

**Porcine endogene Retroviren (PERVs):
In vitro-Infektionsversuche und Etablierung von
Methoden zum Nachweis der Virusintegration**

Diplomarbeit

**vorgelegt der Fakultät für Biologie der
Technischen Universität
Darmstadt**



**angefertigt am
Paul-Ehrlich-Institut, Langen
und
Robert-Koch-Institut, Berlin**

Simone Rubant, im Januar 2001

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Organtransplantation und mangelnde Verfügbarkeit von Organen	1
1.2 Xenotransplantation	3
1.2.1 Mögliche Spendertiere	4
1.2.2 Abstoßungsreaktionen	5
1.2.3 Risiken	6
1.3 Einteilung der Retroviren	7
1.3.1 Retroviren und deren Aufbau	8
1.3.2 Porcine endogene Retroviren	10
2. Zielsetzung	13
3. Material und Methoden	14
3.1 Geräte	14
3.2 Verbrauchsmaterial	15
3.2.1 Chemikalien	15
3.2.2 Oligonukleotide	16
3.2.3 Restriktionsendonukleasen	17
3.2.4 Sonstige Enzyme	18
3.3 Lösungen und Puffer	18
3.4 Medien	20
3.4.1 Medien zur Kultivierung von Zellen	20
3.4.2 Medien zur Kultivierung von Bakterien	21
3.4.3 Antibiotika	22
3.5 Antikörper und Antiseren	22
3.6 Verwendete Zellen	22
3.6.1 PERV-produzierende Zelllinien	22
3.6.2 Humane Zelllinien für Infektionsversuche	23
3.6.3 Humane primäre Zellen	23

3.7 Bakterien und Plasmide	23
3.8 Zellbiologische Methoden	24
3.8.1 Kultivierung von Zellen	24
3.8.2 Bestimmung der Zelldichte	24
3.8.3 Infektion von Zellen	25
3.8.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	25
3.8.5 Lymphozytenseparation	26
3.9 Methoden zum Virusnachweis	27
3.9.1 Immunperoxidase-Assay (IPA)	27
3.9.2 Virustitration	28
3.9.3 RT-Test	29
3.10 Molekularbiologische Methoden	29
3.10.1 Isolierung von Nukleinsäuren	29
3.10.1.1 Isolierung von genomischer DNA	29
3.10.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA	30
3.10.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA	30
3.10.2 Elution von DNA aus Agarosegelen	30
3.10.3 Restriktionsverdau	31
3.10.4 Agarose-Gelelektrophorese	31
3.10.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)	32
3.10.6 RT-PCR	34
3.10.7 Herstellung PERV-spezifischer Sonden	34
3.10.7.1 Fällung und Aufreinigung von DNA	35
3.10.8 Southern Blot	35
3.10.8.1 Hybridisierung der Sonde	36
3.10.8.2 Detektion der Sonde	36
3.11 Klonierung	37
3.11.1 Ligation	38
3.11.2 Transformation	38
3.11.3 Selektion positiver Klone	39
3.11.4 Amplifizierung und Markierung der Sonden	40

4. Ergebnisse	
4.1 Southern Blot	41
4.1.1 Nachweis von PERV mittels PCR	41
4.1.2 Herstellung der Sonden	41
4.1.3 Hybridisierung mit „kalter“ Sonde	42
4.1.4 Hybridisierung mit genomischer DNA	44
4.1.5 Restriktionsverdau und DNA-Isolierung	46
4.1.6 Hybridisierung mit Phenol/Chloroform-gereinigter DNA	47
4.1.7 Inkubationszeiten und Fixierung der DNA	49
4.1.8 Hybridisierungsbedingungen und Stringenzwaschungen	50
4.1.9 Versetzen der genomischen DNA mit unmarkierter Sonde	50
4.1.10 Optimierung der Sondenherstellung	51
4.1.11 Ermittlung der Detektionsgrenze	52
4.2 <i>In vitro</i> -Infektionsversuche	55
4.2.1 Analyse der für die <i>In vitro</i> -Infektionsversuche verwendete PERV-produzierende Zelllinie (PERV/293 Passage 5)	55
4.2.2 EM-Aufnahmen von PERV-produzierenden Zelllinien	56
4.2.3 RT-Aktivitäten von PERV-produzierenden Zelllinien	57
4.2.4 Titer der Viren von verschiedenen PERV-produzierenden Zelllinien	58
4.2.5 <i>In vitro</i> -Infektionsversuche mit PERV	59
5. Diskussion	64
6. Zusammenfassung	70
7. Anhang	71
8. Literaturverzeichnis	75

2. Zielsetzung

Die Xenotransplantation, d.h. die Übertragung von Zellen, Geweben und Organen einer Spezies auf eine andere, ist beim Menschen derzeit nur mit Schweinen als Spendertiere denkbar. Neben den physiologischen und immunologischen Problemen ist vorerst das Risiko einer Übertragung potentiell pathogener Mikroorganismen nicht auszuschließen. Ein besonderes Risiko geht von den porcinen endogenen Retroviren (PERVs) aus, die im Genom aller Schweine vorhanden sind und die menschliche Zellen *in vitro* infizieren können. Im Rahmen einer Risikoevaluierung zur Übertragung von PERV auf den Menschen durch eine Xenotransplantation soll in dieser Diplomarbeit die Southern Blot-Methode zum Nachweis der PERV-Provirusintegration etabliert werden. Diese Methode wäre hilfreich, um die Integrationsorte von PERV im porcinen Genom zu untersuchen. Da gezeigt worden war, dass PERV von peripheren Blutzellen (PBMCs) freigesetzt wird, und es dabei Unterschiede in der Virusfreisetzung zwischen den einzelnen Schweinerassen und den Individuen dieser Rassen gibt, könnte untersucht werden, ob es eine Korrelation zwischen der Häufigkeit und der Verteilung von integrierten PERV-Proviruskopien und der entsprechenden Virusfreisetzung gibt. Niedrig-exprimierende Tiere könnten dabei von besonderer Bedeutung für die Xenotransplantation sein. Weiterhin könnte mit dieser Methode die Integration von PERV nach der Infektion von humanen und tierischen Zellen charakterisiert werden. Es wäre von Interesse zu ermitteln, ob das Virus an immer gleichen Stellen in die jeweiligen Genome integriert und ob es dabei zu Unterschieden in der Anzahl der integrierten Kopien kommt.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten *In vitro*-Infektionsversuche an humanen Zellen durchgeführt werden, um menschliche Zielzellen zu identifizieren und die potentiellen Risiken für den Menschen zu evaluieren. Dazu wurden humane Zellen mit PERV von Virus-produzierenden 293-NIH Zellen infiziert. Für die Infektionsversuche wurden zudem primäre Zellen verwendet, die im Unterschied zu immortalisierten Zelllinien die natürlichen Bedingungen im Menschen besser widerspiegeln.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Bakterienschüttler	New Brunswick Scientific Co. Inc. (G 25)
Brutschränke	Heraeus Instruments bbd 6220 Heraeus T 6060
Entwickler	Fuji-Film, FPM-100A
ELISA-Reader	Tecan (Spectra Classic)
Geldokumentation:	
Bildschirm	Hitachi
Drucker	Mitsubishi (P 90)
Optik	Kaiser
Steuerelement	Cybertech (CS 1)
UV-Tisch	Biometra
Gelelektrophorese:	
Gelkammern	Biorad (Sub Cell GT 192) Biorad (Wide Mini-Sub Cell GT)
Netzgerät	Biorad (Mini-Sub Cell GT) Biorad (Power Pac 300)
Heizblock	Eppendorf Thermomixer 5436
Heizplatte	Ikamag REC-G
Horizontalschüttler	GFL, 3016
Hybridisierungsöfen	Heraeus Instruments HERA 12 Appligene Mini Hybridisation Oven
Magnetrührer	Eppendorf Thermomixer 5436
Megafuge	Heraeus Instruments 1.0 R
Mikroskop	Zeiss (ID 03)
Mikrowelle	Moulinex, Micro-Chef FM B930, 1100 W
pH-Meter	Multical WTW pH 526
Photometer	Shimadzu UV-1202

Gerät	Hersteller
Scintillationszähler	Beckmann
Sterilbänke	The Baker Co. Inc. (SterilGard, Class II, Type A/B3) Biogard Hood
Thermocycler	Biozym (MJ Research PTC-200) Eppendorf (Mastercycler Gradient)
UV-cross-linker	Straragene, Stratalinker 1800
Vakuum Blotter	Pharmacia, Vacu Gene XL
Vortex	Bender & Hobein AG, Vortex Genie 2
Waagen	Sartorius (LP2200P) Sartorius (Isocal – AC 2115)
Wasserbad	Köttermann GFL
Zentrifugen	Heraeus Megafuge 1.0 R Heraeus Minifuge RF Eppendorf (Centrifuge 5415 D) Eppendorf (Centrifuge 5403) Stratagene

3.2 Verbrauchsmaterialien

3.2.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Agarose	Roth GmbH, Karlsruhe
N, N-Dimethylformamid	Perseptive Biosystems, Warrington, UK
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Glutamin	PEI, Langen

Chemikalie	Hersteller
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glycerin	Roth GmbH, Karlsruhe
Glykogen	Boehringer, Mannheim
HCl conc.	Merck, Darmstadt
HEPES	PEI, Langen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
IPTG	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Marvel, England
Natriumacetat	Applichem, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Phenol	Roth GmbH, Karlsruhe
Chloroform	Roth GmbH, Karlsruhe
Polybrene	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
SDS	Merck, Darmstadt
Tris-hydroxymethyl-aminomethan	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Versen	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

3.2.2 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Referenz
env (PERV-A)	TGG AAA GAT TGG CAA CAG CG AGT GAT GTT AGG CTC AGT GG	Le Tissier <i>et al.</i> , (1997)
env (PERV-B)	TTC TCC TTT GTC AAT TCC GG TAC TTT ATC GGG TCC CAC TG	Le Tissier <i>et al.</i> , (1997)

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Referenz
env (PERV-C)	CTG ACC TGG ATT AGA ACT GG ATG TTA GAG GAT GGT CCT GG	Takeuchi <i>et al.</i> , (1998)
gag (PERV):	GCG ACC CAC GCA GTT GCA TA AG TTC CTT GCC CAG TGT CCTT	Paradis <i>et al.</i> , (1999)
env (PERV-C)	GCT ACC TCT TCT TGT TGG CTA TGC CAC CAC CTG TCA TAA CCA GGT ACC	Akiyoshi <i>et al.</i> , (1998)
gag (PERV)	CCC GAT CAG GAG CCC TAT ATC CTT ACG TG CGC AGC GGT AAT GTC GCG ATC TCG T	Akiyoshi <i>et al.</i> , (1998)
pol (PERV)	TTG ACT TGG GAG TGG GAC GGG TAA C GAG GGT CAC CTG AGG GTG TTG GAT	Czauderna <i>et al.</i> , (2000)
β -Aktin (human)	CTA CAA TGA GCT GCG TGT GG AAG GAA GGC TGG AAG AGT GC	R&D Systems, Inc.
M13 reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Invitrogen
M13 forward	GTT TTG CCA GTC ACG AC	

3.2.3 Restriktionsendonukleasen

Enzym	Hersteller
EcoRI	Boehringer, Mannheim
EcoRI high conc.	Boehringer, Mannheim
Hind III	Boehringer, Mannheim
Sac I	Boehringer, Mannheim

Enzym	Hersteller
Xba I	Boehringer, Mannheim
BamH I	Boehringer, Mannheim
BamH I high conc.	Boehringer, Mannheim
EcoR V high conc.	Boehringer, Mannheim
NheI	Boehringer, Mannheim

3.2.4 Sonstige Enzyme

Enzym	Hersteller
AmpliTaq Gold DNA Polymerase	PE Applied Biosystems, Langen
AmpliTaq DNA Polymerase	PE Applied Biosystems, Langen
Enzym-Mix	Boehringer, Mannheim
Proteinase K	Qiagen
T4 DNA Ligase	Novagen, Bad Soden
Trypsin	PEI, Langen
RNase A	GibcoBRL

3.3 Lösungen und Puffer

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
Southern Blot, DIG	
Waschlösung	0,25 M HCl
Denaturierungspuffer	0,5 NaOH, 1,5 M NaCl
Neutralisierungspuffer	2 M NaCl, 1 M Tris-HCl, pH 5,5
20 x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7
DIG-Wasch-Puffer	0,3 % (v/v) Tween 20 in DIG
DIG-Blockierungslösung	1% Blockierungslösung in Maleinsäure-Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Detektionspuffer	0,1 M Tris-HCl (pH 9,5), 0,1 M NaCl
DIG-Easy-Hyb	siehe Boehringer Kit
Substratlösung für DIG	CSPD in Blockierungslösung
Rehybridisierungslösung	0,2 M NaOH, 0,1 % SDS
Southern Blot, radioaktiv	
Prä-, Hybridisierungslösung	24 ml 20 x SSC 46 ml bidest. H ₂ O 8 ml 50 x Denhardts 2 ml 20 % SDS 800 µl Lachssperma DNA (denaturiert, 10 mg/ ml)
50 x Denhardtslösung	1 % Ficoll, Typ 400 1 % PVP-40 1 % BSA
Waschpuffer	2 x SSC, 0,1 % SDS 0,5 x SSC, 0,1 % SDS 0,1 x SSC, 0,1 % SDS
Sonstige Puffer	
EDTA-Lösung	0,5 M EDTA; pH 8,0
Ethidiumbromidlösung	100 µl/ L Ethidiumbromid
IPTG-Lösung	100 mM IPTG
NaAc-Lösung	3 M NaAc, pH 5,2, 3 M NaAc, pH 7,4
Blockierungslösung für IPA	2 % Milchpulver gelöst in PBS (ohne Ca / Mg)
Probenpuffer	25 mg Bromphenolblau / 10 ml 25 mg Xylencyanol / 10 ml 5 ml Glycerin (85 % v/v)/ 10 ml 2 ml TAE-Puffer (50 x)/ 10 ml 3 ml Wasser/ 10 ml

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Substratlösung für IPA	1 ml AEC (4 mg/ ml) gelöst in DMF 19 ml NaAc (20 mM), pH 5,2 10 µl Wasserstoffperoxid
TAE-Puffer 10 x	400 mM Tris-HCl 20 mM NaAc 10 mM EDTA pH 7,8; Eisessig
Trypsinlösung (0,25 %)	25 ml PBS (ohne Ca / Mg) 25 ml Versen 2,5 ml Trypsin (5 %)
TSE + Proteinase K/ SDS	10 mM Tris 10 mM EDTA 150 mM NaCl 0,4 % SDS 200 µg/ ml Proteinase K
TSE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8 10 mM EDTA, 150 mM NaCl
X-Gal-Lösung	40 mg X-Gal gelöst in 1 ml DMF

3.4 Medien

3.4.1 Medien zur Kultivierung von Zellen

Medium	Zusammensetzung
Medium für adhärenente Zelllinien:	400 ml DMEM (4,5 g/l Glukose)
293-NHI Zellen	10 % FKS, Seromed, Berlin
PERV/293 Zellen	1 % Glutamin
PK-15 Zellen	1,75 % HEPES 0,4 % NSP

Medium	Zusammensetzung
Medium für Suspensionszellen:	400 ml RPMI (2g/l Bicarbonat)
Primäre Milzzellen:	10 % FKS, Seromed, Berlin
WIL2.NS.6TG	1 % Glutamin
	1,75 % HEPES
	0,4 % NSP
Medium für primäre adhärenente Zellen:	
HPEAC	M 200 + LSGS-Supplement
HEAC	
HCASMC	M 231 + SMGS-Supplement
Einfriermedium	90 % FKS, Seromed, Berlin
	10 % DMSO

3.4.2 Medien zur Kultivierung von Bakterien

Medium	Zusammensetzung
SOC-Medium	0,5 % Hefeextrakt
	2 % Bacto-Tryptone
	10 mM NaCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	20 mM Glukose
	2,5 mM KCl
LB-Medium	0,5 % Hefeextrakt
	1 % Bacto-Tryptone
	1 % NaCl (pH 7,5)

3.4.3 Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NSP (Neomycin, Streptomycin, Penicillin)	Paul-Ehrlich-Institut, Langen

3.5 Antikörper und Antiseren

Name	Epitop	Referenz
Ziege 18 - Serum	Pr60Gag, p7Gag, p15E	Tacke <i>et al.</i> , eingereicht
Ziege 20 - Serum	gegen rekombinantes p15E	Stephan <i>et al.</i> , in Vorbereitung
Protein G-HPr	Fc-Region von Säuger-Immunglobulinen	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

3.6 Verwendete Zellen

3.6.1 PERV-produzierende Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
PK-15	ATCC: CCL 33, USA
PERV/293	R. Weiss, London, England
PERV-NIH Passage 3	C. Wilson, FDA, Washington, USA
PERV-NIH Passage 5	Passage 2 von PERV-NIH auf 293 Zellen

3.6.2 Humane Zelllinien für Infektionsversuche

Zelllinie	Herkunft
293-NIH Zellen	C. Wilson, FDA, Washington, USA
WIL2.NS.6TG	ECACC, UK

3.6.3 Humane primäre Zellen

Zellen	Herkunft
Aorta-Endothelzellen (HEAC)	Cascade Biologics, Inc., Oregon
Pulmonararterien-Endothelzellen (HPEAC)	Cascade Biologics, Inc., Oregon
Glatte Muskelzellen der Koronararterien (HCASMC)	Cascade Biologics, Inc., Oregon

3.6.4 Bakterien und Plasmide

Bakterien:

Bezeichnung	Referenz
TOP10F'	Invitrogen (Version D, 171117)

Plasmide:

Bezeichnung	Selektionsmarker	Referenz
pCR [®] 2.1-TOPO	Amp, Kan	Invitrogen

3.7 Zellbiologische Methoden

Im folgenden soll auf Methoden eingegangen werden, die für diese Arbeit eine zentrale Bedeutung hatten. Bei der Verwendung von Kits wird auf den Hersteller und die entsprechende Anleitung verwiesen.

3.7.1 Kultivierung von Zellen

Alle Zellen wurden bei einer Temperatur von 37°C, einer CO₂-Konzentration von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 98 % im Inkubator Cytoperm (Heraeus, Hanau) kultiviert.

Die Kultivierung der adhärent wachsenden 293-NIH Zellen sowie der PERV-produzierenden PK-15 Zellen wurde in einem Volumen von 20 ml in einer Zellkulturflasche (75 cm²) durchgeführt. Das Passagieren der Zellen erfolgte zweimal pro Woche im Verhältnis 1:3. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in ca. 2 ml Trypsinlösung (0,25 %) inkubiert. Der Ablösungsvorgang wurde unter dem Mikroskop verfolgt und die abgelösten Zellen anschließend in frischem Medium resuspendiert und ein Drittel der Zellen rekultiviert.

Die Kultivierung von Suspensionszellen, wie WIL2.NS.6TG, erfolgte in einem Volumen von 30 ml. Zweimal pro Woche wurde das Medium gewechselt und die Zellen im Verhältnis 1:3 passagiert. Dabei wurden die Zellen in ein 50 ml-Greiner-Röhrchen überführt und bei 800 x g (Heraeus Megafuge) zentrifugiert. Das Medium wurde abgenommen und 1/3 der Zellen in neuem Medium resuspendiert und rekultiviert.

