

**Molekulare Charakterisierung und
immunologischer Nachweis von porcinen endogenen
Retroviren (PERV)**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Ulrich Krach
aus Köln

Frankfurt 2001
(DF1)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 1997 bis Mai 2001 am Paul-Ehrlich-Institut in Langen durchgeführt.

An dieser Stelle sei all denen gedankt, die dazu beigetragen haben, daß die vorliegende Arbeit zustande gekommen ist. Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Kurth für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Paul-Ehrlich-Institut.

Herrn Dr. Ralf Tönjes für die Vergabe des Themas, die Betreuung, die wissenschaftliche Beratung sowie die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Ludwig für die fachliche und fachübergreifende Betreuung dieser Arbeit.

Den Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe für die freundliche Zusammenarbeit, praktische Unterstützung, weitreichende Diskussions- und Hilfsbereitschaft und die Beiträge zu einer aufbauenden Arbeitsatmosphäre: Yvonne Buckendahl, Gundula Braun, Nicole Fischer, Katrin Bieda, Frank Czauderna, Gregor Scheef, Marcus Niebert.

Frau Bettina Löschner und Herrn Dr. Klaus Boller für die Unterstützung bei Immunfluoreszenzanalysetechniken und elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Frau Rahmouni und Herrn Bartel für die Unterstützung bei der Herstellung von qualitativ hochwertigen Bildern und Ausdrucken.

Allen, die hier nicht namentlich Erwähnung finden, sich aber meinen Fragen und Wünschen ausgesetzt sahen und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ganz besonders den Menschen, die mir nahe stehen und mich in einer Weise unterstützt haben, die weit über fachliche Diskussionen und technische Hilfe hinaus geht: meinen Eltern, meinen Geschwistern, meinen Freunden und meiner Freundin.

All diesen Menschen sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

Einige Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht unter den Titeln:

Krach U., Fischer N., Czauderna F., Kurth R. and Tönjes R.R.

Generation and testing of a highly specific anti-serum directed against porcine endogenous retrovirus nucleocapsid.

Xenotransplantation (2000) 7: 221-229

Tönjes R.R., Czauderna F., Fischer N., Krach U., Boller K., Chardon P., Rogel-Gaillard C., Niebert M., Scheef G., Werner A. and Kurth R.

Molecularly cloned porcine endogenous retroviruses replicate on human cells.

Transplant Proc. (2000) 32: 1158-1161.

Krach U., Fischer N., Czauderna F. and Tönjes R.R.

Comparison of replication-competent molecular clones of porcine endogenous retrovirus class A and class B derived from pig and human cells.

J. Virol. (2001) 75: 5465-5472.

Krach U., Fischer N., Scheef G., Czauderna F. und Tönjes R.R.

Xenogene porzine endogene Retroviren: Genetik und Wirtszellspezifität.

in: Xenotransplantation, Grundlagen, Chancen, Risiken. Schattauer Verlag (2001), im Druck

Scheef G., Fischer N., Krach U. and Tönjes R.R.

The number of a U3 repeat box acting as a transcriptional enhancer in long terminal repeats of polytropic replication-competent porcine endogenous retroviruses dynamically fluctuates during serial passages on human cells.

J. Virol. (2001), im Druck

Desweiteren wurden Teilergebnisse und entwickelte Technologien dieser Arbeit am 9. März 2001 beim Deutschen Patent- und Markenamt unter der Nr. 101114338 angemeldet.

Tönjes R.R., Krach U., Niebert M.

Replication-competent molecular clones of porcine endogenous retrovirus class A and class B derived from pig and human cells.

Inhaltsübersicht

Einleitung

Retroelemente	1
Retroviren	6
Klassifikation der Retroviren	7
Endogene Retroviren	9
Porcine endogene Retroviren (PERV)	9
Xenotransplantation	10
PERV und Xenotransplantation	14
Zielsetzung der Arbeit	16

Material und Methoden

Organismen	17
Zellkultur	18
Transfektionen und Infektionen	19
Produktion von rekombinanten Proteinen	22
Aktivitätsbestimmung der reversen Transkriptase (RT-Test)	24
Kulturbedingungen der Bakterienstämme	25
Proteinchemische Methoden	25
Molekularbiologische Methoden	32

Ergebnisse

Immunologische Detektion von PERV	46
Molekulare Charakterisierung nativer PERV	66

Diskussion

Immunologische Detektion von PERV	85
Molekulare Charakterisierung nativer PERV	95

Zusammenfassung

104

Abkürzungsverzeichnis

106

Literaturverzeichnis

108

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Retroelemente	1
1.2 Retroviren	6
1.3 Klassifikation der Retroviren	7
1.4 Endogene Retroviren	9
1.5 Porcine Endogene Retroviren (PERV)	9
1.6 Xenotransplantation	10
1.7 PERV und Xenotransplantation	14
1.8 Zielsetzung der Arbeit	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Organismen	17
2.1.1 Bakterienstämme	17
2.1.2 Insektenzelllinien	17
2.1.3 Säugerzelllinien	18
2.2 Zellkultur	18
2.2.1 Kultivierung von Insektenzellen	18
2.2.2 Kultivierung von Säugerzellen	19
2.2.3 Einfrieren von Säugerzellen	19
2.3 Transfektionen und Infektionen	19
2.3.1 Transfektion von Insektenzellen zur Herstellung rekombinanter Baculoviren	19
2.3.2 Infektion von SHi5 und SF9 Zellen zur Analyse rekombinanter Proteinexpression	20
2.3.3 Infektion von SHi5 und SF9 Zellen zur präparativen Proteinexpression	21
2.3.4 Transfektion von Säugerzellen	21
2.3.5 Infektion von Säugerzellen	21
2.4 Produktion von rekombinanten Proteinen	22
2.4.1 Plaqueassay	22
2.4.2 Amplifikation rekombinanter Baculoviren	22
2.4.3 Überprüfung rekombinanter Viren durch Polymerase Kettenreaktion (PCR)	23
2.4.4 Herstellung hochtitriger Virusstocks	23
2.4.5 Titration der Virusstocks	23
2.5 Aktivitätsbestimmung der reversen Transkriptase (RT-Test)	24

2.6 Kulturbedingungen der Bakterienstämme	25
2.6.1 Kulturmedien	25
2.6.2 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	25
2.7 Proteinchemische Methoden	25
2.7.1 Proteingelektrophorese	25
2.7.2 Färbung von Proteingelen	26
2.7.3 Western Blotting	26
2.7.4 Enhanced chemiluminescence (ECL)-Verfahren	27
2.7.5 Aufreinigung rekombinanter Proteine	27
2.7.6 Trichloressigsäurefällung (TCA-Fällung)	28
2.7.7 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen	28
2.7.8 Enzymgekoppelter Immuntest (ELISA)	28
2.7.9 Immunperoxidase Assay	29
2.7.10 Gefrierschnitte von Geweben und Zellen	29
2.7.11 Herstellung von synthetischen Peptiden	29
2.7.12 Immunisierung von Kaninchen, Ziegen und Hühnern mit synthetischen Peptiden	30
2.7.13 Indirekte Immunfluoreszenzanalysen mit Insekten- und Säugerzellen	30
2.7.14 Indirekte Immunfluoreszenzanalysen mit Gefrierschnitten	31
2.7.15 Immunogoldmarkierung von Gefrierschnitten	31
2.7.16 Histologische Färbung von Gefrierschnitten	31
2.7.17 Aufreinigung von Viruspartikeln	32
2.8 Molekularbiologische Methoden	32
2.8.1 Isolierung von Nukleinsäuren	32
2.8.1.1 Isolierung von genomischer DNA	32
2.8.1.2 Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien	32
2.8.1.2.1 Minipräparation durch alkalische Lyse	32
2.8.1.2.2 Midi- und Maxipräparation	33
2.8.1.2.3 Isolation von λ -Phagen DNA	33
2.8.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	34
2.8.3 Agarosegelelektrophorese	34
2.8.4 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	34
2.8.5 Anlegen einer λ -Phagenbank aus der Zelllinie PK-15	34
2.8.6 Durchmusterung der Phagenbibliothek	35
2.8.7 „Fill-in“ Reaktion an überhängenden Restriktionsschnittstellen	36
2.8.8 Dephosphorylierung von DNA	36

2.8.9 Ligation	36
2.8.10 T/A-Klonierung von PCR Amplifikaten	37
2.8.11 Herstellung kompetenter Bakterien	37
2.8.12 Transformation von Bakterien	37
2.8.13 <i>In vitro</i> Transkriptions/Translations Assay (Protein Truncation Test)	38
2.8.14 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	38
2.8.15 Amplifikation langer DNA Sequenzen via PCR	39
2.8.16 DNA Sequenzierung	39
2.8.17 Transfer von Nukleinsäuren	39
2.8.17.1 Kapillarblotting nach Southern	39
2.8.18 Markierung von DNA Sonden für Hybridisierungen	40
2.8.18.1 Markierung von Restriktionsfragmenten	40
2.8.18.2 3'-Endmarkierung von Oligonukleotiden	40
2.8.19 Hybridisierungen	41
2.8.19.1 DNA Fragment Sonden	41
2.8.19.2 DNA Oligonukleotid Sonden	41
2.8.20 Datenbank Nummern	42
2.8.21 Verwendete Oligonukleotide	42
3. Ergebnisse	46
3.1 Immunologische Detektion von PERV	46
3.1.1 Expression rekombinanter PERV Proteine in Insektenzellen	46
3.1.1.1 Herstellung der Transfervektoren	46
3.1.1.2 Analyse infizierter Insektenzellen	47
3.1.1.3 Aufreinigung rekombinanter PERV Proteine	51
3.1.2 PERV-spezifische Peptidantiseren	52
3.1.2.1 Auswahl der Peptidsequenzen	52
3.1.2.2 Analyse der Peptidantiseren aus Kaninchen	53
3.1.2.2.1 Peptidantiseren gerichtet gegen PERV Gag	53
3.1.2.2.2 Peptidantiseren gerichtet gegen PERV Env	60
3.1.2.3 Analyse der Peptidantiseren aus Hühnern	63
3.1.2.4 Analyse der Peptidantiseren aus Ziegen	65
3.2 Molekulare Charakterisierung nativer PERV	66
3.2.1 Durchmusterung einer PK15- λ -Phagen Bibliothek	66
3.2.2 Differenzierung der Klone	66
3.2.3 Identifizierung von offenen Leserahmen (ORFs)	67
3.2.4 Molekulare Charakterisierung der PERV Vollängenklone	69

3.2.4.1 Überprüfung der PERV-A Klone	69
3.2.4.2 Genetische Struktur nativer PERV Klone aus PK15 Zellen	70
3.2.4.3 Genetische Merkmale der PERV LTR	73
3.2.4.4 Veränderung der LTR nach Passagierung von PERV in Zellkultur	74
3.2.4.5 Charakterisierung der chromosomalen flankierenden Sequenzen	76
3.2.4.6 Integration der nativen PERV in verschiedenen Schweinerassen	79
3.2.5 Untersuchung der PERV Expression und Replikation	79
3.2.5.1 Integrationsnachweis nach Infektion mit PERV	80
3.2.5.2 Expression von PERV Proteinen nach Infektion	80
3.2.5.3 Nachweis von RT Aktivität im Überstand infizierter Zellen	81
3.2.6 Morphologie nativer PERV	83
4. Diskussion	85
4.1 Immunologische Detektion von PERV	85
4.1.1 Expression von rekombinanten PERV Proteinen	85
4.1.1.1 Expression von PERV Gag, Env A und Env B	85
4.1.1.2 Aufreinigung rekombinanter PERV Proteine	86
4.1.2 PERV-spezifische Peptidantiseren	87
4.1.2.1 Antiseren gerichtet gegen PERV Gag und Env	87
4.1.3 Anwendung von PERV-spezifischen Peptidantiseren	94
4.2 Molekulare Charakterisierung nativer PERV	95
4.2.1 Überprüfung der nativen PERV-A Klone	95
4.2.2 Struktur der nativen PERV Sequenzen	96
4.2.3 Stammbaumanalysen verschiedener PERV Sequenzen	98
4.2.4 Chromosomale flankierende Sequenzen der nativen PERV Klone	99
4.2.5 Infektiösität nativer PERV	101
4.2.6 Bedeutung der Isolation nativer PERV Sequenzen	102
5. Zusammenfassung	104
6. Abkürzungsverzeichnis	106
7. Literaturverzeichnis	108

1. Einleitung

1.1 Retroelemente

Alle eukaryotischen sowie einige prokaryotische Genome beinhalten eine Vielzahl von Sequenzen, die entweder strukturelle Ähnlichkeiten und Sequenzübereinstimmungen mit exogenen, infektiösen Retroviren aufweisen, oder aufgrund ihrer Sequenz die Integrationen von revers transkribierten zellulären mRNA Molekülen darstellen (Brosius, 1991; Boeke & Stoye, 1997). Diesen Elementen, die in ihrer Gesamtheit als Retroelemente bezeichnet werden, ist gemein, daß ihrer Bildung eine reverse Transkription, d.h. die Umschreibung von RNA in DNA, vorausgeht (Löwer *et al.*, 1996). Nach Schätzungen besteht das humane Genom zu 43-45% aus transponierten Sequenzen, eben solchen RNA Transkripten, die nach reverser Transkription in das Genom reintegriert wurden (Li *et al.*, 2001; International Human Genome Sequencing Consortium, 2001).

Zu den Retroelementen werden mehrere Vertreter gezählt, die nach Kodierungskapazität, dem Vorhandensein des Gens für die reverse Transkriptase (RT), Promotorsequenzen und terminal gelegenen direkten Sequenzwiederholungen (long terminal repeats, LTRs) eingeordnet werden (Abbildung 1.1). Synonyme Bezeichnungen für die einzelnen Retroelemente sind in Tabelle 1.1 aufgeführt.

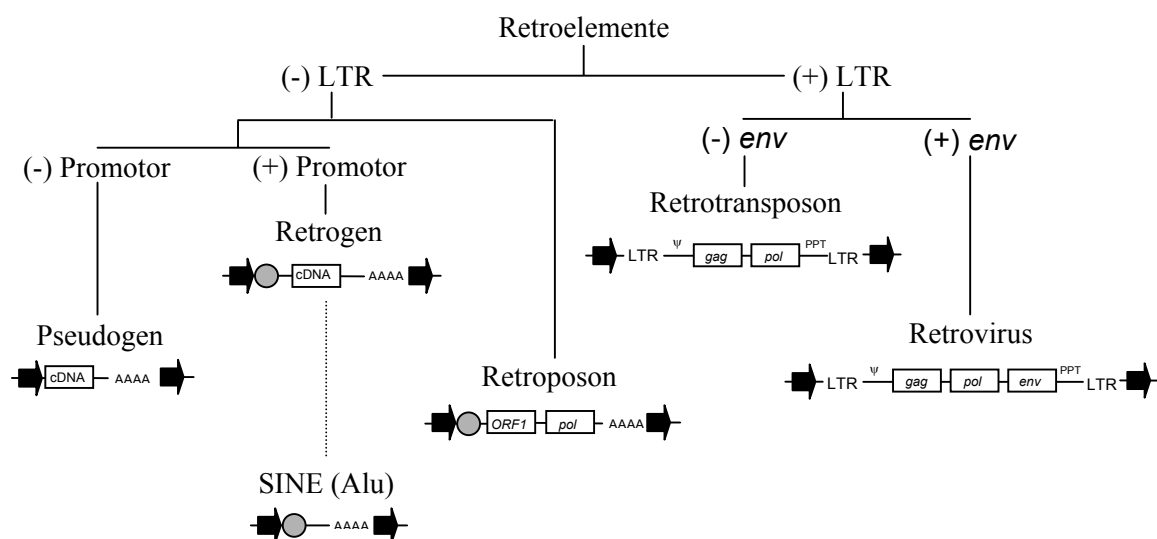


Abb. 1.1 Klassifizierung der Retroelemente.

Schematische Einordnung der wichtigsten Retroelemente, charakterisiert durch das Vorhandensein von LTRs, Promotor- und env Sequenzen. Erläuterungen im Text. (Verändert nach Wilkinson *et al.*, 1994). ■: direkte Wiederholungen zellulärer DNA; ●: Promotor; PPT: Polypurintrakt; ψ: Verpackungssignal.

Pseudogene stellen reverse Transkripte von prozessierten, zellulären Genen dar, die in das Genom reintegriert sind. Da ihnen jegliche Promotorsequenzen fehlen, sind sie „dead on arrival“ (Petrov *et al.*, 2000). Pseudogene, die über zelluläre Promotorsequenzen verfügen und daher transkribiert werden können, werden auch als Retrogene bezeichnet (Löwer *et al.*, 1996). Zu dieser Kategorie können auch die „short interspersed nuclear elements“ (SINEs) gezählt werden, die etwa 13% des humanen Genoms ausmachen (Li *et al.*, 2001; International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Sie besitzen Promotorsequenzen für die RNA Polymerase III, haben aber im Gegensatz zu Retrogenen keine Kodierungskapazität (Löwer *et al.*, 1996; Weiner, 2000). SINEs sind zwischen 100 und 300 Basenpaaren (bp) lang und haben ihren Ursprung in Struktur-RNA Pseudogenen (Deininger & Batzer, 1993; Smit & Riggs, 1995). In erster Linie werden SINEs durch Alu-Elemente vertreten, die sich von 7SL RNA ableiten, mit ca. 10^6 Kopien im humanen Genom vorhanden sind (Ullu & Tschudi, 1984; Li *et al.*, 2001; International Human Genome Sequencing Consortium, 2001) und somit ca. 11% des Genoms ausmachen (Li *et al.*, 2001; International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Weitere, gut charakterisierte Vertreter der SINEs sind die SINE-R-Elemente, die mit 10^3 Kopien im humanen Genom vorhanden sind und sich von partiell deletierten HERV-K LTRs ableiten. Sie besitzen einen RNA-Polymerase II Promotor (Ono *et al.*, 1987). Diesen Elementen und Pseudogenen ist gemein, daß sie erstens am 3'-Ende poly(A) bzw. oligo(A) Sequenzen besitzen, zweitens, daß an der Integrationsstelle variable Sequenzduplikationen vorhanden sind und drittens, daß sie nicht für funktionale Genprodukte kodieren (Boeke & Stoye, 1997), da sie im hohen Maße Punktmutationen und Deletionen aufweisen (Löwer *et al.*, 1996).

Den Prototyp des Retroposons stellen LINEs (long interspersed nuclear elements) dar (Singer, 1982). Der Name wurde gewählt um den Größenunterschied zwischen diesen Elementen gegenüber der Gruppe der SINEs zu verdeutlichen. Während Alu- und SINE-R Elemente zwischen ~300 bzw. ~630 bp umfassen (Weiner *et al.*, 1986; Ono *et al.*, 1987), sind humane LINE-1 (L1) 6,1 Kilobasen (kb) groß (Dombroski *et al.*, 1991). LINEs besitzen einen internen RNA Polymerase II Promotor (Swergold, 1990), sind am 3'-Ende poly- oder oligoadenyliert (im *Drosophila* I Faktor wurde eine adäquate Sequenz gefunden, [TAA]_n; Boeke & Stoye, 1997) und kodieren für zwei offene Leserahmen (open reading frames, ORFs) (Dombroski *et al.*, 1991). Das Genprodukt von ORF1 stellt ein RNA-bindendes Protein dar, dessen Funktion noch nicht geklärt werden konnte. Für das humane Protein wurde ein „Leucin-zipper“-ähnliches Motiv nachgewiesen (Holmes &

Singer, 1992) und in den ORFs vieler anderer Retroposons wurden putative „Zinkfinger“ Motive gefunden, die Ähnlichkeiten zu „Zinkfinger“ Motiven der Gag Proteine anderer Retroelemente zeigen (Covey, 1986). Daneben zeigte sich für das humane L1, daß das ORF1 Protein in einem hochmolekularen, zytoplasmatischen Komplex vorhanden ist, aus dem es durch RNase Behandlung freigesetzt werden konnte (Boeke & Stoye, 1997). Für den zweiten offenen Leserahmen der LINEs wurde die enzymatische Aktivität von reverser Transkriptase nachgewiesen (Ivanov *et al.*, 1991; Mathias *et al.*, 1991). Dieser Leserahmen ist somit adäquat zum *pol* Gen der Retrotransposons und Retroviren. Es wird davon ausgegangen, daß die von Retroposons kodierte Transpositionsmaschinerie *in trans* von Pseudogenen und SINEs genutzt wird (Weiner, 2000).

Tab. 1.1 Nomenklatur der Retroelemente.
(Verändert nach Boeke & Stoye, 1997)

<i>Namen</i>	<i>Synonym(e) oder Subtypen*</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Beispiel (Wirt)</i>
Endogene Retroviren	diverse (Tabelle 1.2)	als Provirus in der Keimbahn vorhandenes Retrovirus; oft nicht infektiös; oft defekt	MLV (Maus), HERV (Mensch), PERV (Schwein)
LTR Retrotransposons	Typ I Retrotransposons; virale Retroposons	LTR-tragendes Retrotransposon; nicht infektiös als Teil des normalen Lebenszyklus	Ty1 (Hefe)
Poly(A) Retrotransposons	nicht-LTR Retrotransposons; Typ II Retrotransposons; nicht-virale Retroposons; LINE	Retrotransposon, das keine terminalen Wiederholungen besitzt; hat gewöhnlich einen poly (A) Trakt oder eine ähnliche Struktur am 3'-Ende; viele sind mit Wirts DNA Wiederholungen assoziiert.	L1 (Mensch)
Pararetroviren	Hepadnavirus*; Caulimovirus*	infektiöse DNA Viren, die über RNA Intermediate replizieren	HHBV (Mensch)
Retroplasmide		Plasmid kodierte RT; Hinweise für RNA Replikationsintermediate (nur in Mitochondrien gefunden worden)	Mauriceville (<i>Neurospora</i>)
Retrointrons	mobiles Gruppe II Intron	Intron, daß für RT kodiert; Hinweise für RT-abhängige Intronmobilität (nur von Organellen bekannt)	al2 (Hefe)
Retrotranskripte	Retroposon ² ; SINE*; prozessierte Pseudogene*; Retrogen ¹	Elemente, die nicht für RT kodieren und anscheinend über RNA Intermediate transponieren; können durch Pol II oder Pol III transkribiert sein; können von Poly(A) Retrotransposons zur Mobilisierung abhängig sein	<i>Alu</i> Sequenzen (Mensch)
Retrons	msDNA	ungewöhnlich verzweigte Nukleinsäure mit DNA und RNA Anteilen; DNA Segmente, erzeugt durch RT, die durch angrenzende DNA kodiert wird; liegt oft auf „Retrophagen“	msDNA (Bakterien)

Die mit * markierten Bezeichnungen sind Subtypen der in Spalte „Namen“ angegebenen Bezeichnungen. ¹nach Löwer *et al.* (1996) besitzen Retrogene Kodierungskapazität. ²wird von Löwer *et al.* (1996) zu den Poly(A) Retrotransposons gezählt.

Für das Maus L1 wurde gezeigt, daß beide Genprodukte mit dem Vollängentranskript in Sucrosegradienten kosedimentieren (Martin, 1991). Dieser Ribonukleoprotein-Komplex

stellt vermutlich das Reaktionszentrum der reversen Transkription dar (Martin, 1991).

Im humanen Genom sind drei Familien von LINEs (LINE1 bis LINE3; auch L1-L3) vorhanden, von denen nur L1 aktiv ist (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). LINEs liegen in ca. $0,8-1 \times 10^6$ Kopien im humanen Genom vor und machen etwa 19-20% der DNA aus (Li *et al.*, 2001; International Human Genome Sequencing Consortium, 2001), wovon die meisten -in der Maus mehr als 90% (Martin, 1991)- durch Punktmutationen und Deletionen defekt sind (Hutchinson *et al.*, 1989). Für das humane Genom wird aber davon ausgegangen, daß 30 - 60 aktive L1-Elemente vorhanden sind (Sassman *et al.*, 1997). Transpositionelle Aktivität von Säuger-LINEs konnte sowohl für die Keimbahn (Katzir *et al.*, 1985; Kazazian *et al.*, 1988; Bratthauer & Fanning, 1992; Narita *et al.*, 1993; Holmes *et al.*, 1994; Kingsmore *et al.*, 1994; Kohrman *et al.*, 1996; Takahara *et al.*, 1996; Perou *et al.*, 1997) als auch für somatische Zellen gezeigt werden (Morse *et al.*, 1988; Miki *et al.*, 1992). Ähnliche Elemente konnten auch in Insekten, Protozoen, Pflanzen und Pilzen nachgewiesen werden (Eickbush, 1992).

Interessanterweise sind L1-ähnliche Sequenzen in allen Eukaryoten aber nicht in *Saccharomyces* vorhanden (Boeke & Stoye, 1997).

Retrotransposons gleichen Retroviren mit der Ausnahme, daß sie kein *env* Gen besitzen und somit, wie SINEs, LINEs und Retroposons, nicht infektiös sind. Retrotransposons werden entweder als Vorläufer oder als Derivate von Retroviren angesehen (Löwer *et al.*, 1996). Übereinstimmungen zu den Retroviren reichen von den LTRs, die Promotorsequenzen beinhaltet (Löwer *et al.*, 1996), über die Primer bindende Sequenz (primer binding site, PBS) und den Polypurin Trakt (Boeke & Stoye, 1997) für die Umschreibung von RNA in DNA, sowie das Verpackungssignal (Ψ , psi site) für die spezifische Einlagerung der viralen RNA in zytoplasmatische Virus-ähnliche Partikel (virus-like particles, VLPs) (Löwer *et al.*, 1996). Konservierte Aspekte der Virusreplikation zwischen Retroviren und Retrotransposons finden sich in der Transposition via reverser Transkription, der Bildung von VLPs, die als Intermediat der Retrotransposition angesehen werden, und der Abhängigkeit von Enzymen, die die Retrotransposition vermitteln (Protease (PR), RT, RNase H und Integrase (IN)) (Boeke & Stoye, 1997).

Neben der Polymerase kodiert ein zweiter Leserahmen für Proteine, die äquivalent zu den retroviralen Kapsidproteinen (kodiert durch das *gag* (group specific antigens) Gen) sind. Diese Proteine sind für die Bildung der VLPs verantwortlich. Es wird angenommen, daß in diesen Intermediaten die reverse Transkription stattfindet (Garfinkel, 1992). Die

Verbreitung von Retrotransposons reicht von Protozoen bis zu den Menschen (Mager & Henthorn, 1984; Garfinkel, 1992). Zu den bestuntersuchten gehören die Ty-Elemente der Hefe (bekannt sind Ty1 bis Ty5) (Boeke & Stoye, 1997) und die *copia*- sowie *gypsy*-Elemente von *Drosophila melanogaster*. Sie lassen sich in zwei Familien unterteilen, die Ty1-*copia*- und die Ty3-*gypsy*-Familie (Boeke & Stoye, 1997). Der offensichtlichste Unterschied zwischen diesen beiden Familien besteht in einer Inversion der Reihenfolge der Domänen im *pol* Gen in der Ty1-*copia*-Familie (PR, IN, RT). Die Ty3-*gypsy*-Familie trägt die von Retroviren bekannte Reihenfolge PR, RT, IN (Boeke & Stoye, 1997). Ty1-Elemente sind 5,9 kb groß und finden sich zwischen 25 bis zu 10.000 mal im Genom der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Garfinkel, 1992; Boeke & Stoye, 1997). *Copia*-Elemente weisen eine Größe von 5,1 kb auf und liegen im Genom von *Drosophila melanogaster* mit etwa 60 Kopien vor (Boeke & Stoye, 1997). Als weitere Übereinstimmung zu den Retroviren konnte vor kurzem für Ty1 nachgewiesen werden, daß die genomische RNA als Dimer in den VLPs vorliegt (Ya-Xiong *et al.*, 2000).

Im humanen Genom existieren etwa 240.000 Kopien sogenannter „transposon-like human elements“ (THE), Retrotransposon-ähnliche Elemente, die eine Größe von 2 bis 3 kb besitzen und keine erkennbaren ORFs aufweisen (Paulson *et al.*, 1985; International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Da sie keine Homologie zur RT zeigen, werden sie als „mammalian apparent LTR-retrotransposons“ (MaLRs) bezeichnet (Smit, 1993). Daneben wurden Sequenzen des humanen endogenen Retrovirus vom Typ H (HERV-H) beschrieben, die die Struktur von Retrotransposons besitzen (Mager & Henthorn, 1984).

Reverse Transkription hat allgemein eine wichtige Rolle bei der Formung des eukaryotischen Genoms gespielt (Baltimore, 1985). Es wird davon ausgegangen, daß die Balance zwischen DNA Zunahme durch Retrotransposition und andere Prozesse und DNA Verlusten einen Faktor darstellt, der die Größe des eukaryotischen Genoms beeinflusst (Petrov *et al.*, 2000). Für die Klasse der Gräser konnte gezeigt werden, daß die Anzahl der Retrotransposons für das C-Wert Paradoxon, der Diskrepanz zwischen Genomgröße und Komplexität eines Organismus (Thomas, 1971), verantwortlich ist (Wendel & Wessler, 2000). Darüber hinaus konnte für die wilde Gerste (*Hordeum spontaneum*) nachgewiesen werden, daß eine Korrelation zwischen der Kopienanzahl des Retrotransposons *BARE-1*, der Genomgröße und lokalen Umweltbedingungen besteht (Kalendar *et al.*, 2000).

1.2 Retroviren

Retroviren stellen die komplexesten Vertreter der Retroelemente dar. Neben den *gag* und *pol* Genen findet sich ein *env* (envelope) Gen, daß für Hüllproteine kodiert, die den Eintritt des Virions in die Wirtszellen vermitteln (Löwer *et al.*, 1996). Retroviren sind somit in der Lage, infektiöse Partikel zu bilden. Es gibt Hinweise, daß sie sich evolutionär von den Retrotransposons herleiten (Temin, 1980). Die Genomorganisation 5'-LTR-*gag-pro-pol-env*-3'-LTR, die bei den einfachen Retroviren (z.B. murines Leukämievirus; MLV) (Coffin, 1996) vorliegt, ist prinzipiell allen Retroviren gemein (Teich, 1984; Coffin, 1996). Komplexere Viren, wie das humane T-Zell Leukämievirus (auch humanes T-lymphotropes Virus; HTLV), das humane Spumaretrovirus (HSRV) oder das humane Immundefizienz Virus (HIV), besitzen zusätzliche Gene, die für regulatorische und akzessorische Proteine kodieren (Coffin, 1996). Das retrovirale Genom weist vier unter den Viren einzigartige Eigenschaften auf: Retroviren sind 1. die einzigen Viren mit einem diploiden Genom; 2. die einzigen Viren, die nur durch die zelleigene Transkriptionsmaschinerie synthetisiert und prozessiert werden; 3. die einzigen Viren, deren Genom mit einer spezifischen zellulären tRNA für die Replikation assoziiert ist und 4. die einzigen (+)-Strang RNA Viren, deren Genom nach der Infektion nicht direkt als mRNA zur Synthese von Proteinen dient (Coffin, 1996).

Historisch reichen Untersuchungen von Retroviren bis zum Anfang des 20. Jahrhunderts zurück, als 1911 Peyton Rous mit dem Rous-Sarcoma Virus (RSV) das infektiöse Agens für die Bildung von spontanen Sarcomata in Hühnern isolierte (Rous, 1911). Vorausgegangen waren Untersuchungen von Ellermann und Bang 1908, die Leukämie in Hühnern durch die Injektion von zellfreien Gewebefiltraten übertragen konnten (Ellermann & Bang, 1908). Da aber Leukämien zu diesem Zeitpunkt noch nicht als Krebserkrankungen erkannt worden waren, fanden ihre Untersuchungen nicht das Echo wie die von Rous (Weiss, 1984). Es folgte die Entdeckung von Retroviren in einer Vielzahl von Eukaryoten. 1964 formulierte Temin die Hypothese der reversen Transkription (Temin, 1964), die 1970 durch die Entdeckung der reversen Transkriptase belegt wurde (Temin & Mizutani, 1970; Baltimore, 1970). 1969 stellten Huebner und Todaro die „Onkogen Hypothese“ auf. Nach dieser Hypothese wirken Karzinogene durch Induktion der Expression von ansonsten kryptischen, retroviralen Genen, die bereits in den Wirtszellen vorhanden sind. Onkogene Informationen sind also genetische Elemente und Krebs entsteht nicht als pathogenetische Reaktion auf ein Virus. Heute ist bekannt, daß Vertebratenzellen Gene besitzen, die

homolog zu viralen Onkogenen sind, daß aber diese Gene zellulären Ursprungs sind (Bishop & Varmus, 1984). 1980 wurde das erste humanpathogene Retrovirus, HTLV, isoliert (Poiesz, 1980). 1983 folgte die Entdeckung des humanen Immundefizienz Virus (HIV) (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1984).

Retroviren sind umhüllte Viren, die typischerweise einen Durchmesser von 90-140 nm besitzen (Nermut & Hockley, 1996). Die Hülle entstammt der Zytoplasmamembran der Wirtszelle und ist mit Proteinen besetzt, die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als „Spikes“ zu erkennen sind. Die Hüllproteine, die als Oligomere vorliegen, sind je nach Virus zwischen 5 nm (Mason-Pfizer monkey virus, M-PMV) (Gelderblom, 1987; Coffin, 1992) und 10 nm (HIV) (Nermut & Hockley, 1996) lang. Unter der Membran liegt eine Membran-assoziierte Schale (gag shell, Matrix). Der Kern der Retroviren, das Kapsid (auch coreshell), ist entweder zylindrisch, konisch oder ikosaedrisch (Nermut & Hockley, 1996) und enthält neben den retroviralen Enzymen RT, IN und PR, den Ribonukleoproteinkomplex, der sich aus dem viralen Genom und dem Nukleokapsid zusammensetzt. Ein schematische Darstellung eines Virions ist in Abbildung 1.2 gezeigt.

1.3 Klassifikation der Retroviren

Zu der Klasse der Viren, die RNA revers transkribieren, gehören drei Familien: die *Retroviridae*, die *Metaviridae* und die *Pseudoviridae*. Während die letztgenannten in Pilzen und Invertebraten zu finden sind, infizieren die *Retroviridae* Vertebraten (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/overview/dnaandrna.html>). Eine grobe Einteilung in simple und komplexe Retroviren basiert auf dem Vorhandensein weiterer Gene neben *gag*, *pro*, *pol* und *env* (Coffin, 1992; Murphy *et al.*, 1994), wobei z.B. C-Typ Viren der Säuger zu den simplen und unter anderem HIV zu den komplexen Viren gezählt werden.

Im Elektronenmikroskop lassen sich morphologisch vier Typen von Retroviren unterscheiden (Teich, 1984). A-Typ Partikel liegen nur intrazellulär vor und besitzen keine Infektiösität. Der Prototyp der B-Typ Partikel-Gruppe ist MMTV (Mouse mammary tumor virus). Die Gruppe zeichnet sich durch Bildung intrazytoplasmatischer toroidaler Strukturen an der Knospungsstelle und elektronendichte, exzentrische Kerne in reifen Partikeln aus. Die meisten Retroviren, die bislang isoliert wurden, gehören zu der C-Typ Gruppe. Ein Hauptmerkmal dieser Gruppe ist, daß bis zum Knospen des Virions keine intrazytoplasmatischen Virusstrukturen zu erkennen sind. Reife C-Typ Partikel besitzen zentral gelegene, elektronendichte Kerne. D-Typ Retroviren werden durch M-MPV

(Mason-Pfizer monkey virus) vertreten. Reife Virionen dieser Gruppe zeigen Ähnlichkeit zu den B-Typ Viren, tragen aber kürzere „Spikes“ auf der Oberfläche (Teich, 1984).

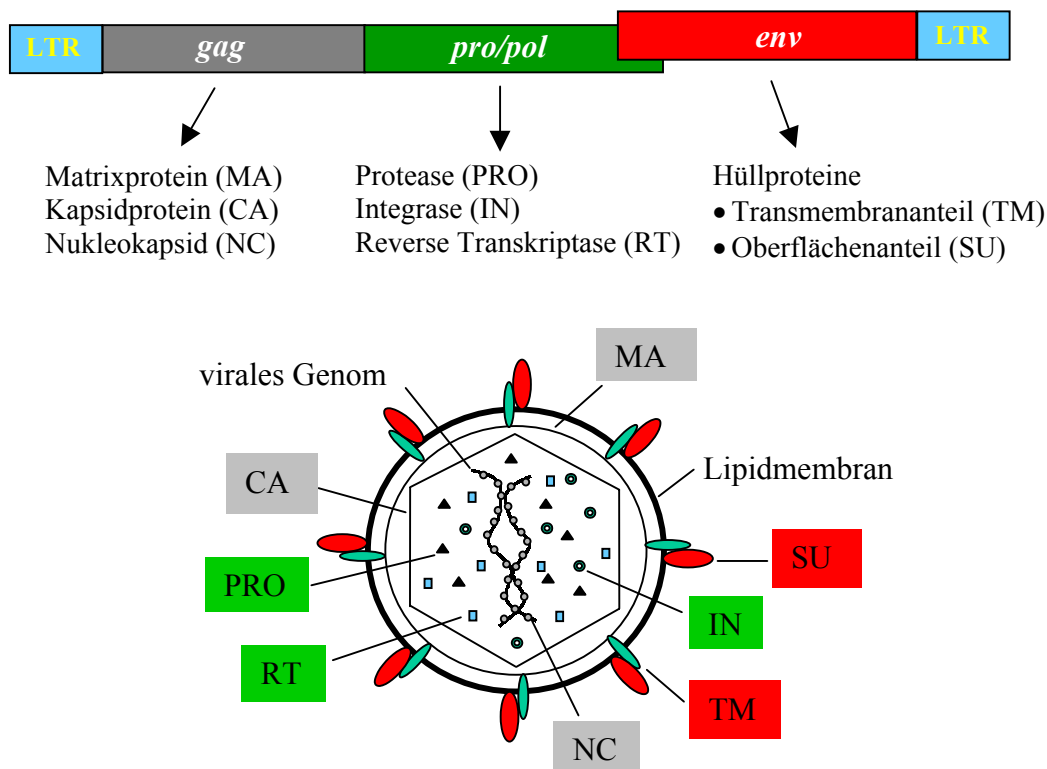


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der proviralen Genomstruktur eines Retrovirus und eines Virions.

