2002. Transcriptional regulation of porcine endogenous retroviruses released from porcine and infected human cells by heterotrimeric protein complex NF-Y and impact of immunosuppressive drugs. *J. Virol.* **76**:12553-63.

Scobie, L., Taylor, S., Wood, J.C., Suling, K.M., Quinn, G., Meikle, S., Patience, C., Schuurman, H.-J. and Onions, D.E. 2004. Absence of Replication-Competent Human Tropic Porcine Endogenous Retrovirus in the Germ Line DNA of Inbred Miniature Swine. *J. Virol.* **78**:2502-2509.

Sharp, P.M., Bailes, E., Robertson, D.L., Gao, F., Hahn, B.H. 1999. Origins and evolution of AIDS viruses. *Biol. Bull.* **196**:338-342.

Smit, A.F.A. and Riggs, A.D. 1995. MIRs are classic, tRNA-derived SINEs that amplified before a mammalian radiation. *Nucleic Acids Res.* **23**:98-102.

Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.

Stoye, J.P., Moroni, C., Coffin, J.M. 1991. Virological events leading to spontaneous AKR thymomas. *J. Virol.* **65**:1273-1285.

Stoye, J.P., Coffin, J.M. 1995. The dangers of xenotransplantation. *Nat. Med.* **1**: 1100.

Studier, F.W., and Moffatt, B. A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**:113-30.

Suling, K., Quinn, G., Wood, J. and Patience, C. 2003. Packaging of human endogenous retrovirus sequences is undetectable in porcine endogenous retrovirus particles produced from human cells. *Virology* **312**:330-336.

Swain, A., Coffin, J.M. 1992. Mechanism of transduction by retroviruses. *Science* **255**:841-845.

Swanstrom, R., Parker, R.C., Varmus, H.E., Bishop, J.M. 1983. Transduction of a cellular oncogene: the genesis of Rous sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:2519-2523.

Swergold, G.D. 1990. Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter. *Mol. Cell. Biol.* **10**:6718-6729

Takahagi, Y., Fujimura, T., Miyagawa, S., Nagashima, H., Shigehisa, T., Shirakura, R., Murakami, H. 2005. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase gene knockout pigs expressing both human decay-accelerating factor and N-acetylglucosaminyltransferase III. *Mol. Reprod. Dev.* **71**: 331-338.

Takeuchi, Y., Porter, C.D., Strahan, K.M, Preece, A.F., Gustafsson, K., Cosset, F.-L., Weiss, R., Collins, M.K. 1996. Sensitization of cells and retroviruses to human serum by galactosyl(α 1-3)galactosyltransferase. *Nature* **379**:85-88.

Takeuchi, Y., Liong, S.-H., Bieniasz, P.D., Jäger, U., Porter, C.D., Friedman, T., McClure, M.O., Weiss, R.A. 1997. Sensitization of Rhabdo-, Lenti-, and Spumaviruses to human serum by galactosyl(α 1-3)galactosylation. *J. Virol.* **71**:6174-6178.

Takeuchi, Y., Patience, C., Magre, S., Weiss, R.A., Banerjee, P.T., LeTissier, P., and Stoye, J.P. 1998. Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus. *J. Virol.* **72**:9986–9991.

Taniguchi, S. and Cooper, D.K.C. 1997. Clinical xenotransplantation – past, present and future. *Ann. R. Surg. Engl.* **79**:13-19.

Teich, N. 1984. Taxonomy of retroviruses. In: RNA tumor viruses. 2nd edition. Edit.: Weiss,R., Teich, N., Varmus, H., Coffin, J. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, S. 25-208.

Temin, H. 1964. Nature of the provirus of Rous sarcoma. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* **17**:557-570.

Tibell, A., Groth, C.G., Moller, E., Korsgen, O., Andersson, A., Herstrom, C. 1994. Pig-to-human islet transplantation in eight patients. *Transplant. Proc.* **26**:762-763.

Tidona, C.A. and Darai, G. 2001. *The Springer Index of Viruses.* Springer Verlag, Heidelberg.

Todaro, G.J., Sherr, C.J., Benveniste, R.E. 1976. Baboons and their close relatives are unusual among primates in their ability to release nondefective endogenous type c viruses. *Virology.* **72**:278-282.

Torado, G.J., Benveniste, R.E. Lieber, M.M. Sherr, C. 1973. Characterization of a type C virus released from the porcine cell line PK(15). *Virology* **58**:65-74.

UNOS 1995. Annual report of the U.S. Scientific Registry for Transplant Recipients and the Organ Procurement and Transplantation Network: transplant data 1988-1994 USA: UNOS/US Department of Health and Human Service.

