

# **Transkriptionelle Regulation und Wirtsspezifität porziner (PERV) und humaner (HERV) endogener Retroviren**

Dissertation zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften

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

von  
Gregor Scheef  
aus Karlsruhe

Frankfurt 2002  
(DF1)

### **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, daß ich die vorgelegte Dissertation über die

Transkriptionelle Regulation und Wirtsspezifität porziner (PERV) und humaner (HERV) endogener Retroviren

selbständig angefertigt und mich nicht anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen bedient habe, insbesondere, daß aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Mainz, den 09.07.02

*Gregor Schuf*

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1999 bis August 2002 am Paul-Ehrlich-Institut in Langen angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich all jenen herzlich danken, die dazu beigetragen haben, daß die vorliegende Arbeit zustande gekommen ist:

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

Herrn PD Dr. Ralf R. Tönjes für die Vergabe des Themas, die praktische Betreuung, die wissenschaftliche Beratung sowie die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Die von ihm ermöglichte Teilnahme am Cold Spring Harbor Meeting "Retroviruses 2001" sei besonders erwähnt.

Herrn Prof. Dr. Bernd Ludwig für die fachliche und fachübergreifende Betreuung.

Allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, die mir die Einarbeitung in ein für mich neues Fachgebiet so leicht gemacht haben, für die außerordentlich freundliche Arbeitsatmosphäre, die Unterstützung, sowie die nicht enden wollende Diskussions- und Hilfsbereitschaft: Gundi Braun, Yvonne Buckendahl, Nicole Fischer, Katrin Bieda und Ulrich Krach.

Frau Dr. Isabel Schmitt, Herrn Dr. Egbert Flory und Herrn Dr. Björn Schröder für ihre Unterstützung bei der Etablierung verschiedener Testsysteme, Frau Dr. Roswitha Löwer für die technische Unterstützung zur Durchführung des Luciferase Assays sowie Herrn Dr. Peter Volkers für die Beratung zu statistischen Fragestellungen.

Frau Sandra Bender, Frau Inge Schildger und Herrn Dr. Roland Plesker, ohne deren Unterstützung die Arbeiten mit den HERV-transgenen Mäusen nicht möglich gewesen wären.

Allen, die hier nicht namentlich Erwähnung finden, von mir jedoch in vielfältiger Weise mit Fragen und Wünschen konfrontiert wurden und die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ganz besonders den mir nahe stehenden Menschen, die mich während meines Studiums und meiner Promotion unterstützt haben: Birgit und meine Eltern.

DANKE !!!

Einige Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder stehen kurz vor der Publikation:

Scheef,G., Fischer,N., Flory,E., Schmitt,I und Tönjes,R.R. (2002). Transcriptional regulation of porcine endogenous retroviruses released from porcine and infected human cells by heterotrimeric protein complex NF-Y and impact of immunosuppressive drugs. *J. Virol.* zur Veröffentlichung eingereicht.

Scheef,G., Fischer,N. und Tönjes,R.R. (2002). Porcine endogene Retroviren (PERV): Die Passagierung von Viren in humanen Zellen führt zur Adaptation der transkriptionellen Aktivität durch Enhancer-Multimerisierung. *Transplantationsmedizin.* *im Druck.*

Krach,U., Fischer,N., Scheef,G., Czauderna,F. und Tönjes,R.R. (2002). Xenogene porcine endogene Retroviren: Genetik und Wirtszellspezifität. In *Xenotransplantation*, Grimm,H., ed. (Stuttgart: Schattauer GmbH – Verlag für Medizin und Naturwissenschaften). *im Druck.*

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

Scheef,G., Fischer,N. und Tönjes,R.R. (2001). Porcine endogenous retroviruses (PERV) - passaging of virions in human cells caused adaptation of transcriptional activity by enhancer multimerization. *Transplant Linc* 2:15-22.

Tönjes,R.R., Czauderna,F., Fischer,N., Krach,U., Boller,K., Chardon,P., Rogel-Gaillard,C., Niebert,M., Scheef,G., Werner,A. und Kurth,R. (2000). Molecularly cloned porcine endogenous retroviruses replicate on human cells. *Transplant Proc.* 35:1158-1161.

## Inhaltsübersicht

<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
Retroelemente	5
Retroviren	6
Xenotransplantation	13
Zielsetzung der Arbeit	18
<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
Organismen	19
Kulturbedingungen der Bakterienstämme	20
Zellkultur	20
Transgene Methoden	23
Molekularbiologische Methoden	25
Proteinchemische Methoden	36
Statistische Auswertung	43
<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
Transkriptionelle Regulation der PERV Long Terminal Repeats (LTR)	44
HERV-K Expression in transgenen Mäusen	67
<b>Diskussion</b>	<b>72</b>
Transkriptionelle Regulation von PERV und deren Adaptation an ein xenotropes humanes Wirtssystem	72
HERV-K Expression in transgenen Mäusen	89
<b>Zusammenfassung</b>	<b>92</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>94</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>96</b>

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1	Retroelemente	5
1.2	Retroviren	6
1.2.1	Klassifikation	9
1.2.2	Endogene Retroviren (ERV)	10
1.2.2.1	Humane endogene Retroviren (HERV)	11
1.2.2.2	Porzine endogene Retroviren (PERV)	12
1.3	Xenotransplantation	13
1.3.1	Die Bedeutung von PERV für die Xenotransplantation	15
1.4	Zielsetzung der Arbeit	18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1	Organismen	19
2.1.1	Bakterienstämme	19
2.1.2	Säugerzellen	19
2.1.3	Mäuse	20
2.2	Kulturbedingungen der Bakterienstämme	20
2.2.1	Kulturmedien	20
2.2.2	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	20
2.3	Zellkultur	20
2.3.1	Kultivierung von Säugerzellen	20
2.3.2	Einfrieren von Säugerzellen	21
2.3.3	Transiente Transfektion von Säugerzellen	21
2.3.3.1	Adhärente Zellen	21
2.3.3.2	Suspensionszellen	21
2.3.4	Aktivitätsbestimmung der reversen Transkriptase (RT)	22
2.3.5	Serielle Passagierung	22
2.4	Transgene Methoden	23
2.4.1	Transgene Expressionsvektoren	23
2.4.2	Herstellung transgener Mäuse	24
2.4.3	Tierhaltung	24
2.4.4	Entnahme von Geweben und Organen	24

---

<b>2.5</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>25</b>
2.5.1	Isolierung von Nukleinsäuren	25
2.5.1.1	Isolierung genomischer DNA aus Zellen	25
2.5.1.2	Isolierung genomischer DNA aus Geweben	25
2.5.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	25
2.5.1.3.1	Minipräparation durch alkalische Lyse	25
2.5.1.3.2	Midi- und Maxipräparation	26
2.5.1.4	Isolierung von RNA aus Geweben	26
2.5.1.5	Isolierung viraler RNA aus Zellkulturüberständen	26
2.5.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	26
2.5.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	27
2.5.3.1	PCR	27
2.5.3.2	RT-PCR	27
2.5.3.3	Quantitative PCR	27
2.5.3.4	Quantitative RT-PCR	28
2.5.3.5	Verwendete Primer	29
2.5.4	Agarosegelelektrophorese	30
2.5.5	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	31
2.5.6	Auffüllen von überhängenden Restriktionsschnittstellen	31
2.5.7	Dephosphorylierung von DNA	31
2.5.8	Ligation	32
2.5.9	T/A-Klonierung von PCR-Amplifikaten	32
2.5.10	Herstellung kompetenter Zellen	32
2.5.11	Transformation von Bakterien	32
2.5.12	DNA-Sequenzierung	33
2.5.13	Hybridisierung einzelsträngiger Oligonukleotide	33
2.5.14	Radioaktive Markierung von DNA und RNA	33
2.5.14.1	Random Prime Labelling	33
2.5.14.2	End Prime Labelling	34
2.5.15	Southern Blotting	34
2.5.16	Northern Blotting	34
2.5.17	Hybridisierung	34
2.5.17.1	Hybridisierungssonden	35
2.5.18	Ribonuclease Protection Assay (RPA)	35
2.5.19	Datenbank-Nummern	36
<b>2.6</b>	<b>Proteinchemische Methoden</b>	<b>36</b>
2.6.1	Isolierung von Zellkernproteinen	36

---

2.6.2	Isolierung von Proteinen aus Geweben und Zellen	36
2.6.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen	37
2.6.4	Proteingelelektrophorese	37
2.6.5	Immuno Blotting (Western Blotting)	38
2.6.6	Enhanced chemiluminescence (ECL)-Verfahren	38
2.6.7	Schnitte von Geweben und Zellen	38
2.6.8	Indirekte Immunfluoreszenzanalysen	39
2.6.9	Histologische Färbung	39
2.6.10	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	39
2.6.10.1	Verwendete Oligonukleotide	40
2.6.10.2	Protein-DNA-Bindung	40
2.6.10.3	Supershift Assay	40
2.6.11	Dual-Luciferase Reporter Assay	41
2.6.11.1	Luciferase-Reportergenvektoren	41
2.6.11.2	Proteinextraktion	42
2.6.11.3	Biolumineszenzmessung	42
<b>2.7</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>43</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Transkriptionelle Regulation der PERV Long Terminal Repeats (LTR)</b>	<b>44</b>
3.1.1	Verteilung von PERV LTRs im porzinen Genom	44
3.1.2	Struktur und Aufbau der PERV LTR	44
3.1.3	Veränderung der LTR Struktur bei der seriellen Passagierung von PERV-B Moleklarklonen in humanen Zellen	46
3.1.4	Provirusbelastung und Virusbildung in porzinen und infizierten humanen Zellen	48
3.1.4.1	Provirusbelastung	49
3.1.4.2	Quantifizierung der Virusfreisetzung	52
3.1.5	Promotoraktivität der PERV LTRs	53
3.1.5.1	Promotoraktivität in humanen Zellen	53
3.1.5.2	Promotoraktivität in nicht-humanen Säugerzellen	54
3.1.5.3	Promotoraktivität partiell deletierter LTRs	55
3.1.5.3.1	R-Region Stem Loop	57
3.1.5.4	Promotoraktivität einer artifiziell verlängerten LTR im Vergleich zum CMV Promotor	58
3.1.6	Enhancer-Eigenschaften der PERV LTR-Repeatbox	59



---

3.1.7	Beeinflussung der PERV LTR Aktivität durch Immunsuppressiva	61
3.1.7.1	Prednisolon (Pred)	62
3.1.7.2	Cyclosporin A (CysA)	62
3.1.8	Putative Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen der PERV LTR	63
3.1.9	Transkriptionsfaktor-Bindung an die PERV LTR Repeatbox	64
3.1.9.1	Nachweis der spezifischen Transkriptionsfaktor-Bindung	64
3.1.9.2	Detektion von NF-Y als bindendes Protein	65
<b>3.2</b>	<b>HERV-K Expression in transgenen Mäusen</b>	<b>67</b>
3.2.1	Etablierung HERV-K transgener Mäuse	67
3.2.2	Expression transgener mRNA	67
3.2.3	Expression retroviraler Proteine	69
3.2.3.1	Immuno Blot	69
3.2.3.2	Indirekte Immunfluoreszenz	70
3.2.3.2.1	Gewebe neugeborener Tiere	70
3.2.3.2.2	Gewebe adulter Tiere	71
3.2.4	Phänotyp der transgenen Mäuse	71
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>72</b>
<b>4.1</b>	<b>Transkriptionelle Regulation von PERV und deren Adaptation an ein xenotropes humanes Wirtssystem</b>	<b>72</b>
4.1.1	PERV LTRs: Verteilung im Genom sowie Struktur und Aufbau	72
4.1.2	Adaptation der Promotorstruktur an den xenotropen Wirt	73
4.1.3	Vergleich der Provirusbelastung und Virionenfreisetzung in porzinen und infizierten humanen Zellen	75
4.1.4	Promotoraktivität der PERV LTR	78
4.1.5	Transkriptionelle Regulation der PERV Promotor-Aktivität	80
4.1.6	Immunsuppressiva haben keinen Einfluß auf die Promotor-Aktivität	84
4.1.7	Konsequenzen einer möglichen PERV Integration in das humane Genom nach erfolgreicher Xenotransplantation	86
<b>4.2</b>	<b>HERV-K Expression in transgenen Mäusen</b>	<b>89</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>92</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>94</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>96</b>

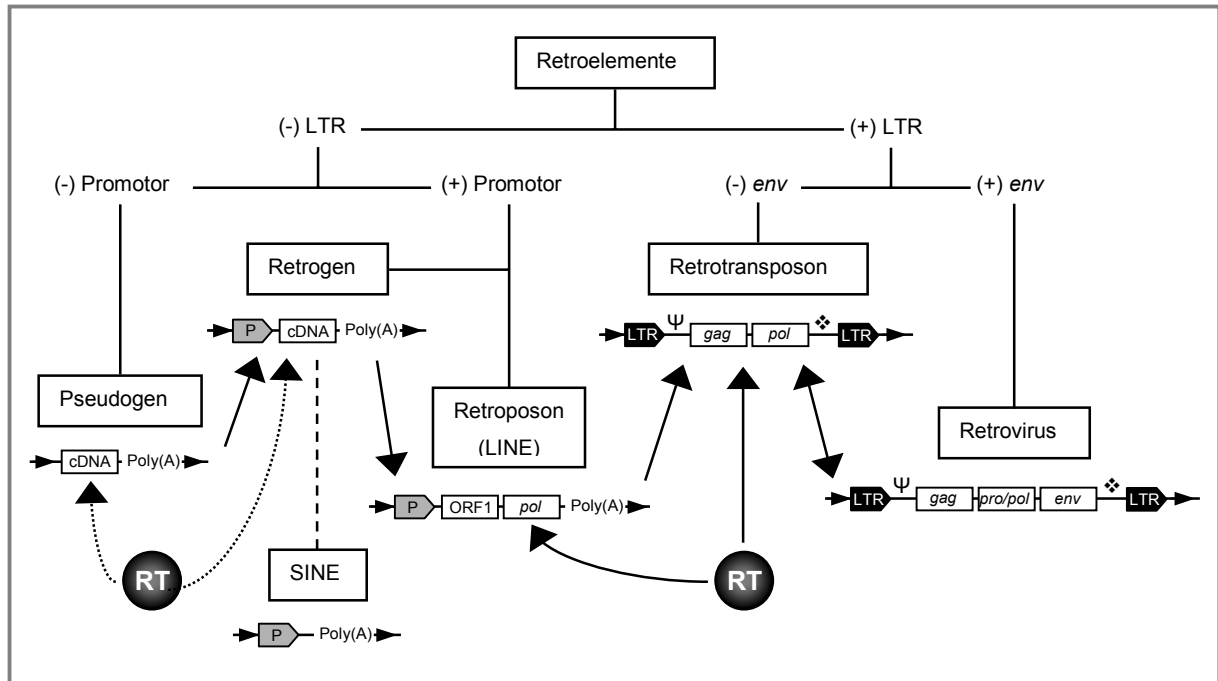
# 1 Einleitung

## 1.1 Retroelemente

Das Genom aller Eukaryoten sowie einiger Prokaryoten beinhaltet eine Vielzahl von Sequenzen, die transponierbare mobile Elemente darstellen, welche RNA-Intermediate zur Replikation nutzen (Wilkinson *et al.* 1994). Diese Retroelemente zeigen entweder strukturelle Ähnlichkeiten und Sequenzhomologien zu infektiösen, exogenen Retroviren, oder stellen aufgrund ihrer Sequenz Integrationsprodukte von revers transkribierter zellulärer mRNA dar (Boeke & Stoye 1997). Grundsätzlich nutzen alle Retroelemente die RT um ausgehend von RNA DNA-Kopien herzustellen, wobei die RT ausgehend von Sequenzen der Retroelemente synthetisiert wird. Bislang konnten keine zellulären RT-Gene identifiziert werden (Wilkinson *et al.* 1994). Da die RT während der Transposition neue Kopien erzeugt, sind Retroelemente in vielfachen Kopien über das gesamte Genom verteilt (Wilkinson *et al.* 1994). Neueste Untersuchungen zeigen, daß 45% des humanen Genoms aus transponierbaren Sequenzen bestehen, also revers transkribierten, in das Genom reintegrierten Retroelementen (International Human Genome Sequencing Consortium 2001).

Die verschiedenen Gruppen der Retroelemente können aufgrund struktureller Merkmale klassifiziert werden (Wilkinson *et al.* 1994, Löwer *et al.* 1996, Andersson *et al.* 1998). In Abbildung 1-1 sind diese Merkmale sowie die putative Evolution der Retroelemente dargestellt. Die Prozentangaben beziehen sich auf den prozentualen Anteil am humanen Genom (International Human Genome Sequencing Consortium 2001):

- **Pseudogene:** Reintegrierte zelluläre mRNA
- **Retrogene:** Pseudogene, die zusätzlichen einen Promotor tragen und daher aktiv transkribieren
- **SINE:** Entsprechen Pseudogenen, haben jedoch keine kodierenden Eigenschaften (13%)
- **LINE (Retroposons):** Tragen einen Promotor und kodieren für ein wenig charakterisiertes Gen (ORF-1) sowie ein *pol*-Gen (ORF-2) mit RT-Homologie (21%)
- **Retrotransposons:** Tragen eine LTR mit Promotoreigenschaften, kodieren neben dem *pol*-Gen für *gag*, welches die Partikelbildung erlaubt; RNA kann durch das Verpackungssignal  $\psi$  in diese inkorporiert werden
- **Retroviren:** Zeigen identischen Aufbau zu Retrotransposons und kodieren zusätzlich für ein *env*-Gen, das die Bildung eines Hüllproteins reguliert, welches für den rezeptorvermittelten Eintritt in die Wirtszelle verantwortlich ist.



**Abbildung 1-1: Strukturelle Eigenschaften und putative Evolution der Retroelemente.** (Abgeändert nach Löwer et al. 1996, Andersson et al. 1998). Gepunktete Pfeile, Entwicklung von genetischen Elementen durch reverse Transkription; durchgezogene Pfeile, Erwerb neuer Elemente durch Rekombination. RT, Reverse Transkriptase; P, Promotor; LTR, Long Terminal Repeat; ORF, offener Leserahmen; pro/pol, Polymerase-Gen (codiert neben anderen Enzymen für RT); gag, Kapsidprotein-Gen; env, Hüllprotein-Gen;  $\psi$ , Verpackungssignal;  $\star$  Polypurintrakt.

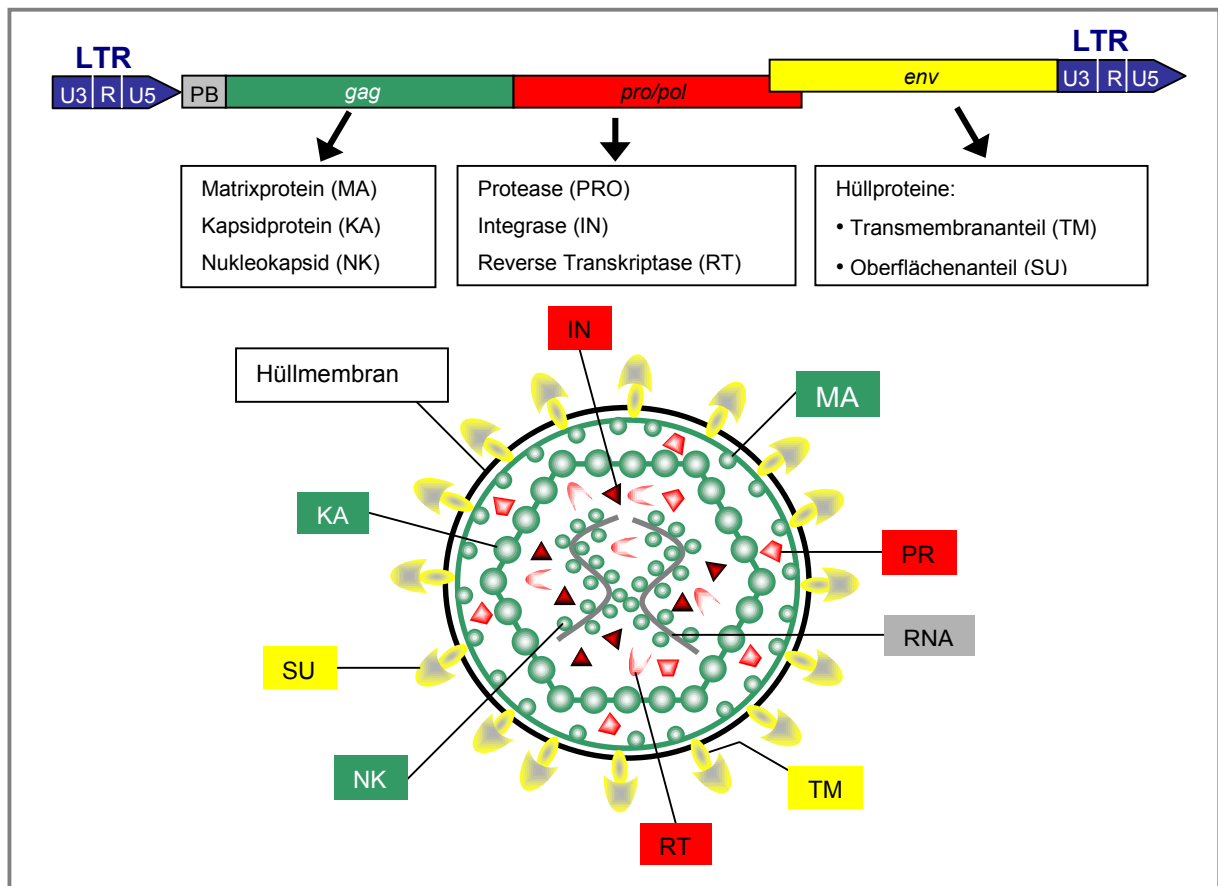
## 1.2 Retroviren

Retroviren stellen die komplexesten Vertreter der Retroelemente dar, sie können infektiöse Partikel bilden, deren rezeptorvermittelter Eintritt in die Wirtszelle durch das vom *env*-Gen kodierte Hüllprotein ermöglicht wird (Löwer *et al.* 1996). Wie in Abbildung 1-1 dargestellt, leiten sich Retroviren evolutionär wahrscheinlich von Retrotransposons ab (Temin 1980). Retroviren können anhand ihrer Genomstruktur in zwei große Gruppen – einfach und komplex – unterteilt werden (Vogt 1997). Das Genom aller Retroviren beinhaltet drei große kodierende Regionen mit Informationen für die viralen Proteine (Vogt 1997), so daß die Genomorganisation 5'-LTR-*gag-pro/pol-env*-3'-LTR der einfachen Retroviren (z.B. C-Typ Retroviren der Säuger und Vögel; Abbildung 1-2) prinzipiell für alle Retroviren gilt (Coffin 1996). Komplex aufgebaute Retroviren wie HIV, HTLV oder HSRV besitzen zusätzliche Gene, die für Proteine kodieren, welche in der Funktion von Transaktivatoren die Transkription des Provirus verstärken (Coffin 1996). Im proviralen Zustand werden die Gene beiderseits durch identische LTRs flankiert, die 5'-LTR stellt den Retroviralen Promotor dar. Die LTR setzt sich aus den Regionen U3, R und U5 zusammen, wobei insbesondere innerhalb der U3 Region die *cis*-aktiven Kontrollelemente lokalisiert sind (Rabson & Graves 1997). Die transkriptio-

nelle Regulation erfolgt auch durch die Bindung einer Vielzahl zellulärer Transkriptionsfaktoren an U3 und beginnt am 5'-Ende der R-Region (Cap Site; Coffin 1996, Rabson & Graves 1997). Die Polyadenylierung des Transkripts erfolgt am 3'-Ende der stromabwärts lokalisierten R-Region (Coffin 1996). Die U5-Region dagegen ist weniger für die transkriptionelle Regulation von Bedeutung sondern vielmehr essentiell für die reverse Transkription (Coffin 1996).

Das Genom der Retroviren zeichnet sich gegenüber dem anderer Viren durch einzigartige Eigenschaften aus (Coffin 1996):

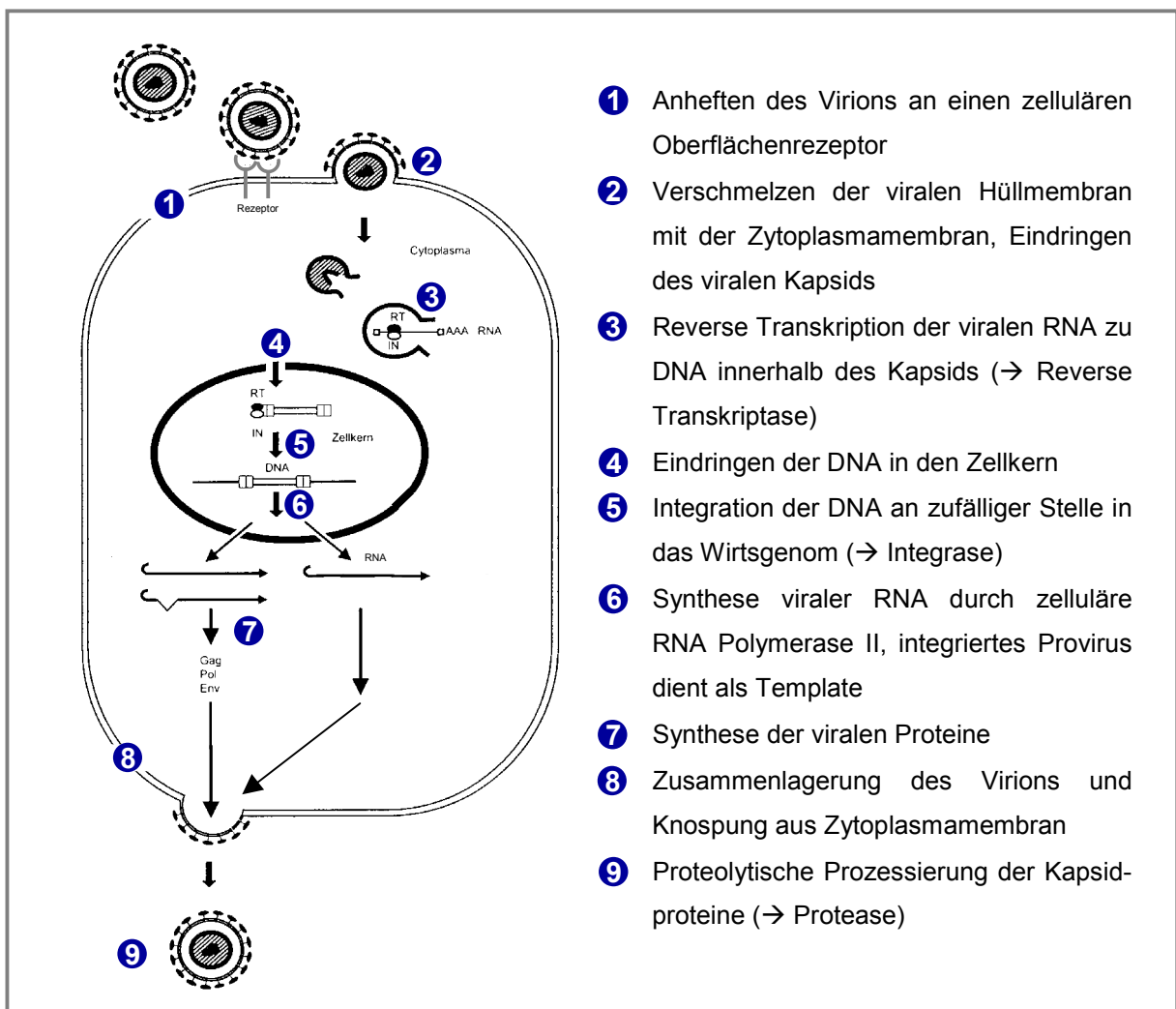
- Diploides Genom
- Synthese und Prozessierung durch zelleigene Transkriptionsmaschinerie
- Assoziation des Genoms mit zelleigener tRNA an die PB, welche der Replikation dient
- (+)-Strang RNA-Genom, das nach Infektion nicht direkt zur Proteinsynthese dient.



**Abbildung 1-2: Genomische Organisation eines Provirus sowie struktureller Aufbau eines Virions.** Die Genprodukte der viralen Leserahmen sind aufgeführt und im Virion in der entsprechenden Farbe dargestellt. Das RNA-Genom liegt im Virion mit dem Nukleokapsidprotein assoziiert vor. Die Hüllmembran entstammt der Zytoplasmamembran der Wirtszelle. Abgeändert nach Vogt 1997.

Die Virionstruktur der Retroviren ist einheitlich (Abbildung 1-2). Retroviren sind umhüllte Viren, die typischerweise einen Durchmesser von 90-140 nm aufweisen (Nermut & Hockley 1996). Die Hülle entstammt der Zytoplasmamembran der Wirtszelle und ist mit viruseigenen Glykoproteinen besetzt (den sog. Envelope-Proteinen, Env; Vogt 1997). Unterhalb der Membran liegt eine mit diesen assoziierte Schale, die Matrix. Das Kapsid, welches den Kern des Virions darstellt, kann entweder zylindrisch, konisch oder ikosaedrisch geformt sein (Nermut & Hockley 1996) und enthält neben den retroviralen Enzymen RT, IN und PRO den sich aus dem viralem Genom und dem Nukleokapsid zusammensetzenden Ribonukleoproteinkomplex.

Der allgemeine retrovirale Replikationszyklus ist in Abbildung 1-3 schematisch zusammengefaßt.



**Abbildung 1-3: Schematische Darstellung des retroviralen Replikationszyklus.** Abgeändert nach Modrow & Falke 1997.

Der Replikationszyklus stellt ein Zusammenspiel viraler Mechanismen (reverse Transkription, Integration) und zellulärer Systeme (Transkription, Translation) dar (Coffin 1996). Die Inter-

aktion mit den Oberflächenrezeptoren der Zelle ist hochspezifisch und damit eine wichtige Determinante der Wirtsspezifität (Vogt 1997). Während der DNA-Synthese innerhalb des Kapsids erfolgt ein Sprung der reversen Transkriptase vom 5'-Ende zum 3'-Ende des RNA-Template, was zu einer Duplikation der Sequenzelemente am jeweiligen Ende führt, welche dann als LTRs das Provirus beiderseits flankieren (Vogt 1997). Nach Integration an zufälliger Stelle liegt das Virus im Status eines zellulären Gens als sog. Provirus vor (Vogt 1997) und wird als Teil der chromosomalen DNA repliziert (Coffin 1996). Da ein Mechanismus zur Entfernung des integrierten Provirus nicht existiert, ist eine Infektion permanent (Coffin 1996). Die Kontrolle der Transkription wird durch die LTR gesteuert, deren Aktivität zellspezifisch reguliert wird und die damit ebenfalls den Wirtstropismus bestimmt (Ruddell 1995, Palmarini *et al.* 2000). Bemerkenswerterweise ist eine produktive retrovirale Infektion nicht zwangsläufig zytopathogen, infizierte Zellen zeigen oftmals keine sichtbaren Veränderungen mit Ausnahme der Virusproduktion (Coffin 1996). Dennoch stellt die Integration *per se* einen mutagenen Vorgang dar (Vogt 1997).

### 1.2.1 Klassifikation

Eine grobe Einteilung der Retroviren erfolgt hinsichtlich des Aufbaus ihres Genoms. Hierbei werden einfache Retroviren, die lediglich die Gene *gag*, *pro/pol* und *env* tragen (z.B. MLV, PERV) von komplexen Retroviren unterschieden, deren Genom neben diesen Genen noch weitere beinhaltet (z.B. HIV, HTLV; Vogt 1997).

Durch den Abgleich retroviraler Sequenzen und den Vergleich des Genoms ergibt sich eine Klassifikation basierend auf evolutionären Beziehungen (Coffin 1996). Dabei werden sieben Gruppen definiert, die vom International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV) als definierte Gattungen anerkannt werden (Tabelle 1-1). Fünf dieser Gattungen zeichnen sich durch ein onkogenes Potential aus (Vogt 1997). Kürzlich wurde von der ICTV (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV>) eine neue Nomenklatur basierend auf dieser Einteilung vorgeschlagen. In dieser Taxonomie sind die aus mehreren Fischarten isolierten komplexen Retroviren wie das Walleye Dermal Sarcoma Virus (Holzschu *et al.* 1997) noch nicht berücksichtigt (Petropoulos 1997), ebensowenig die in *Drosophila melanogaster* identifizierten Gypsy Retroviren (Kim *et al.* 1994, Petropoulos 1997).

Eine konventionellere Klassifikation beruht auf elektronenmikroskopisch zu unterscheidenden morphologischen Eigenheiten der viralen Partikel aufgrund derer vier Typen benannt werden (Teich 1984). A-Typ Partikel können ausschließlich intrazellulär nachgewiesen werden und besitzen keine Infektiösität (Teich 1984). Als typischer Vertreter der B-Typ Partikel gilt MMTV, das sowohl als exogenes als auch endogenes Virus isoliert wurde und der einzige infektiöse Vertreter dieser Gruppe ist (Coffin 1996). Gekennzeichnet sind B-Typ Partikel

durch eine toroidale Kernstruktur während der Knospung, im reifen Partikel liegt dieser elektronendicht vor (Teich 1984). C-Typ Partikel machen den Großteil aller bislang isolierten Retroviren aus. Eine intrazytoplasmatische Virusstruktur ist bei diesen bis zum Zeitpunkt der Knospung nicht zu erkennen. Reife Partikel haben im Gegensatz zu unreifen Partikeln einen zentral gelegenen elektronendichten Kern (Teich 1984). D-Typ Retroviren werden durch das MPMV repräsentiert, reife Partikel gleichen weitgehend denen der B-Typ Retroviren (Teich 1984).

**Tabelle 1-1: Klassifikation der Retroviridae.** Abgeändert nach Vogt 1997.

Gattung	Typspezies	ICTV <sup>a</sup> Nomenklatur	Partikel	Genom	Onkogen
Aviane Leukosis-Sarcoma Viren	Rous Sarcoma Virus (RSV)	Alpharetroviren <sup>b</sup>	C-Typ	einfach	+
Säuger B-Typ Retroviren	Mouse mammary tumor virus (MMTV)	Betaretroviren	B-Typ	einfach	+
MLV-verwandte Retroviren <sup>c</sup>	Murine leukemia virus (MLV)	Gammaretroviren	C-Typ	einfach	+
D-Typ Retroviren	Mason-Pfizer monkey virus (MPMV)	Betaretroviren	D-Typ	einfach	+
HTLV/BLV-Gruppe	Humanes T-Zell Leukämievirus (HTLV), Bovines Leukämievirus (BLV)	Deltaretroviren		komplex	+
Lentiviren	Humanes Immundefizienz Virus-1 (HIV-1)	Lentiviren		komplex	-
Spumaviren	Humanes Foamy Virus (HFV)	Spumaviren		komplex	-
	Walleye dermal sarcoma virus (WDSV)	Epsilonretroviren			

<sup>a</sup> International Committee on the Taxonomy of Viruses

<sup>b</sup> Typspezies ICTV: Avianes Leukosisvirus

<sup>c</sup> Subgattung C-Typ Retroviren (Petropoulos 1997)

## 1.2.2 Endogene Retroviren (ERV)

Das Genom nahezu aller Vertebraten, vom Knochenfisch zum Säuger, enthält stabil verankerte retrovirale Sequenzen, die denen exogener Retroviren im proviralen Zustand entsprechen und welche wie Gene nach den Mendelschen Regeln vererbt werden (Coffin 1996, Herniou *et al.* 1998). Ursache hierfür ist die stabile Integration eines exogenen Retrovirus in die Keimbahn des Wirtes während der gemeinsamen Koevolution (Boeke & Stoye 1997). Abgesehen von wenigen Ausnahmen (MMTV und JSRV) fehlt diesen endogenen Retroviren ein exogener Lebenszyklus (Wilkinson *et al.* 1994), so daß eine horizontale Verbreitung durch Infektion nicht erfolgen kann, die Transmission erfolgt daher vertikal durch Vererbung von einer Generation auf die nächste. Neben altertümlichen ERVs, die in großer Zahl im Genom vorliegen und in die Vorfahren heutiger Arten integrierten, sind auch solche bekannt, bei

denen dies erst in evolutionär gesehen junger Vergangenheit der Fall war (Coffin 1996). ERVs stellen nicht einfach Keimbahnkopien infektiöser exogener Retroviren dar, sondern weisen charakteristische Eigenschaften auf (Coffin 1996):

- meist transkriptionell inaktiv
- häufig defekte Genome mit ausgedehnten Deletionen und Trunkationen
- eine mögliche Replikation erfolgt selten im Wirtsorganismus
- meist apathogen für den Wirtsorganismus.

Die Existenz von ERVs kann für den Wirt unterschiedliche Konsequenzen haben. Deren Env-Expression bietet offensichtlich einen Schutz gegen die Infektion exogener Viren, die denselben Rezeptor nutzen (Boeke & Stoye 1997). Obwohl meist apathogen, können einige ERVs wie MMTV bei Mäusen Brustkrebs hervorrufen (Coffin 1996), ebenfalls bei Mäusen führten Rekombinationsereignisse zwischen einer ekotropen und xenotropen Form zur Ausbildung einer Leukämie (Boeke & Stoye 1997). Grundsätzlich ist eine Rekombination mit anderen endogenen Elementen vorstellbar, die zur Ausbildung neuer pathogener Varianten führen kann (Yoder *et al.* 1997). Die Insertion eines ERV in einen neuen Genort stellt generell ein potentiell mutagenes Ereignis dar (Coffin 1996). Vorstellbar ist in diesem Zusammenhang die Aktivierung zellulärer Protoonkogene durch die retrovirale LTR (Fan 1990).

#### 1.2.2.1 Humane endogene Retroviren (HERV)

Das menschliche Genom besteht zu 8% aus Sequenzen humaner endogener Retroviren (International Human Genome Sequencing Consortium 2001) die vertikal übertragen und als genetische Elemente von einer Generation auf die nächste vererbt werden (Löwer *et al.* 1996). HERVs wurden hinsichtlich ihrer Homologien zu tierischen Retroviren klassifiziert und dementsprechend in zwei Klassen unterteilt (Wilkinson *et al.* 1994). Die Vertreter der Klasse 1 (z.B. HERV-C) ähneln den C-Typ Retroviren der Säuger, als nächste infektiöse Verwandte gelten MLV und BaEV. Im Gegensatz dazu zeichnen sich HERV der Klasse 2 (z.B. HERV-K) durch nahe phylogenetische Beziehungen zu B- und D-Typ Retroviren der Säuger aus.

Die gelegentliche Transkription von HERV-Elementen ist für zahlreiche Zelllinien und humane Gewebe beschrieben, dennoch scheint die Translation der mRNA nur in seltenen Fällen zu erfolgen, die Expression der retroviralen Proteine ist streng kontrolliert (Wilkinson *et al.* 1994, Löwer *et al.* 1996). Das *env*-Produkt von HERV-W, Fusogen, wird ausschließlich in Plazentazellen expremiert und mit der Ausbildung der Plazenta assoziiert (Blond *et al.* 2000). Bislang ist nicht bekannt, daß HERV-Sequenzen zur Kodierung von Retroviren mit einem kompletten exogenen Replikationszyklus dienen, ebensowenig können pathophysiologische Effekte mit solchen Retroviren in Zusammenhang gebracht werden (Wilkinson *et al.* 1994, Lö-



wer *et al.* 1996). Dennoch konnten HTDV-Partikel, die in der teratokarzinomen Zelllinie GH nachgewiesen wurden, mit der mRNA-Expression von HERV-K-Sequenzen in diesen Zellen in Verbindung gebracht werden (Löwer *et al.* 1984, Löwer *et al.* 1993). Antikörper die gegen rekombinantes HERV-K Gag gerichtet waren, zeigten eine spezifische Reaktion gegen Kernproteine des HTDV (Boller *et al.* 1993, Löwer *et al.* 1993).

HERV-K-Sequenzen können nur in der Linie der Altweltaffen nachgewiesen werden (Ono *et al.* 1986, Steinhuber *et al.* 1995) wobei weitgehende Übereinstimmungen zwischen Affen, Menschenaffen und Menschen für die Gene *pol* und *env* bestehen (Tönjes & Kurth 1994). Das haploide humane Genom weist zwischen 30 und 50 HERV-K Kopien auf (Ono *et al.* 1986), von denen einige lange offene Leserahmen (ORF) aufweisen (Ono *et al.* 1986, Löwer *et al.* 1996, Tönjes *et al.* 1996). Darüber hinaus existieren ungefähr 25.000 solitäre LTRs (Leib-Mösch *et al.* 1993). Provirale HERV-K Sequenzen können anhand der Existenz eines 292 nt langen Segmentes, das den aminoterminalen Teil des *env* Gens beinhaltet, unterschieden werden (Löwer *et al.* 1995). Dem Genom von HERV-K des Typs 1 fehlt dieses Segment, die *pol*- und *env*-Gene liegen fusioniert vor und mRNA wird ungespleißt exprimiert (Löwer *et al.* 1995). Im Gegensatz dazu wird das Vollängen-Transkript von HERV-K des Typs 2 zu subgenomischem *env* und zwei kurzen mRNAs gespleißt (Löwer *et al.* 1995). Eine dieser doppelt gespleißten mRNA umfaßt einen Großteil des 292 nt Segmentes und kodiert für das 14 kDa große Protein Rec-Corf, das im Nukleolus vorliegt (Löwer *et al.* 1995) und ähnlich zu Rev und Rex den nukleo-zytoplasmatischen Transport gespleißter oder unvollständig gespleißter viraler Transkripte vermittelt (Magin *et al.* 2000, Magin-Lachmann *et al.* 2001).

#### 1.2.2.2 Porzine endogene Retroviren (PERV)

Nachdem C-Typ Viruspartikel in Kulturen stabiler Nierenzelllinien des Schweines entdeckt wurden (Breese 1970, Armstrong *et al.* 1971) konnte kurz danach gezeigt werden, daß es sich dabei um endogene Retroviren handelt (Todaro *et al.* 1973). Kürzlich erfolgte die molekulare Charakterisierung sowie der Nachweis, daß PERV humane Zellen infizieren kann (Patience *et al.* 1997, Czauderna *et al.* 2000).

Anhand ihrer *env*-Gene werden derzeit vier Klassen von PERV unterschieden, die unterschiedliche Wirtszellspezifität aufweisen (Le Tissier *et al.* 1997, Akiyoshi *et al.* 1998, Takeuchi *et al.* 1998, Patience *et al.* 2001). Während PERV-A, PERV-B und PERV-C (Synonym PERV-MSL) bereits ausführlich beschrieben sind, kennt man von der PERV-D *env*-Sequenz bislang lediglich 275 nt (Patience *et al.* 2001). Basierend auf der Entdeckung weiterer Retroviren im Genom des Schweines und verwandter Arten wurde in jüngster Zeit eine neue Nomenklatur vorgeschlagen (Patience *et al.* 2001). Die infektiösen Gammaretroviren PERV-A,

PERV-B und PERV-C werden in der Gruppe  $\gamma 1$  zusammengefaßt, daneben erfolgte die Benennung von vier weiteren Gruppen porciner Gammaretroviren ( $\gamma 2$ -  $\gamma 5$ ) sowie von vier Gruppen porciner Betaretroviren ( $\beta 1$ -  $\beta 4$ ).

Das porcine Genom verschiedener Schweinerassen trägt zwischen 30 und 50 Integrationsorte für PERV ( $\gamma 1$ ) (Le Tissier *et al.* 1997, Akiyoshi *et al.* 1998). Im Genom der Weißen Landrasse konnten dabei sechs intakte Proviren nachgewiesen werden, die für alle Gene codierten, während eine Vielzahl der isolierten Proviren Defekte in einem oder mehreren Genen aufwies (Herring *et al.* 2001, Niebert *et al.* 2002). Die mRNA-Bildung konnte für einige dieser Proviren im Gewebe verschiedener Organe (Herz, Leber, Niere, Milz, Lunge, Haut) sowie in peripheren Blutlymphozyten und Aortaendothelzellen gezeigt werden (Patience *et al.* 1997, Akiyoshi *et al.* 1998, Martin *et al.* 1998, Wilson *et al.* 1998). Viruspartikel konnten *in vivo* im Schwein bislang noch nicht nachgewiesen werden, ebenso ist keine Erkrankung des Schweines bekannt, die mit PERV assoziiert ist (Tönjes 2000).

### 1.3 Xenotransplantation

Unter der Xenotransplantation versteht man die Verwendung spezieisfremder Spendermaterialien zur Linderung oder Behebung menschlicher Erkrankungen entweder durch Transplantation, Implantation oder Infusion lebender Zellen, Gewebe oder solider Organe oder die *ex-vivo* Behandlung durch Kontakt mit tierischen Geweben (Tönjes 2000). Die Geschichte der modernen Xenotransplantation begann 1963 mit der Transplantation von Schimpansenieren in Patienten mit Nierenversagen (Reemtsma 1966). Große öffentliche Anteilnahme wurde 1985 Baby Fae zuteil, dem aufgrund eines Herzleidens ein Pavianherz transplantiert wurde (Bailey *et al.* 1985). Eine Lebertransplantation wurde erstmals 1993 mit den Organen von Pavianen durchgeführt (Starzl *et al.* 1993). All diesen Versuchen war bis auf einen Ausnahme gemein, daß die Empfänger innerhalb kürzester Zeit nach der Transplantation verstarben.

Die Verwendung von nichthumanen Primaten als Spendertiere erschien hinsichtlich der phylogenetischen Verwandtschaft und der damit einher gehenden Ähnlichkeit der Physiologie und Immunologie als sinnvoll (Boneva *et al.* 2001). Aufgrund der nahen Verwandtschaft besteht allerdings auch ein hohes Risiko der Infektion des Empfängers durch Krankheitserreger des Affen und der Ausbildung von Zoonosen, wie sie z.B. für HIV-1 gezeigt werden konnte (Gao *et al.* 1999). Daneben sprechen auch ökonomische und ethische Gründe gegen die Verwendung von Affen als Organspender, so daß mittlerweile das Schwein als idealer Spenderorganismus betrachtet wird (Sachs 1994, Dorling *et al.* 1997, Greenstein & Sachs 1997, Boneva *et al.* 2001).