Die Genprodukte der viralen Leserahmen sind unter den jeweiligen Genen aufgeführt (oben) und im Virion mit den Farben der jeweiligen Gene gekennzeichnet (unten). Im reifen Viruspartikel liegt das RNA-Genom mit Nukleokapsidproteinen assoziiert vor. Die Lipidmembran entstammt der Zytoplasmamembran der Wirtszelle. LTR: long terminal repeat; gag: group specific antigen; pro/pol: Protease/Polymerase; env: envelope.

Basierend auf dem Weg des Zusammenbaus der Viruspartikel können B-Typ und C-Typ Retroviren unterschieden werden, wobei die C-Typ Gruppe zwei Untergruppen enthält. Die eine Gruppe stellen die Retroviren der Säuger und Vögel dar, die andere die HTLV/BLV Gruppe und die Lentiviren (Nermut & Hockley, 1996) (Tabelle 1.2). Nach morphologischen Kriterien und der evolutionären Verwandtschaft wird die Familie der *Retroviridae* in sieben Gattungen eingeteilt, die in Tabelle 1.2 aufgelistet sind. Zusätzlich dazu sind in letzter Zeit komplexe Retroviren auch aus mehreren Fischarten isoliert worden, die noch keine taxonomische Klassifizierung erfahren haben (Petropoulos, 1997). Desweiteren wurden kürzlich die in *Drosophila melanogaster* gefundenen *gypsy*-Sequenzen als echte Retroviren identifiziert aber noch nicht in das taxonomische System der Retroviren aufgenommen (Petropoulos, 1997).

1.4 Endogene Retroviren

Abgesehen von wenigen Ausnahmen (MMTV und das Jaagsiekte Schaf Retrovirus (JSRV)) (Wilkinson *et al.*, 1994) fehlt endogenen Retroviren ein exogener Lebenszyklus. Das Genom endogener Retroviren, das im proviralen Zustand dem von exogenen, durch Infektion vermittelten, Retroviren entspricht, ist in der Keimbahn des Wirtes verankert und wird nach Mendelschen Regeln vererbt (Coffin, 1984). Sie zeigen aber, evolutionär betrachtet, keine stabile Assoziation mit ihrem Wirt (Coffin, 1984). Das Fehlen eines exogenen Lebenszyklus unterbindet die horizontale Verbreitung (durch Infektion), so daß eine Transmission nur vertikal, von einer Generation auf die nächste, möglich ist. Eine Vielzahl von Vertebraten weisen endogene Retroviren auf (Herniou *et al.*, 1998) und die meisten sind für ihren Wirt apathogen (Coffin, 1984). Eine Zusammenstellung einiger endogener Retroviren ist in Tabelle 1.3 dargestellt.

Tab. 1.2 Klassifizierung der Retroviridae.

Gattung	Typspezies	ICTV ¹ Nomen-klatur	Viruszusammenbau	Genom
Avian C-Typ Retroviren (Aviane – Leukosis-Sarcoma Virusgruppe)	Rous Sarcoma Virus (RSV)	Alpharetroviren ²	C-Typ	Simpel
MLV ³ -verwandte Retroviren ⁴	MLV	Epsilonretroviren ⁵	C-Typ	Simpel
Mammalier B-Typ Retroviren	Mouse mammary tumor virus (MMTV)	Gammaretroviren	B-Typ	Simpel
D-Typ Retroviren	Mason-Pfizer monkey virus (M-PMV)	Betaretroviren	B-Typ	Simpel
HTLV/BLV Gruppe ⁶	HTLV, BLV	Deltaretroviren	C-Typ	Komplex
Lentiviren	Humanes Immunodefizienz Virus (HIV) -1 und -2	Lentiviren	C-Typ	Komplex
Spumaviren	Humanes Foamy Virus (HFV ⁷)	Spumaviren	B-Typ	Komplex

¹International committee on taxonomy of viruses (<http://www.ncbi.nlm.gov/ICTV>); ²die Typspezies des ICTV für diese Gattung ist das Aviane Leukosisvirus; ³Murines Leukämievirus (murine leukemia virus, MLV); ⁴Subgattung davon: mammalier C-Typ Retroviren (Petropoulos, 1997); ⁵die Typspezies des ICTV für diese Gattung ist das Walley Dermal Sarcomavirus; ⁶Humanes T-Zell Leukämievirus-1 und -2, Bovines Leukämievirus; ⁷HFV wird auch als HSRV bezeichnet (Petropoulos, 1997).

1.5 Porcine Endogene Retroviren (PERV)

In den 70er Jahren wurden erstmals Viruspartikel des C-Typs in Kulturen stabiler Nierenzelllinien des Schweines nachgewiesen (Breese, 1970; Armstrong *et al.*, 1971). Im Anschluß an den Nachweis, daß es sich bei diesen Partikeln um endogene Retroviren handelt (Todaro *et al.*, 1973), erfolgte in jüngster Zeit die molekulare Charakterisierung und der Nachweis, daß PERV infektiös für humane Zellen sind (Patience *et al.*, 1997; Le Tissier *et al.*, 1997; Czauderna *et al.*, 2000).

Derzeit sind vier Klassen von PERV bekannt, die sich in den Genen für die Hüllproteine unterscheiden und unterschiedliche Wirtszellspezifitäten aufweisen (Le Tissier *et al.*, 1997; Akiyoshi *et al.*, 1998; Takeuchi *et al.*, 1998; Patience *et al.*, 2001). Während PERV-A und PERV-B polytrope Eigenschaften zeigen, konnte für PERV-C (synonym PERV-MSL) in Pseudotypisierungsversuchen nur ein eingeschränktes Wirtszellspektrum nachgewiesen werden; diese Klasse gilt als ecotrop (Takeuchi *et al.*, 1998). Von der *env* Sequenz der Klasse D sind bislang nur 275 Nukleotide bekannt (Patience *et al.*, 2001)¹.

Untersuchungen ergaben, daß etwa 30 bis 50 provirale Integrationen im Schweinegenom zu finden sind (Patience *et al.*, 1997). Zumindest für einige dieser Proviren konnte die Bildung von mRNA in Herz-, Nieren-, Milz-, Haut-, Lunge- und Lebergewebe sowie in peripheren Blutlymphozyten und Aortaendothelzellen nachgewiesen werden (Patience, *et al.*, 1997; Akiyoshi *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1998). Bislang ist jedoch unklar, ob Viruspartikel auch *in vivo*, in Schweineorganen, gebildet werden. Desweiteren konnte bis heute keine Erkrankung von Schweinen mit PERV in Verbindung gebracht werden.

1.6 Xenotransplantation

Die Übertragung von lebenden Zellen, Geweben oder Organen von einem nicht-humanen Spender auf einen Menschen zur therapeutischen Behandlung von Organversagen im Endstadium und anderer Erkrankungen, wird als Xenotransplantation (XTx) bezeichnet (UNOS, 1995). Historisch betrachtet liegen erste Versuche der Übertragung von tierischem Gewebe auf Menschen einige hundert Jahre zurück. Bereits 1682 soll einem russischen Adligen ein Knochenstück eines Hundes in den Schädel eingesetzt worden sein. Ullmann, der 1902 eine Hundeniere auf eine Ziege übertrug, stellte seine Forschung auf diesem Gebiet ein, nachdem eine gleichartige Übertragung vom Schwein auf eine nierenkranke Frau scheiterte (Nagy, 1999). 1905 transplantierte Princeteau Teile von Kaninchennieren auf ein an Urämie leidendes Mädchen und 1910 verpflanzte Unger die Niere eines Rhesusaffen. Es folgte 1923 Neuhof, der eine Schafsniere übertrug und 1924 Avramovici, der Nierentransplantationen von Katzen auf Hunde durchführte (<http://www.healthsci>).

¹ Die Existenz eines *env* Gens der Klasse D wurde 2000 in einem Patent (Patent Nr. WO 00/11187) beschrieben. In einer neueren Publikation wird vor dem Hintergrund der Existenz von weiteren PERV Sequenzen im Genom des Hausschweins und ihm verwandten Arten eine neue Nomenklatur für PERV vorgeschlagen, so daß die Formulierung PERV A bis D dort nicht mehr auftritt (Patience *et al.*, 2001).

utas.edu.au/pathsec/CJA308%20projects/transplant/history_ehtics.htm). Erst 1964 wurden erstmals erfolgreich solide Organe verpflanzt. In New Orleans wurden insgesamt 13 Nieren von Schimpansen transplantiert, wobei eine Patientin neun Monate mit normalen Nierenfunktionen überlebte, bevor sie an den Nebenwirkungen der Immunsuppression verstarb (Reemstma *et al.*, 1964). Die wahrscheinlich bekannteste Xenotransplantation fand 1984 statt, als einem als „Baby Fae“ bekannt gewordenen Säugling, der mit einem schweren Herzfehler zur Welt kam, ein Pavianherz transplantiert wurde. Das Kind überlebte 20 Tage (Bailey *et al.*, 1985). Die bislang letzte Übertragung eines Primatenorgans überlebte ein Patient 26 Tage, bevor er an Leberversagen starb (Starzl *et al.*, 1993). Die Verwendung von Primaten als Spender für Xenotransplantationen wurde in den USA kürzlich durch die Gesundheitsbehörde (FDA) ausgeschlossen (<http://www.fda.gov/cber/gdlns/xenoprim.pdf>, 1999) was zu einer Verstärkung der Forschung im Hinblick auf die Verwendung von Schweinen für die Xenotransplantation führte, da sie anatomisch und physiologisch dem Menschen ähnlich sind (Sachs, 1994; Cozzi & White 1995; Dorling *et al.*, 1997; Greenstein & Sachs, 1997). Derzeit umfassen Studien die Implantation von fötalem neuronalem Gewebe zur Behandlung von Parkinson und Huntington Erkrankungen (Deacon *et al.*, 1997; Fink *et al.*, 2000), die Infusion oder Implantation von (eingekapselten) Inselzellen zur Therapie von Diabetes mellitus (Tibell *et al.*, 1994; Groth *et al.*, 1994; Groth *et al.*, 1998), extrakorporale Leberperfusion (Breimer *et al.*, 1996) und die Perfusion durch oder Implantation von ganzen Leberpräparationen als Behandlung von Leberversagen (Chari *et al.*, 1994; Cramer, 1995). Neuere Untersuchungen schließen die Verwendung von porcinen neuronalen Zellen zur Regeneration von zerstörten Nerven mit ein (Imaizumi *et al.*, 2000).

Wie bei allen Transplantationen (mit Ausnahme von autologen Transplantationen) besteht auch bei der Xenotransplantation die Problematik der Abstoßung. Dabei unterscheidet man drei Stufen. Die erste und innerhalb von Minuten bis Stunden einsetzende hyperakute Abstoßung von vaskularisierten Organen (hyperacute rejection, HAR) (Bach *et al.*, 1995) wird bedingt durch präformierte Antikörper (xenoreactive natural antibodies, XNA) im Menschen gegen spezifische Zuckerreste (Gal α (1-3)Gal Epitope; α Gal) auf den Endothelzellen des Schweins. Die Antikörperbindung zieht eine Aktivierung der Komplementkaskade nach sich, die zu einer Zerstörung des Endothels und damit zu einem Absterben des porcinen Organs führt (Dorling *et al.*, 1997). Der HAR folgt eine verzögerte Abstoßung des Xenotransplantates, die als verzögerte Xenograft-Abstoßung (delayed xenograft rejection, DXR) bezeichnet wird, erst nach Tagen einsetzt und durch die

Einbeziehung von Entzündungsmediatoren, Makrophagen und natürlichen Killerzellen charakterisiert ist. An diese schließt sich eine durch T-Zellen vermittelte chronische Abstoßung an (Bach *et al.*, 1995).

Tab. 1.3: Auswahl endogener Retroviren unterschiedlicher Spezies
(verändert nach Boeke und Stoye, 1997)

<i>Name</i>	<i>Kopien im haploiden Genom</i>	<i>Genomgröße (kb)</i>	<i>Organisation</i>	<i>Referenz</i>
Maus				
MLV				
Ecotrop	0-10	8,8	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	Herr, 1984
Xenotrop	5-30	8,8	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	O'Neill <i>et al.</i> , 1985
Polytrop	10-30	9,2	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	Stoye & Coffin, 1987
MMTV	0-10	10,0	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR (sag) (sag)	Moore <i>et al.</i> , 1987
Huhn				
ALV	0-10	8,2	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	Hughes, 1982
Katzen				
FeLV	8-12		LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	Stewart <i>et al.</i> , 1986
RD114	20		LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	R. Moehring (unpub)
Schwein				
PERV	30–50	8,9	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	Patience <i>et al.</i> , 1997 Czauderna <i>et al.</i> , 2000
Koala				
KoERV	-	8,4	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	Hanger <i>et al.</i> , 2000
Pavian				
BaEV	5-15	8,9	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	Kato <i>et al.</i> , 1987
Mensch Klasse I				
HERV-E	35-50	8,8	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	Repaske <i>et al.</i> , 1985
HERV-R	10	9,9	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	O'Connell <i>et al.</i> , 1984
HERV-H	900	5,8	LTR- <i>gag-Δpol</i> -LTR	Mager & Freeman, 1987
	100	8,7	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	Hirose <i>et al.</i> , 1993
Mensch Klasse II				
HERV-K	50	9,2	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR <i>rev?</i>	Ono <i>et al.</i> , 1986 Löwer <i>et al.</i> , 1993
HERV-L	200	6,5	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	Cordonnier <i>et al.</i> , 1995

Im Mittelpunkt der Forschung steht derzeit die hyperakute Abstoßung. In Experimenten konnte gezeigt werden, daß die Reduktion des XNA-Titers im Transplantatempfänger durch Immunadsorption an α Gal-haltiges Säulenmaterial (Good *et al.*, 1992) oder durch die Injektion dieser Kohlehydrate, die die Bindestellen der Antikörper absättigen (Ye *et al.*, 1994), möglich ist. In beiden Fällen war der Effekt allerdings nur temporär (Dorling *et al.*, 1997). Ein anderer Ansatz verfolgt die Inhibierung der Komplementkaskade z.B. durch die Gabe von löslichem Komplementrezeptor Typ 1 (soluble complement receptor type 1, sCP1) (Ryan, 1995), für den eine Verlängerung des Überlebens des Xenografts nachgewiesen wurde (Pruitt *et al.*, 1991; Xia *et al.*, 1992; Xia *et al.*, 1993; Pruitt *et al.*, 1994). Eine weiter reichende Hemmung der Komplementkaskade wird durch die Produktion von transgenen Schweinen, die humane komplementregulatorische Proteine auf

der Zelloberfläche tragen, erreicht (Ryan, 1995). Proteine, die zu der Gruppe der „Regulatoren der Komplementaktivität“ (regulator of complement activity, RCAs) gehören, sind CD55 (decay-accelerating factor, DAF), CD46 (membrane cofactor protein, MCP) sowie CD59 (inhibitor of membrane attacking complex, MAC-inhibitor). In Tiermodellen konnte nachgewiesen werden, daß die HAR bei der Verwendung von solchen transgenen Schweinegeweben und -organen überwunden werden konnte (Cozzi & White, 1995; McCurry, 1995; Cowan *et al.*, 2000). Daneben werden Versuche unternommen, Schweine herzustellen, die transgen für das humane Enzym $\alpha(1,2)$ Fucosyltransferase sind, und somit in einer Konkurrenzreaktion mit dem porcinen Enzym $\alpha(1,3)$ Galactosyltransferase, das für die Bildung der α Gal Epitope verantwortlich ist, humane Zuckerreste auf den Zelloberflächen ausprägen würden (Sharma *et al.*, 1996). Hinzu kommt, daß neue Erfolge beim Klonen von Schweinen (Polejaeva *et al.*, 2000; Onishi *et al.*, 2000) die Möglichkeiten, transgene Tiere mit definierter Qualität herzustellen, verbessert haben.

Für den reziproken Ansatz, der die Induktion von Toleranz gegen das Xenotransplantat verfolgt, konnte im Mausmodell durch das Einbringen der porcinen Galactosyltransferase via retroviralem Gentransfer in Knochenmarkszellen (Bracy *et al.*, 1998) bzw. durch Knochenmarkstransplantation von Wildtypmäusen in „Transferase-knock-out“ Mäuse (Yang *et al.*, 1998) B-Zell Toleranz nachgewiesen werden.

Ein Argument, das gegen die Verwendung von transgenen Schweinen für die Xenotransplantation spricht, ist, daß die Expression von humanen Komplementregulatoren auf den Zelloberflächen der Spendertiere auch freigesetzte Viren „tarnen“ und somit dem Komplementsystem entziehen würde (Takeuchi *et al.*, 1996; Takeuchi *et al.*, 1997; Weiss, 1998). Daneben konnte gezeigt werden, daß humane RCAs Rezeptoren für verschiedene Viren darstellen (Naniche *et al.*, 1993; Doerig *et al.*, 1993; Ward *et al.*, 1994; Bergelson *et al.*, 1994; Santoro *et al.*, 1999), was eine neuartige Infektionsgefahr für porcine Organe bedeutet.

Es sind zudem Bedenken formuliert worden, daß mit Xenotransplantaten neue Mikroorganismen in die Empfänger übertragen werden können, was zu Xenozoonosen führen kann (Michaels & Simmons, 1994; Stoye & Coffin, 1995; Allan, 1996; Fishman, 1997; Takeuchi, 2000).

Schließlich ist festzustellen, daß auch unter Verwendung von Immunsuppressiva wie Cyclosporin A, FK506 und Rapamycin in Verbindung mit transgenen Geweben oder Organen, die die HAR als überwindbar erscheinen lassen, die Problematik der verzögerten

Abstoßung und der chronischen Abstoßung noch nicht gelöst ist. Desweiteren ist nicht bekannt, ob ein Schweineorgan über einen längeren Zeitraum im menschlichen Körper seine Funktion ausüben kann (Dorling *et al.*, 1997). Somit bieten sich derzeit Xenotransplantate, besonders im Fall von ganzen vaskularisierten Organen, nur zur Überbrückung (sogenanntes bridging) an, bis ein passendes Allotransplantat zur Verfügung steht.

1.7 PERV und Xenotransplantation

Die Möglichkeit, Schweine unter spezifisch oder qualifiziert pathogen-freien (SPF, QPF) Bedingungen zu züchten und zu halten, ermöglicht es prinzipiell, Tiere zu erzeugen, die weder exogene Viren, noch Bakterien, Pilze oder Parasiten, die für den Rezipienten gefährlich sein könnten, tragen. Einige Mikroorganismen, die vom Schwein auf den Menschen übertragen werden können, sind in Tabelle 1.4 aufgelistet (Fiane *et al.*, 2000). Problematisch bleiben jedoch endogene Retroviren und weitere, unbekannte oder weniger gut charakterisierte Viren, wie Herpesviren (Stoye, 1997; Stoye, 1998; Ehlers *et al.*, 1999, Onions *et al.*, 2000).

In vitro Untersuchungen zeigten erstmals 1997, daß PERV humane Zellen infizieren kann (Patience *et al.*, 1997). Zellfreier Kulturüberstand der porcinen Zelllinien PK15 und MPK, die spontan endogene C-Typ Retroviren freisetzen (Armstrong *et al.*, 1971; Todaro *et al.*, 1974; Moennig *et al.*, 1974), wurde verwendet, um suszeptible Zelllinien zu charakterisieren. Es zeigte sich, daß PERV aus PK15-Zellen sowohl Zelllinien des Schweins, des Nerz und des Menschen infizieren kann. Überstand der Zelllinie MPK infizierte nur porcine Zelllinien (Patience *et al.*, 1997). MPK Zellen produzieren folglich, im Gegensatz zu PK15, nur ecotrope Viruspartikel. Studien zum Wirtszellspektrum von PERV, die unter Verwendung von pseudotypisierten MLV-Partikeln mit den PERV Env Klassen A, B und C durchgeführt wurden, haben das Spektrum der suszeptiblen Zelllinien erweitert (Takeuchi *et al.*, 1998). In dieser Untersuchung wurde auch gezeigt, daß PERV-C, freigesetzt von MPK Zellen, ebenfalls humane Zellen infizieren kann. PERV-C muß daher als polytrop eingestuft werden.

In der letzten Zeit konnte für primäre porcine Zellen gezeigt werden, daß sie mit und ohne mitogene Stimulierung PERV Partikel freisetzen, die für humane Zellen infektiös sind (Wilson *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 2000; Van der Laan *et al.*, 2000). Desweiteren zeigte sich, daß primäre humane Endothelzellen produktiv infiziert werden

können (Martin *et al.*, 2000) und daß zusätzlich, was zum Teil im Widerspruch zu den o.g. Pseudotyp-Experimenten steht, auch Zelllinien von nicht-humanen Primaten durch PERV infiziert werden können (Blusch *et al.*, 2000). Hinzu kommt, daß beschrieben worden ist, daß PERV nach Passagierung in humanen Zellen replikationsdefekte MLV Vektoren komplementieren konnte und diese Vektoren im Anschluß resistent gegen humanes Komplement waren (Griffiths, 2000).

Tab. 1.4: Auswahlliste von Erregern des Schweins, die auf den Menschen übertragen werden können. (nach Fiane *et al.*, 2000)

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

Retrospektive Untersuchungen von Patienten, die zu therapeutischen Zwecken mit lebendem porcinem Gewebe in Kontakt gekommen waren, ergaben bislang keinen Hinweis auf eine Übertragung von und Infektion mit PERV, auch wenn in einigen Fällen Mikro-Chimärismus gefunden wurde (Patience *et al.*, 1998; Heneine *et al.*, 1998; Pitkin *et al.*, 1999; Paradis *et al.*, 1999; Dinsmore *et al.*, 2000).

Kürzlich konnte jedoch für NOD/SCID (non-obese diabetic, severe combined immunodeficiency) Mäuse, die kein Immunsystem besitzen, gezeigt werden, daß nach der Verpflanzung von porcinen Inselzellen von diesen PERV freigesetzt und in der Folge mehrere Organe mit PERV infiziert wurden (Van der Laan *et al.*, 2000).

Auch wenn NOD/SCID Mäuse nicht die Situation in immunsupprimierten Menschen widerspiegeln und der Nachweis einer PERV Infektion für Kritiker nicht eindeutig erbracht wurde, haben diese Experimente doch zu einer neuen Diskussion über die Risiken der Xenotransplantation beigetragen (Dorey, 2000).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit umfaßt zwei thematische Schwerpunkte. Im Rahmen eines Projektes sollten provirale PERV Sequenzen aus dem Genom einer porcinen Zelllinie, die spontan PERV Partikel freisetzt, isoliert und charakterisiert werden. Die so erhaltenen PERV Klone sollten auf ihre Infektiösität auf Säugerzelllinien untersucht werden. Desweiteren sollten Sequenzvergleiche zwischen diesen und zuvor aus humanen, mit PERV infizierten Zellen isolierten Proviren durchgeführt werden, um Veränderungen in den Sequenzen porcinen und humanen Ursprungs zu identifizieren. Die Charakterisierung von funktionalen PERV aus dem porcinen Genom inklusive der genomischen flankierenden Sequenzen kann zukünftig zum Screenen von Spendertieren für die Xenotransplantation eingesetzt werden um die Infektionsrisiken durch PERV genetisch zu evaluieren.

Die Intention des zweiten Projektes war die Produktion von Antisera gegen PERV und die Etablierung von immunologischen Testsystemen zum Nachweis von PERV. In einem Ansatz wurden rekombinante PERV Proteine in Insektenzellen exprimiert. Diese Zellen wurden als positive Testsysteme für PERV-spezifische Peptidantiseren verwendet und können desweiteren zur Isolation von rekombinanten PERV Proteinen herangezogen werden. Parallel dazu sollten in einem zweiten Ansatz auf Basis bekannter PERV Sequenzen Peptide definiert werden, die zur Herstellung von Peptidantiseren verwendet werden sollten. Die so erzeugten PERV-spezifischen Antiseren sollten verwendet werden um Assays zu etablieren, die zur Überprüfung sowohl von Spendertieren als auch von Empfängern von Xenotransplantaten, hinsichtlich potentieller Expression von PERV, einsetzbar sind.

2. Material und Methoden

2.1 Organismen

2.1.1 Bakterienstämme

DH5 α : *Escherichia coli* Stamm mit dem Genotyp: F⁻ Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 *deoR recA1 endA1hsdR17*(r_K⁻, m_K⁺) *phoA supE44* λ *thi-1 gyrA96 relA1* (Life Technologies)

DH10B: *Escherichia coli* Stamm mit dem Genotyp: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 *deoR recA1 endA1 araD139* Δ (*ara, leu*)7697 *galU galK* λ *rpsL nupG* (Life Technologies)

TOP10: *Escherichia coli* Stamm mit dem Genotyp: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 *deoR recA1 araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rspL* (Str^R) *endA1 nupG* (Invitrogen)

TOP10F': *Escherichia coli* Stamm mit dem Genotyp: F' {lacI^q, Tn10(Tet^R)} *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 *deoR recA1 araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rspL*(Str^R) *endA1 nupG* (Invitrogen; One Shot[®])

XL1-Blue MRA (P2): *Escherichia coli* Stamm mit dem Genotyp: Δ (*mcrA*)183 Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac* (P2 lysogen) (Stratagene)

2.1.2 Insektenzelllinien

SF9: ECACC Nr. 89070101, Zellen des Ovariums der Puppe des Nachtfalters *Spodoptera frugiperda*

SHi5: An Wachstum in serumfreiem Medium adaptierte Zellen, abgeleitet vom Zellhomogenisat der Eier des Nachtfalters *Trichoplusia ni* (High Five; Invitrogen)

2.1.3 Säugerzelllinien

- PK15: ATCC Nr. CCL-33, normale epitheliale Nierenzelllinie eines adulten Schweines (*Sus scrofa*)
- 293: ECACC Nr. 85120602, Adenovirus-5 transformierte epitheliale Nierenzelllinie eines menschlichen Embryos (*Homo sapiens*)
- 293 PERV-PK: Adenovirus-5 transformierte epitheliale Nierenzelllinie eines menschlichen Embryos (*Homo sapiens*) nach Co-Kultivierung mit PK15 Zellen produktiv mit PERV infiziert (Patience *et al.*, 1997)
- D17: ECACC Nr. 98090403, Osteosarcoma-Zelllinie eines adulten Hundes (*Canis familiaris*)
- HeLa: ECACC Nr. 85060701, menschliche epitheliale Carcinoma-Zelllinie aus dem Gebärmutterhals (*Homo sapiens*)
- PG-4: ECACC Nr. 94102703, Moloney Sarcoma Virus (M-MST) transformierte astrocytische Zelllinie der Katze (*Felis catus*)

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kultivierung von Insektenzellen

Die adhärent wachsende Zelllinie SF9 wurde in TNM-FH Insektenmedium (Sigma), supplementiert mit 10% inaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS; Seromed) und NSP (siehe 2.2.2), kultiviert und durch Abklopfen zweimal wöchentlich 1:3 gesplittet. Die an Wachstum in serumfreiem Medium angepaßte Zelllinie SHi5 (freundlicherweise von Dr. Osterrieder zur Verfügung gestellt) wurde in SF-900 serum free (GIBCO BRL) Medium, supplementiert mit Gentamycin (50 µg/ml; Sigma), kultiviert und wöchentlich dreimal 1:2 gesplittet. Die Kultivierung erfolgte in einem Zellinkubator bei 27°C.

SF9 Zellen wurden für die Transfektion und die Virusanreicherung sowie die Expression von rekombinanten Proteinen verwendet. SHi5 Zellen wurden in Proteinexpressionsversuchen eingesetzt, wobei die Verwendung von serumfreiem Medium die Anwesenheit von störenden Serumproteinen im Zellkulturmedium verhinderte.

2.2.2 Kultivierung von Säugerzellen

Die Zelllinie HeLa wurde in CMRL (Connaught Medical Research Laboratories 1069) Medium, supplementiert mit Bicarbonat (3,7 g/l), 1,25% L-Glutamin, 0,4% NSP (je 10.000 Units/ml Medium Neomycin, Streptomycin und Penicillin; zu einem späteren Zeitpunkt der Dissertation nur noch SP) und 10% inaktiviertem FKS, kultiviert. Je nach Bedarf wurden die Zellen ein- bis zweimal wöchentlich trypsinisiert (10 ml 2,5% Trypsin Melnick, 15 ml Versen (159 mM NaCl, 3 mM KCl, 6,5 mM Na₂HPO₄, 1,5 M KH₂PO₄, 0,2 mM Titriplex) und 30 ml PBS ohne Mg/Ca) und im Verhältnis 1:5 bis 1:20 gesplittet. Die Kultivierung von 293 (freundlicherweise von Dr. Patience, London, zur Verfügung gestellt) und PG-4 Zellen erfolgte in DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium), supplementiert mit Glutamin, NSP (SP) und FKS. D17 Zellen wurden in MEM (Minimal essential medium) gehalten, das mit Glutamin, NSP (SP) und FKS supplementiert war. Die Zellen wurden je nach Bedarf und Zelllinie ein- bis zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:2 bis 1:20 gesplittet. Die Kultivierung erfolgte in Zellinkubatoren (Heraeus) bei 37°C und 5% CO₂.

2.2.3 Einfrieren von Säugerzellen

Zellen aus einer mittelgroßen Flasche (80 cm²; Nunc) wurden trypsinisiert (siehe Punkt 2.2.2) und in 30 ml Medium aufgenommen. Nach dem Pelletieren (200 x g, 3 min, 4°C) wurden die Zellen je nach Anzahl in 1,5 bis 3 ml Einfrierlösung (90% FKS, 10% DMSO (Dimethylsulfoxid; Sigma)) aufgenommen, in Cryo Vials (Greiner) überführt und nach Lagerung für 2 Stunden (h) bei -20°C und 2 h bis über Nacht bei -80°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.3 Transfektionen und Infektionen

2.3.1 Transfektion von Insektenzellen zur Herstellung rekombinanter Baculoviren

Zur Expression von heterologen Genen in Insektenzellen wurden die Gene in Baculotransfervektoren (pBac-2cp und pVL1392; Novagen) kloniert, die im Bereich der Klonierungsstelle homologe Sequenzen zum Polyhedringen des Wildtyp-Baculovirus

(*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, AcNPV) enthalten. Durch Co-Transfektion des rekombinanten Transfervektors mit linearisierter Wildtyp-Baculovirus DNA kommt es zur homologen Rekombination zwischen dem Virus und dem Transfervektor. Das heterologe Gen kommt dabei unter die Kontrolle des starken Polyhedrinpromotors, so daß eine effiziente Expression des rekombinanten Proteins gewährleistet ist.

Zur Transfektion wurden 2×10^6 SF9 Zellen in 6 cm² Platten (Nunc) ausgesät und nach einstündigem Absetzen transfiziert. Der Transfektionsmix bestand aus:

- 19 µl TNM-FH Medium ohne FKS und NSP
- 5 µl lineare Baculovirus DNA (Baculo2000, 20 ng/µl; Novagen)
- 1 µg rekombinante Transfervektor DNA
- 20 µl H₂O
- 5 µl Eufectin (Novagen)

Nach Durchmischung mittels eines Vortex wurde der Transfektionsmix 15 Minuten (min) bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend auf 500 µl mit Medium ohne FKS und NSP aufgefüllt. Die Zellen wurden zweimal mit nicht-supplementiertem Medium gewaschen und anschließend mit 1 ml nicht-supplementiertem Medium überschichtet. Nach Zugabe von 300 µl Transfektionsmix wurden die Zellen für 4 h bei 27°C inkubiert und anschließend 1 ml Medium mit der doppelten Konzentration FKS und NSP zugegeben. Nach vier Tagen wurde der Transfektionsüberstand (TSN, transfection supernatant) abgenommen, die Zellen abzentrifugiert (150 x g, 5 min, RT) und der Überstand zur Isolierung rekombinanter Baculoviren im Plaqueassay (siehe 2.4.1) eingesetzt.

2.3.2 Infektion von SHi5 und SF9 Zellen zur Analyse rekombinanter Proteinexpression

1×10^6 SHi5 oder SF9 Zellen wurden in Sechsllochplatten (Renner) ausgesät und nach dem Absetzen und Mediumwechsel mit 150 µl - 300 µl Virusstock (VS) II (siehe 2.4.4) infiziert. Um den optimalen Zeitpunkt der Proteinexpression zu bestimmen, wurden die Zellen nach 1 bis 3 Tagen geerntet, lysiert und im Coomassie G 250 gefärbten SDS-Polyacrylamid Gel bzw. mittels Westernblot (siehe 2.7.2 und 2.7.3) untersucht. Die optimale Expressionsdauer lag je nach Viruskonstrukt zwischen ein und zwei Tagen.

2.3.3 Infektion von SHi5 und SF9 Zellen zur präparativen Proteinexpression

Zur präparativen Expression von rekombinanten Proteinen wurden 1×10^6 bzw. 2×10^6 SHi5 oder SF9 Zellen in mittleren (80 cm^2 ; Nunc) bzw. großen (175 cm^2 ; Nunc) Flaschen ausplattiert und nach dem Absetzen und Mediumwechsel mit 2 bzw. 6 ml VS II (siehe 2.4.4) infiziert. Nach optimaler Inkubationsdauer bei 27°C wurden die Zellen geerntet und die rekombinanten Proteine aufgereinigt (siehe 2.7.5).

2.3.4 Transfektion von Säugerzellen

Die Transfektion von Säugerzellen erfolgte mittels Lipofectamin (Life Technologies), das den Gentransfer in eukaryotische Zellen durch die Ausbildung von stabilen DNA-Liposomen-Komplexen vermittelt.

Etwa 2×10^5 Zellen wurden in Sechsllochplatten (Renner) ausgesät und 24 h kultiviert. 1-5 μg Plasmid DNA sowie 2-25 μl Lipofectamin wurden in jeweils 100 μl serumfreiem Medium (Optimem 1, Life Technologies) verdünnt, gemischt und zur Komplexbildung für 15 bis 45 min bei RT inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit PBS (ohne Mg/Ca) und anschließend mit Optimem 1 wurde 1 ml des DNA-Liposomen-Komplexes, nach Verdünnung mit 800 μl Optimem 1, zugegeben. Nach 2 bis 24 h wurde das Transfektionsreagenz durch serumhaltiges Medium ersetzt. Nach zwei weiteren Tagen wurden die Zellen entweder zur Bestimmung der Transfektionseffizienz für indirekte Immunfluoreszenzanalysen (siehe 2.7.13) fixiert oder zur Erzeugung von Zellklonen expandiert.

2.3.5 Infektion von Säugerzellen

Für Infektionsanalysen wurden etwa 2×10^5 Zellen in Sechsllochplatten (Greiner) ausgesät und 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml zellfreiem, steril filtriertem ($0,45 \mu\text{m}$; Sartorius) virushaltigem Zellkulturüberstand infiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen entweder zur Bestimmung der Infektionseffizienz für indirekte Immunfluoreszenzanalysen (IF-Analysen; siehe 2.7.13) fixiert oder expandiert.

2.4 Produktion von rekombinanten Proteinen

2.4.1 Plaquesassay

Zur Isolierung rekombinanter Baculoviren wurde neben der Begutachtung der morphologischen Veränderung der Zellen eine X-Gal (1-Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid; Merck) Färbung herangezogen. Bei der homologen Rekombination zwischen Baculotransfervektor und dem verwendeten Baculo2000 Wildtypvirus (Novagen) wird das darin befindliche *lacZ* Gen durch das heterologe Protein ersetzt. Daher bilden rekombinante Baculoviren farblose Plaques, die von den durch Wildtypviren blaugefärbten unterschieden werden können.

2×10^6 SF9 Zellen wurden in 6 cm² Platten (Nunc) ausgesät und nach dem Absetzen für 1 h mit verschiedenen Verdünnungen (10^0 , 10^{-1} und 10^{-2}) des TSN (siehe 2.3.1) infiziert. Derweil wurde 2%ige Agarose (SeaKam ME; Biozym) autoklaviert, im Wasserbad auf 45°C abgekühlt und mit dem gleichen Volumen FKS-haltigem Medium versetzt. Nach Absaugen des TSN wurden die Zellen mit 3 ml dieses 1%igen Agarose-Mediums überschichtet. Nach Bedecken der erstarrten Agarose mit 1 ml Medium wurden die Zellen für drei bis vier Tage bei 27°C inkubiert.

Zur Herstellung der Färbelösung wurden 500 μ l einer X-Gal Lösung (40 mg/ml) in DMSO steril filtriert und zu 100 ml einer 1%igen Agarose-Medium Mischung gegeben. Die infizierten Zellen wurden nach Absaugen des Mediums mit 1 ml der Färbelösung überschichtet und weitere 24 h bei 27°C inkubiert.

Wildtypviren ließen sich lichtmikroskopisch durch die Freisetzung des blauen 5-Bromo-4-chlor-indigo aus dem farblosen Substrat X-Gal identifizieren.

2.4.2 Amplifikation rekombinanter Baculoviren

Plaques rekombinanter Baculoviren wurden mit einer sterilen Pasteurpipette ausgestochen, in 200 μ l Medium überführt und 1 h eluiert oder direkt zur Infektion von SF9 Zellen verwendet.

$1,2 \times 10^6$ SF9 Zellen wurden in Sechsllochplatten (Renner) ausplattiert. Nach dem Absetzen wurde 1,8 bzw. 2 ml frisches Medium in die Wells gegeben und die eluierten Viren (in 200 μ l Medium) bzw. die gepickten Plaques direkt hinzugegeben. Zur Amplifikation wurden die Zellen sieben Tage bei 27°C inkubiert. Der Überstand mit den rekombinanten Viren

(VS I) wurde bei 4°C gelagert.