3.7.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mittels Vitalfärbung in der Neubauer-Kammer ermittelt. Hierzu wurden die Zellen trypsiniert, resuspendiert, mit gleichem Anteil Trypanblau versetzt und im Phasenkontrast angeschaut. Lebende Zellen

erscheinen in dieser Ansicht hell und gelblich leuchtend, während tote Zellen blau angefärbt sind. Vier ausgezählte Großquadrate entsprechen einem Volumen von 10^{-4} ml. Es wird jeweils der Mittelwert aus den ausgezählten Quadraten ermittelt.

Mathematische Formel für die Berechnung der Zellzahl/ml:

$$Z = N \times 2 \times 10^4$$

Z: Zelldichte = Zellzahl/Volumen (ml)

N: ermittelte Zahl an Zellen

2: Verdünnungsfaktor durch Trypanblau

10^4 : Faktor der Neubauer-Kammer

3.7.3 Infektion von Zellen

Für die Infektion von primären Endothelzellen aus der Aorta und der Pulmonararterie sowie der humanen Suspensionszelllinie WIL2.NS.6TG mit PERV/NIH Passage 5, wurde das Medium abgenommen, 50 % des Kulturvolumens durch zellfreien Überstand aus PERV/NIH Passage 5 ersetzt und über Nacht kultiviert. Als Infektionenhancer wurde 8 μ g/ml Polybrene verwendet. Polybrene vereinfacht die Interaktion zwischen Virus und Zielzelle, indem es dem Virus ermöglicht, näher mit der Zellmembran in Kontakt zu treten und somit die Infektion zu erleichtern. Anschließend wurde das Medium abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Die weitere Kultivierung erfolgte wie bereits in Kapitel 3.6.1 beschrieben.

3.7.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen einer Kultur zunächst trypsiniert, in frischem Medium resuspendiert und abzentrifugiert. Nach nochmaligem Resuspendieren in frischem Medium wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, das Pellet mit 1 x

10^7 Zellen pro ml in Einfriermedium resuspendiert und in Schraubampullen aliquotiert. Die Zellen wurden zunächst für ca. 18 Stunden bei -80°C gelagert und schließlich in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die mit Zellen gefüllten Ampullen in ein Wasserbad bei 37°C gestellt. Die noch nicht vollständig aufgetauten Zellen wurden in 10 ml vorgewärmtem Medium vorverdünnt, abzentrifugiert und schließlich in 20 ml frischem Medium aufgenommen und wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben kultiviert.

3.7.5 Lymphozytenseparation

Die Lymphozyten wurden aus heparinisierem Vollblut gewonnen. Dazu wurde eine Dichtezentrifugation im Ficoll-Gradienten (Histopaque 1077, Sigma), eine Polysaccharose der Dichte $1,077\text{ g/l}$, durchgeführt. Das Vollblut wurde mit PBS im Verhältnis 1:2 verdünnt. LeukoSep-Röhrchen (Greiner) wurden mit 16 ml Histopaque-1007 beschichtet und 1 Minute bei $800 \times g$ vorzentrifugiert. Je 35 ml des verdünnten Blutes wurden in die mit Histopaque vorbehandelten LeukoSep-Röhrchen gegeben und 20 Minuten bei $800 \times g$ ohne Bremse bandiert. Bei der Zentrifugation sanken die Erythrozyten und Granulozyten durch die Fritte zum Boden des Röhrchens, während die peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMC) auf der Membran einen weißen Ring im Plasma bildeten. Die Röhrchen wurden vorsichtig aus der Zentrifuge entnommen, das sich über der Fritte befindende Plasma wurde abgenommen und die direkt über der Fritte befindliche PBMC-Bande wurde in ein neues 50 ml-Greiner-Röhrchen überführt. Zweimal wurden die PBMC mit PBS auf 50 ml aufgefüllt, resuspendiert und erneut bei $120 \times g$ für 10 Minuten zentrifugiert. Bei Erythrozyten-Verunreinigung wurden die PBMC in eine hypotone $0,86\%$ ige Ammoniumchlorid-Lösung überführt und 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Dabei lysierten die Erythrozyten und konnten durch anschließendes zweimaliges Waschen mit PBS entfernt werden. Die PBMCs wurden bei -20°C gelagert oder direkt für eine DNA-Isolierung verwendet.

3.8 Methoden zum Virusnachweis

3.8.1 Immunperoxidase-Assay (IPA)

Mit dem Immunperoxidase-Assay wird in Zellen die Expression viraler oder zellulärer Proteine, die durch geeignete polyklonale oder monoklonale Antikörper erfasst werden können, nachgewiesen. Das Prinzip beruht auf der Bindung eines primären Antikörpers an Proteine der vorab mit Methanol permeabilisierten und fixierten Zellen. Der Primärantikörper wird durch einen zweiten enzymgekoppelten Antikörper detektiert und dann erfolgt eine enzymatische Umsetzung eines Substrates und eine Farbreaktion in den Zellen, die das betreffende Protein exprimieren. Die entstehende Färbung ist mikroskopisch auswertbar.

Zunächst wurden adhärente Zellen aus den Infektionsversuchen auf einer Poly-D-Lysin-beschichteten (0,005 %) 6-Loch-Platte ausgesät (3×10^6 Zellen pro Kavität). Nachdem sich die Zellen am Plattenboden angeheftet hatten, wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 18 Stunden bei -20°C mit Methanol (2 ml/Kavität) fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen der Antikörper durch die Inkubation mit fettfreiem Milchpulver (2 %; 2 ml/Kavität) bei 37°C für eine Stunde abgesättigt. Danach wurde ein PERV-spezifisches Antiserum (Ziege 18; 1 ml/Kavität) in einer Verdünnung von 1:30 für eine Stunde auf die Zellen gegeben und diese im Brutschrank belassen. Nach ausgiebigem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit der Zweitantikörper-Lösung (Protein G-HPr; 1 ml/Kavität) mit einer Verdünnung von 1:5000 überschichtet und im Brutschrank für eine weitere Stunde inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurde die Substratlösung (1 ml/Kavität; siehe Kapitel 3.3) auf die Zellen gegeben und die Rotfärbung unter dem Mikroskop verfolgt. Die Zellen wurden abschließend mit 20 % Glycerin (2 ml/Kavität) überschichtet und bei 4°C gelagert.

3.8.2 Virustitration

Es wurden 3×10^3 in frischem Medium resuspendierte Zellen in einem Volumen von 100 μl pro Kavität auf eine 96-Loch (Poly-D-Lysin) Platte gegeben. Um die Zellen in der Kavität zu arretieren, wurden diese anschließend für 5-8 Stunden in einem Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde 100 μl zellfreier Kulturüberstand von verschiedenen PERV-produzierenden Kulturen, seriell in achtfacher Bestimmung bis zu einer Verdünnung von 1:65536, über zwei Platten ausverdünnt. Anschließend wurde Polybrene (8 $\mu\text{g/ml}$) hinzugegeben und für ca. 18 Stunden in einem Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium gewechselt und die Zellen 3-4 Tage in einem Brutschrank kultiviert. Die anschließende Färbung von infizierten Zellen wurde nach dem IPA-Protokoll durchgeführt. Bei der Auswertung wurden die einzelnen Verdünnungen auf eine Infektion (Färbung) hin überprüft. Die Berechnung der $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ wurde mittels der Software (ID-50 V. 5.0, National Institute of Health, USA) durchgeführt. Die TCID_{50} ist dabei die Verdünnung, bei der 50 % der Kavitäten infizierte Zellen enthalten.

3.8.3 RT-Test

Die Messung der RT-Werte von zellfreien Kulturüberständen aus den Infektionsversuchen wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt (C-Typ Virus RT-Aktivitäts-Assay, CAVIDI TECH, Uppsala, Schweden).

Die im Kit enthaltenen 96-Loch Platten sind an ihrem Boden mit Poly-Adenosin beschichtet. Liegt in der zu untersuchenden Probe (zellfreier Überstand von Zellkulturen) aufgrund einer Virusinfektion eine C-Typ Virus Reverse Transkriptase (RT) vor, werden die im Reaktions-Mix enthaltenen Brom-Deoxyuridintriphosphate (BrdUTP) durch dieses Enzym an das Poly-Adenosin der Platte synthetisiert. Ein im Product-Tracer enthaltener BrdU-bindender Antikörper bindet an das DNA-Stück und ermöglicht über seine Konjugation an eine alkalische Phosphatase den RT-Nachweis durch eine Farbreaktion.

Gemessen wird die Farbintensität anhand der Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm. Die Sensitivität des Tests kann durch eine kurze (3 Stunden) oder eine längere (12 Stunden) RT-Reaktionszeit sowie durch Messung der Farbintensitäten zu unterschiedlichen Zeitpunkten variiert werden. Die Quantifizierung der RT-Aktivität erfolgt über die parallele Messung eines MuLV-RT-Standards bekannter Konzentrationen.

3.9 Molekularbiologische Methoden

Die angewandten molekularbiologischen Standardverfahren, wie Gelelektrophoresen, Restriktionsverdau, Kultivierung von Bakterien u.a., wurden nach Sambrook *et al.*, (1989) durchgeführt. Bei der Verwendung von Kits wird auf den Hersteller und die entsprechende Anleitung verwiesen.

3.9.1 Isolierung von Nukleinsäuren

3.9.1.1 Isolierung von genomischer DNA

Genomische DNA wurde mit verschiedenen Methoden isoliert. Die Isolierung erfolgte aus kultivierten Zellen mittels Phenol/Chloroform oder im Falle von Schweineblut über isolierte PBMC. Kultivierte Zellen wurden trypsiniert, in PBS resuspendiert, abzentrifugiert und in TSE/Proteinase K/SDS-Lösung aufgenommen. PBMC wurden direkt in 5 ml TSE/Proteinase K/SDS-Lösung aufgenommen und über Nacht bei 37°C im Bakterienrührer inkubiert. Die Suspension wurde anschließend mit einem gleichen Volumen 1:1 SS-Phenol:Chloroform versetzt und durch Schwenken gemischt. Durch zehnmütiges Zentrifugieren bei 3000 x g wurde die organische von der wässrigen Phase getrennt. Ohne die Interphase zu entfernen, wurde die obere Phase abgenommen und in ein neues Greiner-Röhrchen überführt. Dieser Schritt wurde erneut durchgeführt, bis keine proteinhaltige Interphase mehr zu sehen war. Anschließend wurde 1/10 Volumen einer 3 M NaAc-Lösung (pH 7,4) und 2,5 Volumen absoluten Ethanol zugegeben und durch Invertieren

gemischt. Die DNA war nun sichtbar ausgefallen und wurde mit einer Glaspipette aufgedreht oder durch Zentrifugieren bei 800 x g für 10 Minuten sedimentiert. Mit 80 % Ethanol wurde die DNA nochmals gewaschen und in destilliertem Wasser über Nacht bei 37°C unter Schütteln gelöst.

Weiterhin wurde DNA aus kultivierten Zellen über verschiedene kommerzielle Kits isoliert. Darunter der DNA Blood and Tissue Kit (Qiagen), der DNA Genomic Tip Kit (Qiagen), der QIAamp DNA Isolation Kit (Qiagen), DNAzol (Pierce). Es wurde nach Anleitung des Herstellers verfahren.

3.9.1.2 Isolierung von viraler RNA

Die Isolierung von RNA wurde nach dem RNA Isolation Kit (Qiagen) durchgeführt. Dazu wurde Überstand der kultivierten Virus-produzierenden Zellen abgenommen und durch zehnmütiges Zentrifugieren bei 200 x g von Zellen befreit. Weitere Zellreste wurden durch zehnmütiges Zentrifugieren bei 3500 x g und für 30 Minuten bei 10000 x g entfernt, und das Virus anschließend in der Ultrazentrifuge bei 54000 x g über 3 Stunden pelletiert. Das Pellet wurde dann im RNA-Isolierung Kit verwandt (siehe Hersteller).

3.9.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

3.9.2 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Elution der DNA aus dem Agarosegel erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen nach Anleitung des Herstellers.

3.9.3 Restriktionsverdau

Es wurden zwischen 5 µg und 10 µg genomische DNA verdaut. Dabei wurde eine Enzymkonzentration von 10-40 U/µg DNA eingesetzt. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes betrug zwischen 50 und 100 µl. Es wurden Enzyme mit einer Konzentration von 10000 U/µl oder hochkonzentrierte Enzyme mit 40000 U/µl verwendet. Das Enzym wurde dem Ansatz in zwei Schritten zugegeben, wobei die zweite Gabe von 10 U nach etwa zwei Stunden erfolgte. Der Ansatz wurde bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.9.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die nach der PCR amplifizierten oder nach einem Restriktionsverdau erhaltenen DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch in 0,7-2 %igen Agarosegelen nach ihrer Größe aufgetrennt und sichtbar gemacht. Dabei hängt die gewählte Dichte des Agarosegels von der Größe der erwarteten Fragmente ab, je kleiner die Fragmente, desto höher konzentriert das Gel. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE-Puffer verwendet. Die Proben wurden zunächst 1:10 mit Probenpuffer versetzt, der Glycerin enthält und das Sinken der Probe in die Taschen ermöglicht. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei 60-80 Volt. Anschließend wurde das Gel 10-30 Minuten in einem Ethidiumbromid-Bad (10 µg/ml) gefärbt und unter UV-Licht der Wellenlänge von 302 nm photographiert (Image Dokumentationssystem, Cybertech). Um die Größe der Fragmente bestimmen zu können, wurde der 100 bp bzw. 1 kb-Leiter (GibcoBRL, Roche) oder der Lambda-HindIII-Marker verwendet. Die zum DNA-Transfer bestimmten Gele wurden mit dem DIG-MarkerII + III (Boehringer, Mannheim) versetzt.

3.9.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (polymerase chain reaction) ist eine *in vitro*-Technik, mit der spezifische DNA-Abschnitte durch eine enzymatisch katalysierte Kettenreaktion vervielfältigt werden (Saiki *et al.*, 1985). Voraussetzung für die Amplifikation ist jedoch die Kenntnis von flankierenden Bereichen der zu amplifizierenden Sequenz (template), an denen sequenzspezifische, einzelsträngige Oligonukleotide, sogenannte Primer, binden können. Die Amplifizierung erfolgt durch eine modifizierte, thermostabile DNA-abhängige Polymerase des Archaeobakteriums *Thermus aquaticus* (Amplitaq-Gold-Polymerase, Perkin Elmer) in einer Drei-Schritt-Reaktion, die in 30-40 Zyklen wiederholt wird. Am Anfang der zyklischen Phase steht eine zehnmütige 95°C Phase, in der die mit einem Inhibitor-Protein gekoppelte und damit unfunktionelle Polymerase aktiviert wird. Durch diesen Initialisierungsschritt wird das Inhibitor-Protein zerstört und die Polymerase während des Abkühlens in einen funktionstüchtigen Zustand überführt.

Im ersten Schritt jeden Zyklusses erfolgt ein Erhitzen auf 95°C, um die doppelsträngige DNA zu denaturieren, also in Einzelstränge aufzutrennen. Im zweiten Schritt, dem sogenannten „annealing“, kann sich bei Erreichen einer vom Primer abhängigen Hybridisierungstemperatur dieser an die komplementäre Sequenz des einzelsträngigen Templates anlagern und so den Startpunkt für die Polymerase bilden. Darauf folgt der eigentliche Syntheseschritt (Elongation), bei dem die Polymerase in Gegenwart der vier benötigten Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) und der benötigten Ionen (Mg^{2+}) den Primer zu einem der Matrix komplementären neuen DNA-Strang verlängert.

Ansatz 1:

ca. 300 ng genomische DNA
2 x 2,5 µl Primer (10 pmol/µl)
5 µl dNTP-Mix (15 mM)
5 µl PCR-Puffer (10 mM)
1 µl DNA-Polymerase (5 U/µl)
ad 50 µl H₂O

Programm:

95°C 10 Minuten

95°C 30 Sekunden

60°C 1 Minute

72°C 1 Minute

35 Zyklen

72°C 7 Minuten

Ansatz 2:

ca. 300 ng genomische DNA
2 x 2,5 µl Primer (10 pmol/µl)
5 µl dNTP-Mix (15 mM)
5 µl PCR-Puffer (10 mM)
1 µl DNA-Polymerase (5 U/µl)
ad 50 µl H₂O

Programm:

95°C 10 Minuten

95°C 30 Sekunden

64°C 45 Sekunden

72°C 1 Minute

35 Zyklen

72°C 7 Minuten

Ansatz 3:

ca. 300 ng genomische DNA
2 x 2,5 µl Primer (10 pmol/µl)
5 µl dNTP-Mix (15 mM)
5 µl PCR-Puffer (10 mM)
1 µl DNA-Polymerase (5 U/µl)
ad 50 µl H₂O

Programm:

95°C 10 Minuten

95°C 30 Sekunden

64°C 45 Sekunden

72°C 1 Minute

35 Zyklen

72°C 7 Minuten

3.9.6 RT-PCR

Die RT-PCR ist eine sensitive Methode für den Nachweis von mRNA-Transkripten. Theoretisch genügt ein mRNA-Transkript eines bestimmten Gens, um es in einer RT-PCR nachweisen zu können.

Das Prinzip dieser Methode basiert auf den Eigenschaften des Enzyms Reverse Transkriptase (RT), das mRNA in cDNA umschreibt. Hierbei wird ein Oligo-d(T)-Primer eingesetzt, der an das polyadenylierte 3'-Ende der mRNA bindet. An den entstandenen Doppelstrangbereich kann die RT binden und einen cDNA-Strang in 5'-3' Richtung synthetisieren. Mit der synthetisierten cDNA wurde nun eine PCR mit spezifischen Primern durchgeführt (siehe Kapitel 3.8.5).

3.9.7 Herstellung PERV-spezifischer Sonden

Die Herstellung der Digoxigenin-markierten Sonden erfolgte durch eine PCR mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit (Boehringer Mannheim). Diese Methode beinhaltet den Einbau von DIG-markierten dUTPs in einer PCR-Reaktion mittels der spezifischen Sonden-Primer.

Neben der Markierung durch PCR wurde auch eine „end-labeling“-Technik mit Digoxigenin durchgeführt (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit), bei der die zunächst unmarkierten Sonden in einem nächsten Schritt mit DIG-dUTPs markiert wurden.

Radioaktiv markierte Sonden wurden zunächst mittels PCR hergestellt. Anschließend wurde radioaktiv markiertes ^{32}P -dCTP durch ein Klenow-Enzym der Sonde angehängt. Der Markierungs-Ansatz wurde durch eine Sephadex G 50-Säule von überschüssiger Radioaktivität befreit. Die Radioaktivität in 1 μl des gereinigten Markierungsansatzes wurde durch einen Scintillationszähler ermittelt.

3.9.7.1 Fällung und Aufkonzentrierung von DNA

Der DNA wurden 1/10 Volumen einer 3 M NaAc-Lösung (pH 5,2) und 4 Volumen absoluten Ethanol zugesetzt und das Gemisch wurde durch Schwenken gemischt. Anschließend wurde die Probe für 30 Minuten bei -80°C gekühlt und die DNA wurde bei 800 x g für 20 Minuten pelletiert. Die pelletierte DNA wurde zweimal mit 80 % Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 20 µl destilliertem Wasser aufgenommen und über Nacht bei 37°C gelöst.

Die Fällung des PCR-Ansatzes erfolgte wie im Kapitel 3.8.2 beschrieben mit dem Unterschied, dass im ersten Schritt dem Ansatz 1/10 Volumen Glykogen zugesetzt wurde.