Bereits 1990 wurde in Osteuropa das Herz eines Schweines transplantiert, der Empfänger überlebte den Eingriff jedoch nur für 24 h (Boneva *et al.* 1997). Daneben wurden Experimente zur Behandlung von Diabetes mellitus durch die Infusion oder Implantation von (eingekapselten) Inselzellen durchgeführt (Groth *et al.* 1994), ebenso eine extrakorporale Leberperfusion (Bengtsson *et al.* 1998) sowie die Perfusion bzw. Implantation ganzer Leberpräparationen (Chari *et al.* 1994, Cramer 1995). Fötale neuronales Gewebe wurde zur Behandlung von Parkinson und Huntington Disease verwendet (Deacon *et al.* 1997, Fink *et al.* 2000), ebenso zur Regeneration zerstörter Nerven (Imaizumi *et al.* 2000).

Wie bei allen Transplantationen ist insbesondere auch bei der Xenotransplantation mit einer Abstoßungsreaktion zu rechnen, die in drei Stufen verläuft. Die bereits nach Minuten bis Stunden einsetzende hyperakute Abstoßung (HAR, hyperacute rejection) vaskularisierter Organe (Bach *et al.* 1995) ist auf das Vorhandensein präformierter Antikörper (XNA, xeno-reactive natural antibodies) zurückzuführen, die gegen spezifische Zuckerreste (Galactose- $\alpha$ -1,3-galactose,  $\alpha$ 1,3Gal), die auf Endothelzellen fast aller Säuger mit Ausnahme der Linie der Altweltaffen und Menschen präsentiert werden (Galili *et al.* 1998), gerichtet sind. Die Bindung der Antikörper, die 1% der zirkulierenden IgGs ausmachen (Galili *et al.* 1985), zieht eine Aktivierung der Komplementkaskade nach sich, die zu einer Zerstörung des Endothels und damit zu einem Absterben des porzinen Organs führt (Dorling *et al.* 1997). Der HAR folgt die verzögerte Xenotransplantat-Abstoßung (DXR, delayed xenograft rejection), die erst nach Tagen einsetzt und durch die Einbeziehung von Makrophagen und natürlichen Killerzellen sowie Entzündungsmediatoren charakterisiert ist. Die darauffolgende chronische Abstoßung wird durch T-Zellen vermittelt (Bach *et al.* 1995).

Zahlreiche Versuche wurden bislang unternommen, die HAR zu umgehen oder abzuschwächen. So gelang es den XNA-Titer im Transplantatempfänger durch Affinitätsadsorption an  $\alpha$ 1,3Gal-haltiges Säulenmaterial zu verringern (Good *et al.* 1992), der Effekt war jedoch nur temporär (Dorling *et al.* 1997). Ein anderer Ansatz zielt auf eine Inhibierung der Komplementkaskade durch die Verwendung transgener Schweine ab, die humane Komplementregulatorische Proteine auf der Zelloberfläche präsentieren (Ryan 1995). Zu diesen Regulatoren der Komplementaktivität (RCA, regulator of complement activity) gehören CD55 (DAF, decay-accelerating factor), CD46 (MCP, membrane cofactor protein) sowie CD59 (MAC-inhibitor, inhibitor of membrane attacking complex). Im Tiermodell konnte der Erfolg der Methode bereits demonstriert werden (Cozzi & White 1995, McCurry *et al.* 1995, Cowan *et al.* 2000). Die mögliche Maskierung freigesetzter Viren für das humane Komplementsystem durch die Expression humaner Komplementfaktoren auf der porzinen Zelloberfläche stellt jedoch ein starkes Argument gegen die Verwendung dieser transgenen Schweine dar (Weiss 1998). RCAs dienen darüber hinaus Viren als Rezeptoren (Naniche *et al.* 1993, Dorig *et al.*

1993, Bergelson *et al.* 1994, Santoro *et al.* 1999), wodurch neue Infektionsrisiken entstehen (Weiss 1998).

Eine kompetitive Inhibierung der  $\alpha$ -1,3-Galactosyltransferase ( $\alpha$ 1,3GalT), welche für die Ausbildung der  $\alpha$ 1,3Gal Epitope verantwortlich ist, sollte durch die transgene Expression der humanen  $\alpha$ -1,3-Fucosyltransferase erzielt werden (Sandrin *et al.* 1995, Sharma *et al.* 1996). Es zeigte sich jedoch nur eine partielle Abnahme der  $\alpha$ 1,3Gal Epitopzahl (Costa *et al.* 1999). Eine Verringerung der  $\alpha$ 1,3Gal-Expression konnte in *N*-Acetylglucosaminyltransferase III transgenen Tieren ebenfalls gezeigt werden, allerdings zeigte sich in einem Primatenmodell kein Effekt auf die HAR (Miyagawa *et al.* 2001). Die erfolgreiche Klonierung von Schweinen (Polejaeva *et al.* 2000, Onishi *et al.* 2000) ermöglichte neben der Herstellung von identischen Tieren definierter Qualität auch neue Ansätze, die HAR zu überwinden (Kaiser 2002). So gelang der heterozygote Knockout des  $\alpha$ 1,3GalT-Gens in geklonten Tieren (Lai *et al.* 2002, Dai *et al.* 2002). Da ausgehend von der verbliebenen Genkopie (hemizygot) die  $\alpha$ 1,3Gal Expression weiter stattfindet, ist die Etablierung homozygoter Knockout-Tiere unerlässlich – ob dies jedoch realisierbar ist und so die HAR komplett überwunden werden kann, bleibt abzuwarten (Butler 2002).

In einem konträren Ansatz gelang in einem Mausmodell die Toleranzinduktion gegen ein Xenotransplantat durch das Einbringen der porzinen  $\alpha$ 1,3GalT mittels Gentransfer in Knochenmarkszellen (Bracy *et al.* 1998). In diesem Fall konnte ebenso eine B-Zell Toleranz nachgewiesen werden, wie bei der Knochenmarkstransplantation von Wildtypmäusen in Transferase-Knockout-Mäuse (Yang *et al.* 1998).

Abschließend bleibt festzuhalten, daß zwar durch die Gabe starker Immunsuppressiva die HAR überwindbar erscheint, nicht jedoch die verzögerte und die chronische Abstoßung. Unbekannt ist weiterhin, ob das Schweineorgan im humanen Organismus über längere Zeiträume seine physiologische Funktion aufrechterhält (Dorling *et al.* 1997). Aus diesem Grund werden derzeit Xenotransplantate, insbesondere solche ganzer vaskularisierter Organe, lediglich zur Überbrückung (dem sogenannten Bridging) als geeignet betrachtet, bis ein passendes Allotransplantat zur Verfügung steht.

### 1.3.1 Die Bedeutung von PERV für die Xenotransplantation

Für die Verwendung porziner Gewebe und Organe wurden immer wieder Bedenken hinsichtlich der Sicherheit der Spendermaterialien geäußert, da eine Infektion durch Mikroorganismen und damit verbundenen Xenozoonosen nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden kann (Michaels & Simmons 1994, Stoye & Coffin 1995, Fishman 1997, Takeuchi 2000, Boneva *et al.* 2001). Einige dieser Erreger sind in Tabelle 1-2 aufgelistet (Fiane *et al.* 2000).

Die Züchtung von Schweinen unter spezifisch oder qualifiziert pathogen-freien (SPF, QPF) Bedingungen ermöglicht prinzipiell die Eliminierung von exogenen Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten, die für den Transplantatempfänger ein gesundheitliches Risiko darstellen können (Fishman 1997). Mögliche Risiken für die Anwendung der Xenotransplantation gehen jedoch weiterhin von endogenen Retroviren aus, ebenso von weniger gut charakterisierten Viren wie Herpes- oder Circoviren (Fishman 1997, Stoye 1997, Ehlers *et al.* 1999, Onions *et al.* 2000, Takeuchi 2000, Boneva *et al.* 2001, Mankertz *et al.* 1997).

**Tabelle 1-2: Erreger des Schweines, die auf den Menschen übertragen werden können.**  
Nach Fiane *et al.* 2000.

Bakterien	Parasiten, Protozoen, Pilze	Viren
<i>Brucella suis</i>	<i>Ascaris suum</i>	Porzines Adenovirus
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Babesia spec.</i>	Porzines Cytomegalievirus
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Balantidium coli</i>	Porzines Rotavirus
<i>Chlamydia psittaci</i>	<i>Cryptosporidium spec.</i>	Porzines endogenes Retrovirus
<i>Clostridium tetani</i>	<i>Echinococcus spec.</i>	Aujeszky's disease virus
<i>Corynebacterium suis</i>	<i>Entamoeba spec.</i>	Japanisches Enzephalievirus
Entrobacteriaceae	<i>Pneumocystis carinii</i>	Encephalomyocarditisvirus
<i>Erysipelotrix rhusiopathiae</i>	<i>Schistosoma spec.</i>	Vesikuläres Stomatitisvirus
<i>Haemophilus spec.</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>	Maul- und Klauenseuche Virus
<i>Leptospira interrogans</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Rabies Virus
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Trichinella spiralis</i>	Schweine Influenza Virus
<i>Mycobacterium avium</i>		Schweine Parainfluenza Virus
<i>Mycobacterium bovis</i>	<i>Aspergillus spec.</i>	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	
<i>Pasturella multocida</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>	
<i>Pseudomonas spec.</i>	<i>Microsporium nanum</i>	
<i>Salmonella spec.</i>	Zygomycetes	
<i>Yersinia spec.</i>	<i>Nocardia spec.</i>	

Im Jahre 1997 wurde erstmals beschrieben, daß PERV *in-vitro* humane Zellen produktiv infizieren kann (Patience *et al.* 1997). Mittels zellfreier Kulturüberstände der spontan C-Typ Retroviren freisetzenden porzinen Zelllinien PK15 und MPK wurden suszeptible Zelllinien charakterisiert (Armstrong *et al.* 1971, Moenning *et al.* 1974, Todaro *et al.* 1974). PERV aus PK15 Zellen konnte dabei sowohl Zellen des Schweins, des Nerzes als auch des Menschen infizieren, PERV aus MPK Zellen lediglich porzine Zellen (Patience *et al.* 1997). Untersuchungen mit MLV Partikeln die mit PERV Env der Klassen A, B und C pseudotypisiert waren, erweiterten das Spektrum suszeptibler Zelllinien (Takeuchi *et al.* 1998). Demnach müssen PERV A und-B als polytrop eingestuft werden, PERV-C als ekotrop.

Die Freisetzung human-infektiöser PERV-Partikel konnte auch für primäre porzine Zellen unabhängig von einer Mitogenstimulation demonstriert werden (Martin *et al.* 1998, Wilson *et al.* 1998, Wilson *et al.* 2000, van der Laan *et al.* 2000), zudem konnte der Nachweis erbracht

werden, daß Zelllinien nicht-humaner Primaten durch PERV infiziert werden können (Blusch *et al.* 2000). Passagierungsexperimente mit PERV in humanen Zellen zeigten, daß replikationsinkompetente MLV-Vektoren durch PERV komplettiert wurden und im Anschluß resistent gegen das humane Komplementsystem waren (Griffiths 2000). Da bekannte PERV im porzinen Genom kartiert werden konnten (Herring *et al.* 2001, Niebert *et al.* 2002) erscheint die Zucht PERV-freier Spendertiere möglich. Kürzlich wurde die Existenz von Minischweinen beschrieben, welche nicht in der Lage sind, PERV freizusetzen (Oldmixon *et al.* 2002). Ein Risiko kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, wie die Entdeckung bislang unbekannter retroviraler Sequenzen im porzinen Genom zeigt (Patience *et al.* 2001), welche bei Rekombinationsereignissen eine Rolle spielen können. Ausgedehnte Rekombinationen zwischen PERV-Proviren wurden für das Genom von für die Transplantation vorgesehenen Westran Schweinen beschrieben (Lee *et al.* 2002).

In retrospektiven Studien an Patienten, die zu therapeutischen Zwecken kurzzeitig mit lebendem porzinen Gewebe behandelt wurden, oder Personen, die aus beruflichen Gründen dauerhaft Kontakt mit Blut und Gewebe des Schweines haben, ergaben sich keine Hinweise auf eine Übertragung von PERV, auch wenn in einigen Fällen Mikro-Chimärismus gezeigt werden konnte (Heneine *et al.* 1998, Patience *et al.* 1998, Paradis *et al.* 1999, Pitkin *et al.* 1999, Dinsmore *et al.* 2000, Tacke *et al.* 2001). Allerdings spiegeln die Bedingungen der therapeutischen Behandlungen keineswegs die Situation wieder, die bei Transplantation eines kompletten vaskularisierten Organs entstehen würde, das bei starker Immunsuppression des Empfängers idealerweise für Monate oder gar Jahre in dessen Organismus verbleibt.

Im Gegensatz dazu konnte in einem Modell für NOD/SCID (non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency) Mäuse eine PERV-Infektion der diabetischen, immundefizienten Tiere sowie die PERV-Expression in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden, nachdem eine Xenotransplantation mit porzinen Inselzellen durchgeführt wurde (van der Laan *et al.* 2000). Obwohl der immunologische Status in immunsupprimierten Patienten bei weitem nicht mit dem von SCID-Mäusen zu vergleichen ist und der Nachweis einer PERV-Infektion für Kritiker nicht einwandfrei belegt ist, haben die Experimente zu einer Anregung der Diskussion über mögliche Risiken der Xenotransplantation beigetragen (Dorey 2001).

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit umfaßt zwei thematische Schwerpunkte. Im Rahmen des ersten Projektes erfolgte die Untersuchung der transkriptionellen Aktivität von PERV in humanen Zellen und deren Regulation durch den retroviralen Promotor (LTR) sowie zelluläre Transkriptionsmechanismen. PERV kann humane Zellen *in-vitro* infizieren und gilt daher als möglicher Risikofaktor für die Anwendung der Xenotransplantation. Voraussetzung für eine produktiven Infektion ist neben dem rezeptorvermittelten Eindringen in die Wirtszelle die Aktivität der LTR, die damit ebenfalls den Wirtstropismus bestimmt. Die Aktivität der LTR sollte mittels eines Reporter-gen Assays in verschiedenen humanen und tierischen Zelllinien im Vergleich zu bekanntermaßen starken Promotoren untersucht werden. Mittels Deletionsmutanten sollten weiterhin für die Regulation der Transkription wichtige LTR Elemente lokalisiert werden, ebenso sollte die Bindung zellulärer Proteine an diese Abschnitte nachgewiesen werden. Da im Falle einer Xenotransplantation der Transplantatempfänger stark immunsupprimiert würde, zielte eine weitere Fragestellung auf den möglichen Einfluß von Immunsuppressiva auf die Regulation des Promotors ab. Durch die Charakterisierung der transkriptionellen Regulation sowie die Bewertung der Promotoraktivität in humanen Zellen kann das Risikopotential von PERV im Falle einer Infektion nach Xenotransplantation für den Transplantatempfänger selbst aber auch sein soziales Umfeld evaluiert werden.

Im Rahmen des zweiten Projektes sollte untersucht werden, ob eine HERV-K Expression in einem transgenen Mausmodell Auswirkungen auf den Phänotyp der Tiere hat. Die meisten HERV-Familien weisen trunkierte Genome auf. HERV-K codiert dagegen für komplette virale Proteine, deren Bedeutung für den menschlichen Organismus weitgehend unbekannt sind und die mit der Ausbildung von Teratokarzinomen assoziiert werden. Die Expression retroviraler Nukleinsäuren und Proteine sollte in den transgenen Tieren mittels verschiedener molekularbiologischer und biochemischer Methoden untersucht werden. Ein weiterer Fokus der Arbeit lag auf der Beobachtung des Phänotyps der Tiere sowie ihrer Lebenserwartung und Reproduktion. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse können helfen, die Bedeutung der HERV-K Expression im humanen Organismus zu bewerten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Organismen

#### 2.1.1 Bakterienstämme

- DH5 $\alpha$ : *Escherichia coli* Stamm mit dem Genotyp F<sup>-</sup>  $\Phi$ 80d*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *deoR recA1 endA1hsdR17*(r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>) *phoA supE44*  $\lambda$  *thi-1 gyrA96 relA1* (Invitrogen)
- DH10 $\beta$ : *Escherichia coli* Stamm mit dem Genotyp F<sup>-</sup> *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80d*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 deoR recA1 araD139*  $\Delta$ (*ara, leu*) 7697 *galU galK*  $\lambda$  *rpsL nupG* (Invitrogen)

#### 2.1.2 Säugerzellen

- 293: Adenovirus-5 transformierte epitheliale Nierenzelllinie eines humanen Embryos (*Homo sapiens*), adhärenente Zelle (ECACC Nr. 85120602)
- 293/PERV-PK: 293 Zellen nach Ko-Kultivierung mit PK15 Zellen (Patience *et al.* 1997)
- 293/PERV-B(33): 293 Zellen nach Transfektion/Infektion mit dem Molekularklon 293-PERV-B(33)/ATG (Czauderna *et al.* 2000)
- A3.01: Lymphoblastoide T-Zelllinie des Menschen (*Homo sapiens*), Suspensionszelle (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program Nr. 166) (Folks *et al.* 1985)
- Bai/NJ: Epstein Barr Virus transformierte B-Zelllinie des Menschen (*Homo sapiens*), Suspensionszelle (ECACC Nr. 9168)
- Cos-7: Simian Virus 40 transformierte fibroblastoide Nierenzelllinie der Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*), adhärenente Zelle (ECACC Nr. 87021302)
- D17: Osteosarcoma-Zelllinie eines adulten Hundes (*Canis familiaris*), adhärenente Zelle (ECACC Nr. 89090403)
- HeLa: Humane epitheliale Carcinoma-Zelllinie aus dem Gebärmutterhals (*Homo sapiens*), adhärenente Zelle (ECACC Nr. 93021013)
- MRC-5: Normale fibroblaste Lungenzelllinie eines humanen Fötus (*Homo sapiens*), adhärenente Zelle (ECACC Nr. 84101801)
- PG-4: Moloney Murine Sarcoma Virus transformierte glial-astrocytische Gehirnzelllinie der Katze (*Felis domestica*), adhärenente Zelle (ECACC Nr. 94102703)



---

PK15:	Normale epitheliale Nierenzelllinie eines adulten Schweines ( <i>Sus scrofa</i> ), adhärenente Zelle (ATCC Nr. CCL-33)
ST-Iowa:	Normale fibroblastoide Hodenzelllinie eines juvenilen Schweines ( <i>Sus scrofa</i> ), adhärenente Zelle (ATCC Nr. CRL-1746)

### 2.1.3 Mäuse

C57Black6: Inzuchtstamm

## 2.2 Kulturbedingungen der Bakterienstämme

### 2.2.1 Kulturmedien

Die Medien wurden nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Festmedien wurden mit 1,5% Agarose (w/v) versetzt.

### 2.2.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

*E. coli* wurde in LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,0; autoklaviert) oder TB-Medium (12 g/l Trypton, 24 g/l Hefeextrakt, 4 ml Glycerin, 17 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 72 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; autoklaviert) bei 37°C unter Schütteln (250 rpm) kultiviert. Transformierte Bakterien wurden durch Zugabe des Antibiotikums Ampicilin (50 µg/µl, Boehringer Mannheim) selektioniert.

## 2.3 Zellkultur

### 2.3.1 Kultivierung von Säugerzellen

Die Zelllinien 293, 293/PERV-PK (freundlicherweise von C. Patience, London, zur Verfügung gestellt), 293/PERV-B(33), PG-4 und PK15 (freundlicherweise von R. Weiss, London, zur Verfügung gestellt) wurden in DMEM-Medium, welchem L-Glutamin (2 mM), Penicillin (100 Units/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) (SP) sowie 10% inaktiviertes FKS zugesetzt war, kultiviert. Die Kultivierung von D17 und ST-Iowa Zellen (freundlicherweise von R. Weiss, London, zur Verfügung gestellt) erfolgte in MEM-Medium (supplementiert mit Glutamin, SP und FKS). Die Zelllinien Cos-7, HeLa und MRC-5 wurden in CMRL-Medium gehalten, dem neben Glutamin, SP und FKS zusätzlich Bicarbonat (3,7 g/l) beigelegt wurde. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen ein- bis zweimal pro Woche trypsiniert [10 ml

2,5% Trypsin Melnick, 15 ml Versen (159 mM NaCl, 3 mM KCl, 6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 mM Titriplex) und 30 ml PBS ohne Mg/Ca] und im Verhältnis 1:5 bis 1:20 gesplittet. Die Suspensionszelllinien A3.01 (freundlicherweise von E. Flory, Paul-Ehrlich-Institut, Langen, zur Verfügung gestellt) und Bai/NJ erfolgte in RPMI-Medium (supplementiert mit Glutamin, SP und FKS). Die Zellen wurden zweimal pro Woche 1:10 gesplittet. Die Kultivierung aller Zellen erfolgte in Zellinkubatoren (Heraeus) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

### **2.3.2 Einfrieren von Säugerzellen**

Adhärente Zellen wurden in einer mittelgroßen Flasche (80 cm<sup>2</sup>, Nunc) bis zur Konfluenz kultiviert, trypsinisiert und in 30 ml Medium aufgenommen. Nach Pelletierung (200 x g, 3 min, 4°C) erfolgte je nach Zellzahl die Aufnahme in 1,5 bis 3 ml Einfrierlösung (90% FKS, 10% DMSO, Sigma). Suspensionszellen wurden pelletiert und danach ebenfalls in Einfrierlösung aufgenommen. Nach Überführung in Cryo Vials (Greiner) erfolgte eine Lagerung bei -20°C für 2 h und -80°C über Nacht, bevor die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

### **2.3.3 Transiente Transfektion von Säugerzellen**

#### **2.3.3.1 Adhärente Zellen**

Die transiente Transfektion adhärenter Zellen erfolgte mittels Lipofectamine (Invitrogen) oder LipofectaminePLUS (Invitrogen). Beide Reagenzien führen zur Ausbildung stabiler DNA-Liposomen-Komplexe, welche den Gentransfer in die eukaryotische Zelle ermöglichen. Vor Transfektion wurden ca.  $2 \cdot 10^5$  Zellen in Sechsllochplatten (Renner) ausgesät und 24 h kultiviert. EndoFree (siehe 2.5.1.3.2) präparierte Plasmid-DNA (333 pg für pRL-CMV und 1 µg für alle anderen Plasmide) wurde mit 10 µl Lipofectamine in 100 µl Optimem 1-Medium (Invitrogen) für 30 min inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit PBS (ohne Mg/Ca) und Optimem 1 erfolgte die Zugabe der mit 800 µl Optimem 1 verdünnten DNA-Liposomen-Komplexe. Das Transfektionsreagenz wurde durch das entsprechende Zellkulturmedium 5 h pt ersetzt und die Zellen für weitere 43 h kultiviert.

Bei Verwendung von LipofectaminePLUS erfolgte eine Vorinkubation der DNA mit 6 µl PLUS-Reagenz für 15 min, gefolgt von der Komplexbildung im Lipofectamine (4 µl)-Optimem 1-Gemisch für weitere 15 min.

#### **2.3.3.2 Suspensionszellen**

Suspensionszellen wurden unter Verwendung von DMRIE-C (Invitrogen) durch die Ausbildung stabiler DNA-Liposomen-Komplexe transient transfiziert. In Sechsllochplatten erfolgte

die Inkubation von Plasmid DNA mit 3,5 µl DMRIE-C (in 500 µl Optimem 1) und 500 µl Optimem 1 für 30 min. Die Zellen wurden mit PBS (ohne Ca/Mg) und Optimem 1 gewaschen und in RPMI-Medium ohne Zusätze auf eine Konzentration von  $5 \cdot 10^5$  Zellen/500 µl eingestellt. Schließlich erfolgte die Zugabe von 500 µl Zellsuspension zu den DNA-Liposomen-Komplexen. 5 h pt wurden 500 µl RPMI-Vollmedium mit 30% FKS zugesetzt und die Zellen für weitere 43 h kultiviert. Diesem Medium wurden nach Bedarf die Immunsuppressiva CysA (Sigma) und Pred (Sigma) in einer Konzentration von 300 ng/ml aus einer 10 mg/ml (CysA) bzw. 20 mg/ml (Pred) DMSO-Stammlösung zugesetzt. Eine Stimulation der Zellen erfolgte 29 h pt durch die Zugabe von 2 µl TPA (10 ng/ml; Sigma) und 2 µl Iono (0,5 µM; Sigma) pro Sechslöchvertiefung.

#### **2.3.4 Aktivitätsbestimmung der reversen Transkriptase (RT)**

Die Bestimmung der RT-Aktivität im Zellkulturüberstand erfolgte mittels des C-type-RT™ Activity Assays (Cavidi Tech) unter Verwendung von Protokoll B. Grundlage des Assays ist der Einbau von im Reaktionsmix enthaltenen BrdUTP in einen DNA Strang, der nach Bindung der RT an ein immobilisiertes Template/Primer Konstrukt synthetisiert wird. Im Detektionsschritt erfolgt die Bindung von BrdUTP an spezifische, mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Antikörper, deren kolorimetrischer Nachweis proportional zur RT-Aktivität der Probe ist.

Zur Bestimmung der RT-Aktivität in Zellkulturüberständen wurden diese nach Pelletierung der Zellen (300 x g, 3 min, 4°C) steril filtriert (0,45 µm; Sartorius) und in Aliquots zu 100 µl bei -80°C bis zur Messung gelagert.

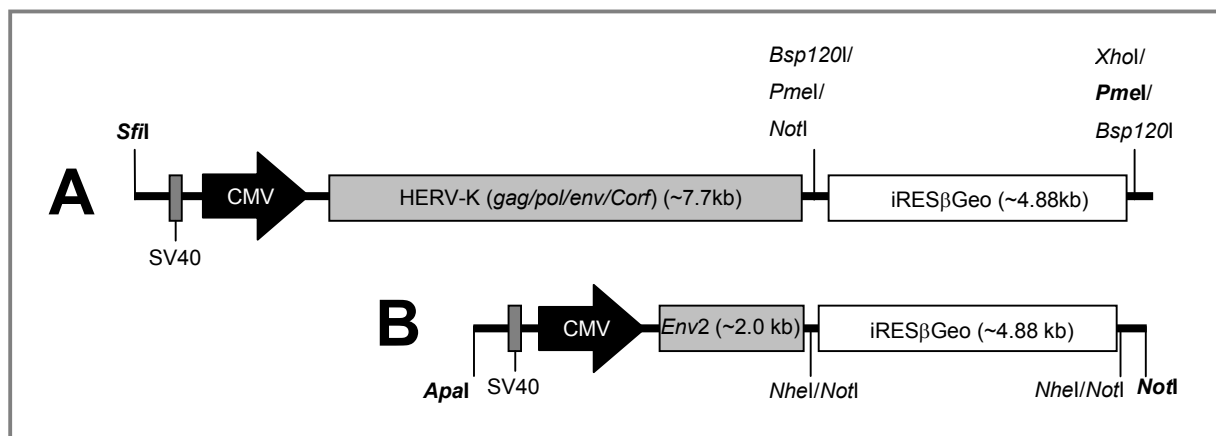
#### **2.3.5 Serielle Passagierung**

Die replikationskompetenten Moleklarklone 293-PERV-B(33)/ATG und 293-PERV-B(43) (Czuderna *et al.* 2000) wurden verwendet, um 293 Zellen zu transfizieren. Virushaltige Zellkulturüberstände wurden auf ihre RT-Aktivität untersucht (siehe 2.3.4) während die Expression von Virusproteinen mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen wurde (siehe 2.6.8). Überstände von produktiv infizierten Zellen wurden alle vier Wochen über einen Zeitraum von 12 Monaten auf frische 293 Zellen übertragen. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Isolierung genomischer DNA (siehe 2.5.1.1) und integrierte provirale LTRs wurden per PCR amplifiziert (siehe 2.5.3.1). Die serielle Passagierung wurde freundlicherweise von N. Fischer, Paul-Ehrlich-Institut, Langen, durchgeführt.

## 2.4 Transgene Methoden

### 2.4.1 Transgene Expressionsvektoren

Für die Herstellung HERV-K transgener Mäuse wurden zwei verschiedene Expressionsvektoren verwendet (Abb. 2-1). Der Expressionsvektor pCHERV-K (Abb. 2-1A) beinhaltet die komplette HERV-K Sequenz (Ono *et al.* 1986; Tönjes *et al.* 1997a, Tönjes *et al.* 1999) ohne die flankierenden LTRs und war mit einer stromabwärts lokalisierten iRES $\beta$ Geo-Box (Mountford *et al.* 1994) verbunden. Die Verwendung der iRES-Box erlaubte, dank ihrer Funktion als ribosomale Bindungsstelle (Mountford *et al.* 1994), die Fortsetzung der Transkription bis über die Sequenz des  $\beta$ Gal-Neomycin-Fusionsgens (Geo) hinaus. Reguliert wurden beide Genkassetten durch einen stromaufwärts lokalisierten SV40 ori-CMV-Intron A Promotor (Lu *et al.* 1998). Der Einsatz der SV40-ori ermöglichte die von der zellulären DNA unabhängige, vom CMV Promotor getriebene Replikation des Konstruktes. Sequenzen des Rinder Wachstumshormons (bGH) stellen ein Polyadenylierungssignal zur Verfügung (Lu *et al.* 1998). Die Elemente des Konstruktes wurden in den prokaryotischen Expressionsvektor pJW4303 (Lu *et al.* 1998) kloniert. Da prokaryotische Vektorsequenzen die Expression eukaryotischer Gene im transgenen Organismus hemmen können (Hogan *et al.* 1994), wurde der Vektor *Sfi*I (New England Biolabs) und *Pme*I (New England Biolabs) verdaut, so daß ein ~14,5 kb langes, linearisiertes Transgenfragment ohne prokaryotische Sequenzen entstand (Tönjes, unveröffentlicht).



**Abbildung 2-1: Aufbau der HERV-K Transgenkonstrukte.** Transgen HERV-K (A) beinhaltet die komplette HERV-K Sequenz mit den Genen gag, pol und env jedoch ohne flankierende LTRs (hellgraue Box), während Transgen Env2 lediglich die HERV-K env-Sequenz trägt (hellgraue Box). Stromabwärts der retroviralen Gene befindet sich eine iRES $\beta$ Geo-Kassette (weiße Box). Die Expression der Genkassetten erfolgt unter der Kontrolle eines SV40 ori-CMV-Intron A Promotors (dunkelgraue Box, schwarzer Pfeil). Restriktionsschnittstellen zur Herstellung der Konstrukte sind angegeben.

Der zweite Expressionsvektor, pEnv2 (Abb. 2-1B), beinhaltete anstelle des kompletten HERV-K Genoms lediglich die *env*-Sequenz (Tönjes *et al.* 1997b) inklusive des Rec-Corf Elementes (Löwer *et al.* 1995). Die Herstellung des ~9,4 kb langen, linearisierten Transgenfragmentes erfolgte durch Verdau mit *Apal* (New England Biolabs) und *NotI* (New England Biolabs). Die Klonierung der Konstrukte wurde freundlicherweise von R.R. Tönjes, Paul-Ehrlich-Institut, Langen, durchgeführt.

## 2.4.2 Herstellung transgener Mäuse

Die Herstellung transgener Mäuse wurde nach der Standardmethode der Mikroinjektion durchgeführt (Hogan *et al.* 1994). Dabei erfolgte die Mikroinjektion der DNA (siehe 2.4.1) direkt in den Pronukleus einer befruchteten Eizelle, die dann in eine empfängnisbereite Maus implantiert wurde. Diese Methode führt bei 10-40% der Nachkommen zu einer stabilen chromosomalen Integration der Fremd-DNA (Hogan *et al.* 1994). Resultierende transgene Gründer-Tiere wurden schließlich bis zur Homozygotie ingezüchtet. Die Herstellung transgener Mäuse wurde freundlicherweise von T. Rülcke, Zürich, durchgeführt.

## 2.4.3 Tierhaltung

Die Etablierung und Zucht der transgenen Mäuse erfolgte in Zürich und in Folge am Paul-Ehrlich-Institut in einer Barrierehaltung mit Personen- und Materialschleuse um die Kontamination mit Krankheitserregern zu vermeiden.

## 2.4.4 Entnahme von Geweben und Organen

Zur Isolierung genomischer DNA aus dem Gewebe der Mäuse (siehe 2.5.1.2) wurde unter Betäubung die Schwanzspitze abgetrennt und bis zur Verarbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach Tötung der Tiere erfolgte die Entnahme von Gehirn, Lunge, Leber, Milz und Niere sowie Hoden oder Ovarien. Bei einer adulten Maus wurde zusätzlich ein Mamma-Adenokarzinom entnommen. Für die Analyse der mRNA-Expression wurden die Organe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und direkt verarbeitet (siehe 2.5.1). Zur Anfertigung von Paraffinschnitten (siehe 2.6.7) wurden die Gewebe direkt in Formalin (Merck) überführt und bis zur Weiterverarbeitung fixiert.

## 2.5 Molekularbiologische Methoden

### 2.5.1 Isolierung von Nukleinsäuren

#### 2.5.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Zellen

Zellen zur Gewinnung von Kernextrakten wurden aus mittelgroßen (80 cm<sup>2</sup>), konfluent bewachsenen Zellkulturflaschen (Nunc) nach dreimaligem Waschen mit kaltem PBS (ohne Mg/Ca) in 10 ml kaltem PBS mit einem Zellschaber (Nunc) abgelöst. Nach Zentrifugation (500 x g, 10 min, 4°C) erfolgte die Lyse in 4 ml Lysispuffer (10 mM Tris/HCl [pH 7,6], 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5% NP40) durch vortexen für 10 sec. Nach erneuter Zentrifugation (1.600 x g 2 min, 4°C) wurden die pelletierten Zellkerne mit 500 µl Proteinase K-Puffer (10 mM Tris [pH 7,8], 0,5% SDS) und 2,5 µl Proteinase K (20 mg/ml; Boehringer Mannheim) resuspendiert und über Nacht verdaut. Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte über Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanolfällung.

#### 2.5.1.2 Isolierung genomischer DNA aus Geweben

Genomische DNA wurde aus Schwanzspitzen der transgenen Mäuse gewonnen (siehe 2.4.4). Diese wurden in 0,7 ml Hogan-Puffer (50 mM Tris/HCl [pH 8,0], 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5% SDS) mit 17,5 µl Proteinase K (20 mg/ml; Boehringer Mannheim) über Nacht verdaut. Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte wie unter 2.5.1.1 beschrieben.

#### 2.5.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

##### 2.5.1.3.1 *Minipräparation durch alkalische Lyse*

Aus Bakterien-Minikulturen erfolgte die Aufreinigung von Plasmiden mittels der alkalischen Lyse. Zellen aus einer 5 ml Übernachtskultur (TB-Medium) wurden pelletiert (16.000 x g, 30 sec) und in 100 µl kaltem GTE-Puffer (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl [pH 8,0], 10 mM EDTA) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lysis Puffer (200 mM NaOH, 1% SDS) wurden die Zellen 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl 3 M Natriumacetat zur Neutralisation wurden Zelltrümmer und chromosomale DNA pelletiert (16.000 x g, 5 min). Die Plasmid-DNA wurde aus dem Überstand durch Zugabe von zwei Volumen Ethanol (100%) 2 min auf Eis gefällt und pelletiert (16.000 x g, 5 min). Die Resuspension des Pellets erfolgte in 60 µl RNase A-haltigem (0,1 mg/ml; Boehringer Mannheim) TE-Puffer.

### **2.5.1.3.2 Midi- und Maxipräparation**

Die Präparation von Plasmid-DNA im größeren Maßstab erfolgte mit dem QIAfilter Plasmid Midi bzw. Maxi Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Zellen aus 50 ml bzw. 250 ml Übernachtskultur (LB-Medium) wurden pelletiert (6.000 x g, 15 min) und durch mitgelieferte Puffer lysiert. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Anionenaustauschersäulen. Die Verwendung des EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) gewährleistete die Entfernung bakterieller Endotoxine aus dem Präparationsansatz, da diese die Transfektion eukaryotischer Zellen inhibieren können.

### **2.5.1.4 Isolierung von RNA aus Geweben**

Die Extraktion totaler RNA aus tiefgefrorenem Gewebe der transgenen Mäuse (siehe 2.4.4) erfolgte mittels TRIzol-Reagenz (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Nach Homogenisierung der Gewebe im Phenol- und GTC-haltigen TRIzol-Reagenz wurden die Phasen durch Zugabe von Chloroform getrennt und die RNA mit Isopropanol präzipitiert. Die Reinheit der RNA wurde photometrisch überprüft (siehe 2.5.2), eine mögliche Degradation wurde durch Gelelektrophorese der glyoxylierten RNA (siehe 2.5.4) ausgeschlossen. Die RNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.5.1.5 Isolierung viraler RNA aus Zellkulturüberständen**

Die Isolierung viraler RNA aus 1 ml zellfreien, steril filtrierten ( $0,45\ \mu\text{m}$ ; Sartorius) Überständen infizierter Zellen erfolgte mit dem High Pure Viral RNA Kit (Roche Diagnostics) nach Angaben des Herstellers. Das Gesamtvolumen des Überstandes betrug 15 ml. Die RNA wurde bis zur Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## **2.5.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren beruht auf den unterschiedlichen Absorptionsmaxima von Nukleinsäuren (260 nm) und Proteinen (280 nm). Für reine DNA liegt der Quotient  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  zwischen 1,6 und 1,8, für reine RNA zwischen 1,8 und 2,0. Die Messung erfolgte am RNA/DNA Calculator (Pharmacia).

## 2.5.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

### 2.5.3.1 PCR

Spezifische DNA-Bereiche wurden mittels PCR unter Verwendung der rekombinanten, thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase AmpliTaq (PE Applied Biosystems) amplifiziert. Ein Standardansatz (20 µl) enthielt 1x PCR Puffer (10 mM Tris/HCl [pH 8,5], 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% Gelatine), je 4 µM Primer, 10 mM dNTPs, 100 ng DNA und 1,25 U Taq-Polymerase.

Allen PCR-Programmen ging eine initiale Denaturierung bei 94°C für 2 min voraus. Die Zyklen begannen ebenfalls mit einer Denaturierung (30 sec), sie unterschieden sich aber in Abhängigkeit vom Amplifikat und Primer hinsichtlich der Temperatur und Dauer der Primerbindung (Annealing) sowie der Dauer der Verlängerung (Elongation, bei 72°C). Der Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation wurde 25-35 mal wiederholt, ehe eine finale Elongation von 10 min die PCR abschloß.

PCRs wurden in den folgenden Thermocyclern durchgeführt: GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems), Mastercycler gradient (Eppendorf) und Progene (Techne).

### 2.5.3.2 RT-PCR

Um RNA per PCR zu amplifizieren, muß in einem ersten Schritt die Erststrangsynthese von cDNA erfolgen, welche in der nachfolgenden PCR-Reaktion als Template dient. Oligo (dT) gepimte cDNA wurde aus Total-RNA (siehe 2.5.1.4) durch Verwendung des SuperScript Preamplification System (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers gewonnen. Nach Synthese wurde die verbliebene RNA durch RNase H verdaut und 1/10 des cDNA Reaktionsvolumens in die PCR-Reaktion eingesetzt.

### 2.5.3.3 Quantitative PCR

Um die Kopienzahl einer bestimmten DNA-Sequenz zu quantifizieren, wurde eine Real-Time PCR unter Verwendung des LightCycler – FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche Diagnostics) durchgeführt. Wichtige Bestandteile des Kits sind eine FastStart Taq DNA Polymerase, die durch eine initiale Denaturierung von 10 min aktiviert werden muß, sowie der Farbstoff SYBR Green I, welcher sich an doppelsträngige DNA unter Fluoreszenzemission anlagert (Wittwer *et al.* 1997).

Ein 20 µl PCR-Ansatz enthielt 2 µl LightCycler – FastStart DNA Master SYBR Green I Mix, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, je 0,3 µM Primer sowie 2 µl (~200 ng) genomische DNA (siehe 2.5.1.1). Das PCR-Programm setzte sich aus 45 Zyklen (Denaturierung, Annealing und Elongation) zu-



sammen, wobei die Annealingtemperatur von den gewählten Primern abhing, die Elongationsdauer von der Größe des Produktes. Die PCR wurde mit einem LightCycler (Roche Diagnostics) durchgeführt, das Monitoring der SYBR Green I-Binding an das amplifizierte Produkt erfolgte nach jeder Elongation. Um das spezifische Amplifikat von unspezifischem Produkt zu unterscheiden, wurde abschließend eine Schmelzkurvenanalyse mit kontinuierlicher Fluoreszenzmessung bei stetiger Erhitzung bis zu 94°C durchgeführt.

Die absolute Quantifizierung des PCR-Produkts erfolgte mittels eines homologen externen Standards. Zu diesem Zweck wurde ein Analogon des zu quantifizierenden PCR-Produkts präpariert und die Konzentration photometrisch bestimmt (siehe 2.5.2). Unter Anwendung der Gleichung 2-1 erfolgte die Berechnung der Kopienzahl.

$$\frac{6 * 10^{23} [\text{Kopien / mol}] * \text{Konzentration}[\text{g} / \mu\text{l}]}{\text{MW}[\text{g} / \text{mol}]} = \text{Menge}[\text{Kopien} / \mu\text{l}]$$

MW = Molekulargewicht [g/mol]

$\text{MW}_{(\text{dsDNA})} = (\text{Anzahl bp}) * (660 \text{ Dalton/bp})$

1 mol =  $6 * 10^{23}$  Moleküle (= Kopien)

**Gleichung 2-1: Berechnung der DNA Kopienzahl anhand der Konzentration ( $OD_{260}$ ).**

Anhand der berechneten Kopienzahl wurde eine Standardreihe mit 10-fach Verdünnungen in  $\text{H}_2\text{O}$  hergestellt. Nach Beendigung der PCR wurde die Kopienzahl des zu detektierenden Moleküls durch das Auftragen der ermittelten Fluoreszenz gegenüber der Kopienzahl des Standards bestimmt. Der log-lineare Anteil der Amplifikation wurde durch die sog. "second derivate maximum method" bestimmt. Abschließend erfolgte ausgehend von der Standardkurve die Extrapolation der Konzentration des PCR-Produkts. Die Berechnung der PCR-Effizienz erfolgte mit Gleichung 2-2:

$$\text{Effizienz}(E) = 10^{-\frac{1}{\text{Steigung}}}$$

**Gleichung 2-2: Berechnung der PCR Effizienz.**

#### 2.5.3.4 Quantitative RT-PCR

Um die Kopienzahl einer bestimmten RNA-Sequenz zu quantifizieren, wurde eine Real-Time One-Step RT-PCR unter Verwendung des LightCycler – RNA Master SYBR Green I Kit (Roche Diagnostics) durchgeführt. Wichtiger Bestandteil des Kit ist neben dem SYBR Green I Farbstoff die Tth DNA Polymerase, welche RNA-abhängig eine RT-Aktivität und DNA-

abhängig eine Polymerase-Aktivität aufweist und somit die Kombination der RT und PCR in einem Ansatz ermöglicht.

Ein 20 µl PCR-Ansatz enthielt 2 µl LightCycler – RNA Master SYBR Green I Mix, 3 mM Mn(OAc)<sub>2</sub>, je 0,3 µM Primer sowie 2 µl Total-RNA (siehe 2.5.1.1). Das PCR-Programm setzte sich aus 50 Zyklen zusammen. Die Durchführung der PCR und die anschließende Quantifizierung erfolgte wie unter 2.5.3.3 beschrieben ( $MW_{[ssRNA]} = [\text{Anzahl bp}] \cdot [660 \text{ Dalton/bp}]$ ).

### 2.5.3.5 Verwendete Primer

Primer, die in der PCR eingesetzt wurden, sind in den Tabellen 2-1, 2-2 und 2-3 zusammengefaßt. Die Datenbank-Nummern sind unter 2.5.19 aufgelistet.