2.4.3 Überprüfung rekombinanter Viren durch Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Isolation rekombinanter Viren wurden 750 µl VS I (siehe 2.4.2) mit dem gleichen Volumen Polyethylenglycol (25% PEG 6000 (Merck-Schuchardt)/2,5 M NaCl) versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (16.000 x g, 10 min, RT) wurden die pelletierten Viren in 100 µl Proteinase K-Puffer (10 mM Tris [pH 7,8], 0,5% SDS) und 5 µl Proteinase K (20 mg/ml; Boehringer Mannheim) resuspendiert und 1 h bei 50°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend durch zweimalige Phenol/Chloroform (1:1) Behandlung extrahiert und mittels Äthanol präzipitiert (2,5faches Volumen 100%iges Äthanol, 5 µl Glycogen (2 mg/ml), -80°C, 1 h). Nach Zentrifugation (16.000 x g, 30 min, 4°C) und Waschen mit 70%igem Äthanol wurde die DNA getrocknet, in 20 µl Aqua bidest resuspendiert und in einer PCR (siehe 2.8.14) mit Primern spezifischen für den Transfervektor analysiert.

2.4.4 Herstellung hochtitriger Virusstocks

Zur Erhöhung des Virustiters von PCR-positiven, rekombinanten VS I (siehe 2.4.2) wurden $2-3 \times 10^7$ SF9 Zellen in großen Zellkulturflaschen (175 cm²; Nunc) ausgesät und nach dem Absetzen und Zugabe von 30 ml frischem Medium mit 50 µl VS I infiziert. Nach Inkubation für sieben Tage bei 27°C wurde der Zellüberstand (VS II) geerntet und bei 4°C gelagert. Zur Langzeitlagerung wurden Aliquots von je 1 ml bei -80°C gelagert.

2.4.5 Titration der Virusstocks

Zur Bestimmung des Titers der VS II (siehe 2.4.4) wurden 2×10^6 SF9 Zellen in 6 cm² Platten (Nunc) ausgesät. Zur Infektion wurden die Zellen nach dem Absetzen mit 1,5 ml frischem Medium versehen und für 1h mit 500 µl VS II, von dem vier Verdünnungsstufen (10^{-4} - 10^{-7}) angesetzt wurden, inkubiert. Jede Verdünnungsstufe wurde in Triplikaten angesetzt. Im Anschluß wurde das Infektionsgemisch abgesaugt, die Zellen mit 0,5%igem Agarose/Medium überschichtet und für 4-5 Tage bei 27°C inkubiert. Zur Sichtbarmachung der Plaques wurde Neutralrot verwendet, das lebende Zellen deutlich rot färbt und tote

oder sterbende, virusinfizierte Zellen als helle Bereiche erscheinen läßt. Medium, das 0,5% Agarose enthielt, wurde mit 5 ml (auf 100 ml Agarose/Medium) einer Neutralrot-Stammlösung versetzt (1 mg/ml (Sigma), steril filtriert in Medium) und die Platten mit 3 ml dieses Neutralrot-Agarose-Mediums überschichtet (Endkonzentration 150 µg Neutralrot pro Platte). Nach Inkubation über Nacht wurden die Plaques gezählt. Zur Berechnung der „plaque-forming units“ pro ml (pfu/ml) wurde die Zahl der Plaques mit dem Verdünnungsfaktor und dem Faktor 8 multipliziert (Formel 1). Zur Bestimmung der Virusmenge, die benötigt wird, um 50% der Zellen in einer Kultur zu infizieren („tissue culture infectious dosis; 50%“; TCID₅₀) wurde die Methode von Reed und Muench (1938) angewendet. Dazu wurden die pfu durch den Faktor 0,69 dividiert (Formel 2).

Formel 1: $Zahl\ der\ Plaques * Verdünnungsfaktor * 8$

Formel 2: $TCID_{50} = pfu/0,69$

2.5 Aktivitätsbestimmung der reversen Transkriptase (RT-Test)

Die Bestimmung der Aktivität der reversen Transkriptase (RT) erfolgte mittels des C-type-RTTM Activity Assay (Cavidi Tech), Protokoll B.

Dem Assay liegt zu Grunde, daß die im Überstand von mit Retroviren infizierten oder transfizierten Zellen befindliche, an Viruspartikel gebundene RT an einem immobilisierten Template/Primer Konstrukt einen DNA Strang synthetisiert, in den im Reaktionsmix enthaltenes Bromo-deoxyuridintriphosphat (BrdUTP) eingebaut wird. In einem Detektionsschritt wird das eingebaute BrdUTP von spezifischen, mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Antikörpern gebunden. Der Nachweis erfolgt kolorimetrisch und ist proportional zu der RT-Aktivität in der Probe.

Die Kontrolle schwach RT-positiver Überstände erfolgte mittels des Cavidi HS-Kit Mn²⁺ RT Assay, Protokoll B.

Zur Bestimmung der RT-Aktivität in Zellkulturüberständen wurden diese nach Abzentrifugieren der Zellen (300 x g, 3 min, 4°C) steril filtriert (0,45 µm; Satorius) und in Aliquots zu 200 µl bei -80°C bis zur Messung gelagert.

2.6 Kulturbedingungen der Bakterienstämme

2.6.1 Kulturmedien

Die Herstellung von Kulturmedien erfolgte, falls nicht anders erwähnt, nach Sambrook *et al.*, 1989. Festmedien wurden mit 1,5% Agarose (w/v) versetzt.

2.6.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in TB-Medium (Terrific Broth; 12 g/l Trypton, 24 g/l Hefeextrakt, 4 ml Glycerin, 17 mM KH_2PO_4 , 72 mM K_2HPO_4 ; autoklaviert) oder LB-Medium (Luria-Bertani; 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,0; autoklaviert) bei 37°C. Flüssigkulturen wurden bei 37°C und 250 rpm geschüttelt. Zur Selektion von transformierten Bakterien wurde das Antibiotikum Ampicillin (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; Boehringer Mannheim) dem Medium zugegeben.

2.7 Proteinchemische Methoden

2.7.1 Proteingelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinlösungen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970). Verwendet wurden diskontinuierliche Gele, die sich aus einem niederprozentigen Sammelgel, zur Konzentration der Proteine, und einem höherprozentigen Trenngel zusammensetzen. Die 5%igen Sammelgele enthielten neben entsprechend verdünnter Lösung A (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid) 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 Lösung A 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 (Ammoniumpersulfat; Gibco) und 0,05% TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin; Serva) eingeleitet.

Die Proben wurden vor dem Auftragen 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 1x 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 (Gelkammer: Mighty small II SE 250; Hoefer Scientific Instruments).

2.7.2 Färbung von Proteingelen

Zum Anfärben der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurde Coomassie Brilliant Blue benutzt. Dazu wurden die Gele je 1 h in den Lösungen I (25% Isopropanol, 10% Essigsäure, 30 mg/l Coomassie G 250), Lösung II (10% Isopropanol, 10% Essigsäure, 30 mg/l Coomassie G 250) bzw. Lösung III (10% Essigsäure, 30 mg/l Coomassie G 250) gefärbt. Überschüssiges Färbemittel wurde anschließend mit Wasser ausgewaschen.

2.7.3 Western Blotting

Die Übertragung von Proteinen, die in einer SDS-PAGE (siehe 2.7.1) aufgetrennt wurden, auf eine Membran (Towbin *et al.*, 1979) wird in Anlehnung an den Nukleinsäuretransfer nach Southern (Southern, 1975) Western Blotting genannt.

Die Gele wurden auf Filterpapier (Whatmann-3MM) überführt und mit in Methanol präinkubierter PVDF-Membran (Immobilon-P; Millipore) und einer weiteren Lage Filterpapier in eine Kunststoffkassette eingespannt. Der Blot-Prozeß erfolgte in Blotting Puffer (25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 20% Methanol, pH 8,3) bei 300 mA über 3 h oder 70 mA über Nacht unter Kühlung in einer Blotting-Apparatur (KMO2 electronic; Janke & Kunkel).

Nach dem Blotten wurden die Membranen 30 min in 1% Tween 20 (in PBS ohne Mg/Ca) und anschließend für 1 h in Blocking Puffer (10% FKS, 1% BSA, 0,1% Triton X-100 in PBS ohne Mg/Ca) inkubiert um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurden die Blots mit dem Primärantikörper (1:1000 bis 1:5000 in Blocking-Puffer oder 0,1% Triton X-100 in PBS ohne Mg/Ca) für 1 h bei RT oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach drei 5-minütigen Waschschritten mit 0,1% Triton X-100 (in PBS ohne Mg/Ca) erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Je nach Primärantikörper wurde als Sekundärantikörper Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekoppeltes G-Protein (Bio Rad) oder ein spezifisch gegen die „Produktions-Spezies“ des Primärantikörpers mit HRP-gekoppelter Antikörper verwendet. Einsatz fanden folgende Sekundärantikörper: Anti-Maus (Amersham-Life Science), Anti-Kaninchen, Anti-Ziege, Anti-Huhn (alle Dianova), und Anti-KLH (keyhole limpets hemocyanin; Sigma). Im Falle

des Nachweises von S-Tag (siehe 2.7.5) entfiel der Sekundärantikörper, da der Primärantikörper bereits mit HRP gekoppelt war. Der His-Tag (siehe 2.7.5) wurde mit aus der Maus stammenden Penta-His Antikörpern (Qiagen) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Anti-Maus-HRP Antikörpern (s.o.). Nach drei weiteren 5-minütigen Waschschritten erfolgte der Nachweis der Proteine mit dem ECL-System (siehe 2.7.4).

2.7.4 Enhanced chemiluminescence (ECL)-Verfahren

Die ECL-Reaktion wurde mit dem ECL Detection Reagent Kit (Amersham) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die an den Sekundärantikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase setzt bei der Spaltung ihres Substrates (ECL Solution 1 und 2 im Verhältnis 1:1) Energie in Form von Chemilumineszenz frei. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgt auf speziellen Filmen (Hyperfilm ECL, Amersham). Je nach Stärke des Signals wurden die Filme zwischen 10 Sekunden und einer Minute exponiert.

2.7.5 Aufreinigung rekombinanter Proteine

Rekombinante Proteine wurden aus dem Zellysat von mit rekombinanten Baculoviren infizierten Insektenzellen mittels Affinitätsaufreinigung als S-Tag- oder als His-Tag-Fusionsproteine isoliert. Der S- und der His-Tag wurde durch den Transfervektor (pBac-2cp) eingebracht (siehe Abb. 3.4). Bei der Affinitätsaufreinigung mit dem S-Tag macht man sich zu Nutze, daß er spezifisch an S-Protein Agarose bindet. Im Fall des His-Tags erfolgt die Bindung an Ni²⁺-Agarose. Nach Abwaschen ungebundener Proteine kann das Fusionsprotein entweder durch enzymatische Abspaltung der Tags oder durch Veränderung der Pufferbedingungen, was die Bindung zwischen den Tags und S-Protein bzw. der Ni²⁺-Agarose aufhebt, eluiert werden. Die Aufreinigung erfolgte entweder mit dem S-TagTM rEK Purification Kit (Novagen) oder mit dem B-PERTM 6XHis Spin Purification Kit (Pierce) nach den Anweisungen des Herstellers. Im Fall der S-Tag Aufreinigung erfolgte die Elution mit 3 M Magnesiumchlorid.

Nach Umpufferung der rekombinanten Proteine in PBS (ohne Mg/Ca) nach deren Affinitätsaufreinigung mittels PD-10 Column (Pharmacia) wurden die Proteine in Vivaspin 2 Einheiten (Vivascience) eingengt und anschließend die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 2.7.7).

2.7.6 Trichloressigsäurefällung (TCA-Fällung)

Unter anderem wurde die Umpufferung von rekombinanten Proteinen durch TCA-Fällung durchgeführt. Dazu wurden die Proben mit 100%iger TCA (Endkonzentration 10% des Gesamtvolumens) versetzt, für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 4°C und 13.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen, getrocknet und in einem geeigneten Puffer aufgenommen.

2.7.7 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Der Proteingehalt einer Lösung wurde mit dem Bio-Rad-Proteinassay (BIO-RAD Laboratories) bestimmt. Der Nachweis basiert auf einer von Bradford (1976) entwickelten Methode. 10 µl einer Probe wurden mit 490 µl Bradford-Reagenz gemischt. Nach Inkubation (20 min, RT) wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt. Über eine mitgeführte Eichreihe wurde der Proteingehalt bestimmt.

2.7.8 Enzymgekoppelter Immuntest (ELISA)

ELISAs wurden zur Abschätzung der Sensitivität von Peptidantiseren verwendet. Die Beschichtung der ELISA-Platten (Falcon, Becton Dickinson) erfolgte mit seriellen Verdünnungen (zwischen 5 ng und 1 pg) aufgereinigter Viruspartikel (siehe 2.7.17) für 1 h bei RT. Anschließend wurden die Platten zur Unterdrückung von unspezifischen Bindungen für 20 min mit 1%igem BSA (in PBS ohne Mg/Ca) geblockt, woraufhin dreimal mit 0.05%igem Tween 20 (in PBS ohne Mg/Ca) gewaschen wurde. Sowohl an die Inkubation des Antiserums (1 h, RT) als auch die darauf folgende einstündige Inkubation (RT) des mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörpers (α -Kaninchen IgG) schlossen sich drei weitere Waschschriffe mit 0.05%igem Tween 20 (in PBS ohne Mg/Ca) an. Für die Farbreaktion wurden 5 mg OPD (O-Phenylendiamindihydrochlorid; Sigma) in 5 ml PBS (ohne Mg/Ca, pH 6,0) aufgelöst und 4 µl H₂O₂ zugegeben. In jede Vertiefung der Platte wurden 100 µl Farbregenz gegeben und die Reaktion nach 5 bis 15 min durch Zugabe von 25 µl H₂SO₄ (2,5 M) gestoppt. Die Auswertung der Platten erfolgte in einem Easy Reader (EAR 400 AT; SLT Labinstruments) bei 492/620 nm.

2.7.9 Immunperoxidase Assay

Die Funktionalität von Peptidantiseren in immunologischen Routineverfahren wurde im Immunperoxidase Assay (IPAP) überprüft. Dafür wurden entweder Gefrierschnitte von virusproduzierenden Zellen (siehe 2.7.10) oder fixierte, semikonfluente Zellen, die Viren freisetzen, verwendet. Das Prozedere entsprach dem für ELISA beschriebenen mit der Abweichung, daß mit PBS (ohne Mg/Ca) gewaschen wurde. Für die Farbreaktion wurden 4 mg 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (Sigma) in 19 ml 0,02 M Natriumacetat Puffer (pH 5,2) gelöst und 1 ml Dimethylformamid (Sigma) zugegeben. 125 µl dieser Färbelösung wurden auf 5 ml mit Natriumacetat Puffer aufgefüllt und kurz vor der Verwendung mit 5 µl H₂O₂ supplementiert. Die Inkubation der Färbelösung erfolgte bis eine deutliche, spezifische Färbung erkennbar war (ca. 30 min).

2.7.10 Gefrierschnitte von Geweben und Zellen

Für die Herstellung von Gefrierschnitten wurde eine konfluente Flasche 293 PERV-PK Zellen mit 2% Formalin (in PBS ohne Mg/Ca) fixiert, zweimal mit PBS (ohne Mg/Ca) gewaschen und nach dem Abschaben in 3%ige Agarose eingebettet. Die eingebetteten Zellen wurden verwendet um Schnitte von 20 µm Dicke anzufertigen (Mikrotom-Kryostat HM 500 OM, Microm, Heidelberg). Formalinfixiertes Schweinegewebe wurde ohne weitere Vorbehandlung zur Herstellung von Schnitten verwendet. Die Kammertemperatur des Mikrotoms betrug -20°C, die Objektemperatur -16°C.

2.7.11 Herstellung von synthetischen Peptiden

Synthetische Peptide zur Immunisierung von Kaninchen und Hühnern wurden kommerziell durch die Firmen Eurogentec (Belgien) und Sigma ARK (Darmstadt) hergestellt. Im Fall von Eurogentec wurden die Peptide nach der Synthese mittels HPLC aufgereinigt und zur Immunisierung an KLH (keyhole limpets hemocyanin) als Trägermolekül gekoppelt.

2.7.12 Immunisierung von Kaninchen, Ziegen und Hühnern mit synthetischen Peptiden

Zur Produktion von polyklonalen Antiseren gegen synthetische Peptide wurden Kaninchen, Ziegen und Hühner verwendet.

Die Herstellung von Antiseren gegen das C-terminale Ende des Nukleokapsids (NC, p10) und das Kapsidprotein (CA, p30) sowie das Oberflächenmolekül gp70 (SU, surface) und den transmembranen Anteil des Oberflächenmoleküls p15E (TM) von PERV in Kaninchen und Ziegen erfolgte durch die Firma Eurogentec (Belgien). Alle Immunisierungen wurden mit 200 µg an KLH gekoppeltem Peptid durchgeführt. In der initialen Immunisierung wurde komplettes Freund'sches Adjuvans, in den Folgeimmunisierungen (Boost) inkomplettes Freund'sches Adjuvans eingesetzt. Erster und zweiter Boost erfolgten im zwei Wochen Abstand nach der ersten Immunisierung. Der finale Boost wurde nach weiteren 28 Tagen gegeben. Zur Überprüfung der Immunantwort der Tiere wurde 10 Tage nach dem zweiten Boost und nach weiteren 28 Tagen Blut abgenommen und in unserem Labor mittels Westernblot gegen PERV Partikelproteine oder rekombinante PERV Proteine getestet. Die finale Blutung erfolgte nach weiteren drei Wochen.

Die Produktion von differentiellen Antiseren gegen die Hüllprotein-Klassen A und B erfolgte in Hühnern (Sigma ARK, Darmstadt). Sowohl für die erste Immunisierung als auch für die Boosts wurde komplettes Freund'sches Adjuvans verwendet. Die Initialimmunisierung erfolgte mit 150 µg Peptid. Für die Boosts, die im 14-tägigen Abstand durchgeführt wurden, wurde bis zur ersten Blutabnahme 300 µg und bis zur finalen Blutung (nach fünf Boosts) 100 µg Peptid eingesetzt. Blutabnahmen erfolgten ab dem zweiten Boost ebenfalls in 14-tägigem Turnus. Die Immunantwort wurde im ELISA gegen das synthetische Peptid durch Sigma ARK überprüft.

Antiseren wurden bei -80°C gelagert oder für immunologische Arbeiten 1:1 mit Glycerin gemischt und bei -20°C aufbewahrt.

2.7.13 Indirekte Immunfluoreszenzanalysen mit Insekten- und Säugerzellen

Konfluente, auf Deckgläschen gewachsene Zellen wurden für 15 bis 45 min mit 2% (w/v) Formaldehyd (in PBS ohne Mg/Ca) fixiert und dreimal mit PBS (ohne Mg/Ca) gewaschen. Nach Permeabilisierung der Zellen mit 0,5% Triton X-100 (in PBS ohne Mg/Ca) für 10 min, dreimaligem Waschen mit PBS (ohne Mg/Ca) und Absättigen unspezifischer

Bindungsstellen mit 1% BSA (in PBS ohne Mg/Ca) wurden die Zellen mit einer 1:500 Verdünnung (in PBS Dulbecco) des Antiserums, des Präimmunserums oder kreuzreaktiver Antikörper für 1 h inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBS Dulbecco wurden die Zellen mit 1:1000 in PBS Dulbecco verdünntem Indokarbocyanin-gekoppelten (Cy3; Dianova) Sekundärantikörpern für 1 h inkubiert. Im Anschluß wurden die Zellen nochmals gewaschen und mit Mowiol (20g Mowiol 4.88 (Hoechst) in 80 ml PBS, 40 ml Glycerin) eingedeckt.

Die indirekte IF-Analysen wurden im Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss) oder im Laserscan Mikroskop (Axiovert 10; BioRad Laser MRC 600) betrachtet und fotografisch bzw. digitalisiert aufgenommen.

2.7.14 Indirekte Immunfluoreszenzanalysen mit Gefrierschnitten

IF-Analysen von Gefrierschnitten wurden analog zu denen der Insekten- und Säugerzellen (siehe 2.7.13) behandelt mit dem Unterschied, daß keine Permeabilisierung der Schnitte mit 0,5% Triton X-100 erfolgte.

2.7.15 Immunogoldmarkierung von Gefrierschnitten

Für Immunogoldmarkierungen wurden Zellen präpariert, wie unter 2.7.10 beschrieben. Schnitte mit einer Dicke von 0,1 μm wurden mit einem Ultracut E (FC 4E, Reichert Jung) hergestellt. Die Kammertemperatur betrug -120°C , die Temperatur des Messers- und des Präparates -70°C bzw. -80°C . Als Primärantikörper fanden PERV-spezifische Antiseren Einsatz. Als Sekundärantikörper wurde monoklonales EM Gold Anti-Rabbit IgG (British Biocell International) verwendet, das mit 10 nm großen Goldpartikeln konjugiert ist. Schnitte, Färbungen und transmissionselektronenmikroskopische (TM-EM) Aufnahmen wurden dankenswerterweise von Frau Löschner, Paul-Ehrlich-Institut, durchgeführt.

2.7.16 Histologische Färbung von Gefrierschnitten

Zur strukturellen Kontrolle von geschnittenen Zellen wurde eine klassische Hämalaun/Eosin-Färbung zur Kontrastierung des Zytoplasmas gegen die Zellkerne durchgeführt. Die Färbungen wurden dankenswerterweise von Frau Schildger, Paul-Ehrlich-Institut, durchgeführt.

2.7.17 Aufreinigung von Viruspartikeln

PERV Partikel wurde aus dem Zellkulturüberstand der Zelllinie 293 PERV-PK über ein Sucrosekissen aufgereinigt. Dazu wurde eine 22%ige Sucroslösung (in H₂O) mit virushaltigem Überstand überschichtet und für 1 h bei 4°C mit 100.000 x g zentrifugiert. Nach Resuspendieren des Viruspellets in 100-150 µl PBS (ohne Mg/Ca) wurde die Proteinkonzentration bestimmt und die Partikel bei –80°C gelagert.

Die Aufreinigung von PERV Partikeln wurde dankenswerterweise von Frau Fischer, Paul-Ehrlich-Institut, durchgeführt.

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.8.1.1 Isolierung von genomischer DNA

Zur Herstellung von Kernextrakten wurde eine konfluente, mittelgroße Zellkulturflasche (80 cm², Nunc) dreimal mit kaltem PBS (ohne Mg/Ca) gewaschen und die Zellen in 10 ml kaltem PBS mit einem Zellschaber (Nunc) abgelöst. Nach Zentrifugation (500 x g, 10 min, 4°C) wurden die pelletierten Zellen in 4 ml Lysispuffer (10 mM Tris/HCl [pH 7,6], 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,5% NP40) aufgenommen und durch Durchmischung mittels eines Vortex für 10 Sekunden (sec) lysiert. Nach erneuter Zentrifugation (1.600 x g, 2 min, 4°C) wurden die pelletierten Zellkerne in 500 µl Proteinase K-Puffer und 2,5 µl Proteinase K (20 mg/ml) (siehe 2.4.3) resuspendiert und für 4 h (bis über Nacht) bei 50°C verdaut. Die Isolation von genomischer DNA erfolgte über Phenol/Chloroform-Extraktion mit zusätzlicher Sevag- (Chloroform/Isoamylalkohol; 24:1) Aufreinigung und anschließender Äthanol-fällung.

2.8.1.2 Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien

2.8.1.2.1 Minipräparation durch alkalische Lyse

Die Plasmidaufreinigung aus Minikulturen von Bakterien erfolgte nach einer Methode von Birnboim und Doly (1979). Zellen aus einer 3 ml Übernachtkultur wurden durch

Zentrifugation geerntet (16.000 x g, 30 sec, RT) 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 für 5 min auf Eis inkubiert. Zur Neutralisation wurden 150 µl 3 M Natriumacetat zugegeben und anschließend die Zelltrümmer und chromosomale DNA abzentrifugiert (16.000 x g, 5 min, RT). Die Plasmid DNA wurde aus dem Überstand durch Zugabe von zwei Volumen 100% Äthanol und Inkubation für 2 min auf Eis gefällt und im Anschluß durch Zentrifugation pelletiert (16.000 x g, 5 min, RT). Das Pellet wurde in 60 µl RNase A (0,1 mg/ml; Boehringer Mannheim) haltigem TE Puffer resuspendiert.

2.8.1.2.2 Midi- und Maxipräparation

Die Präparation von DNA im Midi- und Maximaßstab erfolgte mit dem QIAGEN Midi- bzw. Maxi Kit nach den Angaben des Herstellers. Zellen aus 50 bzw. 250 ml Übernachtskulturen wurden durch Zentrifugation pelletiert (6.000 x g, 15 min, 4°C) und unter Verwendung des mitgelieferten Puffers lysiert. Die Aufreinigung der Plasmid DNA erfolgte an Anionenaustauschersäulen. Die Verwendung von Endo-free Puffern gewährleistete die Entfernung bakterieller Endotoxine, die die Transfektion eukaryotischer Zellen inhibieren können.

2.8.1.2.3 Isolation von λ-Phagen DNA

Die Isolation von λ-Phagen DNA erfolgte mit Nucleobond[®] AX 100 Säulen (Macherey-Nagel). Hierzu wurden 50 ml Phageneluat (in SM Puffer; 100 mM NaCl, 10mM MgSO₄•7H₂O, 50 mM Tris/HCl [pH 7,5], 10‰ (w/v) Gelatine; autoklaviert) einer großen Platte (~500 cm², Nunc) mit 50 µl Chloroform versetzt und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (4.500 x g, 10 min, 4°C) pelletiert. Bakterielle DNA im Überstand wurde durch Bindung (10 min, RT) an eine Extraktionsmatrix und anschließende Zentrifugation (4.500 x g, 5 min, RT) entfernt und die Phagenpartikel im Überstand durch 60-minütige Inkubation mit Puffer T2 (25% PEG 6000, 2,5 M NaCl) vernetzt. Nach Zentrifugation (10.000 x g, 10 min, 4°C) zum Pelletieren der Phagen wurden diese in Puffer T3 (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 30 mM EDTA, pH 7,7) resuspendiert und durch Inkubation (10 min, 65°C) mit Puffer T4 (2% SDS) aufgeschlossen. Die Isolation der Phagen DNA

erfolgte über die Anionenaustauschersäulen AX-100.

2.8.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die photometrische Bestimmung der Konzentration und der Reinheit von Nukleinsäuren beruht auf den unterschiedlichen Absorptionsmaxima von Nukleinsäuren (260 nm) und Proteinen (280 nm). Für reine DNA liegt der Quotient OD_{260}/OD_{280} zwischen 1,6 und 1,8. Die Messung erfolgte im RNA/DNA Calculator (Pharmacia).

2.8.3 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA Fragmenten erfolgte elektrophoretisch. Dazu wurde Agarose (Life Technologies) in 1x TAE Puffer (40 mM Tris/Acetat, 1 M EDTA, pH 8,0) aufgekocht und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Roth) versetzt. Bei Fragmenten mit einer Größe unter 500 Basenpaaren wurden 1x TBE (5x TBE Puffer: 54 g Tris Base, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA [pH 8,0] ad 1 l mit H₂O) Gele verwendet. Zum Auftragen wurden die Proben mit 1/5 Volumen Gelbeladepuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 30% Glycerin) gemischt. In Abhängigkeit der Fragmentgröße erfolgte die Auftrennung bei 5 bis 12 V/cm über einen Zeitraum von 2-20 Stunden in 0,7 bis 1,5%igen Agarosegelen.

2.8.4 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des Jetsorb Gel Extraction Kit (Genomed). Nach der chemischen Zersetzung der Agarosegelmatrix wird die DNA an eine Matrix gebunden, von der sie mit Wasser eluiert werden kann. An die Aufreinigung schloß sich eine Konzentrationsbestimmung an (siehe 2.8.2).

2.8.5 Anlegen einer λ-Phagenbank aus der Zelllinie PK15

Für die Herstellung einer λ-Phagen Genbank wurde genomische DNA der Zelllinie PK15 partiell mit der Endonuklease *Sau3A* restringiert. Der Verdau wurde derart eingestellt, daß hauptsächlich Restriktionsfragmente mit einer Größe von 9-23 kb entstanden, was der

Insertkapazität des Lambda FIX/XhoI Partial Fill-in Vector-Systems (Stratagene) entspricht. Um eine Ligation des Vektor-Systems mit den Restriktionsfragmenten zu ermöglichen, wurden diese zunächst partiell mit den Desoxynukleosidtriphosphaten dGTP und dATP aufgefüllt. Für die Ligation wurden 0,3 µg der aufgefüllten Fragmente in Gegenwart von 1 mM rATP mit 1 µg λ-Vektor (Stratagene) sowie 1 Einheit (Unit, U) T4 Ligase (4,5 Weiss Einheiten) und Ligationspuffer zusammengegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Aliquots des Ligationsansatzes wurden mit Verpackungsextrakten (Gigapack II Gold, Stratagene) nach den Angaben des Herstellers zusammengegeben und die Verpackungsreaktion nach 2 h (RT) durch Zugabe von 500 µl SM-Puffer (siehe 2.8.1.2.3) und 20 µl Chloroform gestoppt. Zelltrümmer des Verpackungsextraktes wurden durch kurze Zentrifugation pelletiert und die Überstände bei 4°C gelagert oder direkt titriert.

Für die Titration wurden Bakterien des Stammes *E.coli* XL1-Blue MRA (P2) in 50 ml LB-Medium, das mit 0,2% Maltose und 10 mM MgSO₄ supplementiert war, kultiviert. Übernachtskulturen wurden geerntet, mit 10 mM MgSO₄ auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt und 200 µl der Bakteriensuspension mit 1 µl einer Verdünnung (10⁰, 10⁻¹ und 10⁻²) des Verpackungsüberstandes für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Bakterien mit adhären Phagen wurden mit 3 ml 48°C warmer Agarose gemischt und auf NZY-Agarplatten (5 g NaCl, 2 g MgSO₄•7H₂O, 5 g Hefeextrakt, 10 NZ Amine, ad 1 l deionisiertes H₂O, pH 7,5; autoklaviert) ausplattiert. Der Titer wurde nach Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht durch Auszählen der Plaques ermittelt. Zur Amplifikation der Bibliothek wurden die Verpackungsüberstände gepoolt und analog der Titrationsergebnisse auf NZY-Agarplatten ausplattiert. Die Elution der Phagen von konfluent lysierten Platten erfolgte über Nacht bei 4°C mit SM-Puffer. Das Phageneluat wurde kollektiert und zur Langzeitlagerung bei 4°C mit 1µl/ml Chloroform versetzt.

2.8.6 Durchmusterung der Phagenbibliothek

Die Durchmusterung der Phagenbank erfolgte mittels Plaque lifting. Dazu wurde auf Nylonmembranen (Hybond™-N, Amersham) Abklatsche der Phagen DNA von sechs großen (~500 cm², Nunc), nahezu durchlysierten Platten durchgeführt. Die Membranen wurden sukzessive für je 1 min in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl), Neutralisationslösung I (0,5 M Tris/HCl [pH 7,5], 1,5 M NaCl) und Neutralisationslösung

II (2x SSC, 0,5 M Tris/HCl [pH 7,5]) inkubiert und zur Fixierung der DNA für 2 h bei 80°C gebacken. Die Hybridisierung erfolgte wie unter Punkt 2.8.19.1 beschrieben. Die Platten wurden im Kühlschrank gelagert, bis anhand der Autoradiographien positive Plaques identifiziert werden konnten. Im Anschluß wurden mit der großen Öffnung einer Pasteurpipette entsprechende Bereiche ausgestochen und in SM-Puffer aufgenommen. Die Durchmusterung wurde bis zur Homogenität der Klone wiederholt.

2.8.7 „Fill-in“ Reaktion an überhängenden Restriktionsschnittstellen

Für die Klonierung von nicht kompatiblen Restriktionsschnittstellen mußten diese zu glatten Enden („blunt end“) oder, wie im Falle der λ -Klonierung, partiell aufgefüllt werden. Hierzu wurde die DNA in Gegenwart von 0,2 mM aller oder einzelner dNTPs mit 2 Units der großen Untereinheit der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, NEB) für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender Äthanolpräzipitation wurde die DNA in den Ligationen (siehe 2.8.9) eingesetzt.

2.8.8 Dephosphorylierung von DNA

Zur Unterbindung der Rezirkulierung von linearisierten Vektoren wurden diese dephosphoryliert. Restringierte Vektoren wurden erst für 20 min mit 0,5 U alkalischer Phosphatase des Kalbes (Pharmacia) bei 37°C und anschließend für 20 min mit 1 U bakterieller alkalischer Phosphatase bei 50°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 μ l 0,5 M EDTA gestoppt. Nach Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Äthanol-fällung stand die Vektor DNA für Ligationen zur Verfügung.

2.8.9 Ligation

Die Verknüpfung von Insert und Vektor DNA erfolgte durch T4-DNA-Ligase (Life Technologies). 10-50 ng Vektor DNA wurden mit 4 μ l 5x Ligase-Puffer, 1 μ l Enzym (4,5 Weiss Einheiten) und der äquimolaren Menge Insert DNA in einem Gesamtvolumen von 20 μ l für einige Stunden bei 15°C oder bei 4°C über Nacht inkubiert. 4 μ l des Ligationsansatzes wurden für die Transformation (siehe 2.8.12) in kompetente *E. coli* Stämme (siehe 2.8.11) (DH5 α , DH10B, TOP10, TOP10F') verwendet.

2.8.10 T/A-Klonierung von PCR Amplifikaten

Bei der Klonierung von PCR Produkten (siehe 2.8.14) macht man sich die Eigenschaft der Taq DNA Polymerase zu Nutze, Template-unabhängig einen Desoxyadenosin-Überhang am 3'-Ende des Amplifikates zu erzeugen. In Vektorsysteme, die einen Desoxythymidin-Überhang besitzen, können die PCR Produkte direkt kloniert werden. Ein solches Vektorsystem wurde in Form des Vektors pGEM-T-Easy (Promega) verwendet, in dem die Verknüpfung von Vektor und PCR Amplifikat durch Ligation (siehe 2.8.9) erfolgte. An die Ligation schloß sich eine Transformation (siehe 2.8.12) in kompetente Zellen (siehe 2.8.11) an, die eine Aufnahme entsprechend großer Plasmide erlaubten.

2.8.11 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur effizienten Transformation von Bakterien müssen diese in einen Zustand der Kompetenz gebracht werden. Dazu wurden 100 ml Kulturen der Bakterienstämme DH5 α , DH10B, TOP10 und TOP10F' bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,55 kultiviert. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen pelletiert (3.700 x g, 10 min, 4°C) und in 20 ml Lösung TFB1 (30 mM KAc, 100 mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂•2 H₂O, 50 mM MnCl₂•4 H₂O, 15% Glycerin (v/v), pH 5,8) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Pelletieren wurden die Zellen in 2 ml Lösung TFB2 (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15% Glycerin (v/v), pH 6,5) aufgenommen und für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Im Anschluß wurden 100 μ l Aliquots auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.8.12 Transformation von Bakterien

Kompetente Bakterien wurden aufgetaut und mit 1-10 ng Plasmid DNA oder 4 μ l eines Ligationsansatzes 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 MgCl₂, 20 mM Glucose, pH 7,0) bei 37°C im Schüttler regeneriert, auf Selektivnährböden ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.8.13 *In vitro* Transkriptions/Translations Assay (Protein Truncation Test)

Zur Detektion offener Leserahmen wurde das *in vitro* Transkriptions/Translations-System TNT[®]T7 (Promega) verwendet. Das zu untersuchende Gen wird in einem ersten Schritt via PCR (siehe 2.8.14) amplifiziert. Der „forward“-Primer beinhaltet am 5'-Ende eine T7 Promotorsequenz, die durch einen 3 bis 6 Nukleotide langen „Spacer“ von 17-24 genspezifischen Nukleotiden getrennt ist. Der „reverse“-Primer enthält das native Stopcodon. Ein Aliquot der PCR wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, um die Reinheit und die Konzentration des Amplifikationsproduktes abzuschätzen. Der Rest wurde äthanolpräzipitiert und in 10 µl Wasser aufgenommen. 10-40 ng des PCR-Produktes wurden mit 20 µl eines Kaninchen-Reticulocytenlysats in Gegenwart von 10 µCi (0,37 mBq) ³⁵S-Methionin bei 30°C für 90 min inkubiert. Durch Einfrieren wurde die Reaktion gestoppt. Die Analyse erfolgte, nach Auftrennung der radioaktiv markierten Translationsprodukte in einer SDS-PAGE (siehe 2.7.1) und anschließender Trocknung der Gele, durch Autoradiographie.

2.8.14 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation spezifischer DNA Bereiche erfolgte mittels PCR (Saiki *et al.*, 1985). Zum Einsatz kam die rekombinante, thermostabile DNA-abhängige DNA Polymerase AmpliTaq oder AmpliTaq Gold (Perkin-Elmer). Im Fall der AmpliTaq Gold war eine Verlängerung der initialen Denaturierung von 2 auf 10 Minuten notwendig, innerhalb der die Polymerase aktiviert wurde.

Eine Standard PCR enthielt 1x PCR Puffer (10 mM Tris/HCl [pH 8,5], 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% Gelatine), je 1 µM Primer, 100 ng DNA und 2,5 Units Taq-Polymerase in einem 50 µl Ansatz.

Die verwendeten PCR Programme unterschieden sich hinsichtlich der Temperatur, der Primerbindung (Annealing) und der Dauer der Verlängerung (Elongation), die jeweils Amplifikat-spezifisch waren. Die Zyklen Denaturierung, Annealing und Elongation wurden, je nach PCR, zwischen 25 und 30 mal wiederholt. Es folgte jeweils eine finale Elongation von 10 min.

An Thermocyclern kamen zur Anwendung Mastercycler Gradient (Eppendorf), Genius (Techne) und Trio-Block (Biometra).

2.8.15 Amplifikation langer DNA Sequenzen via PCR

Zur Amplifikation von DNA Fragmenten mit Größen zwischen 5 und 15 kb wurde das Expand[®]Long PCR System (Boehringer Mannheim) verwendet. Das System beinhaltet neben der Polymerase aus *Thermus aquaticus*, die keine Korrekturleseaktivität aufweist, die DNA Polymerase aus *Pyrococcus woesei* mit 3'-Exonucleaseaktivität. Die Mischung gewährleistet eine erhöhte Prozessivität und eine verringerte Fehlerfrequenz (Cheng *et al.*, 1994; Barnes, 1994).