3.9.8 Southern Blot

Eine auf Gelgröße zurechtgeschnittene Nylonmembran (Hybond N⁺, Amersham) wurde kurz in 2 x SSC inkubiert und auf die Vakuum-Blot Apparatur gelegt. Das 0,7 %ige Agarosegel mit der aufgetrennten DNA wurde nun luftblasenfrei auf die Membran gelegt und für nicht länger als 10 Minuten mit 0,25 M HCl überschichtet, bis sich die Bromphenolblaubande gelb verfärbte. Anschließend wurde das Gel jeweils 30 Minuten mit Denaturierungspuffer und Neutralisierungspuffer überschichtet. Bei jedem Wechsel der Lösungen wurde die vorhergehende Lösung mit einer Pipette vom Gel abgesaugt. Für weitere 2 Stunden wurde die DNA mit 20 x SSC auf die Membran transferiert und, nachdem der DNA-Transfer abgeschlossen war, wurde die Membran kurz in 2 x SSC gewaschen und für 10 Minuten luftgetrocknet. Nun wurde die DNA an der Membran durch Behandlung mit UV-Licht („cross-linken“) in einem Stratalinker (Stratagene) oder durch zweistündiges Backen bei 80°C im Trocknungsöfen fixiert.

3.9.9 Hybridisierung der Sonde

Zunächst wurde die aus dem DNA-Transfer erhaltene Membran in Prähybridisierungslösung inkubiert, um sie gegen unspezifische Bindungen abzusättigen. Während der Hybridisierung des Filters binden die hergestellten Sonden an komplementäre DNA-Sequenzen. Dabei führt eine Erhöhung der Hybridisierungstemperatur zu einer erhöhten Stringenz. Der Hybridisierung folgten mehrere Waschschriffe, die ebenfalls auf die Stringenz Einfluss haben. Je höher die Temperatur der Waschschriffe und je niedriger die Salzkonzentration der Waschlösungen, um so stringenter sind die Bedingungen. Der Grad der Stringenz hängt sowohl von der verwendeten Sonde als auch von der verwendeten DNA ab.

Im Falle der DIG-markierten Sonde wurde der Filter für 30 Minuten in DIG Easy Hyb (Boehringer, Mannheim) bei 37-42°C prähybridisiert. Danach wurde die Prähybridisierungslösung verworfen und gegen frische Prähybridisierungslösung ausgetauscht. Außerdem wurde zuvor denaturierte Sonde (25 ng/ml) hinzugegeben. Die Denaturierung erfolgte durch zehnteinütiges Aufkochen und fünfminütiger Inkubation auf Eis. Hybridisiert wurde über Nacht. Für die Stringenzwaschungen wurde der Filter zweimal 15 Minuten mit 2 x SSC, 0,1 % SDS bei RT gewaschen. Es folgten weitere Waschschriffe mit 0,1 x SSC, 0,1 % SDS oder 0,5 x SSC, 0,1 % SDS zwischen 37°C und 65°C.

Im Falle der radioaktiv markierten Sonden erfolgte die Prähybridisierung für 3-5 Stunden in Prähybridisierungslösung. Die Hybridisierung der radioaktiven Sonde (1×10^6 counts/ml Hybridisierungslösung) erfolgte dann über Nacht. Die Stringenzwaschungen erfolgten mit 2 x SSC, 0,1 % SDS für zweimal 30 Minuten und 0,2 x SSC, 0,1 % SDS für viermal 30 Minuten.

3.9.10 Detektion der Sonden

Die Detektion der DIG-markierten Sonden auf dem Filter erfolgte mittels Autoradiographie. Die Detektion erfolgte über einen DIG-Antikörper, der mit dem Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Dieses Enzym katalysiert mit

dem Substrat CSPD eine Fluoreszenzreaktion. Der genaue Ablauf der Detektion ist der Anleitung des „Labeling Kits“ der Firma Boehringer zu entnehmen.

Im Anschluß an die Detektionswaschungen wurde die DIG-Membran in Folie eingeschweißt, die Substratreaktion 15 Minuten lang bei 37°C aktiviert und die Membran anschließend auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham) exponiert. Die Länge der Inkubation wurde durch den auftretenden Hintergrund auf dem Film begrenzt.

Die Membran mit den radioaktiven Sonden bedurfte keiner weiteren Waschschrte und konnte direkt auf einem Röntgenfilm exponiert werden. Um die maximale Sensitivität zu erreichen, wurde die Inkubation des Films bei -70°C durchgeführt.

Für die Rehybridisierung der DIG-behandelten Membran wurde diese kurz in Aqua bidest gewaschen und anschließend zweimal für 10 Minuten in 0,2 M NaOH, 0,1 % SDS bei 37°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Zuletzt wurde die Membran gründlich in 2 x SSC für zweimal 15 Minuten gewaschen und getrocknet oder direkt prähybridisiert.

3.10 Klonierung

Die Klonierung der Sonden wurde nach Anleitung des TOPO-TA-Cloning Kits von Invitrogen durchgeführt. Dabei wurde das mittels PCR hergestellte template in einer Ligationsreaktion in den pCR-TOPO Vektor integriert. Auf eine Aufreinigung des PCR-Ansatzes konnte verzichtet werden, da kein unspezifisches Nebenprodukt aufgetreten war. Da während der Gelelektrophorese eventuell der endständige Desoxyadenosinrest abgespalten werden kann, was die Ligation in einem TA-Vektor verhindern würde, wurde der PCR-Ansatz direkt verwendet.

3.10.1 Ligation

Es wurde das Vektorsystem pCR[®] II-TOPO (Invitrogen) verwendet, bei dem es sich um einen TA-Vektor handelt, was bedeutet, dass die DNA-Fragmente ohne Schnittstellen für Restriktionsenzyme klonierbar sind. Die *Taq*-Polymerase synthetisiert Matrix-unabhängig ein Desoxyadenosin an das 3'-Ende des PCR-Produkts, im Gegensatz zu den Polymerasen mit Korrekturlesefähigkeit (pfu, tTh). Der benutzte Vektor liegt offen vor und besitzt an beiden Enden des Doppelstranges einen Desoxythymidin-Überhang, wodurch eine direkte Ligation durch die Anlagerung zwischen den Basen Adenosin und Thymidin ermöglicht wird. Die Ligation erfolgte im molaren Verhältnis 1:3 zwischen Vektor und Insert. Es wurde 1 µl PCR-Produkt eingesetzt. Die Ligation erfolgte im TOPO-Vektor durch die TOPO-Isomerase und war nach 5 Minuten bei RT abgeschlossen.

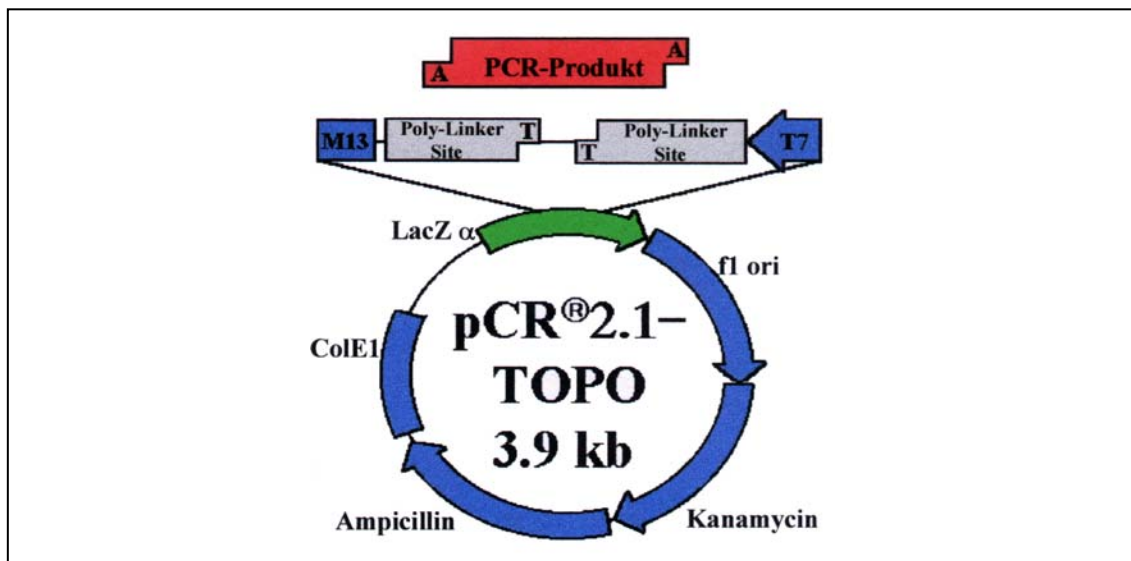


Abb. 3.1: Der Vektor pCR[®] II-TOPO.

3.10.2 Transformation

Mit dem Vektorsystem wurden chemokompetente Zellen des *E.coli* Stammes TOP10F' mitgeliefert, die durch Hitzeschock-Behandlung das geschlossene Plasmid aufnehmen. Die Bakterienzellen wurden in SOC-Medium überführt und

bei 37°C für 30 Minuten im Schüttler inkubiert. Danach wurden Aliquots von 100 µl oder 30 µl auf LB/Amp/IPTG/X-Gal-Agarplatten ausplattiert und diese über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.10.3 Selektion positiver Klone

Die Selektion des gewünschten Inserts gliederte sich in zwei Schritte: zuerst die Identifizierung der Bakterienzellen, die überhaupt einen Vektor aufgenommen haben (Blue/White-Screening) und von diesen ausgehend die Selektion auf das spezifische Insert in diesem Vektor durch einen PCR-Screen.

Durch das Ausplattieren auf Ampicillin-haltigen Agarplatten können zunächst nur die einzelnen Zellen zu Kolonien heranwachsen, die den Vektor aufgenommen haben, da sich im Vektor ein Resistenzgen gegen Ampicillin befindet. Die Blau/Weiß-Selektion dient zum Nachweis, ob auch ein Insert im Vektor vorhanden ist. Bei *E.coli* wird die β -Galactosidase vom lacZ-Gen kodiert. Der benutzte *E.coli* Stamm besitzt eine Mutation im lacZ-Gen und kann somit keine funktionelle β -Galactosidase bilden. Doch im Vektor ist eine Untereinheit der Gensequenz (lacZ α) enthalten, womit die vektortragende Zelle aus beiden Untereinheiten eine funktionstüchtige β -Galactosidase herstellen kann. Dadurch wird in der Kolonie, die aus dieser Zelle hervorgegangen ist, die farblose Substanz X-Gal gespalten, wodurch eine Blaufärbung der Zelle bzw. der Kolonie erfolgt. Da sich aber die Integrationsstelle für das Insert in der Sequenz für lacZ α befindet, wird der Leserahmen des Gens bei Integration zerstört. Somit bleiben Kolonien aus Zellen, die einen Vektor mit Insert aufgenommen haben, weiß.

Die als positiv befundenen Kolonien wurden mit einer sterilen Impföse abgenommen und es wurde damit eine Übernachtskultur angesetzt, um das Plasmid zu vervielfältigen. Zur Verifizierung des Inserts im Vektor, wurde aus der Übernachtskultur das Plasmid präpariert (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen).

1 μ l der Plasmidpräparation wurde in einer PCR mit den vektorspezifischen und den insertspezifischen Primern eingesetzt und durch Gelelektrophorese wurde die Richtigkeit der klonierten Inserts überprüft.

Die Sequenzierung der positiven Plasmide wurde durch die Firma TopLab durchgeführt.

3.10.4 Amplifizierung und Markierung der Sonde

Mit den isolierten Plasmiden aus der Minipräparation wurde eine PCR mit DIG-markierten dUTPs durchgeführt (siehe Kapitel 3.9.7).

4. Ergebnisse

4.1. Southern-Blot

4.1.1 Nachweis von PERV mittels PCR

Um PERV-spezifische Sonden für die Detektion von PERV mittels PCR zu generieren, wurde zunächst eine PCR mit PERV-spezifischen Primern durchgeführt. Die Primersequenzen wurden den Veröffentlichungen von Akiyoshi und Czauderna (Akiyoshi *et al.*, 1998; Czauderna *et al.*, 2000) entnommen. Zum Nachweis von PERV in genomischer DNA wurde für die PCR genomische DNA von PERV/293 Zellen sowie DNA von einem Minipig verwendet. Als Negativkontrolle wurde genomische DNA aus der uninfizierten humanen Nierenzelllinie 293-NIH verwendet.

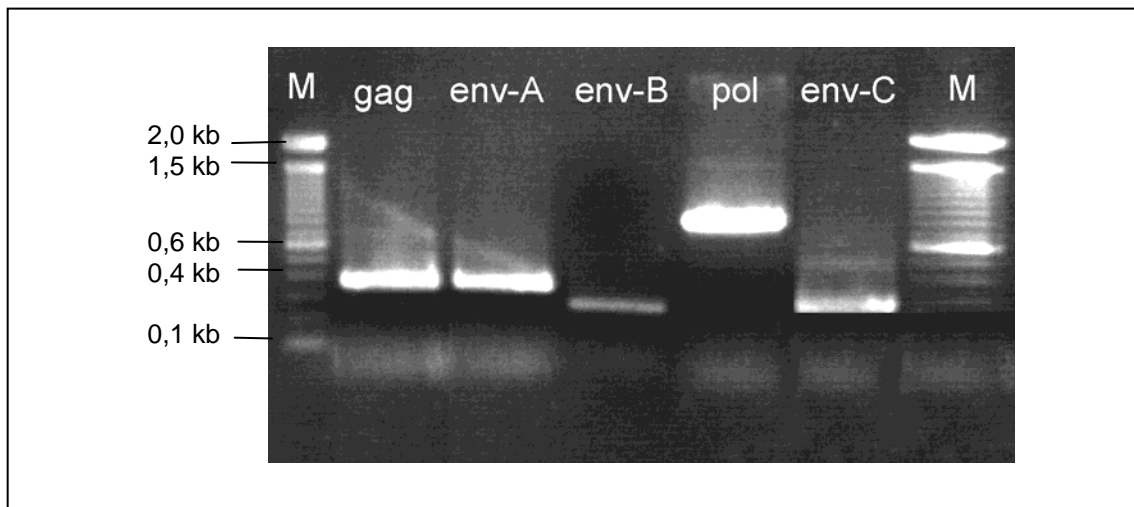


Abb. 4.1.1: PCR mit PERV-spezifischen Primern der *gag*-, *env-A*-, *env-B*-, *env-C* und *pol*-Region. M) Marker (100 bp-Leiter). *Env-C* wurde aus genomischer Minipig-DNA generiert, *gag*, *pol*, *env-A* und *env-B* aus PERV/293 DNA. Proben-Auftragsvolumen: 10 μ l.

Ein Teil des PCR-Ansatzes wurde auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und durch die Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Das *gag*-Amplifikat betrug 330 bp, das *env-A*-Amplifikat 360 bp, *env-B* 263 bp, *pol* 817 bp und *env-C* 219 bp. Durch diese PCR konnte gezeigt werden, dass die Primer der *gag*-, *pol*-, *env-A*- und *env-B*-Region spezifisch an die

genomische DNA von PERV/293 binden und, dass der Primer der *env-C*-Region spezifisch an DNA aus Schweinezellen bindet.

4.1.2 Herstellung der Sonden

Um PERV-spezifische Digoxigenin-markierte Sonden herzustellen, wurde eine PCR mit genomischer DNA von PERV/293 durchgeführt. Dazu wurden im PCR-Ansatz Digoxigenin-markierte dUTPs verwendet, die in der PCR-Reaktion nach einem „random-primed DNA labeling“-Mechanismus durch eine Klenow-Polymerase in das entstehende Amplifikat eingebaut wurden (siehe Material und Methoden). Durch den zufällig verteilten Einbau der kompakteren DIG-dUTPs in die Amplifikate, kommt es zu einer Veränderung des Laufverhaltens der hergestellten Sonden im Agarosegel. Dieser sogenannte „shift“, ist in Abb. 4.1.2 dargestellt. Der Vergleich der Größe der unmarkierten und markierten Sonden fand in einem 1 %igen Agarosegel statt.

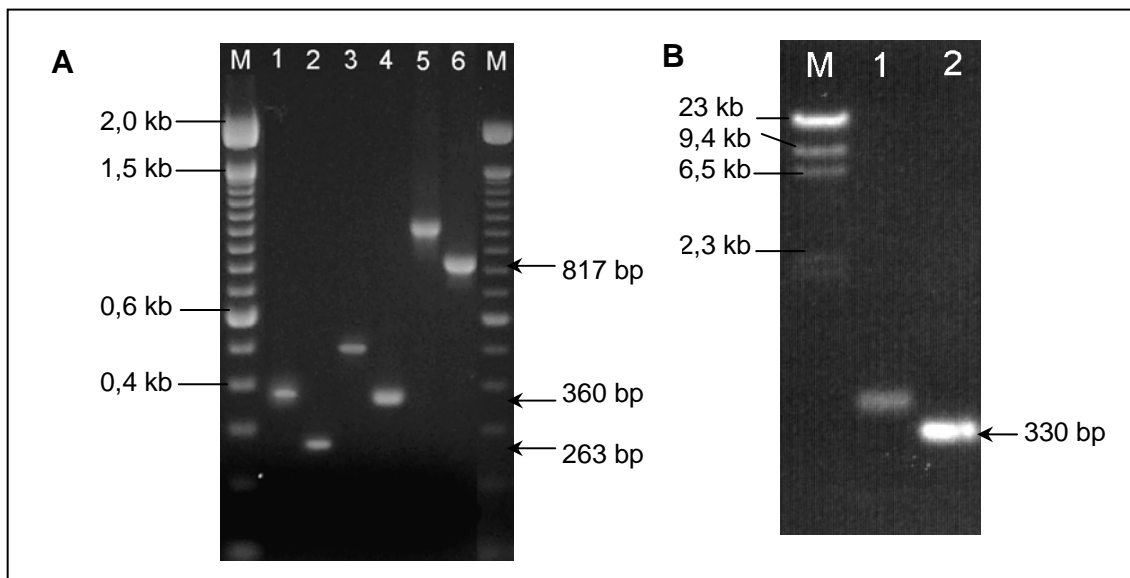


Abb. 4.1.2: PCR-generierte PERV-spezifische Amplifikate, DIG-markiert und unmarkiert.

Abb. A: Vergleich der unmarkierten und DIG-markierten Amplifikate aus der *env-A*-, *env-B*- und *pol*-Region. M) Marker (100 bp-Leiter); 1) *env-B*-Sonde DIG-markiert; 2) *env-B*-Sonde unmarkiert (263 bp); 3) *env-A*-Sonde DIG-markiert; 4) *env-A*-Sonde unmarkiert (360 bp); 5) *pol*-Sonde DIG-markiert; 6) *pol*-Sonde unmarkiert (817 bp).

Abb. B: Vergleich des DIG-markierten und unmarkierten Amplifikates aus der *gag*-Region. M) λ -Hind-Marker; 1) *gag*-Sonde DIG-markiert; 2) *gag*-Sonde unmarkiert (330 bp).

Abb. 4.1.2 macht deutlich, dass die markierten Amplifikate höher laufen als die unmarkierten Amplifikate. Zudem war erkennbar, dass bei der PCR-Reaktion jeweils nur eine diskrete Bande generiert wurde, so dass nicht mit Beiprodukten zu rechnen war. Dennoch wurde der PCR-Ansatz durch eine Fällung aufgereinigt.