**Tabelle 2-1: Primer zur Isolierung von PERV LTRs und anderer Promotoren sowie zu deren Modifikation.** Rekombinant eingefügte Schnittstellen sind fett dargestellt, Stuffer kursiv. Überhänge (Banner) von bei der Fusions-PCR verwendeten Primer sind unterstrichen.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	nt-Position
5'-PERV-LTR I	TGAAAGGATGAAAATGCAACCTAAC	1-25 <sup>a</sup>
3'-PERV-LTR/PBS I	TTTCCCGGCCAACGCACCAAATGA	705-728 <sup>a</sup>
5'-PERV-LTR II	<i>CAGTGAGGTACCT</i> GAAAGGATGAAAATGCAACCTAAC	1-25 <sup>a</sup>
3'-PERV-LTR/PBS II	<i>CAGTGAAGATCT</i> TTTCCCGGCCAACGCACCAAATGA	705-728 <sup>a</sup>
5'-PERV-Zero	<u>AGATGCGGACCTCCGGAGCTT</u> GTGACGCACAGGCTTTGTTG	487-508 <sup>a</sup>
3'-PERV-Zero	<u>CAACAAAGCCTGTGCGTCACA</u> AGCTCCGGAGGTCCGCATCT	294-312 <sup>a</sup>
5'-PERV-Del II	<u>CGGAGCTATTTTAAAATGATTGG</u> TTTGTGACGCACAGGCTTTGTTG	469-508 <sup>a</sup>
3'-PERV-Del I	CGGACCTCCGGAGCTATTTTAA	299-320 <sup>a</sup>
3'-PERV-Del II	<u>CAACAAAGCCTGTGCGTCACA</u> ACCAATCATTTTAAAATAGCTCCG	469-508 <sup>a</sup>
5'-PERV-DelA	<i>CAGTGAGGTACC</i> GGACCTCCGGAGCTATTTTA	299-319 <sup>a</sup>
5'-PERV-DelB	<i>CAGTGAGGTACCT</i> TTGTGACGCACAGGCTTTGT	497-506 <sup>a</sup>
5'-PERV-DelE	<i>CAGTGAGGTACC</i> GCCGAGTCTCTACCC	546-562 <sup>a</sup>
3'-PERV-DelC	<i>CAGTGAAGATCT</i> TGCAAACAGCAAGAGGATT	605-624 <sup>a</sup>
3'-PERV-DelD	<i>CAGTGAAGATCT</i> CCCGAGTGCGGAATCGG	529-555 <sup>a</sup>
5'-PERV-DelFus I	<u>AAATGATTGGTTTGTGACGC</u> GCCGAGTCTCTACCC	476-495 <sup>a</sup>
3'-PERV-DelFus I	<u>GGGTAGAGGACTGCGGC</u> GCGTCACAAACCAATCATTT	476-495 <sup>a</sup>
5'-PERV-DelFus II	<u>CCGATTCCGCACTCGGG</u> TCAAGACCGCTTCTCGTGA	625-643 <sup>a</sup>
3'-PERV-DelFus II	<u>TCACGAGAAGCGGTCTTG</u> ACCCGAGTGCGGAATCGG	625-643 <sup>a</sup>
5'-Rep-Kpn	<i>CAGTGAGGTACC</i> AGATGCGGACCTCCGGAGC	293-312 <sup>a</sup>
3'-Rep-Kpn	<i>CAGTGAGGTACCA</i> ACAAAGCCTGTGCGTCACAA	487-508 <sup>a</sup>
5'-Rep-BamH	<i>CAGTCGGGATCCC</i> GAGATGCGGACCTCCGGAGC	291-312 <sup>a</sup>
3'-Rep-Bgl	<i>CAGTGAAGATCT</i> TCAACAAAGCCTGTGCGTCACAA	487-508 <sup>a</sup>
5'-Rep-Mult	GATGCGGACCTCGGATCCTATT	295-306 <sup>a</sup>
3'-Rep-Mult	AAAGCCTGTGGATCCCAAACCA	483-504 <sup>a</sup>
5'-PERV-C-LTR	<i>CAGTGAGGTACCT</i> GAAAGGATGAAAATACAACCTAAGC	1-26 <sup>b</sup>
3'-PERV-C-LTR	<i>CAGTGAAGATCT</i> CCCGGACGAGCCCCCAAATGTAA	607-630 <sup>b</sup>

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	nt-Position
5'-RSV-LTR	CAGTGAGGTACCGGTACCCAGCTTGGAGGTGCACA	457-479 <sup>c</sup>
3'-RSV-LTR	CAGTGAAGATCTGTTTGACAGCTTATCATCGCAGATCC	1054-1080 <sup>c</sup>
5'-MMTV-LTR	CAGTGAGGTACCAAGCTTGGGCAGAAATGGTT	91-110 <sup>d</sup>
3'-MMTV-LTR	CAGTGAGGTACGGTCCCTATGGTGAGTCC	1524-1241 <sup>d</sup>
5'-CMV	CAGTGAGGTACCTCAATATTGGCCATTAGC	7-24 <sup>e</sup>
3'-CMV	CAGTGAGGTACCCACTGACTGCGTTAGCAATT	784-803 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> nt-Position bezieht sich auf die Datenbank-Nummer AJ133816

<sup>b</sup> nt-Position bezieht sich auf die Datenbank-Nummer AF038600

<sup>c</sup> nt-Position bezieht sich auf die Sequenz von pREP4 (Invitrogen)

<sup>d</sup> nt-Position bezieht sich auf die Sequenz von pMAMneo (Clontech)

<sup>e</sup> nt-Position bezieht sich auf die Sequenz von pRL-CMV (Promega)

**Tabelle 2-2: Primer zur Durchführung der quantitativen PCR.**

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	nt-Position
5'-PK-1	TTGACTTGGCAGTGGGACGGGTAAC	2927-2949 <sup>a</sup>
3'-PK-6	GAGGGTCACCTGAGGGTGTGGAT	3716-3739 <sup>a</sup>
5'-PERV-F	TCTCCCAAGTAAAGCCTGAT	195-214 <sup>a</sup>
3'-PERV-R	ACTAGGATGCCCTGTTGGATTA	400-421 <sup>a</sup>
5'-PBGD-F1	TGAAGGCTGGCTGCTCATAC	5689-5708 <sup>b</sup>
3'-PBGD-R	GTTTTCTGCCACCAGTCAACA	5934-5954 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> nt-Position bezieht sich auf die Datenbank-Nummer AJ133816

<sup>b</sup> nt-Position bezieht sich auf die Datenbank-Nummer M95623

**Tabelle 2-3: Primer zur Durchführung von RT-PCRs zum Nachweis der Genexpression in transgenen Mäusen.**

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	nt-Position
5'-HERV-SD	TCGAGCGTAATCATTGAGGACAAGTCGA	1013-1040 <sup>a</sup>
3'-HERV-gag	GAGCCATTACCGGCTCTGCTACATATTCG	1507-1535 <sup>a</sup>
3'-HERV-Corf	TTTCGACAAAACCGCCATCGTCATCATGGCCCG	8164-8197 <sup>a</sup>
5'-GAPDH-Ex II	GACCCTAAAGAAATCCCCTG	7875-7894 <sup>b</sup>
3'-GAPDH-Ex II	TGTGTAAGCAAGGATGCCAG	9282-9301 <sup>b</sup>
5'-GAPDH-Int II	AGATGACGGCCATCCTCCA	8169-8187 <sup>b</sup>
3'-GAPDH-Int II	AACGGCCATAGCATGCCAG	8496-8514 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> nt-Position bezieht sich auf die Datenbank-Nummer M14123

<sup>b</sup> nt-Position bezieht sich auf die Datenbank-Nummer UO9964

## 2.5.4 Agarosegelelektrophorese

DNA Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Agarose (Invitrogen) wurde dazu in 1 x TAE Puffer (40 mM Tris/Acetate [pH 8,0], 1 M EDTA) aufgekocht und mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid (Roth) versetzt. Bei kleinen Fragmenten (~ 500 bp) wurde 1 x TBE

Puffer (5 x TBE: 54 g Tris Base, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA ad 1 l H<sub>2</sub>O) verwendet. Für die Auftrennung von RNA wurde die Agarose in NaPO<sub>4</sub>-Puffer aufgekocht. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen Gelbeladungspuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 30% Glycerin) vermischt und aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in Abhängigkeit der Fragmentgröße bei 5-12 V/cm über einen Zeitraum von 1-20 h in 0,7-1,5%igen Agarosegelelen. Als Größenstandards wurden Lambda DNA *Hind*III Digest (Biolabs), One kb DNA Ladder (Invitrogen) oder SmartLadder (Eurogentec) verwendet.

Vor der Elektrophorese von RNA wurde diese zunächst glyoxyliert. Zu diesem Zweck wurden 20 µg Total-RNA in 8 µl DMSO-Mix (1750 µl DMSO, 70 µl 0,5 M NaPO<sub>4</sub> [pH 7,0], 35 µl 20% SDS, 150 µl H<sub>2</sub>O) mit 1,25 µl Glyoxal (Serva) 30-60 min bei 50°C inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl Bromphenolblau erfolgte die Elektrophorese in NaPO<sub>4</sub>-Puffer (10 mM [pH 6,8]) aufgekochter Agarose bei kontinuierlicher Umwälzung des NaPO<sub>4</sub>-Puffers. Als Größenstandard wurde die 0.24-9.5 Kb RNA Ladder (Invitrogen) verwendet. Um die Qualität der RNA zu untersuchen (Vergleich der 18s/28s RNA-Banden) wurden die Gele zunächst in NaOH (50 mM) für 15 min inkubiert und anschließend in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,1 M Tris [pH 7,4], 0,1 M NaCl, 1% Ethidiumbromid) gefärbt.

### **2.5.5 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen**

DNA-Fragmente wurden mit dem Jetsorb Gel Extraction Kit (Genomed) aus Agarosegelen rückgewonnen. Die DNA wird hierbei nach chemischer Zersetzung des Agarosegels an eine Matrix gebunden, von der sie mit H<sub>2</sub>O eluiert werden kann. Nach der Extraktion der DNA wurde deren Konzentration photometrisch bestimmt (siehe 2.5.2).

### **2.5.6 Auffüllen von überhängenden Restriktionsschnittstellen**

Um nicht kompatible Restriktionsschnittstellen klonieren zu können, mußten deren Überhänge aufgefüllt werden. Dies erfolgte unter Verwendung von 2 U des Klenow-Fragmentes, der großen Untereinheit der DNA-Polymerase I (New England Biolabs), sowie 0,2 mM der dNTPs bei 37°C für 30 min. Nach Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanolpräzipitation wurde die DNA in die Ligationsansätze (siehe 2.5.8) eingesetzt.

### **2.5.7 Dephosphorylierung von DNA**

Die Religation linearisierter Vektoren wurde durch eine Dephosphorylierung unter Verwendung von 0,5 U CIP (20 min, 37°C; Pharmacia) sowie 1 U BAP (20 min, 50°C; Pharmacia) verhindert. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA erfolgte eine

Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanolpräzipitation, danach stand der Vektor für die Ligation (siehe 2.5.8) zur Verfügung.

### **2.5.8 Ligation**

Die Verknüpfung von Vektor und Insert erfolgte unter Verwendung der T4-DNA-Ligase (Invitrogen). Dabei wurden 10-50 ng Vektor-DNA mit 4 µl 5 x Ligase-Puffer, 1 µl T4-DNA-Ligase (4,5 Weiss Einheiten) und der äquimolaren Menge Insert-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei 4°C über Nacht inkubiert.

### **2.5.9 T/A-Klonierung von PCR-Amplifikaten**

Die bei der PCR verwendete Taq-DNA-Polymerase (siehe 2.5.3.1) erzeugt Template-unabhängig einen Desoxyadenosin-Überhang am 3'-Ende des Amplifikates. Dieser kann mit Vektoren, die über einen Desoxythymidin-Überhang verfügen, direkt verknüpft werden. PCR-Produkte wurden auf diese Weise in den Vektor pGEM-T-Easy (Promega), wie unter 2.5.8 beschrieben, inkloniert.

### **2.5.10 Herstellung kompetenter Zellen**

Die Transformation von Bakterien ist nur möglich, wenn diese dafür kompetent sind. Um Kompetenz zu erlangen, wurden 100 ml Kulturen der Bakterienstämme DH5α und DH10β bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,55 kultiviert. Nach Inkubation auf Eis (5 min) wurden die Zellen pelletiert (3.700 x g, 10 min, 4°C) und in 40 ml Lösung TFB1 [30 mM KAc, 100 mM RbCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>\*2 H<sub>2</sub>O, 50 mM MnCl<sub>2</sub>\*4 H<sub>2</sub>O, 15% Glycerin (v/v), pH 5,8] resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Pelletieren erfolgte die Aufnahme in 4 ml Lösung TFB2 [10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 15% Glycerin (v/v), pH 6,5] und eine weitere Inkubation auf Eis (15 min). Im Anschluß wurden 100 µl Aliquots auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### **2.5.11 Transformation von Bakterien**

Kompetente Bakterien (siehe 2.5.10) wurden aufgetaut und mit 1-10 ng Plasmid-DNA oder 4 µl eines Ligationsansatzes (siehe 2.5.8) für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (45 sec, 42°C) wurden die Zellen für 1 h in SOC-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,05% NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Glucose, pH 7,0) bei 37°C im Schütt-

ler regeneriert, auf Selektivnährböden ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

### **2.5.12 DNA-Sequenzierung**

Sequenzierungen wurden unter Verwendung der automatischen DNA-Sequenzier Modelle 373 bzw. 377 (Applied Biosystems) dankenswerterweise von M. Selbert, Paul-Ehrlich-Institut, Langen, durchgeführt. Die Auswertung und Bearbeitung der Sequenzen erfolgte mit den Programmen Sequence-Navigator (ABI), DNAsis (Hitachi) und MacVector™ 6.5 (Oxford Molecular). Datenbankabgleiche wurden via Internet mit dem Programm BLASTN (NCBI, Washington) vorgenommen. Die Analyse putativer Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren erfolgte mit dem Programm MatInspector (Genomatix).

### **2.5.13 Hybridisierung einzelsträngiger Oligonukleotide**

Die Hybridisierung zweier komplementärer einzelsträngiger Oligonukleotide wurden je 200 µg jedes ss-Oligonukleotids in 1 x Annealing Puffer (5 x Annealing Puffer: 0,5 M NaHCO<sub>3</sub>, 1,65 M NaCl, 1 mM EDTA) bei 100°C für 2 min denaturiert. Nach Zugabe von 200 µl H<sub>2</sub>O erfolgte die Trennung verbliebener ss-Oligonukleotide von hybridisierten ds-Oligonukleotiden mittels ELUTIPd Säulen (Schleicher & Schuell) nach Angaben des Herstellers. Nach einer Ethanolpräzipitation erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung (siehe 2.5.2).

### **2.5.14 Radioaktive Markierung von DNA und RNA**

#### **2.5.14.1 Random Prime Labelling**

Das radioaktive Random Prime Labelling von Nukleinsäure-Fragmenten erfolgte mit dem Megaprime DNA Labelling System (Amersham Pharmacia Biotech). Das Labelling erfolgte mit 5-50 ng DNA, 5 µl eines randomisierten Hexanukleotidgemisches und 5 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (3.000 Ci/mmol; Amersham Pharmacia Biotech) nach Angaben des Herstellers. Nach Beendigung der Reaktion (Zugabe von 50 µl EDTA) wurden nicht inkorporierte Radionukleotide über Sephadex G50 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) fraktioniert. Die spezifische Aktivität der einzelnen Fraktionen wurde im Szintillationszähler per Cerenkov-Messung (Einheit: counts per minute [cpm]) bestimmt.

#### 2.5.14.2 End Prime Labelling

Die radioaktive Markierung von Oligonukleotiden am 5'-Ende erfolgte mit einer T4 Polynucleotid Kinase (Promega). Zu diesem Zweck wurden 3,5 pmol eines ds-Oligonukleotides (siehe 2.5.13) mit 1  $\mu$ l T4 Polynucleotid Kinase, 1  $\mu$ l T4 Puffer und 1  $\mu$ l [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (3.000 Ci/mmol; Amersham Pharmacia Biotech) bei 37°C 10 min inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 1  $\mu$ l EDTA erfolgte die Fraktionierung und Messung der Aktivität wie unter 2.5.14.1 beschrieben.

#### 2.5.15 Southern Blotting

Mittels eines Southern Blot erfolgte der Transfer von DNA Banden aus einem Agarosegel (siehe 2.5.4) durch einen Kapillarstrom auf eine Nitrocellulose- oder Nylonmembran. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele für 30 min denaturiert (Denaturierungslösung: 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und anschließend 10 min in 0,25 N HCl depuriniert, ehe eine zweimalige Inkubation für 15 min in Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl [pH 7,5]) folgte. Der Transfer auf die Porablot NY Amp Nylon Membran (Macherey-Nagel) erfolgte in 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat [pH 7,0]) über Nacht. Der Blot wurde nach Sambrook *et al.* (1989) aufgebaut. Nach Transfer wurde die DNA durch UV-Bestrahlung (UV Stratalinker; Stratagene) kovalent an die Membran gebunden.

#### 2.5.16 Northern Blotting

Der Transfer von RNA Banden aus einem Agarosegel (siehe 2.5.4) auf die Porablot NY Amp Nylon Membran (Macherey-Nagel) und die UV-Vernetzung erfolgte wie unter 2.5.15 beschrieben, jedoch wurde keine Depurinierung durchgeführt.

#### 2.5.17 Hybridisierung

Blot-Membranen wurden zur Unterdrückung unspezifischer Bindungen für 1 h in Hybridisierungslösung (5 x Denhardt, 6 x SSC, 0,5% SDS, 50  $\mu$ g/ml Hefe tRNA [Invitrogen]) bei 65°C in Rollbehältern aus Glas im Rollofen präinkubiert. Für die Hybridisierung wurden 10<sup>6</sup> cpm/ml der frisch Hitze-denaturierten Sonden in frischer Hybridisierungslösung über Nacht auf die präinkubierte Membran gegeben. Im Anschluß wurde einmal mit Waschpuffer I (2 x SSC, 0,1% SDS) bei Raumtemperatur für 30 min gewaschen, zweimal mit dem selben Puffer bei 65°C für 30 min und einmal mit Waschpuffer II (0,2 x SSC, 0,1% SDS) bei 65°C für 30 min, um die Stringenz zu erhöhen.

Nach den Waschschriften wurden die Membranen in Folie eingeschweißt und die Hybridisierungssignale durch Autoradiographie bei  $-80^{\circ}\text{C}$  unter Verwendung von Verstärkerfolien detektiert.

#### 2.5.17.1 Hybridisierungssonden

Zum Nachweis von PERV LTRs im Genom des Schweines oder in PERV infizierten humanen Zellen wurde eine 209 bp lange Sonde verwendet, die in der U5 Region der LTR hybridisiert (nt 489-675, Datenbank-Nummer AJ 133816; Czauderna *et al.* 2000).

Der Nachweis einer HERV-K-Expression in den transgenen Mäusen erfolgte mit Hilfe der 0,5 kb langen *env*-Sonde envBX0.5 (nt 7251-7755, Datenbank-Nummer M14123; Tönjes *et al.* 1997b), welche durch einen *Bam*HI (New England Biolabs) und *Xho*I (New England Biolabs) Verdau aus dem Plasmid pcK30 (Löwer *et al.* 1995) generiert wurde.

#### 2.5.18 Ribonuclease Protection Assay (RPA)

Der RPA stellt eine hochsensitive Methode zur Detektion auch geringer Mengen von mRNA dar. Grundlage des Assays ist die Hybridisierung einer radioaktiv markierten RNA-Sonde an den komplementären, zu detektierenden RNA-Abschnitt. Auf diese Weise hybridisierte RNA ist resistent gegenüber einer Ribonukleaseverdau, durch den die nicht-hybridisierte Sonde degradiert wird.

Die Generierung der RNA Sonde erfolgte durch Klonierung der Sonde envBX0.5 in pBS (Stratagene, Tönjes *et al.* 1997b). Nach Verdau mit *Xho*I wurde unter der Kontrolle des T7 Promotors ein antisense RNA Transkript generiert, nach Verdau mit *Bam*HI unter Kontrolle des T3 Promotors ein sense Transkript, das als Negativkontrolle verwendet wurde. Als Positivkontrolle diente pTRI-Actin der Maus (AMS Biotechnology). Die Transkription und das gleichzeitige Random Prime Labelling erfolgte unter Verwendung des MAXIscript Systems (AMS Biotechnology) mit  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  UTP (800 Ci/mmol; Amersham Pharmacia Biotech).

Der RPA wurde mit dem RPA III Kit (AMS Biotechnology) mit  $2\text{-}8 \cdot 10^4$  cpm/ml gelabelter Sonde und der Total-RNA der transgenen Mäuse (siehe 2.5.14) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach dem Verdau mit einem RNase A/RNase T1-Mix wurden die Proben auf einem Polyacrylamidgel aufgetragen und per Autoradiographie visualisiert. Als Größenstandard wurde eine  $^{32}\text{P}$ -Sequenzierungsreaktion nach Maxam-Giebert (Sambrook *et al.* 1989) der Sonde envBX0.5 verwendet.



### 2.5.19 Datenbank-Nummern

AF038600	PERV-MSL cDNA (Akiyoshi <i>et al.</i> 1998)
AJ133816	293-PERV-B(33) Molekularklon (Czauderna <i>et al.</i> 2000)
AJ133817	293-PERV-A(42) Molekularklon (Czauderna <i>et al.</i> 2000)
AJ133818	293-PERV-B(43) Molekularklon (Czauderna <i>et al.</i> 2000)
AJ293656	PK15-PERV-A(58) Molekularklon (Krach <i>et al.</i> 2001)
AJ298073	293-PERV-B(43)-746 LTR (Scheef <i>et al.</i> 2001)
AJ298074	293-PERV-B(43)-590 LTR (Scheef <i>et al.</i> 2001)
AJ298075	PERV-C LTR (Scheef <i>et al.</i> 2001)
M14123	HERV-K Provirus (Ono <i>et al.</i> 1986)
M95623	humane PBGD (Yoo <i>et al.</i> 1993)
UO9964	murine GAPDH (Welch <i>et al.</i> 1995)

## 2.6 Proteinchemische Methoden

### 2.6.1 Isolierung von Zellkernproteinen

Die Isolierung von Zellkernproteinen erfolgte nach Schreiber *et al.* (1985). Adhärente Zellen wurden aus mittelgroßen (80 cm<sup>2</sup>), konfluent bewachsenen Zellkulturflaschen nach dreimaligem Waschen mit kaltem PBS (ohne Mg/Ca) in 10 ml kaltem PBS mit einem Zellschaber abgelöst und pelletiert (200 x g, 3 min, 4°C). Suspensionszellen wurden dreimal mit PBS (ohne Mg/Ca) gewaschen und pelletiert (200 x g, 3 min, 4°C).

Pelletierte Zellen wurden in 150 µl Puffer A (10 mM HEPES [pH 7,9], 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF) durch pipettieren resuspendiert und in 350 µl Puffer A überführt, wo sie auf Eis für 15 min inkubierten. Die gequollenen Zellen wurden mehrfach durch eine 0,45 x 10 mm Kanüle (HSW) gepreßt und dabei aufgeschlossen. Nach zweimaligem Waschen in 500 µl Puffer A erfolgte nach Pelletierung der Kerne (6.000 x g, 5 min, 4°C) die Aufnahme in 50 µl Puffer C (20 mM HEPES [pH 7,9], 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) mit anschließender Inkubation (15 min, 4°C) auf einem Tischschüttler. Nach einer abschließenden Pelletierung (16.000 x g, 4°C, 10 min) wurden die Kernproteine zu 10 µl aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.6.2 Isolierung von Proteinen aus Geweben und Zellen

In flüssigem Stickstoff schockgefrorenes Gewebe (siehe 2.4.4) wurde in kaltem PBS (ohne Mg/Ca) homogenisiert und pelletiert (1.200 x g, 3 min, 4°C). Nach einmaligem Waschen des Pellets mit kaltem PBS (ohne Mg/Ca) erfolgte die Zugabe von 1 ml Lysispuffer (20 mM TRIS

[pH7,4], 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP40) dem Protease-Inhibitoren zugesetzt waren (100 mM PMSF, 1 mg/ml Aprotinin, 1 mg/ml Leupeptin, 1 mg/ml Pepstatin A). Während der Lysierung (1h auf Eis) wurde die DNA geschert. Abschließend wurden die Proben pelletiert (16.000 x g, 7 min, 4°C) und der Überstand bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Zur Gewinnung von Proteinen aus Zellen wurden diese aus mittelgroßen (80 cm<sup>2</sup>), konfluent bewachsenen Zellkulturflaschen nach dreimaligem Waschen mit kaltem PBS (ohne Mg/Ca) in 10 ml kaltem PBS mit einem Zellschaber abgelöst. Nach Zentrifugation (500 x g, 10 min, 4°C) erfolgte die Lyse wie zuvor beschrieben.

### 2.6.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Der Proteingehalt einer Probe wurde mittels Bio-Rad-Proteinassay (BioRad Laboratories) bestimmt. Dabei werden 10 µl der Probe mit 490 µl Bradford-Reagenz vermischt. Nach Inkubation (20 min) wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt und der Proteingehalt bezogen auf ein externes Protein mittels Eichkurve ermittelt.

### 2.6.4 Proteingelelektrophorese

Proteinlösungen wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Eingesetzt wurden diskontinuierliche Gele, die sich aus einem niederprozentigem Sammelgel und einem höherprozentigem Trenngel zusammensetzten. Die Sammelgele (5%) enthielten neben entsprechend verdünnter Acrylamidlösung (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid; Roth) 25% (v/v) Lösung C (0,5 M TRIS/HCl [pH 6,8], 0,4% SDS). Je nach Größe der zu trennenden Proteine wurden 10%ige bis 15%ige Trenngele verwendet. Sie enthielten neben der Acrylamidlösung 25% (v/v) Lösung B (1,5 M TRIS/HCl [pH 8,8], 0,4% SDS). Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0,1% APS (Gibco) und 0,05% TEMED (Serva) eingeleitet.

Die Proben wurden in 1x Probenpuffer (4x Probenpuffer: 0,25 M TRIS/HCl [pH 6,8], 4% SDS, 10% MercaptoEthanol, 20% Glycerin, 20 mg/l Bromphenolblau) aufgenommen und 5 min bei 90°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte in 1 x Elektrophorese-Laufpuffer (4x Elektrophorese-Laufpuffer: 0,1 M TRIS/HCl [pH 8,3], 0,77 M Glycin, 0,4% SDS) über 1,5 h bei 30 mA/Gel in der Gelkammer Mighty small II SE 250 (Hoefer Scientific Instruments).

Zur Anfärbung der Gele wurde Coomassie Brilliant Blue verwendet. Die Gele wurden hierzu je 1 h in Lösung I (25% Isopropanol, 10% Essigsäure, 30 mg/l Coomassie G 250), Lösung II (10% Isopropanol, 10% Essigsäure, 30 mg/l Coomassie G 250) und Lösung III (10% Essig-

säure, 30 mg/l Coomassie G 250) gefärbt. Überschüssiges Färbemittel wurde mit Wasser ausgewaschen.

### **2.6.5 Immuno Blotting (Western Blotting)**

Die Übertragung von in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen (siehe 2.6.4) auf eine Membran erfolgte im Immuno Blot-Verfahren. Die Gele wurden hierzu auf Filterpapier (Whatmann-3MM) überführt und mit einer in Methanol präinkubierten PVDF-Membran (Immobilon-P; Millipore) und einer weiteren Lage Filterpapier in eine Kunststoffkassette eingespannt. Der Blot wurde in Blotting Puffer (25 mM TRIS/HCl [pH 8,3], 192 mM Glycin, 20% MEthanol) bei 300 mA über 3 h oder 70 mA über Nacht unter Kühlung in der Blotting Apparatur KMO2 electronic (Janke & Kunkel) durchgeführt.

Unspezifische Bindungsstellen wurden nach dem Blotten durch Inkubation der Membranen in 1% Tween 20 (in PBS ohne Mg/Ca) für 30 min und anschließender Inkubation in Blocking Puffer (10% FKS, 1% BSA, 0,1% Triton X-100 in PBS ohne Mg/Ca) für 1 h abgesättigt. Im Anschluß wurden die Blots mit dem Primärantikörper  $\alpha$ -HERV-K Gag ( $\alpha$ -Gag) (Boller *et al.* 1997) (1:1.000 in Blocking Puffer) für 1 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach drei 5-minütigen Waschschrritten mit 0,1% Triton X-100 (in PBS ohne Mg/Ca) erfolgte die Inkubation mit Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekoppeltem G-Protein (BioRad) (1:10.000 in 0,1% Triton X-100 [in PBS ohne Mg/Ca]). Nach drei weiteren Waschschrritten erfolgte der Nachweis der Proteine mit dem ECL-System (siehe 2.6.6).

### **2.6.6 Enhanced chemiluminescence (ECL)-Verfahren**

Die ECL-Reaktion wurde mit dem ECL Detection Reagent Kit (Amersham Pharmacia Biotech) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase setzt bei der Spaltung des Substrates (ECL Solution 1 und 2 im Verhältnis 1:1) Energie in Form von Chemilumineszenz frei, deren Detektion mit Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech) erfolgte.

### **2.6.7 Schnitte von Geweben und Zellen**

Formalin-fixierte Gewebe (siehe 2.4.4) wurden in Paraffin eingebettet, GH-Zellen (freundlicherweise von K. Boller, Langen, zur Verfügung gestellt) in 3% Agarose. Anschließend erfolgte die Herstellung von Ultradünnschnitten von 3  $\mu$ m Stärke (freundlicherweise von I. Schildger, Paul-Ehrlich-Institut, Langen, durchgeführt).

## 2.6.8 Indirekte Immunfluoreszenzanalysen

Zellen aus der seriellen Passagierung (siehe 2.3.5) wurden auf Objektträgern kultiviert und, sobald sie konfluent gewachsen waren, für 15-45 min mit 2% (w/v) Formaldehyd (in PBS ohne Mg/Ca) fixiert und dreimal mit PBS (ohne Mg/Ca) gewaschen, ehe eine Permeabilisierung der Zellen mit 0,5% Triton X-100 (in PBS ohne Mg/Ca) erfolgte. Ebenso wie auf Objektträgern fixierte Paraffinschnitte (siehe 2.6.7) wurden die Zellen dreimal mit PBS (ohne Mg/Ca) gewaschen, ehe unspezifische Bindungsstellen mit 1% BSA (in PBS ohne Mg/Ca) abgesättigt wurden. Die Zugabe von Antiserum oder Präimmunserum erfolgte in einer 1:500 Verdünnung (in PBS Dulbecco), die Inkubationszeit betrug 1 h. Für den Nachweis der PERV-Expression in infizierten Zellen wurde der PERV Gag p10 Antikörper (Krach *et al.* 2000) verwendet, der Nachweis der HERV-K Expression in den transgenen Mäusen erfolgte mit den Antikörpern  $\alpha$ -Gag und  $\alpha$ -HERV-K Corf ( $\alpha$ -Corf) (Löwer *et al.* 1995).

Nach drei Waschschritten mit PBS Dulbecco wurden die Proben mit 1:1000 in PBS Dulbecco verdünntem Indokarbocyanin-gekoppelten (Cy3; Dianova) Sekundärantikörper für 1 h im dunkeln inkubiert. Abschließend erfolgte die Eindeckung der Zellen mit Mowiol (20 g Mowiol 4.88 [Hoechst] in 80 ml PBS, 40 ml Glycerin).

Die indirekten Immunfluoreszenzanalysen wurden in einem Fluoreszenzmikroskop (Axio-phot; Zeiss) oder in einem Laserscan Mikroskop (Axiovert 10; Zeiss, Laser MRC 600; Bio-Rad) betrachtet und digitalisiert aufgenommen.

## 2.6.9 Histologische Färbung

Eine klassische Hämalaun/Eosin-Färbung wurde angewandt, um durch Kontrastierung des Zytoplasmas gegen die Zellkerne eine strukturelle Kontrolle der geschnittenen Zellen und Gewebe zu erlauben. Die Färbung wurde freundlicherweise von I. Schildger, Paul-Ehrlich-Institut, Langen, durchgeführt.

## 2.6.10 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Der EMSA stellt eine Möglichkeit dar, die Bindung von Proteinen an DNA zu belegen. Zu diesem Zweck werden kurze Oligonukleotide radioaktiv markiert und mit dem zu untersuchenden Proteinmix inkubiert. Nach Proteinbindung zeichnet sich das Oligonukleotid durch einen stark verzögerten Lauf in einem Acrylamidgel aus, es kommt zur Ausbildung spezifischer Bandenmuster (Dent *et al.* 1999).

### 2.6.10.1 Verwendete Oligonukleotide

Zum Nachweis der Transkriptionsfaktor Bindung an Elemente der PERV LTR wurde das Oligonukleotid NF-Y+ (5'-AAATGATTGGTCCAC-3', nt 319-334, nt-Position bezieht sich auf die Datenbank-Nummer AJ 133816) verwendet, das eine putative Bindungsstelle für das Protein Nucleus Factor (Y) (NF-Y, auch CBF [CCAAT-Binding Factor]; Maity & de Crombrugge 1998) enthält (Kern-Bindungsstelle fett, Matrix-Bindungsstelle unterstrichen). Als Kontrolle wurde das CBF-Konsensus Oligonukleotid (5'-AGACCGTACGTGATTGGTTAATCTCTT-3'; Santa Cruz Biotechnology) verwendet, Versuche zur nicht-kompetitiven Hemmung wurden mit dem AP1-Konsensus Oligonukleotid (5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3'; Promega), das die Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor AP1 beinhaltet, durchgeführt.

### 2.6.10.2 Protein-DNA-Bindung

Der EMSA wurde unter Verwendung von 5%igen Acrylamidgelen durchgeführt. Diese enthielten 7 ml Acrylamidlösung (37,5% Acrylamid, 1% Bisacrylamid; Roth) und 5 ml TBE in 28 ml H<sub>2</sub>O. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 200 µl APS und 20 µl TEMED eingeleitet.

Zur Durchführung des EMSA wurden 5 µg Zellkernproteine (siehe 2.6.1) mit 2 µg poly(dI-dC) (Roche Diagnostics) als unspezifischem Kompetitor und 1 µg BSA in 4 µl EMSA-Puffer 5 x (50 mM TRIS [pH 7,5], 150 mM KCl, 20% Ficoll, 5 mM EDTA, 2,5 mM DTT) mit H<sub>2</sub>O auf Eis für 40 min inkubiert. 50.000 cpm <sup>32</sup>P-Random Prime gelabeltes Oligonukleotid (siehe 2.5.14.1) wurden in ein Endvolumen von 20 µl zugegeben und für weitere 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl Gelpuffer (250 mM TRIS [pH 7,5], 0,2% Bromphenolblau, 40% Glycerol) in die Negativkontrolle wurden die Proben auf ein Acrylamidgel geladen. Die Auftrennung der Proben erfolgte mittels Elektrophorese in einer vertikalen Gelkammer Modell V15•17 (Invitrogen) bei 100 V für 3-4 h in 0,5 x TBE Puffer. Nach der Elektrophorese wurden die Gele unter Vakuum getrocknet und die radioaktiven Signale durch Autoradiographie bei -80°C unter Verwendung von Verstärkerfolien detektiert.

### 2.6.10.3 Supershift Assay

Mittels Supershift Assay kann die Bindung bestimmter Proteine an DNA durch die Verwendung spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Zum Nachweis von NF-Y dienten Antikörper, die gegen jeweils eine der drei Untereinheiten des Transkriptionsfaktors (A, B und C; Maity & de Crombrugge 1998) gerichtet waren (CBF-A<sub>C</sub>, CBF-B<sub>C</sub> und CBF-C<sub>C</sub>, jeweils gegen das C-terminale Ende gerichtet, und CBF-C<sub>N</sub>, gegen das N-terminale Ende gerichtet;

alle Santa Cruz Biotechnology). Als Negativkontrolle kam ein anti-NF-KB Antikörper (NF-KB p65; Santa Cruz Biotechnology) zum Einsatz.

Für den Supershift Assay wurden 6 µg des jeweiligen Antikörpers wie unter 2.6.10.2 beschrieben mit den Zellkernproteinen, poly(dI-dC) und BSA in 5 x EMSA-Puffer auf Eis präinkubiert, ehe das markierte Oligonukleotid zugegeben wurde. Die Auftrennung der Proben und die Analyse des Bandenmusters erfolgte ebenfalls wie unter 2.6.10.2 beschrieben.

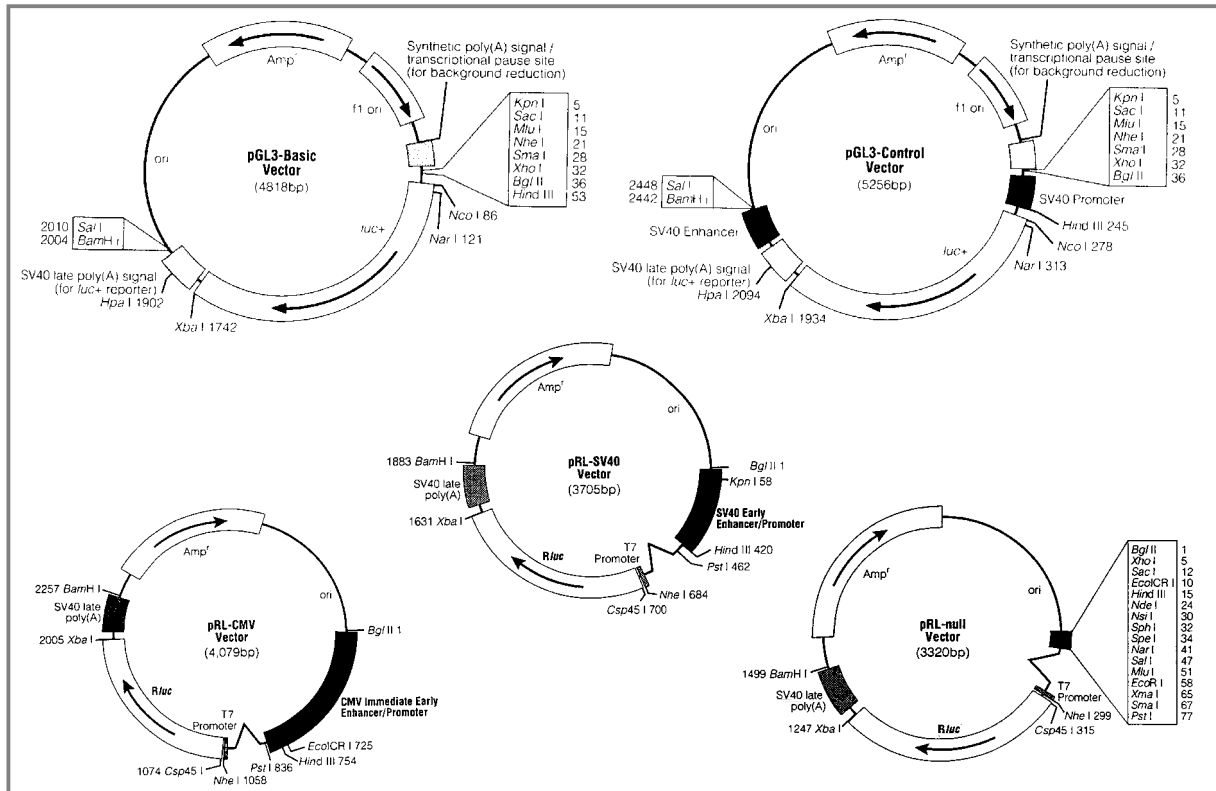
### 2.6.11 Dual-Luciferase Reporter Assay

Reportergeren Assays werden verwendet, um Aspekte der eukaryotischen Genexpression zu untersuchen. Durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Reporterenzyme innerhalb eines Systems (duale Reporter) kann die Genauigkeit des Experimentes verbessert werden. Vorteil dieser Verfahren ist der Einsatz eines internen Kontrollreporters, auf den die Aktivität des zu untersuchenden Reporters bezogen wird. Zur Untersuchung der transkriptionellen Regulation von PERV wurde daher das Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) eingesetzt. Bei diesem System wird zunächst die Aktivität der Glühwürmchen (*Photinus pyralis*) Luciferase bestimmt, dann die der Luciferase der Weichkoralle *Renilla reniformis*, welche als interner Standard verwendet wird. Im ersten Detektionsschritt wird nach Zugabe des Luciferase Assay Reagent II (LAR II; Promega) Beetle Luciferin unter Lichtemission zu Oxyluciferin reduziert. Diese Reaktion wird durch Zugabe von Stop & Glo (Promega) gestoppt, das darin enthaltene Coelenterazin wird durch die Renilla-Luciferase unter Biolumineszenz einer anderen Wellenlänge zu Coelenteramid reduziert.

#### 2.6.11.1 Luciferase-Reportergerenvektoren

Die für das Dual-Luciferase Reporter Assay verwendeten Luciferase-Reportergerenvektoren (alle Promega) sind in Abbildung 2-2 zusammengefaßt.

Die Klonierung der zu untersuchenden Promotoren von PERV, RSV und CMV, welche mit entsprechenden Primern per PCR isoliert wurden (siehe 2.5.3.1), in pGL3-Basic erfolgte nach *KpnI* und *BglII* Verdau des Vektors in die entsprechenden Restriktionsorte der multiplen Klonierungsstelle. Versuche zu den Enhancer-Eigenschaften der PERV LTR Repeatbox wurden mit pGL3-Basic, der bereits die 293-PERV-B(43)-Zero LTR beinhaltetete, und pGL3-Control durchgeführt. Nachdem die Repeatbox mit den entsprechenden Primern per PCR isoliert wurde, erfolgte die Klonierung stromaufwärts des SV40 Promotors bzw. der 293-PERV-B(43)-Zero LTR über die *KpnI* Schnittstelle, stromabwärts des Luciferase Gens über die *BamHI* und *Sall* Schnittstellen, stromabwärts der Zero-LTR über die *BglII* Schnittstelle.



**Abbildung 2-2: Luciferase-Reportergenvektoren des Dual-Luciferase Reporter Assays.** Der Vektor pGL3-Basic besitzt keinen Promotor und wurde zur Untersuchung der Aktivität von Promotoren verwendet, während pGL3-Control (SV40 Promotor) als Positivkontrolle oder bei Enhancer-Versuchen genutzt wurde. Beide Vektoren kodieren für das Luciferase-Gen des Glühwürmchens (luc<sup>+</sup>). Die Vektoren der pRL-Serie kodieren für die Renilla-Luciferase (Rluc) und wurden als interner Standard kotransfiziert (siehe 2.3.3). Während pRL-null keinen Promotor besitzt und nur eine basale Transkription des Reportergens bewirkt, sind die beiden anderen Vektoren mit starken viralen Promotoren ausgerüstet (SV40, CMV).

### 2.6.11.2 Proteinextraktion

Nach Kotransfektion der entsprechenden Zellen mit einem pGL3- und einem pRL-Vektor erfolgte eine Kultivierung von 48 h. Adhärenz Zellen wurden mit PBS (ohne Mg/Ca) gewaschen und durch Zugabe von 300 µl Passive Lysis Buffer (PLB; Promega) 10 min bei Raumtemperatur lysiert. Bei Suspensionszellen erfolgte die Zugabe von 100 µl PLB, nachdem die Zellen in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und mit PBS (ohne Mg/Ca) gewaschen waren. Die Zellysate wurden abschließend pelletiert (13.000 x g, 1 min), und die Überstände bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

### 2.6.11.3 Biolumineszenzmessung

Die Durchführung des Luciferase Assays erfolgte in einem MicroLumat Plus LB 96 V (EG&G Berthold). Für jede Messung wurden je 20 µl des Zellysates in eine spezielle, weiße 96-Loch Mikrotiterplatte (Nunc) gegeben. Nach Injektion von 50 µl LAR II erfolgte nach einer Vorlauf-

zeit von 2 sec die Detektion der Biolumineszenz über einen Zeitraum von 10 sec nach dem Integrate-Meßmodus. Die anschließende Messung der Lumineszenz nach Zugabe von Stop & Glo wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Angabe der Lichtintensität erfolgte in relativen Lichteinheiten (RLU, relative light units). Für Meßwerte, die außerhalb des linearen Meßbereiches liegen, gibt das Luminometer keine Daten an.

## 2.7 Statistische Auswertung

Die Messungen der Real-Time PCR erfolgte jeweils in Einzelansätzen, so daß keine statistische Auswertung der Ergebnisse durchgeführt wurde. Das Resultat der Quantifizierung wurden dennoch durch mindestens eine wiederholte Messung bestätigt.

Der Dual-Luciferase Reporter Assay wurde für jedes Konstrukt und für jede Zelllinie in mindestens drei getrennten Ansätzen in Triplikaten durchgeführt. Um die Aktivität des experimentellen Vektors auf die der internen Kontrollen (pRL-Vektoren) zu beziehen, wurden deren Meßwerte gleich eins gesetzt und der Quotient aus  $RLU_{\text{experimenteller Vektor}}/RLU_{\text{interner Standard}}$  gebildet. Für jedes Triplikat erfolgte die Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung. Um die Beeinflussung des SV40 Promotors und der 293-PERV-B(43)-Zero LTR durch eine inserierte PERV LTR Repeatbox zu beurteilen, wurden die Mittelwerte beider Promotoren gleich eins gesetzt und der relative Anstieg oder die relative Abnahme der Luciferase Aktivität berechnet. Formelle statistische Tests wurden aufgrund der geringen Probenzahl nicht durchgeführt.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Transkriptionelle Regulation der PERV Long Terminal Repeats (LTR)

##### 3.1.1 Verteilung von PERV LTRs im porzinen Genom

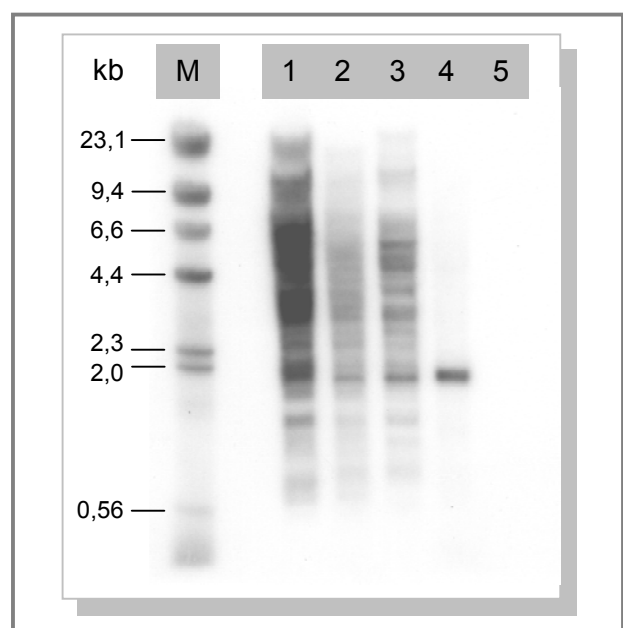
Eine 209 bp lange Sonde, welche in der U5 Region der PERV LTR hybridisiert (Czauderna *et al.* 2000) wurde verwendet, um die Verteilung von LTRs im porzinen Genom sowie in infizierten humanen Zellen mittels Southern Blot Analyse zu untersuchen.

PERV LTRs sind im gesamten Genom des Schweines verteilt und zeigen für PBMCs des Minischweines eine ähnliche Verteilung wie für die der Deutschen Landrasse oder in der genomischen DNA der Zelllinie PK15 (Abbildung 3-1, Spuren 1 bis 3). In humanen Nierenzellen (293), die mit der porzinen Zelllinie PK15 Kointiviert wurden (293/PERV-PK) erfolgte nach PERV-Infektion offenbar die Integration an einem einzigen, distinkten Genort (Abbildung 3-1, Spur 4). Die Intensität der entsprechenden Bande im Bereich von 1,9 kb war für die DNA der porzinen Zellen und der infizierten humanen Zelle identisch. In der DNA von 293 Zellen konnte dagegen kein Hybridisierungssignal detektiert werden (Abbildung 3-1, Spur 5). Für 293/PERV-PK wurde die

Existenz von mindestens fünf integrierten Proviren beschrieben (Czauderna *et al.* 2000), so daß bei einem Vergleich der Bandenintensitäten für die porzine DNA das Vorhandensein von ungefähr 700 LTRs angenommen werden kann.