Ein 50 µl Ansatz enthielt 1x PCR Puffer (50 mM Tris/HCl [pH 9,2], 16 mM (NH₄)₂SO₄, 1,75 mM MgCl₂), je 300 nM Primer, je 350 µM dNTPs, 5-100 ng DNA und 2,5 U des Polymerasegemisches. Die Reaktionsbedingungen unterschieden sich von der Standard PCR dahingehend, daß die Elongation bei 68°C durchgeführt wurde und ab dem 11. Zyklus für sie ein zehnstündiges Inkrement vorgegeben war. Für die Klonierung in T/A-Vektoren wurden die PCR Produkte über Agarosegele aufgereinigt.

2.8.16 DNA Sequenzierung

Sequenzierungen erfolgten dankenswerterweise durch Herrn Selbert, Paul-Ehrlich-Institut, unter Verwendung der automatischen DNA-Sequenzier Modelle 373 bzw. 377 (Applied Biosystems). Die computergestützte Auswertung der Sequenzen erfolgte mit den Programmen Sequence-Navigator und -Editor (ABI), DNAsis (Hitachi) und MacVector[™] 6.5 (Oxford Molecular). Datenbankabgleiche wurden via Internet mit dem Programm BLASTN (NCBI, Washington) vorgenommen.

2.8.17 Transfer von Nukleinsäuren

2.8.17.1 Kapillarblotting nach Southern

Die Übertragung von DNA Banden aus einem Agarosegel erfolgte nach Southern (1975). Die Methode basiert auf dem Transfer der Banden mittels eines Kapillarstroms auf eine Nitrocellulose- oder Nylonmembran.

Gele wurden im Anschluß an die Elektrophorese für 30 min in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) inkubiert. Für Fragmente, die größer als 10 kb waren, mußte zuvor, um einen vollständigen Transfer zu gewährleisten, eine Depurinierung (10 min, 0,25 N

HCl) durchgeführt werden. An die Denaturierung schloß sich eine zweimalige Inkubation für 15 min in Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl [pH 7,5]) an. Der Transfer erfolgte über Nacht mittels 20x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0) auf die Membran. Der Blot wurde gemäß Sambrook *et al.* (1989) aufgebaut. An Membranen fanden Verwendung Hybond N, Hybond N⁺ (Amersham) oder Parablot NY-Amp (Machery & Nagel).

Nach dem Transfer wurde die DNA durch UV-Bestrahlung (UV Stratalinker 1800, Stratagene) kovalent an die Membran gebunden. Die Membran wurde entweder bei RT gelagert oder direkt für Hybridisierungen (siehe 2.8.19) eingesetzt.

2.8.18 Markierung von DNA Sonden für Hybridisierungen

2.8.18.1 Markierung von Restriktionsfragmenten

Die radioaktive Markierung von DNA Fragmenten erfolgte mit dem Random Prime DNA Labelling Kit (Amersham). 5-50 ng DNA wurden in Gegenwart von 5 µl eines randomisierten Hexanukleotidgemisches sowie 10 µl eines 5x Puffers denaturiert (5 min, 100°C) und auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 2 U Klenow-Fragment und 5 µl α-³²P dCTP (50 µCi ≅ 1,85 mBq) wurde der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl EDTA gestoppt. Nicht inkorporierte Radionukleotide wurden im Anschluß über Sephadex G50 Säulen (Pharmacia) fraktioniert. Die spezifische Aktivität der einzelnen Fraktionen wurde im Szintillationszähler (Cerenkov-Messung; Einheit: counts per min (cpm)) bestimmt.

2.8.18.2 3'-Endmarkierung von Oligonukleotiden

Zur Herstellung strangspezifischer Sonden wurden Oligonukleotide mit dem ECL[®] 3'oligo labelling and detection kit (Amersham) endmarkiert. Hierzu wurden Primer (Sonden) nach den Angaben des Herstellers mit Fluorescein-markierten dUTPs gemischt und diese mittels der terminalen Transferase an die Primer angehängt. Die Oligonukleotidsonden wurden ohne weitere Aufreinigung für die Hybridisierung (siehe 2.8.19) eingesetzt.

2.8.19 Hybridisierungen

2.8.19.1 DNA Fragment Sonden

Southern Blot-Membranen (siehe 2.8.17.1) wurden zur Unterdrückung unspezifischer Bindungen für 1 h in Rollbehältern in Hybridisierungslösung (5x Denhardt, 6x SSC, 0,5% SDS, 50 µg/ml Hefe t-RNA (Life Technologies)) bei 65°C im Rollofen präinkubiert. Für die Hybridisierung wurden die Sonden zur Denaturierung für 10 min gekocht und 500.000-1.000.000 cpm/ml in frischer Hybridisierungslösung für 16-72 h (65°C) auf die prähybridisierten Membranen gegeben. Im Anschluß wurde zweimal mit Waschpuffer I (2x SSC, 0,1% SDS, 30 min, 65°C) und anschließend einmal mit Waschpuffer II (0,1-0,75x SSC, 0,1% SDS, 60 min, 65°C) gewaschen. Die SSC-Konzentration des Waschpuffers II bedingte die Stringenz des Waschens. Nach den Waschschrritten wurden die Membranen in Folie eingeschweißt und die Hybridisierungssignale durch Autoradiographie bei -80°C unter Verwendung von Verstärkerfolien detektiert.

2.8.19.2 DNA Oligonukleotid Sonden

Im Fall von Oligonukleotid-Sonden wurde die Prähybridisierung bei 42°C durchgeführt. Anschließend wurden 5-10 ng/ml 3'-endmarkierten Oligonukleotids in frischer Hybridisierungslösung (5x SSC, 0,1% (w/v) Hybridisierungskomponente (Amersham), 0,02% (w/v) SDS, 1:20 verdünnter Liquidblock (Amersham)) auf die Membranen gegeben und für 1-17 h bei 42-50°C im Rollofen inkubiert. Nach der Hybridisierung wurde zweimal je 5 min mit Waschpuffer A (5x SSC, 0,1% (w/v) SDS) und einmal mit Waschpuffer B (0,4-1x SSC, 0,1% SDS) gewaschen. Die Stringenz der Waschschrritte mit Puffer B wurde sowohl durch Änderung der Temperatur (50-62°C) als auch der SSC Konzentration bestimmt.

Membranen wurden im Anschluß für 1 min mit Puffer 1 (0,15 M NaCl, 0,1 Tris/HCl [pH 7,5]) gewaschen bevor sie für 30 min in Liquidblock (1:20 in Puffer 1 verdünnt) inkubiert wurden. Einem weiteren Waschschrtritt mit Puffer 1 folgte die Inkubation mit einem α -Fluorescein-HRP Konjugat, welches 1:1000 mit Puffer 2 (0,4 M NaOH, 0,1 M Tris/HCl [pH 7,5]; mit 0,5% (w/v) BSA) verdünnt wurde, für 1 h bei RT. Ungebundenes Konjugat wurde durch viermaliges Waschen mit Puffer 2 abgewaschen.

Die Detektion der Hybridisierungen erfolgte mit dem ECL detection reagent kit

(Amersham) (siehe 2.7.4) mit einer Exposition der Filme zwischen 1 und 5 min.

2.8.20 Datenbank Nummern

Die Sequenzen von PK15-PERV-A(58) und PK15-PERV-B(213) sind in der Genbank unter den Nr. AJ293656 bzw. AJ293657 abgelegt worden. Die 3'-flankierende genomische Sequenz von PK15-PERV-A(58) wurde unter der Genbank Nr. AJ291758, die 5'- bzw. 3'-flankierende genomische Sequenzen des Klons PK15-PERV-B(213) unter den Genbank Nr. AJ291759 und AJ291760 abgelegt.

Sequenzen, die für Homologieuntersuchungen verwendet wurden, waren 293-PERV-B(33) (Genbank Nr.: AJ133816), 293-PERV-B(43) (AJ133818), 293-PERV-A(42) (AJ133817) (alle Czauderna *et al.*, 2000) sowie PERV-MSL (AF038600) (Akiyoshi *et al.*, 1998). Für Sequenzabgleiche wurden verwendet: Gibbon ape leukemia virus (GaLV) (Genbank Nr.: NC_001885), Moloney murine leukemia virus (MoMLV) (Genbank Nr.: NC_001501), Feline leukemia virus (FeLV) (Genbank Nr.: NC_001940); Koala retrovirus (KoRV) (Genbank Nr.: AF151794) und Baboon endogenous virus (BaEV) (Genbank Nr.: D10032).

2.8.21 Verwendete Oligonukleotide

Die Bezugssequenzen, auf deren Basis die Oligonukleotide ausgewählt wurden, sind durch Indizes gekennzeichnet. Die Orientierung der Primer ist in 5'-3' Richtung angegeben.

Name	Sequenz	Position
PK1	TTGACTTGGGAGTGGGACGGGTAAC	2927-2949*
PK2	GGTAACCCACTCGTTTTCTGGTCA	2944-2966*
PK3	CATCTTTGACGAAGCCCTACACAG	3673-3696*
PK4	ATCCAACACCCTCAGGTGACCCTC	3716-3739*
PK5	CTGTGTAGGGCTTCGTCAAAGATG	3696-3673*
PK6	TTGACTTGGGAGTGGGACGGGTAAC	3739-3716*
PK7	CCCACCCATCACCCAGGATTTTTT	2884-2861*
PK8	TTCCTAATGGTTGTAGCAGCACTG	2849-2826*
PK9	AGGGTTCAAGAACTCCCCGACCAT	3651-3657*
PK10	AGGCGCTCACTGGGAAGTGGACTT	5444-5457*
PK11	AGTGGACTTCACTGAGGTAAGCC	5449-5472*
PK12	GGTGGCTTCCCCTTAGTCTCTTTC	5432-5409*
PK13	CCTGGAGGTATTCTGGAAGGATTAG	5385-5409*
PK14	TTCGGTGATGCGCGCTTTCGGTTG	842-855*
PK15	ACAGACACTCAGAACAGAGACGCC	807-830*
PK17	GCTAATCTTCCAGAATACCTCCAG	5384-5408*
PK18	TAACCAGCTGTCCCTGTTCTTACG	7642-7619*

PK19	CCCTAATCCGAGCATTACAGCTAG	7607-7584*
PK20	TGGTCGGTTATACCGATAGTCATA	7559-7536*
PK21	AAGGACCACTTCCTCAGGATGGTA	7529-7506*
PK22	AAAGAGAACCCGTATCCCTTACCC	7561-7584*
PK23	AGCTGTAATGCTCGGATTAGGGAC	7586-7609*
PK24	AAGGTCCTAACTCTAGAAGAAGAT	2696-2719*
PK25	GACAATTCCAGCAGTAGTGCCTTC	3825-3802*
PK26	ACGCACAAGACAAAGACACACGAA	1134-1111*
PK27	CTTGTCTACAGTTTTAATATGGGA	1136-1159*
PK28	CCACGCAGGGGTAGAGGACTGGGG	8781-8758*
PK29	ATCAGCAGACGTCTAGGAGGATC	895-918*
PK30	TGGATGACCACCCTGCTTTCTGCT	7977-8000*
PK31	GAACCATCCTTCAAACCACCCTG	7964-7941*
PK32	TGCTCCTGTTACTTACAGTTGGGC	8023-8046*
PK33	TCTCTTCCCTTCGACGCCTCTCT	7933-7910*
PK34	AAAGGATGAAAATGCAACCTAACC	3-26*
PK35	CCCCACTTCTTGCTTGTTAATAG	8186-8209*
PK36	GAACCCAGGAAGTTAATAAAAAGC	8244-8267*
PK37	CTAGAGGTCAGTTTCTCCTTGGCT	8162-8139*
PK40	TAATCGCTTATCTGGATTCTGTAA	177-200*
PK41	GTCAACTCATTTCCTGTTATCTTA	175-151*
PK42	TGACTGGCACCATAGAAGAATTGA	8415-8438*
PK43	AAGTGTGACCTTCTACCTATTTAC	8329-8306*
PK44	CTGGAATTGTCTGACCTAG	3815-3833*
PK45	GCTAAGAAGGCCAGATTGTC	3848-3868*
PK46	GCCATCCTCTTACCTTCCAC	4670-4689*
PK47	CTTCCGTCAGTGAACCAGGTTAG	4637-4659*
PK48	CTGACCGACAGAAGGAGACCAC	994-973 ^{oo}
PK49	GAGCCCTGGATTAACTTCAG	1222-1202 ^{ooo}
PK50	CTCCGAGTCCCTGCAGCAGGTC	1688-1667 ^{ooo}
PK51	GGAAGAAGATAAAGACTAGGG	2709-2729 ^{ooo}
PK52	CTACTGCTGGAATTGTCTGAC	3808-3828 ^{ooo}
PK53	GTCAGCGGTATGTCTGTAAG	4606-4625 ^{ooo}
PK54	CCACGGTTGAAGTCTCTTTC	5566-5547 ^{ooo}
PK55	GATCCATGCATCCCACGTTAAG	6180-6201 ^{ooo}
PK56	GACCGTAAGGACTGGAGGAC	794-813 ^{oo}
PK57	GCTGCTACAACCATTAGGAAAAC	2753-2775 ^{oo}
PK58	CAAGGAAGACCAGAAGTGTC	2961-2980 ^{oo}
PK59	CACTTGTTTGGCTGTGGTTGG	3858-3905 ^{oo}
PK60	GTACGTGTGCAGTCGCAAAG	4766-4785 ^{oo}
PK61	CTGTATGCACAATGCAGTTTC	5618-5638 ^{oo}
PK62	CTCTTTCTCTGTGCCTGGGC	6452-6471 ^{oo}
PK63	GTGGTCCTTGATGAATATGAC	7444-7464 ^{oo}
AGOWA 1	GTA ACTCAGCCTCCTGTAAC	2372-2353*
AGOWA 2	CCCGTGAGGCGTTGGGGATC	1873-1854*
AGOWA 3	CAGTCTGAAAAATGATTGCC	1367-1348
AGOWA 4	ACGAAGCCCTACACAGGGAC	3681-3700*
AGOWA 5	CCTCCCTGACGTAACATAAC	4156-4175*
AGOWA 6	TGACGGAAGCAGCTATGTGG	4651-4670*
AGOWA 7	CCAGTTCTCTGAGACTCCGG	5161-5180*
AGOWA 8	ACTTCACTGAGGTAAAGCCG	5454-5473*
AGOWA 9	GACTTCTTTGTCTGAAGTGG	7751-7770*
AGOWA 10	CATAAACCACAGTACTATAG	7359-7340*

AGOWA 11	GTACCTTCTAAGCAGTCCTG	3801-3782*
AGOWA 12	AGGGGAGACGGGGTTCGGAC	2727-2746*
AGOWA 13	CGGTATTTCTTGAGAGGCTC	2208-2227*
AGOWA 14	CCCGTCTCTATCCTAAGGCG	6880-6861*
AGOWA 15	GAAGGAAAATTCAATGTGACC	7206-7226*
AGOWA 16	AGCCTCTGTTCTCTAGGCTC	5449-5968*
AGOWA 17	CAGGCCAGTAGTAAACGCC	6306-6324*
AGOWA 18	TAACCTTTCTCTAAGCTTGC	7910-7891*
AGOWA 19	ACAGTGACACCCGTATCAGG	6400-6381*
AGOWA 20	AATCCAACAGGGCATCCTAG	3325-3344*
AGOWA 21	TAAAGATAAGAGCTGCTCCCC	6704-6724*
AGOWA 22	TTGTTCCAGGGCCTGCTATCC	123-143*
AGOWA 23	AGCCAGCAGGGTCTGGAATTC	8301-8291*
AGOWA 24	CCCTTCCACCGAGTCTCGAGG	6123-6103*
AGOWA 25	GGCCTTCAGTTGAATAACCTG	3244-3224*
AGOWA 26	CAGAAACGAGTGGGTTACCC	2962-2943*
AGOWA 27	CTGCATTTCTGCCTCCGATTG	6447-6467*
AGOWA 28	CTTCAACCACTGCGGCCAAG	2528-2509*
PERV-PBS	GTTGGCCGGGAAATCCTGCG	716-735*
PERV-PBS rev	CGCAGGATTTCCCGGCCAAC	735-716*
PERV-5'-LTR-for	TGAAAGGATGAAAATGCAACCTAAC	1-25
58-5'LTR-Flanke	GCCCTAAAACAGCAAAAAGTATG	126-104 ^{oo}
58-5'DR-rev	GCATTTTCATCCTTTCAATC	(-4)-17 ^{oo}
3'ChrFlanke-for	CTTTCAGGATAAGCCACCACCC	8912-(+15) ^{oo}
Fl3'-out-for	GTATATGAACCTAGAGGCTCTC	(+54)-(+75) ^{oo}
Fl3'-out-rev	GAGAGCCTCTAGGTTTCATATAC	(+75)-(+54) ^{oo}
Fl3'-outII-rev(b)	CTGATGGGTGGTGGCTTAT	(+21)-(+2) ^{oo}
213-5-for	GGAATCTCCTATTTAACAAGC	(-107)-(-87) ^{ooo}
213-5'-forII	GAACAGTGCAACTTCGGGGAC	(-479)-(-459) ^{ooo}
213-5'-forIII	CTGCTGTGGCTGTGGTGTAGG	(-291)-(-271) ^{ooo}
213-5-rev	CTTTCACTCCTACCTTGGGAAC	6 -(-16) ^{ooo}
213-3-for	CTTTCAGGAGCTGATATCAGAGC	8758-(+17) ^{ooo}
213-3'-forII	CATCCTCATGGACACTATGTC	(+128)-(+148) ^{ooo}
213-3-rev	GAAAACCTGCGGTATAGGTCACAG	(+70)-(+92) ^{ooo}
213-3'-revII	GACATAGTGTCCATGAGGATG	(+148)-(+128) ^{ooo}
VL(-LTR)-for	CTTTCATTTGGTGC GTTGGC	702-721*
Env5-III	TGGATGAGCTCTCCCACGTTAAGCTG	6152-6169 ^o
		6182-6208*
Env-3	GGAAGGCTAGAGCTCAGTTTCTCCT	8138-8114 ^o
		8168-8144*
Gag-5	GTTTAAACCCGGGACAGACAGTGACGAC	1146-1173*
Gag-3	CCCCTAAGCTTATCTTCTTAGAG	2731-2706*
Env-C-for	CCTGGATCGAGCTCTCCCACGTTAAAC	5311-5637 ¹
Env-C2-for	CAACACCTATAACCAGCTCTGGAC	6572-6594 ¹
Env-C3-for	GCTCTTAACTCCACGACTCCAGAG	6496-6519 ¹
Env-C-rev	GAAGTGGTAGAGCTCCGGCCAGCTTC	7548-7522 ¹
Env-C4-rev	GAGATATGGGTTCTCTTTTTGTCC	6955-6931 ¹
Env TM A B	GAGGTCAGTTTCTCCTTGGCTCAG	8129-8106 ^o
Diff-A-for	CAATCCTACCAGTTATAATCAATT	6638-6661 ^o
Diff-A-revS	TCGATTAAGGCTTCAGTGTGGTT	7334-7311 ^o

Diff-B-for	GTGGATAAATGGTATGAGCTGGGG	6788-6811 [*]
Diff-B-rev	CTGCTCATAAACCACAGTACTATA	7364-7341 [*]
Diff-C-for	CTAATGGTATGCGCATAGGAGAC	5741-5763 ¹
Diff-C-rev	GAGTAGTTTCCTTTCCCTTC	7318-7298 ¹
Diff-D-for	CCAACCTCTCAGCAGGATAG	1-20 ³
Diff-D-rev	ATAGCCATTGGAGGCTCCAG	275-256 ³
T7-Gag-for	CTTGTGCGTCCTTGTCTACAG ²	1126-1146 [*]
Gag-rev(T7)	CTTCAAAGTTACCCTGGGCTCG	2776-2755 [*]
T7-Pol-for	GCTACAACCATTAGGAAAAC ²	2833-2852 [*]
Pol-rev(T7)	GAGTTCGGGCTGTCCACAAGG	6343-6323 [*]
T7-Env-for	CCACTAGACATTTGAAGTTC ²	6155-6175 [*]
Env-rev(T7)	GTTAATAGTTCTAATCTTAGAAC	8163-8141 [*]

* bezogen auf p293-PERV-B(33); ° bezogen auf p293-PERV-A(42); °° bezogen auf pPK15 PERV-A(58); °°° bezogen auf pPK15-PERV-B(213); ¹ bezogen auf PERV-MSL (PERV-C); ² T7-forward Primer besitzen am 5'-Ende die Sequenz: TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA ACA G; ³ bezogen auf die im Patent Nr. WO 00/11187 veröffentlichte Sequenz; Angaben in Klammern beziehen sich auf die Position von Primern, die sich über die Bezugssequenz hinaus erstrecken (flankierende chromosomale Sequenzen), wobei „-“ und „+“ der 5'- bzw. 3'-flankierenden Region der Proviren entsprechen. ⁴Der LTR Primer „5'-PERV-LTR“ ist für alle hier beschriebenen PERV identisch.

3. Ergebnisse

3.1 Immunologische Detektion von PERV

Die Zielsetzung des ersten Projektes war die Produktion von spezifischen Antiseren gegen PERV, die zum Nachweis von viralen Proteinen verwendet werden können. Es wurden dabei zwei Ansätze verfolgt, zum einen die Expression von rekombinanten PERV Gag und Env Proteinen im Baculovirus Expressions System (BVES), die zur Immunisierung von Kaninchen verwendet werden sollten, und zum anderen die Herstellung von Antiseren gegen Gag und Env Peptide, abgeleitet von Sequenzen von PERV Moleklarklonen (Czauderna *et al.*, 2000; Krach *et al.*, 2001). Die Funktionalität der so hergestellten Seren sollte in verschiedenen immunologischen Assays überprüft werden, um zu evaluieren, ob es sich dabei um valide Werkzeuge handelt, mit denen die Expression von PERV Proteinen überprüft werden kann.

3.1.1 Expression rekombinanter PERV Proteine in Insektenzellen

Ein Ansatz zur immunologischen Detektion von PERV basierte auf dem BVES. PERV Gag sowie die PERV Env Proteine der beiden xenotropen Klassen sollten in Insektenzellen exprimiert und zur Produktion von Antiseren verwendet werden.

3.1.1.1 Herstellung der Transfervektoren

Ausgehend von dem PERV Moleklarklon 293-PERV-B(33)/ATG (Czauderna *et al.*, 2000) wurde unter Verwendung der rekombinanten Primer Gag-5 (*SmaI*) und Gag-3 (*HindIII*) die Sequenz des *gag* Gens (Nukleotid (nt) Position 1154-2728) amplifiziert. Das Amplifikat wurde anschließend in die *SmaI* und *HindIII* Restriktionsschnittstellen des Baculo-Transfervektors pBac-2cp (Novagen) kloniert. Der resultierende Vektor wurde Bac-PERV-G genannt. Desweiteren wurde, basierend auf dem gleichen Moleklarklon, mit den Primern PK27 und AGOWA19 eine Genkassette amplifiziert, die neben dem *gag* Gen das Gen für die Polymerase (*pro/pol*) umfaßt (nt Position 1136-6400). Die Klonierung dieser Kassette in pGem-T-Easy (Promega) und anschließende Subklonierung in die *NotI* Restriktionsschnittstelle des Transfervektors pVL1392 (Pharmingen) führte zu dem Vektor

Bac-PERV-GPP.

Zur Herstellung der Transfervektoren, die das *env* Gen tragen, wurde für die Klasse B ebenfalls der Moleklarklon 293-PERV-B(33)/ATG (nt Position 6189-8162) und, im Falle des *env* Gens der Klasse A, der Moleklarklon 293-PERV-A(42) (nt Position 6150-8132; Czauderna *et al.*, 2000; Krach *et al.*, 2001) verwendet. Die Amplifikation erfolgte mit den rekombinanten Primern Env5-III (*SacI*) und Env-3 (*SacI*). Die Klonierung der Amplifikate in die Restriktionsschnittstelle *SacI* des Transfervektors pBac-2cp (Novagen) ergab die Konstrukte Bac-PERV-E(A) und Bac-PERV-E(B).

Die derart hergestellten Transfervektoren wurden eingesetzt, um rekombinante Baculoviren zu erzeugen, die zur Infektion von SF9 und SHi5 Zellen verwendet wurden.

3.1.1.2 Analysen infizierter Insektenzellen

Die zur Infektion von Insektenzellen verwendeten Virusüberstände II (VS II) wurden vor ihrem Einsatz titriert. Dabei ergaben sich für Bac-PERV-G Werte von $2,6 \times 10^7$ pfu/ml (das entspricht nach der Formel für die TCID₅₀ (siehe 2.4.5, Formel 2) einem Wert von $3,5 \times 10^7$). Bac-PERV-GPP wies $1,5 \times 10^7$ pfu/ml (TCID₅₀: $2,2 \times 10^7$) auf. Die Titrierung der Env Konstrukte Bac-PERV-E(A) und Bac-PERV-E(B) ergab 1×10^7 pfu/ml (TCID₅₀: $1,4 \times 10^7$) für Env A und $1,7 \times 10^7$ pfu/ml (TCID₅₀: $2,5 \times 10^7$) für Env B.

Zur Überprüfung der optimalen Expressionsdauer der einzelnen Konstrukte nach Infektion wurden Zellen und Überstand bis zu drei Tage post Infektion (p.i.) geerntet und in mit Coomassie G 250 gefärbten SDS-PAGE sowie in Westernblotanalysen untersucht.

In Abbildung 3.1 sind Coomassie G 250 gefärbte SDS-PAGE mit Überstand und Zellysaten der Konstrukte Bac-PERV-G, Bac-PERV-GPP, Bac-PERV-E(A) und Bac-PERV-E(B) dargestellt.

Es zeigte sich für das Konstrukt Bac-PERV-G (Abb. 3.1A), daß eine optimale Expressionsdauer innerhalb von 24 h p.i. lag. Fast zeitgleich mit einer Bande bei etwa 65 kDa, was dem Molekulargewicht des Gag Polyproteins inklusive der Tag-Sequenzen entspricht, tritt eine Bande bei ca. 60 kDa auf (Spur 1). Im Verlauf der nächsten zwei Tage (Spur 2 und 3) verschiebt sich das Verhältnis weiter in Richtung der 60 kDa Bande. Nach einer genaueren Untersuchung der Expression innerhalb der ersten beiden Tage (Abb. 3.3) wurde für weitere Versuche eine Expressionsdauer von 30 h angesetzt.

Die im Konstrukt Bac-PERV-GPP (Abb. 3.1B) enthaltene virale Protease vermittelt die korrekte proteolytische Spaltung des Gag Polyproteins. Ab dem zweiten Tag (Spur 2) ist

neben der Bande mit 60 kDa, was dem Molekulargewicht des Gag Polyproteins entspricht, eine Bande bei etwa 40 kDa zu erkennen, die ein Intermediat der Gag-Proteolyse darstellt. Daneben ist eine Bande bei 30 kDa, die dem reifen Kapsidprotein zugeordnet werden kann, sowie eine Bande bei ca. 25 kDa, die ein zweites putatives Intermediat der Spaltung darstellt, zu erkennen. Dieses Proteolysemuster entspricht dem für das Gag von MLV beschriebenen Prozessierungsweg (Weiss, 1984). Die beiden weiteren Endprodukte der proteolytischen Spaltung des Gag Polyproteins, das Matrixprotein (p15) und das Nukleokapsid (p10), liegen in diesem Gel außerhalb der Auftrennungscharakteristika. Expressionsanalysen mit Bac-PERV-GPP wurden bis zum zweiten Tag durchgeführt.

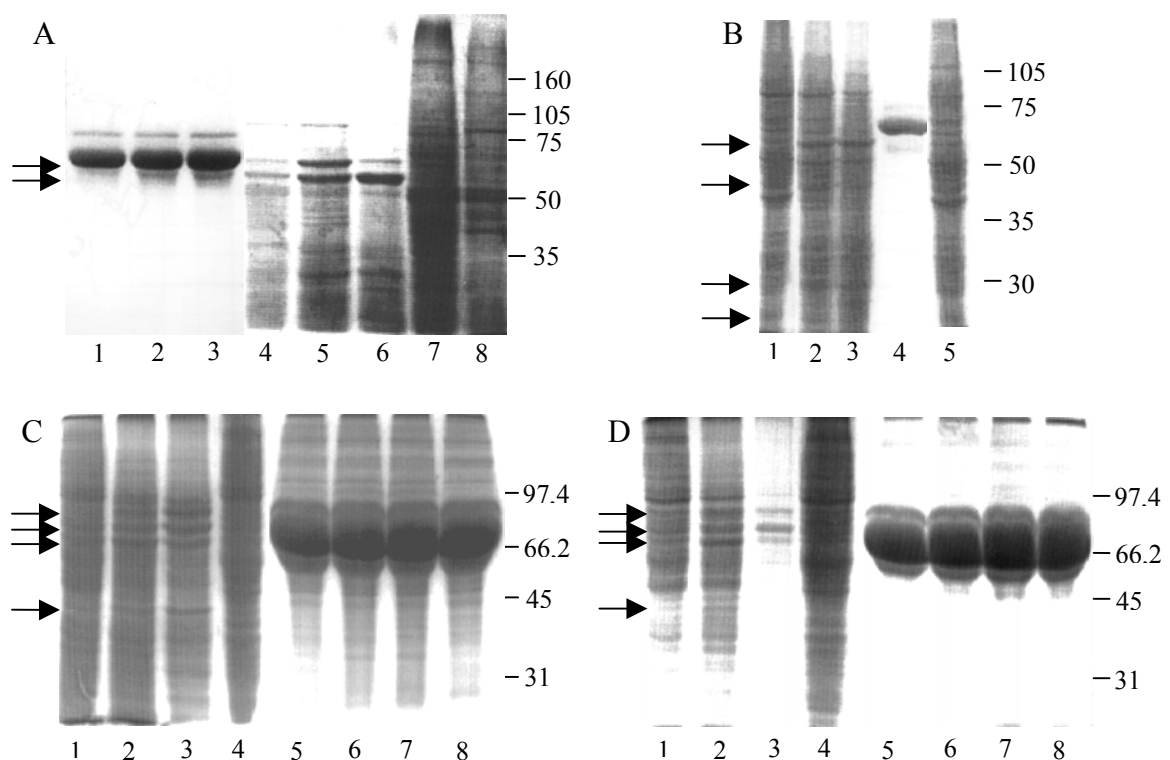


Abb. 3.1. SDS-PAGE mit Zellysaten von PERV-Protein exprimierenden Insektenzellen.

Gag exprimierende SHi5 Zellen (A), Gag-Pro-Pol exprimierende SHi5 Zellen (B), Env-A und Env-B exprimierende SF9 Zellen (C und D). Auftragung in A: Überstände vom 1.-3. Tag p.i. (Spuren 1-3), Zellysaten des 1.-3. Tages p.i. (Spuren 4-6), Zellysat uninfizierter SHi5 Zellen des 3. Tages p.i. (Spur 7) und mit Baculo-Wildtypvirus infizierte SHi5 Zellen des 3. Tages p.i. (Spur 8); B: Zellysate vom 1.-3. Tag p.i. (Spuren 1-3), Überstand des 3. Tages p.i. (Spur 4) und Zellysat uninfizierter SHi5 Zellen des 3. Tages p.i. (Spur 5); C und D: Zellysate infizierter SF9 Zellen des 1.-3. Tages p.i. (Spuren 1-3), Zellysat uninfizierter SF9 Zellen des 3. Tages p.i. (Spur 4), Überstände infizierter Zellen des 1.-3. Tages p.i. (Spuren 5-7) und Überstand uninfizierter Zellen des 3. Tages p.i. (Spur 8). Pfeile markieren Banden putativer Proteine, die mit den Vorläuferproteinen oder Spaltprodukten in Verbindung gebracht werden können (Erläuterung siehe Text). Molekulargewichte sind in kDa angegeben.

Die Expression der Konstrukte Bac-PERV-E(A) und Bac-PERV-E(B) (Abb. 3.1C und D) wurden ebenfalls am zweiten Tag beendet. Für Bac-PERV-E(B) ist am ersten Tag (Abb.

3.1D, Spur 1) bereits eine schwache Bande im Bereich von 76 kDa zu erkennen, die dem Env Vorläuferprotein zugeordnet werden kann. Am zweiten Tag sind bei beiden Env-Konstrukten (Abb. 3.1C und 3.1D, Spur 2) drei weitere Banden bei etwa 73, 68 und 45 kDa zu finden. Diese Banden stellen vermutlich Spaltprodukte des Env Vorläuferproteins dar.

Die in den Überständen aller Konstrukte zu erkennende Bande bei etwa 70 kDa ist auf BSA im Medium der Insektenzellen zurückzuführen. In Westernblotanalysen mit Protein-spezifischen Antisera konnte gezeigt werden, daß diese in keinem Zusammenhang zu den rekombinanten Proteinen steht (siehe 3.1.2.2.2).

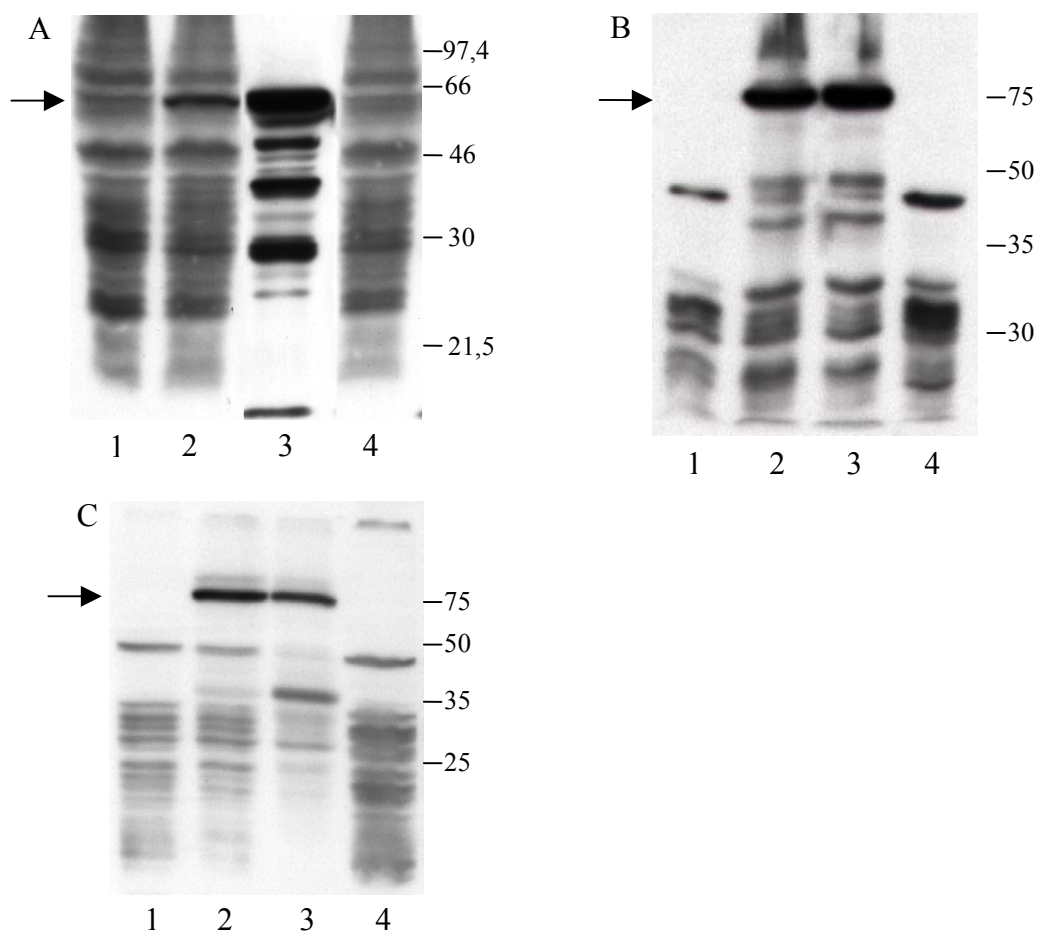


Abb. 3.2. Westernblotanalysen mit Zellysaten von PERV-Protein exprimierenden Insektenzellen.

Bac-PERV-G (A), Bac-PERV-E(A) (B) und Bac-PERV-E(B) (C) exprimierende SF9 Zellen. Aufgetragen sind in allen Abbildungen Lysate der Zellen des 1.-3. Tages p.i. (Spuren 1-3) und unifizerte Zellen des 3. Tages p.i. (Spur 4). Die Inkubation erfolgte mit α -S-Tag-HRP konjugierten Antikörpern. Pfeile markieren die Vorläuferproteine von Gag (A) und Env (B, C). Molekulargewichte sind in kDa angegeben.

Die in den Zellysaten mittels Coomassie G 250 gefärbten SDS-PAGE identifizierten Banden wurden in Westernblotanalysen unter Verwendung von Antikörpern gegen den S-Tag (S-Tag™ CL-HRP Western Blot Kit, Novagen; vergleiche Abbildung 3.3) verifiziert.

In Abbildung 3.2 sind Westernblots für das Konstrukt Bac-PERV-G, Bac-PERV-E(A) und Bac-PERV-E(B) dargestellt.

Für das Konstrukt Bac-PERV-G ist am zweiten Tag (Abb. 3.2A, Spur 2) eine deutliche Bande in der Größe des Gag Polyproteins zu erkennen, wohingegen am dritten Tag (Spur 3) neben einer stärkeren Bande für dieses Molekül zahlreiche Banden mit kleineren Molekulargewichten, die vermutlich Abbauprodukten entsprechen, sichtbar sind. Die in der mit Coomassie G 250 gefärbten SDS-PAGE sichtbare Bande bei etwa 60 kDa (Abb. 3.1A, Spur 5) ist im Westernblot nicht nachweisbar.

Westernblotanalysen von PERV Gag exprimierenden SF9 Zellen, die zwischen 24 h und 30 h p.i. geerntet wurden, ergaben erste Signale für das Gag Polyprotein nach ca. 27 h und eine beginnende Proteolyse des Proteins nach etwa 30 h (Abb. 3.3).