Van der Laan, L.J.W., Lockey, C., Griffeth, B.C., Frasier, F.S., Wilson, C.A., Onions, D.E., Hering, B.J., Long, Z., Otto, E., Torbett, B.E. & Salomon, D.R. 2000. Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Letters to nature* **407**:90-94.

Vogt, P.K. 1971. Genetically stable reassortment of markers during mixed infection with avian tumor viruses. *Virology* **46**:947-952.

Vogt, P.K. 1997. Historical introduction to the general properties of retroviruses. In *Retroviruses*, Coffin J.M., Hughes S.H. and Varmus, H.E., eds. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 1-25

Weiner, A.M. 2000. Do all SINEs lead to LINEs ? *Nature Genet.* **24**:332-333.

Weiss, R. 1998. Science, medicine, and the future: Xenotransplantation. *BMJ* **317**:931-934.

Weiss, R.A. 1998. Transgenic pigs and viruses adaption. *Nature* **391**:327-328.

Wilkinson, D.A., Mager, D.L., and Leong, J.C. 1994. Endogenous human retrovirus. In *The Retroviridae*, J.A. Levy, ed. (New York: Plenum Press) 465-535.

Wilson, C., A., Wong, S., Muller, J., Davidson, C.E., Rose, T. M. and Burd, P. 1998. Type C Retrovirus Released from Porcine Primary Peripheral Blood Mononuclear Cells Infects Human Cells. *J. Virol.* **72**:3082-3087.

Wilson, C.A., Wong, S., VanBrocklin, M. and Federspiel, M.J. 2000. Extended Analysis of the In Vitro Tropism of Porcine Endogenous Retrovirus. *J. Virol.* **74**:49-56.

Wood, J.C., Quinn, G., Suling, K.M., Oldmixon, B.A., Van Tine, B.A., Cina, R., Arn, S., Huang, C.A., Scobie, L., Onions, D.E., Sachs, D.H., Schuurman, H.-J., Fishman,

- J.A. and Patience, C.** 2004. Identification of Exogenous Forms of Human-tropic Porcine Endogenous Retrovirus in Miniature Swine. *J. Virol.* **78**:2494-2501.
- Wu, X., Li, Y., Crise, B. and Burgess, S.M.** 2003. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* **300**:1749-1751.
- Wyke, J.A., Bell, J.G., Beaman, J.A., Henderson, L.E., Bowers, M.A., et al.** 1975. Genetic recombination among temperature-sensitive mutants of Rous sarcoma virus. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **39**:897-905.
- Ye, Y., Neethling, F.A., Niekrasz, M., Koren, E., Richards, S.V., Martin, M., Kosanke, S., Oriol, R., Cooper, D.K.** 1994. Evidence that intravenously administered alpha-galactosyl carbohydrates reduce baboon serum cytotoxicity to pig kidney cells (PK15) and transplanted pig hearts. *Transplantation* **58**:330-337.
- Yoder, J.A., Walsh, C.P. and Bestor, T.H.** 1997. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends. Genet.* **13**:335-340.
- Yang, Y.-G., Wood, J.C., Lan, P., Wilkinson, R.A., Sykes, M., Fishman, J.A. and Patience, C.** 2004. Mouse retrovirus mediates porcine endogenous retrovirus transmission into human cells in long-term human-porcine chimeric mice. *J. Clin. Invest.* **114**:695-700.
- Yoshimura, F.K., Wang, T. and Cankovic, M.** 1999. Sequences between the enhancer and promoter in the long terminal repeat affect murine leukemia virus pathogenicity and replication in the thymus. *J. Virol.* **73**:4890-4898.
- Zhang, H., Harrison, P., Liu, F. and Gerstein, M.** 2003. Millions of years evolution preserved a comprehensive catalogue of the processed pseudogenes in the human genome. *Genome Res.* **13**:2548-2558.
- Zhang, J., Tang, L.Y., Li, T., Ma, Y, Sapp, C.M.** 2000. Most retroviral recombinations occur during minus-strand DNA synthesis. *J. Virol.* **74**:2313-2322.
- Zhang, J., Temin, H.M.** 1994. Retrovirus recombination depends on the length of sequence identity and is not error prone. *J. Virol.* **68**:2409-2414.

Závada, J. 1976. Viral pseudotypes and phenotypic mixing. Arch. Virol. **50**: 1-15.