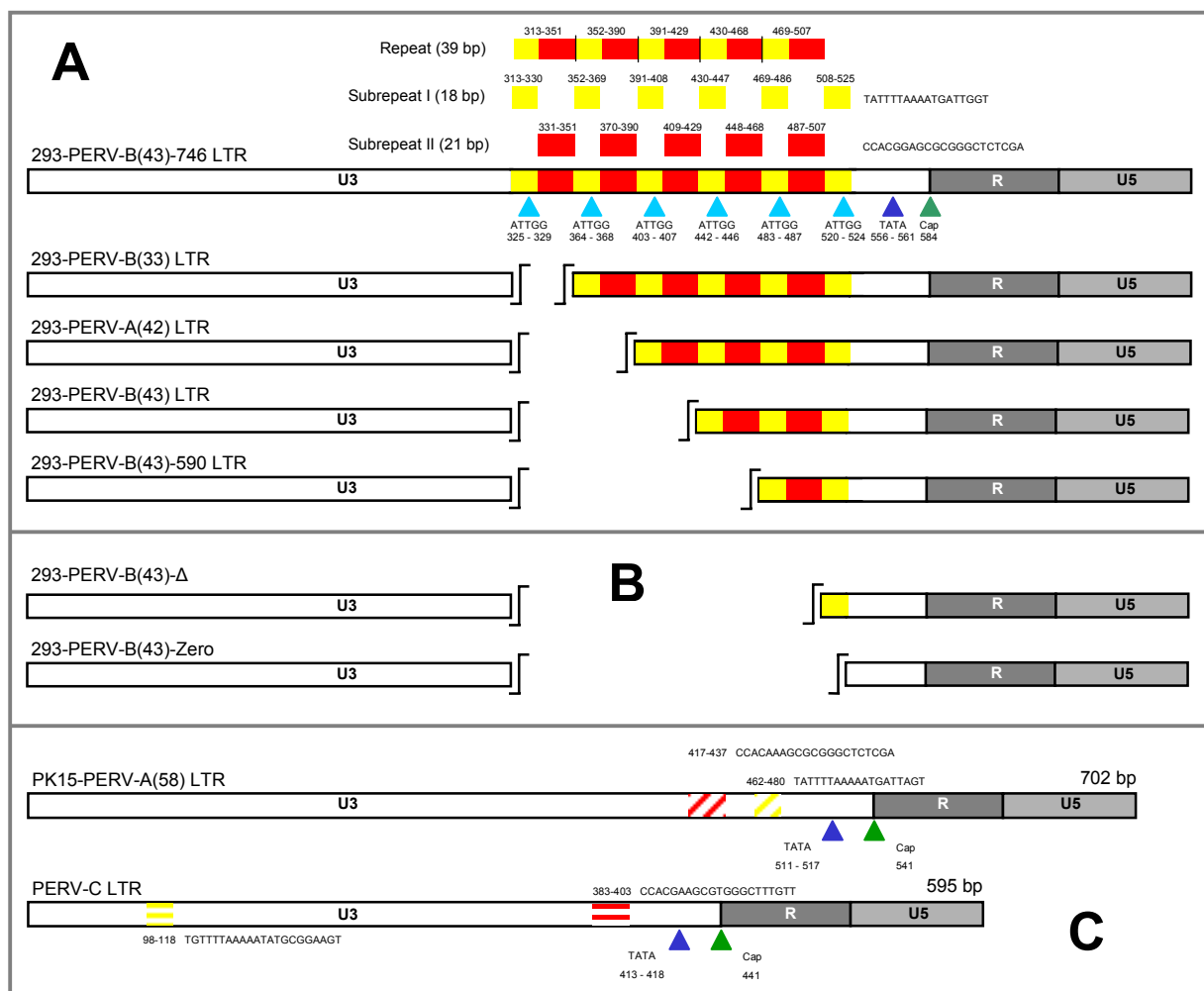
##### 3.1.2 Struktur und Aufbau der PERV LTR

Der Aufbau und die grundsätzliche Organisation der PERV LTRs ist identisch zu der anderer C-Typ Retroviren mit einer U3-, R- und U5-Region (Abbildung 3-2). Innerhalb der untersuch-



**Abbildung 3-1: Verteilung von PERV LTRs im porzinen Genom und in infizierten humanen Zellen.** Southern Blot Analyse von *HincII* restringierter genomischer DNA mit einer LTR U5-Sonde. Spur 1, Minischwein PBMC; Spur 2, Landrasse PBMC; Spur 3, PK15; Spur 4, 293/PERV-PK; Spur 5, 293; M, Marker (*HindIII* restringierter  $\lambda$ ).

ten LTRs sind die Homologien zwischen den R- und U5-Regionen am stärksten ausgeprägt. Diese sind identisch für die Klone 293-PERV-B(33) und 293-PERV-B(43) (Czuderna *et al.* 2000) sowie die LTRs 293-PERV-B(43)-746 und 293-PERV-B(43)-590. Im Gegensatz dazu unterscheidet sich die LTR des Klones 293-PERV-A(42) lediglich in einem SNP in U5, während die von PK15-PERV-A(58) (Krach *et al.* 2001) sich in 2 nt in R und 9 nt in U5 unterscheidet, die PERV-C LTR dagegen in einem SNP in R, und 18 nt in U5. Die R- und U5-Regionen von 293-PERV-B(33) weisen eine Homologie von 76% bzw. 55% gegenüber den entsprechenden Regionen eines typischen, anhand von Sequenzabgleichen konstruierten C-Typ Retrovirus der Säuger (Chen *et al.* 1984) auf.



**Abbildung 3-2: Aufbau und Organisation der PERV LTRs.** (A) LTRs, die nativ eine Repeatbox beinhalten; (B) LTRs, deren Repeatbox artifiziiell deletiert wurde; (C) LTRs, die nativ keine Repeatbox tragen. Die Box ist aus 39-bp Repeats in unterschiedlicher Anzahl aufgebaut, welche sich aus einem 18-bp Subrepeat (gelbe Box) und einem 21-bp Subrepeat (rote Box) zusammensetzen. Stromabwärts der Repeatbox ist ein solitäres 18-bp Subrepeat lokalisiert. Die TATA-Box (blaues Dreieck), die Cap Site (grünes Dreieck) und CCAAT-Elemente, die auf dem Gegenstrang lokalisiert sind (hellblaue Dreiecke) sind dargestellt. Die nt-Positionen geben die Lokalisation der jeweiligen Elemente innerhalb der LTRs an. U3, U3-Region (weiße Box); R, R-Region (dunkelgraue Box); U5, U5-Region (hellgraue Box); TATA, TATA-Box; Cap; Cap-Site.

Im Gegensatz dazu zeigen in U3 nur das äußerste 5'-Ende (nt 1-6) sowie das äußerste 3'-Ende (nt 538-544) Homologien zu hochkonservierten LTR Sequenzen der Säuger C-Typ Retroviren (Chen *et al.* 1984, Golemis *et al.* 1990). Eine TATA-Box ist vorhanden (nt 517-522), die auch bei allen anderen PERV LTRs nachzuweisen war.

Die U3-Regionen von PK15-PERV-A(58) und PERV-C unterscheiden sich komplett von denen der anderen LTRs. Diese sind mit Ausnahme der Anzahl eines 39-bp langen Repeats identisch (Abbildung 3-2A), welches aus einem 18-bp Subrepeat und einem 21-bp Subrepeat aufgebaut ist. Die 293-PERV-B(43)-746 LTR (Gesamtlänge 746 bp) trägt das Repeat fünfmal, die LTRs von 293-PERV-B(33) (Gesamtlänge 707 bp) viermal, von 293-PERV-A(42) (Gesamtlänge 668 bp) dreimal und von 293-PERV-B(43) (Gesamtlänge 629 bp) zweimal, während die LTR 293-PERV-B(43)-590 (Gesamtlänge 590 bp) lediglich eine Kopie des Repeats beinhaltet. Ein solitäres 18-bp Subrepeat ist bei all diesen LTRs stromabwärts der 39-bp Repeatbox lokalisiert. Eine CCAAT-Box ist innerhalb jedes 18-bp Subrepeats auf dem Gegenstrang lokalisiert (nt 13-17 des Subrepeats).

Die LTR von PK15-PERV-A(58) (Gesamtlänge 702 bp) beinhaltet eine Homologie zum 18-bp Subrepeat (nt 462-480), die an zwei nt-Positionen verändert ist sowie eine Homologie zum 21-bp Repeat (nt 417-437), die zwei nt-Austausche aufweist (Abbildung 3-2C). Beide Elemente sind nicht miteinander verbunden. Das gleiche Bild ergibt sich für die U3-Region der PERV-C LTR, mit einem 18-bp Subrepeat-Homologon (nt 98-118) und einer Sequenz, die dem 21-bp Subrepeat ähnelt (nt 383-403) (Abbildung 3-2C).

Der Vergleich der kompletten LTRs von 293-PERV-B(33) zu der von PK15-PERV-A(58) und PERV-C zeigt eine Sequenzübereinstimmung von 68% bzw. 61%. Die provirale PERV-C LTR wurde aus genomischer DNA des Minischweines isoliert und zeigt hohe Sequenzhomologien (97%) zu der von PERV-MSL (Akiyoshi *et al.* 1998) für den Bereich des 3'-Endes der U3-Region inklusive des Poly(A) Signals, sowie der R- und der U5-Region, während der 5'-Anteil der U3 Region deutliche Unterschiede aufweist.

Um die Bedeutung der Repeatbox für die transkriptionelle Regulation zu untersuchen, wurden mittels Fusions-PCR ausgehend von der 293-PERV-B(43) LTR artifiziell deletierte LTRs hergestellt (Abbildung 3-2B). Die LTR 293-PERV-B(43)- $\Delta$  beinhaltet nur ein solitäres 18-bp Subrepeat, bei der LTR 293-PERV-B(43)-Zero wurde die komplette Repeatbox deletiert.

### **3.1.3 Veränderung der LTR Struktur bei der seriellen Passagierung von PERV-B Molekularklonen in humanen Zellen**

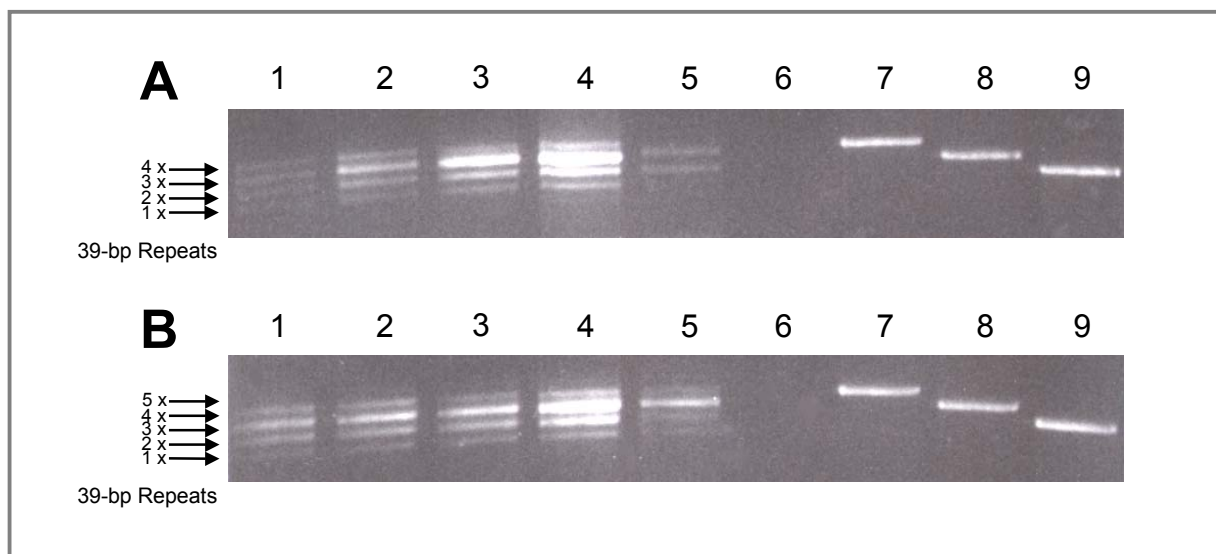
Für die serielle Passagierung wurden die PERV-Molekularklone 293-PERV-B(33)/ATG und 293-PERV-B(43) (Czuderna *et al.* 2000) initial in die humane Nierenzelllinie 293 transfiziert, die daraufhin gebildeten Viren wurden in 293 Zellen seriell passagiert. Der Nachweis der

retroviralen Replikation erfolgte durch die Bestimmung der RT-Aktivität, die Expression viraler Proteine wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Der Zeitverlauf der RT-Aktivität war in jedem der 12 vierwöchigen Passagierungszyklen annähernd identisch mit einem starken Anstieg der Aktivität innerhalb der ersten beiden Wochen und der Entwicklung eines Plateau in Woche 4. Betrachtet man die RT-Aktivität über den gesamten Versuchszeitraum, zeigte sich für den Moleklarklon 293-PERV-B(33)/ATG ein Maximum innerhalb der ersten zwei Passagen, während die Aktivität von 293-PERV-B(43) nahezu unverändert hoch blieb.

Nach Beendigung eines jeden Passagierungszyklus wurden die proviralen LTRs mittels PCR isoliert und amplifiziert. Nach der Gelelektrophorese zeigte sich dabei für beide Klone nicht eine distinkte Bande sondern ein Bandenmuster, das bereits nach der ersten Passagierung zu detektieren war (Abbildung 3-3). Wie Sequenzanalysen ergaben, bestanden diese Banden aus LTRs unterschiedlicher Länge, die sich lediglich in der Anzahl des 39-bp Repeats unterschieden. Die LTR des molekular klonierten Virus 293-PERV-B(33)/ATG enthält vier Kopien des Repeats plus einem solitären 18-bp Subrepeat (Abbildung 3-2; 3-3A und B, Spur 7) und ist 707 bp lang. Die multiplen Banden nach der ersten Passagierung (Abbildung 3-3A, Spur 1) entsprachen dabei der ursprünglichen LTR, der LTR des Moleklarklons 293-PERV-A(42), die drei Kopien des 39-bp Repeats sowie ein solitäres 18-bp Subrepeat enthält (Gesamtlänge 668 bp) (Abbildung 3-2; 3-3A und B, Spur 8) sowie der LTR des Moleklarklons 293-PERV-B(43), die zwei Kopien des 39-bp Repeats sowie ein einzelnes 18-bp Subrepeat beinhaltet (Gesamtlänge 629 bp) (Abbildung 3-2; 3-3A und B, Spur 9). Zusätzlich wurde eine bis dato unbekannte LTR von 590 bp Länge nachgewiesen, die lediglich ein einzelnes 39-bp Repeat plus einem 18-bp Subrepeat trägt [diese LTR, die auch bei der Passagierung von 293-PERV-B(43) nachgewiesen werden konnte, wurde als 293-PERV-B(43)-590 LTR bezeichnet; Abbildung 3-2]. Während des zweiten Passagierungszyklus traten kürzere LTRs mit einem dreifach 39-bp Repeat in größerer Anzahl auf als andere LTRs (Abbildung 3-3A, Spur 2). Diese Verteilung war bis zu der 9. Passagierung identisch, während sich die Mengenverhältnisse nach der 10. Passagierung erneut veränderten (Abbildung 3-3A, Spur 5). Von diesem Zeitpunkt an bis zum Ende der Untersuchung entsprachen die meisten LTRs denen der Klone 293-PERV-A(42) und 293-PERV-B(43) mit dreifach bzw. zweifach 39-bp Repeat. Alle anderen LTR konnten in geringen Mengen weiterhin nachgewiesen werden. Für den Klon 293-PERV-B(43) konnte während der seriellen Passagierung ein ähnliches Verteilungsmuster verschiedener LTRs nachgewiesen werden (Abbildung 3-3B, Spuren 1-5). Von diesem Klon ausgehende Proviren beinhalteten eine weitere, bis dato unbekannte LTR, in der das 39-bp Repeat in fünf Kopien vorhanden war. Zusammen mit einem zusätzlichen solitären 18-bp Subrepeat ergab sich für diese LTR eine Gesamtlänge von 746 bp [als 293-PERV-B(43)-746 LTR bezeichnet; Abbildung 3-2]. Daneben konnte auch in dieser Passagie-

rung die 293-PERV-B(43)-590 LTR nachgewiesen werden, ebenso die LTRs von 293-PERV-B(33)/ATG und 293-PERV-A(42). Mit Ausnahme der 293-PERV-B(43)-746 LTR zeigten alle anderen LTRs eine nahezu gleichmäßige Mengenverteilung.

Bei einer PCR unter Verwendung genomischer DNA der porzinen Zelllinie PK15 konnten ebenfalls Repeat-tragende LTRs detektiert werden, die zu den bereits beschriebenen identisch waren. Lediglich der Nachweis einer LTR mit fünffach bzw. dreifach 39-bp Repeat mißlang (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3-3: PCR der PERV LTRs nach serieller Passagierung.** Die LTRs entstanden nach der seriellen Passagierung der Molekularklone 293-PERV-B(33)/ATG (A) und 293-PERV-B(43) (B) (Czauderna et al. 2000). Die multiplen LTR Banden sind durch Pfeile gekennzeichnet. Spur 1, Viruspassage 1 (4 Wochen pi); Spur 2, Viruspassage 2 (8 Wochen pi); Spur 3, Viruspassage 3 (12 Wochen pi); Spur 4, Viruspassage 4 (16 Wochen pi); Spur 5, Viruspassage 10 (40 Wochen pi); Spur 6, Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O); die Spuren 7-9 zeigen die LTR PCR der Molekularklone 293-PERV-B(33)/ATG (Spur 7), 293-PERV-A(42) (Spur 8) und 293-PERV-B(43) (Spur 9).

### 3.1.4 Provirusbelastung und Virusbildung in porzinen und infizierten humanen Zellen

Durch Amplifikation eines *pro/pol*-Fragmentes aus der genomischen DNA der porzinen Zelllinie PK15 sowie der humanen Zelllinie 293, die produktiv mit PERV aus PK15-Zellen (293/PERV-PK; Patience et al. 1997) oder dem Molekularklon 293-PERV-B(33)/ATG [293/PERV-B(33); Czauderna et al. 2000] infiziert worden war erfolgte die Quantifizierung der proviralen Kopien per Real-Time PCR. Als Negativkontrolle diente die genomische DNA unbehandelter 293 Zellen. Durch die Amplifikation des als Einzelkopie vorliegenden Haushaltsgens PBGD konnte die Anzahl der Zellen, aus denen die genomische DNA isoliert wurde, bestimmt werden. Die Anzahl der von den Zellen in den Kulturüberstand freigesetzten

Virionen wurde mittels einer Real-Time One-Step RT-PCR durch Amplifikation eines zweiten *pro/pol*-Fragmentes quantifiziert. Die Ergebnisse der quantitativen PCR sind in Tabelle 3-1 wiedergegeben.

**Tabelle 3-1: Ergebnisse der quantitativen PCR.** Die Anzahl integrierter Proviren sowie die Zellzahl wurden mittels Real-Time PCR bestimmt, die Anzahl freigesetzter Viruspartikel per Real-Time One-Step RT-PCR.

	293 (human)	293/PERV-PK	293/PERV-B(33)	PK15 (porzin)
<b>PERV provirale DNA<sup>a</sup></b>	kP <sup>f</sup>	1.16*10 <sup>6</sup>	6.95*10 <sup>5</sup>	3.50*10 <sup>6</sup>
<b>Zellzahl<sup>b</sup></b>	1.55*10 <sup>7</sup>	5.76*10 <sup>7</sup>	7.23*10 <sup>7</sup>	~1,34*10 <sup>5g</sup>
<b>PERV DNA Kopien<sup>c</sup></b>	0.00	2.01*10 <sup>4</sup>	9.61*10 <sup>3</sup>	~26*10 <sup>6g</sup>
<b>PERV Virion RNA<sup>d</sup></b>	kP	2.46*10 <sup>4</sup>	4.18*10 <sup>4</sup>	1.30*10 <sup>4</sup>
<b>PERV Virionen pro infizierter Zelle<sup>e</sup></b>	0.00	1.59 oder 3,18 <sup>h</sup>	4.51	~7.28

<sup>a</sup> PERV Kopien/μl genomischer DNA

<sup>b</sup> PBGD Kopien/μl genomischer DNA geteilt durch 2

<sup>c</sup> pro 10<sup>6</sup> Zellen

<sup>d</sup> PERV RNA Kopien/μl Zellkulturüberstand

<sup>e</sup> Anzahl der Virionen im Gesamtvolumen des Kulturüberstandes geteilt durch die Gesamtzahl infizierter Zellen (Superinfektion wird ausgeschlossen)

<sup>f</sup> kein spezifisches PCR-Produkt (Analyse Schmelzkurve)

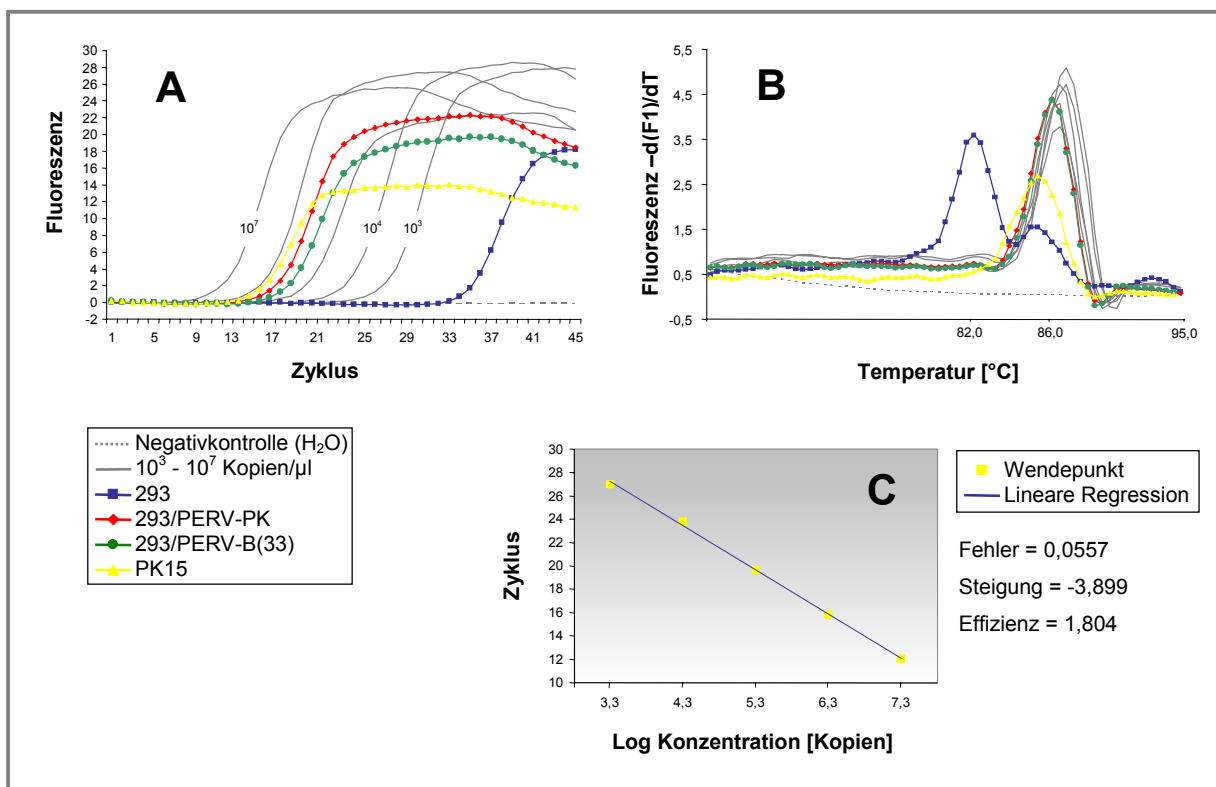
<sup>g</sup> Berechnung basiert auf der Kopienzahl *pol*-tragender PERV im porzinen Genom (siehe Diskussion)

<sup>h</sup> Infektion mit einem Klon (PERV-A oder PERV-B) oder simultane Infektion

### 3.1.4.1 Provirusbelastung

Um die Spezifität der quantitativen PCR zur Bestimmung der PERV Kopienzahl zu ermitteln, wurden die logarithmischen Werte der Fluoreszenzen jeder Probe und Verdünnung der Standardreihe gegen die Zyklenzahl aufgetragen (Abbildung 3-4A). Dabei zeigte sich für die zehnfache serielle Verdünnung des externen homologen Standards eine gleichmäßige Verteilung der Wendepunkte, der direkte Zusammenhang zwischen der Zyklenzahl und der logarithmischen Konzentration der Proben und Standards konnte gezeigt werden. Für die Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O) war keine Zunahme der Fluoreszenz zu detektieren. Für die Proben von 293/PERV-PK, 293/PERV-B(33) und PK15 lagen die Umkehrpunkte zwischen den Zyklen 14 und 18 und damit im Bereich des Standards. Für 293-Zellen konnte eine zunehmende Fluoreszenz erst ab Zyklus 32 festgestellt werden. Die Schmelzkurvenanalyse (Abbildung 3-4B) ergab für die Zelllinien 293/PERV-PK, 293/PERV-B(33) und PK15 sowie den Standard nur ein einziges Produkt, so daß die Amplifikation fehlerhafter Produkte oder die Bildung von dimerisiertem Primer ausgeschlossen werden konnte. Im Gegensatz dazu war die Fluores-

zenzzunahme für 293 Zellen nach dem 32. Amplifikationsschritt auf die Bildung von dimerisiertem Primer aus Mangel an adäquatem PERV-Template zurückzuführen, da diese von den spezifischen Produkten anhand der signifikant geringeren Schmelztemperatur unterschieden werden konnten. Die Amplifikation des externen Standards offenbarte eine lineare Regression für die seriellen Verdünnungen von  $10^3$  bis  $10^7$  Kopien/ $\mu$ l (Abbildung 3-4C) mit einem Fehler von 0,056. Die Effizienz wurde durch die Steigung der Standardkurve überprüft und auf 1,80 berechnet (Gleichung 2-2, siehe 2.5.3.3), was einen guten Wert darstellt.

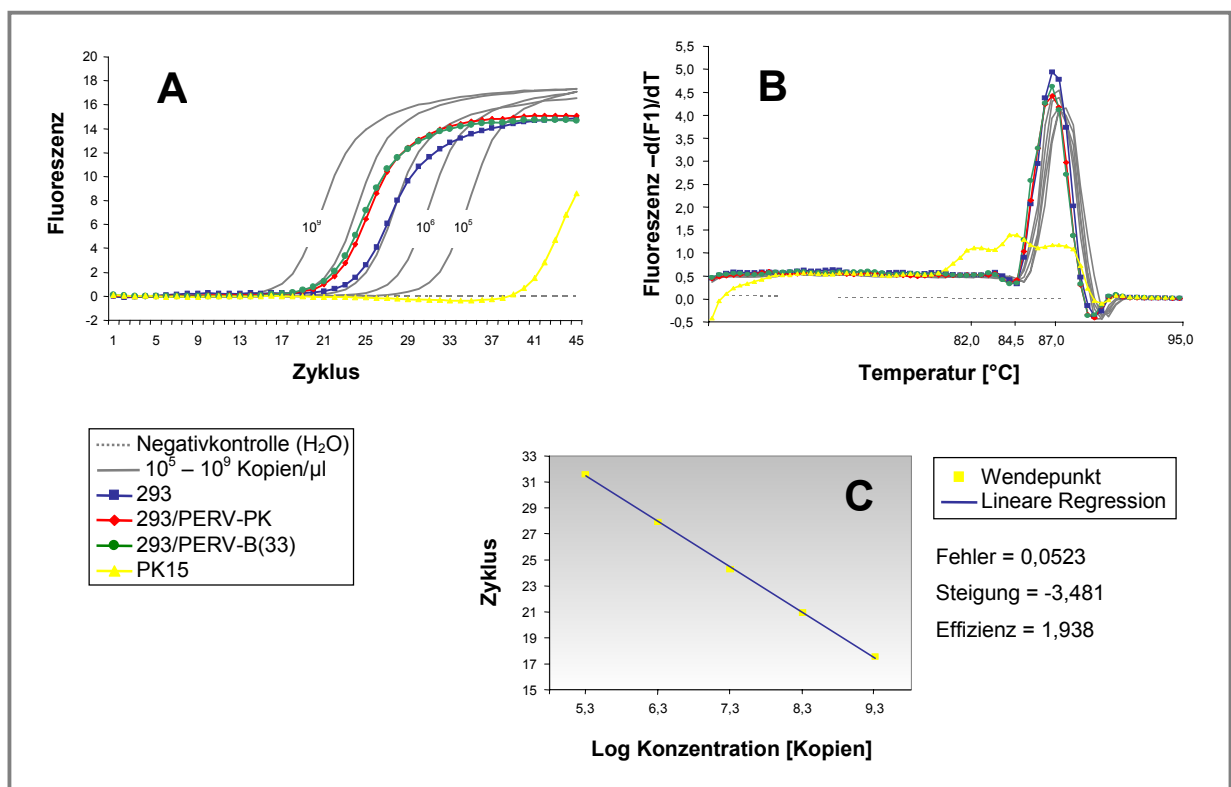


**Abbildung 3-4: Quantitative PCR zur Bestimmung der PERV Provirus Kopienzahl.** (A) Fluoreszenzanalyse, (B) Schmelzkurvenanalyse, (C) Lineare Regression durch die Wendepunkte der Standardreihe. Die serielle Verdünnung des externen homologen Standards ist von  $10^3$  bis  $10^7$  Kopien/ $\mu$ l dargestellt. Die genomische DNA wurde aus der porzinen Zelllinie PK15, der humanen Nierenzelllinie 293, der Zelllinie 293/PERV-PK (293-Zellen infiziert mit PERV aus PK15) und der Zelllinie 293/PERV-B(33) [293-Zellen infiziert mit Molekularklon 293/PERV-B(33)/ATG] isoliert.

Die Spezifität der Amplifikation des als Einzelkopie vorliegenden Haushaltsgens PBGD wurde durch Auftragen der logarithmischen Werte der Fluoreszenzen jeder Probe und Verdünnung der Standardreihe gegen die Zyklenzahl überprüft (Abbildung 3-5A). Der direkte Zusammenhang zwischen der Zyklenzahl und der logarithmischen Konzentration der Proben und Standards konnte dabei gezeigt werden. Für die Negativkontrolle ( $H_2O$ ) konnte keine Zunahme der Fluoreszenz festgestellt werden. Für die Proben der Zelllinien 293, 293/PERV-PK und 293/PERV-B(33) lagen die Umkehrpunkte zwischen den Zyklen 21 und 24 und damit

im Bereich des Standards. Ein Anstieg der Fluoreszenz war für PK15 Zellen erst ab Zyklus 38 zu verzeichnen. Die Schmelzkurvenanalyse (Abbildung 3-5B) zeigte für die Zelllinien 293, 293/PERV-PK und 293/PERV-B(33) sowie die Standards ein einziges Produkt, die Amplifikation fehlerhafter Produkte oder die Bildung von dimerisiertem Primer trat nicht auf. Aus Mangel an geeignetem PBGD-Template kam es in den Proben von PK15 nach dem Zyklus 38 zur Ausbildung von dimerisiertem Primer, die von den spezifischen Produkten anhand der signifikant geringeren Schmelztemperatur zu unterscheiden waren. Die Amplifikation des externen Standards offenbarte eine lineare Regression für die seriellen Verdünnungen von  $10^5$  bis  $10^9$  Kopien/ $\mu$ l (Abbildung 3-5C) mit einem Fehler von 0,052. Die Effizienz der PCR wurde durch die Steigung der Standardkurve überprüft und auf 1,94 berechnet (Gleichung 2-2, siehe 2.5.3.3), was einen guten Wert darstellt.

Die annähernd gleiche Effizienz sowohl der PERV PCR als auch der PBGD PCR erlaubt es, die Ergebnisse in direkte Relation zueinander zu setzen.

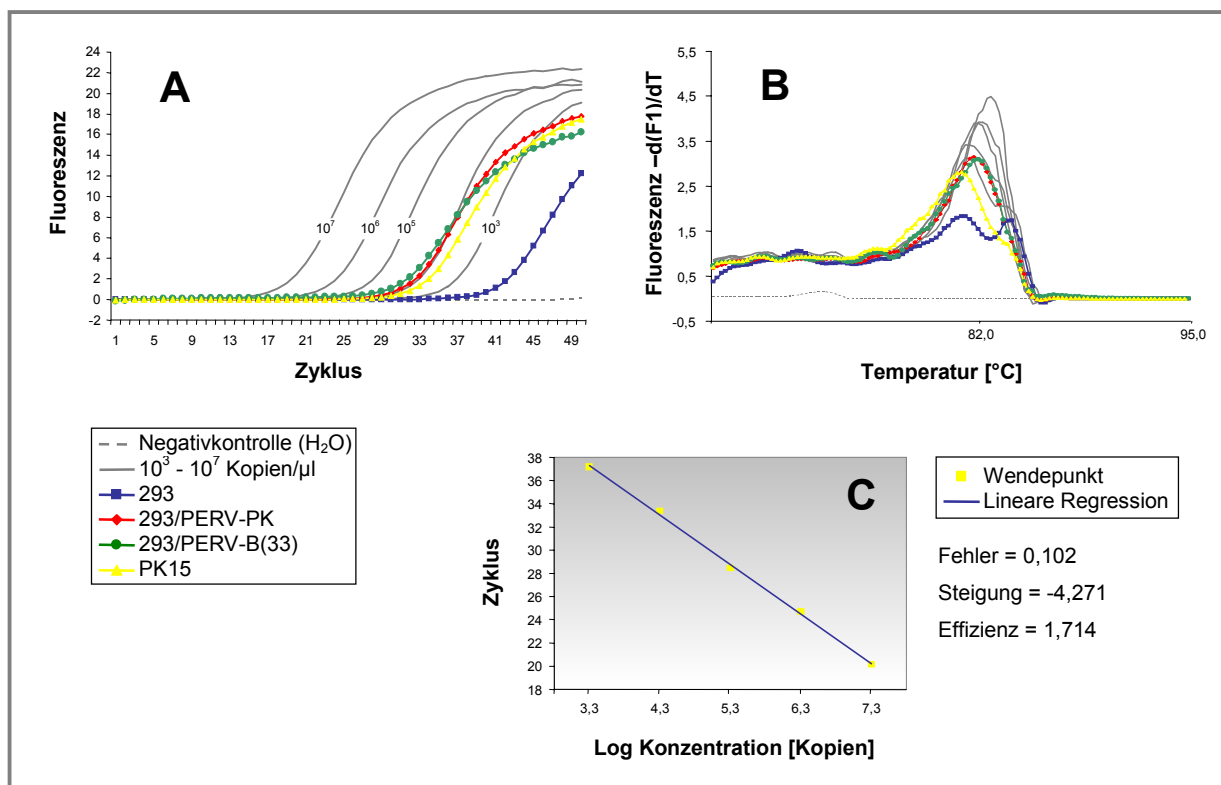


**Abbildung 3-5: Quantitative PCR zur Bestimmung der Zellzahl durch Amplifikation des in Einzelkopie vorliegenden Haushaltsgens PBGD.** (A) Fluoreszenzanalyse, (B) Schmelzkurvenanalyse, (C) Lineare Regression durch die Wendepunkte der Standardreihe. Die serielle Verdünnung des externen homologen Standards ist von  $10^5$  bis  $10^9$  Kopien/ $\mu$ l dargestellt. Die genomische DNA wurde aus der porzinen Zelllinie PK15, der humanen Nierenzelllinie 293, der Zelllinie 293/PERV-PK (293-Zellen infiziert mit PERV aus PK15) und der Zelllinie 293/PERV-B(33) [293-Zellen infiziert mit Moleklarklon 293/PERV-B(33)/ATG] isoliert.



### 3.1.4.2 Quantifizierung der Virusfreisetzung

Die absolute Quantifizierung der Virusfreisetzung erfolgte mittels einer Real-Time One-Step RT-PCR unter Verwendung eines externen homologen Standards. Nach Beendigung der PCR wurden die logarithmischen Fluoreszenzwerte jeder Probe und der Verdünnungen der Standardreihe gegen die Zyklenzahl aufgetragen (Abbildung 3-6A). Die direkte Relation zwischen der Zyklenzahl und der logarithmischen Konzentration der Proben und den Verdünnungen der Standardreihe konnte dabei gezeigt werden. Die Analyse der Schmelzkurve (Abbildung 3-6B) zeigte, daß unspezifische Produkte nur bei 293 Zellen gebildet wurden. Die Zunahme der Fluoreszenz nach Zyklus 37 kann vielmehr auf die Bildung von dimerisiertem Primer zurückgeführt werden, die vom spezifischen Produkt anhand der geringeren Schmelztemperatur unterschieden werden konnten. Die Amplifikation des externen Standards offenbarte eine lineare Regression für die seriellen Verdünnungen von  $10^3$  bis  $10^7$  Kopien/ $\mu$ l (Abbildung 3-6C) mit einem Fehler von 0,102. Die Effizienz der PCR wurde durch die Steigung der Standardkurve überprüft und auf 1,71 berechnet (Gleichung 2-2 siehe 2.5.3.3), was einen guten Wert darstellt.



**Abbildung 3-6: Real-Time RT-PCR zur Quantifizierung der freigesetzten Virionen.** (A) Fluoreszenzanalyse, (B) Schmelzkurvenanalyse, (C) Lineare Regression durch die Wendepunkte der Standardreihe. Die serielle Verdünnung des externen homologen Standards ist von  $10^3$  bis  $10^7$  Kopien/ $\mu$ l dargestellt. Die genomische DNA wurde aus der porzinen Zelllinie PK15, der humanen Nierenzelllinie 293, der Zelllinie 293/PERV-PK (293-Zellen infiziert mit PERV aus PK15) und der Zelllinie 293/PERV-B(33) [293-Zellen infiziert mit Molekularklon 293/PERV-B(33)/ATG] isoliert.

### 3.1.5 Promotoraktivität der PERV LTRs

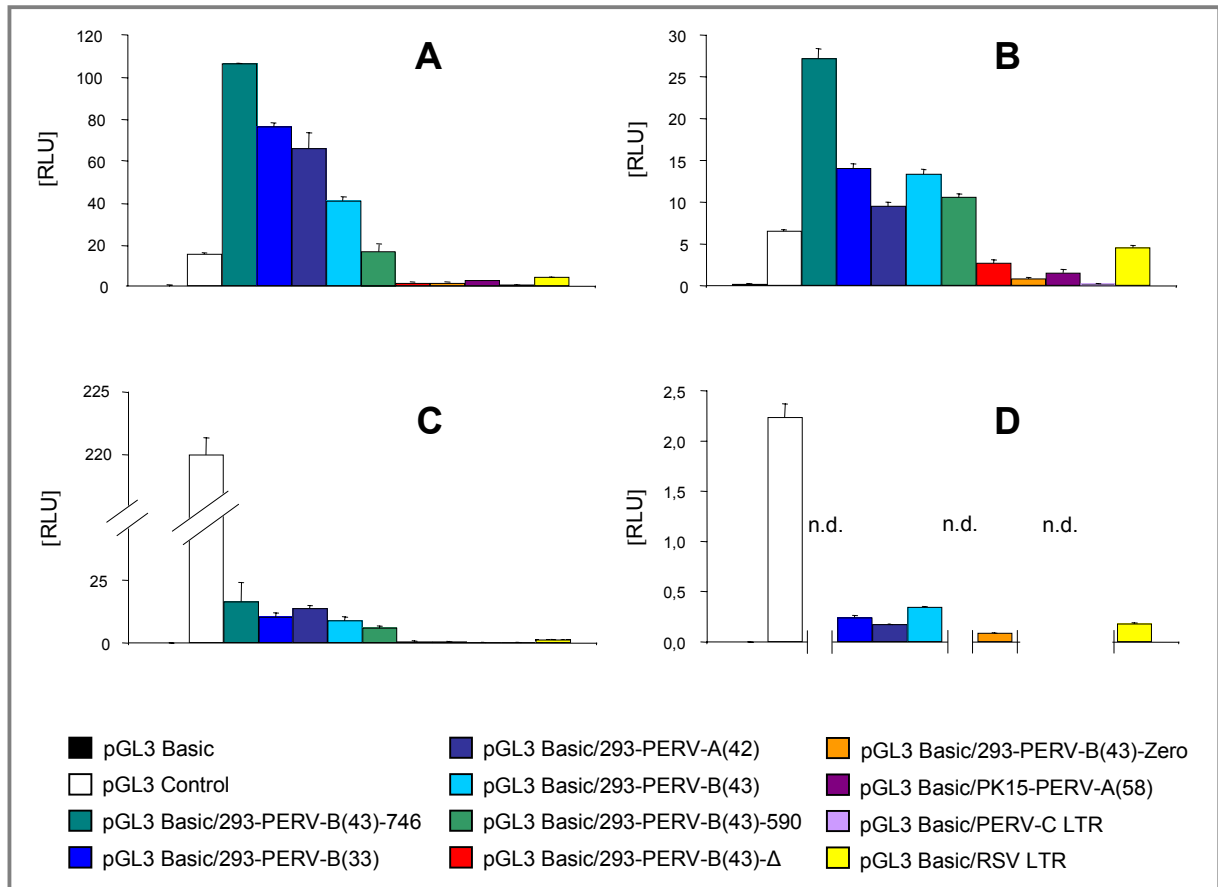
Ein Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega) wurde verwendet, um die Aktivität der verschiedenen PERV LTRs in unterschiedlichen Säugerzelllinien zu untersuchen. Die LTRs stammen von replikationskompetenten Moleklarklonen (Czauderna *et al.* 2000, Krach *et al.* 2001) (Abbildung 3-2A und C) oder entstanden während der seriellen Passagierung der Klonne 293-PERV-B(33) und 293-PERV-B(43) (siehe 3.1.3, Abbildung 3-2A). Die PERV-C LTR wurde aus der genomischen DNA des Minischweins isoliert (Abbildung 3-2C). Bei den LTRs 293-PERV-B(43)- $\Delta$  und 293-PERV-B(43)-Zero (Abbildung 3-2B) wurde die U3 Repeatbox partiell oder komplett per PCR deletiert. Als Kontrollen dienten ein SV40 Promotor sowie eine RSV LTR.

#### 3.1.5.1 Promotoraktivität in humanen Zellen

In allen getesteten humanen Zelllinien (A3.01, 293, HeLa und MRC-5) zeigten die PERV LTRs eine signifikante Promotoraktivität (Abbildung 3-7). In 293 Zellen korrelierte die Aktivität Repeat-tragender LTRs direkt mit der Anzahl der 39-bp Repeats, so daß LTRs mit einer großen Repeatzahl eine stärkere Promotoraktivität zeigten als LTRs mit weniger Repeats (Abbildung 3-7A). Demzufolge zeigte die 293-PERV-B(43)-746 LTR (5-fach Repeat) die höchste Aktivität, während die 293-PERV-B(43)-590 LTR (1-fach Repeat) sich durch die geringste Aktivität auszeichnete. In A3.01 und HeLa Zellen konnte diese direkte Korrelation mit einem stufenförmigen Muster zwar nicht festgestellt werden, dennoch wiesen auch hier die längeren LTRs eine grundsätzlich höhere Aktivität auf (Abbildung 3-7B und C).

In den Zelllinien 293, A3.01 und HeLa zeigten die Repeat-tragenden LTRs eine deutlich stärkere Aktivität als die RSV LTR [bis zu 25-fach bzw. 7-fach in 293 bzw. A3.01 Zellen für die 293-PERV-B(43)-746 LTR; Abbildung 3-7A und B]. In 293 und A3.01 Zellen war deren Aktivität sogar stärker als die des SV40 Promotors [bis zu 7-fach bzw. 4-fach in 293 bzw. A3.01 Zellen für die 293-PERV-B(43)-746 LTR; Abbildung 3-7A und B]. Im Gegensatz dazu zeichneten sich die nativ Repeat-losen LTRs von PK15-PERV-A(58) und PERV-C, durch schwächere Aktivitäten aus, die gegenüber der RSV LTR deutlich reduziert waren. In humanen MRC-5 Zellen zeigten alle PERV LTRs ebenso wie die RSV LTR lediglich schwache Promotoraktivitäten (Abbildung 3-7D).

In allen humanen Zelllinien war die Promotorstärke der artifiziell deletierten LTRs, 293-PERV-B(43)- $\Delta$  und 293-PERV-B(43)-Zero, gegenüber den ursprünglichen LTR deutlich verringert. So zeigte 293-PERV-B(43)- $\Delta$  eine um das 67-fache reduzierte Aktivität im Vergleich zu 293-PERV-B(43)-746 in 293 Zellen während für 293-PERV-B(43)-Zero in HeLa Zellen eine um das 33-fache verringerte Aktivität im Vergleich zu 293-PERV-B(43)-746 zu beobachten war (Abbildung 3-7A und C).



**Abbildung 3-7: Promotoraktivität der PERV LTRs in humanen Zellen.** Die Aktivitäten der in den Luciferase Reportergenvektor pGL3 Basic (Promega) klonierten LTRs sind in Relation zu der internen Kontrolle (pRL-CMV, Promega) in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben. (A) 293 Zellen; (B) A3.01 Zellen; (C) HeLa Zellen; (D) MRC-5 Zellen. n.d., nicht durchgeführt. pGL3 Basic, ohne Promotor; pGL3 Control, SV40 Promotor (siehe 2.6.11.1)

### 3.1.5.2 Promotoraktivität in nicht-humanen Säugerzellen

In allen getesteten simianen (Cos-7), caninen (D17), felines (PG-4) und porzinen (PK15 und ST-Iowa) Zelllinien zeigten die PERV LTRs eine signifikante Promotoraktivität (Tabelle 3-2). In Cos-7 und D17 Zellen ähnelten die Aktivitäten denen in humanen Zellen. Die nativ Repeat-tragenden PERV LTRs zeigten eine starke Promotoraktivität, die gegenüber der RSV LTR deutlich erhöht waren, während die Aktivität von 293-PERV-B(43)- $\Delta$  wiederum deutlich reduziert war [170-fach im Vergleich zu 293-PERV-B(33) in Cos-7 und 19-fach im Vergleich zu 293-PERV-A(42) in D17]. Der SV40 Promotor zeigte in Cos-7 Zellen eine stärkere Promotoraktivität als die PERV LTRs, während sie in D17 Zellen annähernd identisch war. Im Gegensatz dazu wies die Deletionsmutante 293-PERV-B(43)-Zero in der felines Zelllinie PG-4 und den porzinen Zelllinien PK15 bzw. ST-Iowa eine starke Promotoraktivität auf, die mit Ausnahme von 293-PERV-B(43)-746 mit jener der Repeat-tragenden LTRs vergleichbar

war (Tabelle 3-2). Die Aktivität der PK15-PERV-A(58) LTR war in beiden porzinen Zelllinien deutlich reduziert.