Analysen der Lysate von SF9 Zellen, die mit den Konstrukten Bac-PERV-E(A) bzw. Bac-PERV-E(B) infiziert waren, ergaben für den zweiten Tag eine starke Bande bei ca. 76 kDa (Abb. 3.2B und C, Spur 2), was dem apparenten Molekulargewicht des Env Vorläufermoleküls inklusive der Tag-Sequenzen entspricht. Die in den Coomassie G 250 gefärbten SDS-PAGE (Abb. 3.1C und D) gefundenen Banden bei etwa 73, 68 und 45 kDa sind via S-Tag nicht nachweisbar. Keine dieser Banden konnte im Überstand infizierter Zellen nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Für das Konstrukt Bac-PERV-GPP war eine derartige Analyse nicht möglich, da der Transfervektor pVL1392, der für die Genkassette *gag-pro-pol* verwendet wurde, keinen S-Tag beinhaltet.

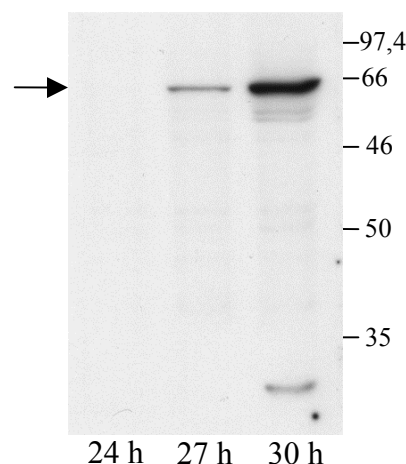


Abbildung 3.3. Westernblotanalyse mit PERV Gag exprimierenden SF9 Zellen.

Zellen wurden 24, 27 und 30 h p.i. geerntet. Zellysate wurde mit α -S-Tag-HRP konjugierten Antikörpern inkubiert. Molekulargewichte sind in kDa angegeben.

3.1.1.3 Aufreinigung rekombinanter PERV Proteine

Die Aufreinigung rekombinanter PERV Proteine basierte entweder auf den im Transfervektor enthaltenen Sequenzen für sechs Histidinreste (His-Tag) oder der Sequenz für ein 15 Aminosäuren (AS) umfassendes Bindemotiv für S-Protein (S-Tag). Eine schematische Darstellung des Vektorsystems pBac-2cp ist in Abbildung 3.4 gezeigt.

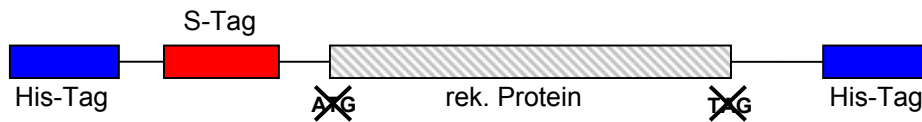


Abb. 3.4. Schematische Darstellung des Vektorsystems pBac-2cp.

His-Tag bzw. S-Tag stellen Sequenzen dar, die zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine verwendet werden können. Das durchgestrichene ATG bzw. TAG verdeutlicht, daß das native Start- und Stopcodon des Gens für das Expressionskonstrukt mutiert werden mußte.

Sowohl die Bindung des rekombinanten Gag und der rekombinanten Env Proteine an Ni^{2+} -Agarose via His-Tag als auch an S-Protein-Agarose über den S-Tag wurde durchgeführt. Westernblotanalysen der Isolierungsschritte via His-Tag mit Antikörpern gegen den His-Tag sind in Abbildung 3.5 exemplarisch für PERV Env-A dargestellt. Es ist zu erkennen, daß im zweiten Elutionsschritt (Spur 5) zwei deutliche Banden mit apparenten Molekulargewichten von ca. 76 bzw. 73 kDa von der Agarose freigesetzt werden. Bei der Bande mit dem geringeren Molekulargewicht handelt es sich vermutlich um ein während der Aufreinigung entstandenes Spaltprodukt. Die anschließende Umpufferung führte jedoch in allen Fällen zum Verlust der Proteine. Weder unter Verwendung des His- noch des S-Tags konnten somit erfolgreich rekombinante PERV Gag, Env-A oder Env-B Proteine aufgereinigt werden.

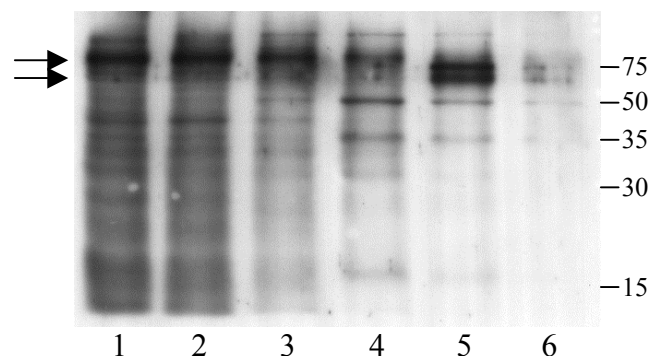


Abb. 3.5. Westernblotanalyse der Isolierungsschritte rekombinanter Env Proteine.

Aufgetragen ist nicht aufgereinigtes Lysat von Insektenzellen, die das Konstrukt Bac-PERV-E(A) exprimieren (Spur 1), Lysat nach der Bindung an die Nickel-Agarose (Spur 2), der Waschschrift (Spur 3) und drei Elutionsschritte (Spur 4-6). Verwendet wurden SHi5 Zellen zwei Tage p.i.. Die Immunreaktion wurde mit Antikörpern gerichtet gegen den His-Tag (Penta-His Antibody, Qiagen) durchgeführt. Pfeile markieren das Env-Vorläuferprotein und ein Spaltprodukt. Molekulargewichte sind in kDa angegeben.

3.1.2 PERV-spezifische Peptidantiseren

Der zweite Ansatz zur immunologischen Detektion von PERV gründete auf der Herstellung von Antiseren gegen Peptide aus den PERV Gag und Env Proteinen.

3.1.2.1 Auswahl der Peptidsequenzen

Computergestützt wurde durch die Fa. Eurogentec (Belgien) nach immunogenen Sequenzen im Gag und im Env der Klasse B basierend auf dem Moleklarklon 293-PERV-B(33) (Czauderna *et al.*, 2000) gesucht. Die Sequenzen für das Env der Klasse A entstammten dem Moleklarklon 293-PERV-A(42) (Czauderna *et al.*, 2000; Krach *et al.*, 2001). Ausgewählt wurden für Gag Sequenzen aus dem Matrixprotein (MA, p15), dem Kapsidprotein (CA, p30) und dem Nukleokapsid (NC, p10) und für Env sowohl Sequenzen aus dem Oberflächenanteil (SU, gp70) als auch aus dem Transmembrananteil (TM, p15E). Die AS-Sequenzen der zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzten Peptide für Gag und Env und deren Position im jeweiligen Protein sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1. Peptidsequenzen zur Herstellung von Antiseren in Kaninchen.

Peptidname	AS Position	AS Sequenz
p15	176-190	H ₂ N-GTRSRRGATPERTDEC-CONH ₂
p30a	303-316	H ₂ N-PGWDYNTAEGRESLC-CONH ₂
p30b	327-340	H ₂ N-LRGASRRPTNLAKVC-CONH ₂
p10	506-524	H ₂ N-CPKKGNKGPKVLALEEDKD-COOH
gp70	9-24	H ₂ N-HLPTRGGEPKRLRIPLC-CONH ₂
Env-A [gp70(A)]	182-196	H ₂ N-QQRVQKDVRNKQISC-CONH ₂
Env-B [gp70(B)]	283-297	H ₂ N-PTNTPRNSPGVPVKTC-CONH ₂
p15E	641-657	H ₂ N-VLRQQYQGLLSQGETDL-COOH

Kursive ‚Cs‘ am Ende der Sequenzen kennzeichnen Cysteinreste, die zur Kopplung des jeweiligen Peptids an das Trägermolekül angefügt wurden. Mit Ausnahme der Sequenz für Env-A [gp70(A)], die sich auf den Klon 293 PERV-A(42) (Czauderna *et al.*, 2000; Krach *et al.*, 2001) bezieht, sind die AS Positionen für den Klon 293 PERV-B(33) angegeben (Czauderna *et al.*, 2000).

Für das Kapsidprotein wurden zwei unterschiedliche Sequenzen ausgewählt (a und b) um eine optimale Detektion zu gewährleisten.

Um polyklonale Antiseren aus einer weiteren Spezies zu erhalten, wurden Ziegen mit den Peptiden Gag p10 und Env p15E immunisiert.

Tabelle 3.2. Peptidsequenzen zur Herstellung von Antiseren in Hühnern.

Peptidname	AS Position	AS Sequenz
EnvA1-1	164–185	H ₂ N-NPTS ^{<i>Y</i>} YNQFNYGHGRW ^{<i>K</i>} DWQQRVC-CONH ₂
EnvA1-3	269–288	H ₂ N-CPPIQEQR ^{<i>P</i>} SPNPSDYNTTSG-CONH ₂
EnvB2-2	249–264	H ₂ N-PALEPPHNLPV ^{<i>P</i>} QLTC-CONH ₂
EnvB2-3	283–292	H ₂ N-PTNTPRNSPG-COOH

Kursive ‚Cs‘ am Ende der Sequenzen kennzeichnen Cysteinreste, die zur Kopplung des jeweiligen Peptids an das Trägermolekül angefügt wurden. Die Positionen für Env A beziehen sich auf den Klon 293 PERV-A(42) (Czauderna *et al.*, 2000; Krach *et al.*, 2001) und für Env B auf 293 PERV-B(33) (Czauderna *et al.*, 2000).

Weitere Antiseren zur Differenzierung der PERV Klassen A und B, gerichtet gegen Abschnitte in den variablen Regionen der Env Proteine (Env-A: AS 160-305 und Env-B: AS 157-302; Le Tissier *et al.*, 1997) wurden durch die Fa. Sigma ARK (Darmstadt) in Hühnern produziert. Die Sequenzen dieser Peptide sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

3.1.2.2 Analyse der Peptidantiseren aus Kaninchen

3.1.2.2.1 Peptidantiseren gerichtet gegen PERV Gag

Die Positionen der vier Peptide im Gag Polyprotein, die verwendet wurden, um in Kaninchen Antiseren gegen PERV Gag zu produzieren, sind in Abb. 3.6 schematisch dargestellt. Die Funktionalität der Seren wurde in verschiedenen immunologischen Assays überprüft.

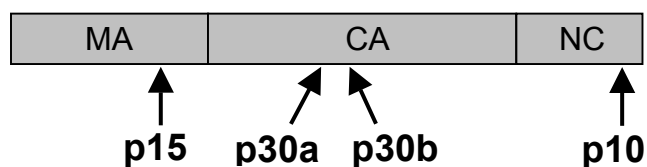


Abb. 3.6. Schematische Darstellung der Lokalisation der Peptide gerichtet gegen PERV Gag.

MA: Matrixprotein, CA: Kapsidprotein, NC: Nukleokapsid. Die Angaben p15, p30 und p10 entsprechen dem Molekulargewicht der Proteine und benennen die Antiseren (siehe Tabelle 3.1).

Die initiale Überprüfung des Antiserums gerichtet gegen das Gag p15 erfolgte mittels Westernblotanalysen auf Zellysaten von 293 PERV-PK Zellen und aufgereinigten PERV Viruspartikeln. In keinem Fall konnten spezifische Banden nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Anschließend durchgeführte indirekte Immunfluoreszenzen (IF-Analysen) mit diesem Serum auf 293 PERV-PK Zellen bestätigten dieses Ergebnis (nicht gezeigt). Das Serum wurde daher als nicht funktional eingestuft.

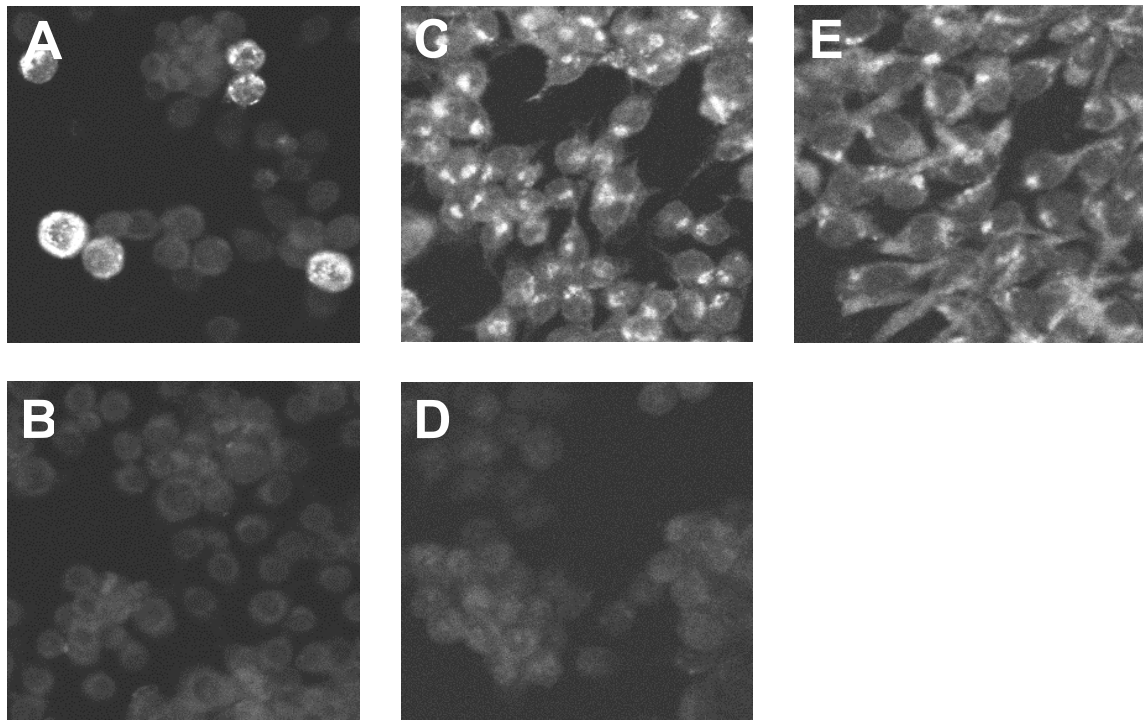


Abb. 3.7. Indirekte Immunfluoreszenzanalysen unter Verwendung des Gag p30a Serums.

Insektenzellen, die PERV-Gag exprimieren (Bac-PERV-G; A und B), 293 PERV-PK Zellen (C und D) und uninfizierte 293 Zellen (E). A, C und E, p30a Antiserum; B und D, Präimmunsrum. Vergrößerung 400x.

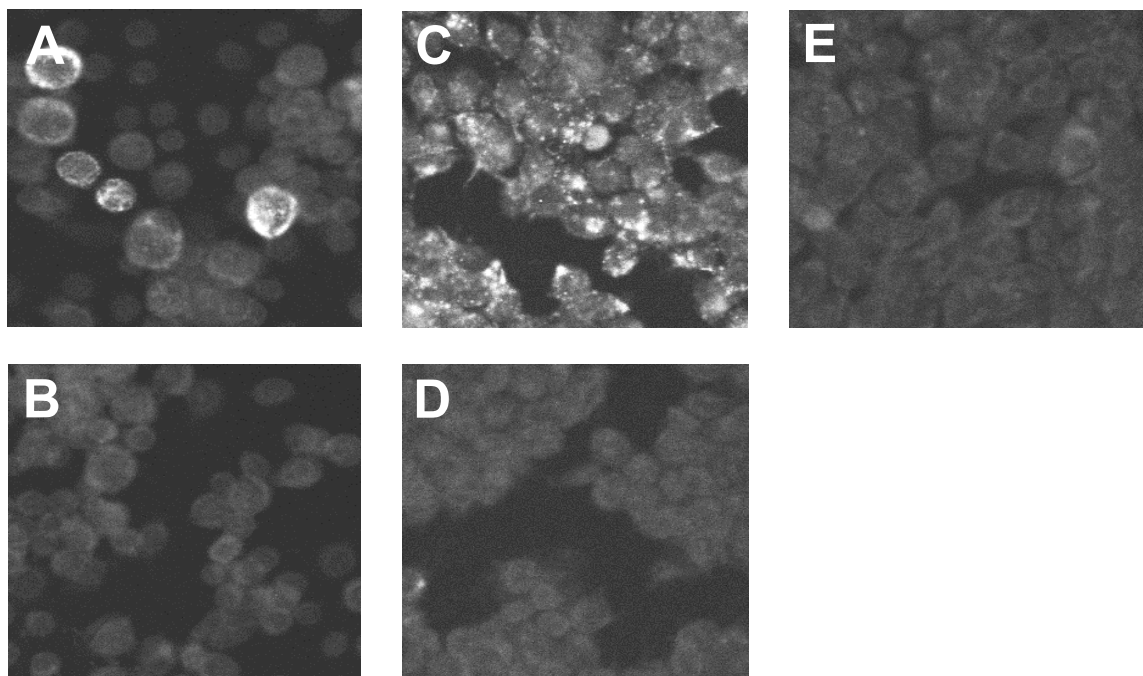


Abb. 3.8. Indirekte Immunfluoreszenzanalysen unter Verwendung des Gag p30b Serums.

Insektenzellen, die PERV-Gag exprimieren (Bac-PERV-G; A und B), 293 PERV-PK Zellen (C und D) und uninfizierte 293 Zellen (E). A, C und E, p30b Antiserum; B und D, Präimmunsrum. Vergrößerung 400x.

IF-Analysen mit den Gag p30a Antiseren auf Gag exprimierenden Insektenzellen (Abb. 3.7A) und 293 PERV-PK Zellen (Abb. 3.7C) ergaben spezifische Färbungen. Allerdings wurde bei der Inkubation von uninfizierten 293 Zellen eine starke Hintergrundfluoreszenz gefunden (Abb. 3.7E). Exprimierende Insektenzellen und 293 PERV-PK Zellen, die mit dem Präimmunserum inkubiert wurden, zeigten keine Reaktivität (Abb. 3.7B und D). Adäquate Fluoreszenzen wurden auf Gag exprimierenden Insektenzellen und 293 PERV-PK Zellen unter Verwendung des p30b Antiserums erhalten (Abb. 3.8A und C). Das p30b Antiserum zeigte jedoch im Gegensatz zu dem p30a Antiserum keine Kreuzreaktivität mit uninfizierten 293 Zellen (Abb. 3.8E). Ebenso wie mit dem p30a Präimmunserum wurden keine Fluoreszenzen auf exprimierenden Insektenzellen und 293 PERV-PK Zellen, inkubiert mit dem p30b Präimmunserum, erhalten (Abb. 3.8B und D).

Aufgrund der in der Immunfluoreszenz beobachteten Kreuzreaktivität des p30a Antiserums wurden Westernblotanalysen nur mit dem p30b Serum durchgeführt. In Abb. 3.9 sind Lysate von uninfizierten 293 Zellen (Spur 2 und 5) und 293 PERV-PK Zellen (Spur 3 und 6) sowie aufgereinigte PERV Partikel (Spur 1 und 4) inkubiert mit dem p30b Antiserum und dem Präimmunserum dargestellt.

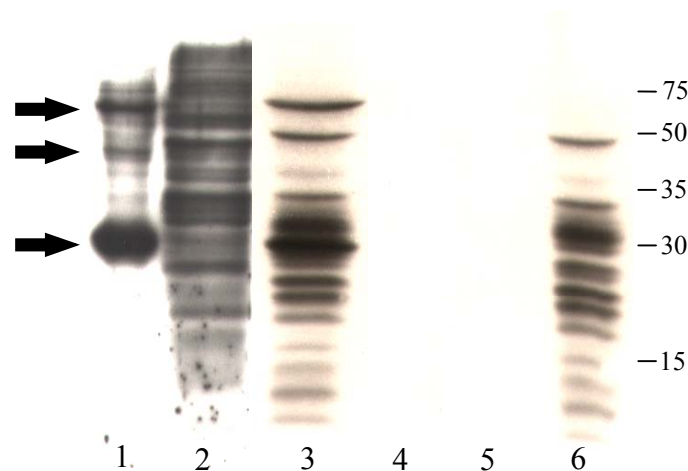


Abb. 3.9. Westernblotanalyse unter Verwendung des p30b Serums.

Aufgereinigte PERV Partikel (Spuren 1 und 4), Lysat uninfizierter 293 Zellen (Spuren 2 und 5) und Lysat von 293 PERV-PK Zellen (Spuren 3 und 6). Spuren 1-3, Antiserum; Spuren 4-6, korrespondierendes Präimmunserum. Pfeile kennzeichnen das Gag Polyprotein, ein Intermediat der Proteolyse und das Kapsidprotein mit apparenten Molekulargewichten von 60 kDa, 40 kDa und 30 kDa. Molekulargewichte sind in kDa angegeben.

Mit aufgereinigten PERV Partikeln wurden Banden detektiert, die dem Muster entsprechen, wie es in Insektenzellen gefunden wurde, die mit dem Konstrukt Bac-PERV-GPP infiziert waren (Abb. 3.9, Spur 1). Es ist eine deutliche Bande bei 30 kDa zu erkennen, was dem Molekulargewicht des Kapsidproteins entspricht. Daneben sind

Banden bei etwa 60 kDa und 40 kDa zu erkennen, die dem Gag Polyprotein und einem Intermediat der Proteolyse zugeordnet werden können. Die Bande, die dem Kapsid zugeordnet werden kann, sowie eine schwächere für das Vorläuferprotein ist auch im Lysat der 293 PERV-PK Zellen (Spur 3) zu erkennen. Im Gegensatz zu den PERV Partikeln läßt sich das putative Intermediat jedoch nicht nachweisen. Im Lysat der uninfizierten 293 Zellen (Spur 2) sind keine spezifischen Banden zu erkennen. Die Inkubation mit dem Präimmunsereum ergab weder für die Viruspartikel noch für die Zellysate spezifische Banden der erwarteten Größen (Spuren 4-6).

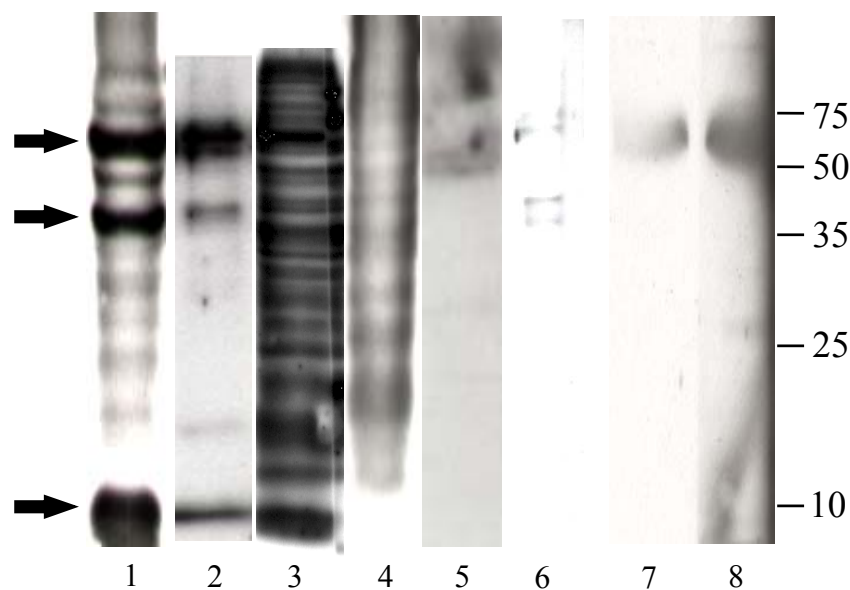


Abb. 3.10. Westernblotanalyse unter Verwendung des Gag p10 Serums.

Aufgetragen ist Lysat von SHi5 Zellen, die das Konstrukt Bac-PERV-GPP exprimieren (Spuren 1 und 4), aufgereinigte PERV Partikel (Spuren 2 und 5), 293-PERV-PK Zellysat (Spuren 3 und 6) und MLV-haltiger Zellkulturüberstand (Spuren 7 und 8). Spuren 1-3 und 7, Antiserum; Spuren 4-6 und 8, korrespondierendes Präimmunsereum. Pfeile kennzeichnen das Gag Polyprotein, ein Intermediat und das Nukleokapsid mit apparenten Molekulargewichten von 60 kDa, 40 kDa und 10 kDa. Molekulargewichte sind in kDa angegeben.

Das Antiserum gerichtet gegen das Nukleokapsid von PERV (p10) wurde zuerst in Westernblotanalysen auf Lysaten von Insektenzellen, die das Konstrukt Bac-PERV-GPP exprimieren, getestet (Abb. 3.10, Spur 1). In Übereinstimmung mit dem Gag p30b Serum sind spezifische Banden die dem Gag Polyprotein und dem Intermediat zugeordnet werden können bei 60 kDa bzw. 40 kDa zu erkennen. Entsprechend dem verwendeten Antiserum ist daneben eine Bande bei 10 kDa zu finden, was dem Molekulargewicht des Endprodukts der Gag Proteolyse, dem reifen Nukleokapsid, entspricht. Westernblotanalysen auf aufgereinigten PERV Partikeln (Abb. 3.10, Spur 2) sowie auf Lysat von 293 PERV-PK Zellen (Abb. 3.10, Spur 3) ergaben ebenfalls ein spezifisches Signal, das dem Vorläufermolekül entspricht, sowie eine Bande, die dem Nukleokapsid zugeordnet werden

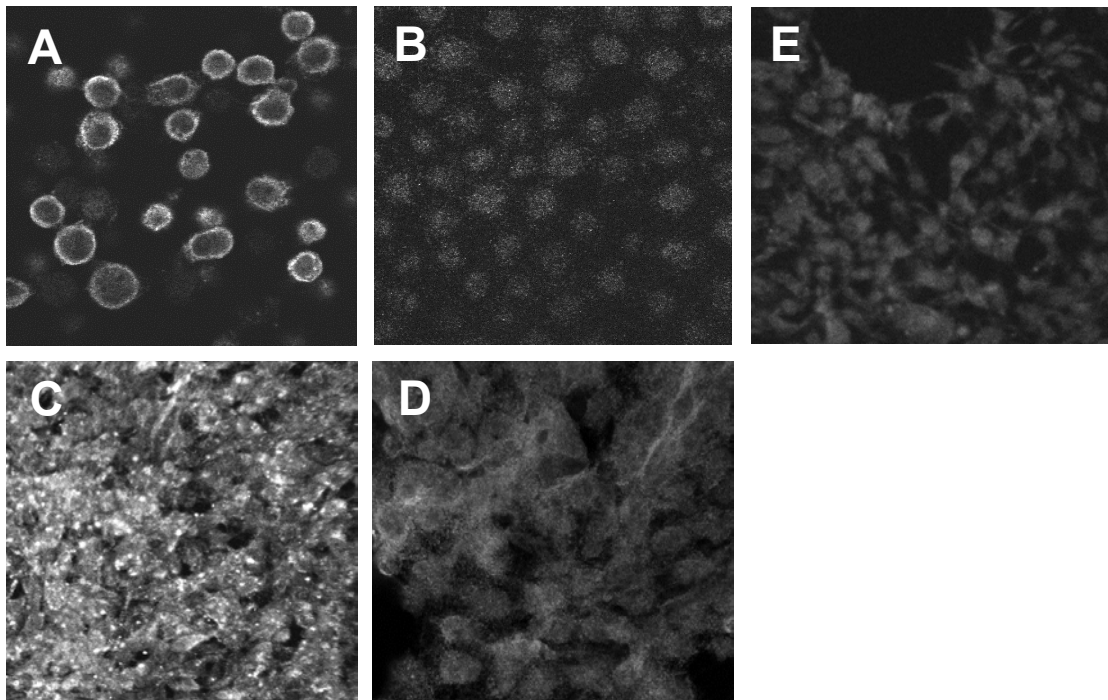


Abb. 3.11. Indirekte Immunfluoreszenzen unter Verwendung des Gag p10 Serums.

Abgebildet sind SHi5 Zellen, die rekombinantes PERV Gag exprimieren (Bac-PERV-Gag; A und B), 293 Zellen, die mit dem Molekularklon 293-PERV-B(33)/ATG (Czauderna *et al.*, 2000) transfiziert wurden (C und D) und untransfizierte 293 Zellen (E). A, C und E, Antiserum; B und D, korrespondierendes Präimmunserum. Vergrößerung 400x.

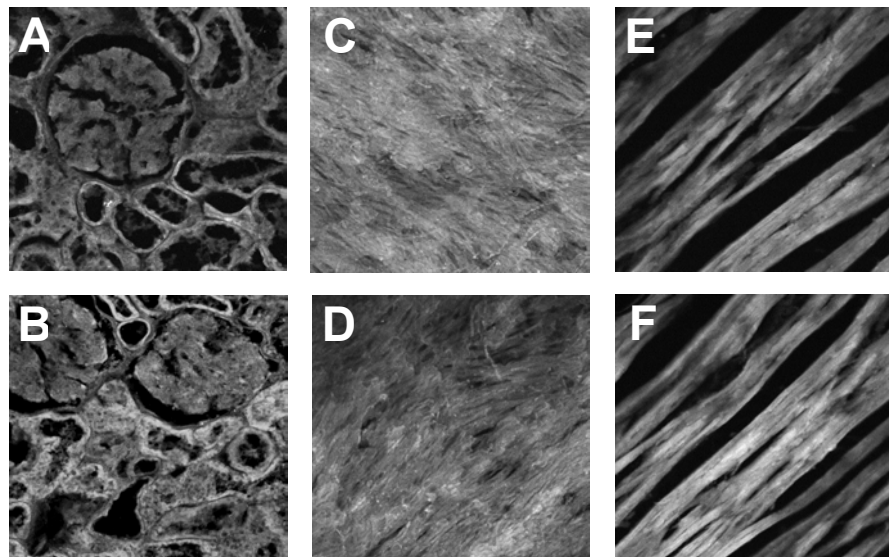


Abb. 3.12. Indirekte Immunfluoreszenz auf Gefrierschnitten von porcinen Geweben mit dem p10 Serum.

Dargestellt sind Niere (A und B), Aorta (C und D) und Herz (E und F). A, C und E, Präimmunserum; B, D und F, Antiserum. Vergrößerung 400x.

kann. Während das Intermediat in den Viruspartikeln nachgewiesen werden konnte, fehlt, in Übereinstimmung mit dem p30b Antiserum, diese Bande im Lysat der 293 PERV-PK Zellen. Unter Verwendung des Präimmunserums konnte in keinem der Lysate Gag

nachgewiesen werden (Spuren 4, 5 und 6). Die Spezifität des p30b und des p10 Antiserums wurden durch Inkubation von MLV-haltigem Zellkulturüberstand mit dem Anti- und dem Präimmunserum nachgewiesen (für α -p30b nicht gezeigt; Abb. 3.6, Spuren 7 und 8), wobei keine Bande detektiert wurde.

Das Gag p10 Antiserum wurde desweiteren in IF-Analysen auf seine Funktionalität überprüft. Inkubiert wurden unter anderem 293 Zellen, die mit dem Moleklarklon 293-PERV-B(33)/ATG transfiziert wurden (Czauderna *et al.*, 2000). Analysen mit diesen Zellen ergaben spezifische Signale unter Verwendung des p10 Antiserums sowie keine Signale mit dem Präimmunserum (Abb. 3.11C und D). Entsprechende Signale wurden mit Insektenzellen, die rekombinantes Gag exprimierten, erhalten (Abb. 3.11A und B). Nicht transfizierte 239 Zellen inkubiert mit dem Gag p10 Antiserum zeigten keine Fluoreszenz (Abb. 3.11E).

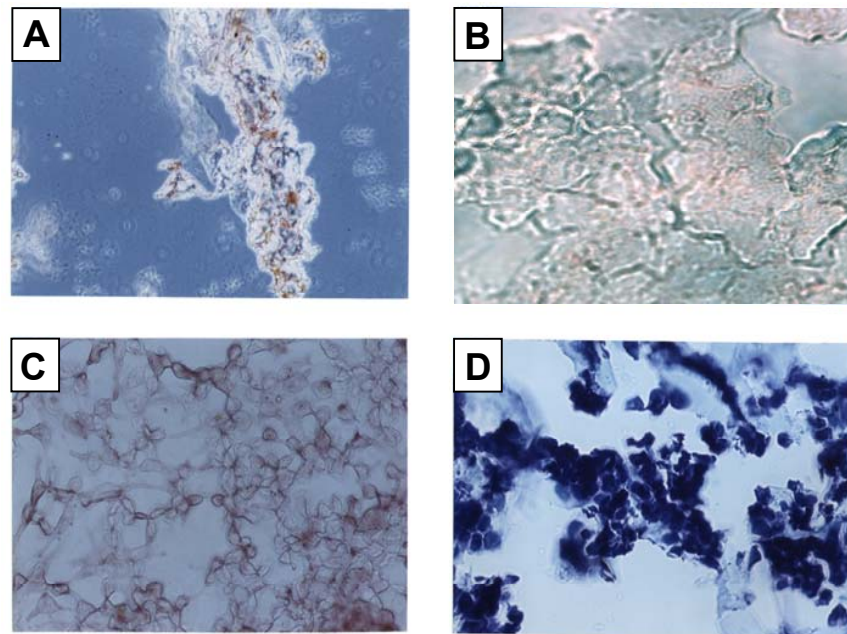


Abb. 3.13. Immunperoxidase Assay unter Verwendung des Gag p10 und des p30b Antiserums.

Dargestellt sind gefriergeschnittene 293 PERV-PK Zellen (A und B) und 293 PERV-PK Zellen gewachsen auf Deckgläschen (C und D). A und C, p10 Antiserum; B, p30b Antiserum; D, gefriergeschnittene Zellen gefärbt mit Hyalin-Eosin.

Neben Westernblotanalysen auf PERV-haltigen Zellysaten und Viruspräparationen sowie IF-Analysen auf PERV exprimierenden Zellen wurde die Reaktivität des Gag p10 Serums auf Gefrierschnitten von Schweinegeweben getestet. Dazu wurden von Nieren, Aorta und Herz (Abb. 3.12A-F) Schnitte hergestellt und mit dem Antiserum bzw. dem Präimmunserum inkubiert. Keines der untersuchten Gewebe zeigte spezifische Signale. Es wurde lediglich eine geringe Hintergrundfluoreszenz mit dem Antiserum, im Vergleich

zum Präimmuns serum, gefunden.

Für eine Abschätzung der Sensitivität des p10 Antiserums wurde der Schwellenwert, der an PERV Protein nachgewiesen werden kann, im ELISA, basierend auf aufgereinigten Viruspartikeln, bestimmt. Mit dem Antiserum gerichtet gegen das Nukleokapsid konnten noch 0,5 ng virale Proteine nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Das Gag p30b und das Gag p10 Antiserum wurden desweiteren auf ihre Anwendbarkeit in Routineassays, wie sie in der klinischen Diagnostik angewendet werden, untersucht. Dazu wurden 293 PERV-PK Zellen gefriereschnitten und im Immunperoxidase Assay (IPAP) auf die Expression von PERV Gag hin getestet (Abb. 3.13). Wie für die IF-Analysen beschrieben (Abb. 3.8 und 3.11), wurden mit den Antiseren spezifische Signale erhalten (Abb. 3.13A und B). Eine Kontrollfärbung von 293 PERV-PK Zellen auf Deckgläschen unter Verwendung des Gag p10 Antiserums zeigte eine identische Verteilung von Signalen (Abb. 3.13C). Die schwächeren Signale auf den geschnittenen Zellen hängen mit dem Verlust an Antigen während des Schneideprozesses zusammen. Als Strukturkontrolle wurden Parallelschnitte der gleichen Präparation mit Hyalin-Eosin gefärbt (Abb. 3.13D).

Die PERV Gag Antiseren p30b und p10 wurden weiterhin auf ihre Funktionalität mittels Immunogoldmarkierungen überprüft. Ultradünnschnitte von 293 Zellen, die mit dem Moleklarklon 293-PERV-B(33)/ATG (Czauderna *et al.*, 2000) transfiziert waren, wurden mit den Antiseren inkubiert. In beiden Fällen wurden deutliche Immunreaktionen erhalten (Abb. 3.14).

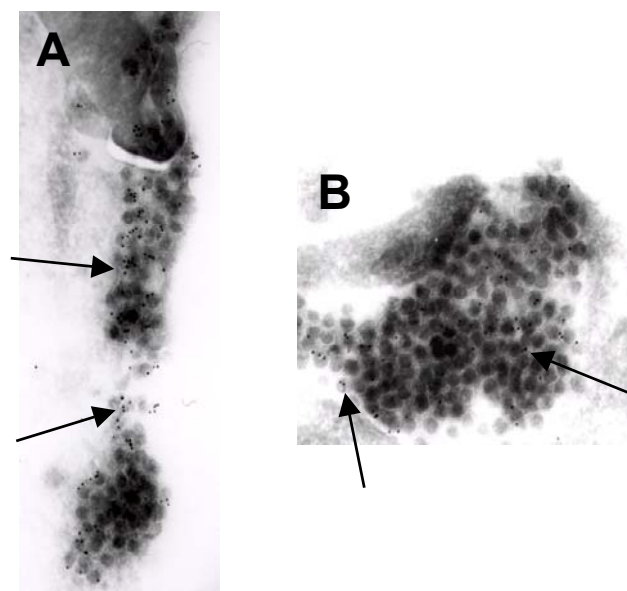


Abb. 3.14. Immunogoldfärbung unter Verwendung der p30b und p10 Antiseren.

Verwendet wurde 293 Zellen transfiziert mit 293-PERV-B(33)/ATG (Czauderna *et al.*, 2000). A, p30b Antiserum; B, p10 Antiserum. Als Sekundärantikörper wurde Ziegen α -Kaninchen IgG konjugiert mit 10 nm Goldpartikeln eingesetzt. Pfeile markieren positive Immunreaktionen. Vergrößerung 21.000x.

3.1.2.2.2 Peptidantiseren gerichtet gegen PERV Env

Analog zu den Gag Peptiden sind in Abbildung 3.15 die Positionen der zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzten Peptide aus dem Hüllprotein (envelope, Env) von PERV schematisch dargestellt.

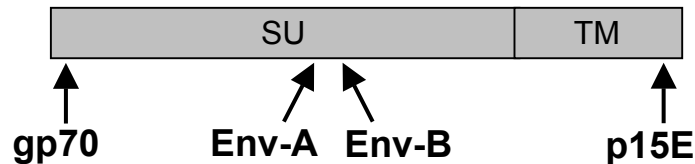


Abb. 3.15. Schematische Darstellung der Lokalisation der Peptide gerichtet gegen PERV Env.