Im PCR DIG Probe Synthesis Kit wurde ein humanes Kontroll-Templete mitgeliefert, dessen 5 kb Plasmid die cDNA eines Tissue-type Plasminogenaktivators (tPA) enthielt. Mit Hilfe dieses Kontroll-Templates wurde in einer PCR-Reaktion mit spezifischen Primern des Kits eine DIG-markierte Kontrollsonde hergestellt, um einerseits die funktionierende Markierung der Sonden anhand der Veränderung des Laufverhaltens des Templates zu überprüfen. Andererseits sollte die Kontrollsonde dazu benutzt werden, die Hybridisierung und die Detektion der Sonde auf humaner genomischer DNA zu kontrollieren. Prinzipiell sollte das tPA-Gen in humaner genomischer DNA durch die Kontrollsonde nachweisbar sein. Bei der Kontrollreaktion des PCR DIG Probe Synthesis Kits entstand ein Amplifikationsprodukt von 442 bp. Abb. 4.1.3 zeigt das tPA-Kontroll-Templete unmarkiert und DIG-markiert.

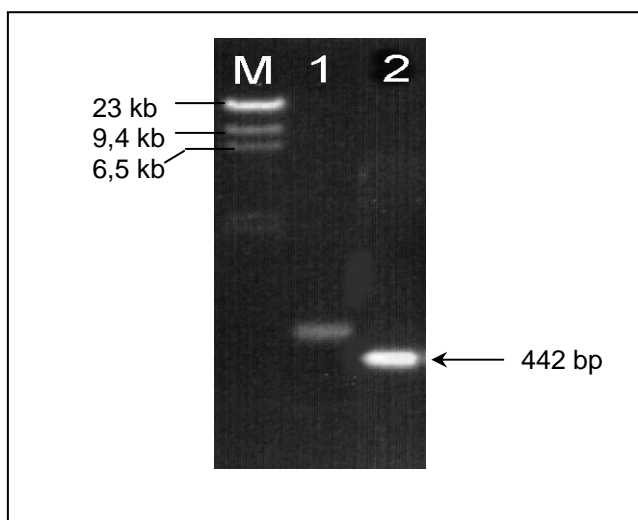


Abb. 4.1.3: Vergleich der tPA-Kontrollsonde DIG-markiert und unmarkiert.

M: Marker (λ -HindIII);
 1: tPA-Kontrollsonde DIG-markiert
 2: tPA-Kontrollsonde unmarkiert (442 bp).

Um radioaktiv markierte ^{32}P -Sonden herzustellen, wurde mit den PERV-spezifischen Primern der *gag*- und *pol*-Region eine PCR mit genomischer DNA von PERV/293 durchgeführt. Anschließend wurde die DNA-Konzentration des PCR-Ansatzes photometrisch ermittelt und 30 ng DNA wurden in der Markierungsreaktion eingesetzt. In einer „end-labeling“-Reaktion wurden an die Sonde durch eine Klenow-Polymerase ^{32}P -markierte Poly-Cytidin-Reste

angehängt. Um die Sonde von nicht eingebauten Nukleotiden und überschüssiger Radioaktivität zu befreien, wurde der Ansatz über eine G-50 Sephadex-Säule gereinigt. Anschließend wurde die eingebaute Radioaktivität in 1 μ l der Markierungsreaktion durch einen Scintillationszähler ermittelt und auf die eingesetzte DNA-Menge umgerechnet. Die gemessene Radiaktivität in 1 μ l des Sondenvolumens betrug bei der *gag*-Sonde 358385 CPM (counts per minute) (Abb. 4.1.4 A) und bei der *pol*-Sonde 374208 CPM (Abb. 4.1.4 B). Dies entsprach einer Radioaktivität von $1,43 \times 10^9$ DPM/ μ g DNA bei der *gag*-Sonde und $1,49 \times 10^9$ DPM/ μ g DNA bei der *pol*-Sonde. Es wurden 1×10^6 CPM pro Milliliter Hybridisierungslösung eingesetzt.

4.1.3 Hybridisierung mit „kalter“ Sonde

Um zu überprüfen, ob die Sonden ein Signal bei der Hybridisierung abgeben und dieses auch detektiert werden kann, wurde unmarkierte, sogenannte „kalte“, Sonde durch eine PCR-Reaktion hergestellt, auf einem 0,7 %igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit der dazugehörigen DIG-markierten Sonde über Nacht hybridisiert.

Die Detektion der DIG-markierten Sonde erfolgt durch einen polyklonalen Schaf-Anti-Digoxigenin-Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist. Die alkalische Phosphatase setzt das Substrat CSPD in einer chemilumineszierenden Reaktion um, deren Lichtsignal an dieser Stelle zu einer Schwärzung des Röntgenfilms führt. Die Dauer der Exposition auf dem Röntgenfilm wurde durch den mit zunehmender Zeit aufkommenden Hintergrund begrenzt.

Abb. 4.1.4 zeigt die Hybridisierung der unmarkierten Kontrollsonde und *gag*-Sonde mit der jeweils zugehörigen DIG-markierten Sonde.

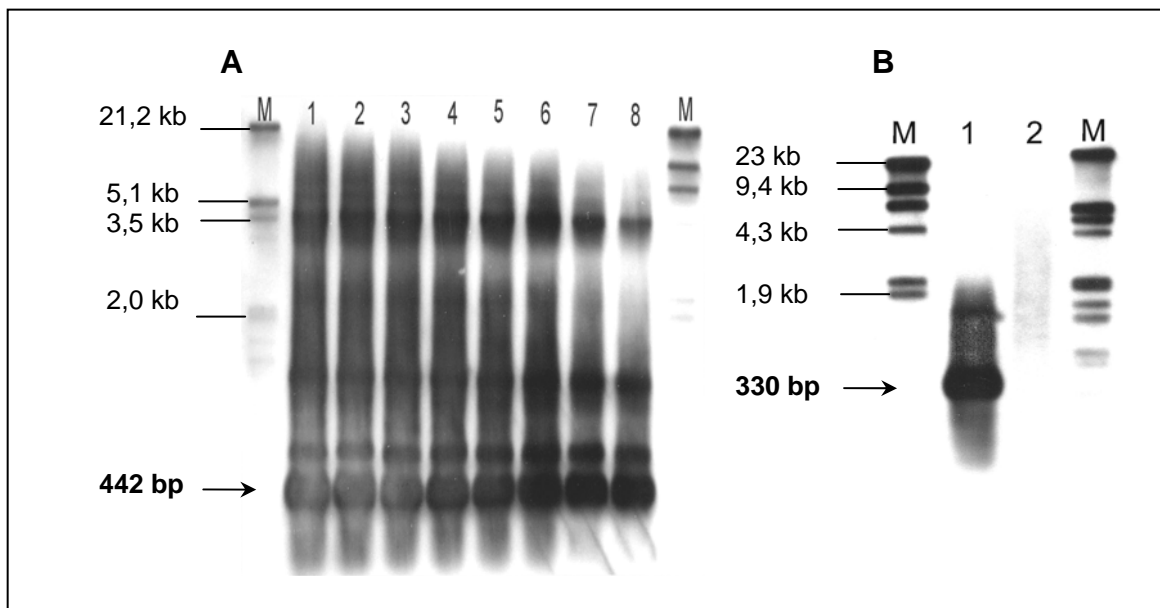


Abb. 4.1.4: Hybridisierung der unmarkierten tPA-Sonde (A) und der unmarkierten gag-Sonde (B) mit der zugehörigen DIG-markierten Sonde.

Abb. A: M) DIG-Marker II; 1) ~75 ng tPA-Sonde; 2) ~65 ng tPA-Sonde; 3) ~50 ng tPA-Sonde; 4) ~40 ng tPA-Sonde; 5) ~30 ng tPA-Sonde; 6) ~20 ng tPA-Sonde; 7) ~10 ng tPA-Sonde; 8) ~5 ng tPA-Sonde; M) DIG-Marker III.

Abb. B: M) DIG-Marker III; 1) unmarkierte gag-Sonde (330 bp); 2) 293-NIH DNA; M) DIG-Marker II.

Die DIG-markierten Sonden zeigten ein gutes Signal bei der Hybridisierung mit den unmarkierten Amplifikaten. Damit war nachgewiesen, dass sowohl die Markierung als auch die Hybridisierung funktionierten und spezifische Signale in erwarteter Bandenhöhe erhalten wurden. Die Größe der erwarteten Banden betrug 442 bp beim Kontrolltemplate und 330 bp bei der gag-Sonde.

Die Detektionsgrenze der DNA-Konzentration eines mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels liegt etwa bei 10 ng DNA und die Detektionsgrenze des DIG-Systems wurde vom Hersteller mit 0,03 pg DNA angegeben. Dieses zeigt, dass der Southern Blot eine erheblich sensitivere Methode der DNA-Darstellung ist, wodurch auch Beiprodukte der PCR sichtbar wurden. Durch diese Test-Hybridisierung war der Nachweis für die „Durchführbarkeit“ des Southern Blots erbracht. Die verwendeten Puffer und Lösungen waren in Ordnung, die Durchführung des Blotvorgangs und der Detektion funktionierte prinzipiell.

4.1.4 Hybridisierung mit genomischer DNA

Genomische DNA von PK-15 Zellen, PERV/293-Zellen und von uninfizierten 293-NIH Zellen wurde mit EcoRI verdaut, auf einem 0,7 %igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Anschließend wurde die Membran mit der DIG-markierten Sonde der *pol*-Region und der des tPA-Kontrolltemplates hybridisiert. Als Negativkontrolle für die *pol*-Sonde diente die DNA der nicht infizierten 293-NIH Zellen. Mit den nicht infizierten 293-NIH Zellen sollte die tPA-Kontrollsonde hybridisieren und, es sollte ein Fragment von 1,7 kb detektiert werden (siehe Anleitung Boehringer).

Parallel zu dem oben generierten Blot wurde ein Blot mit radioaktiven Sonden hergestellt, auf dem die gleichen DNAs aufgetrennt wurden. Der DNA-Transfer wurde wie in Kapitel 3.8.9 beschrieben durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C im Hybridisierungsofen. Die Hybridisierungslösung bestand im Falle des DIG-Blots aus der kommerziellen DIG Easy Hyb-Lösung (Boehringer Mannheim), der radioaktive Blot wurde hingegen in selbst hergestellter, wie in Kapitel 3.3 aufgeführter Hybridisierungslösung inkubiert. Die Membran wurde mit ^{32}P -markierten Sonden der *pol*-Region hybridisiert (Kapitel 4.1.2).

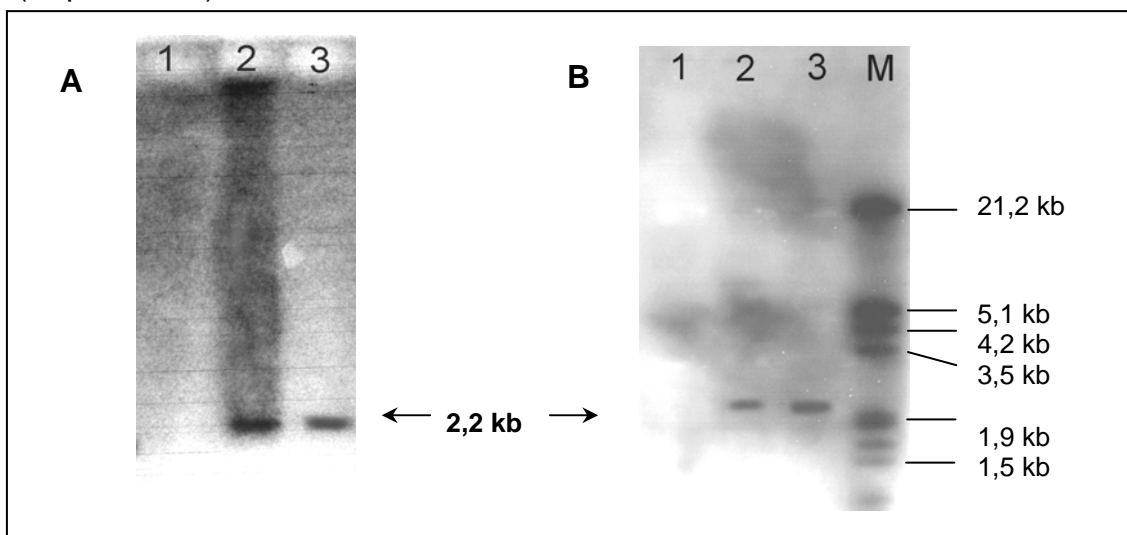


Abb. 4.1.5: Vergleich der Hybridisierung mit radioaktiv markierter Sonde (A) und mit DIG-markierter *pol*-Sonde (B).

Abb. A+B: 1) uninfizierte 293-NIH DNA (Negativkontrolle); 2) PERV/293 DNA; 3) PK-15 DNA; M) DIG-Marker III.

Abb. 4.1.5 zeigt, dass beide Blots das gleiche Bandenmuster lieferten. Man erhielt in beiden Fällen nur eine diskrete Bande bei 2,2 kb mit der *pol*-Sonde. Bei dem mitgelieferten tPA-Kontrolltemplate von Boehringer sollte, je nach humaner DNA, mindestens eine Bande bei 1,7 kb detektiert werden, wobei diese auf der uninfizierten humanen 293-NIH DNA nicht detektiert werden konnte. Dies ließ darauf schließen, dass nur sehr dominante Banden detektiert wurden, aber nicht die notwendige Sensitivität erreicht wurde.

4.1.5. Restriktionsverdau und DNA-Isolierung

Im Schweinegenom werden etwa 50 PERV-Kopien (Patience *et al.*, 1998) und in den PERV-infizierten 293-NIH Zellen auch mehrere Proviren erwartet (Czaderna *et al.*, 2000). Da diese aber nicht detektiert werden konnten, wurde als Grund für eine nicht optimale Sensitivität der Methode eine ungenügend aufgereinigte DNA vermutet. Als Maß für eine qualitativ gute DNA wurde der Restriktionsverdau herangezogen. Der Verdau der DNA war vollständig und für die nachfolgenden Schritte geeignet, wenn keine ungeschnittene hochmolekulare DNA auf dem Agarosegel zu sehen war. Zudem sollten Ansammlungen repetitiver Sequenzen, deren Verdau in sogenannten „Satellitenbanden“ resultiert, und die abhängig von der verwendeten DNA und dem verwendeten Enzym auftreten, auf dem Gel zu erkennen sein.

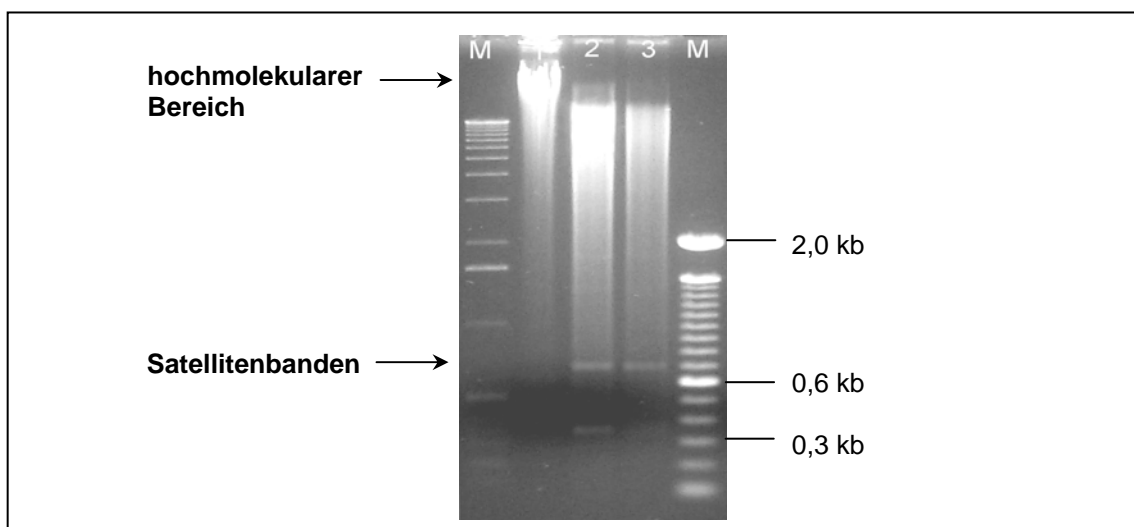


Abb. 4.1.6: EcoRI-Verdau von 10 µg humaner DNA mit 10 U/µg DNA.

M) Marker (1 kb-Leiter); 1) ungeschnittene humane Placenta-DNA; 2)+3) humane Placenta-DNA; M) Marker (100 bp-Leiter).

Abb. 4.1.6 zeigt einen exemplarischen EcoRI-Verdau von uninifizierter humaner DNA aus der Placenta (Boehringer). Der Verdau erfolgte bei einer Enzymkonzentration von 10 U EcoRI/ μg DNA, die vom Hersteller vorgeschlagen wurde, nur unvollständig. Um auszuschließen, dass eine mangelnde Funktionalität des Enzyms für den unvollständigen Verdau verantwortlich war, wurde neben dem Verdau genomischer DNA ein Plasmidverdau als Kontrolle eingesetzt. Dieser zeigte, dass das Enzym in Ordnung war. In weitergehenden Versuchen wurden verschiedene Enzyme (BamHI, EcoRI, SacI, HindIII, NheI) und mehrere Enzymkonzentrationen (20-80 U/ μg DNA) eingesetzt, um eventuelle Unterschiede im Verdau mit diesen Enzymen zu erfassen und um einen vollständigen Verdau der genomischen DNA zu erreichen. Dabei zeigte sich zunächst ein vollständiger Verdau bei etwa 40 U/ μg DNA, der jedoch, abhängig von der verwendeten genomischen DNA, nicht immer reproduzierbar war. Um zu testen, ob eine ungenügend aufgereinigte DNA für den nicht optimalen Restriktionsverdau verantwortlich war, wurden verschiedene DNA-Isolierungsmethoden getestet und miteinander verglichen.

Die Konzentrationsmessung der DNA erfolgte photometrisch. Das Verhältnis $A_{260/280}$ (OD der DNA gegen die OD der Proteine) ist ein Maß für die Reinheit der DNA in der Probe.

Die durchgeführten DNA-Isolierungsmethoden sind vergleichend in folgender Tabelle aufgeführt.

Tab. 4.1: Vergleich der DNA-Isolierungsmethoden

Methode	Ausbeute (μg) bei $\sim 3 \times 10^7$ Zellen	Ratio ($A_{260/280}$)
DNAzol	200	1,5-1,7
Qiaquick DNA Isolation Kit	500	1,6-1,7
QIAamp DNA Blood and Tissue Kit	700	1,6-1,75
QIAamp genomic tip	200	1,6
Phenol/Chloroform-Reinigung	1000	1,85-1,9

Da sich die Phenol/Chloroform-Isolierung als effektivste und sauberste DNA-Isolierungsmethode herausstellte, wurden alle folgenden DNAs nach dieser Methode aufgereinigt.

4.1.6 Hybridisierung mit Phenol/Chloroform-gereinigter DNA

Im folgenden wurde eine Hybridisierung mit genomischer DNA durchgeführt, die durch BamHI und EcoRV verdaut wurde, um die zuvor verwendeten Enzyme auch bei der Hybridisierung zu testen. Abb. 4.1.7 zeigt die Hybridisierung der *gag*-Sonde mit genomischer DNA von PK-15 Zellen, die zuvor mit EcoRV bzw. mit BamHI geschnitten wurde.