**Tabelle 3-2: Promotoraktivität der PERV LTRs in nicht-humanen Säugerzellen.** Die Aktivitäten der in den Luciferase Reportergenvektor pGL3 Basic (Promega) klonierten LTRs sind in Relation zu der internen Kontrolle (pRL-CMV, Promega) in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben.

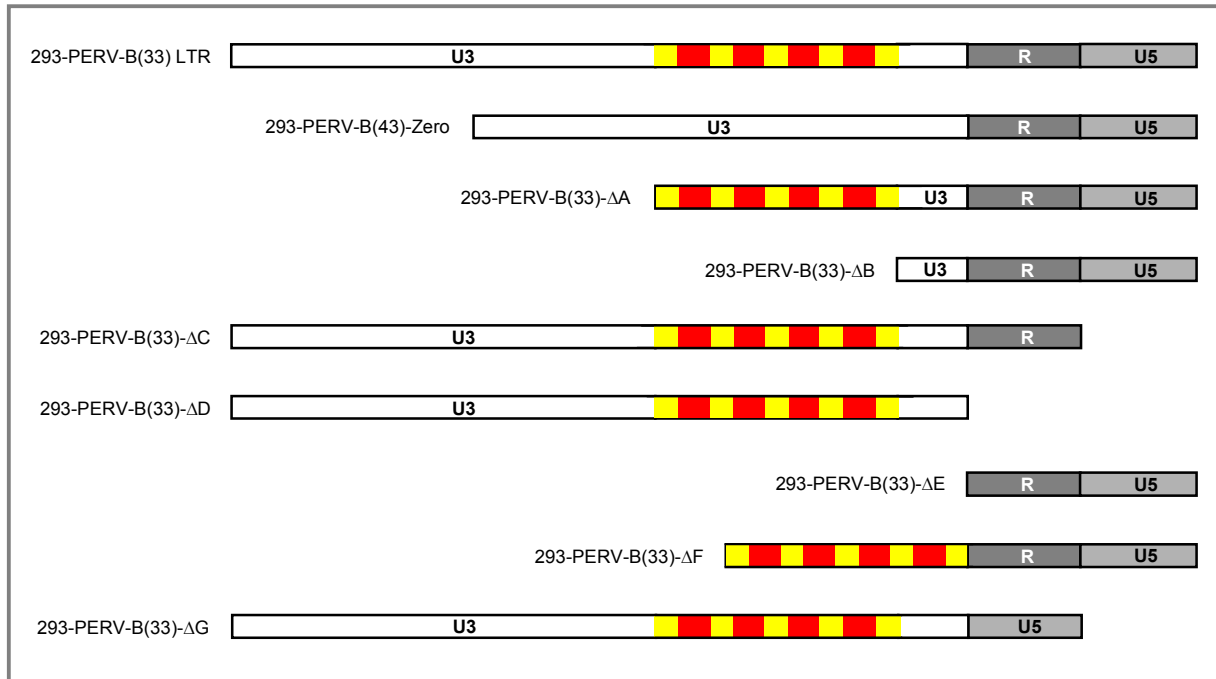
	Mittelwert RLU $\pm$ Standardabweichung in Zelllinie				
	Cos-7 simian	D-17 canin	PG-4 felin	ST-lowa porzin	PK15 porzin
pGL3 Basic	0,02 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,00	0,21 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,00
pGL3 Control	63,49 $\pm$ 11,91	9,04 $\pm$ 0,46	22,12 $\pm$ 0,22	177,59 $\pm$ 2,34	51,69 $\pm$ 1,94
PERV-B(43)-746	n.d.	n.d.	74,53 $\pm$ 9,77	47,59 $\pm$ 5,67	58,70 $\pm$ 0,10
PERV-B(33)	23,82 $\pm$ 0,60	9,37 $\pm$ 0,10	19,58 $\pm$ 0,26	31,14 $\pm$ 1,07	27,44 $\pm$ 0,00
PERV-A(42)	17,63 $\pm$ 0,26	10,62 $\pm$ 0,22	24,68 $\pm$ 1,46	29,01 $\pm$ 1,02	27,33 $\pm$ 0,93
PERV-B(43)	11,98 $\pm$ 0,61	9,45 $\pm$ 0,23	17,12 $\pm$ 0,60	48,45 $\pm$ 1,37	27,85 $\pm$ 3,64
PERV-B(43)- $\Delta$	0,14 $\pm$ 0,01	0,55 $\pm$ 0,03	n.d.	n.d.	n.d.
PERV-B(43)-Zero	n.d.	n.d.	32,34 $\pm$ 2,29	39,25 $\pm$ 4,75	21,66 $\pm$ 0,84
PERV-A(58)	n.d.	n.d.	0,85 $\pm$ 0,01	2,47 $\pm$ 0,15	1,28 $\pm$ 0,06
RSV	1,94 $\pm$ 0,16	0,40 $\pm$ 0,02	n.d.	n.d.	n.d.

RLU, Relative Light Units  
n.d., nicht durchgeführt

### 3.1.5.3 Promotoraktivität partiell deletierter LTRs

Die Lokalisierung und Identifizierung von für die transkriptionelle Regulation bedeutenden LTR-Elementen erfolgte mittels Deletionsmutanten, deren Aktivitäten im Vergleich zu einer nativen LTR mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay in humanen und porzinen Zellen bestimmt wurden (Tabelle 3-3). Zu diesem Zweck wurden ausgehend von der 293-PERV-B(33)-LTR, deren Repeatbox aus vier 39-bp Repeats besteht (Abbildung 3-2), per PCR eine Reihe verschiedener LTRs kloniert, die Deletionen kompletter Struktur motive aufwiesen (Abbildung 3-8).

In allen getesteten Zelllinien (293, A3.01, HeLa und PK15) führten weder die Deletion der U3-Region stromaufwärts der Repeatbox [293-PERV-B(33)- $\Delta$ A] noch die Deletion der U5-Region [293-PERV-B(33)- $\Delta$ C] zu einer signifikanten Veränderung der Promotoraktivität im



**Abbildung 3-8: Aufbau und Organisation deletierter partiell PERV LTRs.** Repeatbox der 293-PERV-B(33) LTR besteht aus vier 39-bp Repeats (siehe 3.1.2). 18-bp Subrepeat (gelbe Box); 21-bp Subrepeat (rote Box). U3, U3-Region (weiße Box); R, R-Region (dunkelgraue Box); U5, U5-Region (hellgraue Box).

Vergleich zur unmodifizierten 293-PERV-B(33)-LTR. Dieses Phänomen zeigte sich ebenso für die Deletion der kompletten U3-Region mit Ausnahme der Repeatbox [293-PERV-B(33)-ΔF] in A3.01 und HeLa Zellen und die Deletion der R-Region zusammen mit der U5-Region [293-PERV-B(33)-ΔD] in HeLa und PK15 Zellen.

Im Gegensatz dazu führte die Deletion der Repeatbox [293-PERV-B(33)-Zero; Abbildung 3-2] zu einer starken Reduktion der Aktivität in den humanen Zellen (bis zu 11-fach in A3.01 Zellen, vergleiche 3.1.5). Dieser Effekt konnte potenziert werden durch die zusätzliche Deletion des stromaufwärts der Repeatbox gelegenen U3-Abschnittes [293-PERV-B(33)-ΔB] (bis zu 130-fache Reduktion der Aktivität in 293 Zellen) oder der Deletion der kompletten U3-Region [293-PERV-B(33)-ΔE] (bis zu 138-fache Reduktion der Aktivität in 293 Zellen). Interessanterweise führte die Deletion der Repeatbox in porzinen PK15 Zellen zu keiner signifikanten Abnahme der LTR-Aktivität (vergleiche 3.1.5) während dies für die Deletionsmutanten 293-PERV-B(33)-ΔB und 293-PERV-B(33)-ΔE durchaus der Fall war.

Eine konträre Auswirkung auf die Promotorstärke zeigte sich nach Deletion der R-Region [293-PERV-B(33)-ΔG] in allen Zelllinien, welche zu einem signifikanten Anstieg der Aktivität führte (bis zu 4,5-fach in 293-Zellen). Der gleiche Effekt trat in 293 und A3.01 Zellen bei kombinierter Deletion der R- und U5-Region auf [293-PERV-B(33)-ΔD].

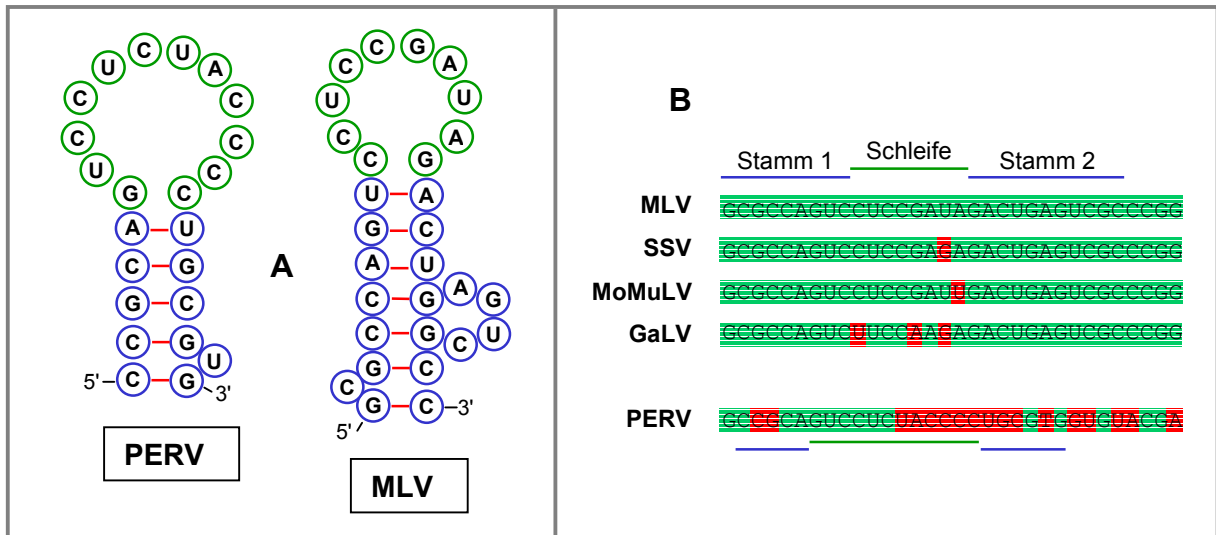
**Tabelle 3-3: Promotoraktivität nativer und partiell deletierter LTRs.** Die Aktivitäten der in den Luciferase Reportergenvektor pGL3 Basic (Promega) klonierten LTRs sind in Relation zu der internen Kontrolle (pRL-CMV, Promega) in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben.

	Mittelwert RLU ± Standardabweichung in Zelllinie			
	293 human	A3.01 human	HeLa human	PK15 porzin
pGL3 Basic	1,50 ± 0,13	0,55 ± 0,07	0,08 ± 0,01	0,04 ± 0,00
293-PERV-B(33)	158,53 ± 0,66	111,17 ± 14,03	10,72 ± 0,18	12,17 ± 0,71
293-PERV-B(43)-Zero	31,88 ± 2,06	9,93 ± 0,35	3,68 ± 0,49	12,52 ± 1,72
293-PERV-B(33)-ΔA	174,80 ± 30,84	145,54 ± 19,06	15,87 ± 0,13	14,46 ± 0,97
293-PERV-B(33)-ΔB	1,22 ± 0,21	3,87 ± 0,25	0,26 ± 0,04	0,09 ± 0,01
293-PERV-B(33)-ΔC	135,28 ± 3,34	130,07 ± 54,95	6,40 ± 0,57	13,39 ± 1,09
293-PERV-B(33)-ΔD	218,94 ± 1,66	261,24 ± 26,43	8,99 ± 0,95	13,25 ± 0,63
293-PERV-B(33)-ΔE	1,15 ± 0,19	2,12 ± 0,11	0,28 ± 0,01	0,24 ± 0,05
293-PERV-B(33)-ΔF	32,56 ± 0,71	130,86 ± 7,76	6,21 ± 1,04	3,98 ± 0,62
293-PERV-B(33)-ΔG	707,49 ± 23,96	206,09 ± 15,39	60,43 ± 0,12	21,80 ± 1,80

RLU, Relative Light Units

### 3.1.5.3.1 R-Region Stem Loop

Nach Deletion der R-Region konnte für die PERV LTR eine Zunahme der Aktivität festgestellt werden (siehe 3.1.5.3). Aus diesem Grund wurde eine Analyse der RNA-Sekundärstruktur der ersten Nukleotide der R-Region, welche den R-Region Stem Loop (RSL) ausbilden (Cupelli & Lenz 1991), für PERV und MLV durchgeführt, ebenso ein Vergleich der entsprechenden Sequenzen verschiedener Retroviren (Abbildung 3-9). Die RSL von PERV und MLV unterscheiden sich deutlich in Größe und Form. Während der RSL von PERV aus den nt 2-24 der R-Region gebildet wird, sind bei MLV die ersten 29 nt involviert (Abbildung 3-9A). Die Energie der jeweiligen Sekundärstruktur beträgt wie berechnet bei PERV –8,6 kcal/mol, bei MLV –9,9 kcal/mol. Wie der Sequenzvergleich verschiedener C-Typ Retroviren zeigt, sind mit Ausnahme von PERV insbesondere jene Nukleotide konserviert, die durch Basenpaarung an der Bildung des Stammes beteiligt sind (Abbildung 3-9A und B).

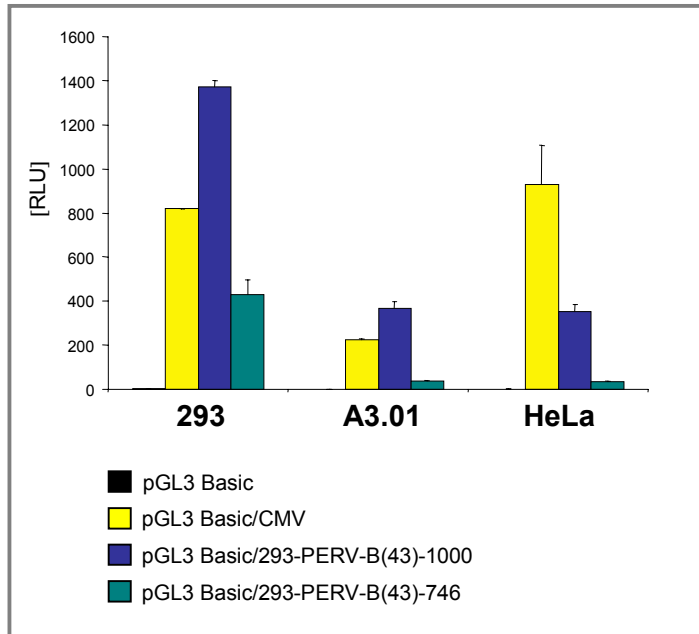


**Abbildung 3-9: R-Region Stem Loop (RSL) und Sequenzabgleiche.** (A) RSL basierend auf der Sekundärstrukturanalyse der ersten Nukleotide der R Region von PERV und MLV. (B) Vergleich der ersten 32 Nukleotide der R-Region verschiedener C-Typ Retroviren. MLV, Murine Leukemia Virus; SSV, Simian Sarcoma Virus; MoMuLV, Moloney Murine Leukemia Virus; GaLV, Gibbon Ape Leukemia Virus. (Abgeändert nach Cupelli & Lenz 1991).

#### 3.1.5.4 Promotoraktivität einer artifiziell verlängerten LTR im Vergleich zum CMV Promotor

Basierend auf den Ergebnissen der Promotoranalysen, welche zeigten, daß die Aktivität der PERV LTR direkt mit der Anzahl der 39-bp Repeats korreliert (siehe 3.1.5), wurde per PCR eine LTR kloniert, in deren U3-Region der Repeat 10-fach vorhanden war [293-PERV-B(43)-1000 LTR]. Die Aktivität dieser LTR wurde im Vergleich zu der des CMV Promotors sowie der 293-PERV-B(43)-746 LTR (5-fach Repeat) mittels Dual-Luciferase Reporter Assay in verschiedenen humanen Zelllinien untersucht (Abbildung 3-10).

In allen Zelllinien zeigte die artifizielle 293-PERV-B(43)-1000 LTR eine signifikant höhere Promotorstärke als die 293-PERV-B(43)-746 LTR, welche während der seriellen Passagierung von PERV Moleklarklonen entstand (siehe 3.1.4). In A3.01 und HeLa Zellen bewirkte die Verdoppelung der Repeatzahl einen Anstieg der Aktivität um das 10-fache, in 293 Zellen dagegen um den Faktor 3,2. In den Zelllinien 293 und A3.01 zeichnete sich die 293-PERV-B(43)-1000 LTR durch eine signifikant stärkere Aktivität aus als der CMV Promotor (1,7-fach in 293 Zellen und 1,6-fach in A3.01 Zellen). Im Gegensatz dazu war deren Aktivität in HeLa Zellen um das 2,7-fache gegenüber dem CMV Promotor reduziert.



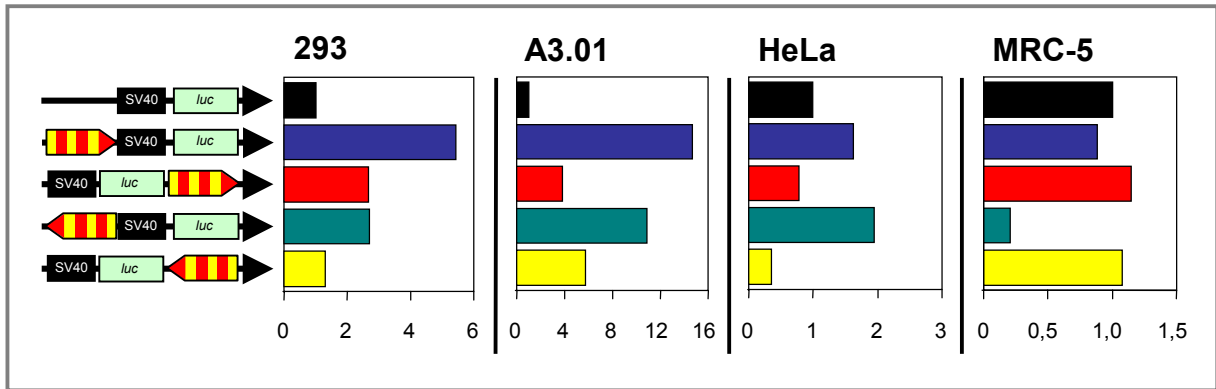
**Abbildung 3-10: Promotoraktivität der 293-PERV-B(43)-1000 LTR.** Die Aktivitäten der in den Luciferase Reporter-Genvektor pGL3 Basic (Promega) klonierten PERV und CMV Promotoren sind in Relation zu der internen Kontrolle (pRL-SV40, Promega) in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben.

### 3.1.6 Enhancer-Eigenschaften der PERV LTR-Repeatbox

Repeatelemente innerhalb retroviraler Promotoren zeichnen sich oftmals durch Eigenschaften eines Enhancers aus (Laimins *et al.* 1984, Fan 1990). Um mögliche Enhancer-Eigenschaften der PERV LTR Repeatbox zu evaluieren, wurde die Repeatbox der 293-PERV-B(33) LTR (vierfach 39-bp Repeat plus solitäres 18-bp Subrepeat) in den Luciferase Reporter-Genvektor pGL3 Control kloniert, stromaufwärts des heterologen SV40 Promotors ebenso wie stromabwärts des *luciferase*-Gens, jeweils in beiden Orientierungen. Mittels des Dual-Luciferase Reporter Assays wurde in verschiedenen Zelllinien untersucht, ob die Aktivität des SV40 Promotors durch die Existenz der PERV Repeatbox beeinflusst wurde.

In den humanen Zellen 293 und A3.01 zeigten diese Konstrukte eine deutlich erhöhte Promotoraktivität gegenüber dem unmodifizierten Vektor pGL3 Control und zwar unabhängig von der Lage und Orientierung der Repeatbox gegenüber dem SV40 Promotor (Abbildung 3-11A und B). Die stärkste Aktivierung des SV40 Promotors erfolgte, sobald die Repeatbox stromaufwärts des Promotors in Vorwärtsorientierung kloniert wurde. Daraus resultierte eine 5,4-fach erhöhte Aktivität in 293 Zellen und eine Zunahme der Aktivität um das 14,7-fache in A3.01 Zellen. Die Insertion der Repeatbox an gleicher Position in reverser Orientierung resultierte in A3.01 Zellen in einer geringfügig schwächeren Aktivierung (10,9-fach), während diese Anordnung in 293 Zellen zu einer deutlich reduzierten Aktivitätssteigerung führte (2,7-fach), die identisch zur stromabwärts/vorwärts Anordnung war. Am geringsten wirkte sich die Beeinflussung des SV40 Promotors in 293 Zellen in der stromabwärts/reversen Anordnung aus, in A3.01 Zellen in der Anordnung stromabwärts/vorwärts.

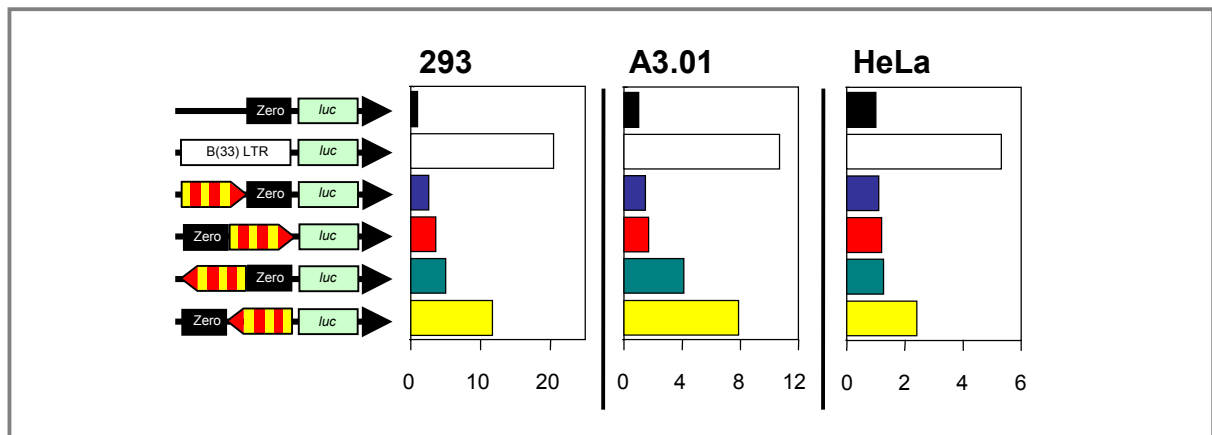




**Abbildung 3-11: Modulation des heterologen SV40 Promotors durch die 4-fach 39-bp Repeatbox.** Die Repeatbox wurde stromaufwärts des SV40 Promotors und stromabwärts des luciferase-Gens in beiden Orientierungen inseriert. Die Mittelwerte der pGL3 Control Aktivität (SV40) wurden gleich 1 gesetzt und die relative Zu- oder Abnahme angegeben. SV40 Promotor (schwarze Box), luciferase-Gen (grüne Box) und der 39-bp Repeat (gelb-rot gestreifte Box; Pfeilrichtung gibt Orientierung an) sind dargestellt.

In HeLa Zellen wurde die SV40 Promotoraktivität nur bei jenen Konstrukten verstärkt, bei denen die PERV Repeatbox stromaufwärts des Promotors inseriert war, was zu einer 1,6-fachen Aktivierung in der Vorwärtsorientierung und einer 1,9-fachen Aktivierung in der reversen Orientierung führte. Im Gegensatz dazu führte eine stromabwärtige Insertion zu einer Reduzierung der Aktivität (0,8-fach in Vorwärts- und 0,4-fach in Reversorientierung; Abbildung 3-11C). In der Zelllinie MRC-5 konnte dagegen für keines der Konstrukte eine signifikante Erhöhung der SV40 Promotoraktivität festgestellt werden (Abbildung 3-11D). In der stromaufwärts/reversen Anordnung wurde die Aktivität sogar um den Faktor 0,2 erniedrigt. Die artifiziell deletierte 293-PERV-B(43)-Zero LTR trägt keine Elemente der Repeatbox (Abbildung 3-2). Um Effekte der Promotorregulation zu untersuchen, die auf der räumlichen Beziehung zwischen der Repeatbox und der restlichen LTR basieren, wurde der pGL3 Basic/293-PERV-B(43)-Zero Vektor verwendet, in den zusätzlich die 293-PERV-B(33) Repeatbox stromaufwärts und stromabwärts der Zero-LTR in beiden Orientierungen kloniert war. Mit diesen Konstrukten sollte weiterhin untersucht werden, ob die durch die Deletion hervorgerufene reduzierte Promotoraktivität (siehe 3.1.5.1) durch eine dislozierte Repeatbox rekonstituiert werden konnte.

In den Zelllinien 293, A3.01 und HeLa verursachte die Repeatbox eine Erhöhung der 293-PERV-B(43)-Zero Aktivität unabhängig von der Lage und Orientierung (Abbildung 3-12A bis C). Für alle drei Zelllinien zeigte sich dabei ein uniformes Muster mit der stärksten Aktivierung für die stromabwärts/reverse Anordnung (11,8-fach in 293 Zellen), während für die stromaufwärts/vorwärts-Konstrukte die Beeinflussung der LTR am geringsten war (2,6-fach in 293). Eine komplette Rekonstitution der Promotorstärke der 293-PERV-B(33) LTR war jedoch durch die dislozierte Repeatbox nicht möglich. In A3.01 Zellen betrug die maximale Aktivität eines Konstruktes 73,8% der Promotorstärke der 293-PERV-B(33) LTR, in 293 Zel-



**Abbildung 3-12: Modulation der homologen 293-PERV-B(43)-Zero LTR durch die 4-fach 39-bp Repeatbox.** Die Repeatbox wurde stromauf- und stromabwärts der Zero-LTR in beiden Orientierungen inseriert. Die Mittelwerte der pGL/293-PERV-B(43)-Zero Aktivität wurden gleich 1 gesetzt und die relative Zu- oder Abnahme angegeben. 293-PERV-B(43)-Zero LTR (schwarze Box), 293-PERV-B(33) LTR (weiße Box), luciferase-Gen (grüne Box) und der 39-bp Repeat (gelb-rot gestreifte Box; Pfeilrichtung gibt Orientierung an) sind dargestellt.

len 57,5 % und in HeLa Zellen 45,4%. Demzufolge spielt die räumliche Anordnung der Repeatbox in Bezug auf die Gesamt-LTR eine bedeutende Rolle für deren Regulation.

In 293 Zellen war die maximale Aktivierung der homologen Zero-LTR stärker als die des heterologen SV40 Promotors, während in A3.01 Zellen die Verhältnisse genau umgekehrt waren (vgl. Abb. 3-11 und 3-12). In HeLa Zellen war dagegen der Grad der maximalen Aktivierung für den homologen und heterologen Promotor identisch. Die PERV LTR Repeatbox zeigte demzufolge mit Ausnahme der Zelllinie MRC-5 in allen anderen Zellen die typischen Eigenschaften eines Enhancers und erhöhte die Aktivität sowohl eines heterologen als auch eines homologen Promotors unabhängig von der Lage und Orientierung. Für die stromabwärts des *luciferase*-Gens klonierten Elemente war dies über die Distanz von 2.700 bp der Fall.

Die Repeatbox selbst zeigte ebenfalls eine schwache Promotoraktivität, nachdem sie in den promotorlosen Luciferase Vektor pGL3 Basic stromaufwärts des *luciferase*-Gens in beiden Orientierungen inseriert wurde. Die Aktivität entsprach dabei in der Vorwärtsorientierung dem 2,4-fachen Wert der 293-PERV-B(43)-Zero LTR in HeLa Zellen, in der reversen Anordnung sogar dem 4,9-fachen Wert (Daten nicht gezeigt).

### 3.1.7 Beeinflussung der PERV LTR Aktivität durch Immunsuppressiva

Im Falle einer Xenotransplantation würde der Transplantatempfänger einer starken Immunsuppression ausgesetzt sein, um die Abstoßung des artfremden Gewebes nach Möglichkeit zu verhindern. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob Immunsuppressiva, die in der

Transplantationsmedizin routinemäßig zum Einsatz kommen, Auswirkungen auf die Aktivität des PERV Promotors haben.

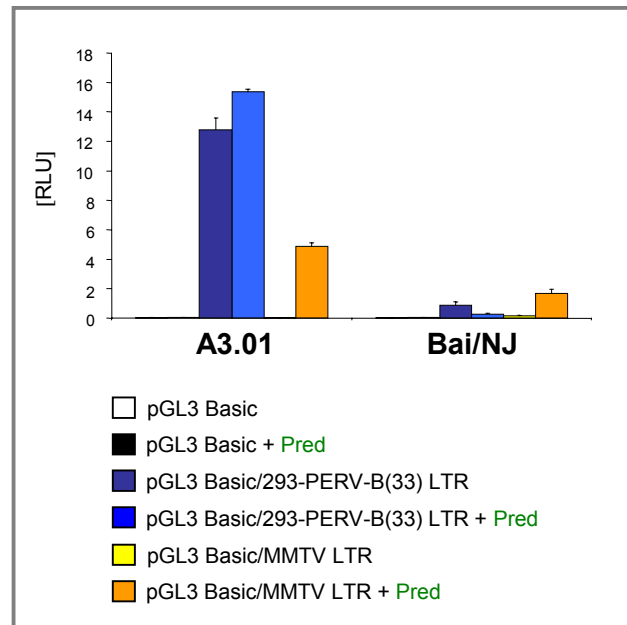
### 3.1.7.1 Prednisolon (Pred)

Die T-Zell Linie A3.01 und die B-Zell Linie Bai/NJ wurden verwendet, um mittels Dual-Luciferase Reporter Assay zu untersuchen, ob die Aktivität der 293-PERV-B(33) LTR sowie der 293-PERV-A(42) LTR durch das Glucocorticoid Pred beeinflusst wird.

In A3.01 Zellen wurde die Aktivität der 293-PERV-B(33) LTR durch Behandlung der Zellen mit Pred nicht signifikant beeinflusst, es war lediglich ein 1,2-facher Anstieg der Aktivität festzustellen (Abbildung 3-13). Im Gegensatz dazu wurde die Aktivität einer MMTV LTR, welche als Positivkontrolle verwendet wurde, um den Faktor 121,3 durch das Glucocorticoid verstärkt. In Bai/NJ Zellen konnte der gleiche Effekt beobachtet werden, die Aktivität der MMTV LTR wurde 9,3-fach erhöht. Im Gegensatz dazu zeigte sich für die 293-PERV-B(33) LTR wiederum kein signifikanter Effekt.

In Übereinstimmung dazu zeigte auch die 293-PERV-(A)42 LTR keinerlei Suszeptibilität gegenüber Pred, in beiden Zelllinien konnte keine signifikante Veränderung der LTR Aktivitäten detektiert

werden. Im Gegensatz dazu wurde die Aktivität der MMTV LTR in beiden Zelllinien signifikant erhöht (40,3-fach in A3.01 Zellen; 5,8-fach in Bai,NJ Zellen; Daten nicht gezeigt).

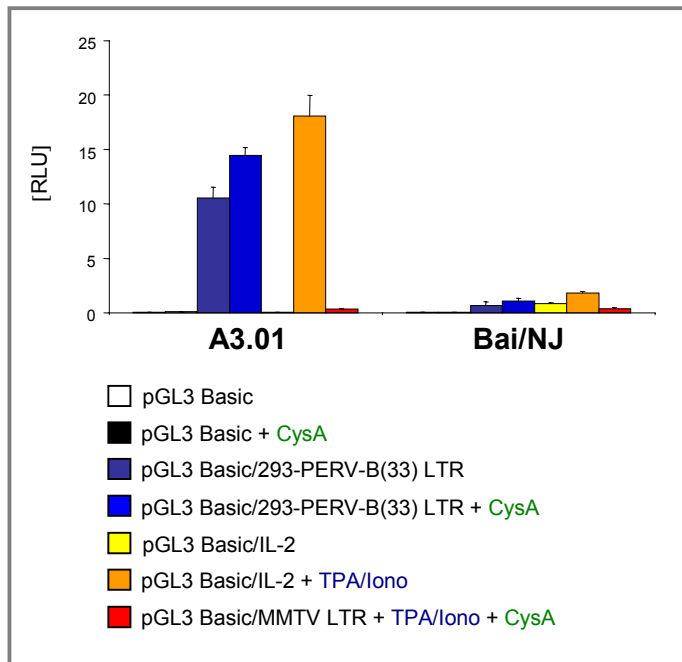


**Abbildung 3-13: Einfluß von Prednisolon auf die PERV LTR Aktivität.** Die Aktivitäten der in den Luciferase Reporter genvektor pGL3 Basic (Promega) klonierten 293-PERV-B(33) LTR sowie der MMTV LTR in der lymphoblastoiden T-Zell Linie A3.01 und der lymphoblastoiden B-Zell Linie Bai/NJ sind in Relation zu der internen Kontrolle (pRL-null, Promega) in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben.

### 3.1.7.2 Cyclosporin A (CysA)

Mögliche Effekte von CysA auf die transkriptionelle Regulation der 293-PERV-B(33) LTR wurden in den Zelllinien A3.01 und Bai/NJ mittels Dual-Luciferase Reporter Assay untersucht. Eine signifikante Beeinflussung der Promotorstärke konnte dabei nicht festgestellt werden (Abbildung 3-14). In A3.01 Zellen wurde unter CysA Einfluß lediglich eine 1,3-fache Erhöhung der Aktivität gegenüber unstimulierten Zellen detektiert. Als Positivkontrolle wurde der

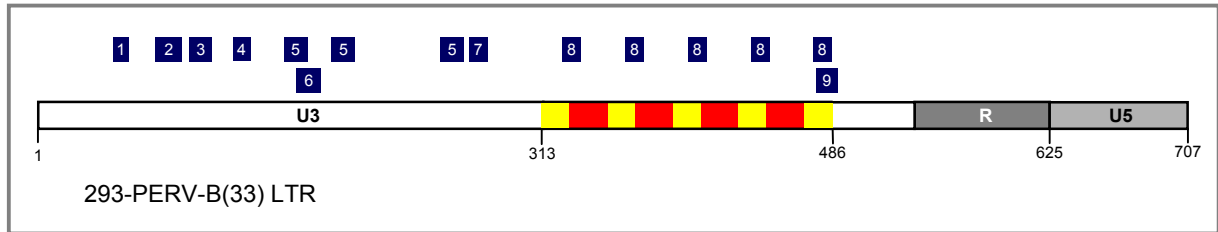
humane, fakultative IL-2 Promotor verwendet, der durch Inkubation der Zellen mit TPA und Iono über den  $\text{Ca}^{2+}$ -Weg stimuliert wurde, was zu einem Anstieg der Aktivität um den Faktor 301,2 führte. Die zusätzliche Applikation von CysA führte zu einer signifikanten Abnahme der Promotoraktivität (53,4-fach). Die Meßergebnisse in Bai/NJ Zellen waren identisch mit einer von CysA unabhängigen Aktivität der PERV LTR und einer signifikanten Induzierung des IL-2 Promotors durch TPA und Iono, die durch CysA-Zugabe aufgehoben werden konnte.



**Abbildung 3-14: Einfluß von Cyclosporin A auf die PERV LTR Aktivität.** Die Aktivitäten der in den Luciferase Reportergenvektor pGL3 Basic (Promega) klonierten 293-PERV-B(33) LTR sowie des humanen IL-Promotors sind in der lymphoblastoiden T-Zelllinie A3.01 und der lymphoblastoiden B-Zelllinie Bai/NJ in Relation zu der internen Kontrolle (pRL-null, Promega) in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben. Der fakultative IL-2 Promotor wurde durch Zugabe von TPA und Iono stimuliert.

### 3.1.8 Putative Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen der PERV LTR

Eine statistische Transkriptionsfaktoranalyse wurde mit der MatInspector Software durchgeführt und offenbarte zahlreiche putative Bindungsstellen innerhalb der PERV-LTR (Abbildung 3-15). Innerhalb eines jeden 39-bp Repeats befinden sich Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Nucleus Factor (Y) (NF-Y), der an die Sequenz 5'-GGACCAATCAT-3' bindet (Kernbindungssequenz fett, Matrixbindungssequenz unterstrichen). Die Übereinstimmung auf dem reversen Strang beträgt für die Kernsequenz 100%, für die Matrixsequenz 95,6%. Die NF-Y Bindungsstelle umfaßt nt 10-20 eines jeden 39-bp Repeats (vergleiche 3.1.2) mit Lokalisation der Kernbindungsstelle im 18-bp Subrepeat. Entsprechend der Repeatzahl der nativen PERV LTRs variiert die Anzahl der NF-Y Stellen zwischen sechs [293-PERV-B(43)-746 LTR] und drei [293-PERV-B(43)], artifiziell deletierte LTRs tragen lediglich eine [293-PERV-B(43)- $\Delta$ ] bzw. keine Bindungsstelle [293-PERV-B(43)-Zero]. Neben Bindungsstellen für NF-Y wurden weitere putative Bindungsstellen mit einer Übereinstimmung der Matrixsequenz von mindestens 95,2% über die gesamte LTR verteilt identifiziert (Abbildung 3-15).



**Abbildung 3-15: Putative Transkriptionsfaktor Bindungsstellen.** Die Bindungsstellen (blaue Box) sind für die U3 Region der 293-PERV-B(33) LTR angegeben. 1, LPOLYA (nt 46 - 53); 2, TH1E47 (nt 71 - 86); 3, FKH1 (nt 92 - 105); 4, SOX5 (nt 120 - 129); 5, GATA1 (nt 151 - 164, nt 180 - 192, nt 249 - 261); 6, ETS2 (nt 159 - 172); 7, AP1FJ (nt 265 - 275); 8, NF-Y (nt 322 - 332, nt 361 - 371, nt 400 - 410, nt 439 - 449, nt 478 - 488); 9, CAAT (nt 479 - 490). Die nt-Position bezieht sich auf die Datenbank Nummer AJ133816.

Entsprechend der Sequenzunterschiede der PK15-PERV-A(58) und PERV-C LTR zu den Repeat-tragenden LTRs offenbarte die Analyse Bindungsstellen für andere Transkriptionsfaktoren. Bindungsstellen für NF-Y wurden nicht identifiziert, während solche für GATA1 in allen LTRs vorhanden waren. Weitere Übereinstimmungen zwischen den Repeat-tragenden LTRs und der PK15-PERV-A(58) LTR bezogen sich auf eine Bindungsstelle für TH1E47, Bindungsstellen für SOX5 und APF1J wurden in den Repeat-tragenden LTRs und der PERV-C LTR identifiziert. Gemeinsamkeiten zwischen der LTR von PK15-PERV-A(58) und PERV-C bezogen sich auf das Vorhandensein von Bindungsstellen für GATA3, HSF1 und S8.

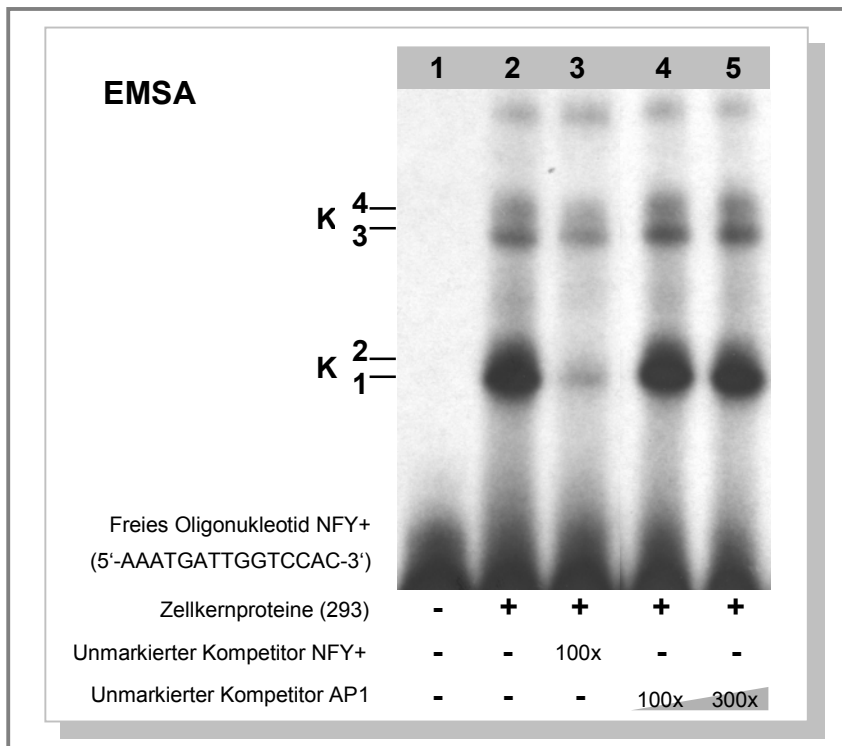
### 3.1.9 Transkriptionsfaktor-Bindung an die PERV LTR Repeatbox

#### 3.1.9.1 Nachweis der spezifischen Transkriptionsfaktor-Bindung

Um die Ergebnisse der statistischen Transkriptionsfaktoranalyse zu bestätigen, wurde ein Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) durchgeführt, um die Bindung von Zellkernproteinen an DNA-Abschnitte der PERV LTR nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurde das spezifische 15-mer Oligonukleotid NFY+, das die putative NF-Y Bindungssequenz der PERV LTR beinhaltet (Abbildung 3-15) radioaktiv markiert und mit Zellkernproteinen der humanen Zelllinie 293 inkubiert (Abbildung 3-16).

Nach Auftrennung der DNA-Proteinkomplexe mittels Acrylamid Gelelektrophorese offenbarte die Autoradiographie ein typisches Bandenmuster, bei dem vier distinkte Proteinkomplexe unterschieden werden konnten (Abbildung 3-16, Spur 2). Bei der Verwendung von markiertem Oligonukleotid ohne Zellkernextrakte war dagegen kein Bandenmuster zu identifizieren (Abbildung 3-16, Spur 1). Um die Spezifität der DNA-Protein-Bindung zu zeigen, wurde sowohl eine spezifische als auch eine unspezifische Kompetition durchgeführt. Durch Zugabe des unmarkierten Oligonukleotids NF-Y+ in 100-fachem molarem Überschuss konnten die

DNA-Protein-Bindungen der Komplexe 1 und 2 komplett kompetitiert werden (Abbildung 3-16, Spur 3). Im Gegensatz dazu hatte die Zugabe eines unmarkierten Oligonukleotids, das die Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors AP1 trägt, weder im 100-fachem noch im 300-fachem molarem Überschuß Auswirkungen auf die Bildung der vier DNA-Protein-Komplexe, die in identischer Weise vorlagen wie bei den nicht-kompetitierten Ansätzen (Abbildung 3-16, Spuren 4 und 5).



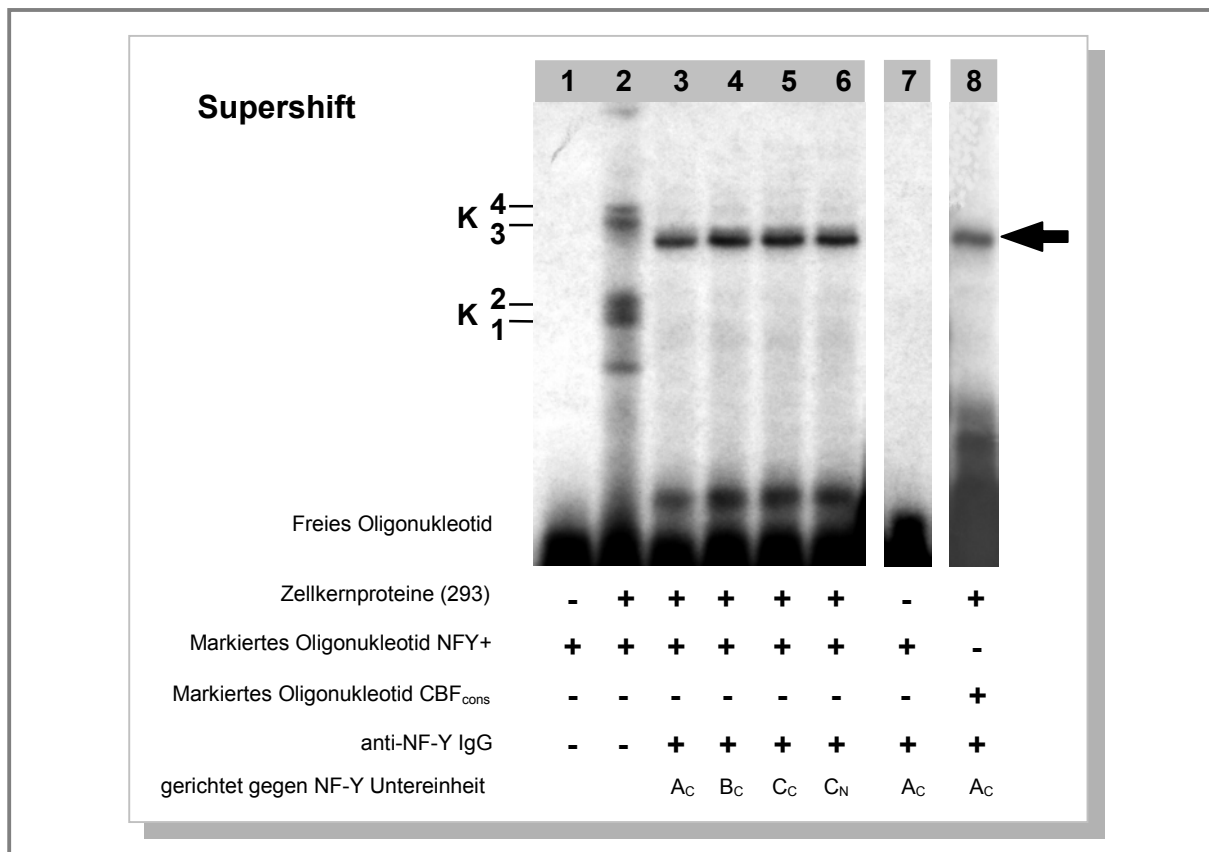
**Abbildung 3-16: DNA-Protein Interaktion.** EMSA zum Nachweis der Bindung von Zellkernproteinen der humanen Zelllinie 293 an die putative NF-Y Bindungsstelle, die im 39-bp Repeat der PERV LTR lokalisiert ist. Spezifische Kompetition wurde mit unmarkiertem Oligonukleotid NF-Y+ in 100-fachem molarem Überschuß durchgeführt, unspezifische Kompetition mit dem AP1 Konsensusoligonukleotid im 100-fachem und 300-fachem molarem Überschuß.