7 Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Aspartat
E	Glutamat
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Thryptophan
Y	Tyrosin

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Acc. No.	Accession Nummer (accession number)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BAP	bakterielle alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
BrdUTP	Bromo-deoxyuridintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CA	Kapsidprotein (capsid)
Cap	7-Methylguanosintriphosphatmodifikation
CIP	intestinale alkalische Phosphatase des Kalbes (calf intestinal phosphatase)
cpm	Zähler pro Minute (counts per minute)
DMEM	Dulbecco`s modifiziertes Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2`-Desoxy-Nukleosid-5`-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamin Tetraessigsäure
<i>env</i> -Gen	<i>envelope</i> -Gen, Gen das für retrovirale Oberflächenprotein kodiert
Env	retrovirales Oberflächenprotein (Envelope-Protein)
et al.	Et alii, und andere

FKS	fötales Kälberserum
Gag	gruppenspezifische Antigene
h	Stunde (hour)
HAR	hyperakute Abstoßungsreaktion (hyperacute rejection)
IN	Integrase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani-Medium
LTR	retroviraler Promoter (Long Terminal Repeat)
mg	Milligramm
min	Minute
MLV	murines Leukämievirus
mM	millimolar
mRNA	messenger RNA
mU/ml	milli Units pro Milliliter
nt	Nukleotid
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
PBS	Primer Bindestelle
PBS	Phosphat gepufferte Saline (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PERV	porzines endogenes Retrovirus
pfu	Einheiten des Virustiters (plaque forming units)
p.I.	post-Infektion
PMSF	Phenylmethansulfonyl Fluorid
Pol	Polymerase
<i>pol</i> -Gen	Polymerase Gen
poly(A)	Polyadenylierungssignal
p.T.	post-Transfektion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SA	Spliceakzeptor
Sec.	Sekunde
SD	Splicedonor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Natriumcitrat (saline sodium citrate)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
TBS	Tris gepufferte Saline (tris buffered saline)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembranprotein
U	Einheiten (units)

8 Anhang

		Section 1					
	(1)	1	10	20	30	47	
LTR PERV MSL	(1)	TCAAAGGATGAAAAATACAACCTAAGCTAATGAGGAGCTTAAATATTGT					
LTR PERV-C(1312)	(1)	TCAAAGGATGAAAAATACAACCTAAGCTAATGAGGAGCTTAAAAATTGT					
		Section 2					
	(48)	48	60	70	80	94	
LTR PERV MSL	(48)	TCTGAATTCAGAGTTTGTTCCTTATAGGTAAGGTTAGGTTTTTTT					
LTR PERV-C(1312)	(48)	TCTGAATTCAGAGTTTGTTCCTTATAGGTAAGGATTAGGTTTTTTT					
		Section 3					
	(95)	95	100	110	120	130	141
LTR PERV MSL	(95)	TGCTGTTTTAAAAATATGCGGAAGTAAAAATAGGCTCTGAGTACGTGTC					
LTR PERV-C(1312)	(95)	-GCTGTTTTAAAAATATGCGGAAGTAAAAATAGGCCCTGAGTACATGTC					
		Section 4					
	(142)	142	150	160	170	188	
LTR PERV MSL	(142)	TCTAGACACGAAACTTCTTGAAACTATTTGAGATAACAAGAACAGGG					
LTR PERV-C(1312)	(141)	TCTAGGCAATGAAACTTCTTGAAACTATTTGAGATAACAAGAAAAGGG					
		Section 5					
	(189)	189	200	210	220	235	
LTR PERV MSL	(189)	AGTTTTCTAACTGCTTGTTCAGCTTCTGTAAAACCTGCTTGCAAAAGAT					
LTR PERV-C(1312)	(188)	AGTTTTCTAACTGCTTGTTCAGCTTCTGTAAAACCTGCTTGCGCCATAA					
		Section 6					
	(236)	236	250	260	270	282	
LTR PERV MSL	(236)	AAAAGGAGAGGGGGTTAATCTC-TAAAGCAACCTCAAATTTGGTTGGC					
LTR PERV-C(1312)	(235)	AGATGTTGAAATGTTGATACACATATCTTGGTGACAAACATGTCCTCC					
		Section 7					
	(283)	283	290	300	310	329	
LTR PERV MSL	(282)	CCAT----AAAGATGTTGAAACGTTGATACACATATCTTGGTGACAA					
LTR PERV-C(1312)	(282)	CCACCCCGAAAACATGCGCAATGTGTAACCTCTAAAACAATTTAAATT					
		Section 8					
	(330)	330	340	350	360	376	
LTR PERV MSL	(325)	CATGTCTCCCCGAAACATGTGCA----AATGTGTAACCTCCAAA----					
LTR PERV-C(1312)	(329)	AATTTGGTCCACGAAGCGCGGCTCTCGAAGTTTTTAAATGACTGGTT					
		Section 9					
	(377)	377	390	400	410	423	
LTR PERV MSL	(364)	----ACAATTTAAATTAATTTGGTCCACGAAGCGTGGGCTTTGTTGTTG					
LTR PERV-C(1312)	(376)	TGTGATTTTTGAAATGATTTGGTTTGTAAAGCGCGGGCTTTGTTGTTG					
		Section 10					
	(424)	424	430	440	450	470	
LTR PERV MSL	(407)	AACCCCATAAAAGCTGTCCCGACTCCACACTCGCCGCCGAGTCCCTC					
LTR PERV-C(1312)	(423)	AACCCCATAAAAGCTGTCCCGACTCCACACTCGGGGCCGAGTCCCTC					
		Section 11					
	(471)	471	480	490	500	517	
LTR PERV MSL	(454)	TACCCCTGCGTGGTGTATGACTGTGGGCCCCAGCGCGCTTGGAAATAA					
LTR PERV-C(1312)	(470)	TACCCCTGCGTGGTGTACGACTGTGGGCCCCAGCGCGCTTGGAAATAA					
		Section 12					
	(518)	518	530	540	550	564	
LTR PERV MSL	(501)	AAATCCTCTTGCCTTTGCATCAAGACCGCTTCTCGTGAGTGATTAA					
LTR PERV-C(1312)	(517)	AAATCCTCTTGCCTTTGCATCAAGACCGCTTCTCGTGAGTGATTAA					
		Section 13					
	(565)	565	570	580	590	600	611
LTR PERV MSL	(548)	GGGGAGTCGCCCTTCCGAGCCTAGAAGTTCTTCTTGCTGGTCTTAC					
LTR PERV-C(1312)	(564)	GGGGAGTCGCCCTTCCGAGCCTGGAGGTTCTTCTTGCTGGTCTTAC					
		Section 14					
	(612)	612					
LTR PERV MSL	(595)	A					
LTR PERV-C(1312)	(611)	A					