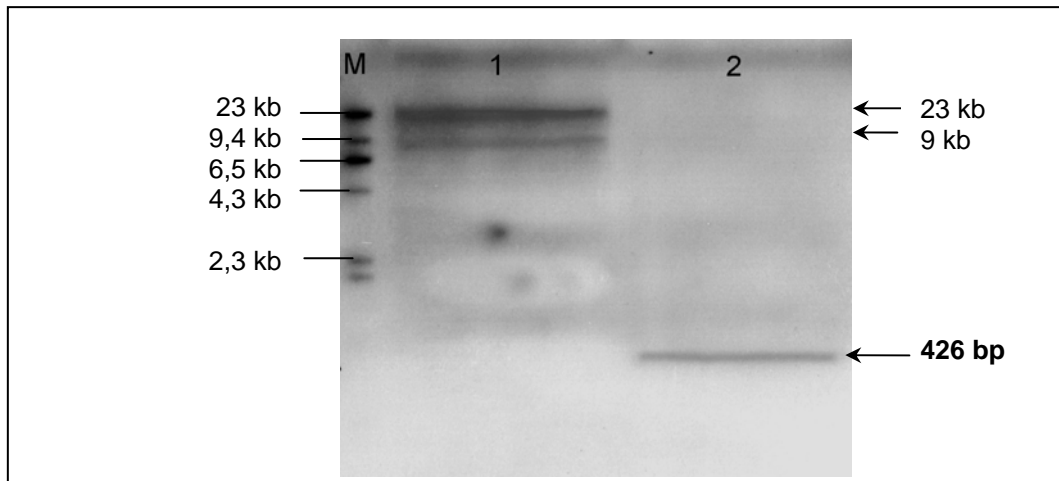


Abb. 4.1.7: Hybridisierung der *gag*-Sonde mit PK-15 DNA.

M) DIG-Marker II; 1) 10 µg PK-15 DNA EcoRV verdaut; 2) 10 µg PK-15 DNA BamHI verdaut.

Zur Überprüfung des Bandenmusters wurde zuvor eine Restriktionsanalyse der Schnittstellen durchgeführt und die erwarteten Fragmentlängen ermittelt. Das Bandenmuster aus Abb. 4.1.7 zeigt bei der PK-15 DNA, die mit EcoRV verdaut wurde, Banden bei etwa 23 kb und 9 kb. Bei der PK-15 DNA, die durch BamHI verdaut wurde, zeigt sich eine Bande bei 426 bp, die durch die Restriktionsanalyse bestätigt werden konnte. Es wurde jedoch erwartet, dass mehrere Banden zu sehen waren, so dass davon auszugehen war, dass die Sensitivität der Methode nicht ausreichte.

4.1.7 Inkubationszeiten und Fixierung der DNA

Da mehrere Banden bei der Hybridisierung erwartet wurden, aber nur wenige Banden detektiert wurden, und die Erhöhung der Qualität der DNA keine signifikanten Verbesserungen der durch die Hybridisierung erhaltenen Signale brachte, wurden weitere mögliche Faktoren optimiert.

Eine Möglichkeit bestand in einer ungenügend denaturierten DNA, so dass die DNA nicht einzelsträngig auf der Membran vorlag und die Sonde nicht hybridisierte. Dazu wurden die Inkubationszeiten mit 0,25 M HCl und Denaturierungspuffer ausgeweitet, wobei diese nicht zu lange gewählt werden durften, um die DNA nicht nachhaltig zu schädigen. Damit sollte erreicht werden, dass die DNA vollständig denaturiert wurde und mit der Sonde hybridisieren konnte. Die Verlängerung der Denaturierungsschritte während des Blotvorgangs brachten bei der Detektion keine Veränderungen, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass eine ausreichende Denaturierung zuvor stattgefunden hatte.

Auch konnte ein DNA-Verlust beim Transfer auf die Membran für die mangelnde Qualität der Hybridisierung verantwortlich sein oder, dass die DNA aufgrund ungenügender Fixierung von der Membran abgewaschen wurde. Um dieses auszuschließen, wurden zwei Blots parallel hergestellt. Auf der einen Membran wurde die DNA wie herkömmlich durch „auto-cross-linking“ (Stratagene) mit UV-Licht fixiert, auf der anderen Membran wurde sie für zwei Stunden bei 80°C in einem Trocknungsofen festgebacken.

Da dieser Versuch auch keinen Unterschied in der Intensität der detektierten Signale brachte, wurden die Hybridisierungsbedingungen variiert, um oben genannten Problemen zu entgegenen.

4.1.8 Hybridisierungsbedingungen und Stringenzwaschungen

Da ein Abwaschen der DNA von der Membran ausgeschlossen werden konnte, blieben die Hybridisierungsbedingungen oder zu stringente Waschungen als

weitere mögliche Probleme der Hybridisierung. Daher wurden die Waschschritte und Hybridisierungsbedingungen nacheinander variiert.

Es wurden die Puffer für die Stringenzwaschungen in ihrem Salzgehalt erniedrigt und die Temperatur, bei der die Stringenzwaschungen stattfanden, nicht über 65°C gewählt. Diese Maßnahmen hatten keine verbesserten Sondensignale zur Folge, sondern erhöhten ausschließlich den Hintergrund. Des Weiteren wurde die Hybridisierungstemperatur zwischen 37°C und 42°C verändert. Und auch hier zeigte sich keine Verbesserung der Hybridisierung und der detektierten Signale.

4.1.9 Versetzen der genomischen DNA mit unmarkierter Sonde

Nachdem es durch die vorangegangenen Versuche zu keiner Verbesserung der detektierten Signale kam, wurden sogenannte "spike-Experimente" mit unmarkierter Sonde und DNA durchgeführt. Dazu wurden drei Ansätze erstellt: Erstens, die zu transferierende genomische DNA wurde mit unmarkierter tPA-Kontrollsonde versetzt ("gespiked") und verdaut, um den Transfer der DNA auf die Membran und die Funktion der Sonde zu überprüfen, und darüber hinaus gleichzeitig im Restriktionsansatz den Verdau der DNA zu kontrollieren. Zweitens wurde nur genomische DNA verdaut, und drittens wurde als Positivkontrolle nur unmarkierte Sonde verdaut. Alle Ansätze wurden in einem Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit der DIG-markierten tPA-Sonde hybridisiert.

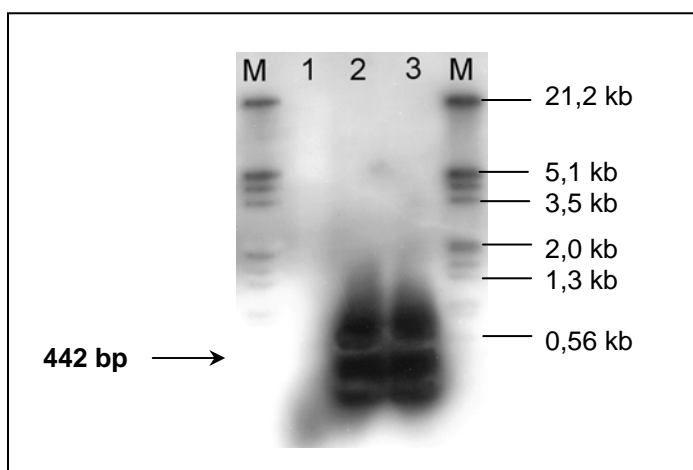


Abb. 4.1.8: Hybridisierung der unmarkierten tPA-Kontrollsonde mit DIG-markierter tPA-Sonde im "spike"-Experiment.

M) DIG-Marker III;
1) uninfizierte 293-NIH DNA;
2) uninfizierte 293-NIH DNA versetzt mit unmarkierter tPA-Kontrollsonde;
3) unmarkierte tPA-Kontrollsonde.
Alle Ansätze wurden mit EcoRI geschnitten.

Das dargestellte Ergebnis zeigt, dass sowohl bei der unmarkierten Kontrollsonde als auch bei der mit unmarkierter Kontrollsonde versetzten 293-NIH DNA ein starkes Signal erzielt wurde, jedoch bei der 293-NIH DNA allein kein Signal auftrat. Durch diesen Versuch ließ sich nachweisen, dass die unmarkierte tPA-Sonde, im Misch-Ansatz mit der DNA, von der DIG-markierten tPA-Sonde wiedergefunden und detektiert wurde, während die tPA-Sonde mit der genomischen DNA nicht hybridisierte. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Verdau der DNA prinzipiell funktioniert hatte, da sich in beiden Spuren ein gleiches Bandenmuster ergab, und dass der Transfer der DNA bzw. der unmarkierten Sonde vollständig und gleichmäßig erfolgt war.

4.1.10 Optimierung der Sondenherstellung

Da das Provirus in hoher Kopienzahl im Genom vorliegt, wird durch die Herstellung der Sonden mittels PCR ein Gemisch an Sonden amplifiziert. Um dem möglichen Problem zu entgegnen, dass dieses Gemisch bei dessen Hybridisierung mit der genomischen DNA zu einer Ausverdünnung des zu detektierenden Signals führen konnte, wurden die Sonden in einen TOPO-Kloning Vektor (Invitrogen) kloniert. Damit wurde erzielt, dass nur ein spezifisches Fragment als Sonde generiert und amplifiziert wurde. Abb. 4.1.9 zeigt den analytischen Restriktionsverdau der Plasmide mit *EcoRI*, durch den die Größe der Sonden auf einem 1,8 %igen Agarosegel kontrolliert wurde.

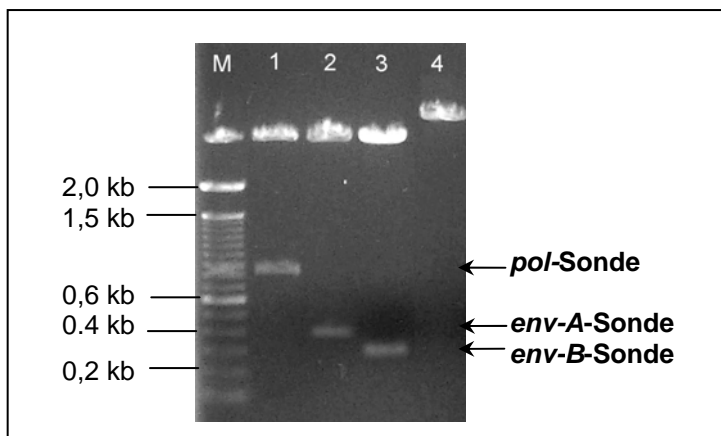


Abb. 4.1.9:
Restriktionsverdau der klonierten Sonden mit *EcoRI*.

M) Marker (100 bp-Leiter);
1) verdautes *pol*-Plasmid (*pol*-Sonde 817 pb)
2) verdautes *env-A*-Plasmid (*env-A*-Sonde 360 bp);
3) verdautes *env-B*-Plasmid (*env-B*-Sonde 263 bp);
4) *pol*-Plasmid ungeschnitten.

Die klonierten Sonden wurden einerseits als Positivkontrollen für die Hybridisierung und Detektion in unmarkierter Form und andererseits als Positivkontrollen für die „spike“-Experimente genutzt.

Die DIG-Markierung der klonierten Sonden erfolgte einerseits durch die zuvor beschriebene „random-labeling“-Methode mit DIG-dUTPs durch eine PCR mit den insert-spezifischen Primern, andererseits durch eine „end-labeling“-Methode mittels des DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kits (siehe Material und Methoden).

Zuerst wurde ein „spike“-Experiment mit verdünnten Plasmiden der *gag*- und *pol*-Sonde durchgeführt. Dazu wurden 8 µg PK-15 DNA mit EcoRI verdaut. In drei weiteren Ansätzen wurde die gleiche Menge PK-15 DNA mit Plasmid in den Konzentrationen von 0,2 µg, 0,5 µg und 1 µg versetzt und verdaut. In diesen Konzentrationen wurde das Plasmid nochmals ohne PK-15 DNA verdaut.

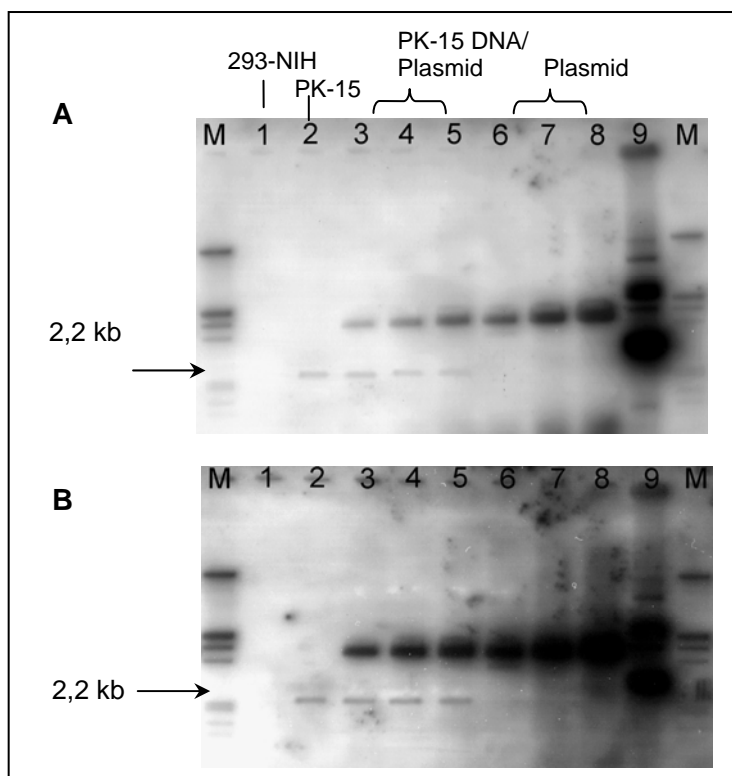


Abb. 4.1.10: Vergleich der Hybridisierung mit der PCR-generierten (A) und klonierten *pol*-Sonde (B).

Abb. A+B:

- M) DIG-Marker III;
- 1) 8 µg uninferzierte 293-NIH DNA;
- 2) 8 µg PK-15 DNA;
- 3) PK-15 DNA versetzt mit 0,2 µg *pol*-Plasmid;
- 4) PK-15 DNA versetzt mit 0,5 µg *pol*-Plasmid;
- 5) PK-15 DNA versetzt mit 1,0 µg *pol*-Plasmid;
- 6) 0,2 µg *pol*-Plasmid;
- 7) 0,5 µg *pol*-Plasmid;
- 8) 1,0 µg *pol*-Plasmid;
- Proben 1)-8) EcoRI verdaut.
- 9) 0,5 µg *pol*-Plasmid EcoRI ungeschnitten.

Abb. 4.1.10 zeigt, dass die klonierte *pol*-Sonde ein etwas stärkeres Signal brachte als die PCR-generierte *pol*-Sonde. Anhand des verdünnten Plasmids als Positivkontrolle sollte gezeigt werden, bis zu welcher Plasmid-Konzentration

die Sonde dieses detektieren konnte. An den deutlichen Signalen zeigte sich, dass das klonierte Amplifikat durch die daraus generierte Sonde besser detektiert wurde als es bei der PCR-generierten Sonde der Fall war. Offensichtlich war jedoch, dass erneut nur die dominante 2,2 kb Bande detektiert werden konnte, und die übrigen schwächeren Banden nicht erkennbar waren.

Der gleiche Versuch wurde mit der *gag*-Sonde durchgeführt. Bei der *gag*-Sonde zeigte sich, dass außer dem zugehörigen Plasmid keine Banden detektiert werden konnten. Dies zeigte, dass die Sensitivität der Sonde nicht optimal war.

4.1.11 Ermittlung der Detektionsgrenze

Der folgende Versuch wurde durchgeführt, um die Detektionsgrenze des Systems anhand der eigens generierten Positivkontrollen zu ermitteln. Dazu wurde das *pol*-Plasmid mit EcoRI verdaut und ausgehend von einer Konzentration von 0,2 ng in 1:1000-Schritten ausverdünnt. Anschließend wurden die Proben auf einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht mit der klonierten DIG-markierten *pol*-Sonde. Es sollte die niedrigste Kopienzahl ermittelt werden, die durch die Sonde noch detektiert werden konnte.

Das Ergebnis zeigte, dass 0,2 pg Sonden-DNA, was einer ungefähren Kopienzahl von $8,3 \times 10^4$ Zielsequenzen entspricht, detektiert werden konnte. Um eine vergleichbare Basis zur genomischen DNA herzustellen, wurde die eingesetzte Kopienzahl in der DNA abgeschätzt. Dazu musste ermittelt werden, wie viele Genome sich in einem μg eingesetzter DNA befinden. Geht man von einem Schweinegenom mit 3×10^9 bp aus, so enthalten die eingesetzten 8 μg DNA, wie in Abb. 4.1.10 eingesetzt, $4,82 \times 10^6$ Genome. Bei angenommenen 40 proviralen Kopien von PERV pro Genom sollten in einer Probe von 8 μg DNA $1,9 \times 10^8$ Kopien von PERV vorliegen. Durch das ausverdünnte Plasmid wurde gezeigt, dass noch $8,3 \times 10^4$ Kopien detektierbar sind. Die nicht detektierte Kopienzahl liegt somit bei etwa 10^4 Kopien, was entweder an einem

ineffizienten DNA-Transfer oder an einer nicht ausreichend sensitiven Hybridisierung liegen kann.

4.2. Infektionsversuche

4.2.1. Analyse der für die *In vitro*-Infektionsversuche verwendete PERV-produzierende Zelllinie (PERV-NIH Passage 5)

Um die in dieser Arbeit verwendeten porcinen endogenen Retroviren zu charakterisieren, wurde zunächst eine Elektronenmikroskopie (EM)-Analyse durchgeführt und die Reverse Transkriptase (RT)-Aktivität in zellfreien Kulturüberständen von PERV-produzierenden Zelllinien bestimmt. Zudem wurde der Virustiter aus dem zellfreien Überstand der PERV-produzierenden Zelllinien ermittelt. Damit wurde die Virusproduktion der PERV-produzierenden Zelllinien analysiert.

Es wurde mit einem PERV-Klon, der von 293-NIH Zellen produziert wird, und uns freundlicherweise von C. Wilson zur Verfügung gestellt wurde, gearbeitet (PERV-NIH Passage 3) (Wilson *et al.*, 1998, 2000). Dieses Virus stellt eine Rekombination von PERV-A und PERV-C dar, die bei der Infektion menschlicher 293-NIH Zellen mit PERV, welche von Mitogen-stimulierten PBMCs des Schweins freigesetzt wurden, entstanden ist. Die serielle Passagierung von PERV-NIH Passage 3 führte letztlich zu PERV-NIH Passage 5.

Mit dieser Passage wurden die folgenden Infektionsversuche durchgeführt. In Kapitel 3.5.2 sind alle PERV-produzierenden Zellen in einer Tabelle aufgeführt. Die Abb. 4.2.1 zeigt das Schema der Passagierung.

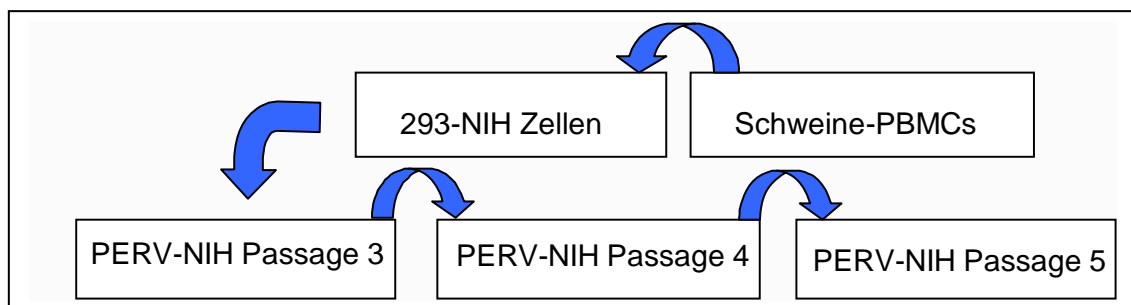


Abb. 4.2.1: Schematische Darstellung der Generierung von PERV-NIH Passage 3 mit Virus aus Mitogen-stimulierten PBMC und deren serielle Passagierung zu PERV-NIH Passage 5.