### 3.1.9.2 Detektion von NF-Y als bindendes Protein

Die tatsächliche Bindung des Transkriptionsfaktors NF-Y an die entsprechende Repeatsequenz der PERV LTR wurde mittels Supershift Assays mit spezifischen anti-NF-Y Antikörpern nachgewiesen. Die verwendeten Antikörper waren jeweils gegen eine der drei Untereinheiten von NF-Y gerichtet.

Eine Verschiebung der Proteinkomplexe (Abbildung 3-17, Spur 2) und die Ausbildung eines Supershifts war bei Verwendung aller Antikörper festzustellen. Diese waren gegen die C-terminalen Enden der NF-Y Untereinheiten A (Abbildung 3-17, Spur 3), B (Abbildung 3-17, Spur 4) und C (Abbildung 3-17, Spur 5) gerichtet, ebenso gegen das N-terminale Ende der Untereinheit C (Abbildung 3-17, Spur 6). Im Gegensatz dazu führte die Verwendung eines unspezifischen Antikörpers, der gegen NF-KB gerichtet war, zu keiner Verschiebung der Proteinkomplexe (Daten nicht gezeigt), das Bandenmuster war identisch zu jenem der Ansätze ohne Antikörper (Abbildung 3-17, Spur 2). Bei Ansätzen mit anti-NF-Y IgG aber ohne

Zellkernextrakte konnte kein Proteinkomplex detektiert werden (Abbildung 3-17, Spur 7), die Ergebnisse waren identisch zur Negativkontrolle (Abbildung 3-17, Spur 1). Die Verwendung des CBF-Konsensusoligonukleotides in Kombination mit anti-NF-Y IgG führte zur Ausbildung von verschobenen Protein-Komplexen identisch zu den bereits beschriebenen (Abbildung 3-17, Spur 6). Die Verschiebung der Protein-Komplexe mit Ausbildung eines Supershifts konnte neben den Zellkernproteinen der Zelllinie 293 auch für jene der Zelllinien A3.01, HeLa und PK15 nachgewiesen werden, nicht jedoch für MRC-5 Zellen (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3-17: Supershift Assay zum Nachweis der NF-Y Bindung.** Supershifts (Pfeil) wurden durch die Verwendung von Antikörpern, die gegen das C-terminale Ende der drei Untereinheiten von NF-Y (A, B und C) und das N-terminale Ende der Untereinheit C gerichtet waren mit Zellkernproteinen der Zelllinie 293 generiert. Das CBF Konsensusoligonukleotid wurde als Positivkontrolle verwendet.

## 3.2 HERV-K Expression in transgenen Mäusen

### 3.2.1 Etablierung HERV-K transgener Mäuse

Für die Herstellung HERV-K transgener Mäuse waren zwei Expressionsvektoren konstruiert worden (siehe Abbildung 2-1). Das Transgen HERV-K beinhaltet die komplette HERV-K Sequenz einschließlich der Gene *gag*, *pro/pol* und *env*, jedoch ohne die flankierenden LTRs. Das zweite Transgen, Env2, beinhaltet dagegen lediglich die *env*-Sequenz von HERV-K einschließlich des Rec-Corf Segmentes. Beide Konstrukte wurden durch den heterologen CMV Promotor getrieben.

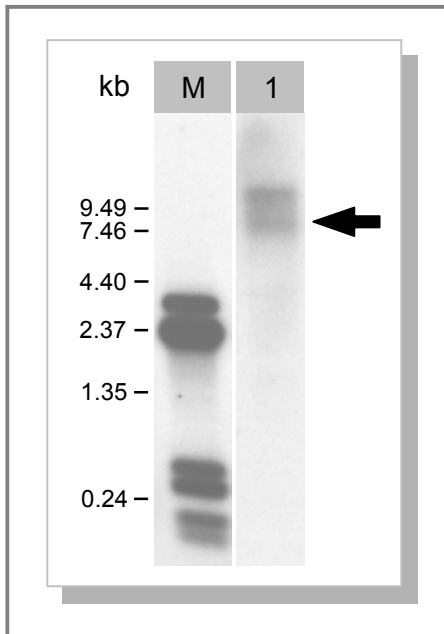
Von den fünf transgenen HERV-K Gründer-Tieren zeigten zwei Männchen (HERV-K-10 und HERV-K-11) die Existenz des transgenen Konstrukts in hoher Kopienzahl. Von den Tieren der Env2 Gründer-Generation war eine Verankerung des Transgens im Genom der Tiere in hoher Kopienzahl für vier Männchen (Env2-1, Env2-5, Env2-6 und Env2-8) nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Bei den per Southern Blotting mit der Env-Sonde envBX0.5 (siehe 2.5.17.1; Tönjes *et al.* 1997b) durchgeführten Untersuchungen konnte aufgrund der stringenten Hybridisierungsbedingungen und der Verwendung geeigneter Kontrollen eine Kreuzreaktion mit *env*-Sequenzen muriner Retroviren ausgeschlossen werden.

Ausgehend von den Tieren HERV-K-10 und HERV-K-11 wurden die Linien 404 und 405 gezüchtet, die Linien 406, 407 und 408 wurden ausgehend von den Tieren Env2-5, Env2-8 und Env2-6 etabliert. Die Linie 409, welche auf das Gründer-Tier Env2-1 zurückzuführen war, wurde nicht weiter gezüchtet, da eine Vererbung des Transgens an die Nachkommen nicht erfolgte (Daten nicht gezeigt).

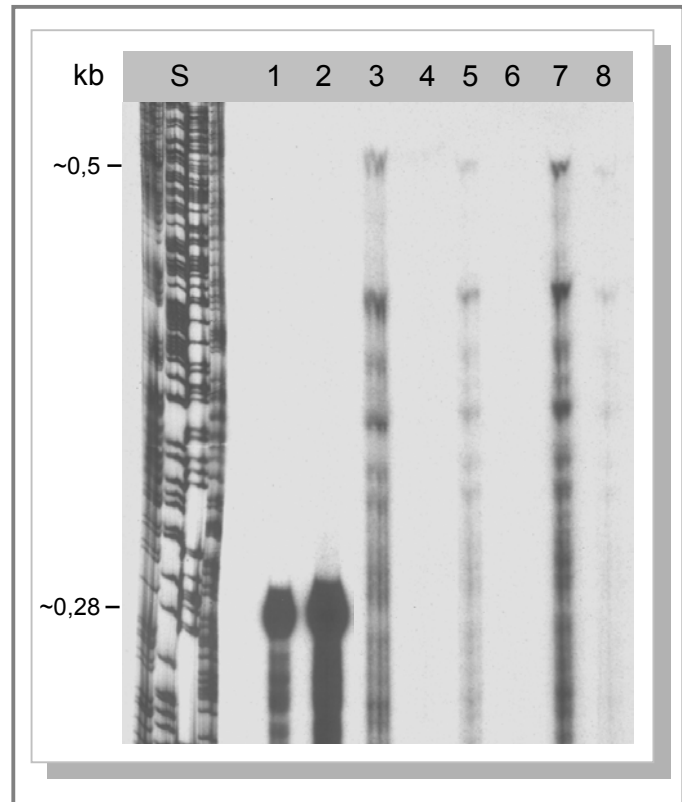
### 3.2.2 Expression transgener mRNA

Die Transkription der transgenen DNA wurde mit verschiedenen Methoden wie Northern Blotting, RPA oder RT-PCR untersucht. Northern Blots wurden mit RNA durchgeführt, die aus Gehirn, Lunge, Leber, Niere, Milz und Ovarien bzw. Hoden adulter Tiere aller transgenen Linien isoliert wurde. Eine Hybridisierung erfolgte mit der Env-Sonde envBX0.5 (Tönjes *et al.* 1997b). Eine schwache Expression transgener mRNA konnte dabei lediglich in Tieren der Linie 404 für Gewebe der Niere nachgewiesen werden (Abbildung 3-18). Die detektierte Bande von ~ 7,7 kb entspricht dabei der Länge der HERV-K Vollängen-RNA.





**Abbildung 3-18: Northern Blot zum Nachweis der mRNA Expression.** RNA wurde aus HERV-K transgenen Tieren der Gruppe 404 isoliert und mit der Sonde *envBX0.5* hybridisiert. Eine schwache mRNA Expression konnte lediglich in der Niere nachgewiesen werden (Spur 1, Pfeil). Die ~7,7 kb Bande entspricht der HERV-K Vollängen-RNA. M, Marker.



**Abbildung 3-19: RPA zum Nachweis der mRNA Expression.** RNA wurde aus HERV-K transgenen Tieren der Gruppe 404 isoliert. Die Hybridisierung erfolgte mit der ~0,5 kb Sonde *envBX0.5* (Spuren 3 – 8) sowie der ~0,28 kb Kontrollsonde *TRI-Actin Mouse* (Spuren 1 und 2). Spur 1, Leber (Kontroll-RNA AMS Biotechnology); Spur 2, Leber; Spur 3, Lunge; Spur 4, Ovar; Spur 5, Milz; Spur 6, Leber; Spur 7, Niere; Spur 8, Gehirn; S, Sequenzierreaktion *envBX0.5*.

Hinsichtlich der Ergebnisse, die mit Northern Blotting erzielt werden konnten, wurde ein hochsensitiver RPA durchgeführt, um die mRNA Expression zu untersuchen. Dabei wurden RNA-Proben der Gewebe aller transgenen Linien mit der *XhoI*-restringierten *Env*-Sonde *envBX0.5* hybridisiert. Für die transgenen Tiere der Linien 406, 407 und 408, die lediglich das *Env*-Konstrukt tragen, konnte dabei in keinem der Gewebe eine Transkription des retroviralen Gens detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu konnte bei Tieren der Linien 404 und 405, die Träger des HERV-K Vollängenkonstruktes sind, eine starke mRNA Expression in der Lunge und der Niere nachgewiesen werden (Abbildung 3-19 Spuren 3 und 7; Daten nicht gezeigt). Eine schwache Expression in der Milz und dem Gehirn der Tiere konnte ebenfalls gezeigt werden (Abbildung 3-19 Spuren 5 und 8; Daten nicht gezeigt). In Leber und Ovarien bzw. Hoden konnte dagegen keine HERV-spezifische RNA detektiert

werden. Wie Vorversuche zeigten, konnten mit der als Negativkontrolle verwendeten *Bam*HI-restringierten Env-Sonde (envBX0.5) keine Signale erzeugt werden.

Der Nachweis der HERV-RNA Expression mittels RT-PCR war nicht möglich, da die Ergebnisse aufgrund einer DNA Kontamination nicht eindeutig beurteilt werden konnten.

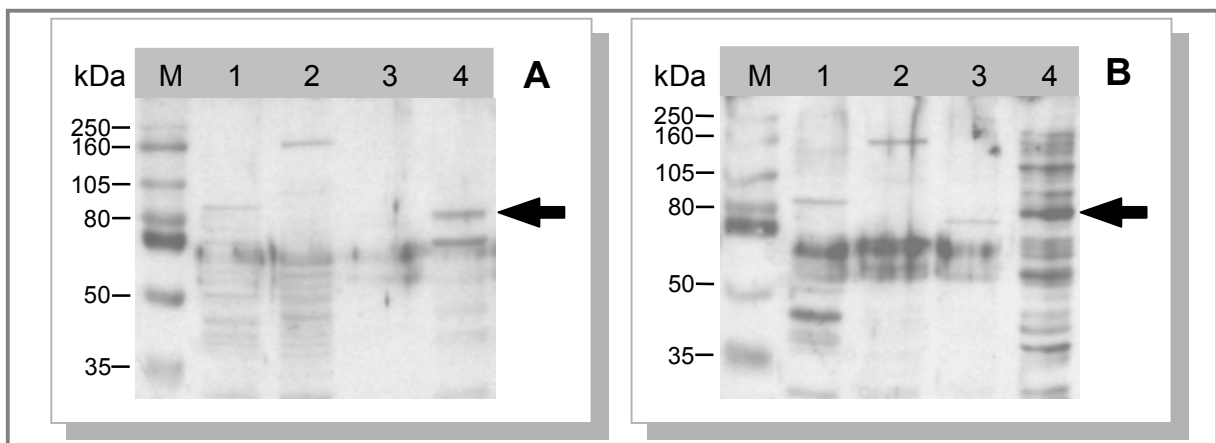
### 3.2.3 Expression retroviraler Proteine

Die mögliche Expression der retroviralen Proteine in den transgenen Tieren der Linien 404 und 405 wurde mittels Immuno Blotting und indirekter Immunfluoreszenz untersucht.

#### 3.2.3.1 Immuno Blot

Immuno Blots wurden mit Proteinen durchgeführt, die aus Niere, Leber und Lunge zweier adulter weiblicher Mäuse der Linie 404 isoliert wurden, ebenso mit Proteinen die aus einem Mamma-Adenokarzinom extrahiert wurden, welches von einem der beiden Tiere ausgebildet wurde (Abbildung 3-20A und B). Immuno Blots wurden mit dem gegen das Gag Protein gerichteten Antikörper  $\alpha$ -Gag durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden Proteinextrakte der HERV produzierenden Zelllinie GH verwendet.

Die Bildung des ~80 kDa großen Gag-Vorläuferproteins konnte in den Nieren beider Individuen nachgewiesen werden (Abbildung 3-20A und B, Spur 1). Im Gegensatz dazu konnte ein Nachweis in der Leber oder Lunge nicht erfolgen (Abbildung 3-20A und B, Spuren 2 und 3). Für das Mamma-Adenokarzinom konnte ebenfalls eine starke Expression des Gag Vorläufers gezeigt werden (Abbildung 3-20A, Spur 4), ebenso für die Proteinextrakte aus GH Zellen (Abbildung 3-20B, Spur 4).



**Abbildung 3-20: ImmunoBlot Analyse der HERV-K Expression.** Proteine wurden aus verschiedenen Geweben zweier adulter weiblicher Mäuse (A und B) der Linie 404 isoliert. Das ~80 kDa große Gag-Vorläuferprotein ist gekennzeichnet. Abbildung 4A: M, Marker; Spur 1, Niere; Spur 2, Leber; Spur 3, Lunge; Spur, 4 Mamma-Adenokarzinom. Abbildung 4B: M, Marker; Spur 1, Niere; Spur 2, Leber; Spur 3, Lunge; Spur 4, GH Zellen.

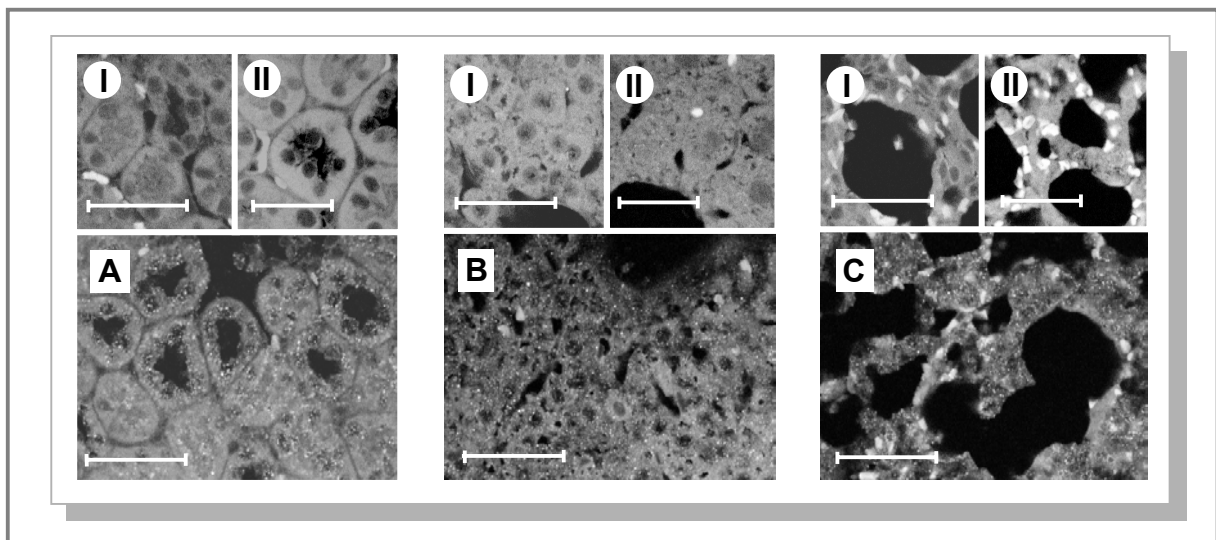
### 3.2.3.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Neben ImmunoBlot Assays wurde eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt, um die Expression der retroviralen Proteine zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Paraffinschnitte verschiedener Gewebe von neugeborenen und adulten Tieren der Linien 404 und 405 mit Antikörpern gegen Gag ( $\alpha$ -Gag) und Rec-Corf ( $\alpha$ -Corf) inkubiert.

#### 3.2.3.2.1 Gewebe neugeborener Tiere

Im Gewebe junger Mäuse (18 Tage alt) der Linien 404 (Abbildung 3-21) und 405 (Daten nicht gezeigt) konnte die Bildung von Gag in Nieren, Leber und Lunge nachgewiesen werden. Die Gag-positiven Signale waren dabei an keine Zellstruktur assoziiert, sondern vielmehr im gesamten Bereich des Zytoplasmas verteilt. Bei Behandlung der Gewebe mit Prä-immunserum konnte eine Detektion Gag-positiver Signale nicht erfolgen (Abbildung 3-21, Insert I), ebensowenig bei Inkubation von Geweben nicht-transgener Tiere mit  $\alpha$ -Gag (Abbildung 3-21, Insert II).

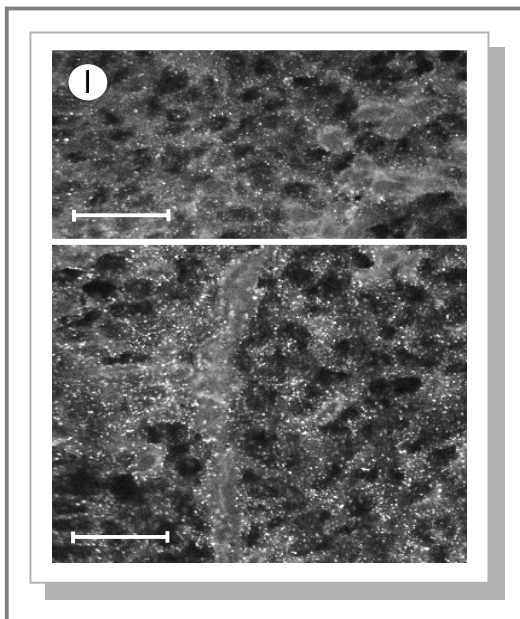
Im Gegensatz zu Gag konnte die Expression von Rec-Corf in den transgenen Jungtieren nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Eignung des  $\alpha$ -Corf Antikörpers konnte durch den Nachweis von Rec-Corf in GH Zellen demonstriert werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3-21: Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis der Gag Expression.** Zur Analyse wurden Paraffinschnitte von Niere (A), Leber (B) und Lunge (C) neugeborener Mäuse der Linie 404 verwendet. Die Schnitte wurden mit  $\alpha$ -Gag inkubiert, ebenso mit dem entsprechenden Prä-immunserum (Insert I). Als Negativkontrolle diente das Gewebe einer nicht-transgenen Maus, das mit  $\alpha$ -Gag inkubiert wurde (Insert II). Maßstab, 50  $\mu$ m.

### 3.2.3.2.2 Gewebe adulter Tiere

Bei adulten weiblichen Tieren der Linien 404 und 405 konnte eine Expression der retroviralen Proteine in keinem der untersuchten Gewebe (Niere, Leber und Lunge) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies galt sowohl für die Gag-Expression als auch für die Expression des Rec-Corf Proteins. Im Gegensatz dazu war eine starke Gag Expression im Gewebe eines Mamma-Adenokarzinoms, das von einer Maus der Linie 404 (Alter: 637 Tage) ausgebildet wurde, zu detektieren (Abbildung 3-21). Die Gag-positiven Signale waren dabei im gesamten Gewebe zu lokalisieren und keinem zellulären Element zuzuordnen.



**Abbildung 3-22: Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis der Gag Expression.** Zur Analyse wurden Paraffinschnitte eines Mamma-Adenokarzinoms einer adulten Maus der Linie 404 verwendet. Die Schnitte wurden mit  $\alpha$ -Gag inkubiert, ebenso mit dem entsprechenden Präimmenserum (Insert 1). Maßstab, 50  $\mu$ m.

### 3.2.4 Phänotyp der transgenen Mäuse

Während der Etablierung der transgenen Linien wurden Tiere, die natürlicherweise in hohem Alter verstorben waren oder Tiere, die aufgrund schwerwiegender gesundheitlicher Probleme abgesetzt wurden, hinsichtlich anatomischer oder histologischer Auffälligkeiten und Besonderheiten untersucht. In diesen Tieren, die alle transgenen Linien repräsentierten, ergaben die Autopsien keinerlei signifikanten Auffälligkeiten. Die Ausbildung von Tumoren konnte stets auf das hohe Alter des jeweiligen Individuums zurückgeführt werden. Die transgenen Tiere zeigten demnach einen normalen Phänotyp, zudem eine unveränderte Lebenserwartung sowie ein gewöhnliches Reproduktionsverhalten.

## 4 Diskussion

### 4.1 Transkriptionelle Regulation von PERV und deren Adaptation an ein xenotropes humanes Wirtssystem

#### 4.1.1 PERV LTRs: Verteilung im Genom sowie Struktur und Aufbau

Eine Southern Blot Analyse diente dazu, die Verteilung von PERV LTRs im porzinen Genom sowie in infizierten humanen Zellen zu untersuchen (Abbildung 3-1). Dabei zeigte sich nach *HincII*-Restriktion für das Genom des Minischweins sowie der Deutschen Landrasse ebenso eine gleichmäßige Verteilung der LTRs wie für das Genom der porzinen Nierenzelllinie PK15. Für das Genom der Deutschen Landrasse wurde die Existenz von ca. 50 PERV-Proviren nachgewiesen, von denen lediglich sechs Proviren ein intaktes Genom besitzen (Herring *et al.* 2001, Niebert *et al.* 2002). Der durchgeführte Southern Blot zeigt die Existenz von ungefähr 700 LTRs im porzinen Genom. Die LTR stellt den retroviralen Promotor dar und flankiert als dupliziertes Element beiderseits das integrierte Provirus. Im Gegensatz zu HERV-K, für das ungefähr 25.000 solitäre LTRs im humanen Genom vermutet werden (Leib-Mösch *et al.* 1993), kann daher bei PERV nicht von der Existenz zahlreicher solitärer LTRs, die ohne proviralen Kontext im Genom des Schweines verteilt sind, ausgegangen werden. Das Genom humaner 293 Zellen, die mit der porzinen Zelllinie PK15 ko-kultiviert wurden, zeigt im Gegensatz zu PK15 Zellen die Existenz von PERV LTRs an lediglich einem distinktem Genort. Diese Beobachtung ist auf die Infektion mit von PK15 Zellen freigesetzten PERV Virionen zurückzuführen.

Eine komplette retrovirale LTR besteht aus den Regionen U3, R und U5 (Coffin 1996, Rabson & Graves 1997). Die in dieser Arbeit untersuchten PERV LTRs zeigten diesen grundsätzlichen Aufbau (Abbildung 3-2). Dabei wies die Region U5 und insbesondere die R-Region eine große Homologie zu den entsprechenden Regionen eines anhand von Sequenzabgleichen konstruierten typischen C-Typ Retrovirus der Säuger auf (Chen *et al.* 1984). Homologien zu hochkonservierten Sequenzen (Chen *et al.* 1984, Golemis *et al.* 1990) konnten in der U3-Region dagegen nur im Bereich der äußersten Enden festgestellt werden. Das Kernelement der meisten Promotoren einschließlich derer aller Retroviren ist die TATA-Box, welche die initiale Bindung der RNA Polymerase an die DNA vermittelt (Rabson & Graves 1997). Die TATA-Box ist bei allen untersuchten PERV LTRs nahe dem 3'-Ende der U3 Region lokalisiert (Abbildung 3-2).

Die LTRs der PERV Molekularklone, die aus infizierten humanen Zellen der Zelllinie 293 isoliert wurden (Czauderna *et al.* 2000) wiesen als besonderes Merkmal die Existenz einer Repeatbox innerhalb der U3-Region auf. Diese Repeatbox besteht aus 39-bp Repeats in ver-

schiedener Anzahl, von denen jedes wiederum aus einem 18-bp Subrepeat und einem 21-bp Subrepeat aufgebaut ist (Abbildung 3-2). Die Existenz von Repeatelementen in viralen Promotoren ist seit langem bekannt (Fan 1990). So trägt der SV40 Promotor beispielsweise ein 72-bp Duplikat (Haegmann & Fiers 1980), die U3-Region von MoMuV beinhaltet Repeats zwischen 58 bp und 100 bp Länge (van Beveren *et al.* 1982), die von HTLV-I und HTLV-II trägt drei Kopien eines 21-bp langen Elements (Shimotohno *et al.* 1984, Paskalis *et al.* 1986), während die MDEV LTR mehr als sechs Kopien eines 80-bp langen Sequenzabschnittes aufweist (Wolgamot & Miller 1999).

#### 4.1.2 Adaptation der Promotorstruktur an den xenotropen Wirt

Die replikationskompetenten Molekularklone 293-PERV-B(33)/ATG und 293-PERV-B(43) (Czuderna *et al.* 2000) wurden für eine serielle Passagierung in der humanen Nierenzelllinie 293 verwendet. Nach einer initialen Transfektion wurden Überstände produktiv infizierter Zellen alle vier Wochen auf frische 293 Zellen übertragen. Im Verlauf der seriellen Passagierung konnte dabei eine schnelle Adaptation an das neue Wirtssystem auf der Ebene der transkriptionellen Regulation festgestellt werden.

Ausgehend von den Klonen 293-PERV-B(33), dessen LTR eine Repeatbox bestehend aus vier 39-bp Repeats beinhaltet, und 293-PERV-B(43) (2-fach 39-bp Repeat) konnten provirale LTRs mit amplifizierter oder reduzierter Repeatzahl nachgewiesen werden (Abbildung 3-3). Zwei dieser LTRs, 293-PERV-B(43)-746 (5-fach 39-bp Repeat) und 293-PERV-B(43)-590 (1-fach 39-bp Repeat), konnten keinem Provirus oder Molekularklon zugeordnet werden und waren bis dato unbekannt. Daneben konnte die Bildung einer LTR, die identisch zu der des Molekularklons 293-PERV-A(42) (3-fach 39-bp Repeat) war, ebenfalls nachgewiesen werden. Die Vervielfältigung spezifischer U3 Elemente der PERV LTR und deren Anordnung als Repeats ist dabei keine Folge der Passagierung in humanen Zellen. So zeigte die Analyse des Genoms der Deutschen Landrasse mittels BAC Klonen sowohl die Existenz einer kompletten PERV-B Provirus-Sequenz [Bac-PERV-B(192B9)], deren LTR nahezu identisch mit der des Molekularklons 293-PERV-A(42) ist und daher ein 3-fach 39-bp Repeat beinhaltet, als auch das Vorhandensein einer kompletten PERV-A Provirus-Sequenz [Bac-PERV-A(463H12)], die, analog zu der LTR des Molekularklons 293-PERV-B(43), ein 2-fach 39-bp Repeat trägt (Niebert *et al.* 2002). Darüber hinaus zeigte ein Klon [PK15-PERV-B(213)], der aus porzinen PK15 Zellen isoliert wurde, eine LTR, die mit 2-fach 39-bp Repeat identisch zu der des Molekularklons 293-PERV-B(43) ist (Krach *et al.* 2001).

Demnach stellt nicht etwa die Ausbildung der U3 Repeats eine Adaptation an den neuen xenotropen Wirt dar, sondern vielmehr die Modulation der Anzahl dieser Repeats. Dabei werden offensichtlich LTRs einer bestimmten Länge und damit einer definierten Repeatzahl

bevorzugt generiert (Abbildung 3-3A und B, Spuren 5), welche möglicherweise die für die Replikation in den humanen 293 Zellen optimale Anzahl an 39-bp Repeats beinhalten. Die Aktivität der PERV LTR nimmt in 293 Zellen *in vitro* mit der Anzahl der Repeats zu (Abbildung 3-7A). Berücksichtigt man die Anhäufung von LTRs mit moderater Repeatzahl in den späteren Passagierungszyklen, scheint eine stark verlängerte LTR jedoch negative Auswirkungen auf die Replikation des Retrovirus zu haben. Eine negative Selektion hinsichtlich der Repeatzahl ist beispielsweise durch eine übermäßige Nutzung zellulärer Transkriptionsmediatoren (z.B. Transkriptionsfaktoren) seitens des Retrovirus vorstellbar, welche zu einer Beeinträchtigung der zellulären Lebensfähigkeit führen könnte. So gelang es nicht, einen Luciferase-Vektor mit einer artifiziell verlängerte LTR mit 10-fach 39-bp Repeat stabil in 293 Zellen zu etablieren. Im Gegensatz zu einer CMV-Promotor vermittelten Luciferase-Expression zeigten die transfizierten Zellen hierbei deutliche Anzeichen einer Schädigung, so daß die Kultur nur wenige Tage überlebte (Daten nicht gezeigt).

Durch eine stark verlängerte LTR können weiterhin Interferenzen bei der Verpackung der viralen mRNA in das Viruspartikel auftreten, wie sie für MLV beschrieben wurden (Martiney *et al.* 1999). Hinsichtlich der geringen Länge der Repeats von lediglich 39 bp scheint dieser Mechanismus jedoch eher unwahrscheinlich (Coffin, unveröffentlicht). Neben der Regulation der Transkription ist die U3 Region auch an der Integration in die Wirts-DNA beteiligt (Shimotohno & Temin 1982). Da eine 80-bp Insertion in die U3 Region des RSV keinerlei Auswirkung auf diesen Vorgang hat (Shimotohno & Temin 1982), kann ein negativer Effekt durch die Multimerisierung eines 39-bp Repeats bei PERV als unwahrscheinlich angesehen werden. Die mehrheitliche Bildung von LTRs mit 2-fach oder 3-fach 39-bp Repeat am Ende der seriellen Passagierung stellt damit offensichtlich einen Kompromiß dar, der eine möglichst starke Transkription der viralen Gene bei gerade ausreichender Lebensfähigkeit der Zellen erlaubt und somit die maximale Replikation des Virus ermöglicht.

Der Mechanismus der Repeatvervielfältigung ist unbekannt. Eine Modell, das auch für PERV gültig sein könnte, beschreibt das "Verrutschen" (slippage) der RT, das leicht zur Generierung von Genomen unterschiedlicher Repeatzahl führen kann (Martiney *et al.* 1999). Wahrscheinlicher jedoch ist ein Modell, das von einem homologen Misannealing der RT ausgeht (Lenz, unveröffentlicht) und für MDEV beschrieben wurde (Wolgamot *et al.* 1999). Voraussetzung hierfür ist die Existenz kurzer Repeatsequenzen, die den eigentlichen Repeat flankieren und als Initiationspunkt der Vervielfältigung dienen. Im Falle der PERV LTR ist dies durch den solitären 18-bp Subrepeat gegeben, der stromabwärts direkt an die eigentliche Repeatbox anschließt (Abbildung 3-2). Da dieser mit einem 18-bp Subrepeat beginnt, wird die Repeatbox von zwei identischen Repeatelementen flankiert. Eine Duplizierung von Sequenzen, die beiderseits von kurzen Repeats flankiert werden, wurde für RSV beschrieben (Shimotohno & Temin 1982).

In Übereinstimmung zu MDEV, bei dem die Ausbildung und Vervielfältigung von U3 Repeaten bereits kurz nach dessen Aktivierung zu beobachten war (Wolgamot *et al.* 1999), ereignete sich die Vervielfältigung bzw. Reduktion der PERV Repeatzahl ebenfalls innerhalb der ersten vier Wochen der seriellen Passagierung (Abbildung 3-3A und B, Spuren 1). Im Gegensatz zu MDEV war dabei keinerlei Mutation innerhalb der Sequenz festzustellen.

#### 4.1.3 Vergleich der Provirusbelastung und Virionenfreisetzung in porzinen und infizierten humanen Zellen

Die Fähigkeit von PERV, *in-vitro* humane Zellen produktiv zu infizieren ist seit längerem bekannt und konnte in zahlreichen Infektionsstudien nachgewiesen werden (Patience *et al.* 1997, Martin *et al.* 1998, Wilson *et al.* 1998, Wilson *et al.* 2000). Überraschenderweise ist bislang jedoch nur die indirekte Quantifizierung der freigesetzten Virionen mittels RT-Test gut etabliert (Patience *et al.* 1997, Wilson *et al.* 1998, Czauderna *et al.* 2001), wohingegen Verfahren zur direkten Quantifizierung mittels Real-Time PCR kaum beschrieben worden sind (Powell *et al.* 2000). Aus diesem Grund wurde eine Real-Time PCR zur Quantifizierung der proviralen Kopien in infizierten Zellen ebenso etabliert, wie zur Bestimmung der Zellzahl durch Amplifikation des in einfacher Kopie vorliegenden Haushaltsgens PBGD (Tabelle 3-1). Durch diese Messungen war es möglich, die provirale Belastung zu bestimmen. Eine quantitative One-Step RT-PCR wurde etabliert, um die Anzahl der von infizierten Zellen freigesetzten Virionen zu bestimmen (Tabelle 3-1). Die PCRs basierten auf der unspezifischen Bindung des Farbstoffes SYBR Green I an das doppelsträngige Amplifikat (Wittwer *et al.* 1997) und wurden mit dem LightCycler Instrument durchgeführt.

Durch die Verwendung von Primern, die gegen das humane PBGD gerichtet waren, ergab die PCR auf der genomischen DNA der porzinen Zelllinie PK15 kein spezifisches PCR-Produkt. Die ermittelte Zellzahl in Tabelle 3-1 basierte auf der Untersuchung einer BAC-Bibliothek des Genoms eines Individuums der Deutschen Landrasse, in der 13 PERV Proviren pro haploidem chromosomalem Satz nachgewiesen werden konnten, die teilweise trunziert, zumindest das *pro/pol*-Gen trugen (Niebert *et al.* 2002). Ausgehend von der Anzahl proviraler Kopien in dieser Zelllinie, die mittels quantitativer PCR unter Verwendung *pro/pol*-spezifischer Primer bestimmt wurde, konnte somit die Zellzahl kalkuliert werden. Da jedoch das Genom lediglich eines Individuums untersucht wurde, kann nur ein ungefährender Wert angegeben werden, da eine Variation zwischen verschiedenen Individuen und zwischen dem Genom des Schweines und einer porzinen Zelllinie wahrscheinlich ist. Die Effizienz der PERV-PCR sowie der PBGD-PCR war annähernd identisch, so daß die Ergebnisse direkt in Relation zueinander gesetzt und die provirale Belastung berechnet werden konnte.



In der Zelllinie 293/PERV-PK (Patience *et al.* 1997), bestehend aus produktiv mit von der porzinen Zelllinie PK15 freigesetzten PERV-Virionen infizierten 293 Zellen, konnten  $2,01 \cdot 10^4$  PERV DNA Kopien in  $10^6$  Zellen nachgewiesen werden. In der Zelllinie 293/PERV-B(33), die aus 293 Zellen besteht, welche produktiv mit dem Moleklarklon 293-PERV-B(33)/ATG (Czuderna *et al.* 2000) infiziert wurden, lagen  $9,61 \cdot 10^3$  PERV DNA Kopien in  $10^6$  Zellen vor. Für die genomische DNA uninfizierter 293 Zellen ergab die PCR nach Auswertung der Schmelzkurvenanalyse (Abbildung 3-4B) lediglich fehlerhafte Produkte, so daß die Detektion falschpositiver Signale ausgeschlossen werden konnte. Ausgehend von der bereits beschriebenen Analyse der BAC-Klone kann für die porzine Zelllinie PK15 eine provirale Belastung von  $\sim 26 \cdot 10^6$  Proviren je  $10^6$  Zellen kalkuliert werden.

Bereits publizierte Angaben zu proviralen Belastungen anderer Retroviren können aufgrund der Verwendung verschiedener Detektionsmethoden oder unterschiedlicher PCR-Ansätze für den LightCycler und der daraus resultierenden unterschiedlichen Sensitivität nur indirekt mit den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen verglichen werden. So entsprach die provirale Belastung in PERV-infizierten 293 Zellen in etwa jener von HIV-1 in PBMCs seropositiver, unbehandelter Patienten (Ibanez *et al.* 1999), welche mittels quantitativer Nested-PCR unter Verwendung einer den Endpunkt limitierenden Verdünnung bestimmt wurde. Für HIV-2 wurde mittels LightCycler-PCR eine provirale Belastung von  $2,10 \cdot 10^3$  provirale Kopien je  $10^6$  PBMCs detektiert (Damond *et al.* 2001). Für HTLV-1 betrug die per TaqMan PCR detektierte mittlere provirale Belastung asymptotisch monoinfizierter Personen  $6,80 \cdot 10^3$  provirale Kopien je  $10^6$  PBMCs und  $5,80 \cdot 10^4$  provirale Kopien je  $10^6$  PBMCs in monoinfizierten Personen mit HTLV-1 assoziierter spastischer Paraparese (Cesaire *et al.* 2001). Patienten mit HTLV-1 assoziierter adulter T-Zell Leukämie trugen dagegen bis zu  $3 \cdot 10^6$  provirale Kopien je  $10^6$  mononukleärer Zellen, welche per LightCycler PCR quantifiziert wurden (Kamihara *et al.* 2000). Mit Ausnahme des letztgenannten Zitates wurde für PERV eine provirale Belastung detektiert, die in etwa der anderer Retroviren entspricht.

Die retrovirale Infektion einer Zelle verhindert eine erneute Infektion der gleichen Zelle durch Retroviren, die den gleichen Rezeptor nutzen (Hunter 1997). Schließt man eine Superinfektion, also die Infektion durch mehrere Viren, aus, kann daher für 293/PERV-B(33) Zellen, die definitiv mit einem PERV-B Moleklarklon infiziert wurden, von einem integrierten Provirus je Zelle ausgegangen werden. Demzufolge waren in dieser Kultur 0,96% aller Zellen durch PERV infiziert. Die Zellen der Linie 293/PERV-PK wurden mit einem Gemisch verschiedener PERV infiziert, die sowohl PERV-A als auch PERV-B angehören können und damit zwei unterschiedliche Rezeptoren nutzen. Demnach ist es möglich, daß die Zellen dieser Kultur auch zwei integrierte Proviren tragen könnten, wonach zwischen 1,00% und 2,01% der Zellen infiziert wären. Weiterhin kann die Existenz nicht-integrierter viraler DNA (unintegrated viral DNA, UVD) nicht ausgeschlossen werden, welche obligatorisch für den Replikations-

zyklus von Retroviren zu sein scheint (Mullins *et al.* 1986). Diesbezüglich könnte der Anteil tatsächlich infizierter Zellen auch geringer ausfallen.

Die detektierte Zahl von PERV RNA Kopien im Überstand infizierter Zellen lag zwischen  $1,30 \cdot 10^4$  Kopien/ $\mu$ l für porzine PK-15 Zellen und  $4,18 \cdot 10^4$  Kopien/ $\mu$ l für 293-PERV-B(33) Zellen. Im Überstand uninfizierter 293 Zellen ergab die PCR nach Auswertung der Schmelzkurvenanalyse (Abbildung 3-6B) lediglich fehlerhafte Produkte, so daß die Detektion falsch-positiver Signale ausgeschlossen werden konnte. Beim Vergleich dieser Daten mit publizierten Ergebnissen, die mit anderen Detektionsverfahren ermittelt wurden, zeigt sich deutlich die Schwierigkeit einer Bewertung. So wurden für die HIV-1 infizierte Zelllinie HUT4-3 mittels quantitativer radioaktiv-kompetetiver PCR zwischen  $1,20 \cdot 10^3$  und  $1,68 \cdot 10^4$  HIV-1 RNA Kopien/ $\mu$ l detektiert (Gratzl *et al.* 1997). Demzufolge hätten PERV und HIV-1 ein nahezu identisches Replikationspotential, eine Schlußfolgerung die in dieser Weise wohl eher nicht realistisch ist (Weiss 1998). Dennoch kann PERV als potentes Virus hinsichtlich der Transkription der retroviralen Gene sowie der Partikelzusammenlagerung und -freisetzung betrachtet werden. Diese Vermutung wird durch die Untersuchungen bezüglich der Stärke des PERV Promotors unterstützt (siehe 3.1.5).

Ausgehend von der RNA Kopienzahl wurde unter Berücksichtigung des diploiden RNA Genoms der Retroviren (Coffin 1996) die Anzahl der von einer infizierten Zelle freigesetzten Virionen berechnet. Jede infizierte Zelle der Linie 293/PERV-PK setzte demnach zum Meßzeitpunkt zwischen 1,59 Virionen (bei einfacher Infektion) und 3,18 Virionen (bei simultaner Infektion durch PERV-A und PERV-B) frei. Im Gegensatz dazu wurden von jeder infizierten Zelle der Linie 293/PERV-B(33) 4,51 Virionen freigesetzt, womit die Virusfreisetzung bei diesen Zellen, die mit einem definierten Molekularklon infiziert wurden, um den Faktor 2,8 bzw. 1,4 gegenüber Zellen, die mit einem Gemisch verschiedener PERV infiziert waren, erhöht ist. Die LTR des Molekularklons 293-PERV-B(33) trägt mit vier Kopien des 39-bp Repeats (Abbildung 3-2) die längste Repeatbox aller bekannten PERV Klone und zeigt im Reporteragen-Assay eine deutlich erhöhte LTR Aktivität (siehe 3.1.5). Damit existiert offensichtlich ein direkter Zusammenhang zwischen der Promotorstärke und der Virusproduktion, so daß Zellen der Linie 293/PERV-B(33) aufgrund der konstant hohen LTR Aktivität deutlich mehr Viruspartikel produzieren und freisetzen als 293/PERV-PK Zellen.

Ausgehend von der geschätzten Anzahl porziner PK15 Zellen (siehe oben) ergab sich für diese Zelllinie eine Virionenbildung von 7,28 Partikeln pro Zelle. Wie beschrieben wurden drei verschiedene Molekularklone, 293-PERV-B(33), 293-PERV-A(42) und 293-PERV-B(43) aus infizierten, mit PK15 Zellen kokultivierten humanen 293 Zellen isoliert, deren LTRs eine Repeatstruktur aufwiesen (Czauderna *et al.* 2000). Aus einer genomischen PK15 Bibliothek gelang die Isolation von zwei Molekularklonen, die zu zwei dieser Klone [293-PERV-A(42) und 293-PERV-B(43)] identisch waren, darüberhinaus wurden weiter drei Molekularklone

identifiziert, die sich von diesen insbesondere auch in der LTR Struktur unterscheiden (Krach *et al.* 2001). Demnach liegen im Genom dieser Zelllinie zwei PERV Proviren vor, die aufgrund ihrer LTR Struktur eine hohe transkriptionelle Aktivität zeigen, daneben drei Proviren, deren LTR lediglich eine basale Aktivität aufweist (siehe 4.1.4). In Kombination werden ausgehend von diesen fünf Proviren in der porzinen Zelllinie mehr Partikel gebildet als von infizierten humanen Zelllinien, die, wie im Falle von 293/PERV-PK Zellen maximal zwei integrierte PERV-Proviren beinhalten oder im Falle von 293/PERV-B(33) maximal ein integriertes Provirus tragen.

#### 4.1.4 Promotoraktivität der PERV LTR

Neben dem Vorhandensein PERV-spezifischer Rezeptoren (Takeuchi *et al.* 1998), die dem rezeptorvermittelten Eintritt des Virus in die Wirtszelle dienen, stellt die Aktivität der PERV LTR in dieser Zelle die Voraussetzung für eine produktive Infektion dar. Mittels eines dualen Reporter-gen Assays wurde die Aktivität verschiedener nativer und artifiziell deletierter PERV LTRs (Abbildung 3-2) im Vergleich zu der des SV40 Promotors und einer RSV LTR bestimmt. In verschiedenen humanen und anderen Säugerzelllinien zeigten Repeat-tragende PERV LTR [293-PERV-B(43)-746, 293-PERV-B(33), 293-PERV-A(42), 293-PERV-B(43), 293-PERV-B(43)-590] eine starke Promotoraktivität, während diese für nativ Repeat-lose [PK15-PERV-A(58), PERV-C] und artifiziell deletierte LTRs [293-PERV-B(43)- $\Delta$ , 293-PERV-B(43)-Zero] deutlich reduziert war (Abbildung 3-7, Tabelle 3-2).

Ausgehend von Untersuchungen die mit SV40 (Benoit & Chambon 1981), MLV (Martiney *et al.* 1999) und MDEV (Wolgamot & Miller 1999) durchgeführt wurden, ist zu vermuten, daß die Verlängerung der PERV LTR bei gleichzeitiger Verstärkung der transkriptionellen Aktivität mit der Multimerisierung eines Enhancer-Elementes einhergeht. Die Existenz von Enhancer-Elementen in mehrfacher Anzahl führte bei ALV und RSV ebenfalls zu einer erhöhten Transkriptionsrate (Ruddell 1995). Bei den artifiziell deletierten, Repeat-losen LTR ist die verbleibende Aktivität analog zum MoMuSV (Laimins *et al.* 1984) wahrscheinlich auf die Existenz weiterer regulatorischer Elemente zurückzuführen, die außerhalb der Repeatbox lokalisiert sind.