SU: Oberflächenanteil des Env (surface), TM: transmembraner Anteil des Env. Die Angaben gp70 und p15E entsprechen dem Molekulargewicht der Proteine und benennen -mit Ausnahme von Env-A und Env-B- die Antiseren (siehe Tabelle 3.1).

Westernblotanalysen mit PERV Partikeln, Lysat von 293 PERV-PK Zellen sowie von Insektenzellen, die das Env der Klasse A bzw. der Klasse B (Bac-PERV-E(A) bzw. Bac-PERV-E(B)) exprimierten, ergaben für die Antiseren gp70, Env-A [gp70(A)] und Env-B [gp70(B)] keine Reaktivitäten (nicht gezeigt). Anschließende Überprüfungen der Funktionalität dieser Seren in indirekten IF-Analysen bestätigten diese Ergebnisse (nicht gezeigt). Wie das Gag Antiserum p15 wurden diese drei gegen das Env von PERV gerichteten Seren als nicht funktional eingestuft.

Im Gegensatz dazu konnte für das PERV Env p15E Antiserum Funktionalität in indirekten IF-Analysen nachgewiesen werden. In Abbildung 3.16 sind die Ergebnisse der IF-Analysen unter Verwendung von Insektenzellen, die entweder das Env der Klasse A oder der Klasse B exprimieren (Abb. 3.16A und B), 293-PERV-PK Zellen (Abb. 3.16C) und uninfizierten 293 Zellen (Abb. 3.16D), inkubiert mit dem Antiserum, dargestellt. Im Fall der Insektenzellen sind sowohl für Env-A als auch für Env-B deutliche Signale innerhalb der Zellen zu erkennen. Auf 293 PERV-PK Zellen ist die Fluoreszenz membranständig, was der zellulären Lokalisation des transmembranen Anteils des Env entspricht. Nicht infizierte 293 Zellen (Abb. 3.16D) inkubiert mit dem Antiserum ergaben, wie die Insektenzellen, die das Env der Klasse A exprimieren und 293 PERV-PK Zellen, die mit dem Präimmenserum inkubiert wurden (Abb. 3.16E und F), keine Signale.

Analog zu diesen Ergebnissen zeigte das p15E Antiserum auch Reaktivität in Westernblotanalysen. Die Inkubation von 293 PERV-PK Zellysat (Abb. 3.17, Spur 1) ergab deutliche Banden bei etwa 90 und 80 kDa. Das Molekulargewicht der untere Bande

entspricht dem des Env Vorläufermoleküls (bestehend aus dem SU und TM Anteil). Die Bande bei ca. 90 kDa geht vermutlich auf ein Glykosylierungsintermediat des Env zurück. Desweiteren ist eine Bande in der Höhe von ca. 20 kDa zu erkennen, die wahrscheinlich dem prä15E, wie es für MuLV beschrieben worden ist und aus dem p15E und dem p2E besteht (Rein *et al.*, 1994), entspricht.

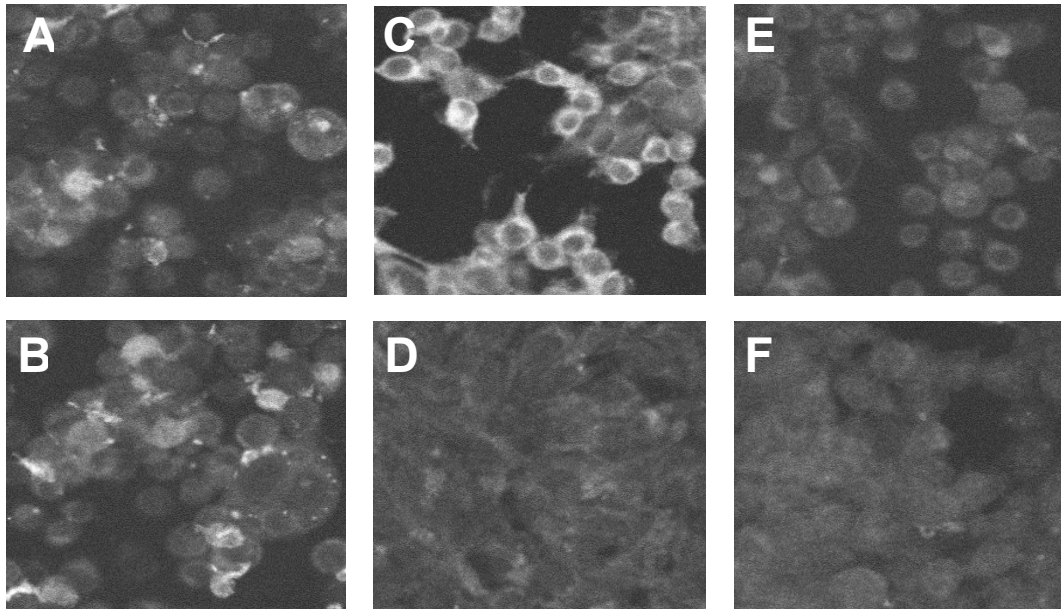


Abb. 3.16. Indirekte Immunfluoreszenzen unter Verwendung des Env p15E Serums.

Dargestellt sind SF9 Zellen, die das Env der Klasse A (A und E) bzw. der Klasse B (B) exprimieren (Bac-PERV-E(A) und Bac-PERV-E(B)), 293 PERV-PK Zellen (C und F) und uninfizierte 293 Zellen (D). A, B, C und D, Antiserum; E und F, Präimmunsereum. Vergrößerung 400x.

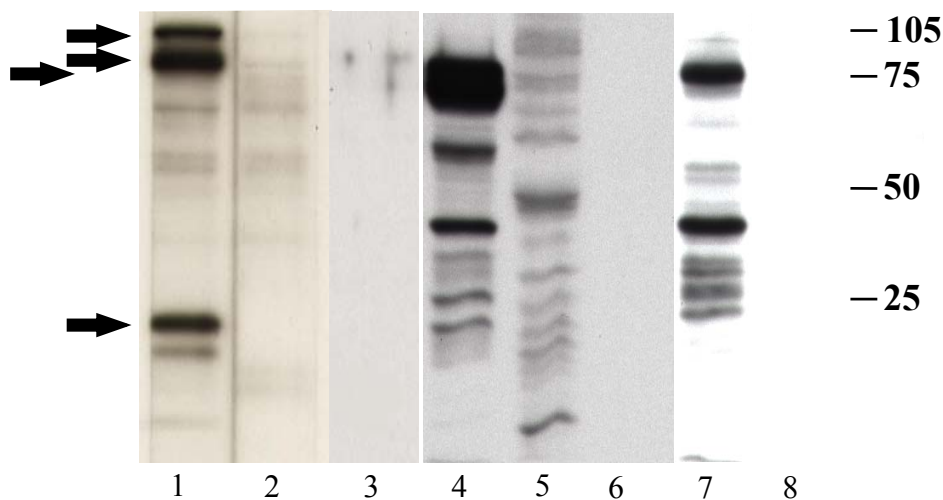


Abb. 3.17. Westernblotanalysen unter Verwendung des Env p15E Serums.

Aufgetragen ist Lysat von 293 PERV-PK Zellen (Spuren 1 und 2), aufgereinigte PERV Partikel (Spur 3), Zellysat und Überstand von SF9 Zellen, die das Env der Klasse A exprimieren (Spuren 4 und 6), Lysat uninfizierter SF9 Zellen (Spur 5) sowie Zellysat und Überstand von SF9 Zellen, die das Env der Klasse B exprimieren (Spuren 7 und 8). Spuren 1, 3-8, Antiserum; Spur 2, Präimmunsereum. Pfeile markieren zwei Glykosylierungsformen des Env Vorläuferproteins, die Vorläuferproteine in Insektenzellen sowie das prä15E Protein (Erläuterung siehe Text). Molekulargewichte sind in kDa angegeben.

Die schwache Bande unterhalb des putativen prä15E (Abb. 3.17, Spur 1) stellt vermutlich eine unspezifische Reaktion dar. Entgegen früherer Berichte (Tacke *et al.*, 2000) konnten keine multimeren Formen des TM Proteins nachgewiesen werden. Die Inkubation des Lysats mit dem Präimmunserum (Abb. 3.17, Spur 2) ergab keine Signale.

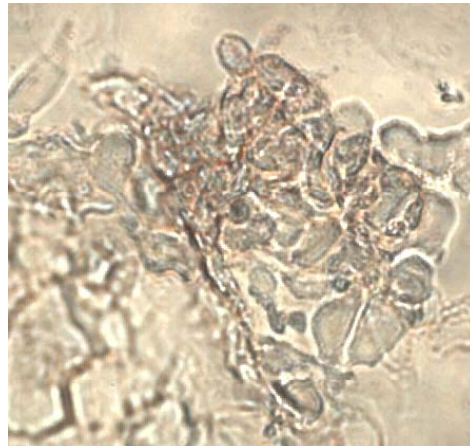


Abb. 3.18. Immunoperoxidase Assay unter Verwendung des Env p15E Antiserums.

Dargestellt sind gefriereschnittene 293 PERV-PK Zellen inkubiert mit p15E Antiserum. Vergrößerung 400x.

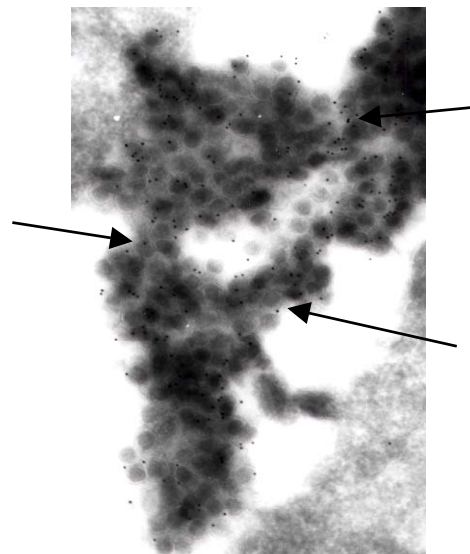


Abb. 3.19. Immunogoldfärbung unter Verwendung des p15E Antiserums.

Verwendet wurde 293 Zellen transfiziert mit 293-PERV-B(33)/ATG (Czauderna *et al.*, 2000). Zellen wurden mit p15E Antiserum inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde Ziegen α -Kaninchen IgG konjugiert mit 10 nm Goldpartikeln eingesetzt. Pfeile markieren positive Immunreaktionen. Vergrößerung 21.000x.

Im Gegensatz zu den Gag Antiseren p30b und p10 wurden mit dem p15E Antiserum unter Verwendung von aufgereinigten PERV Partikeln (Abb. 3.17, Spur 3) keine spezifischen Banden gefunden. Daß beide Klassen von Env mittels des anti TM Serums nachgewiesen werden können, zeigt sich bei der Inkubation von Insektenzelllysaten, die entweder das Env der Klasse A oder B enthielten (Abb. 3.17, Spuren 4 und 7). In beiden Fällen sind deutliche

Banden bei ca. 76 kDa zu erkennen, die dem Vorläuferprotein inklusive der Tag-Sequenzen entsprechen. Die weiteren Banden sind vermutlich Abbauprodukten des Env zuzuordnen. Im Lysat uninfizierter Insektenzellen (Abb. 3.17, Spur 5) sind entsprechende Banden nicht zu erkennen. Die in den Spuren 6 und 8 (Abb. 3.17) aufgetragenen Überstände der Insektenzellen inkubiert mit dem Antiserum verdeutlichen, daß das Env nicht in den Kulturüberstand freigesetzt wurde.

Ebenso wie die beiden funktionalen Gag Antiseren wurde auch das p15E Antiserum auf seine Funktionalität im IPAP (Abb. 3.18) und in Immunogoldfärbungen (Abb. 3.19) getestet. In beiden Assays wurden spezifische Signale erhalten.

3.1.2.3 Analyse der Peptidantiseren aus Hühnern

Die initiale Analyse der in Hühnern hergestellten Seren erfolgte in Westenblots. Es zeigte sich, daß von den Seren, die gegen die Env Klassen A bzw. B gerichtet waren, nur das Antiserum EnvB2-2 spezifische Signale ergab (Abb. 3.20 und nicht gezeigt). Sowohl unter Verwendung von aufgereinigten Viruspartikeln (Abb. 3.20, Spur 4) als auch mit Lysat von 293 Zellen, die mit dem Moleklarklon 293-PERV-B(33)/ATG (Czauderna *et al.*, 2000) transfiziert waren (Abb. 3.20, Spur 6), wurden Banden bei ca. 80 kDa und 70 kDa gefunden. Die Bande bei 80 kDa entspricht dem putativen Env Vorläufermolekül, wie es sich auch mit dem p15E Antiserum zeigen ließ. Die darunter laufende Bande läßt sich dem reifen Oberflächenmolekül, gp70, zuordnen. Keine Banden dieser Größen wurden mit Zellysat von HeLa Zellen gefunden, die mit dem Moleklarklon 293-PERV-A(42) (Czauderna *et al.*, 2000; Krach *et al.*, 2001) transfiziert waren (Abb. 3.20, Spur 5), was die Spezifität des Serums für Env der Klasse B verdeutlicht. Unter Verwendung des Präimmuserums wurde im Lysat von 293-PERV-B(33)/ATG Zellen (Abb. 3.20, Spur 1) eine unspezifische Bande bei etwa 72 kDa gefunden, die weder mit Viruspartikeln noch im Lysat der HeLa Zellen transfiziert mit 293-PERV-A(42) zu erkennen war (Abb. 3.20, Spuren 2 und 3).

Die Spezifität des EnvB2-2 Antiserums konnte auch in IF-Analysen mit 293 und HeLa Zellen, die mit den PERV Moleklarklonen der Klasse B bzw. der Klasse A transfiziert waren, gezeigt werden. In Abbildung 3.21A ist eine deutliche membranständige Fluoreszenz auf 293 Zellen transfiziert mit 293-PERV-B(33)/ATG (Abb. 3.21A) zu erkennen, die unter Verwendung des Präimmuserums (Abb. 3.21B) nicht zu sehen ist. Ebenso wurden keine Signale bei der Inkubation von HeLa Zellen transfiziert mit 293-

PERV-A(42) erhalten (Abb. 3.21C). Bestätigt wurde in den IF-Analysen auch die unspezifische Reaktion mit zellulären Proteinen von 293 Zellen, die sich in Form einer über die Zellen verteilten Hintergrundfluoreszenz zeigte (Abb. 3.21D).

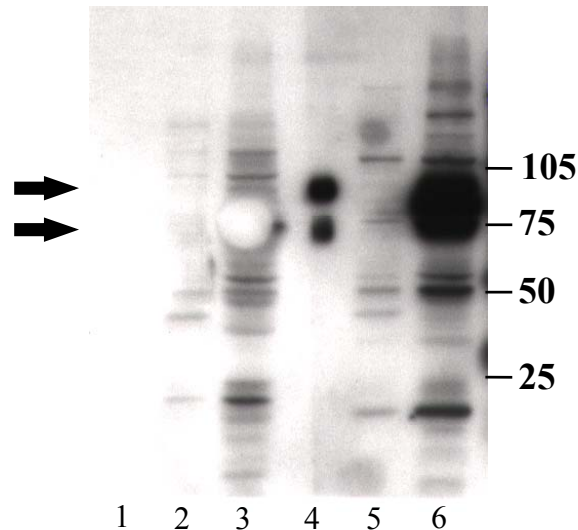


Abb. 3.20. Westernblotanalysen unter Verwendung des EnvB2-2 Serums.

Aufgetragen sind aufgereinigte PERV Partikel (Spuren 1 und 4), Lysat der Zelllinien HeLa und 293 transfiziert mit den Moleklarklonen 293-PERV-A(42) (Spuren 2 und 5) bzw. 293-PERV-B(33)/ATG (Spuren 3 und 6). Spuren 1-3, Präimmunserum; Spuren 4-6, Antiserum. Pfeile markieren das putative reife gp70 und das nicht gespaltene Env Vorläuferprotein. Molekulargewichte sind in kDa angegeben.

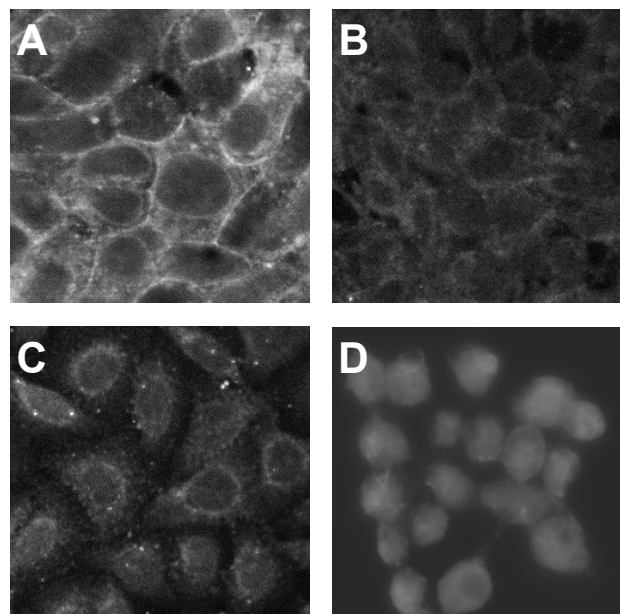


Abb. 3.21. Indirekte Immunfluoreszenzen unter Verwendung des EnvB2-2 Serums.

Dargestellt sind 293 Zellen, transfiziert mit 293-PERV-B(33)/ATG (A und B), HeLa Zellen, transfiziert mit 293-PERV-A(42) (C) und untransfizierte 293 Zellen (D). A, C und D, Antiserum; B, korrespondierendes Präimmunserum. Vergrößerung 400x.

3.1.2.4 Analyse der Peptidantiseren aus Ziegen

Die in Ziegen hergestellten Antiseren gegen das Gag p10 und das Env p15E zeigten weder in Westernblotanalysen noch in Immunfluoreszenzen Reaktivität (nicht gezeigt). Eine sich anschließende Überprüfung, ob die Ziegen Antikörper gegen das Kopplungsmolekül KLH (keyhole limpets hemocyanin) gebildet hatten, fiel ebenfalls negativ aus. Die Seren wurden wie die zuvor beschriebenen Seren gegen PERV Gag und PERV Env, die keine Reaktivität zeigten, als nicht funktional eingestuft.

3.2 Molekulare Charakterisierung nativer PERV

Das Ziel dieses Teils der Arbeit bestand in der Isolierung und Charakterisierung von nativen, direkt aus dem porcinen Genom stammenden Vollängensequenzen replikationskompetenter PERV. Die Konzentration lag dabei auf PERV der Klassen A und B, die als xenotrop beschrieben worden sind (Takeuchi *et al.*, 1998). Ausgangsmaterial der Untersuchung war die porcine Nierenzelllinie PK15, die PERV Partikel freisetzt, die für humane Zellen infektiös sind (Patience *et al.*, 1997; Le Tissier *et al.*, 1997).

3.2.1 Durchmusterung einer PK15- λ -Phagen Bibliothek

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde genomische DNA aus Zellen der Linie PK15 isoliert und partial verdaut, so daß die Majorität der Restriktionsfragmente eine Größe von 9 bis 23 kb aufwies, was der Insertkapazität des Lambda-FIX II/*Xho*I Partial Fill-in Vector Systems (Stratagene) entspricht. Die Titrierung der Bibliothek, die sich an die Auffüllreaktion und die Ligation der Fragmente anschloß, ergab, daß die Bibliothek etwa $1,44 \times 10^6$ unabhängige Klone enthielt. Bei einer durchschnittlichen Insertgröße von 15 kb sind somit $2,16 \times 10^{10}$ Basen verpackt worden. Das Genom des Schweins wird auf 3×10^9 Basen geschätzt, so daß es in der Phagenbibliothek ungefähr siebenmal repräsentiert ist.

Die Durchmusterung der Bibliothek erfolgte mittels einer Sonde, die homolog zu einem 753 bp Abschnitt der Protease/Polymerase von PERV ist (Czauderna *et al.*, 2000; im weiteren als *pro/pol*-Sonde bezeichnet). Nach Plaquelifting und Hybridisierung mit der *pro/pol*-Sonde wurden von den auf sechs Autoradiogrammen erhaltenen Klonen 85 mit hoher und mittlerer Intensität ausgewählt. Von diesen wurden nach zwei Wiederholungen der Durchmusterung 68 bis zur Homogenität aufgereinigt. Die Isolierung der λ -Phagen DNA erfolgte wie unter 2.8.1.2.3 beschrieben. Nach Restriktion mit *Not*I wurden die λ -Phagen Inserts in *Not*I restringierte pBlueScript Vektoren subkloniert.

3.2.2 Differenzierung der Klone

Da der Fokus der Klonierung und Charakterisierung von nativen PERV auf den Klassen mit xenotropem Potential lag, wurden die isolierten 68 Klone via PCR auf die Klassen A und B differenziert. Die verwendeten Primer (Diff-A-for versus (vs) Diff-A-rev, Diff-B-for

vs Diff-B-rev) ergaben für *env A* ein Amplifikat von 697 Basenpaaren (bp) und für *env B* ein Amplifikat von 577 bp. In Abbildung 3.22 ist exemplarisch eine Differenzierungs-PCR von 16 Klonen dargestellt.

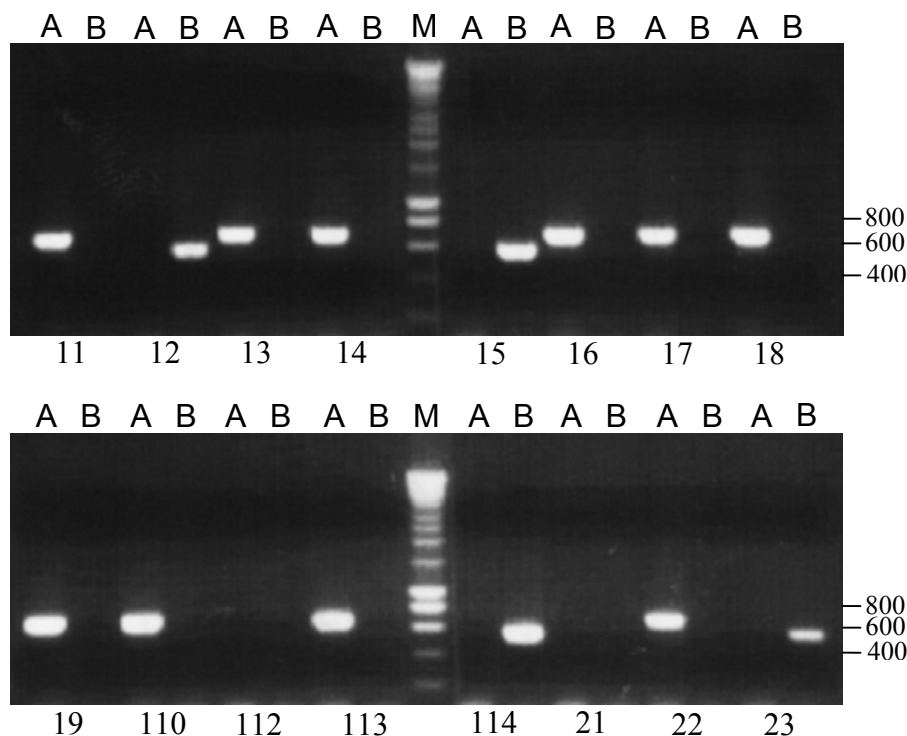


Abb. 3.22. Differenzierungs-PCR von PERV Klonen in *env* Klasse A und B.

Aufgetragen sind *env A* bzw. *env B* Amplifikate. Die Größe des *env A* Amplifikates beträgt 697 bp, die des *env B* Amplifikates 577 bp. Nummern beziehen sich auf verschiedene Klone; A, *env* Klasse A; B, *env* Klasse B; M, Längenstandard (Smart ladder, Eurogentec). Größen sind in bp angegeben.

Die Differenzierung der 68 Klone ergab, daß 41 der Klasse A, 10 der Klasse B und 17 Klone keiner Klasse zuzuordnen waren (z.B. Abb. 3.22, Klon 112). Die anschließende Überprüfung der 17 nicht zuordnungsfähigen Klone, ob sie der Klasse C (Primer Diff-C-for vs Diff-C-rev) oder der vor kurzem beschriebenen Klasse D (Primer Diff-D-for vs Diff-D-rev) angehören, fiel ebenfalls negativ aus (nicht gezeigt). Diese Klone wurden als trunziert im oder defizient für das *env* Gen betrachtet und daher von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

3.2.3 Identifizierung von offenen Leserahmen (ORFs)

Ziel war es, funktionale provirale PERV Sequenzen zu klonieren. Daher wurde in einem nächsten Schritt mittels des *in vitro* Transkriptions/Translations Assay (Protein Truncation Test, PTT) überprüft, welche Klone in allen drei viralen Leserahmen offen sind. PCRs auf

den drei viralen Genen ergaben Amplifikationsprodukte für *gag* von 1651 bp, für *pro/pol* von 3511 bp und für *env* von 2009 bp. Exemplarische Gele für diese PCRs sind in Abbildung 3.23 dargestellt. Die sich an die Aufreinigung der PCR Produkte anschließende *in vitro* Transkription/Translation ergab nach Autoradiographie für die einzelnen Gene Bilder, wie sie in Abbildung 3.24 gezeigt sind.

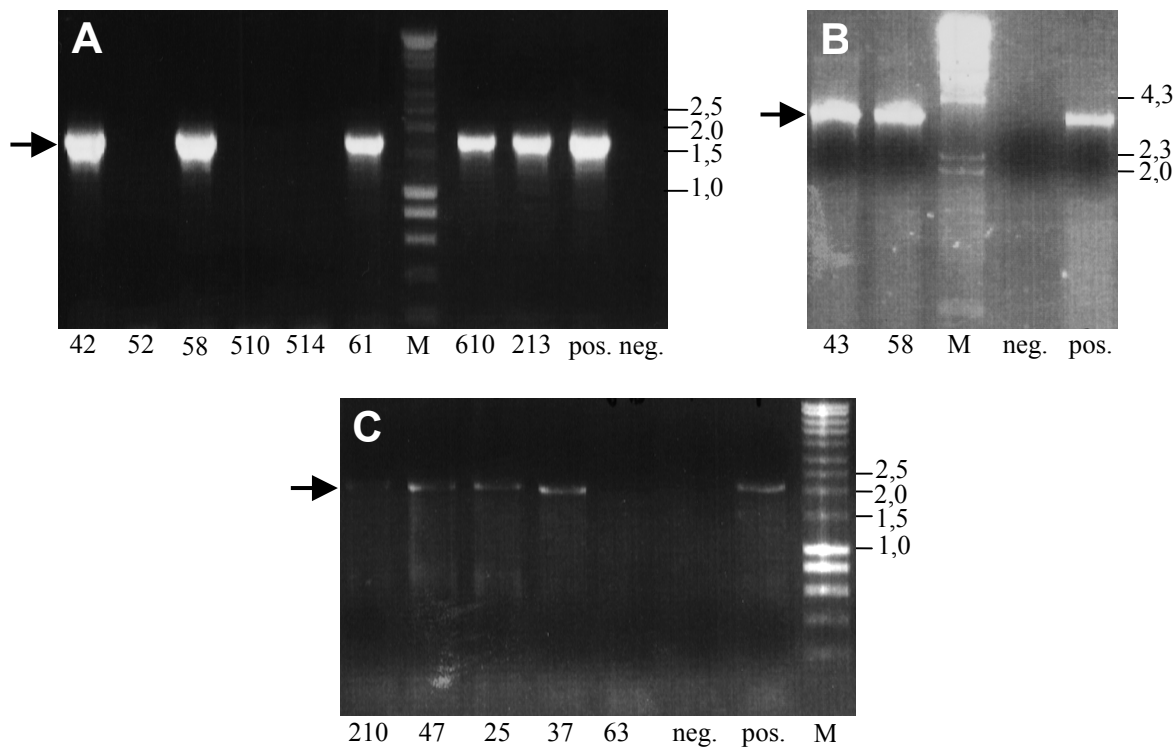


Abb. 3.23. Präparative PCR für PTT.

PCR der viralen Leserahmen *gag* (A), *pro/pol* (B) und *env* (C) für den *in vitro* Transkriptions/Translations Assay. Nummern beziehen sich auf verschiedene Klone. Pfeile markieren die Vollängengene mit 1651 bp für *gag*, 3511 bp für *pro/pol* und 2009 bp für *env*. Positivkontrolle, Molekularklon p293-PERV-B(33)/ATG (Czauderna *et al.*, 2000); neg., Wasserkontrolle; pos., Positivkontrolle; M, Längenstandard (Smart ladder, Eurogentec). Größen sind in kb angegeben.

Letztendlich wurden drei Klone der Klasse A, λ PK15-PERV-A(42), λ PK15-PERV-A(45) und λ PK15-PERV-A(58), und ein Klon der Klasse B, λ PK15-PERV-B(213), identifiziert, die sowohl für *gag* als auch für *pro/pol* und *env* offene Leserahmen aufwiesen. Die Subklonierung der λ Inserts in pBlueScript ergab die Plasmide pPK15-PERV-A(42), pPK15-PERV-A(45) und pPK15-PERV-A(58) bzw. pPK15-PERV-B(213).

3.2.4 Molekulare Charakterisierung der PERV Vollängenklone

3.2.4.1 Überprüfung der PERV-A Klone

Die erste Überprüfung der drei Klasse A Klone erfolgte in Restriktionsanalysen mit den Enzymen *EcoRI* und *HindIII* (Abb. 3.25A und B). Es zeigte sich, daß in den drei Klonen mehrere Banden auf gleicher Höhe auftraten, was vermuten ließ, daß sie das gleiche Virus, integriert an unterschiedlichen Orten im Genom, repräsentieren. Anschließende partielle Sequenzierungen der A Klone (nicht gezeigt) unterstützten die Annahme, daß sie das gleiche Provirus darstellen. Für die weitere Charakterisierung wurde daher der Klon pPK15-PERV-A(58) ausgewählt.

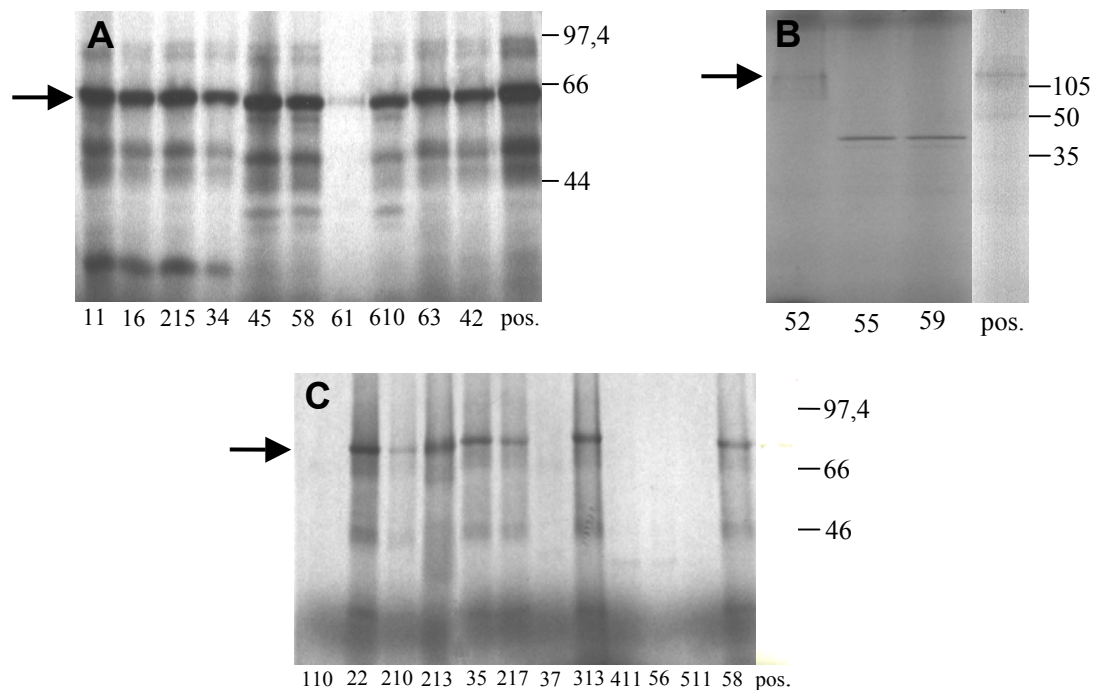


Abb. 3.24. PTT der drei viralen Leserahmen.

Offenheit der viralen Leserahmen *gag* (A), *pro/pol* (B) und *env* (C) wurde im *in vitro* Transkriptions/Translations Assay überprüft. Nummern beziehen sich auf verschiedene Klone. Pfeile markieren die Vollängenproteine mit 60 kDa für Gag, 120 kDa Pro/Pol und 72 kDa für Env. Als Positivkontrolle wurde der Molekularklon p293-PERV-B(33)/ATG verwendet (Czuderna *et al.*, 2000). Die Molekulargewichte der ORFs wurden mit DNASIS (Hitachi) berechnet.; pos., Positivkontrolle; Molekulargewichte sind in kDa angegeben.

Nach der Charakterisierung der 3'-flankierenden genomischen Sequenz des Klons pPK15-PERV-A(58) (siehe 3.2.4.5) wurde mittels PCR überprüft, ob die Integrationsorte der drei A Klone übereinstimmen. Unter Verwendung des Primers PK32, der im *env* bindet (8023-8046 in pPK15-PERV-A(58)), und des Primers Fl3'-out-rev, der in der 3'-flankierenden chromosomalen Sequenz von pPK15-PERV-A(58) bindet (+75+54), konnte für alle drei A

Klone das erwartete Amplifikat von 970 bp nachgewiesen werden (Abb. 3.25C). Die Klone PK15-PERV-A(42), PK15-PERV-A(45) und PK15-PERV-A(58) sind folglich identisch.

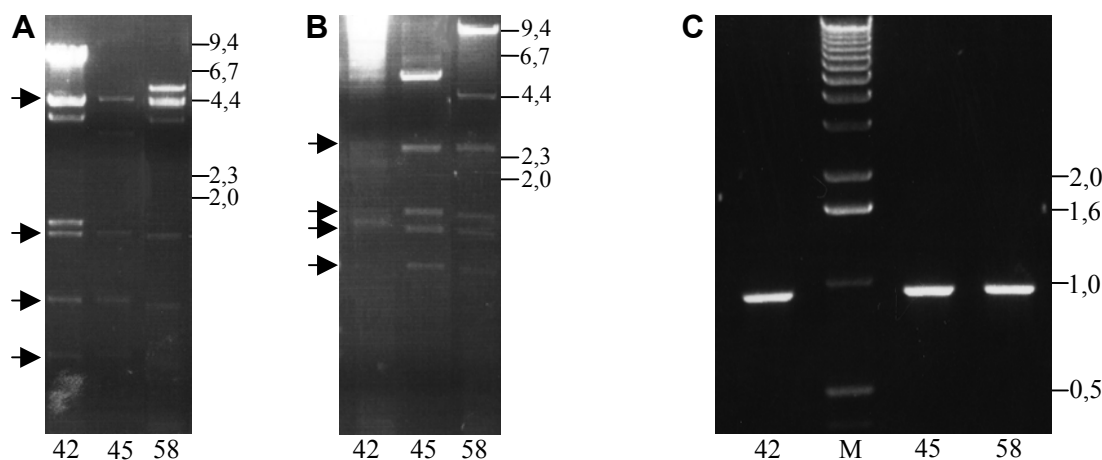


Abb. 3.25. Restriktionsanalyse und Integrationsnachweis der PK15-PERV-A Klone. Restriktionsanalyse der Klone pPK15-PERV-A(42), pPK15-PERV-A(45) und pPK15-PERV-A(58) mit *EcoRI* (A) und *HindIII* (B). Pfeile markieren Banden in gleicher Höhe. (C) PCR-Integrationsnachweis im Genom der Zelllinie PK15 für die drei A Klone unter Verwendung des Primers F13[']-out-rev, der spezifisch auf der 3'-flankierenden genomischen Sequenz bindet. Das entstehende Amplifikat weist eine Größe von 970 bp auf. M, Längenstandard (1-kb ladder). Längen sind in kb angegeben.

3.2.4.2 Genetische Struktur der nativen PERV Klone aus PK15 Zellen

Die Sequenzierung der nativen Proviren PK15-PERV-A(58) und PK15-PERV-B(213) ergab, daß sie die gleiche genetische Struktur wie die zuvor charakterisierten PERV Sequenzen aus der humanen Zelllinie 293 PERV-PK (Czauderna *et al.*, 2000; Krach *et al.*, 2001) aufwiesen. Die Klone PK15-PERV-A(58) und PK15-PERV-B(213) sind 8918 bzw. 8763 bp lang. Das *gag* Gen des A Klons startet bei nt 1153 und ist colinear mit dem *pro/pol* ORF (nt 2728-6309). Das Amber Stop-Codon (UAG) an nt Position 2727, das die beiden Gene voneinander trennt, wird, wie für PERV beschrieben (Akiyoshi *et al.*, 1998; Czauderna *et al.*, 2000), durch eine Glutamin tragende tRNA (tRNA_{Gln}) unterdrückt. Das *env* Gen überlappt partiell mit dem *pro/pol* Gen und stellt einen neuen Leserahmen dar (nt 6185-8149). PK15-PERV-B(213) zeigt eine dem entsprechende Struktur mit den Genen *gag* (nt 1077-2651), *pro/pol* (nt 2652-6239) und *env* (nt 6112-8085). Eine schematische Darstellung der Struktur der beiden Klone und die Positionen wichtiger retroviraler Sequenzen, wie sie für den Moleklarklon 293-PERV-B(33) bestimmt wurden (Czauderna *et al.*, 2000), sind in Abbildung 3.26 angegeben.

Vergleiche der Nukleotid- und der davon abgeleiteten Aminosäuresequenz des Klons PK15-PERV-A(58) mit dem aus der humanen Zelllinie 293 PERV-PK isolierten Klon 293-

PERV-A(42) sowie des Klons PK15-PERV-B(213) mit den Klonen 293-PERV-B(33) und 293-PERV-B(43) ergaben hohe Übereinstimmungen. Homologien sind in Tabelle 3.3A und B dargestellt.