4.2.2 EM-Aufnahmen von PERV-produzierenden Zelllinien

Durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten erste Einschätzungen über den Grad der Virusproduktion bzw. Virusfreisetzung erlangt werden.

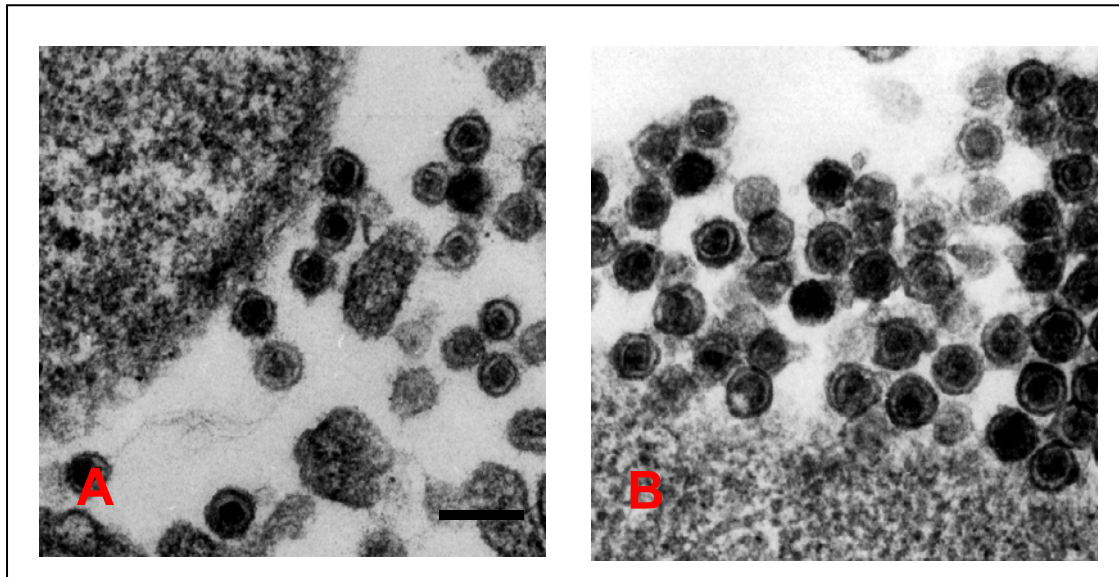


Abb. 4.2.2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von PERV-produzierenden Zelllinien. In **Abb. A:** ist die PERV-produzierende porcine Nierenzelle PK-15, in **Abb. B:** ist die PERV-produzierende humane Nierenzelle (PERV/293) dargestellt. Die Abbildungen A und B sind in der gleichen Vergrößerung dargestellt. Der Balken entspricht 200 nm. Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Dr. K. Boller (PEI) zur Verfügung gestellt.

Die Abb. 4.2.2 zeigt porcine endogene Retroviren, die von PK-15 bzw. PERV/293-Zellen freigesetzt wurden. Die in Abb. 4.2.2 A dargestellte porcine Nierenzelle zeichnet sich durch eine deutlich geringere Virusfreisetzung als die in Abb. 4.2.2 B dargestellte humane Nierenzelllinie aus. Dieser Unterschied ist repräsentativ für die gesamte Zellpopulation und wurde mit anderen Methoden bestätigt.

Die Morphologie der Viren von beiden Zelllinien zeigt keine Unterschiede. Weiterhin ist zu erkennen, dass es sich bei dem freigesetzten Virus um intakte Viruspartikel handelt.

4.2.3 RT-Aktivitäten von PERV-produzierenden Zelllinien

Das Enzym Reverse Transkriptase ist im Viruskapsid lokalisiert. Durch eine RT-Aktivitätsmessung aus zellfreien Kulturüberständen, die für C-Typ Viren spezifisch ist, können Rückschlüsse auf die Virusproduktion der PERV-produzierenden Zelllinien gezogen werden. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass keine Aussagen über den Anteil von infektiösen, intakten oder defekten Viren getroffen werden kann, da die RT auch in defekten Viren, z.B. Gag-Partikeln vorkommen kann.

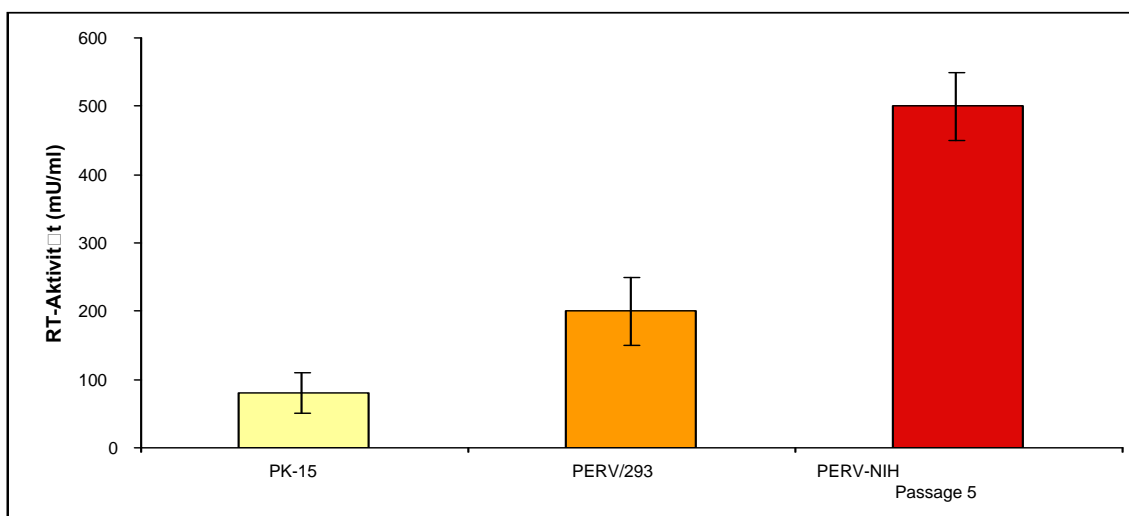


Abb. 4.2.3: Durchschnittliche RT-Aktivitäten von zellfreien Kulturüberständen PERV-produzierender Zelllinien (PK-15, PERV/293, PERV-NIH Passage 5). (3 unabhängige Versuche à 8-fach-Bestimmung).

Aus Abb. 4.2.3 ist erkennbar, dass die RT-Aktivitäten von PERV in Kulturüberständen von PK-15 Zellen mit ca. 80 mU/ml am niedrigsten sind. Die RT-Aktivitäten von PERV/293 aus Überständen von 293 Zellen zeigen mit ca. 200 mU/ml, wie bereits in den EM-Aufnahmen zu sehen war, eine höhere Virusproduktion als PK-15 Zellen. Die höchste RT-Aktivitäten konnte jedoch bei der PERV-NIH Passage 5 produzierenden Zelllinie, die in den EM-Aufnahmen nicht dargestellt war, mit ca. 500 mU/ml gemessen werden.

Periphere mononukleäre Zellen (PBMC) des Schweins produzieren nach Mitogen-Stimulierung PERV mit einer RT-Aktivität von etwa 5 mU/ml (nicht dargestellt). Dies zeigt, dass die Virusproduktion in PK-15 Zellen bereits viel höher liegt als bei diesen Zellen des Schweins. Betrachtet man nun die Virusproduktion, die von PERV-infizierten humanen Zellen ausgeht, so erkennt

man, dass dieser Wert etwa 4 mal höher liegt als bei PK-15 Zellen. Die RT-Aktivität von PERV-NIH Passage 5 liegt bei ca. 500 mU/ml. Dieser Wert hat sich im Vergleich zu PERV/293-Zellen verdoppelt und im Vergleich zu den Zellen im ursprünglichen Wirt hat sich der RT-Wert sogar ver Hundertfacht. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Virusfreisetzung der verschiedenen PERVs in den untersuchten Zelllinien unterschiedlich hoch ist, nach jeder Passagierung des Virus steigt und, dass die Zellen der PERV-NIH Passage 5 zum jetzigen Zeitpunkt die Zellen mit der höchsten Virusfreisetzung sind.

4.2.4 Titer der Viren von verschiedenen PERV-produzierenden Zelllinien

Um die Menge der infektiösen Viren im Zellkulturüberstand festzustellen, wurde eine Titration der PERVs mittels IPA durchgeführt. In Abb. 4.2.4 sind die Virustiter von zellfreien Kulturüberständen PERV-produzierender Zelllinien dargestellt.

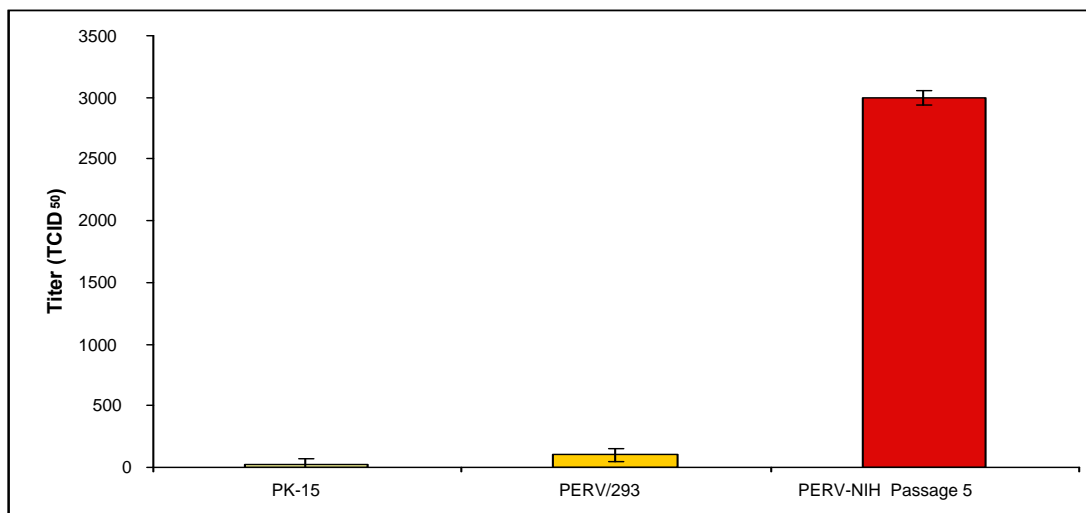


Abb. 4.2.4: Virustiter von zellfreien Kulturüberständen PERV-produzierender Zelllinien. n =5

Aus Abb. 4.2.4 ist ersichtlich, dass der Virustiter von PERV/293-Zellen im Vergleich zu PK-15 Zellen fünfmal höher liegt, und, dass der Titer der 5. Passage von PERV-NIH bereits dreißig mal höher liegt als der von PERV/293. Damit wird deutlich, dass sich das Virus im humanen System offenbar besser

und öfter repliziert und im Laufe der Passagierung infektiöser wird, als es im ursprünglichen Wirt, dem Schwein, der Fall war.

4.2.5 *In vitro*-Infektionsversuche mit PERV

Ziel dieser Versuche war es, die Infizierbarkeit von verschiedenen humanen Zellen *in vitro* zu testen, um eine Risikoevaluierung für den Menschen durchführen zu können. Zu diesem Zweck wurden eine humane Milzzelllinie und humane primäre Endothelzellen der Aorta, der Pulmonararterie sowie humane Herzmuskelzellen verwendet.

Die humane Milzzelllinie wurde deshalb ausgewählt, weil die Milz ein wichtiges Organ des Immunsystems darstellt und in hohem Maße Immunzellen enthält. Wenn man die Verwandtschaft von PERV zu anderen C-Typ Retroviren betrachtet, wo Immunzellen eine hohe Suszeptibilität besitzen, könnten lymphoide Zellen potentiell sehr susceptible Zielzellen darstellen.

Die weiteren Infektionsversuche wurden an primären Zellen durchgeführt, da diese gegenüber Zelllinien den Vorteil besitzen, keine Veränderungen im Genom aufzuweisen, wie sie z.B. durch Immortalisierung entstehen können, und ein breiteres Spektrum von Zielzellen darstellen. Diese *in vitro*-Versuche spiegeln deshalb besser die Situation im Mensch wider und sind aussagekräftiger für die Beurteilung der Situation *in vivo* im Vergleich zu Zelllinien.

Als Positiv-Kontrolle für die Infektionsstudien wurden 293-NIH Zellen mit PERV-NIH Passage 5 und PERV/293 infiziert. Als Negativ-Kontrolle wurden uninfizierte 293-NIH Zellen verwendet sowie parallel alle humanen Zellen, die ohne PERV-Zugabe kultiviert wurden.

Zur Detektion der PERV-Infektion wurde der RT-Aktivitäts-Test für C-Typ Viren, der eine produktive Infektion nachweist, und eine PCR, die mit PERV-spezifischen Primern aus der *gag*-, *pol*- und *env*-Region provirale DNA im Genom der Zellen nachweist, eingesetzt. Die Ergebnisse der Infektionsversuche sind in Tab. 4.2 dargestellt.

Tab. 4.2: Ergebnisse der Infektionsversuche. Der Versuchszeitraum betrug 14 Tage bei der humanen Milzzelllinie sowie den 293-NIH Zellen und 10 Tage bei den primären Endothel- und Muskelzellen. Die dargestellten Ergebnisse wurden jeweils am letzten Tag des Versuches erhoben. Die Negativ-Kontrollen, bei denen keine Virusinfektion nachgewiesen werden konnte, sind nicht aufgeführt. Als Infektions-Enhancer wurde Polybrene (8 µg/ml) verwendet.

Spezies	Zellen	Gewebe	Detektion von PERV			
			DNA-PCR	RT-Test	RT-PCR	IPA
human	WIL2.NS.6TG/ PERV-NIH P. 5	Milz	+	+	+	+
human	primär/ PERV-NIH P. 5	Herzmuskel	+	-	-	n.t.
human	primär/ PERV-NIH P. 5	Pulmonararterien- Endothelzellen	+	+	+	n.t.
human	primär/ PERV-NIH P. 5	Arterien- Endothelzellen	+	+	+	n.t.

n.t.: nicht getestet

Positiv-Kontrollen:

human	293-NIH/ PERV/293	Niere	+	+	+	+
human	293-NIH/ PERV-NIH P. 5	Niere	+	+	+	+

Negativ-Kontrolle:

human	293-NIH/kein	Niere	-	-	-	-
-------	--------------	-------	---	---	---	---

Aus Tab. 4.2. ist zu entnehmen, dass die humane Milzzelllinie und die humanen Endothelzellen der Aorta und der Pulmonararterie produktiv infiziert werden konnten. Bei den humanen Herzmuskelzellen konnte provirale DNA, aber keine RT-Aktivität nachgewiesen werden. Bei der Positiv-Kontrolle konnte immer eine PERV-Infektion beobachtet werden. Die Negativ-Kontrolle zeigte keine PERV-Infektion.

Im folgenden soll genauer auf die Infektionsergebnisse eingegangen werden. Abb. 4.2.5 zeigt die RT-Aktivitäten im Überstand der infizierten humanen Zelllinie WIL2.NS.6TG, der primären Endothelzellen der Aorta, der Pulmonararterie sowie der Herzmuskelzellen.

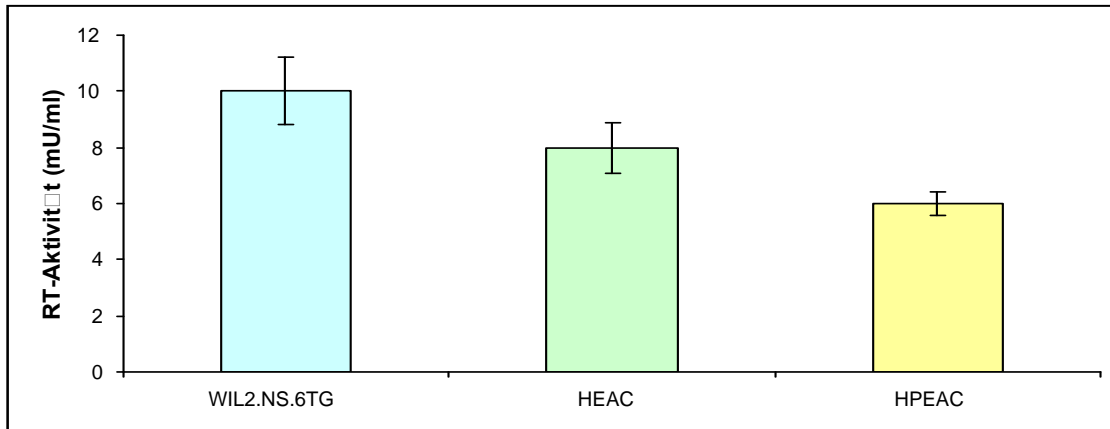


Abb. 4.2.5: Vergleich der RT-Aktivitäten der infizierten humanen Zellen. WIL2.NS.6TG) humane Milzzelllinie; HEAC) humane Endothelzellen der Aorta; HPEAC) humane Endothelzellen der Pulmonararterie. n = 1, Dreifachbestimmung.

Die RT-Aktivität ist ein Maß für die Virusfreisetzung einer infizierten Zelle bzw. einer Zellpopulation.

Abb. 4.2.5 zeigt, dass die humanen primären Endothelzellen der Aorta und der Pulmonararterie sowie die humane Milzzelllinie produktiv mit PERV infiziert werden konnten. Der Werte der RT-Aktivität für die Endothelzellen der Aorta und der Pulmonararterie liegen bei 8 mU/ml bzw. 6 mU/ml, die der Milzzelllinie bei 10 mU/ml.

Parallel zur Messung der RT-Aktivitäten wurde die Provirusintegration in den infizierten Zellen untersucht (Abb.4.2.6).

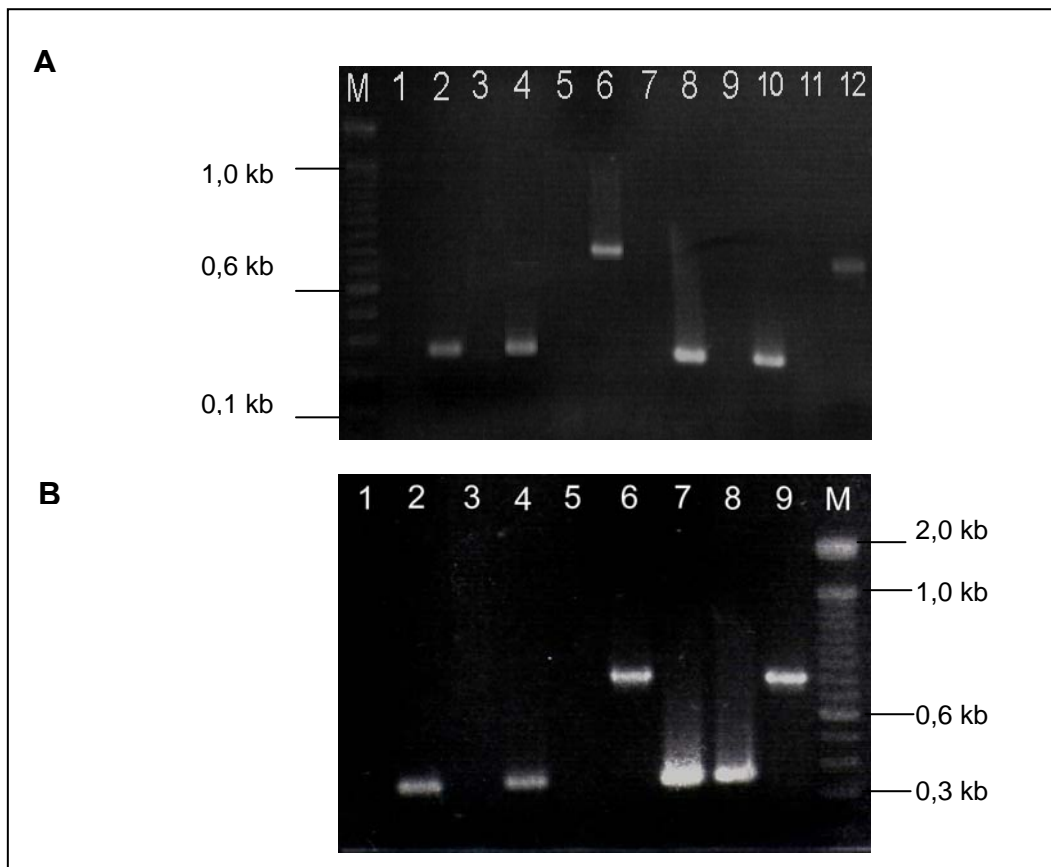


Abb. 4.2.6: Nachweis der proviralen DNA in den mit PERV infizierten humanen primären Zellen. Der Nachweis erfolgte durch eine PCR mit PERV-spezifischen Primern, die in der *gag*-, *pol*- und *env-A* Region binden. Die Amplifikate von 330 bp-Länge, 817 bp-Länge und 240 bp-Länge wurden in der Gelelektrophorese dargestellt.