Im Gegensatz zu humanen, simianen und caninen Zelllinien zeigte die 293-PERV-B(43)-Zero LTR in der felines Zelllinie PG-4 sowie den porzinen Zelllinien PK15 und ST-Iowa eine starke Promotoraktivität, die vergleichbar zu der einer LTR mit 4-fach 39-bp Repeat war (Tabelle 3-2). Offenbar kommen positiv regulatorische Effekte der Repeatbox in diesen Zellen erst dann zum tragen, wenn ein Schwellenwert von 4-fach 39-bp Repeats überschritten wird, wie eine nochmalige Zunahme der Aktivität der 293-PERV-B(43)-746 LTR mit 5-fach 39-bp Repeat zeigte. Dieser Schwellenwert-Effekt könnte durch negativ regulatorische Elemente, die au-

ßerhalb der Repeatbox liegen und die in diesen Zellen aktiv sind, hervorgerufen werden. Solche suppressiven Elemente wurden bereits für MLV (Ch'ang *et al.* 1989) und MMTV (Overhauser & Fan 1985) beschrieben.

Virale Promotoren und Enhancer von CMV (Boshart *et al.* 1985), RSV (Norton & Coffin 1987) und SV40 (Benoist & Chambon 1981) stellen geeignete Elemente zur Durchführung von Gentransfers oder der Genexpression dar (Zarrin *et al.* 1999). Unter Berücksichtigung der Aktivitäten dieser Promotoren in lymphoiden B- oder T-Zelllinien (Zarrin *et al.* 1999) scheinen die untersuchten Repeat-tragenden PERV Promotoren ebenfalls für den Einsatz in der Gentherapie, dem Gentransfer oder bei Anwendungen, die eine starke Expression erfordern, geeignet zu sein. Ausgehend von der Beobachtung, daß die Aktivität der PERV LTR mit der Repeatzahl zunimmt, wurde daher per PCR eine LTR generiert, in der der 39-bp Repeat 10-fach vorhanden war [293-PERV-B(43)-1000 LTR]. In humanen Zellen zeigte diese LTR eine nochmals verstärkte Aktivität gegenüber der bislang aktivsten LTR 293-PERV-B(43)-746 (Abbildung 3-10). In den Zelllinien 293 und A3.01 wies die neue LTR eine höhere Aktivität auf als der CMV Promotor, der als stärkster bekannter konstitutiver Promotor gilt (Boshart *et al.* 1985). Für Ansätze, in denen eine kurzzeitige Expression wünschenswert ist, stellt diese 293-PERV-B(43)-1000 LTR daher eine wirkungsvolle Alternative zum CMV Promotor dar. Deren Eignung für Anwendungen in einer Langzeitexpression sollte mittels stabiler Transfektion und Expression des Luciferase-Gens im Vergleich zum CMV Promotor untersucht werden. Die 293-PERV-B(43)-1000 LTR transfizierten Zellen zeigten jedoch deutliche Anzeichen einer Schädigung, so daß ein Vergleich nicht gezogen werden konnte (Daten nicht gezeigt, siehe S. 75).

Wie bereits für JSRV (Palmarini *et al.* 2000), das Maedi-Visna Virus (Agnarsdóttir *et al.* 2000) und RSV (Ruddell 1995) beschrieben wurde, determiniert die zellspezifische Aktivität einer retroviralen LTR den viralen Zelltropismus. PERV-A und PERV-B, die von porzinen Zellen freigesetzt werden, können *in-vitro* humane Zellen infizieren (Patience *et al.* 1997, Martin *et al.* 1998, Wilson *et al.* 1998, Wilson *et al.* 2000, van der Laan *et al.* 2000). PERV-B Molekularklone sind replikationskompetent in 293 Zellen (Czauderna *et al.* 2000), in geringerem Maße auch in A3.01 Zellen (Fischer, unveröffentlicht), während PERV-A Molekularklone in HeLa Zellen und D17 Zellen Replikationskompetenz aufweisen (Krach *et al.* 2001, Niebert *et al.* 2002). Die PERV LTRs dieser Klone zeigten in den entsprechenden Zellen eine starke Promotoraktivität, was neben der Existenz PERV-spezifischer Rezeptoren (Takeuchi *et al.* 1998) die Voraussetzung für eine produktive Infektion darstellt. Aufgrund der geringen LTR-Aktivität in humanen MRC-5 Zellen können diese nicht infiziert werden (Fischer, unveröffentlicht), darüber hinaus zeigten MRC-5 Zellen nur eine geringe Suszeptibilität gegenüber pseudotypisiertem MLV (Takeuchi *et al.* 1998). Aufgrund fehlender PERV-Rezeptoren (Takeuchi *et al.* 1998) wird die Zelllinie Cos-7 trotz einer starken Aktivität der PERV LTR eben-

falls replikationsdefizient sein. Die bifaktorielle Determination des Wirtstropismus wird am Beispiel der felines Zelllinie PG-4 deutlich, welche ein hohes Replikationspotential für PERV-A zeigt (Krach *et al.* 2001), obwohl die 293-PERV-A(42) LTR im Reportergeren Assay in diesen Zellen keine signifikant erhöhte Aktivität gegenüber PERV-B LTRs aufwies.

#### 4.1.5 Transkriptionelle Regulation der PERV Promotor-Aktivität

Nach Integration des Retrovirus in das Genom der Wirtszelle liegt dieses im Status eines zellulären Gens vor (Vogt 1997) und ist somit für seine Replikation nahezu vollständig von der zelleigenen Maschinerie der Genexpression abhängig (Rabson & Graves 1997). Zwar unterstützt diese Strategie virale Genome, die nur für wenige Proteine kodieren, es müssen jedoch gleichzeitig eine Vielzahl *cis*-aktiver Elemente die Mechanismen der zellulären Genexpression aktivieren und steuern, insbesondere die Initiierung der Transkription durch die zelluläre RNA Polymerase II (Rabson & Graves 1997). Das Kernelement der meisten Promotoren, so auch der aller Retroviren inklusive PERV (Abbildung 3-2), ist die TATA-Box, an welche in einem initialen Schritt verschiedene Proteine binden (TATA-Binding Protein, DNA-Binding Polypeptide), die für die Anlagerung und Aktivierung der RNA Polymerase II essentiell sind. Die durch diese basale Maschinerie initiierte Transkription wird durch regulatorische Kontrollelemente moduliert, welche als Enhancer bezeichnet werden und meist stromaufwärts der TATA-Box in bis zu 1 kb Entfernung liegen (zusammengefaßt in Rabson & Graves 1997).

Ausgehend von der Beobachtung, daß die LTR-Aktivität der Repeat-tragenden 293-PERV-B(43)-746 LTR 67-fach stärker ist als die der artifiziell Repeat-losen 293-PERV-B(43)- $\Delta$  LTR, 37-fach stärker als die der nativ Repeat-losen PK15-PERV-A(58) LTR und sogar 197-fach stärker als die der ebenfalls nativ Repeat-losen PERV-C LTR, liegt der Schluß nahe, daß die Repeatbox ein Enhancer-Element beinhaltet. Die Lokalisation von Enhancern innerhalb solcher Repeats ist eine typische retrovirale Eigenschaft (Laimins *et al.* 1984, Fan 1990). Ebenso wurde beschrieben, daß die Deletion dieser Elemente eine starke Reduktion der ursprünglichen Promotoraktivität bewirkt (94% im Falle von RSV; Cullen *et al.* 1985). Um diese Hypothese zu prüfen wurde untersucht, inwieweit die 4-fach 39-bp Repeatbox der 293-PERV-B(33) LTR die Aktivität des SV40 Promotors in Abhängigkeit von Lage und Orientierung beeinflusst (Abbildung 3-11). Die Repeatbox vermittelte dabei in 293 und A3.01 Zellen eine erhöhte Aktivität des heterologen Promotors, unabhängig von der Lage und Orientierung und im Falle der stromabwärts des *luciferase*-Gens klonierten Konstrukte über eine Distanz von 2.200 bp hinweg. Die Repeatbox zeigt somit die klassischen Eigenschaften eines Enhancers (Khoury & Gruss 1983, Dynan 1985, Picard 1985, Jeang & Khoury 1988, Black-

wood & Kadonaga 1998). In beiden Zelllinien bewirkte die Orientierung stromaufwärts/vorwärts die stärkste Aktivierung (Abbildung 3-11).

In HeLa Zellen konnte dagegen nur eine geringe Aktivierung für die beiden stromaufwärtigen Konstrukte detektiert werden. In der Orientierung stromabwärts/vorwärts war die Aktivität nahezu identisch zu der des solitären SV40 Promotors, während in der Orientierung stromabwärts/revers sogar eine Reduktion der Promotorstärke erfolgte (Abbildung 3-11). Ursache hierfür könnte die *per se* starke Aktivität des SV40 Promotors in HeLa Zellen sein (Abbildung 3-7C), die, insbesondere durch den Transkriptionsfaktor SP1 stimuliert (Dyanan & Tijan 1983), keinen Spielraum für eine weitreichende Modulation seitens der PERV Repeatbox erlaubt. Dennoch bleibt festzuhalten, daß die Aktivität des in diesen Zellen außerordentlich starken SV40 Promotors durch die Repeatbox weiter erhöht werden konnte. In Übereinstimmung mit der schwachen Aktivität der PERV LTRs in MRC-5 Zellen (Abbildung 3-7), hatte die LTR-Repeatbox keinerlei Einfluß auf die Aktivität des SV40 Promotors (Abbildung 3-11).

Zusätzlich zu den Versuchen, die sich auf die Modulation des heterologen Promotors beziehen, wurde der Einfluß der 4-fach 39-bp Repeatbox in Abhängigkeit von Lage und Orientierung auf die homologe, artifiziell deletierte 293-PERV-B(43)-Zero LTR untersucht, die selbst keine Repeat-Elemente beinhaltet (Abbildung 3-2B, 3-12). Da die Repeatbox direkt stromauf- bzw. stromabwärts der Zero-LTR in beiden Orientierungen kloniert wurde, entsprachen die neuen Konstrukte einer 293-PERV-B(33) LTR mit dislozierter Repeatbox. In allen getesteten Zelllinien bewirkte diese Repeatbox eine Steigerung der Aktivität der Deletionsmutante unabhängig von ihrer Lage und Orientierung was einen weiteren Nachweis der Enhancer-Eigenschaften der Repeatbox darstellt. Im Gegensatz zum heterologen SV40 Promotor wurde die stärkste Aktivierung für die stromabwärts/revers angeordneten Konstrukte detektiert, die in A3.01 Zellen 73,4% der Aktivität der 293-PERV-B(33) LTR erreichten, in 293 Zellen 57,3% und in HeLa Zellen 45,3%. Die geringste Aktivitätssteigerung war bei stromaufwärts/vorwärts-Konstrukten zu beobachten, in HeLa Zellen erreichten diese lediglich 20,7% der 293-PERV-B(33) Aktivität, in A3.01 Zellen 13,7% und in 293 Zellen 12,7%. Demzufolge spielt sowohl die Orientierung der Repeatbox als auch ihre Lage innerhalb der gesamten LTR eine bedeutende Rolle für die Stärke des Promotors. Die offensichtlichen Folgen einer räumlichen Neugruppierung ("spacing") können mit einer Abschwächung des Enhancers erklärt werden ("enhancer silencing"; Bonifer 2000).

Die 4-fach 39-bp Repeatbox selbst zeigte eine schwache Promotoraktivität, sobald sie in den Promotor-losen Luciferase-Vektor pGL3 Basic stromaufwärts des *luciferase*-Gens in beiden Orientierungen kloniert wurde. Eine schwache Initiation der Transkription in Abwesenheit des eigentlichen Promotors ist eine kennzeichnende Eigenschaft von Enhancer-Elementen (Lang & Spandidos 1986) und wurde bereits für den SV40 72-bp Repeat beschrieben (Moreau *et*

*al.* 1981, Wasylyk *et al.* 1983), ebenso für den Enhancer des BPV (Campo *et al.* 1983) und des MoMuSV (Lang *et al.* 1983).

Um weitere transkriptionell regulatorische Elemente innerhalb der PERV LTR zu lokalisieren, wurden ausgehend von der 293-PERV-B(33) LTR artifiziell veränderte LTRs hergestellt, bei denen komplette Strukturelemente per PCR deletiert waren (Abbildung 3-8). Diese zeigten in humanen (293, A3.01, HeLa) und porzinen (PK15) Zellen Promotoraktivitäten, die sich teilweise signifikant von denen der nativen LTR unterschieden (Tabelle 3-2).

Da die Mehrheit der *cis*-aktiven Elemente in der U3 Region lokalisiert ist (Rabson & Graves 1997), führt die komplette Deletion dieser Region [293-PERV-B(33)- $\Delta$ E] folgerichtig zu einem kompletten Verlust der Promotoraktivität, die Reporterexpression liegt im Bereich der Negativkontrolle pGL3 Basic. Wie bereits beschrieben, führt die Deletion des in der Repeatbox lokalisierten retroviralen Enhancers [293-PERV-B(43)-Zero] zu einer signifikanten Reduktion der Promotorstärke in allen getesteten humanen Zelllinien (siehe 4.1.4). Dieser Effekt kann durch eine zusätzliche Deletion der U3 Bereiche, welche stromaufwärts der Repeatbox lokalisiert sind [293-PERV-B(33)- $\Delta$ B], potenziert werden. Dieses Phänomen war bei allen humanen Zellen zu detektieren, aber auch in der porzinen Zelllinie PK15, bei welcher die alleinige Deletion der Repeatbox keinerlei Auswirkungen auf die Promotorstärke hatte. In diesen Zellen führte die Deletion aller U3 Elemente mit Ausnahme der Repeatbox [293-PERV-B(33)- $\Delta$ F] ebenfalls zu einer Verminderung der LTR Aktivität. Ausgehend von diesen Beobachtungen ist zu vermuten, daß neben dem Enhancer und der stromabwärts davon lokalisierten TATA-Box noch weitere *cis*-aktive Elemente in der U3 Region stromaufwärts der Repeatbox lokalisiert sind. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der statistischen Transkriptionsfaktor Analyse bestätigt (Abbildung 3-15), welche zahlreiche Bindungsstellen in diesem Bereich offenbarte.

Nach Deletion der R-Region [293-PERV-B(33)- $\Delta$ G] war in allen Zellen eine signifikante Zunahme der Promotorstärke festzustellen, ebenso nach Deletion der R- und U5-Regionen [293-PERV-B(33)- $\Delta$ D] in den Zelllinien 293 und A3.01. Im proviralen Kontext ist die R Region mit dem Beginn der Transkription innerhalb der 5'-LTR assoziiert (Rabson & Graves 1997). Sequenzabschnitte dieser Region im Genom komplexer Retroviren, die wie HIV-1 (Hauber & Cullen 1988), HTLV-1 (Inoue *et al.* 1987) und BLV (Derse & Casey 1986) für Transaktivatoren kodieren, beinhalten Bindungssequenzen für den jeweiligen Transaktivator. Folgerichtig führt die Deletion der R-Region bei HTLV-1 (Ohtani *et al.* 1987) und BLV (Derse & Casey 1986) zu verminderter Expression eines Reportergens, während Mutationen innerhalb der HIV-1 R-Region die basale Transkriptionsaktivität verringerte (Hauber & Cullen 1988). In Übereinstimmung zu PERV kodiert MLV nicht für transaktivierende Proteine (Cupelli & Lenz 1991, Czauderna *et al.* 2000). Dennoch führt eine Deletion der MLV R-Region zu einer Abnahme der entsprechenden LTR Aktivität (Cupelli & Lenz 1991), die mit dem Verlust des R

Region Stem Loop (RSL) in Zusammenhang gebracht wird. Dieser ist am 5'-Ende der R-Region zahlreicher Säuger-C-Typ-Retroviren lokalisiert (Cupelli *et al.* 1998, Trubetsky *et al.* 1999) und dient der postranskriptionellen zytoplasmatischen Akkumulation ungespleißter mRNA und ist so an Vermittlung der LTR Aktivität beteiligt (Trubetsky *et al.* 1999). Die Nukleotide, welche durch Basenpaarung die Ausbildung des RSL-Stammes bewerkstelligen, sind bei MLV, FeLV und C-Typ Retroviren im allgemeinen konserviert (Cupelli & Lenz 1991). Die entsprechenden Nukleotide der PERV LTR variieren dagegen deutlich zu diesen konservierten Sequenzen, so daß der berechnete Stem Loop sich in Größe und Form unterscheidet (Abbildung 3-9). Vorstellbar wäre demzufolge, daß dieser Stem Loop aufgrund struktureller Unterschiede nicht die gleiche Bedeutung für die transkriptionelle Regulation hat wie der RSL anderer C-Typ Retroviren und daher dessen Verlust keine Verringerung der LTR Aktivität bedingt. Andererseits kann davon ausgegangen werden, daß innerhalb der R-Region starke inhibitorische Elemente lokalisiert sind, deren Deletion zu einem starken Anstieg der transkriptionellen Aktivität führt. Solche Inhibitoren wurden bereits für die HTLV-1 LTR beschrieben, wo eine unkonventionelle Interaktion eines CREB-Faktors mit der R-Region eine Suppression der Aktivität hervorruft (Xu *et al.* 1994). Die Analyse potentieller Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren innerhalb der PERV R-Region fiel negativ aus, es konnten keine Bindungsstellen mit einer Sequenzhomologie von über 95% detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Für die R Regionen des MMTV sowie des BLV konnten Elemente, welche die Transkriptionsrate erhöhen, nachgewiesen werden (Pierce *et al.* 1993, Kiss-Tóth & Unk 1994). Ausgehend von der Aktivitätszunahme nach Deletion der R Region bei PERV kann davon ausgegangen werden, daß solche stromabwärts des Transkriptionsstartpunktes (cap) lokalisierte Elemente in der PERV LTR nicht vorhanden sind.

Retroviren nutzen für ihre Replikation ein breites Spektrum zellulärer Transkriptionsfaktoren, die sich, ubiquitär oder zellspezifisch exprimiert, von Virus zu Virus unterscheiden und damit dessen einzigartigen Replikationsmechanismus ermöglichen. Transkriptionsfaktoren können sowohl für die Ausbildung als auch für die Stabilisierung des initialen RNA Polymerase-DNA-Komplexes verantwortlich sein, ebenso für eine Neuordnung der Chromatinstruktur (Rabson & Graves 1997). Putative Transkriptionsfaktor Bindungsstellen innerhalb der U3 Region der Repeat-tragenden PERV LTRs wurden durch eine statistische Analyse lokalisiert (Abbildung 3-15). Die transkriptionelle Aktivität der PERV LTR wird nahezu ausschließlich durch den in der Repeatbox lokalisierten Enhancer vermittelt (siehe 4.1.4). Enhancer tragen üblicherweise Bindungsstellen für Proteine, welche regulierend in die Transkription eingreifen (Blackwood & Kadonaga 1998). Folgerichtig ergab die Transkriptionsfaktor-Analyse putative Bindungsstellen für den CCAAT-bindenden Transkriptionsfaktor NF-Y innerhalb eines jeden 39-bp Repeats (Abbildung 3-15). Die spezifische Bindung von Zellkernproteinen aus der Zelllinie 293 an diese Sequenzabschnitte konnte mittels EMSA unter Verwendung kurzer



Oligonukleotide, welche die putative Bindungsstelle beinhalteten, gezeigt werden, wobei es zur Ausbildung vier distinkter DNA-Protein-Komplexe kam (Abbildung 3-16). Durch Verwendung von Antikörpern, die spezifisch gegen die drei Untereinheiten von NF-Y gerichtet waren, konnte in Supershift-Experimenten gezeigt werden, daß das im EMSA detektierte Bandenmuster in der Tat auf eine Bindung von NF-Y an die Repeatsequenz der PERV LTR zurückzuführen war (Abbildung 3-17). Die Ausbildung eines Supershifts erfolgte bei Verwendung von Zellkernextrakten aller getesteten Zelllinien mit Ausnahme der humanen Zelllinie MRC-5.

Der Nucleus Factor Y (NF-Y) wird auch als CCAAT-binding Factor (CBF) bezeichnet und stellt einen ubiquitären, hochkonservierten heterotrimeren Transkriptionsfaktor dar (Maity & de Crombrughe 1998, Mantovani 1998). Die differenzierte Expression der drei NF-Y Untereinheiten (A, B und C) sowie zellspezifische Unterschiede bei der Synthese der Untereinheit A können in einzelnen Zellen jedoch zu variablen Aktivitäten führen (Marziali *et al.* 1999). Die wie Histone gefalteten Untereinheiten NF-Y-B und NF-Y-C bilden ein Heterodimer, die eigentliche DNA Bindung kann jedoch nur durch das Heterotrimer, das sich durch Interaktion von NF-Y-A mit dem NF-Y-B/NF-Y-C Heterodimer ausbildet, erfolgen (Liang & Maity 1998, Maity & de Crombrughe 1998, Mantovani 1998). In MRC-5 Zellen konnte eine mögliche Interaktion von NF-Y mit der PERV LTR Repeatsequenz nicht nachgewiesen werden. Übereinstimmend zeigten die LTRs in diesen Zellen lediglich eine basale Aktivität, der heterologe SV40 Promotors war durch die Repeatbox nicht zu beeinflussen. Da alle drei NF-Y Untereinheiten für die DNA Bindung essentiell sind, würde das Fehlen von NF-Y-A in MRC-5 Zellen die DNA Interaktion wirkungsvoll verhindern. Da funktionelles NF-Y mit anderen Transkriptionsmediatoren interagiert und so den transkriptionellen Prozeß reguliert (Wright *et al.* 1994, Jin & Scotto 1998), könnten die für MRC-5 Zellen gemachten Beobachtungen auch mit dem Fehlen eines solchen interaktiven Faktors erklärt werden. Die Zell- oder Gewebespezifität ist eine typische Eigenschaft von Enhancer-Elementen, die auf der Existenz oder dem Fehlen spezifischer Transkriptionsfaktoren beruht (Khoury & Gruss 1983).

#### **4.1.6 Immunsuppressiva haben keinen Einfluß auf die Promotor-Aktivität**

Im Falle einer Xenotransplantation wäre die massive Immunsuppression des Empfängers unumgänglich, um die Abstoßung des Xenotransplantats zu verhindern. Seit längerem ist bekannt, daß Immunsuppressiva oder Substanzen aus deren Stoffgruppen die Aktivität zellulärer und viraler Promotoren beeinflussen können (Beato *et al.* 1989, Jain *et al.* 1995, Serfling *et al.* 1995). Da PERV für die Anwendung der Xenotransplantation ein potentielles Risiko darstellt, wurde untersucht, ob Prednisolon (Pred) und Cyclosporin A (CysA), beides in der

Transplantationsmedizin routinemäßig eingesetzte Immunsuppressiva (Barry 1992), einen Einfluß auf den PERV Promotor haben.

Bei der Inkubation von transfizierten Zellen der T-Zelllinie A3.01 sowie der B-Zelllinie Bai/NJ mit Pred zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der Aktivität weder für die 293-PERV-B(33) LTR noch für die 293-PERV-A(42) LTR (Abbildung 3-13, Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu wurde die Aktivität einer als Positivkontrolle verwendeten MMTV LTR durch das Glucocorticoid in A3.01 Zellen um den Faktor 121,3 erhöht, in Bai/NJ Zellen um den Faktor 9,3, womit gezeigt werden konnte, daß beide Zelllinien für Pred suszeptibel waren. Die Induktion der Transkription von MMTV durch Glucocorticoide beruht auf der Interaktion des Hormonrezeptors mit regulatorischen DNA-Elementen (Beato *et al.* 1989). Die Analyse Glucocorticoid-responsiver Elemente (GRE) sowohl in Genen von Vertebraten als auch in retroviralen Promotoren offenbarte die konservierte GRE Sequenz 5'-GGTACAnnnTGTTCT-3' mit dem als Kernmotif fungierendem Hexanukleotid 5'-TGTTCT-3' (Beato *et al.* 1989), das in der U3 Region der MMTV LTR lokalisiert ist (Scheidereit & Beato 1984, Medh & Schmidt 1997). Für beide PERV LTRs [293-PERV-B(33) und 293-PERV-A(42)], die sich mit Ausnahme der Repeatzahl nur in einem SNP in U5 unterscheiden, konnte lediglich das Kernmotif nachgewiesen werden, welches in der U5 Region lokalisiert war (nt 687-692, Datenbank Nummer AJ133817). *In-silico* Analysen offenbarten eine putative hormon-responsive Region (HRR) in der U5 Region der 293-PERV-B(43) LTR, die sich von der 293-PERV-B(33) LTR lediglich in der Repeatzahl unterscheidet, sowie der 293-PERV-A(42) LTR, welche ein östrogenresponsives Element (ERE, estrogen responsive element) beinhaltet (Quinn & Langford 2001). Die HRR ist stromaufwärts des TGTTCT-Kernmotifs lokalisiert (nt 632-646, Datenbank Nummer AJ133817) und umfaßt den SNP der 293-PERV-A(42) LTR. Bedingt durch diesen SNP trägt die 293-PERV-A(42) LTR zwei Kopien der des ERE, während alle anderen LTRs lediglich eine solitäre ERE besitzen. Durch EMSA und Supershift Assay konnte gezeigt werden, daß an dieses duplizierte ERE der Glucocorticoidrezeptor bindet, ebenso der Östrogenrezeptor sowie der Progesteronrezeptor (Quinn & Langford 2001). Da weder die Promotoraktivität der 293-PERV-A(42) LTR durch das Glucocorticoid Pred beeinflusst wurde, noch die der 293-PERV-B(33) LTR, hat die mögliche Bindung des dimerisierten Glucocorticoidrezeptors an das TGTTCT-Kernmotif oder die HRR aufgrund deren Lokalisation stromabwärts des transkriptionellen Startpunktes keine Einfluß auf die Regulation der Promotoraktivität. Diese wird entweder durch die klassische Bindung des Rezeptors an regulatorische DNA Sequenzen vermittelt oder durch eine transkriptionelle Wechselwirkung des Glucocorticoidrezeptors mit Transkriptionsfaktoren (Göttlicher *et al.* 1998). Durch die Lokalisation der HRR in der U5 Region ist anzunehmen, daß die Expression der PERV-Gene auch durch andere Steroidhormone wie Östrogen oder Progesteron nicht reguliert werden kann. Für

HERV wurde ein weiteres GRE-Motiv, 5'-TGTTAT-3', beschrieben (Ono *et al.* 1986), zu dem jedoch kein Analogon innerhalb der PERV LTR Sequenz nachzuweisen war.

Ebenso wie für Pred konnte auch für CysA nach Inkubation transfizierter Zellen der Linien A3.01 und Bai/NJ keine signifikante Beeinflussung der 293-PERV-B(33) LTR festgestellt werden (Abbildung 3-14). Im Gegensatz dazu erfolgte nach Inkubation mit CysA eine Inhibierung des TPA/Iono stimulierten, als Positivkontrolle eingesetzten humanen IL-2 Promotors um den Faktor 53,4 in A3.01 Zellen und den Faktor 4,5 in Bai/NJ Zellen. Die Induktion des fakultativen IL-2 Promotors in T-Zellen durch TPA und Iono über den Ca<sup>2+</sup> Weg und dessen Inhibierung durch CysA ist ausführlich beschrieben (Jain *et al.* 1995, Serfling *et al.* 1995).

Da die Stärke des 293-PERV-B(33) Promotors, der in humanen Zellen *per se* eine hohe Aktivität zeigt (siehe 4.1.3), weder durch Pred noch durch CysA beeinflusst werden kann, ist wahrscheinlich, daß die unvermeidliche Behandlung von Empfängern eines Xenotransplantates mit Immunsuppressiva nicht die von der LTR ausgehenden Risiken und Gefahren (siehe 4.1.8) potenziert.

#### **4.1.7 Konsequenzen einer möglichen PERV Integration in das humane Genom nach erfolgreicher Xenotransplantation**

Wie beschrieben zeigen Repeat-tragende PERV LTRs in humanen Zellen eine außerordentlich starke Promotor-Aktivität, die insbesondere durch die in der U3 Region lokalisierte, aus 39-bp Repeats bestehende Repeatbox vermittelt wird, an deren Elemente der ubiquitäre Transkriptionsfaktor NF-Y bindet. Die Repeatbox selbst zeigt die Eigenschaften eines klassischen Enhancers und ist in der Lage, die Aktivität sowohl eines heterologen Promotors als auch einer homologen Repeat-losen LTR unabhängig von Lage und Orientierung zu potenzieren. Während einer seriellen Passagierung in humanen Zellen adaptierten PERV LTRs durch Veränderung der Repeatzahl und damit ihrer transkriptionellen Aktivität schnell an den neuen, xenotropen Wirt. Da aus dem porzinen Genom isolierte provirale PERV LTRs eine Repeatstruktur besitzen (Krach *et al.* 2001, Niebert *et al.* 2002), stellt nicht etwa die Ausbildung der Repeats eine Adaptation dar, sondern lediglich die Veränderung der Repeatzahl. Die Anzahl gebildeter Viruspartikel korreliert in infizierten humanen Zellen direkt mit der Repeatzahl der LTR und damit ihrer Aktivität. Eine Infektion des Xenotransplantatempfängers mit PERV und eine Integration der viralen RNA in das Wirtsgenom vorausgesetzt, ergeben sich ausgehend von diesen Ergebnissen spezifische Aspekte bezüglich der Sicherheit porziner Xenotransplantate.

Pathogene, durch die LTR vermittelte Effekte wurden für exogene (Khoury & Gruss 1983) und endogene Retroviren (Löwer 1999) sowie Transposons generell beschrieben (Yoder *et al.* 1997). Hinsichtlich ihrer Pathogenität können akut transformierende Retroviren, die für

virale Onkogene kodieren, welche vom Virus "erworbene" zelluläre Onkogene darstellen, von nicht-akut transformierenden unterschieden werden (Fan 1990). Nicht-akut transformierende Retroviren, die eine längere Latenz zeigen, aktivieren zelluläre Protoonkogene durch den retroviralen Promotor mittels eines Mechanismus, der als Promotor-Insertion bezeichnet wird (Fan 1990). Beeinflusst wird die Pathogenität des Virus dabei durch die transkriptionelle Aktivität und Gewebespezifität der LTR (Fan 1990). Ausgehend von der starken Promotoraktivität der PERV LTR, die in vielen Zelllinien nachgewiesen werden konnte, kann nach Insertion des retroviralen Genoms an einer beliebigen Stelle von einer effizienten Aktivierung potentieller Protoonkogene mit schneller Tumorausbildung ausgegangen werden. Der Mechanismus der Promotor-Insertion wurde erstmals für B-lymphoide Tumoren beschrieben, welche durch die Insertion eines ALV Provirus in unmittelbarer Nähe des *c-myc* Protoonkogens induziert wurde (Hayward *et al.* 1981). Ebenso konnte die Tumorgenese in Mäusen mit der Insertion muriner Retroviren in distinkte DNA Bereiche in Verbindung gebracht werden (Nusse & Varmus 1982, Cuypers *et al.* 1984).

Neben der klassischen Promotor-Insertion ist auch ein Mechanismus vorstellbar, der die Potenzierung zellulärer Protoonkogen-Promotoren durch den retroviralen Enhancer beschreibt (Fan 1990) und der demnach als Enhancer-Insertion bezeichnet werden müßte (Khoury & Gruss 1983). Virale Enhancer zeigen im Vergleich zu zellulären Enhancern stärkere Aktivitäten, da sie mit zellulären Genen konkurrieren müssen. Sie können die Aktivität zahlreicher zellulärer Promotoren beeinflussen und zwar unabhängig von ihrer Lage und Orientierung im Verhältnis zu diesem auch über weite Distanzen von bis zu 10 kb hinweg (Khoury & Gruss 1983, Rabson & Graves 1997). Demnach kann der generelle Prozeß der Onkogenese als LTR-bedingte Aktivierung zellulärer Protoonkogene angesehen werden, für den die Promotor-Insertion einen Sonderfall darstellt. Der direkte Zusammenhang zwischen der Anzahl von Enhancer-Elementen und der daraus resultierenden LTR-Aktivität mit der damit einher gehenden Pathogenität wurde ausführlich für MLV untersucht. So wiesen mutierte MLV LTR, die lediglich eine Kopie eines ansonsten als Tandem vorliegenden Enhancers beinhalteten, eine reduzierte Leukämogenität auf (Li *et al.* 1987), während ein Enhancer-Triplikat eine erhöhte Leukämogenität bewirkte (Belli *et al.* 1995). Das Vorhandensein von Bindungsstellen für spezifische Transkriptionsfaktoren hat dabei einen starken Einfluß auf die Verbreitung und Latenz der durch das Virus hervorgerufenen Erkrankung (Speck *et al.* 1990, Yoshimura *et al.* 1999). Die Aktivierung zellulärer Gene durch eine Enhancer-Insertion wurde nicht ausschließlich für Protoonkogene beschrieben. So bewirkt die endogene solitäre ERV-9 LTR, welche im Genom von Menschenaffen und Menschen konserviert vorliegt, die Aktivierung zellulärer Gene (Ling *et al.* 2002). Desweiteren aktiviert, wie *in-vitro* Studien zeigen, die solitäre HERV DQ-LTR13 die Transkription bestimmter DQB1 Gene und

hat so möglicherweise einen Einfluß auf die Ausbildung des Typ 1 Diabetes (Bieda, unveröffentlicht).

Die Adaptation der LTR-Struktur und damit der LTR-Aktivität, die während der seriellen Passagierung zu beobachten war, erlaubt, wie die Ergebnisse der quantitativen PCR belegen, die für die Wirtszelle maximal verträgliche Virusproduktion. Nach Freisetzung dieser Viruspartikel und einer Reinfektion des Transplantatempfängers kann, ebenso wie bei der Erstinfektion, die willkürliche Insertion der viralen DNA in das Wirtsgenom zu einer Disruption zellulärer Gene (Löwer 1999) und damit einem mutagenen Ereignis führen (Coffin 1996). Vorstellbar ist in diesem Zusammenhang die Disruption von Genen durch eine direkte Insertionsmutagenese (Yoder *et al.* 1997), ebenso das Einbringen viraler Spleißorte in das zelluläre Gen, die zu falsch gespleißten Produkten oder der Fusion von zellulären mit viralen Sequenzen führen könnten (Löwer 1999). Bedeutsam wird die virale Insertion insbesondere dann, wenn sie in kodierende Regionen von Protoonkogenen, Tumor-Suppressorgenen oder Genen, die für die Bekämpfung von Tumoren relevant sind, erfolgt (Löwer 1999).

Ein weiteres Risikopotential ergibt sich aus einer möglichen Rekombination der exogenen PERV Sequenzen mit humanen endogenen Sequenzen (Yoder *et al.* 1997, Löwer 1999) oder Sequenzen anderer exogener Erreger, in deren Folge hochpathogene Varianten entstehen könnten. Solche Rekombinanten mit endogenen Sequenzen, die mit der Ausbildung onkogener Viren verbunden sind, wurden in murinen Modellen ausführlich beschrieben (Coffin 1996; siehe unten). Der Austausch von LTR-Sequenzen während solcher Rekombinationsereignisse kann zu einer Zunahme der LTR-Aktivität und einer Erweiterung der Gewebespezifität führen, die mit einer Verstärkung der damit verbundenen Risiken einhergeht. Der Austausch von *env*-Sequenzen könnte dagegen Varianten generieren, welche neue Rezeptoren für den Eintritt in die Zielzelle nutzen und die damit über eine erweiterte Wirtsspezifität verfügen würden (Löwer *et al.* 1999). Erst kürzlich wurden ausgedehnte Rekombinationsereignisse von PERV in für die Transplantation vorgesehenen Westran Schweinen beschrieben, so daß die Rekombination mit humanen Sequenzen möglich erscheint (Lee *et al.* 2002). Es sei darauf hingewiesen, daß die in dieser Arbeit untersuchten Immunsuppressiva Pred und CysA keinen signifikanten Einfluß auf die Aktivität der PERV LTR hatten und somit die spezifischen, durch diese hervorgerufenen Risiken, nicht potenziert werden. Dennoch stellt ausgehend von den erhobenen Daten PERV ein Risiko für die Anwendung der Xenotransplantation dar, das sich primär auf den Transplantatempfänger selbst bezieht, aber auch, durch die mögliche Ausbildung pathogener Erreger durch Rekombination und Adaptation, Auswirkungen auf sein soziales Umfeld haben kann.

## 4.2 HERV-K Expression in transgenen Mäusen

Von allen Familien humaner endogener Retroviren stellt HERV-K jene dar, die aufgrund des intakten Genoms einiger Proviren am ehesten in der Lage wäre, infektiöse Viren zu bilden und damit den Status eines Retrovirus mit exogenem Lebenszyklus zu erlangen (Löwer *et al.* 1996). Viruspartikel, die in den humanen teratokarzinomen Zelllinien GH und TERA-1 nachgewiesen wurden, konnten mit der Expression von HERV-K-Sequenzen in Verbindung gebracht werden (Löwer *et al.* 1984). Die 30 bis 50 HERV-K-Kopien pro haploidem humanem Genom (Ono *et al.* 1986) kodieren teilweise für Gag, Pol und Env (Löwer *et al.* 1993). Ein alternatives Spleißprodukt von Vollängentranskripten des HERV-K Typs 2, das Rec-Corf Protein, vermittelt den nukleo-zytoplasmatischen Export ungespleißter oder unvollständig gespleißter viraler RNA (Magin *et al.* 2000, Magin-Lachmann *et al.* 2001).

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals ein HERV-K transgenes Mausmodell vorgestellt. Zu diesem Zweck waren transgene Tiere etabliert worden, die entweder die komplette HERV-K-Sequenz trugen, oder lediglich die solitäre *env* Sequenz (Abbildung 2-1). Obwohl DNA beider Transgene in verschiedenen Gründertieren nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt), war eine Transkription lediglich in jenen Linien zu detektieren, welche die komplette HERV-K-Sequenz mit *gag*, *pol* und *env* trugen (Linien 404 und 405; Abbildung 3-18 und 3-19). Da beide Transgenkonstrukte von derselben CMV-Promotorkassette getrieben wurden (Abbildung 2-1) und der Nachweis der mRNA-Synthese für beide Konstrukte mit der *env*-Sonde envBX0.5 (Tönjes *et al.* 1997b) durchgeführt wurde, erscheint dieses Ergebnis überraschend.

Ausgehend von diesen Resultaten wurde der Nachweis der Protein-Expression mittels Immuno Blot und indirekter Immunfluoreszenz mit einem Fokus auf die Linien 404 und 405 durchgeführt. Die Immuno Blot-Analyse zeigte die Expression des ~80 kDa großen Gag Vorläuferproteins (Boller *et al.* 1997) in den Nieren zweier Individuen der Linie 404 (Abbildung 3-20). Im Gegensatz dazu entsprach eine ~180 kDa große Bande, die bei der Untersuchung von Proteinen der Leber dieser Tiere zu detektieren war, nicht einem möglichen Gag-Pro/Pol Vorläuferprotein, da die Bande auch bei Leberproben nicht-transgener Tiere zu detektieren war.

Mittels indirekter Immunfluoreszenz konnte der Nachweis einer Rec-Corf Expression nicht erfolgen, welches unter Berücksichtigung seiner Funktion (Magin *et al.* 2000), wie für GH Zellen demonstriert, im Nukleolus zu detektieren hätte sein müssen (Löwer *et al.* 1995). Die Ursache hierfür könnte in einem ineffizienten Spleißen des *env*-Gens begründet sein. Die proteolytische Prozessierung von Gag erfolgt in einer späten Phase des retroviralen Replikationszyklus während der Zusammenlagerung viraler RNA und Proteine (Swanstrom & Wills 1997), so daß Gag-positive Signale im Bereich der Zelloberfläche zu erwarten waren. In der

Tat konnte die durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesene Gag-Expression (Abbildung 3-21) keinem zellulären Kompartiment zugeordnet werden und erschien über die gesamte Zelle gleichmäßig verteilt, wobei ein Bezug zur Zytoplasmamembran deutlich wurde. Die Expression von Gag wurde in verschiedenen Geweben junger Tiere (18 Tage alt) der transgenen Linien 404 und 405 detektiert (Abbildung 3-21), ebenso in einem Mamma-Adenokarzinom, das von einer adulten Maus der Linie 404 ausgebildet wurde (Abbildung 3-22). Aufgrund des hohen Alters dieser weiblichen Maus (637 Tage), der konstanten Gag-Expression bei neugeborenen Tieren sowie einer für den verwendeten Mausstamm (C57Black6) gewöhnlichen, nicht signifikant erhöhten Tumorbildung bei anderen Individuen, ist eine von der Expression des HERV-K Transgens hervorgerufene oder verstärkte Tumorigenese auszuschließen. Die starke Gag-Expression innerhalb des Mamma-Adenokarzinoms kann dagegen vermutlich auf eine durch die Tumorigenese verursachte allgemeine Aktivierung und Hochregulierung der Zellteilungsmechanismen zurückgeführt werden.

Ausgehend von diesen Ergebnissen muß festgehalten werden, daß das HERV-K-Transgen offensichtlich nicht das onkogene Potential hat, das für murine endogene Retroviren wie MMTV und MLV beschrieben wurde (Boeke & Stoye 1997). Die Rekombination der transgenen Sequenzen mit denen endogener Proviren, welche, wie für das MCF Virus beschrieben (Khan 1984, Stoye *et al.* 1991), zur Ausbildung von Viren mit onkogenem Potential führen könnte, erscheint daher unwahrscheinlich. Voraussetzung für das initiale Rekombinationsereignis ist eine ausgedehnte Expression eines ekotropen Virus (Thomas & Coffin 1982), welche für das HERV-K Transgen nicht erfolgte. Im weiteren Verlauf würde die Rekombination dieses Virus mit einem xenotropen Provirus erfolgen, die eine Akquirierung der xenotropen LTR mit einer Multimerisierung eines U3-Enhancers zur Folge hätte. Ein weiteres Rekombinationsereignis mit einem polytropen Virus würde zu einer Veränderung des *env*-Gens führen, die durch Interaktion des neuen Env-Proteins mit Wachstumsfaktoren zur Transformation der infizierten Zellen führt (Coffin 1996, Boeke & Stoye 1997).

Die Bildung Virus-ähnlicher HERV-K-Partikel in einem Baculovirus-Expressionssystem konnte trotz des Mangels einer Rec-Corf-Expression nachgewiesen werden (Tönjes *et al.* 1997a). Offensichtlich reicht demnach eine starke Gag-Expression zur Partikelbildung aus. Elektronenmikroskopische Untersuchungen (durchgeführt von K. Boller, Paul-Ehrlich-Institut, Langen) ergaben jedoch keinen Hinweis auf freigesetzte Partikel in den Geweben der Gag-positiven transgenen Tiere.

Neben einer gewöhnlichen Tumorbildungsrate zeigten die transgenen Tiere einen normalen Phänotyp sowie einen normalen Lebenszyklus mit einer unveränderten Reproduktionsrate. Anatomische oder histologische Auffälligkeiten waren, wie Autopsien zu Beginn der Untersuchung zeigten, ebenfalls nicht nachzuweisen. Ausgehend von diesen Beobachtungen in einem transgenen Tiermodell kann für den humanen Organismus der Schluß gezogen werden,

daß eine konstitutive oder induzierte HERV-K Expression keine große Bedeutung haben dürfte.



## 5 Zusammenfassung

Endogene Retroviren des Schweines (PERV), die vertikal auf die Nachkommen vererbt werden, stellen ein potentiell Infektionsrisiko bei der Transplantation porziner Zellen, Gewebe oder solider Organe auf den Menschen (Xenotransplantation) dar. Bislang sind zwei PERV-Klassen des C-Typs bekannt, die *in-vitro* humane Zellen produktiv infizieren können. Voraussetzung einer produktiven Infektion ist neben dem Rezeptor-vermittelten Eindringen des Virus in die Wirtszellen die transkriptionelle Aktivität des retroviralen Promotors (LTR), welcher die zweite Determinante des Wirtstropismus darstellt.

Mittels eines Luciferase Reportergen Assays wurde die Aktivität verschiedener PERV LTRs in humanen und anderen Säugerzellen im Vergleich zu bekanntermaßen starken Promotoren untersucht. Dabei zeigten LTRs, welche in der die Transkription regulierenden Region U3 eine aus 39-bp Repeats bestehende Repeatbox trugen, in nahezu allen getesteten Zelllinien eine außerordentlich starke Promotoraktivität. Diese wurde insbesondere durch die Repeatbox vermittelt und korrelierte direkt mit der Anzahl der 39-bp Repeats. Wie weiterführende Untersuchungen zeigten, konnte die Aktivität heterologer und Repeat-loser homologer Promotoren durch eine 4-fach 39-bp Repeatbox unabhängig von deren Lage und Orientierung über weite Distanzen hinweg signifikant erhöht werden. Die Repeatbox stellt damit einen klassischen Enhancer dar. Als die Transkription regulierende zelluläre Komponente konnte der ubiquitäre, in der Evolution konservierte Transkriptionsfaktor NF-Y identifiziert werden, dessen Bindung an Sequenzabschnitte des 39-bp Repeats nachgewiesen wurde. Weitere *cis*-aktive Elemente konnten in der U3 Region stromaufwärts der Repeatbox sowie in der R Region lokalisiert werden. Im Verlauf einer seriellen Passagierung in infizierten humanen Zellen erfolgte eine rasche Adaptation der Repeatzahl und damit der transkriptionellen Aktivität an den neuen Wirt. Wie die Ergebnisse einer neu etablierten quantitativen Real-Time PCR zeigten, korrelierte die Anzahl der von einer infizierten Zelle freigesetzten Viruspartikel direkt mit der Aktivität der LTR. Durch Adaptation der LTR Aktivität kann somit eine maximale, für die Wirtszelle verträgliche Virusproduktion erfolgen.

Ausgehend von den beschriebenen Eigenschaften der PERV LTR ergeben sich für die Xenotransplantation spezifische Risiken, die Infektion des möglichen Transplantatempfängers vorausgesetzt. Diese betreffen durch mögliche Aktivierung von Protoonkogen oder Disruption zellulärer Gene den Empfänger selbst, durch die mögliche Rekombination von PERV mit humanen endogenen Sequenzen oder anderen exogenen Erregern und der Ausbildung potentiell hochpathogener Formen aber auch sein soziales Umfeld. Wie *in-vitro* Studien mit zwei routinemäßig in der Transplantationsmedizin eingesetzten Immunsuppressiva belegen, werden diese Risiken durch deren unvermeidlichen Einsatz im Falle einer Xenotransplantation nicht potenziert.