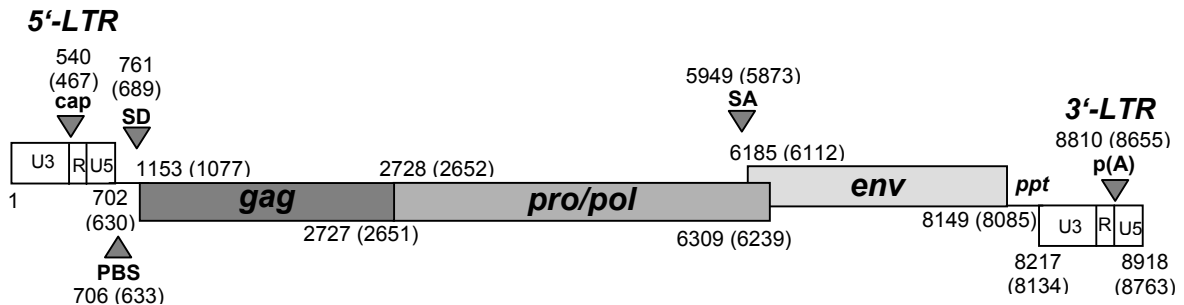


Abb. 3.26. Struktur der proviralen Sequenzen in den Klonen PK15-PERV-A(58) und PK15-PERV-B(213).

Provirale Sequenzen von PK15-PERV-A(58) und PK15-PERV-B(213) sind 8918 bzw. 8763 bp lang. Gene sind als grau hinterlegte Rechtecke dargestellt. Das erste und das letzte Nucleotid der LTR bzw. der Gene sind angegeben. Die Nummern in Klammern beziehen sich auf Klon PK15-PERV-B(213). Pfeile markieren den Transkriptionsstartpunkt (cap), die Primerbindestelle (primer binding site, PBS), den Splicedonor (SD) und Spliceakzeptor (SA) sowie das Polyadenylierungssignal (p(A)). PPT, Polypurintrakt.

Beide nativen Klone zeigen hoch konservierte Aminosäuremotive, wie sie für C-Typ Retroviren der Säuger beschrieben worden sind (Akiyoshi *et al.*, 1998; Czauderna *et al.*, 2000; Tabelle 3.4).

Tab. 3.3. Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der PERV LTR, gag, pro/pol und env ORFs.

A: PK15-PERV-A(58) vs 293-PERV-A(42); B: PK15-PERV-B(213) vs 293-PERV-B(33) und 293-PERV-B(43).

A				
Prozent Nukleotid- und Aminosäurehomologie (in Klammern) von PK15-PERV-A(58) Genen (Proteinen)				
Virus	LTR	Gag	Pro/pol	Env
293-PERV-A(42)	63,4	95,4 (95,8)	97,2 (97,4)	98,1 (98,3)
B				
Prozent Nukleotid- und Aminosäurehomologie (in Klammern) von PK15-PERV-B(214) Genen (Proteinen)				
Virus	LTR	Gag	Pro/pol	Env
293-PERV-B(33)	79,9	99,4 (99,2)	99,7 (99,6)	99,6 (99,2)
293-PERV-B(43)	99,0	99,5 (99,4)	99,7 (99,3)	99,6 (99,1)

Homologien wurden mit der Sequenzanalyse Software DNASIS (Hitachi) ermittelt.

Das *pro/pol* Gen von PK15-PERV-B(213) weist im Vergleich zu dem korrespondierenden Gen von Klon PK15-PERV-A(58) zwei zusätzliche Codons auf (nt 5951-5953 und 6234-6236) die für Arginin bzw. Glutamin kodieren. Der Längenunterschied der *env* Gene der

beiden nativen Klone geht in erster Linie auf die klassenspezifischen Unterschiede zurück. Desweiteren wurde eine Insertion von 4 nt in der 5'-nicht-translatierten Region (5'-UTR) von Klon PK15-PERV-A(58) gefunden (nt 787-790).

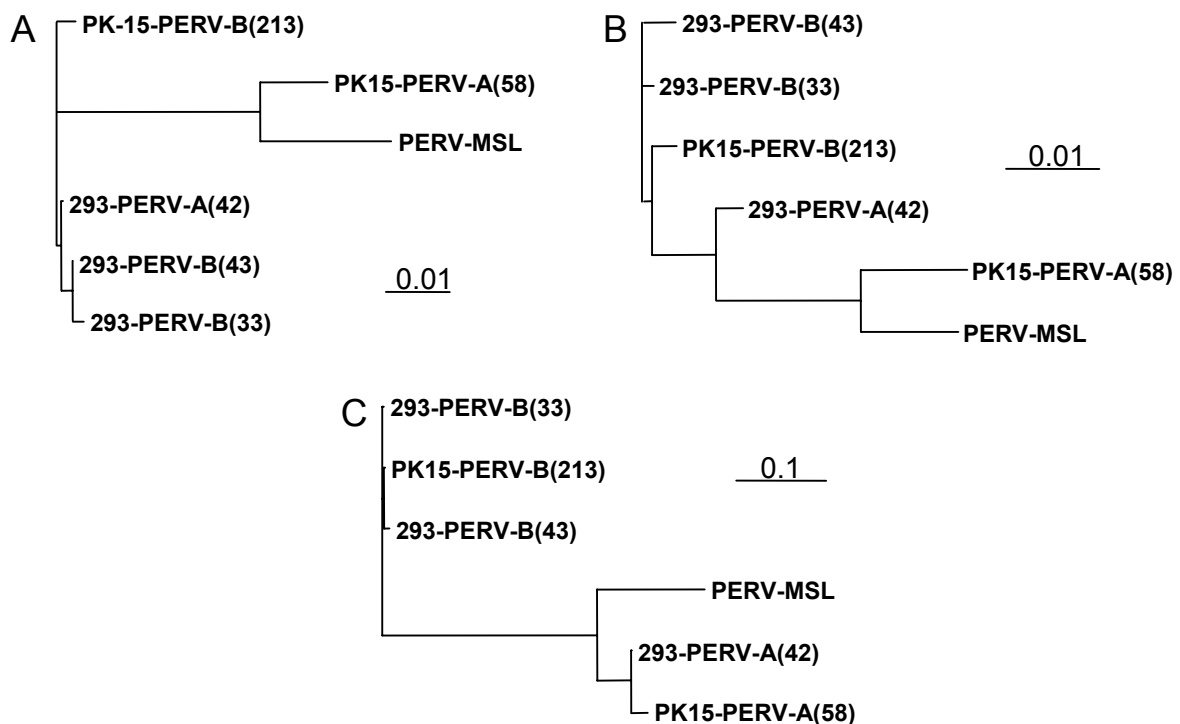


Abb. 3.27. Phylogenetische Verwandtschaft von PERV Proteinen.

Phylogramme basieren auf Vollängen ORFs von Gag (A), Pro/Pol (B) und Env (C) (siehe auch Tab. 3.3). Die Maßstäbe geben relative Distanzen an (0.1 entspricht 10% Divergenz). Phylogramme wurden mit Phylip 3.574c hergestellt (Programme Prodist and Neighbor) (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>).

Phylogenetische Untersuchungen der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von Klon PK15-PERV-A(58) und PK15-PERV-B(213) sowie der korrespondierenden ORFs der zuvor beschriebenen PERV Sequenzen 293-PERV-B(33), 293-PERV-B(43), 293-PERV-A(42) und PERV-MSL (PERV-C) (Akiyoschi *et al.*, 1998; Czauderna *et al.*, 2000; Krach *et al.*, 2001) spiegeln die Verwandtschaft dieser Viren wider (Abb. 3.27). Für Gag wurde eine Gruppierung der aus der 293 Zelle isolierten Klone gefunden, wohingegen das Gag von PK15-PERV-A(58) näher bei PERV-MSL steht als bei PK15-PERV-B(213) (3.27A). Die Pro/Pol Sequenz zeigt eine den PERV Klassen entsprechende Verteilung (3.27B). Der native Klon PK15-PERV-B(213) ist nahe verwandt mit den Klonen 293-PERV-B(33) und 293-PERV-B(43), wie auch der Tabelle 3.3 zu entnehmen ist. Die beiden A Klone zeigen jedoch eine höhere Divergenz für Pro/Pol. Env zeigt die erwartete klassenspezifische Verteilung (LeTissier *et al.*, 1997), wobei die Klasse B Sequenzen einen Ast des Stammbaums bilden (3.27C). Die Klone PK15-PERV-A(58) und 293-PERV-A(42) liegen

dagegen für Env nahe bei PERV-MSL. PERV-MSL zeigt für alle drei ORFs eine generelle Nähe zu PK15-PERV-A(58).

Die Sequenzen der nativen PERV PK15-PERV-A(58) und PK15-PERV-B(213) sind unter den Nr. AJ293656 und AJ293657 in der Genbank abgelegt worden.

3.2.4.3 Genetische Merkmale der PERV LTRs

Im Gegensatz zu der genetischen Struktur der viralen ORFs wurden größere Unterschiede zwischen den LTRs der Klone PK15-PERV-A(58) und PK15-PERV-B(213) gefunden. Eine schematische Darstellung der Struktur der beiden LTRs ist in Abbildung 3.28 wiedergegeben. An die U3 Region der LTR von PK15-PERV-A(58) (nt 1-541) schließt sich die R Region (bis nt 620) und bis zum Ende der LTR (nt 702) die U5 Region an. Die LTR des Klons PK15-PERV-B(213) ist 630 nt lang und weist die gleiche Struktur, mit U3 (nt 1-469), R (bis nt 548) und U5 (bis nt 630), auf. Die LTRs beider proviraler PERV werden durch die invertierte Wiederholungssequenz TGAAAGG/CCTTTCA begrenzt, wie es für die zuvor aus der humanen Zelllinie 293 isolierten PERV Sequenzen beschrieben worden ist (Czauderna *et al.*, 2000). Für den Klon PK15-PERV-B(213) wurde desweiteren in der U3 Region eine Kasette mit 39-bp Wiederholungen gefunden, die jeweils aus einer 21 bp und einer 18 bp Untereinheit bestehen. Die Kasette dieses Klons beinhaltet zwei solcher 39-bp Wiederholungen (nt 331-408) mit einer 5' gelegenen zusätzlichen 18-bp Untereinheit. Die LTR von PK15-PERV-B(213) entspricht somit der LTR des Klons 293-PERV-B(43), wie es auch der Tabelle 3.3 zu entnehmen ist.

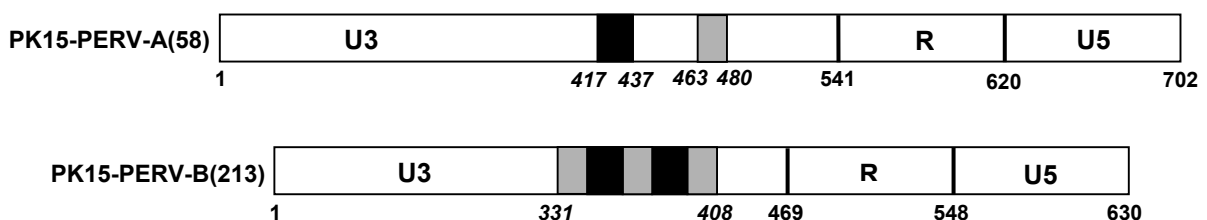


Abb. 3.28. Schematische Struktur der 5'-LTR von PK15-PERV-A(58) und PK15-PERV-B(213).

Die LTRs sind 707 bp (PK15-PERV-A(58)) und 630bp (PK15-PERV-B(213)) lang. Die Wiederholungen, bestehend aus 18-bp und 21-bp Untereinheiten, sind als schwarze bzw. graue Rechtecke dargestellt.

Die LTR von PK15-PERV-A(58) beinhaltet eine 21-bp sowie eine 18-bp Untereinheit, wobei beide, im Vergleich zu den Untereinheiten von PK15-PERV-B(213) einen Nukleotidaustausch aufweisen. Im Gegensatz zu PK15-PERV-B(213) liegen die beiden

Untereinheiten allerdings voneinander getrennt in der U3 Region vor (nt 417-437 und nt 463-480). Der Vergleich dieser LTR mit der LTR des Klasse A Klons 293-PERV-A(42) ergab eine Homologie von 63,4% (Tabelle 3.3).

3.2.4.4 Veränderung der LTR nach Passagierung von PERV in Zellkultur

Eine Untersuchung der proviralen LTRs der PERV Molekularklone 293-PERV-B(33), 293-PERV-B(43) und 293-PERV-A(42) ca. vier Wochen nach Transfektion in humane Zellen ergab, daß die LTRs in der Anzahl der 39-bp Wiederholung variieren (Scheef *et al.*, im Druck). Daher wurde untersucht, ob und in welcher Art die LTR des Klons PK15-PERV-A(58) ebenfalls derartige Veränderungen nach serieller Passagierung des Virusklons in Zellkultur aufweist.

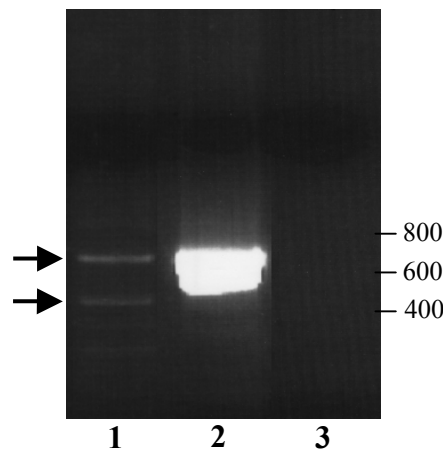


Abb. 3.29. PCR Amplifikation der 5'-LTR des Klons PK15-PERV-A(58) nach serieller Kultivierung auf 293 Zellen.

(1) Amplifikat auf genomischer DNA von transfizierten HeLa Zellen nach serieller Kultivierung; (2) Amplifikat auf Plasmid DNA des Klons PK15-PERV-A(58); (3) Wasserkontrolle. Größen sind in bp angegeben.

PCR Analysen mit Primern spezifisch für die 5'-LTR (PERV-5'-LTR-for vs PERV-PBS-rev) auf genomischer DNA von mit diesem PERV Klon transfizierten HeLa Zellen führten zu zwei Banden, eine bei etwa 730 bp und eine bei ca. 500 bp (Abb. 3.29). Die Subklonierung der Banden und deren anschließende Sequenzierung ergab, daß die höhere Bande der originalen LTR entspricht (siehe Abb. 3.28). Die niedrigere Bande entspricht der LTR von PK15-PERV-A(58), wobei allerdings neben zahlreichen Deletionen in der U3 Region sowohl die 21- als auch die 18-bp Wiederholung fehlen. Die R Region sowie die U5 weisen nur einige Punktmutationen auf. In Abbildung 3.30 sind die Sequenzen der originalen LTR und der LTR, wie sie nach serieller Kultivierung des Klons PK15-PERV-A(58) gefunden wurden, gegenübergestellt.

Tab. 3.4. Hochkonservierte Aminosäuremotive der C-Typ Retroviren der Säuger in den Proviren PK15-PERV-A(58) und PK15-PERV-B(213).

Protein	Konsensussequenz	PERV Sequenz	Nukleotidposition
N-Terminus von Gag	Asn ₁ -Met ₁ -Gly ₂ -Gln ₃ -Thr ₄ ¹	Identisch	1153-1165; 1077-1089
N-Terminus von p30	Prolin ²	Identisch	1735-1737; 1659-1661
C-Terminus von p30	Thr-Lys-X-Leu	Thr-Lys-Ile-Leu ³	2501-2513; 2425-2437
Cys-His Box in p10	Cys-Xaa ₂ -Cys-Xaa ₄ -His-Xaa ₄ -Cys ⁴	Identisch	2630-2672; 2554-2596
Aspartylprotease	Leu-Leu/Val-Asp-Thr-Gly-Ala-Asp-Lys ⁵	Leu-Val-Asp-Thr-Gly-Ala-Glu/Lys-His ⁶	2724-2747; 2800-2823
RNA-abhängige Polymerase (RT)	Tyr-X-Asp-Asp (YXDD) ⁷	Tyr-Val-Aap-Asp (YVDD)	3597-3609; 3521-3533
Spaltstelle gp70/p15E	Arg/Lys-X-Lys-Arg ⁸	Arg-Pro-Lys-Arg	7560-7572; 7478-7490

Die nt Positionen retroviraler Konsensussequenzen sind angegeben für PK15-PERV-A(58) und PERV-B(213).

Fußnoten:

¹Motiv in MoMLV (Shinnick *et al.*, 1981) und PERV-MSL (Akiyoshi *et al.*, 1998); ²(Oroszlan *et al.*, 1981); ³identisch in BaEV, GaLV und KoRV; ⁴(Green *et al.*, 1989; Meric *et al.*, 1989); ⁵(Coffin, 1996); ⁶in PK15-PERV-A(58) ist die siebte Aminosäure ein Lysin; ⁷(Xiong *et al.*, 1990); ⁸(Le Tissier *et al.*, 1997; Akiyoshi *et al.*, 1998). Datenbank Nr. siehe 2.8.20.

Plasmid nach Kultur **1**

TGAAAGGATGAAAATGCAACCTAACTCTCCAGAACCCAGGAAGTTAATAAGAAG
 TGAAAGGATGAAAATGCAACCTAACCTCCAGAACCCAGGAAGTTAATAAAAAG

CTCTAAATGCCCTCGAAATCCAGACCCTGTTCCCT-----ATAGGTAAAAGA
 CTCTAAATGCCCCGAATTCCAGACCCTGCTGGCTGCCAGTAAATAGGTAGAAGG

TCATACTTTTGGCTGTTTTAGGGCTTGCTTTCTGCTCTGTACAAAACCTTGTGGA
 TCACACTTCTATTTGTTCCAGGGCCTGCTATC----CTGGCCTAA-----GT--A

AGGGGAAAAACAGGCCCTGAGTATGTGCCTCTATGCTTGAACTTCTTGAACT
 AG----ATAACAGGA-----A--ATGAG-----TTGA-----

GCTCCTAACTGCTTGTTTGGCTTCTGTAAACCTG-CTTGCATAAGATAAAAAGAG
 ----CTAATCGCTTATCTGGATTCTGTAAAACCTGACTGGCACC--ATA-----

GAGAAGTCAATTGCCTAACGGACCCAGTAAGATCGGGCGTGCCACAAAATGTTG
 --GAAG--AATTG-----GTTA-----CACA-----TTG

AAAATCCTGATAAATATATCTTGGTGACAATATGTCTCCCCACCCAGAGACAGG
 ACAGCCCT----A-----GTGACC-TA--TCTC-----A--ACTG-

CACAAACATGTAACCTCCAGAACAACCTTAAAATTAATTGGTCCACAAAGCGCGGGC
 --CAATC-TGTCACCT-----TG--CC-CA--G--GAGC

TCTCGAAGTTTTGAATTGACTGGTTTGCAGATATTTAAAAATGATTAGTTTGTAA
 CCACGCAGATGCG----GACC----TCCG-----G--AGCTTGTGA

AAGCGCGGGCTTTGTTGTGAACCCCATAAAAGCTGTCCCGACTCCACACTCGGGG
 C-GCACAGGCTTTGTTGTGAACCCCATAAAAGCTGTCCCGATTCCGCACTCGGGG

CCGCAGTCCTCTACCCCTGCGTGGCGTACGACTGTGGGCCCCAGCGCGCTCGGAA
 CCGCGGTCTCTACCCCTGCGTGGTGTACGACTGTGGGCCCCAGCGCGCTTGGAA

TAAAAATCCTCTTGCTGTTTGCATCAAGACCGCTTCTCGTGAGTGATTTGGGGTG
 TAAAAATCCTCTTGCTGTTTGCATCAAGACCGCTTCTTGAGTGATTTGGGGTG

TCGCCTCTTCCGAGTCAGGACGAGAGGGATTTAACTCGACTGGCCTTTCA
 TCGCCTCTTCCGAGCCCGGACGAGGGGGATTTCTTTTACTGGCCTTTCA

542

621

702

Abb. 3.30. Veränderung der LTR von PK15-PERV-A(58) nach serieller Viruskultivierung in Zellkultur.

Sequenzvergleich der plasmidären LTR mit der LTR, wie sie nach Kultur von PK15-PERV-A(58) auf HeLa Zellen gefunden wurde. Die R Region ist hellgrau hinterlegt. Offene Rechtecke markieren die 21-bp und die 18-bp Wiederholung sowie die putative TATA-Box. Zahlen geben das erste nt der U5, das erste nt der R sowie das erste und letzte nt der U3 Region der plasmidären LTR an.

3.2.4.5 Charakterisierung der flankierenden genomischen Sequenzen

Zur Charakterisierung der flankierenden genomischen Sequenzen am Integrationsort der beiden proviralen nativen PERV mußten die Sequenzen derart präpariert werden, daß Fragmente entstanden, die jeweils nur die 5'- oder 3'-LTR mit den angrenzenden genomischen Abschnitten enthielten. Restriktionen von pPK15-PERV-A(58) und pPK15-PERV-B(213) mit dem Enzym *Afl*III, das nur einmal in der Sequenz von PERV und nicht im Vektor schneidet, ergaben ein Bandenmuster, wie es in Abbildung 3.31 gezeigt ist. Eine schematische Darstellung des Ansatzes und der Restriktionsprodukte ist in Abbildung 3.32 wiedergegeben. Da *Afl*III in der Sequenz von pPK15-PERV-A(58) und pPK15-PERV-

B(213) nur an nt Position 6254 bzw. 6181 schneidet und nicht im Vektor, können die 3 kb Fragmente (Abb. 3.31) nur durch eine weitere *Afl*III Schnittstelle etwa 400 nt stromabwärts der 3'-LTR entstanden sein. Diese Fragmente enthalten folglich neben der 3'-LTR auch die 3'-flankierende genomische Sequenz. Die Fragmente bei ca. 24 kb (Abb. 3.31) bestehen neben pBS aus den 5'-flankierenden genomischen Sequenzen der Proviren bis zur *Afl*III Schnittstelle und dem Rest der 3'-flankierenden genomischen Sequenz bis zum Vektor (siehe Abb. 3.32).

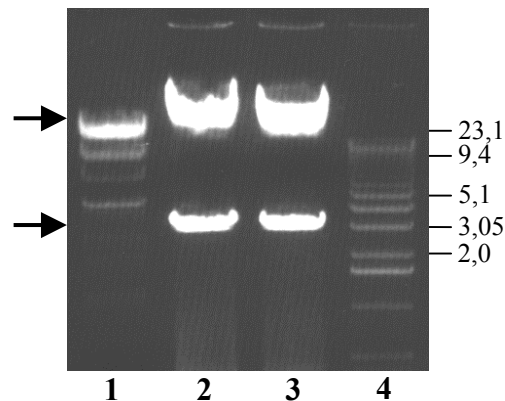


Abb. 3.31. *Afl*III Restriktion von pPK15-PERV-A(58) und pPK15-PERV-B(213).

Die Restriktion der beiden Klone ergab ein Fragment mit ca. 24 kb, das die 5'-LTR sowie die 5'-flankierende genomische Sequenz und pBS enthält, und ein Fragment mit ca. 3 kb, das die 3'-LTR inklusive der 3'-flankierenden genomischen Sequenz enthält (siehe Text). (2) PK15-PERV-A(58), (3) PK15-PERV-B(213); Spuren 1 und 4, Längenstandards λ -*Hind*III und kb-ladder. Größen sind in kb angegeben.

Die Selbstligation der 24 kb Fragmente ergab die Konstrukte pBS/PERV(58)/5'Flanke bzw. pBS/PERV(213)/5'Flanke. Nach dem Auffüllen der Schnittstellen der 3 kb Fragmente wurden sie in den mit *Sma*I restringierten Vektor pVL1392 (Novagen) subkloniert und führten so zu den Konstrukten pVL1392/PERV(58)/3'Flanke bzw. pVL1392/PERV(58)/3'Flanke. Diese Konstrukte wurden verwendet, um die flankierenden genomischen Sequenzen zu bestimmen. Während dieser Ansatz für Klon PK15-PERV-B(213) für beide flankierende Sequenzen erfolgreich war, konnte für Klon PK15-PERV-A(58) nur die 3'-flankierende Sequenz ermittelt werden. Die Sequenzierung der 5'-flankierenden Region ergab, daß die LTR stromaufwärts von nt 103 in den T7 Klonierungsbereich (multiple cloning site, MCS) des λ -Phagen (37 nt, von *Xho*I bis *Not*I) und anschließend in die MCS des Vektors pBlueScript überging (nicht gezeigt). Sie ist somit klonierungsbedingt trunziert.

Die Integration von Retroviren in das Genom der Wirtszelle führt zur Duplikation einer kurzen Sequenz der Integrationsstelle, die zwischen 4-6 bp lang sein kann und als direkte Wiederholungssequenz das Provirus flankiert (Brown, 1997). Für PK15-PERV-B(213)

wurde eine direkte Wiederholungssequenz von vier nt mit der Sequenz 5'-GGAG-3' gefunden. Mit Bezug auf die vier nt umfassende direkte Wiederholung des B Klons ergab sich für den Klon PK15-PERV-A(58), abgeleitet von der 3'-flankierenden Sequenz, die Wiederholungssequenz 5'-GGAT-3'.

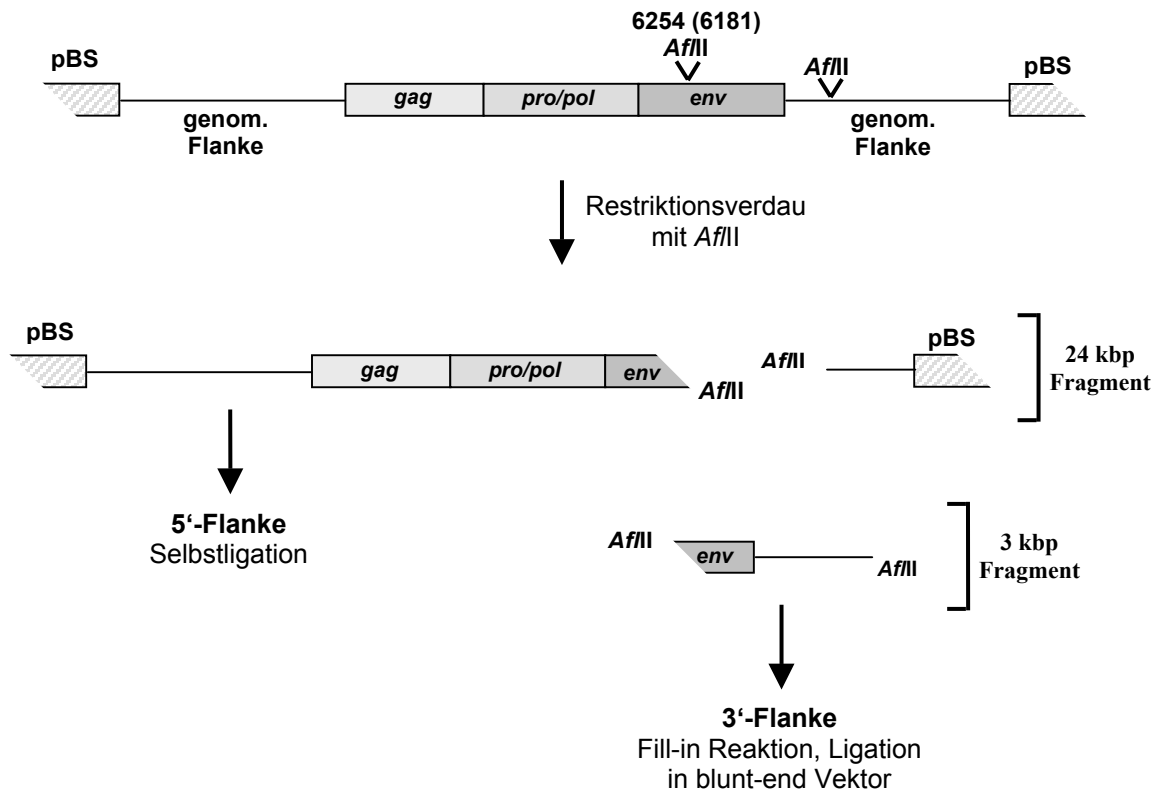


Abb. 3.32. Schematische Darstellung der Analyse der genomischen Flanke von PK15-PERV-A(58) und PK15-PERV-B(213).

Die zirkuläre Struktur der pPK15-PERV-Sequenzen ist hier linear dargestellt. Die Zahl über der *Afl*III Schnittstelle innerhalb der PERV Sequenz gibt die nt Position für PK15-PERV-A(58) (in Klammern für PK15-PERV-B(213)) an. Desweiteren ist die putative *Afl*III Schnittstelle in der 3'-flankierenden genomischen Sequenz angegeben. (Erläuterung siehe Text).

Die Sequenz des 3'-flankierenden Bereichs von Klon PK15-PERV-A(58) ist in der Genbank unter der Nr. AJ291758 sowie die 5'- und 3'-flankierende Sequenz des Klons PK15-PERV-B(213) unter AJ291859 und AJ291860 abgelegt.

Eine vorläufige Analyse der Flankensequenzen ergab für beide Klone Übereinstimmungen mit Sequenzen aus dem Bereich des Schweine-Leukozyten-Antigens (SLA; nicht gezeigt).

3.2.4.6 Integration der nativen PERV in verschiedenen Schweinerassen

Mittels Primerpaaren, die zum einen im *env* von PERV und zum anderen in der 3'-flankierenden genomischen Sequenz binden, erfolgte in einem nested PCR Ansatz eine erste Überprüfung, ob die beiden nativen proviralen PERV in das Genom unterschiedlicher Schweinerassen integriert sind. Dabei wurde für PK15-PERV-A(58) ein semi-nested Ansatz (I. Runde: PK30 vs F13'-out-rev; II. Runde: PK32 vs F13'-out-rev) und für PK15-PERV-B(213) ein nested Ansatz (I. Runde: PK30 vs 213-3'-revII; II. Runde: PK32 vs 213-3'-rev) gewählt. Das Ergebnis dieser PCR auf genomischer DNA eines Miniaturschweins, zwei Mikro Pigs und zwei Deutsche Landrasse Schweinen ist in Abbildung 3.33 dargestellt. In allen untersuchten Schweinen konnten die Proviren PK15-PERV-A(58) und PK15-PERV-B(213) nachgewiesen werden. Die Bande in der Wasserkontrolle der ersten Runde von PK15-PERV-A(58), die in der zweiten Runde positiv ausfiel (Abb. 3.33, Gel I B, Spur 8), ist durch falsches Pipettieren zu erklären. Wenn es sich um eine Kontamination des Wassers mit dem Klon PK15-PERV-A(58) gehandelt hätte, sollte man davon ausgehen, daß die resultierende Bande in der 2. Runde der PCR die Stärke der Signale auf genomischer DNA zeigen würde.

3.2.5 Untersuchung der PERV Expression und Replikation

Im Anschluß an die Analyse der genomischen Struktur der nativen, proviralen Sequenzen wurden Untersuchungen in der Zellkultur durchgeführt, um die Funktionalität der beiden Klone PK15-PERV-A(58) und PK15-PERV-B(213) zu überprüfen.

Versuche, die im Vorfeld dieser Arbeit mit PERV Moleklarklonen aus der humanen Zelllinie 293 PERV-PK durchgeführt wurden (Czauderna *et al.*, 2000) sowie neuere Publikationen (Takeuchi *et al.*, 1998) haben gezeigt, daß verschiedene Zelllinien suszeptibel für die Infektion mit PERV sind. Für die Funktionalitätsuntersuchungen der nativen PERV Klone wurden die Katzenzelllinie PG-4, die Hundezelllinie D17 sowie die beiden humanen Zelllinien HeLa und 293 aus der Liste der suszeptiblen Zelllinien ausgewählt und mit zellfreien Kulturüberständen inkubiert, die von mit PERV DNA transfizierten oder mit PERV infizierten Zellen stammten.

3.2.5.1 Integrationsnachweis nach Infektion mit PERV

Die Integration des viralen Genoms in das Genom der Wirtszelle stellt einen entscheidenden Abschnitt im Lebenszyklus der Retroviren dar. Daher wurde nach Infektion der verschiedenen Zelllinien mit Überständen, die Viruspartikel der Klone PK15-PERV-A(58) bzw. PK15-PERV-B(213) enthielten, überprüft, ob in genomischer DNA die Integration viraler DNA nachgewiesen werden kann. Mit Primern, die spezifisch in der *pro/pol* Region von PERV binden (PK1 vs PK6 und PK2 vs PK5, Czaudern *et al.*, 2000) konnte in allen getesteten Zelllinien das erwartete Amplifikat von 753 bp nachgewiesen werden (Abb. 3.34).

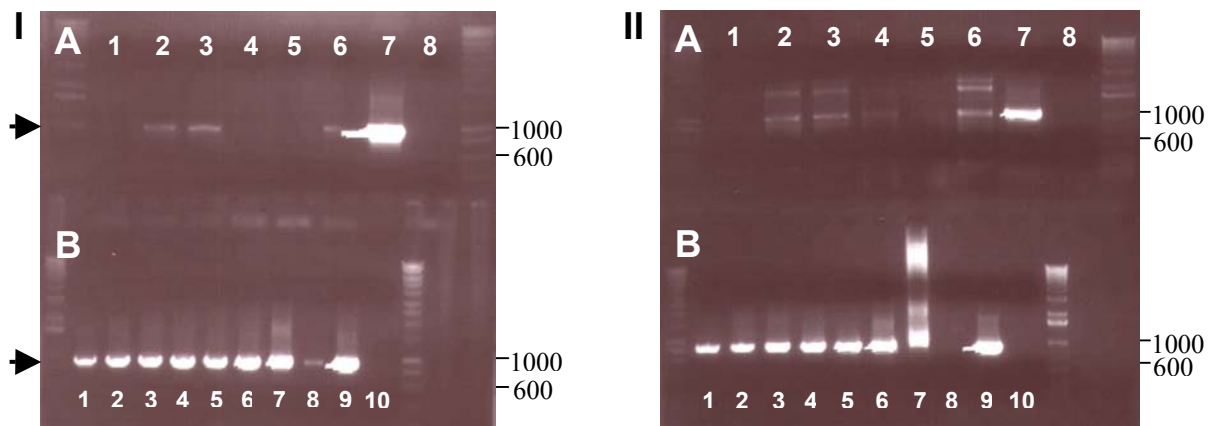


Abb. 3.33. Integration der Proviren PK15-PERV-A(58) und PK15-PERV-B(213) im Genom verschiedener Schweinerassen.

In der nested PCR wurde genomische DNA eines Miniaturschweins (Spur 1), zwei Mikro Pigs (Spuren 2 und 3), zwei Deutsche Landrasse Schweine (Spuren 4 und 5) sowie genomische DNA aus der porcinen Nierenzelllinie PK15 (Spur 6) eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde Plasmid DNA des jeweiligen Klon verwendet (Spur 7). Spur 8, Wasserkontrolle; Spuren 9 und 10, Positiv- und die Wasserkontrolle des nested Ansatzes. I, PK15-PERV-(58); II, PK15-PERV-B(213). A, 1. Runde der PCR; B, 2. Runde der PCR. Pfeile markieren die Amplifikate der beiden Runden mit 1011 bp für beide Klone in der ersten bzw. 965 bp für PK15-PERV-A(58) und 887 bp für PK15-PERV-B(213) in der zweiten Runde. Längenstandards, Smart ladder (Eurogentec), kb-ladder. Längen sind in bp angegeben.

3.2.5.2 Expression von PERV Proteinen nach Infektion

Zur Untersuchung der produktiven Infektion der Zelllinien mit PK15-PERV-A(58) und PK15-PERV-B(213) wurde die Expression viraler Proteine überprüft. Unter Verwendung des Gag p10 Antiserums konnte auf allen getesteten Zelllinien, wenn auch in unterschiedlichen Intensitäten (nicht gezeigt), die Expression des PERV Nukleokapsids nachgewiesen werden. In Abbildung 3.35 ist die indirekte IF-Analyse in mit PK15-PERV-A(58) und PK15-PERV-B(213) infizierten 293 Zellen exemplarisch dargestellt.

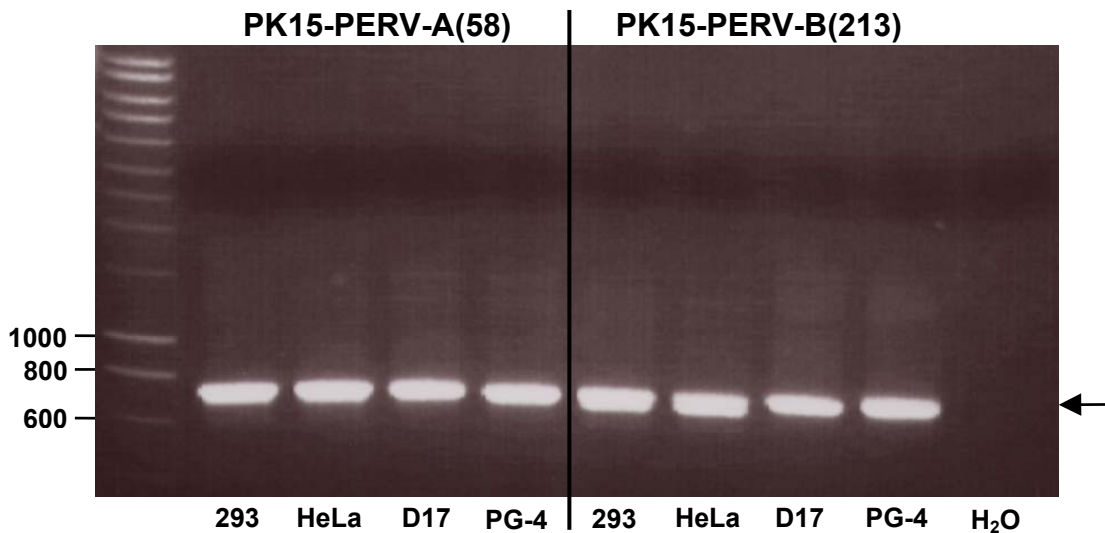


Abb. 3.34. Integrationsnachweis der viralen DNA nach Infektion mit PK15-PERV-A(58) und PK15-PERV-B(213).