Abb. 8.1: Sequenzvergleich zwischen der 5'LTR von PERV-MSL und PERV-C(1312). Die grau unterlegten Nukleotide zeigen die homologen Bereiche zwischen beiden Sequenzen, Nukleotidunterschiede sind nicht unterlegt. Die Striche bedeuten das Fehlen des Nukleotids.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den Menschen danken, die dazu beigetragen haben, dass diese vorliegende Arbeit zustande gekommen ist:

Herrn Prof. Dr. Johannes Löwer für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Paul-Ehrlich-Institut.

Herrn PD Dr. Ralf Tönjes für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seiner Arbeitsgruppe, die Vergabe des Themas, die praktische Betreuung sowie die stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft in wissenschaftlichen Belangen.

Herrn Prof. Dr. Dingermann für die fachliche und fachübergreifende Betreuung.

Allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe 6/4, die mir das Einarbeiten in ein neues Thema sehr erleichtert haben, für die unglaublich tolle Arbeitsatmosphäre, die vielen praktischen Tipps, sowie ein immer offen währendes Ohr für wissenschaftliche Diskussionen: Nicole Fischer, Andreas Jungmann, Melanie Krämer, Eva Dörrschuck, Kristina Sawallisch, Dr. Dagmar Schilling-Leiß, Yvonne Buckendahl, Dr. Marcus Niebert und Dr. Katrin Krach.

Herrn Dr. Boller für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Allen anderen Menschen, die hier namentlich nicht erwähnt worden sind.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder bedanken, die mir das Studium und die Promotion ermöglicht haben und auf deren Unterstützung ich jederzeit bauen konnte.

VIELEN DANK !

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Thomas Preuß
Geburtsdaten: 08.03.1977
Geburtsort: Bremen

Schulbildung

1983 - 06/1996 Grundschule, Mittelstufe, Oberstufe in Bremen
Juni 1996 Abitur

Studium

10/1997 - 09/1999 Biologiestudium an der Universität Bremen
September 1999 Vordiplomsprüfung im September, Note: Gut
10/1999 - 12/2002 Biologiestudium an der Georg-August-Universität Göttingen
November 2001 Diplomprüfungen im November, Note: Gut
Hauptfach: Botanik
Biologisches Nebenfach: Humangenetik
Nichtbiologisches Nebenfach: Pharmakologie
3/2001 - 11/2002 Experimentelle Diplomarbeit im Bereich Humangenetik.
Thema: „Analysen zur Expression, subzellulären Lokalisation und zur Funktion eines putativen peroxisomalen Proteins der Maus“
Dezember 2002 Studienabschluß Diplom-Biologe, Note: Gut

Promotion

1/2003 – 12/2006 Promotionsstudium im Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Thema: „Klonierung und Charakterisierung eines ecotropen porzinen endogenen Retrovirus der Klasse C (PERV-C)“