---

Ausgehend von der starken transkriptionellen Aktivität Repeat-tragenden LTRs könnten diese geeignete Werkzeuge für molekularbiologische Anwendungen darstellen, bei denen, wie im Falle des Gentransfers oder der Gentherapie, starke Promotoren benötigt werden.

In einem zweiten Projekt der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Expression des humanen endogenen Retrovirus HERV-K in einem transgenen Mausmodell Auswirkungen auf den Phänotyp der Tiere hat. HERV-K kodiert im Gegensatz zu den meisten anderen HERV-Familien für komplette virale Proteine, deren Bedeutung für den menschlichen Organismus jedoch weitgehend unbekannt sind.

Zur Etablierung transgener Tiere waren zwei verschiedene Transgen-Konstrukte verwendet worden, von denen eines die komplette provirale Sequenz exklusive der LTRs beinhaltete, das andere lediglich das *env*-Gen. Für beide Konstrukte war die Etablierung homozygot transgener Tiere gelungen, der Nachweis der RNA Expression konnte jedoch nur bei jenen Linien erfolgen, die das komplette virale Genom trugen. Immuno Blot-Analysen und indirekte Immunfluoreszenz belegten die Expression viraler Proteine in verschiedenen Organen juveniler und adulter Tiere dieser Linien. Die transgenen Mäuse zeigten einen normalen Phänotyp und einen normalen Lebenszyklus mit einer unveränderten Reproduktionsrate. Eine auftretende Tumorgenese konnte stets auf das hohe Alter der betroffenen Tiere zurückgeführt werden, histologische oder anatomische Auffälligkeiten traten nicht auf. Ausgehend von diesen Beobachtungen in einem Tiermodell kann der Schluß gezogen werden, daß die HERV-K Expression im humanen Organismus keine große Bedeutung hat.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

ALV	Avianes Leukämievirus
APS	Ammoniumpersulfat
BAP	bakterielle alkalische Phosphatase
BaEV	Endogenes Pavian Virus (baboon endogenous virus)
BLV	Bovines Leukämievirus
bp	Basenpaare
BPV	Rinder Papillomvirus (bovine papillomavirus)
BrdUTD	Bromo-deoxyuridintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
CA	Kapsidprotein (capsid)
cDNA	komplementäre DNA
CIP	intestinale alkalische Phosphatase des Kalbes (calf intestinal phosphatase)
CMRL	Connaught Medical Research Laboratories 1069
CMV	Cytomegalievirus
Corf	zentraler offener Leserahmen (central open reading frame)
cpm	Zähler pro Minute (counts per minute)
CysA	Cyclosporine A
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsOligo	doppelsträngiges Oligonukleotid
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamine Tetraessigsäure
EGTA	Ethyleneglycolbisaminoethylether Tetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
Env	retrovirales Oberflächenprotein (envelope)
ERV	endogenes Retrovirus
FeLV	Felines Leukämievirus
Gag	gruppenspezifische Antigene
GAPDH	Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
Geo	$\beta$ Gal-Neomycin-Fusionsgen
GTC	Guanidinisothiocyanat
HEPES	Hydroxyethylpiperazine Ethansulfonsäure
HERV	humanes endogenes Retrovirus
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HSRV	humanes Spumavirus
HTDV	humanes Teratokarzinoma Virus (human teratocarcinoma-derived virus)
HTLV	humanes T-lymphotropes Virus
IL-2	Interleukin 2
Iono	Ionomycin
iRES	interne ribosomale Eintrittsstelle (internal ribosome-entry site)
JSRV	Jaagsiekte Schaf Retrovirus
kb	Kilobasen
LB	Luria-Bertani-Medium
LINE	lange verteilte Elemente (long interspersed elements)
LTR	retroviraler Promotor (long terminal repeat)
MEM	minimales essentielles Medium (Eagle's)
MDEV	<i>Mus dunni</i> endogenes Virus
MLV	murines Leukämievirus

---

MMTV	murines Brusttumorvirus (mouse mammary tumor virus)
MoMuSV	Moloney's murines Sarcoma Virus
MPMV	Mason-Pfizer Affenvirus (Mason-Pfizer monkey virus)
mRNA	messenger RNA
nt	Nukleotid
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
ori	Replikationsursprung (origin of DNA replication)
PB	Primer Bindungsstelle
PBGD	Porphobilinogen Deaminase
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphat gepufferte Saline (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PERV	porzines endogenes Retrovirus
pi	post infektionem
PMSF	Phenylmethansulfonyl Fluorid
Pol	Polymerase
poly(A)	Polyadenylierungssignal
Pred	Prednisolon
pt	post transfektionem
Rec	regulatorisches Protein von HERV (entspricht Corf)
RNA	Ribonukleinsäure
RPA	Ribonuclease Protection Assay
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
RSL	R-Region Stem Loop
RSV	Rous Sarcomavirus
RT	reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SINE	kurze verteilte Elemente (short interspersed elements)
SNP	Einzelnukleotid Polymorphismus (single nucleotide polymorphism)
SSC	Natriumcitrat (saline sodium citrate)
ssOligo	einzelsträngiges Oligonukleotid
ssRNA	einzelsträngige RNA (single strand)
SV40	Simianer Virus 40
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
TB	Terrific Broth-Medium
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetat
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U	Einheiten (units)

## 7 Literaturverzeichnis

Agnarsdottir,G., Thorsteinsdottir,H., Oskarsson,T., Matthiasdottir,S., St. Hafliadottir,.B. undresson,O.S. und Andresdottir,V. (2000). The long terminal repeat is a determinant of cell tropism of maedi-visna virus. *J. Gen. Virol.* *81*, 1901-1905.

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

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

Armstrong,J.A., Porterfield,J.S. und De Madrid,A.T. (1971). C-type virus particles in pig kidney cell lines. *J. Gen. Virol.* *10*, 195-198.

Bach,F.H., Robson,S.C., Winkler,H., Ferran,C., Stuhlmeier,K.M., Wrighton,C.J. und Hancock,W.W. (1995). Barriers to xenotransplantation. *Nat. Med.* *1*, 869-873.

Bailey,L.L., Nehlsen-Cannarella,S.L., Concepcion,W. und Jolley,W.B. (1985). Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate. *JAMA* *20*, 3321-3329.

Barry,J.M. (1992). Immunosuppressive drugs in renal transplantation. A review of the regimens. *Drugs* *44*, 554-566.

Beato,M., Chalepakis,G., Schauer,M. und Slater,E.P. (1989). DNA regulatory elements for steroid hormones. *J. Steroid Biochem.* *32*, 737-747.

Belli,B., Patel,A. und Fan,H. (1995). Recombinant mink cell focus-inducing virus and long terminal repeat alterations accompany the increased leukemogenicity of the Mo+PyF101 variant of Moloney murine leukemia virus after intraperitoneal inoculation. *J. Virol.* *69*, 1037-1043.

Bengtsson,A., Svalander,C.T., Molne,J., Rydberg,L. und Breimer,M.E. (1998). Extracorporeal ("ex vivo") connection of pig kidneys to humans. III. Studies of plasma complement activation and complement deposition in the kidney tissue. *Xenotransplantation.* *5*, 176-183.

Benoist,C. und Chambon,P. (1981). In vivo sequence requirements of the SV40 early promoter region. *Nature* *290*, 304-310.

- Bergelson, J.M., Chan, M., Solomon, K.R., St John, N.F., Lin, H. und Finberg, R.W. (1994). Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 6245-6249.
- Blackwood, E.M. und Kadonaga, J.T. (1998). Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* *281*, 61-63.
- Blond, J.L., Lavillette, D., Cheynet, V., Bouton, O., Oriol, G., Chapel-Fernandes, S., Mandrand, B., Mallet, F. und Cosset, F.L. (2000). An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *J. Virol.* *74*, 3321-3329.
- Blusch, J.H., Patience, C., Takeuchi, Y., Templin, C., Roos, C., von der Helm, K., Steinhoff, G. und Martin, U. Infection of nonhuman primate cells by pig endogenous retrovirus. *J. Virol.* 2000. Aug. ;74. (16. ):7687. -90. *74*, 7687-7690.
- Boeke, J.D. und Stoye, J.P. (1997). Retrotransposons, endogenous retroviruses und the evolution of retroelements. In *Retroviruses*, J.M.Coffin, S.H.Hughes und H.E.Varmus, eds. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 343-435.
- Boller, K., Janssen, O., Schuldes, H., Tönjes, R.R. und Kurth, R. (1997). Characterization of the antibody response specific for the human endogenous retrovirus HTDV/HERV-K. *J. Virol.* *71*, 4581-4588.
- Boller, K., König, H., Sauter, M., Mueller-Lantzsch, N., Löwer, R., Löwer, J. und Kurth, R. (1993). Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV. *Virology* *196*, 349-353.
- Boneva, R.S., Folks, T.M. und Chapman, L.E. (2001). Infectious disease issues in xenotransplantation. *Clin. Microbiol. Rev.* *14*, 1-14.
- Bonifer, C. (2000). Developmental regulation of eukaryotic gene loci: which cis-regulatory information is required? *Trends. Genet.* *16*, 310-315.
- Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Hasler, K., Fleckenstein, B. und Schaffner, W. (1985). A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* *41*, 521-530.
- Bracy, J.L., Sachs, D.H. und Iacomini, J. (1998). Inhibition of xenoreactive natural antibody production by retroviral gene therapy. *Science* *281*, 1845-1847.

Butler,D. (2002). Xenotransplant experts express caution over knockout piglets. *Nature* 415, 103-104.

Campo,M.S., Spandidos,D.A., Lang,J. und Wilkie,N.M. (1983). Transcriptional control signals in the genome of bovine papillomavirus type 1. *Nature* 303, 77-80.

Cesaire,R., Dehee,A., Lezin,A., Desire,N., Bourdonne,O., Dantin,F., Bera,O., Smadja,D., Abel,S., Cabie,A., Sobesky,G. und Nicolas,J.C. (2001). Quantification of HTLV type I and HIV type I DNA load in coinfecting patients: HIV type 1 infection does not alter HTLV type I proviral amount in the peripheral blood compartment. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 17, 799-805.

Ch'ang,L.-Y., Yang,W.K., Myer,F.E. und Yang,D.M. (1989). Negative regulatory element associated with potentially functional promoter and enhancer elements in the long terminal repeats of endogenous murine leukemia virus-related proviral sequences. *J. Virol.* 63, 2746-2757.

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

Chen,H.R. und Barker,W.C. (1984). Nucleotide sequences of the retroviral long terminal repeats and their adjacent regions. *Nucleic. Acids. Res.* 12, 1767-1778.

Coffin,J.M. (1996). Retroviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology*, B.N.Fields, D.M.Knipe und P.M.Howley, eds. (Philadelphia: Raven PublishersCold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 1767-1847.

Costa,C., Zhao,L., Burton,W.V., Bondioli,K.R., Williams,B.L., Hoagland,T.A., Ditullio,P.A., Ebert,K.M. und Fodor,W.L. (1999). Expression of the human alpha1,2-fucosyltransferase in transgenic pigs modifies the cell surface carbohydrate phenotype and confers resistance to human serum-mediated cytolysis. *FASEB J.* 13, 1762-1773.

Cowan,P.J., Aminian,A., Barlow,H., Brown,A.A., Chen,C.G., Fiscaro,N., Francis,D.M., Goodman,D.J., Han,W., Kurek,M., Nottle,M.B., Pearse,M.J., Salvaris,E., Shinkel,T.A., Stainsby,G.V., Stewart,A.B. und d'Apice,A.J. (2000). Renal xenografts from triple-transgenic pigs are not hyperacutely rejected but cause coagulopathy in non-immunosuppressed baboons. *Transplantation* 69, 2504-2515.

Cozzi,E. und White,D.J. (1995). The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nat. Med.* 1, 964-966.

Cramer,D.V. (1995). The use of xenografts for acute hepatic failure. *Transplant. Proc.* 27, 80-82.

Cullen,B.R., Raymond,K. und Ju,G. (1985). Functional analysis of the transcription control region located within the avian retroviral long terminal repeat. *Mol. Cell Biol.* 5, 438-447.

Cupelli,L., Okenquist,S.A., Trubetskoy,A. und Lenz,J. (1998). The secondary structure of the R region of a murine leukemia virus is important for stimulation of long terminal repeat-driven gene expression. *J. Virol.* 72, 7807-7814.

Cupelli,L.A. und Lenz,J. (1991). Transcriptional initiation and postinitiation effects of murine leukemia virus long terminal repeat R-region sequences. *J. Virol.* 65, 6961-6968.

Cuypers,H.T., Selten,G., Quint,W., Zijlstra,M., Maandag,E.R., Boelens,W., van Wezenbeek,P., Melief,C. und Berns,A. (1984). Murine leukemia virus-induced T-cell lymphomagenesis: integration of proviruses in a distinct chromosomal region. *Cell* 37, 141-150.

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

Dai,Y., Vaught,T.D., Boone,J., Chen,S.H., Phelps,C.J., Ball,S., Monahan,J.A., Jobst,P.M., McCreath,K.J., Lamborn,A.E., Cowell-Lucero,J.L., Wells,K.D., Colman,A., Polejaeva,I.A. und Ayares,D.L. (2002). Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat. Biotechnol.* 20, 251-255.

Damond,F., Descamps,D., Farfara,I., Telles,J.N., Puyeo,S., Campa,P., Lepretre,A., Mathéron,S., Brun-Vezinet,F. und Simon,F. (2001). Quantification of proviral load of human immunodeficiency virus type 2 subtypes A and B using real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39, 4264-4268.

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

Dent,C.L., Smith,M.D. und Latchman, D.S. (1999). The DNA mobility shift assay. In *Transcription factors: a practical approach*, Latchman, D S, ed. (Oxford University Press), 1-25.



- Derse,D. und Casey,J.W. (1986). Two elements in the bovine leukemia virus long terminal repeat that regulate gene expression. *Science* 231, 1437-1440.
- Dinsmore,J.H., Manhart,C., Raineri,R., Jacoby,D.B. und Moore,A. (2000). No evidence for infection of human cells with porcine endogenous retrovirus (PERV) after exposure to porcine fetal neuronal cells. *Transplantation* 70, 1382-1389.
- Dorey,E. (2001). PERV data renew xeno debate. *Nat. Biotechnol.* 18, 1032-1033.
- Dorig,R.E., Marcil,A., Chopra,A. und Richardson,C.D. (1993). The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 75, 295-305.
- Dorling,A., Riesbeck,K., Warrens,A. und Lechler,R. (1997). Clinical xenotransplantation of solid organs. *Lancet* 349, 867-871.
- Dynan,W.S. (1989). Modularity in promoters and enhancers. *Cell* 58, 1-4.
- Dynan,W.S. und Tjian,R. (1983). The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35, 79-87.
- Ehlers,B., Ulrich,S. und Goltz,M. (1999). Detection of two novel porcine herpesviruses with high similarity to gammaherpesviruses. *J. Gen. Virol.* 80, 971-978.
- Fan,H. (1990). Influences of the long terminal repeats on retrovirus pathogenicity. *Sem. Virol.* 1, 165-174.
- Fink,J.S., Schumacher,J.M., Ellias,S.L., Palmer,E.P., Saint-Hilaire,M., Shannon,K., Penn,R., Starr,P., van Horne,C., Kott,H.S., Dempsey,P.K., Fischman,A.J., Raineri,R., Manhart,C., Dinsmore,J. und Isacson,O. (2000). Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell Transplant.* 9, 273-278.
- Fishman,J.A. (1997). Xenosis and xenotransplantation: addressing the infectious risks posed by an emerging technology. *Kidney Int. Suppl* 58, 41-S45.
- Folks,T., Benn,S., Rabson,A., Theodore,T., Hoggan,M.D., Martin,M., Lightfoote,M. und Sell,K. (1985). Characterization of a continuous T-cell line susceptible to the cytopathic effects of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-associated retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82, 4539-4543.

- Galili,U., Macher,B.A., Buehler,J. und Shohet,S.B. (1985). Human natural anti-alpha-galactosyl IgG. II. The specific recognition of alpha (1----3)-linked galactose residues. *J. Exp. Med.* 162, 573-582.
- Galili,U., Shohet,S.B., Kobrin,E., Stults,C.L. und Macher,B.A. (1988). Man, apes und Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *J. Biol. Chem.* 263, 17755-17762.
- 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. und Hahn,B.H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397, 436-441.
- Golemis,E.A., Speck,N.A. und Hopkins,N. (1990). Alignment of U3 region sequences of mammalian type C viruses: identification of highly conserved motifs and implications for enhancer design. *J. Virol.* 64, 534-542.
- Good,A.H., Cooper,D.K., Malcolm,A.J., Ippolito,R.M., Koren,E., Neethling,F.A., Ye,Y., Zuhdi,N. und Lamontagne,L.R. (1992). Identification of carbohydrate structures that bind human antiporcine antibodies: implications for discordant xenografting in humans. *Transplant. Proc.* 24, 559-562.
- Göttlicher,M., Heck,S. und Herrlich,P. (1998). Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J. Mol. Med.* 76, 480-489.
- Gratzl,S., Moroni,C. und Hirsch,H.H. (1997). Quantification of HIV-1 viral RNA and proviral DNA by isotopic competitive PCR. *J. Virol. Methods* 66, 269-282.
- Greenstein,J.L. und Sachs,D.H. (1997). The use of tolerance for transplantation across xenogeneic barriers. *Nat. Biotechnol.* 15, 235-238.
- Griffiths,P.D. (2000). Xenotransplantation: one trotter forward, one claw back. *Lancet* 356, 1049-1050.
- Groth,C.G., Korsgren,O., Tibell,A., Tollemar,J., Moller,E., Bolinder,J., Ostman,J., Reinholdt,F.P., Hellerstrom,C. und Andersson,A. (1994). Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. *Lancet* 19, 1402-1404.
- Haegeman,G. und Fiers,W. (1980). Characterization of the 5'-terminal cap structures of early simian virus 40 mRNA. *J. Virol.* 35, 955-961.

- Hauber, J. and Cullen, B.R. (1988). Mutational analysis of the trans-activation-responsive region of the human immunodeficiency virus type I long terminal repeat. *J. Virol.* **62**, 673-679.
- Hayward, W.S., Neel, B.G. und Astrin, S.M. (1981). Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukemia. *Nature* **290**, 475-480.
- Heneine, W., Tibell, A., Switzer, W.M., Sandstrom, P., Rosales, G.V., Mathews, A., Korsgren, O., Chapman, L.E., Folks, T.M. und Groth, C.G. (1998). No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts. *Lancet* **352**, 695-699.
- Herniou, E., Martin, J., Miller, K., Cook, J., Wilkinson, M. und Tristem, M. (1998). Retroviral diversity and distribution in vertebrates. *J. Virol.* **72**, 5955-5966.
- Herring, C., Quinn, G., Bower, R., Parsons, N., Logan, N.A., Brawley, A., Elsome, K., Whittam, A., Fernandez-Suarez, X.M., Cunningham, D., Onions, D., Langford, G. und Scobie, L. (2001). Mapping full-length porcine endogenous retroviruses in a large white pig. *J. Virol.* **75**, 12252-12265.
- Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F. und Lacy, E. (1994). *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual.* (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Holzschu, D.L., Fodor, S.K., Quackenbush, S.L., Earnest-Koons, K., Bowser, P.R., Vogt, V.M. und Casey, J.W. (1997). Molecular characterization of a piscine retrovirus, walleye dermal sarcoma virus. *Leukemia* **11**, 172-175.
- Hunter, E. (1997). Viral entry and receptors. In *Retroviruses*, J.M.Coffin, S.H.Hughes und H.E.Varmus, eds. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 71-120.
- Ibanez, A., Puig, T., Elias, J., Clotet, B., Ruiz, L. und Martinez, M.A. (1999). Quantification of integrated and total HIV-1 DNA after long-term highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected patients. *AIDS* **13**, 1045-1049.
- Imaizumi, T., Lankford, K.L., Burton, W.V., Fodor, W.L. und Kocsis, J.D. (2000). Xenotransplantation of transgenic pig olfactory ensheathing cells promotes axonal regeneration in rat spinal cord. *Nat. Biotechnol.* **18**, 949-953.
- Inoue, J., Yoshida, M. und Seiki, M. (1987). Transcriptional (p40x) and post-transcriptional (p27x-III) regulators are required for the expression and replication of human T-cell leukemia virus type I genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 3653-3657.

---

International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.

Jain, J., Loh, C. und Rao, A. (1995). Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 333-342.

Jeang, K.T. und Khoury, G. (1988). The mechanistic role of enhancer elements in eukaryotic transcription. *Bioessays* 8, 104-107.

Jin, S. und Scotto, K.W. (1998). Transcriptional regulation of the MDR1 gene by histone acetyltransferase and deacetylase is mediated by NF-Y. *Mol. Cell Biol.* 18, 4377-4384.

Kamihira, S., Dateki, N., Sugahara, K., Yamada, Y., Tomonaga, M., Maeda, T. und Tahara, M. (2000). Real-time polymerase chain reaction for quantification of HTLV-1 proviral load: application for analyzing aberrant integration of the proviral DNA in adult T-cell leukemia. *Int. J. Hematol.* 72, 79-84.

Khan, A.S. (1984). Nucleotide sequence analysis establishes the role of endogenous murine leukemia virus DNA segments in formation of recombinant mink cell focus-forming murine leukemia viruses. *J. Virol.* 50, 864-871.

Khoury, G. und Gruss, P. (1983). Enhancer elements. *Cell* 33, 313-314.

Kim, A., Terzian, C., Santamaria, P., Pelisson, A., Purd'homme, N. und Bucheton, A. (1994). Retroviruses in invertebrates: the gypsy retrotransposon is apparently an infectious retrovirus of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 1285-1289.

Kiss-Toth, E. und Unk, I. (1994). A downstream regulatory element activates the bovine leukemia virus promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202, 1553-1561.

Krach, U., Fischer, N., Czauderna, F., Kurth, R. und Tönjes, R.R. (2000). Generation and testing of a highly specific anti-serum directed against porcine endogenous retrovirus nucleocapsid. *Xenotransplantation*. 2000. Aug. ;7. (3. ):221. -9. 7, 221-229.

Krach, U., Fischer, N., Czauderna, F. und Tönjes, R.R (2001). Comparison of replication-competent molecular clones of porcine endogenous retrovirus class A and class B derived from pig and human cells. *J. Virol.* 75, 5465-5472.

Lai, L., Kolber-Simonds, D., Park, K.W., Cheong, H.T., Greenstein, J.L., Im, G.S., Samuel, M., Bonk, A., Rieke, A., Day, B.N., Murphy, C.N., Carter, D.B., Hawley, R.J. und Prather, R.S. (2002).

Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295, 1089-1092.

Laimins,L.A., Gruss,P., Pozzatti,R. und Khoury,G. (1984). Characterization of enhancer elements in the long terminal repeat of Moloney murine sarcoma virus. *J. Virol.* 49, 183-189.

Lang,J.C. und Spandidos,D.A. (1986). The structure and function of eukaryotic enhancer elements and their role in oncogenesis. *Anticancer Res.* 6, 437-449.

Lang,J.C., Wilkie,N.M. und Spandidos,D.A. (1983). Characterization of eukaryotic transcriptional control signals by assay of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase. *J. Gen. Virol.* 64, 2679-2696.

Leib-Mösch,C., Haltmeier,M., Werner,T., Geigl,E.M., Brack-Werner,R., Francke,U., Erfle,V. und Hehlmann,R. (1993). Genomic distribution and transcription of solitary HERV-K LTRs. *Genomics* 18, 261-269.

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

Lee,J.H., Webb,G.C., Allen,R.D. und Moran,C. (2002). Characterizing and mapping porcine endogenous retroviruses in Westran pigs. *J. Virol.* 76, 5548-5556.

Li,Y., Golemis,E., Hartley,J.W. und Hopkins,N. (1987). Disease specificity of nondefective Friend and Moloney murine leukemia viruses is controlled by a small number of nucleotides. *J. Virol.* 61, 693-700.

Liang,S.G. und Maity,S.N. (1998). Pathway of complex formation between DNA and three subunits of CBF/NF-Y. Photocross-linking analysis of DNA-protein interaction and characterization of equilibrium steps of subunit interaction and dna binding. *J. Biol. Chem.* 273, 31590-31598.

Ling,J., Pi,W., Bollag,R., Zeng,S., Keskinetepe,M., Saliman,H., Krantz,S., Whitney,B. und Tuan,D. (2002). The solitary long terminal repeats of ERV-9 endogenous retrovirus are conserved during primate evolution and possess enhancer activities in embryonic and hematopoietic cells. *J. Virol.* 76, 2410-2423.

Löwer,R. (1999). The pathogenic potential of endogenous retroviruses: facts and fantasies. *Trends. Microbiol.* 7, 350-356.

- Löwer,R., Boller,K., Hasenmaier,B., Korbmacher,C., Muller-Lantzsch,N., Löwer,J. und Kurth,R. (1993). Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 4480-4484.
- Löwer,R., Löwer,J., Frank,H., Harzmann,R. und Kurth,R. (1984). Human teratocarcinomas cultured in vitro produce unique retrovirus-like viruses. *J. Gen. Virol.* **65**, 887-898.
- Löwer,R., Löwer,J. und Kurth,R. (1996). The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 5177-5184.
- Löwer,R., Tönjes,R.R., Korbmacher,C., Kurth,R. und Löwer,J. (1995). Identification of a Rev-related protein by analysis of spliced transcripts of the human endogenous retroviruses HTDV/HERV-K. *J. Virol.* **69**, 141-149.
- Lu,S., Arthos,J., Montefiori,D.C., Yasutomi,Y., Manson,K., Mustafa,F., Johnson,E., Santoro,J.C., Wissink,J., Mullins,J.I., Haynes,J.R., Letvin,N.L., Wyand,M. und Robinson,H.L. (1996). Simian immunodeficiency virus DNA vaccine trial in macaques. *J. Virol.* **70**, 3978-3991.
- Magin-Lachmann,C., Hahn,S., Strobel,H., Held,U., Löwer,J. und Löwer,R. (2001). Rec (formerly Corf) function requires interaction with a complex, folded RNA structure within its responsive element rather than binding to a discrete specific binding site. *J. Virol.* **75**, 10359-10371.
- Magin,C., Hesse,J., Löwer,J. und Löwer,R. (2000). Corf, the Rev/Rex homologue of HTDV/HERV-K, encodes an arginine-rich nuclear localization signal that exerts a trans-dominant phenotype when mutated. *Virology* **274**, 11-16.
- Maity,S.N. und de Crombrughe,B. (1998). Role of the CCAAT-binding protein CBF/NF-Y in transcription. *Trends. Biochem. Sci.* **23**, 174-178.
- Mankertz,A., Persson,F., Mankertz,J., Blaess,G. und Buhk,H.J. (1997). Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus. *J. Virol.* **71**, 2562-2566.
- Mantovani,R. (1998). A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. *Nucleic. Acids. Res.* **26**, 1135-1143.
- Martin,U., Kiessig,V., Blusch,J.H., Haverich,A., von der Helm,K., Herden,T. und Steinhoff,G. (1998). Expression of pig endogenous retrovirus by primary porcine endothelial cells and infection of human cells. *Lancet* **352**, 692-694.

- Martiney, M.J., Rulli, K., Beaty, R., Levy, L.S. und Lenz, J. (1999). Selection of reversions and suppressors of a mutation in the CBF binding site of a lymphomagenic retrovirus. *J. Virol.* 73, 7599-7606.
- Marziali, G., Perrotti, E., Ilari, R., Coccia, E.M., Mantovani, R., Testa, U. und Battistini, A. (1999). The activity of the CCAAT-box binding factor NF-Y is modulated through the regulated expression of its A subunit during monocyte to macrophage differentiation: regulation of tissue-specific genes through a ubiquitous transcription factor. *Blood* 93, 519-526.
- McCurry, K.R., Kooyman, D.L., Alvarado, C.G., Cotterell, A.H., Martin, M.J., Logan, J.S. und Platt, J.L. (1995). Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury. *Nat. Med.* 1, 423-427.
- Medh, R.D. und Schmidt, T.J. (1997). Trans-retinoic acid and glucocorticoids synergistically induce transcription from the mouse mammary tumor virus promoter in human embryonic kidney cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 62, 129-142.
- Michaels, M.G., McMichael, J.P., Brasky, K., Kalter, S., Peters, R.L., Starzl, T.E. und Simmons, R.L. (1994). Screening donors for xenotransplantation. The potential for xenozoonoses. *Transplantation* 57, 1462-1465.
- Miyagawa, S., Murakami, H., Takahagi, Y., Nakai, R., Yamada, M., Murase, A., Koyota, S., Koma, M., Matsunami, K., Fukuta, D., Fujimura, T., Shigehisa, T., Okabe, M., Nagashima, H., Shirakura, R. und Taniguchi, N. (2001). Remodeling of the major pig xenoantigen by N-acetylglucosaminyltransferase III in transgenic pig. *J. Biol. Chem.* 276, 39310-39319.
- Modrow, S. und Falke, D. (1997). *Molekulare Virologie*. (Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag).
- Moennig, V., Frank, H., Hunsmann, G., Ohms, P., Schwarz, H. und Schafer, W. (1974). C-type particles produced by a permanent cell line from a leukemic pig. II. Physical, chemical und serological characterization of the particles. *Virology* 57, 179-188.
- Moreau, K., Torne-Celer, C., Faure, C., Verdier, G. und Ronfort, C. (2000). In vivo retroviral integration: fidelity to size of the host DNA duplication might be reduced when integration occurs near sequences homologous to LTR ends. *Virology* 278, 133-136.
- Mountford, P., Zevnik, B., Duwel, A., Nichols, J., Li, M., Dani, C., Robertson, M., Chambers, I. und Smith, A. (1994). Dicistronic targeting constructs: reporters and modifiers of mammalian gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 4303-4307.

- Mullins,J.I., Chen,C.S. und Hoover,E.A. (1986). Disease-specific and tissue-specific production of unintegrated feline leukaemia virus variant DNA in feline AIDS. *Nature* 319, 333-336.
- Naniche,D., Varior-Krishnan,G., Cervoni,F., Wild,T.F., Rossi,B., Rabourdin-Combe,C. und Gerlier,D. (1993). Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J. Virol.* 67, 6025-6032.
- Nermut,M.V. und Hockley,D.J. (1996). Comparative morphology and structural classification of retroviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 214:1-24., 1-24.
- Niebert,M., Rogel-Gaillard,C., Chardon,P. und Tönjes,R.R. (2002). Characterization of chromosomally assigned replication-competent gamma porcine endogenous retroviruses derived from a large white pig and expression in human cells. *J. Virol.* 76, 2714-2720.
- Norton,P.A. und Coffin,J.M. (1987). Characterization of Rous sarcoma virus sequences essential for viral gene expression. *J. Virol.* 61, 1171-1179.
- Nusse,R. und Varmus,H.E. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31, 99-109.
- Ohtani,K., Nakamura,M., Saito,S., Noda,T., Ito,Y., Sugamura,K. und Hinuma,Y. (1987). Identification of two distinct elements in the long terminal repeat of HTLV-I responsible for maximum gene expression. *EMBO J.* 6, 389-395.
- Oldmixon,B.A., Wood,J.C., Ericsson,T.A., Wilson,C.A., White-Scharf,M.E. und Ericsson,G., Greenstein,J.L., Schuurman,H.J. und Patience,C. (2002). Porcine endogenous retrovirus transmission characteristics of an inbred herd of miniature swine. *J. Virol.* 76, 3045-3048.
- Onions,D., Cooper,D.K., Alexander,T.J., Brown,C., Claassen,E., Foweraker,J.E., Harris,D.L., Mahy,B.W., Minor,P.D., Osterhaus,A.D., Pastoret,P.P. und Yamanouchi,K. (2000). An approach to the control of disease transmission in pig-to-human xenotransplantation. *Xenotransplantation.* 7, 143-155.
- Onishi,A., Iwamoto,M., Akita,T., Mikawa,S., Takeda,K., Awata,T., Hanada,H. und Perry,A.C. (2000). Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 289, 1188-1190.
- Ono,M., Yasunaga,T., Miyata,T. und Ushikubo,H. (1986). Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. *J. Virol.* 60, 589-598.



- Overhauser, J. und Fan, H. (1985). Generation of glucocorticoid-responsive Moloney murine leukemia virus by insertion of regulatory sequences from murine mammary tumor virus into the long terminal repeat. *J. Virol.* 54, 133-144.
- Palmarini, M., Datta, S., Omid, R., Murgia, C. und Fan, H. (2000). The long terminal repeat of Jaagsiekte sheep retrovirus is preferentially active in differentiated epithelial cells of the lungs. *J. Virol.* 2000. Jul. ;74. (13. ):5776. -87. 74, 5776-5787.
- Paradis, K., Langford, G., Long, Z., Heneine, W., Sandstrom, P., Switzer, W.M., Chapman, L.E., Lockey, C., Onions, D. und Otto, E. (1999). Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. *Science* 285, 1236-1241.
- Paskalis, H., Felber, B.K. und Pavlakis, G.N. (1986). Cis-acting sequences responsible for the transcriptional activation of human T-cell leukemia virus type I constitute a conditional enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 6558-6562.
- Patience, C., Patton, G.S., Takeuchi, Y., Weiss, R.A., McClure, M.O., Rydberg, L. und Breimer, M.E. (1998). No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys. *Lancet* 352, 699-701.
- Patience, C., Switzer, W.M., Takeuchi, Y., Griffiths, D.J., Goward, M.E., Heneine, W., Stoye, J.P. und Weiss, R.A. (2001). Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species. *J. Virol.* 75, 2771-2775.
- Patience, C., Takeuchi, Y. und Weiss, R.A. (1997). Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat. Med.* 3, 282-286.
- Petropoulos, C. (1997). Retroviral taxonomy, protein structures, sequences und genetic maps. In *Retroviruses*, J.M.Coffin, S.H.Hughes und H.E.Varmus, eds. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 757-805.
- Picard, D. (1985). Viral and cellular transcription enhancers. *Oxf. Surv. Eukaryot. Genes* 2, 24-48.
- Pierce, J., Fee, B.E., Toohey, M.G. und Peterson, D.O. (1993). A mouse mammary tumor virus promoter element near the transcription initiation site. *J. Virol.* 67, 415-424.
- Pitkin, Z. und Mullon, C. (1999). Evidence of absence of porcine endogenous retrovirus (PERV) infection in patients treated with a bioartificial liver support system. *Artif. Organs* 23, 829-833.

Polejaeva, I.A., Chen, S.H., Vaught, T.D., Page, R.L., Mullins, J., Ball, S., Dai, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D.L., Colman, A. und Campbell, K.H. (2000). Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407, 86-90.

Powell, S.K., Gates, M.E., Langford, G., Gu, M.L., Lockey, C., Long, Z. und Otto, E (2000). Anti-retroviral agents inhibit infection of human cells by porcine endogenous retroviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 3432-3433.

Quinn, G. und Langford, G (2001). The porcine endogenous retrovirus long terminal repeat contains a single nucleotide polymorphism that confers distinct differences in estrogen receptor binding affinity between PERV A and PERV B/C subtypes. *Virology* 286, 83-90.

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

Reemtsma, K. (1966). Renal heterotransplantation. *Adv. Surg.* 2:285-93., 285-293.

Ruddell, A. (1995). Transcription regulatory elements of the avian retroviral long terminal repeat. *Virology* 206, 1-7.

Ryan, U.S. (1995). Complement inhibitory therapeutics and xenotransplantation. *Nat. Med.* 1, 967-968.

Sachs, D.H. (1994). The pig as a potential xenograft donor. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43, 185-191.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sandrin, M.S., Fodor, W.L., Mouhtouris, E., Osman, N., Cohnhey, S., Rollins, S.A., Guilmette, E.R., Setter, E., Squinto, S.P. und McKenzie, I.F. (1995). Enzymatic remodelling of the carbohydrate surface of a xenogenic cell substantially reduces human antibody binding and complement-mediated cytotoxicity. *Nat. Med.* 1, 1261-1267.

Santoro, F., Kennedy, P.E., Locatelli, G., Malnati, M.S., Berger, E.A. und Lusso, P. (1999). CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* 99, 817-827.

Scheef, G., Fischer, N., Krach, U. und Tönjes, R.R (2001). The number of a U3 repeat box acting as an enhancer in long terminal repeats of polytropic replication-competent porcine en-

dogenuous retroviruses dynamically fluctuates during serial virus passages in human cells. *J. Virol.* **75**, 6933-6940.

Scheidereit,C. und Beato,M. (1984). Contacts between hormone receptor and DNA double helix within a glucocorticoid regulatory element of mouse mammary tumor virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 3029-3033.

Schreiber,E., Matthias,P., Muller,M.M. und Schaffner,W. (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic. Acids. Res.* **17**, 6419.

Serfling,E., Avots,A. und Neumann,M. (1995). The architecture of the interleukin-2 promoter: a reflection of T lymphocyte activation. *Biochim. Biophys. Acta* **1263**, 181-200.

Sharma,A., Okabe,J., Birch,P., McClellan,S.B., Martin,M.J., Platt,J.L. und Logan,J.S. (1996). Reduction in the level of Gal(alpha1,3)Gal in transgenic mice and pigs by the expression of an alpha(1,2)fucosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 7190-7195.

Shimotohno,K., Golde,D.W., Miwa,M., Sugimura,T. und Chen,I.S. (1984). Nucleotide sequence analysis of the long terminal repeat of human T-cell leukemia virus type II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **81**, 1079-1083.

Shimotohno,K. und Temin,H.M. (1982). Spontaneous variation and synthesis in the U3 region of the long terminal repeat of an avian retrovirus. *J. Virol.* **41**, 163-171.

Speck,N.A., Renjifo,B., Golemis,E., Fredrickson,T.N., Hartley,J.W. und Hopkins,N. (1990). Mutation of the core or adjacent LVb elements of the Moloney murine leukemia virus enhancer alters disease specificity. *Genes Dev.* **4**, 233-242.

Starzl,T.E., Fung,J., Tzakis,A., Todo,S., Demetris,A.J., Marino,I.R., Doyle,H., Zeevi,A., Warty,V. und Michaels,M. (1993). Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet* **341**, 65-71.

Steinhuber,S., Brack,M., Hunsmann,G., Schwelberger,H., Dierich,M.P. und Vogetseder,W. (1995). Distribution of human endogenous retrovirus HERV-K genomes in humans and different primates. *Hum. Genet.* **96**, 188-192.

Stoye,J.P. (1997). Xenotransplantation. Proviruses pose potential problems. *Nature* **386**, 126-127.

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

- Stoye, J.P., Moroni, C. und Coffin, J.M. (1991). Virological events leading to spontaneous AKR thymomas. *J. Virol.* 65, 1273-1285.
- Swanstrom, R. und Wills, J.W. (1997). Synthesis, assembly und processing of viral proteins. In *Retroviruses*, J.M.Coffin, S.H.Hughes und H.E.Varmus, eds. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 263-334.
- Tacke, S.J., Bodusch, K., Berg, A. und Denner, J. (2001). Sensitive and specific immunological detection methods for porcine endogenous retroviruses applicable to experimental and clinical xenotransplantation. *Xenotransplantation.* 8, 125-135.
- Takeuchi, Y. (2000). Risk of zoonosis in xenotransplantation. *Transplant. Proc.* 32, 2698-2700.
- Takeuchi, Y., Patience, C., Magre, S., Weiss, R.A., Banerjee, P.T., Le Tissier, P. und Stoye, J.P. (1998). Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus. *J. Virol.* 72, 9986-9991.
- Teich, N. (1984). Taxonomy of retroviruses. In *RNA tumor viruses*, R.A.Weiss, N.Teich, H.E.Varmus und J.M.Coffin, eds. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 25-207.
- Temin, H.M. (1980). Origin of retroviruses from cellular moveable genetic elements. *Cell* 21, 599-600.
- Thomas, C.Y. und Coffin, J.M. (1982). Genetic alterations of RNA leukemia viruses associated with the development of spontaneous thymic leukemia in AKR/J mice. *J. Virol.* 43, 416-426.
- Todaro, G.J., Benveniste, R.E., Lieber, M.M. und Sherr, C.J. (1974). Characterization of a type C virus released from the porcine cell line PK(15). *Virology* 58, 65-74.
- Tönjes, R.R. (2000). Xenotransplantation: Risiken und Chancen. *Aktuelle Nephrologie* 33, 17-32.
- Tönjes, R.R., Czauderna, F. und Kurth, R. (1999). Genome-wide screening, cloning, chromosomal assignment und expression of full-length human endogenous retrovirus type K. *J. Virol.* 73, 9187-9195.
- Tönjes, R.R., Boller, K., Limbach, C., Lugert, R. und Kurth, R. (1997a). Characterization of human endogenous retrovirus type K virus-like particles generated from recombinant baculoviruses. *Virology* 233, 280-291.

Tönjes,R.R., Limbach,C., Löwer,R. und Kurth,R. (1997b). Expression of human endogenous retrovirus type K envelope glycoprotein in insect and mammalian cells. *J. Virol.* *71*, 2747-2756.

Tönjes,R.R., Löwer,R., Boller,K., Denner,J., Hasenmaier,B., Kirsch,H., König,H., Korbma-cher,C., Limbach,C., Lugert,R., Phelps,R.C., Scherer,J., Thelen,K., Löwer,J. und Kurth,R. (1996). HERV-K: the biologically most active human endogenous retrovirus family. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* *13*, S261-S267.

Tönjes,R.R. und Kurth,R. (1994). Comparison of primate cellular sequences homologous to HERV-K reverse transcriptase. *J. Cell. Biol.* *18*, 41.

Trubetskoy,A.M., Okenquist,S.A. und Lenz,J. (1999). R region sequences in the long termi-nal repeat of a murine retrovirus specifically increase expression of unspliced RNAs. *J. Virol.* *73*, 3477-3483.

van der Laan LJ, Lockey,C., Griffeth,B.C., Frasier,F.S., Wilson,C.A., Onions,D.E., He-ring,B.J., Long,Z., Otto,E., Torbett,B.E. und Salomon,D.R. (2000). Infection by porcine endo-genous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* *407*, 90-94.

Van Beveren,C., Rands,E., Chattopadhyay,S.K., Lowy,D.R. und Verma,I.M. (1982). Long terminal repeat of murine retroviral DNAs: sequence analysis, host-proviral junctions und preintegration site. *J. Virol.* *41*, 542-556.

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

Wasylyk,B., Wasylyk,C., Augereau,P. und Chambon,P. (1983). The SV40 72 bp repeat pre-ferentially potentiates transcription starting from proximal natural or substitute promoter ele-ments. *Cell* *32*, 503-514.

Weiss,R.A. (1998). Transgenic pigs and virus adaptation. *Nature* *391*, 327-328.

Welch,J.E., Brown,P.R., O'Brien,D.A. und Eddy,E.M. (1995). Genomic organization of a mouse glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (Gapd-s) expressed in post-meiotic spermatogenic cells. *Dev. Genet.* *16*, 179-189.

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

- Wilson,C.A., Wong,S., Muller,J., Davidson,C.E., Rose,T.M. und Burd,P. (1998). Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *J. Virol.* 72, 3082-3087.
- Wilson,C.A., Wong,S., van Brocklin,M. und Federspiel,M.J. (2000). Extended analysis of the in vitro tropism of porcine endogenous retrovirus. *J. Virol.* 74, 49-56.
- Wittwer,C.T., Herrmann,M.G., Moss,A.A. und Rasmussen,R.P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22, 130-138.
- Wolgamot,G. und Miller,A.D. (1999). Replication of *Mus dunni* endogenous retrovirus depends on promoter activation followed by enhancer multimerization. *J. Virol.* 73, 9803-9809.
- Wright,K.L., Vilen,B.J., Itoh-Lindstrom,Y., Moore,T.L., Li,G., Criscitiello,M., Cogswell,P., Clarke,J.B. und Ting,J.P. (1994). CCAAT box binding protein NF-Y facilitates in vivo recruitment of upstream DNA binding transcription factors. *EMBO J.* 13, 4042-4053.
- Xu,X., Brown,D.A., Kitajima,I., Bilakovics,J., Fey,L.W. und Nerenberg,M.I. (1994). Transcriptional suppression of the human T-cell leukemia virus type I long terminal repeat occurs by an unconventional interaction of a CREB factor with the R region. *Mol. Cell Biol.* 14, 5371-5383.
- Yang,Y.G., deGoma,E., Ohdan,H., Bracy,J.L., Xu,Y., Iacomini,J., Thall,A.D. und Sykes,M. (1998). Tolerization of anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal natural antibody-forming B cells by induction of mixed chimerism. *J. Exp. Med.* 20, 1335-1342.
- Yoder,J.A., Walsh,C.P. und Bestor,T.H. (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends. Genet.* 13, 335-340.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Gregor Scheef
Anschrift	Lanzelhohl 94, 55128 Mainz
Geburtsdatum	08.01.1972
Geburtsort	Karlsruhe
Familienstand	ledig

### Schulbildung

08/1978 – 06/1982	Tulla Grundschule in Karlsruhe
08/1982 – 06/1991	Goethe-Gymnasium Karlsruhe
19.06.1991	Allgemeine Hochschulreife; Note: 1,8

### Studium

10/1992 – 08/1998	Studium der Biologie, Universität Karlsruhe (TH) Studienschwerpunkte im Hauptstudium: Zoologie, Ingenieurbiologie, Mikrobiologie und Paläontologie
01/1998 – 08/1998	Diplomarbeit am Zoologischen Institut I der Universität Karlsruhe (TH) unter Leitung von Prof. Dr. Taraschewski Thema: Auswirkungen einer Cadmium-Kontamination auf das Wirt-Parasit-Verhältnis von Ratten und dem intestinalen Helminthen <i>Moniliformis moniliformis</i> (Acanthocephala)
20.08.1998	Studienabschluß: Diplom-Biologe; Note: sehr gut

### 7.1.1 Promotion

07/1999 – 07/2002	Promotionsstudium im Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main Anfertigung der Doktorarbeit am Paul-Ehrlich-Institut (Bundesamt für Sera und Impfstoffe) in Langen Interner (1.) Gutachter: Prof. Dr. Ludwig (Universität Frankfurt) Externer (2.) Gutachter: PD Dr. Tönjes (Paul-Ehrlich-Institut) Thema: Transkriptionelle Regulation und Wirtsspezifität porziner (PERV) und humaner (HERV) endogener Retroviren
-------------------	--