Abb. A: humane Endothelzellen der Aorta und der Pulmonararterie (HEAC, HPEAC).

M) Marker (100 bp Leiter);

- 1) HEAC uninfiziert/*gag*;
- 2) HEAC infiziert/*gag*;
- 3) HEAC uninfiziert/*env-A*;
- 4) HEAC infiziert/*env-A*;
- 5) HEAC uninfiziert/*pol*;
- 6) HEAC infiziert/*pol*;
- 7) HPEAC uninfiziert/*gag*;
- 8) HPEAC infiziert/*gag*;
- 9) HPEAC uninfiziert/*env-A*;
- 10) HPEAC infiziert/*env-A*;
- 11) HPEAC uninfiziert/*pol*;

Abb. B: humane Herzmuskelzellen (HCASMC).

- 1) HCASMC uninfiziert/*gag*;
- 2) HCASMC infiziert/*gag*;
- 3) HCASMC uninfiziert/*env-A*;
- 4) HCASMC infiziert/*env-A*;
- 5) HCASMC uninfiziert/*pol*;
- 6) HCASMC infiziert/*pol*;
- 7) PERV/293/*gag*;
- 8) PERV/293/*env-A*;
- 9) PERV/293/*pol*.

In Abb. 4.2.6 ist zu sehen, dass nach der Infektion bei allen humanen primären Zellen (HEAC, HPEAC, HCASMC) provirale DNA durch die PCR nachgewiesen werden konnte. Durch die PERV-spezifischen Primer der *gag*-, *pol*- und *env-A*-

Region wurden in der PCR Amplifikate spezifischer Größe erhalten. Damit wurde erstmals die Infektion von humanen Muskelzellen (Herzmuskelzellen) gezeigt. Der Nachweis der Provirusintegration der humanen Milzzelllinie ist in folgender Abbildung dargestellt.

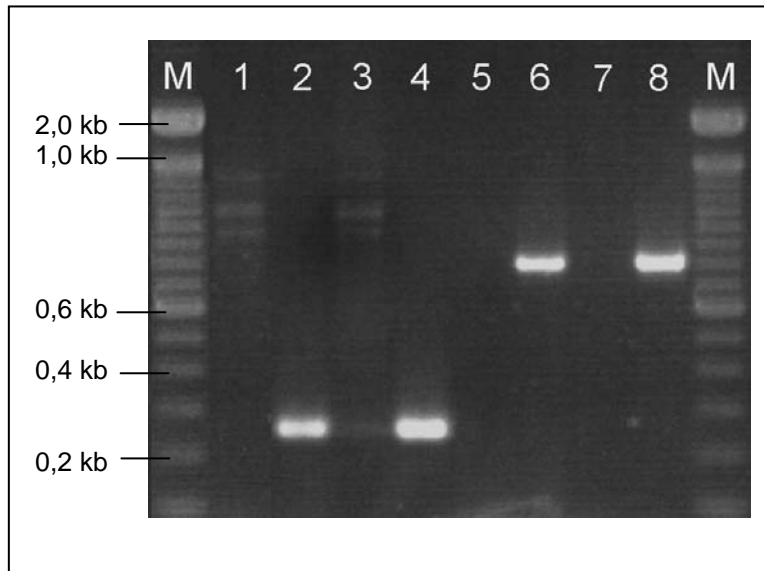


Abb. 4.2.7: Nachweis der proviralen DNA durch PCR bei WIL2.NS.6TG.

M) Marker (100 bp Leiter);
 1) 293-NIH uninfiziert/*gag*;
 2) PERV/293 infiziert/*gag*;
 3) WIL2.NS.6TG uninfiziert/*gag*;
 4) WIL2.NS.6TG infiziert/*gag*;
 5) 293-NIH uninfiziert/*pol*;
 6) PERV/293 infiziert/*pol*;
 7) WIL2.NS.6TG uninfiziert/*pol*;
 8) WIL2.NS.6TG infiziert/*pol*.

Bei der infizierten humanen Suspensionszelllinie WIL2.NS.6TG konnten mit den PERV-spezifischen Primern Amplifikate der *gag*- und *pol*-Region durch die PCR gewonnen werden. Die Amplifikate der *gag*-Region weisen eine Größe von 280 bp, die der *pol*-Region eine Größe von 817 bp auf. Als Positivkontrolle wurde DNA von PERV/293-Zellen eingesetzt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass alle getesteten primären humanen Zellen und die humane Milzzelllinie mit PERV infiziert werden konnten und dass bei allen Zellen außer den Herzmuskelzellen geringe RT-Aktivitäten gemessen werden konnten. Damit wurden erstmals Herzmuskelzellen mit PERV infiziert, und es wurde deutlich gemacht, dass PERV humane Zellen des Immunsystems, in diesem Falle der Milz, sowie andere Zelltypen, wie z.B. Endothelzellen der Aorta und der Pulmonararterie, infizieren kann.

5. Diskussion

Southern Blot-Methode

Ziel der Arbeit war es, zum Nachweis der PERV-Integration im Genom verschiedener Schweinerassen und in infizierten humanen Zellen die Southern Blot-Methode zu etablieren. Dazu wurden nicht-radioaktive Sonden mittels Digoxigenin sowie radioaktiv-markierte Sonden mittels ^{32}P aus dem *gag*- und *pol*-Bereich hergestellt. Die Kontrollhybridisierungen waren erfolgreich; mit den gewonnenen Sonden konnte auf genomischer DNA jedoch nur eine Bande bei 2,2 kb detektiert werden. Weitere Verbesserungen der Methodik sind notwendig, um eine ausreichende Sensitivität und eine höhere Effizienz des DNA-Transfers zu erreichen.

Seit der Einführung der Southern Blot-Methode durch E.M. Southern 1974 wurden diverse Modifikationen bei der Durchführung dieser Methode vorgenommen (Southern, 1974). Um Gesundheitsrisiken zu minimieren, wurde die ursprünglich radioaktive Generierung der Sonden in eine nicht-radioaktive Herstellung z.B. mittels Digoxigenin umgestellt (Kessler *et al.*, 1990; An *et al.*, 1992). Die Tatsache, dass es sich bei PERV um ein Schwarmvirus mit etwa 50 Proviruskopien pro Zellgenom (Takeuchi *et al.*, 1998; Suzuka *et al.*, 1986) handelt und es daher nicht um die Detektion eines „single copy“-Gens geht, ließ erwarten, dass das abgegebene Signal der Sonden stärker ausfallen müsste, als das der Detektion eines einzelnen Gens im Genom. Aus diesem Grund wurde für diese Diplomarbeit die nicht-radioaktive Methode mittels Digoxigenin gewählt, die aber auch die Detektion eines „single copy“-Gens ermöglichen sollte.

Die erfolgreiche Sondenmarkierung konnte über das veränderte Laufverhalten der generierten Amplifikate im Agarosegel kontrolliert werden. Die Funktionalität der generierten Sonden wurde anschließend durch die Test-Hybridisierungen mit der jeweils unmarkierten Sonde bestätigt.

Bei der Hybridisierung der genomischen DNA parallel zur Hybridisierung von unmarkierten, sogenannten kalten Sonden bzw. PCR-Ansätzen zeigte sich stets bei der genomischen DNA nur eine detektierbare Bande bei 2,2 kb. Diese war bereits als sehr dominante Bande in der Literatur beschrieben worden (Akiyoshi *et al.*, 1998; Czauderna *et al.*, 2000). Hingegen trat bei der Hybridisierung mit den unmarkierten Sonden stets ein starkes Signal auf, was eine prinzipiell richtige Durchführung der

Methode bestätigte. Alle anderen in der Literatur beschriebenen Banden bei genomischer DNA konnten nicht detektiert werden, was auf eine mangelnde Sensitivität der Methode hinwies.

Einer der Faktoren hätte eine ungenügende Qualität der DNA sein können, da auch deren Verdau zunächst unvollständig erfolgte. Um den ersten Verdacht zu widerlegen, dass die Restriktionsstellen durch Methylierungen für das Enzym unzugänglich gemacht sind, wurden neben EcoRI andere Restriktionsenzyme verwendet. Die Verwendung der zusätzlichen Enzyme zeigte, dass die DNA durch diese nicht besser verdaut wurde. Daher wurden verschiedene DNA-Isolierungsmethoden getestet, um die möglicherweise ungenügende Qualität der DNA zu optimieren und einen eventuell vorhandenen Inhibitor zu entfernen. Die nach der Phenol/Chloroform-Methode aufgereinigte DNA zeigte anschließend einen vollständigen Verdau der verwendeten DNAs und wurde für die folgenden DNA-Isolierungen angewandt.

Da auch dies zu keiner Verbesserung der detektierten Signale führte, wurden verschiedene Kontroll-Experimente durchgeführt. Zum einen wurden die Bedingungen des DNA-Transfers variiert, um einen ungenügenden Transfer der DNA auf die Membran oder deren unvollständige Denaturierung während des Transfer-Vorgangs auszuschließen. Zudem wurden zwei verschiedene Methoden ausprobiert, um die DNA an der Membran zu fixieren und ein eventuelles Abwaschen dieser zu verhindern. Es wurden durch diese Veränderungen keine signifikanten Verbesserungen bei der Detektion erreicht. Anschließend wurden verschiedene Hybridisierungsbedingungen variiert, wie z.B. die Hybridisierungstemperatur und die Stringenz der Waschungen. Die Verringerung der Hybridisierungstemperatur führte ausschließlich zu einer Erhöhung des Hintergrundes auf dem entwickelten Film.

Um auszuschließen, dass die Transfer-Methode nicht optimal war, wurde parallel zum Vakuum-Blot ein Kapillar-Blot durchgeführt, auf dem die Signale jedoch nicht intensiver waren und auch nur eine Bande detektiert wurde.

Weiterhin hätte die Herstellung der Sonden mittels PCR aus genomischer DNA die Sensitivität des Systems negativ beeinflussen können. Durch mögliche Unterschiede in den Sequenzen der etwa 50 Proviren konnte in der PCR ein Sondengemisch hergestellt werden. Als Folge davon würde bei Hybridisierung mit diesem Sondengemisch das auf genomischer DNA zu detektierende Signal abgeschwächt. Um eine einheitliche Sonde zu generieren, wurde das entsprechende PCR-Produkt

kloniert und sequenziert. Es zeigte sich, dass durch diese Sonden auch nur die 2,2 kb Bande detektiert werden konnte, die Sondengenerierung also keinen entscheidenden Vorteil brachte.

Ein Grund konnte sein, dass der DNA-Transfer doch nicht im vollständigem Maße erfolgte, wie angenommen wurde, d.h. die Blotting-Effizienz trotz allem zu gering war. Durch Austitrieren der gewonnenen Plasmide mit der einklonierten Sondensequenz konnte für den Blotvorgang eine bekannte Anzahl von Zielsequenzen als Positivkontrolle eingesetzt werden. Dadurch wurde ermittelt, dass noch $8,3 \times 10^4$ Kopien, vorliegend als geschnittene Plasmid-DNA, durch das DIG-System detektiert werden konnten. Ausgehend von einer angenommenen PERV-Kopienzahl von 40 Kopien pro Genom, sollte in 8 μg DNA eine PERV-Kopienzahl von 2×10^8 enthalten sein. Da die detektierte Kopienzahl durch das Plasmid jedoch nur bei $8,3 \times 10^4$ liegt. Die Diskrepanz zwischen der eingesetzten und der detektierten Kopienzahl kann entweder durch eine unzureichende Blotting-Effizienz oder durch eine unzureichende Sensitivität erklärt werden.

Folgende Experimente und Veränderungen könnten durchgeführt werden, um die Probleme, die sich aus der Hybridisierung ergaben, zu beheben.

Zum einen könnte ein weiterer „spike“-Versuch mit ausverdünntem Plasmid in genomischer DNA stattfinden, um anhand der detektierten Plasmidmenge einen eventuellen Verlust von DNA während des Transfer zu ermitteln. Zum anderen könnten eine andere Variante der Sondenherstellung gewählt werden, die Generierung aus isolierter mRNA. Dazu müsste zunächst mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben werden. Diese könnte durch Klonierung in einen Vektor und Amplifikation mit spezifischen Primern als Hybridisierungssonde verwandt werden (Akiyoshi *et al.* 1998; Czauderna *et al.*, 2000).

Infizierbarkeit von humanen Zellen

Aus früheren Untersuchungen, die teils in unserer, teils in anderen Gruppen durchgeführt wurden, ging hervor, dass *in vitro* ein breites Spektrum von humanen Zelltypen infiziert werden konnten. Tab. 5.1 zeigt eine Übersicht über diese Zellen.

Tab. 5.1:

Referenz	Infizierte Zellen	Ursprungsgewebe
Takeuchi et al., 1998	293	Niere
	TE671	Medullablastom
	HeLa	Cervixkarzinom
Patience et al., 1997	293	Niere
Wilson et al., 1998	293	Niere
	HeLa	Cervixkarzinom
	HT1080	Fibrosarkom
	HOS	Osteosarkom
	HepG2	Hepatoblastom
Martin et al., 2000	huvec	Vena umbilicalis
	hvec	Vena saphena magna
	hvfb	Vaskuläre Fibroblasten
Denner, 1999	PBMC	PBMC
Specke et al., 2001	WIL2.NS.6TG	Milz
	HPEAC	Pulmonararterie
	HEAC	Aorta
	HCASMC	Herzmuskel

Die Infektionsversuche, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigen, dass neben humanen Milzzellen, Endothelzellen der Aorta und der Pulmonararterie auch erstmals Herzmuskelzellen mit PERV infiziert werden konnten. Der Umstand, dass so viele Zelltypen infiziert werden können, stellt ein bedeutendes Problem für die Xenotransplantation dar, da die sich daraus ergebenden Risiken für den Menschen nicht abzuschätzen sind.

Betrachtet man die RT-Aktivität der Überstände von PERV-produzierenden Zelllinien, so kann man erkennen, dass die Werte bei den ursprünglichen Wirtszellen niedriger sind als bei den infizierten immortalisierten humanen Zelllinien.

Hiermit wird deutlich, dass Viren, die im Schwein möglicherweise apathogen sind, in humanen Zellen stärker exprimiert werden können. Vergleicht man die RT-Aktivität der Überstände der in dieser Arbeit infizierten primären Zellen mit den Überständen der PERV-produzierenden Zelllinien so sind diese um etwa 95 % geringer. Dies könnte damit begründet werden, dass die Zellen nur einen begrenzten Proliferationszyklus durchlaufen bis sie schließlich absterben. Da die Proliferation von Zellen eine wichtige Voraussetzung für die Integration der Retroviren (mit Ausnahme der Lentiviren) in das Genom der Zellen ist, könnte die Zahl der freigesetzten Viruspartikel und somit der RT-Wert von der Wachstumsrate der Zellen abhängen.

Es könnte möglicherweise bei einer höheren Anzahl an infektiösen Viren im Inokulat, durch eine höhere Stimulierung der Zellen oder durch andere Mitogene eine produktivere Infektion erreicht werden. Eine Ursache für die bessere Infektion der 293-NIH Zellen wäre, dass die verwendeten Viren aus PERV-produzierenden 293-NIH Zellen stammen und daher bereits an 293-NIH Zellen adaptiert waren und so auch in einer geringen Anzahl eine Infektion auslösen konnten. Da aber auch PERV von PK-15 Zellen humane Zellen direkt infizieren kann, scheint eine Prä-Adaptation von PERV an humane Zellen grundsätzlich nicht notwendig.

Implikationen der Ergebnisse für die Xenotransplantation

Es ist noch einmal zu betonen, dass die oben aufgeführten Infektionsdaten alle aus *In vitro*-Versuchen stammen und eine direkte Übertragung dieser Ergebnisse auf die *In vivo*-Situation so nicht möglich ist. Im *In vitro*-System kann weder der Einfluß des Immunsystems mit seinen Komplementfaktoren und den Immunzellen, noch die Wirkung von Immunsuppressiva auf die Infizierbarkeit von Zellen durch PERV untersucht werden. Ob durch die Übertragung eine Gefahr für den Empfänger und andere Personen besteht, ist abhängig davon, ob das Virus exprimiert wird und den Organempfänger infizieren kann, ob es in dessen Körper zu einer produktiven Infektion kommt und ob die Viren auf Dritte übertragen werden können. Des Weiteren muss ergründet werden, ob das Virus für den Menschen pathogen ist. Zur Abschätzung der infektiösen Eigenschaften von PERV sind Untersuchungen an einem geeigneten Tiermodell nötig. Durch Vorversuche mit Kulturen primärer Zellen können Aussagen über die Tauglichkeit einer bestimmten Spezies als Modellsystem

gemacht werden. Eine Infektion von Zellen einer Spezies *in vitro* bedeutet jedoch nicht, dass diese Spezies auch *in vivo* infiziert werden kann. Ebenso ist es bei negativen Ergebnissen *in vitro* möglich, dass die Spezies *in vivo* infizierbar ist.

Eine abschließende Bewertung der Infektiosität, Pathogenität bzw. Kanzerogenität von PERV kann nur nach Durchführung von *In vivo*-Modellen, in denen eine Situation geschaffen wird, wie sie in einem Transplantatrezipienten auftritt, erfolgen.

Zum jetzigen Zeitpunkt kann für die Xenotransplantation das Risiko einer Transspezies-Übertragung von PERV mit der Bildung von Tumoren bzw. einer Immundefizienz und der Verbreitung dieser Viren in der Bevölkerung noch nicht eingeschätzt werden.

6. Zusammenfassung

Zum Nachweis der PERV-Integration im Genom verschiedener Schweinestämme und in infizierten humanen Zellen sollte die Southern Blot-Methode etabliert werden. Dazu wurden Sonden aus dem *gag*- und *pol*-Bereich generiert. Die Markierung dieser Sonden erfolgte zum einen nicht-radioaktiv mit Digoxigenin, zum anderen durch radioaktive Markierung mittels ^{32}P . Test-Hybridisierungen mit kalten Sonden waren erfolgreich. Bei Hybridisierungsversuchen mit genomischer DNA aus PERV-produzierenden Schweinenierenzellen (PK-15) und PERV-infizierten humanen 293-Nierenzellen wurden nur wenige Banden detektiert. Da etwa 50 Proviren im Schweinegenom und mehrere Proviren in den verwendeten PERV-infizierten humanen Zellen vorkommen (Akiyoshi *et al.*, 1998; Czauderna, 2000) und diese durch eine höhere Anzahl von Banden auf dem Blot erkennbar sein müßten, muß eine Verbesserung der Sensitivität der Methode erfolgen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden *In vitro*-Infektionsversuche mit menschlichen Zellen durchgeführt, um potentielle Zielzellen zu erkennen und zu charakterisieren. Neben der menschlichen Nierenzelllinie (Takeuchi *et al.*, 1998) konnten auch bereits primäre PBMC des Menschen (Denner, 1999; Wilson *et al.*, 2000) und primäre vaskuläre Endothelzellen (Martin *et al.*, 2000) mit PERV infiziert werden.

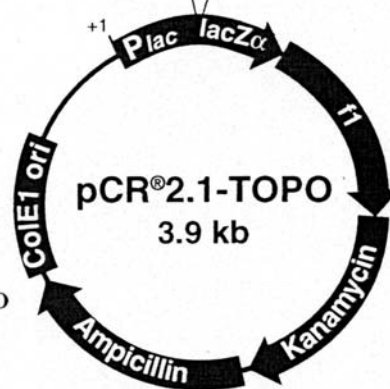
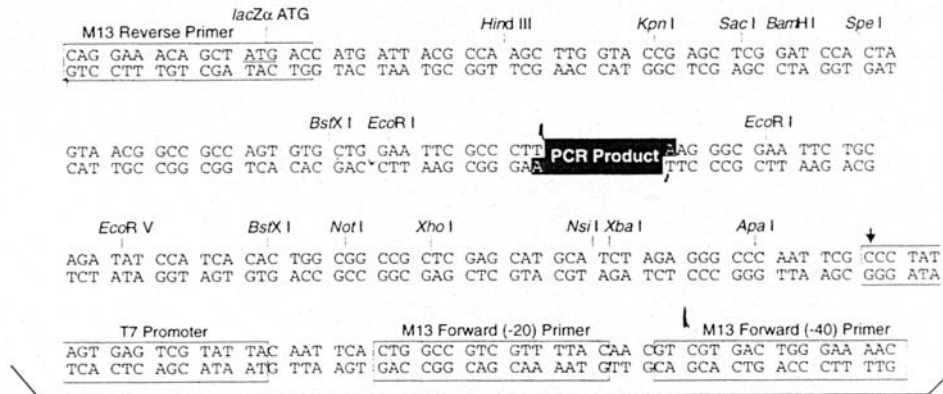
In dieser Diplomarbeit konnten humane Milzzellen, Endothelzellen der Aorta und der Pulmonararterie produktiv mit PERV infiziert werden. Darüber hinaus erfolgte in dieser Arbeit erstmals die Infektion von Herzmuskelzellen mit PERV. Die Infektion von Muskelzellen ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht beschrieben worden. Es konnte somit ein breites Spektrum von humanen Zellen sowie von Zellen anderer Spezies einschließlich nicht-humaner Primaten (Blusch *et al.*, 2000; Specke, 2001) mit PERV infiziert werden. Die Expression in verschiedenen Zelltypen und verschiedenen Spezies ist dabei unterschiedlich.

Weitere Infektionsstudien und die Entwicklung eines Tiermodells sind notwendig, um abzuschätzen, ob es zu einer Infektion und Gefährdung des Rezipienten durch Tumoren und / oder Immundefizienzen kommt und ob dabei eine Verbreitung der Viren auf Dritte möglich ist.

Map of pCR[®]2.1-TOPO

pCR[®]2.1-TOPO Map

The map below shows the features of pCR[®]2.1-TOPO and the sequence surrounding the TOPO-Cloning™ site. Restriction sites are labeled to indicate the actual cleavage site. The start of transcription for T7 polymerase is indicated by the arrow. For the full sequence of the vector, you may download it from our Web site or call Technical Service (page 12).



Comments for pCR[®]2.1-TOPO 3908 nucleotides

- LacZα fragment: bases 1-571
- M13 reverse priming site: bases 205-221
- Multiple cloning site: bases 234-357
- T7 promoter/priming site: bases 364-383
- M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
- M13 Forward (-40) priming site: bases 411-426
- f1 origin: bases 548-962
- Kanamycin resistance ORF: bases 1296-2090
- Ampicillin resistance ORF: bases 2108-2968
- ColE1 origin: bases 3113-3786

7. Literaturverzeichnis

- Akiyoshi, D. E., Denaro, M., Zhu, H., Greenstein, J. L., Banerjee, P. & Fishman, J. A. (1998).** Identification of full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine. *J. Gen. Virol.*, 72(5), 4503-7.
- An, S.F., Franklin, D., Fleming, K.A. (1992).** Generation of digoxigenin-labelled double-stranded and single-stranded probes using polymerase chain reaction. *Mol. Cell Probes*, 6(3):193-200.
- Anderson, J. B., Wood, H. G., Allaire, P. E., Bearnson, G., Khanwilkar, P. (2000).** Computational flow study of the continuous flow ventricular assist device, prototype number 3 blood pump. *Artif. Organs*, 24(5), 377-85.
- Arbeitskreis Organspende.**1999. <http://www.akos.de>
- Artrip, J. H., S., I., Minanov, O. P., Kwiatkowski, P. A. & Michler, R. E. (1997).** Cardiac xenotransplantation. *Curr. Opin. Cardiol.*, 12(2), 172-8.
- Baltimore, D. (1970).** Viral RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature*, 226, 1209-1211.
- Barré-Sinoussi (1983).** Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*; 220 (4599):868-71
- Blusch (2000).** Infection of non-human primate cells by pig endogenous retrovirus. *J.Virol.* 7687-7690
- Bontrop, R. E., Kenter, M., Otting, N. & Jonker, M. (1993).** Major histocompatibility complex class II polymorphisms in humans and chimpanzees. *J. Med. Primatol.*, 1, 50-56.
- Bouillant, A. M. P., Greig, A. S., Lieber, M. M. & Todaro, G. J. (1975).** Type C virus production by a continuous line of pig oviduct cells (PFT). *J. of Gen. Virol.*, 27, 173-180.
- Breese, S. S., Jr. (1970).** Virus-like particles occurring in cultures of stable pig kidney cells lines. *Arc. d. Ges. Virusf.*, 30, 401-404.
- Byrne, G. W., Mc Curry, K. R., Martin, M. J., Mc Clellan, S. M., Platt, J. L. & Logan, J. S. (1997).** Transgenic pigs expressing human CD59 and decay-accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement-mediated damage. *Transplantation*, 63(1), 149-155).

- Chang**, D. W., Sanchez, L. A., Veith, F. J., Wain, R. A., Okhi, T., Suggs, W. D. (2000). Can a tissue-engineered skin graft improve healing of lower extremity foot wounds after revascularization? *Ann. Vasc. Surg.*, 14(1), 44-9.
- 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(9), 4028-38.
- Denner**, J. (1987). Immunosuppression by oncogenic retroviridae. *Immune Modulation by Infectious Agents*, W. Zschiesche, ed., Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Denner**, J., Persin, C., Vogel, T., Haustein, D., Norley, S., Kurth, R. (1996). The immunosuppressive peptide of HIV-1 inhibits T and B lymphocyte stimulation. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, 12(5), 442-50.
- Denner**, J. (1998). Immunosuppression by retroviruses: implication for xenotransplantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 862, 75-86.
- Denner**, J. (1999). Immunsuppression durch Retroviren: Implikationen für die Xenotransplantation. *Transplantationsmedizin*, 11, 223-233.
- Deutsche Stiftung Organtransplantation**. 1999. <http://www.dso.de>
- Dulbecco**, R., Freeman, G. (1959). Dulbecco's modification of MEM. *Virology*, 8, 396.
- Ezzel**, C. (1988). Wild chimpanzees upgraded to endangered species. *Nature*, 336(511).
- Fan**, H. (1994). Retroviruses and their role in cancer. In *the retrov.* Vol. 3, pp. 313-362. Edited by J. A. Levy: Plenum Press, N. Y.
- Fishman**, J. A. (1997). Xenosis and xenotransplantation: addressing the infectious risks posed by an emerging technology. *Kidney Int. Suppl.*, 58, S41-5.
- Frazier**, M. E. (1985). Evidence for retrovirus in miniature swine with radiation-induced leukemia or metaplasia. *Arch. Virol.*, 83, 83-97.

- Gao, F., Yue, L., Robertson, D. L., Hill, S. C., Hui, H., Bigga, R. J., Neequayee, A. E., Whelan, T. M., Ho, D. D., Shaw, G. M. & Hahn, B. H. (1994).** Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J. Virol.*, 68, 7433-7447.
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., Cummins, L. B., Arthur, L. O., Peeters, M., Shaw, G. M., Sharp, P. M. & Hahn, B. H. (1999).** Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature*, 397(6718), 436-41.
- Goodman, M., Bailey, W. J., Hayasaka, K., Stanhope, M. J., Slighton, J. & Czelusniak, J. (1994).** Molecular evidence on primate phylogeny from DNA sequences. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 1, 3-24.
- Hannon, J. P., Bossone, C. A. & Wade, C. E. (1990).** Normal physiological values for conscious pigs used in biomedical research. *Lab. Anim. Sci.*, 40(3), 293-298.
- Harcourt, A. H., Fossey, D., Stewart, K. J. & Watts, D. P. (1980).** Reproduction in wild gorillas and some comparisons with chimpanzees. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 28, 59-70.
- Hardy, J. D., Kurrus, F. E., Chavaz, C. M. & Al, E. (1964).** Heart transplantation in man: Developmental studies and review of the case. *JAMA*, 188, 1125-1132.
- Heneine, W., Tibell, A., Switzer, W. M., Sandstrom, P., Rosales, G. V., 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 xenografts. *Lancet*, 352(9129), 695-9.
- Iwakata, S., Grace, J. T. J. (1964).** „RPMI-Medium“. *N. Y. J. Med.*, 64, 2279.
- Kessler, C., Holtke, H.J., Seibl, R., Burg, J., Muhlegger, K. (1990).** Non-radioactive labeling and detection of nucleic acids. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 371(10):917-27
- Le Tissier, P. I., Stoye, J. P., Takeuchi, Y., Patience, C. & Weiss, R. A. (1997).** Two sets of human-tropic pig retrovirus. *Nature*, 389(6652), 681-682.

- Li, S. F., Neethling, F. A., Tangiguchi, S., Yeh, J. C., Kobayashi, T., Ye, Y., Koren, E. & Cummings, R. D. (1996).** Glycans derived from porcine stomach mucin are effective inhibitors of natural anti-alpha-galactosyl antibodies in vitro and after intravenous infusion in baboons. *Transplantation*, 62(9), 1324-31.
- Lieber, M. M., Sherr, C. J., Benveniste, R. E. & Todaro, G. J. (1975).** Biologic and immunologic properties of porcine type C viruses. *Virology*, 66, 616-619.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (1999).** *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman.
- Löwer, R., Löwer, J. & Kurth, R. (1996).** The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93(11), 5177-84.
- Martin, U., Steinhoff, G., Kiessig, V., Chikobava, M., Anssar, M., Morschheuser, T., Lapin, B., Haverich, A. (1998).** Porcine endogenous retrovirus (PERV) was not transmitted from porcine endothelial cells to baboons in vivo. *Transpl. Int.*, 11, 247-251.
- Martin, U., Kiessig, V., Blusch, JH, Haverich, K., von der Helm, Herden, T., and G. Steinhoff. 1998.** Expression of pig endogenous retrovirus by primary porcine endothelial cells and infection of human cells. *Lancet* 352: 692-694.
- Martin, U., Winkler, ME, Id, M., Radecke, H., Arseniev, L., Groteluschen, R., Simone, AR, Steinhoff, G. 2000.** Transmission of pig retrovirus to primary human cells. *Transplant Proc.*; 32(5):1157.
- Martin, U., Winkler, ME, Id, M., Radecke, H., Arseniev, L., Takeuchi, Y., Simone, AR, Patience, C., Haverich, A., Steinhoff, G.2000.** Productive infection of primary human endothelial cells by pig endogenous retrovirus. *Xenotransplantation* 7(2): 138-42
- Meriggi, F., Forni, E., Bismuth, H. (1994).** What future for clinical xenograft of the liver? *Giorn. Chirug.*, 15(4), 183-9.
- Modrow, S., Falke D. (1998).** *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

- Moore**, G. E., Sandberg, A. A. & Ulrich, K. (1966). RPMI-Medium. *J. Natl. Cancer Inst.*, 36, 405.
- O'h Uigin**, C., Sato, A. & Klein, J. (1997). Evidence for convergent evolution of A and B blood group antigens in primates. *Hum. Genet.*, 2, 141-148.
- Osman**, N., Mc Kenzie, I. F., Osterried, K., Ioannou, Y. A., Desnick, R. J. & Sandrin, M. S. (1997). Combined transgenic expression of alpha-galactosidase and alpha-1,2-fucosyltransferase leads to optimal reduction in the major xenoepitope Gal-alpha(1,3)Gal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(26), 14677-14682.
- Paradis**, K., Langford, G., Long, Z., Heneine, W., Sandstrom, P., Switzer, W. M., Chapman, L. E., Lockey, C., Onions, D., The XEN 111 Study Group, Otto, E. (1999). Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. *Science*, 285, 1236-41.
- Patience**, C., Takeuchi, Y. & Weiss, R. A. (1997). Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat. Med.*, 3 (3), 282-6.
- Patience**, C., Patton, G. S., Takeuchi, Y., Weiss, R. A., Mc Clure, 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 kidneys. *Lancet*, 352(9129), 699-701.
- Reemtsma**, K., Mc Cracken, B. H., Schlegel, J. U. & Al., e. (1964). Renal heterotransplantation in man. *Ann. Surg.*, 160, 384-410.
- Renner**, M., Storch, V. & Welsch, U. (1991). *Kükenthals Leitfaden für das Zoologische Praktikum*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Saiki**, R. K., D. H Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Ehrlich. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487
- Sambrook**, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3 Volume Set)*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sandrin**, M. S., Vaughan, H. A., Dabkowski, P. L. & Mc Kenzie, I. F. C. (1993). Anti-pig IgM Antibodies in Human Serum React Predominantly with Gal-alpha-1,3-Gal Epitopes. *Proc. Natl. Ac. Sci.*, 90, 2919.

- Schmoeckel**, M., Nollert, G., Shahmohammadi, M., Müller-Hocker, J., Young, V. K., Kasper-Konig, W., White, D. J., Hammer, C. & Reichert, B. (1997). Transgenic human decay accelerating factor makes normal pigs function as a concordant species. *J. Heart & Lung Transplant.*, 16(7), 758-764.
- SoRelle**, R. (2000). First US implantation of DeBakey ventricular assist device. *Circulation*, 101(24), 9056-7.
- Southern**, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Specke**, V., Tacke, S. J., Boller, K., Schwendemann, J. & Denner, J. (2001). Porcine endogenous retroviruses (PERVs): In vitro host range and attempts to establish small animal models. *J. Gen. Virol.* (eingereicht).
- Starzl**, T. E., Fung, J., Tzakis, A., Todo, S., Demetris, A. J., Marino, I. R., Doyle, H., Zeevi, A., Warty, V., Michaels, M. & *et al.* (1993). Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet*, 341(8837), 65-71.
- Stephan**, O., Schwendemann, J., Specke, V., Tacke, S.J., Boller, K., Denner, J. Porcine endogenous retroviruses(PERVs): Generation of specific antibodies, development of an immunoperoxidase assay (IPA) and inhibition by AZT. (Xenotransplantation, eingereicht)
- Suzuka**, I., N. Shimizu, K. Sekiguchi, H. Hoshino, M. Kodama, and K. Shimotohno. (1986). Molecular cloning of unintegrated closed circular DNA of porcine retrovirus. *FEBS Lett.* 198:339-343
- Swindle**, M. M. (1998) Defining appropriate health status and management programmes for specific-pathogen-free swine for xenotransplantation. Department of Comparative Medicine, Medical University of South Carolina, Charleston. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 30; 862:111-20
- Tacke**, S. J., Kurth, R. & Denner, J. (2000). Porcine endogenous retrovirus inhibit human immune cell functions: Risk for xenotransplantation. *Virology*, 268, 87-93.
- Takeuchi**, Y., Patience, C., Magre, S., Weiss, R. A., Banerjee, P. T., Le Tissier, P. & Stoye, J. P. (1998). Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus. *J. Virol.*, 72(12), 9986-91.

- Tanczos**, E., Horch, R. E., Bannasch, H., Andree C., Walgenbach, K. J., Voigt, M., Stark, G. B. (1999). Keratinocyte transplantation and tissue engineering. New approaches in treatment of chronic wounds. *Zentralbl. Chir.*, 124 Suppl. 1, 81-6.
- Thomson**, A. W. (1992). The spectrum of action of new immunosuppressive drugs. *Clin. Exp. Immunol.*, 2, 170-173.
- Todaro**, G. J., Benveniste, R. E., Lieber, M. M. & Sherr, C. J. (1974). Characterization of type C virus released from the porcine cell line PK(15). *Virology*, 58, 65-74.
- Vanhove**, B., Renard, J. P. & Soulillou, J. P. (1998). Genetic engineering in the pig. Gene knockout and alternative techniques. *Ann N. Y. Acad. Sci.*, 826, 28-36.
- Weiss**, R. A, N. Teich, H. Varmus and J. Coffin (ed.).1984, RNA tumor viruses, Molecular biology of tumor viruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Weiss**, R. A. (1998). Transgenic pigs and virus adaptation. *Nature*, 391(6665), 327-8.
- Wilson**, C. A., Wong, S., Muller, J., Davidson, C. E., Rose, T. M. & Burd, P. (1998). Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *J. Virol.*, 72(4), 3082-7.
- Wilson**, C. A., Wong, S., VanBrocklin, M., Federspiel, M. J. (2000). Extended analysis of the in vitro tropism of porcine endogenous retrovirus. *J Virol.*, 74(1), 49-56.
- ZKBS**, Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit.
<http://www.rki.de>

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mir die Möglichkeit zu studieren gaben und die mich während dieser gesamten Zeit großartig unterstützt haben.

Herrn Dr. Joachim Denner danke ich für die Themenstellung dieser Arbeit und für die Möglichkeit, meine Diplomarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können.

Bei Herrn Prof. Dr. R. Kurth bedanke ich mich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Paul-Ehrlich-Institut und am Robert-Koch-Institut.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Betreuern Oliver Stephan und Volker Specke bedanken, die mich bei dieser Arbeit durch Rat und Tat unterstützt haben.

Ebenso gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen 6/4 und A/5 am Paul-Ehrlich-Institut sowie Herrn Dr. Baier, Herrn Dr. Simon und Frau Dr. Dorner vom Robert-Koch-Institut, für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft, die mir entgegengebracht wurde.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Oliver Hohn und Erik Seibold für ihre intensive Unterstützung und ihre stets produktiven Ratschläge bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Freund Schahram bedanken, der mir während der Diplomarbeit durch seine Motivation und Hilfe zur Seite stand.

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde am Paul-Ehrlich-Institut, Langen und am Robert-Koch-Institut, Berlin, in der Abteilung Medizinische Biotechnologie, Rekombinante Peptide und Proteine, in der Zeit vom 05. Juni bis 05. Februar 2001 unter der Leitung von Prof. Dr. R. Kurth und Dr. J. Denner angefertigt.

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorliegende Diplomarbeit selbständig unter Anleitung verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Rodgau, den 05. Februar 2001

Simone Rubant