Mittels PCR wurde in genomischer DNA ein Fragment der *pro/pol* Region von PERV (753 bp) amplifiziert. Der Pfeil markiert das erwartete Fragment. Längenstandard, Smart ladder (Eurogentec). Längen sind in bp angegeben.

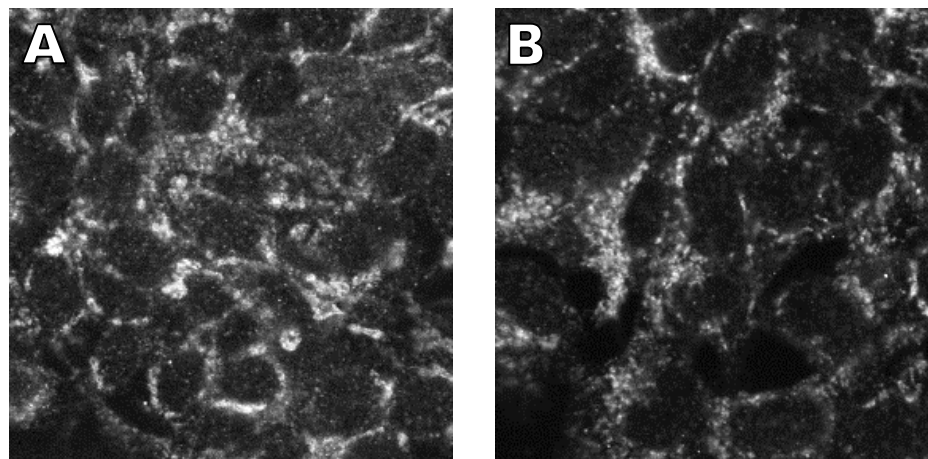


Abb. 3.35. Expression von PERV Gag p10 nach Infektion mit PK15-PERV-A(58) und PK15-PERV-B(213).

293 Zellen wurden mit zellfreiem, PERV-haltigem Überstand transfizierter Zellen infiziert. A: PK15-PERV-A(58), B: PK15-PERV-B(213). Die Inkubation erfolgte mit dem PERV Gag p10 Antiserum. Vergrößerung 400x.

3.2.5.3 Nachweis von RT Aktivität im Überstand infizierter Zellen

Da die Expression von viralen Proteinen nicht direkt korreliert sein muß mit der Virusfreisetzung, wurde die Anwesenheit von infektiösen und replikationskompetenten PERV Partikeln im Überstand der infizierten Zellen überprüft. Für beide nativen Klone konnte der Nachweis von partikelgebundener RT Aktivität erbracht werden (Abb. 3.36).

Zellfreier Kulturüberstand von D17, PG-4, HeLa und 293 Zellen, die mit PERV von 293 bzw. HeLa Zellen, die ihrerseits mit den Moleklarklonen PK15-PERV-A(58) bzw. PK15-PERV-B(213) transfiziert bzw. infiziert worden waren, wurde bis zu 48 Tage p.i. untersucht.

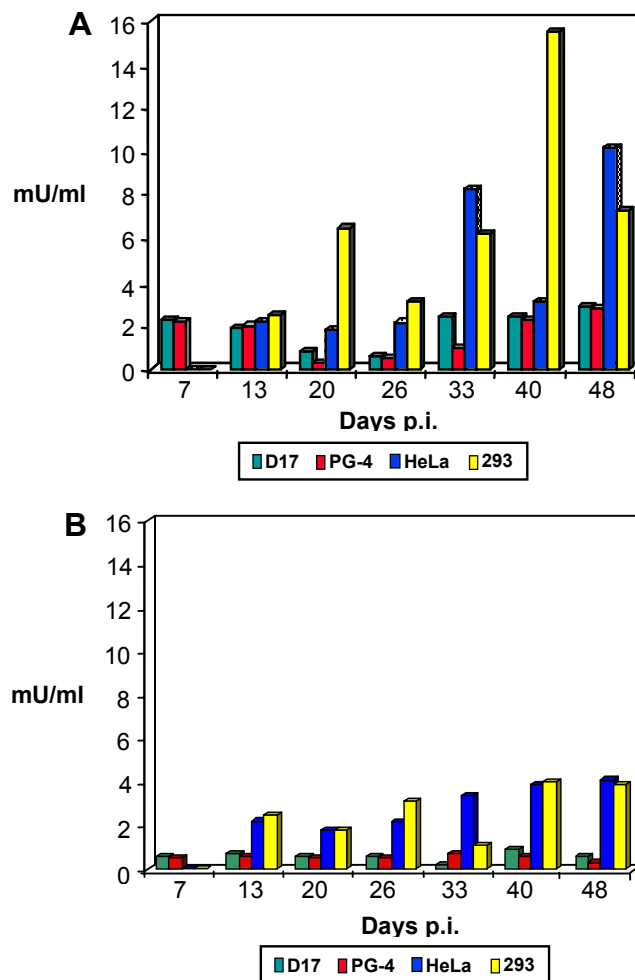


Abb. 3.36. Replikation von PK15-PERV-A(58) und PK15-PERV-B(213).

RT Aktivität in zellfreiem Zellkulturüberstand von mit PK15-PERV-A(58) (A) und PK15-PERV-B(213) (B) infizierten Zellen. Die Zelllinien 293, HeLa, D17 und PG-4 wurden bis zu 48 Tage p.i. untersucht. MoMLV RT wurde als Standard verwendet.

Für den Klon PK15-PERV-A(58) konnten Aktivitäten mit einer Spanne von 2-15 mU/ml auf unterschiedlichen Zelllinien nachgewiesen werden (Abb. 3.36A). Für 293 Zellen, die mit virushaltigem Zellkulturüberstand von mit PERV DNA transfizierten 293 Zellen infiziert worden waren, wurde 40 Tage p.i. ein Wert von 15 mU/ml gemessen. PG-4 und D17 Zellen, die mit dem gleichen virushaltigen Zellkulturüberstand infiziert worden waren, wiesen 48 Tage p.i. Werte von 3 mU/ml auf, wohingegen für HeLa Zellen zu diesem Zeitpunkt eine Aktivität von 10 mU/ml gemessen wurde. Die zur Infektion mit

PK15-PERV-A(58) eingesetzten virushaltigen Zellkulturüberstände zeigten RT-Werte von 1-2 mU/ml (nicht gezeigt).

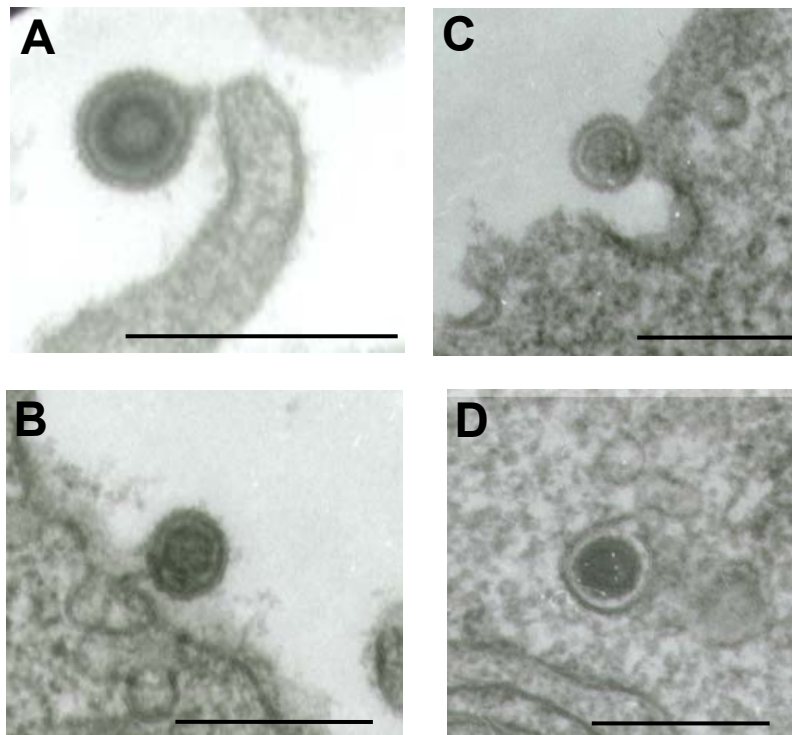


Abb. 3.37. Elektronenmikroskopische Struktur nativer PERV.

Ultradünnschnitte von mit PK15-PERV-A(58) infizierten 293 Zellen. Dargestellt ist ein Partikel während der Freisetzung (A), ein reifes Virus (B) sowie Viren während der Infektion bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose (C) und innerhalb eines Vesikels (D). Maßstäbe entsprechen 400 nm.

Für PK15-PERV-B(213) wurde auf 293 Zellen eine transiente RT Aktivität von bis zu 4 mU/ml am Tag 20 p.i. gemessen (Abb. 3.36B). Die Infektion erfolgte mit virushaltigem Kulturüberstand von HeLa Zellen, die ihrerseits mit Überstand von mit PERV DNA transfizierten 293 Zellen infiziert worden waren. Der Zellkulturüberstand von HeLa Zellen, für die Infektion von 293 Zellen verwendet wurden, wies selbst Werte von 2 bis 4 mU/ml bis Tag 48 p.i. auf. PG-4 und D17 Zellen wurden mit virushaltigem Zellkulturüberstand von mit PERV DNA transfizierten 293 Zellen infiziert, der eine Aktivität von 4 mU/ml zeigte. Für die infizierten PG-4 und D17 Zellen wurden RT-Werte von unter 1 mU/ml gemessen.

3.2.6 Morphologie nativer PERV

Zur Überprüfung, ob die nativen PERV C-Typ Morphologie aufwiesen und zur weiteren Kontrolle, ob Viruspartikel aus mit nativen PERV infizierten Zellen freigesetzt wurden,

wurden TM-EM Aufnahmen angefertigt. In Abbildung 3.37 sind unterschiedliche Stadien der viralen Infektion von 293 Zellen exemplarisch für den Moleklarklon PK15-PERV-A(58) dargestellt. Die Aufnahmen zeigen PERV Partikel mit einem Durchmesser von ca. 110 nm, wie sie zuvor (Czuderna *et al.*, 2000) beschrieben worden sind. Zu erkennen ist ein Partikel während der Freisetzung (Abb. 3.37A), der den noch nicht kollabierten Kern eines unreifen C-Typ Retrovirus zeigt (Frank, 1987), ein reifer Partikel mit elektronendichtem Kern (Abb. 3.37B) sowie ein Virus im Stadium der Rezeptorvermittelten Endozytose (Abb. 3.37C) und ein Virus innerhalb eines Vesikels (Abb. 3.37D).

4. Diskussion

4.1 Immunologische Detektion von PERV

4.1.1 Expression von rekombinanten PERV Proteinen

Das Baculovirus Expressions System (BVES) ist zur Expression einer Vielzahl von heterologen Proteinen verwendet worden, wobei es unter anderem hilfreich bei der Untersuchung von posttranslationalen Modifikationen wie Abspaltung der Signalsequenz, proteolytische Spaltung sowie O- und N-Glykosylierung ist (O'Reilley *et al.*, 1994).

Unter diesen Aspekten und weil es sich um ein eukaryotisches Expressionssystem handelt, wurde das BVES für die Expression des Gag und des Env Proteins von PERV verwendet.

4.1.1.1 Expression von PERV Gag, Env A und Env B

Sowohl für das Konstrukt Bac-PERV-G, das nur die Sequenz des *gag* Gens enthält, als auch für Bac-PERV-GPP, das neben *gag* die Information für die virale Protease beinhaltet, konnte die Expression in Insektenzellen nachgewiesen werden (Abb. 3.1A und B; 3.2A). In der Coomassie G 250 gefärbten SDS-PAGE wurden für Gag zwei Banden mit Größen von 65 und 60 kDa gefunden, wobei nur für die obere Bande in Westernblotanalysen das Vorhandensein des S-Tags nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.2A). Diese Bande entspricht dem Gag Polyprotein. Die Bande bei 60 kDa stellt vermutlich ein Abbauprodukt dar. Die von der Nukleotidsequenz abgeleitete Größe des Gag liegt bei etwa 57 kDa. Das größere Molekulargewicht rührt von den Tag-Sequenzen her (Abb. 3.4), die ca. 7 kDa ausmachen.

Die Überprüfung des Konstruktes Bac-PERV-GPP in der Coomassie G 250 gefärbten SDS-PAGE ergab, daß die virale Protease das Vorläuferprotein so spaltet, wie es für das Gag von MLV beschrieben worden ist (Dickson *et al.*, 1984). Neben dem Gag Polyprotein mit 60 kDa ist ein Intermediat mit ca. 40 kDa, das aus dem Kapsidprotein (30 kDa) und dem Nukleokapsid (10 kDa) besteht, sowie ein Intermediat mit ca. 25 kDa, welches aus dem Matrixprotein (p15) mit 15 kDa und dem pp12 besteht, zu finden (Abb. 3.1B). Aus dem 40 kDa Intermediat wird anschließend das reife Kapsidprotein und das Nukleokapsid freigesetzt (vergleiche 4.1.2.1). Korrespondierende Proteine zu dem für MLV

beschriebenen p15 und pp12 (Dickson *et al.*, 1984) sind in PERV noch nicht nachgewiesen worden. Es lassen sich jedoch proteinspezifische Sequenzmotive, wie sie im p15 von MoMLV zu finden sind (Yuan *et al.*, 2000), im Gag von PERV nachweisen (nicht gezeigt). Wie für Bac-PERV-G konnte auch für die Konstrukte Bac-PERV-E(A) und Bac-PERV-E(B) Expression in Insektenzellen gezeigt werden (Abb. 3.1C und D; Abb. 3.2B und C). In Coomassie G 250 gefärbten SDS-PAGE wurden mehrere Banden gefunden, die mit dem Env Vorläuferprotein oder Spaltprodukten in Verbindung gebracht werden können (Abb. 3.1C und D). Ebenfalls wie für Gag, wurde in einer anschließenden Überprüfung im Westernblot für die Env Konstrukte jeweils nur eine Bande gefunden, die mit dem S-Tag Antikörper reagierte und eine Größe von ca. 72 kDa aufwies (Abb. 3.2B und C). Diese Bande entspricht dem Env Vorläufermolekül, das, abgeleitet von der Nukleotidsequenz, ein Gewicht von etwa 70 kDa aufweist. Wie im Falle von Gag rührt das größere Molekulargewicht von den Tag-Sequenzen her. Es wurde keine Proteinbande, die einer potentiell glykosylierten Form des Env entspricht, wie sie für MLV mit 80 kDa (gp80) (Dickson *et al.*, 1984) und für die Expression des Oberflächenmoleküls von HERV-K in Insektenzellen beschrieben worden ist (Tönjes *et al.*, 1997), gefunden. Bedingt durch die Klonierung des Expressionskonstruktes mit His- und S-Tag Sequenzen stromaufwärts des heterologen Gens (Abb. 3.4), konnte die in der *env* Sequenz enthaltene Signalsequenz keine Bindung an das endoplasmatische Retikulum (ER) vermitteln, so daß eine Glykosylierung nicht stattfand. Mit dem Verbleib des Proteins im Zytoplasma ist auch zu erklären, daß das Env Vorläufermolekül nicht in den Oberflächenanteil (SU) und den transmembranen Anteil (TM) gespalten wird. Hinzu kommt, daß berichtet wurde, daß Insektenzellen für die Serinprotease (Furin), die für die Spaltung des Env im ER verantwortlich gemacht wird, defizient sind (Morikawa *et al.*, 1993; Einfeld, 1996).

4.1.1.2 **Aufreinigung rekombinanter PERV Proteine**

Mit den in den Konstrukten Bac-PERV-G sowie Bac-PERV-E(A) und Bac-PERV-E(B) enthaltenen Tags (Abb. 3.4) sollten die rekombinant exprimierten Proteine zur Immunisierung von Kaninchen isoliert und aufgereinigt werden.

Die Aufreinigung führte, wie in Abb. 3.5 exemplarisch für das Env der Klasse A dargestellt, unter Verwendung der beiden Tags in unterschiedlichen Maßen zur Elution von rekombinantem Protein. Die Überführung dieser Proteine in einen Puffer, der geeignet war,

um Kaninchen zu immunisieren, brachte jedoch den Verlust der Proteine mit sich (nicht gezeigt).

Die Tatsache, daß die Tags sowohl zur immunologischen Detektion (Abb. 3.2 und 3.3) als auch zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine verwendet werden konnten (Abb. 3.5), zeigt, daß sie funktional sind. Die Möglichkeit, daß es sich bei dem Verlust der Proteine während des Umpufferns um ein Mengenproblem handelt, wurde durch größere Expressionsansätze (bis zu 6×10^8 Zellen) ausgeschlossen (nicht gezeigt). Bei der Umpufferung wurde sowohl auf „klassische“ Methoden wie Trichloressigsäure (TCA)-Fällung und Dialyse als auch auf Spin-Columns zurückgegriffen, die jedoch alle, wie oben beschrieben, nicht den gewünschten Erfolg mit sich brachten.

Letztlich kann nicht gesagt werden, warum sich weder das Gag Protein noch das Hüllprotein der beiden Klassen von PERV aufreinigen ließen. Nichtsdestotrotz konnten die Insektenzellen, die die rekombinanten Proteine exprimierten, als Positivkontrolle für die gegen PERV Peptide hergestellten Antiseren eingesetzt werden.

4.1.2 PERV-spezifische Peptidantiseren

In der Literatur wurde die Entwicklung eines Westernblot Assays zum Nachweis von PERV beschrieben, der auf kreuzreaktiven, gegen simiane C-Typ Retroviren gerichteten Antikörpern basiert (Matthews *et al.*, 1999). Das Ziel dieses Teils der vorliegenden Arbeit bestand in der Herstellung von immunologischen Werkzeugen, die spezifisch gegen PERV gerichtet sind und zur Überprüfung von potentiellen PERV-Infektionen vor und nach einer Xenotransplantation verwendet werden können.

4.1.2.1 Antiseren gerichtet gegen PERV Gag und Env

Aus der Überprüfung der gegen PERV Gag gerichteten Peptidantiseren (Tab. 3.1) gingen nur das p30b Antiserum, gerichtet gegen das Kapsidprotein, und das p10 Antiserum, gerichtet gegen das Nukleokapsid von PERV, als funktional hervor. Das Antiserum p30a zeigte ebenfalls Immunreaktion mit PERV Gag, wies allerdings in IF-Analysen eine starke Hintergrundreaktion mit nicht infizierten 293 Zellen auf, so daß keine Unterscheidung zwischen Gag Expression und Kreuzreaktion möglich war (Abb. 3.7E).

Unter Verwendung der Peptidantiseren p30b und p10 konnte mit aufgereinigten PERV Partikeln sowohl das Gag Polyprotein als auch die intermediäre Form und die jeweiligen

Endprodukte der proteolytischen Spaltung des Gag, das Kapsidprotein und das Nukleokapsid, nachgewiesen werden (Abb. 3.9, Spur 1 und 3.10, Spur 2).

Daß das 25 kDa Intermediat, wie es in der Coomassie G 250 gefärbten SDS-PAGE nachzuweisen war (Abb. 3.1B), mit den Gag Peptidantiseren nicht detektiert werden konnte, beruht auf deren Spezifität für das Kapsidprotein bzw. Nukleokapsid, wodurch sich das 40 kDa Intermediat mit beiden Antisern darstellen ließ.

Der Nachweis dieser intermediären Form und des Polyproteins mit dem p10 und p30b Antiserum in der Viruspräparation ist auf unreife Partikel zurückzuführen. Wie für MLV beschrieben, benötigt die Umwandlung von unreifen Viruspartikeln in die reife C-Typ Struktur bis zu 3 h bei 37°C in zellfreiem Medium und ein Teil der freigesetzten Viren machen den Reifungsprozeß nie durch. Untersuchungen von unreifen MLV Partikeln weisen darauf hin, daß sie defizient für die virale Protease sind (Weiss, 1984).

Die Existenz des reifen Kapsidproteins bzw. Nukleokapsids im Lysat von 293 PERV-PK (Abb. 3.9, Spur 3 und Abb. 3.10, Spur 3) legen den Schluß nahe, daß einige Viruspartikel, die von den infizierten Zellen gebildet werden, sich ‚*in status nascendi*‘ befinden, wie es für MLV gezeigt wurde, wo das Gag Polyprotein während des Knospungsprozesses proteolytisch gespalten wird (Weiss, 1984). Daß sich das p40 Intermediat in diesem Lysat weder mit dem p30b noch mit dem p10 Antiserum nachweisen ließ (Abb. 3.9, Spur 3 und 3.10, Spur 3), ist vermutlich auf eine zu geringe Konzentration dieses Proteins zurückzuführen.

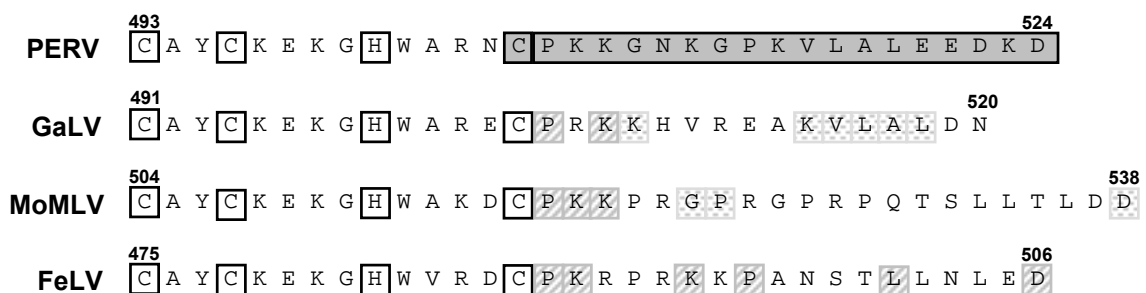


Abb. 4.1. Aminosäurehomologien des Nukleokapsids verschiedener C-Typ Retroviren.

Die Sequenz beginnt mit der Cys-His-Box (angezeigt durch die offenen Rechtecke; siehe Tabelle 3.4). Die grau hinterlegte Box in der Sequenz von PERV p10 markiert das Peptid, das zur Immunisierung verwendet wurde. AS in der Peptidsequenz, die homolog zu anderen Retroviren sind, sind durch Schraffur und Punkte gekennzeichnet. Nummern über der ersten und letzten AS kennzeichnen die Positionen der Sequenzen im jeweiligen Gag Polyprotein. Datenbank Nr. siehe 2.8.20.

Die Spezifität des PERV p10 Antiserums zeigte sich bei der Inkubation von MLV Partikeln (Abb. 3.10, Spur 7), wobei keine Kreuzreaktion gefunden wurde. Eine unspezifische Bande bei etwa 60 kDa ist sowohl im Antiserum als auch im

Präimmenserum zu erkennen. Die in Abb. 4.1 dargestellten Aminosäurehomologien zwischen den Sequenzen von Gag p10 verschiedener C-Typ Retroviren der Säuger verdeutlichen die Unterschiede zwischen den Viren und damit die Spezifität des p10 Antiserums.

Für das p30b Antiserum wurde die Kreuzreaktivität mit MLV in Westernblotanalysen überprüft, wobei ebenfalls keine Immunreaktion gefunden wurde (nicht gezeigt). Die Aminosäurehomologien des Peptids, das zur Immunisierung eingesetzt wurde, zeigt allerdings zwischen verschiedenen C-Typ Retroviren eine hohe Übereinstimmung (Abb. 4.2), so daß eine Kreuzreaktion mit z.B. GaLV oder FeLV nicht ausgeschlossen werden kann.

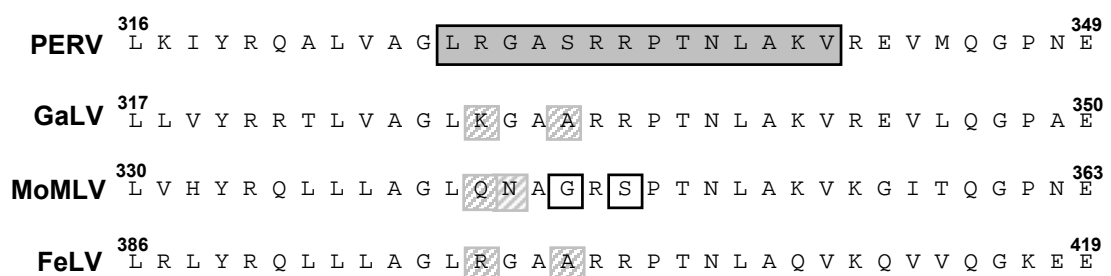


Abb. 4.2. Aminosäurehomologien des Kapsidproteins verschiedener C-Typ Retroviren.

Die grau hinterlegte Box in der Sequenz von PERV markiert das Peptid, das zur Herstellung des p30b Antiserums verwendet wurde. AS, die grau hinterlegt sind kennzeichnen neutrale Austausche, offene Boxen nicht-neutrale Austausche. Nummern über der ersten und letzten AS kennzeichnen die Positionen der Sequenzen im jeweiligen Gag Polyprotein. Datenbank Nr. siehe 2.8.20.

Ebenso wie für die Untersuchung der Kreuzreaktivität wurden mit den Präimmenserum von p30b und p10 keine spezifischen Signale (Abb. 3.9, Spur 4-6; Abb. 3.10, Spur 4-6 und 8) sowie auf nicht infizierten oder nicht transfizierten Zellen, unter Verwendung der Antiserum, nur Hintergrundsignale erhalten (exemplarisch für das p30b Antiserum, Abb. 3.9, Spur 2).

Auch wenn für die Auswahl der zur Immunisierung eingesetzten Peptide der Molekularklon 293-PERV-B(33) verwendet wurde, ist aufgrund der hohen Homologie des *gag* Gens zwischen den beiden Klassen (98%) davon auszugehen, daß auch PERV der Klasse A nachgewiesen werden kann. Desweiteren ist es wahrscheinlich, daß mit den verschiedenen Gag Antiserum ebenfalls der Nachweis der Klasse C möglich ist. In den 18 AS des p10 Peptides finden sich nur zwei Austausche, an Position 10 Lysin zu Arginin und an Position 11 Valin zu Isoleucin, zu PERV-MSL. Der Vergleich des p30 von PERV-B mit der entsprechenden Sequenz von PERV-MSL zeigte in den 259 AS nur einen Austausch

von Methionin in PERV-B (Position 10) zu Threonin in PERV-MSL. Neun weitere Austausche (Positionen 95, 165, 171, 217, 225, 232, 238, 248 und 249) sind neutral.

Die Reaktivität des p10 Antiserums mit porcinem Gewebe wurde auf Gefrierschnitten von Niere, Aortenbogen und Herz durchgeführt. Nieren- und Aortenmaterial wurde gewählt, da PERV erstmals aus der porcinen Nierenzelllinie PK15 isoliert wurde (Armstrong *et al.*, 1971) und für primäre Endothelzellen des Aortenbogens die Freisetzung von PERV Partikeln beschrieben worden ist (Martin *et al.*, 1998). Das Herz wurde stellvertretend für zur Transplantation in Frage kommende Organe ausgewählt. In keinem der untersuchten Gewebe wurden Hinweise auf die Expression von PERV Gag gefunden (Abb. 3.12), weshalb das p30b Antiserum nicht getestet wurde.

Bislang schließen Kulturbedingungen von primären Zellen, die PERV Partikel freisetzen, eine mitogene Stimulierung der Zellen ein (Wilson *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1998; Akiyoshi *et al.*, 1998). Da von anderen endogenen Retroviren wie HERV bekannt ist, daß Proteinexpression an Tumore gekoppelt ist (Boller *et al.*, 1997; Sauter *et al.*, 1995), wohingegen mRNA in einer Vielzahl von gesunden Geweben nachgewiesen werden kann (Medstrand *et al.*, 1993), kann davon ausgegangen werden, daß keine PERV Proteine existieren, auch wenn mRNA in porcinem Gewebe exprimiert wird (Patience *et al.*, 1997, Akiyoshi *et al.*, 1998; Cunningham *et al.*, 1999). Desweiteren scheinen die meisten Transkripte trunkiert zu sein (Cunningham *et al.*, 1999). Auf der anderen Seite deutet die Aktivität der Reversen Transkriptase, die im Serum von hDAF transgenen Schweine gefunden wurde (Cunningham *et al.*, 1999), darauf hin, daß PERV Partikel vorhanden sind. Diese Befunde können allerdings auf individuelle Veränderungen der PERV Expression (Cunningham *et al.*, 1999) oder auf den hochsensitiven, PCR-basierenden RT Assay, der verwendet wurde, zurückzuführen sein.

Das p30b und das p10 Antiserum wurden weiterhin auf ihre Verwendbarkeit in Immunperoxidase Assays und Immunogoldfärbungen hin untersucht, wobei für beide Antiseren spezifische Signale erhalten wurden (Abb. 3.13A, B und Abb. 3.14A, B).

Auch wenn diese Quantifizierung der Sensitivität des p10 Antiserums, wie sie im ELISA durchgeführt wurde (nicht gezeigt), keinen Einfluß auf die potentielle immun-histochemische Verwendung des Antiserums hat, da es keine direkte Korrelation zwischen der nachgewiesenen Proteinmenge und der Anzahl von Virionen gibt, zeigt es dennoch die hohe Sensitivität und Spezifität des p10 Antiserums.

Die Überprüfung der gegen das Hüllprotein von PERV gerichteten Antiseren aus dem Kaninchen und aus Hühnern (Tab. 3.1 und 3.2) ergab, daß nur das EnvB2-2 Antiserum, spezifisch gerichtet gegen den Oberflächenanteil des Env (SU) der Klasse B, und das p15E Antiserum, gerichtet gegen den transmembranen Anteil des Env (TM), funktional waren. Alle anderen Seren zeigten entweder keine Immunreaktion oder waren kreuzreaktiv.

Indirekte IF-Analysen mit PERV freisetzenden humanen Zellen mit den beiden Env Antiseren ergaben randständige Fluoreszenzen, die der zellulären Lokalisation sowohl des SU als auch des TM entsprechen (Abb. 3.16C und 3.21A). Im Gegensatz dazu ist mit infizierten Insektzellen die Fluoreszenz intrazellulär, da das Env Protein, bedingt durch die Konstruktion des Expressionsvektors, nicht in das ER gelangen kann (für α -EnvB2-2 nicht gezeigt; Abb. 3.16A und B; siehe 4.1.1.2). In Westernblotanalysen wurden mit dem p10 Antiserum im Lysat von 293 PERV-PK Zellen (Abb. 3.1.7, Spur 1) Signale sowohl für das Env Vorläufermolekül (gp80), das aus dem glykosylierten SU Anteil (gp70) und dem p15E besteht, als auch für ein Reifungsintermediat des Env Vorläufermoleküls (p90) nachgewiesen. Beide Moleküle sind für MLV und verwandte Viren beschrieben worden (Einfeld, 1996). Die intermediäre Form weist neben N-gebundenen weitere O-gebundene Oligosaccharide auf, die an Aminosäurereste in der prolinreichen Region (PRO Region) des SU Bereiches von Env gekoppelt sind (Einfeld, 1996). Untersuchungen zur Glykosylierung des Hüllproteins von PERV wie sie für das Env von HERV-K beschrieben worden sind (Tönjes *et al.*, 1997) wurden nicht durchgeführt. Es ist allerdings für das Env von MoMLV beschrieben worden, daß das Vorläufermolekül zum Zeitpunkt der Abspaltung des p15E bereits modifiziert vorliegt (Dickson *et al.*, 1984).

Das p15E Antiserum ist gegen die letzten 17 Aminosäuren des Env von PERV gerichtet (Abb. 4.3). Für MLV ist beschrieben worden, daß vom transmembranen Anteil des Env während der Reifung des Viruspartikels durch die virale Protease eine 16 Aminosäure umfassende C-terminale Sequenz, das so genannte R-Peptid (bzw. p2E), abgespalten wird und so das reife p12E (bzw. p15TM) entsteht (Rein *et al.*, 1994; Yang & Compans, 1996). Die Sequenz des p15E von PERV und konservierte Motive in dieser Sequenz sind in Abbildung 4.3 dargestellt.

Rein *et al.* geben für das unreife p15E, das sie prä15E nennen, eine Größe von ca. 20 kDa und für das reife Protein eine Größe von etwa 15 kDa an (Rein *et al.*, 1994). Die Größe dieses prä15E stimmt mit der in Westernblots erhaltenen Größe des TM des PERV Env überein (Abb. 3.17, Spur 1). Korrespondierend wurde für das prä15E von MLV ein Molekulargewicht von 22 kDa berechnet (Dickson *et al.*, 1984). Die etwas niedriger

(nicht gezeigt). Vergleiche der R-Peptide zwischen Vertretern der C-Typ Retroviren der Säuger ergaben nur geringe Homologien (ca. 68%). Von den 16 Aminosäuren des R-Peptids in MoMLV (Fielding *et al.*, 2000) stimmen nur sechs mit dem 17 Aminosäuren langen R-Peptid in PERV überein (Abb. 4.4), was die Spezifität des p15E Antiserums für PERV vermuten ließ.

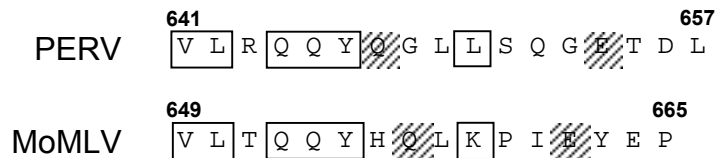


Abb. 4.4. Homologie zwischen dem R-Peptid von PERV und MoMLV.

Verglichen wurde das putative R-Peptid von 293-PERV-B(33)/ATG und von MoMLV. Homologien sind durch offene und schraffierte Rechtecke gekennzeichnet. Nummern über der ersten und letzten AS geben die Position im jeweiligen Protein an. Datenbank Nr. siehe 2.8.20.

Untersuchungen hinsichtlich der Funktionalität des p15E Antiserums in Immunperoxidase Assays (Abb. 3.18) und auf Immunogoldfärbungen (Abb. 3.19) ergaben positive Reaktionen wie für die PERV Gag Antiseren beschrieben.

Von den in Hühnern hergestellten Antiseren gegen den SU Anteil der zwei PERV Klassen A und B zeigte nur das Antiserum EnvB2-2 dahingehend Funktionalität und Spezifität, daß ausschließlich Env der Klasse B detektiert wurde.

In Westernblotanalysen mit dem EnvB2-2 Antiserum mit Lysat von humanen Zellen, die mit dem Klasse B Klon 293-PERV-B(33)/ATG transfiziert waren (Abb. 3.20, Spur 6), konnten Signale für das Env Vorläufermolekül (gp80), wie es auch mit dem p15E Antiserum nachgewiesen wurde (Abb. 3.17, Spur 1), und das SU (gp70) detektiert werden. Davon ausgehend, daß, wie für MLV beschrieben (Dickson *et al.*, 1984), Zuckerreste am SU etwa 30% des Gewichtes ausmachen und der Aminosäurekern des Moleküls etwa 50 kDa ausmacht, ergibt sich entsprechend der Bande im Westernblot für den SU Anteil von PERV ein Molekulargewicht von etwa 71 kDa. Die Tatsache, daß sich beide Banden, die des Vorläufers und die des reifen Env Moleküls, auch in aufgereinigten Viruspartikeln detektieren ließen (Abb. 3.20, Spur 4), kann nur damit erklärt werden, daß nicht gespaltene Env Moleküle, die beide Env Komponenten noch enthalten, in virale Partikel eingebaut wurden. Die Spaltung des Env erfolgt durch eine oder mehrere zelluläre Proteasen im ER. Für die Konsensussequenz der Spaltstelle zwischen SU und TM (siehe Tab. 3.4) konnte gezeigt werden, daß bereits Mutationen an einer Position eine eingeschränkte Spaltung zur Folge haben. Hinzu kommt, daß es vermutlich subtile Unterschiede zwischen Proteasen

aus unterschiedlichen Spezies und Zellarten gibt (Einfeld, 1996), so daß es nicht unwahrscheinlich ist, daß ein Teil der PERV Env Moleküle, die von humanen 293 PERV-PK Zellen freigesetzt werden, keine Spaltung des gp80 in das gp70 und p15E durchlaufen. Da sich das gp80 nicht mit dem p15E Antiserum in aufgereinigten Viren nachweisen ließ (Abb. 3.17, Spur 3), muß allerdings von den nicht gespaltenen Env Molekülen zumindest das R-Peptid abgespalten worden sein.

Daß sich mit dem EnvB2-2 Antiserum das Reifungsintermediat (p90) nicht nachweisen ließ, ist vermutlich durch sterische Behinderungen bedingt, da die Sequenz des EnvB2-2 Peptids mit der PRO Region des SU (Battini *et al.*, 1995; Le Tissier *et al.*, 1997) überlappt. Glykosylierungen dieses Bereichs wie sie in dem Reifungsintermediat auftreten (Einfeld, 1996) können daher die Bindung durch das EnvB2-2 Antiserum verhindern. Das reife gp70 sowie das gp80 sind im PRO Bereich nicht glykosyliert. Die Bindung des p90 durch das p15E Antiserum ist möglich, da der TM Anteil, wie für MLV beschrieben (Einfeld, 1996), nicht glykosyliert wird.

Mit dem EnvB2-2 Antiserum konnten keine Signale im Lysat von HeLa Zellen detektiert werden, die mit dem Molekularklon Klasse A, 293-PERV-A(42) (Czuderna *et al.*, 2000; Krach *et al.*, 2001) transfiziert waren, was auf die Spezifität des Antiserums hinweist. In Übereinstimmung dazu ergab das EnvB2-2 Antiserum keine Signale auf MLV-haltigem Überstand. Die Spezifität für Env B konnte auch in indirekten IF-Analysen gezeigt werden, wobei nur auf 293 Zellen, die mit dem Klasse B Molekularklon 293-PERV-B(33)/ATG transfiziert wurden, Signale erhalten wurden (Abb. 3.21A). Das EnvB2-2 Antiserum wurde nicht auf seine Funktionalität in IPAP oder Immunogoldfärbungen getestet.

4.1.3 Anwendung von PERV-spezifischen Peptidantiseren

Neuere Publikationen zeigen, daß in allen klinischen Xenotransplantationen, die bislang, basierend auf zellulären Produkten oder *ex vivo* Perfusionen durchgeführt wurden, kein Hinweis auf eine Infektion mit PERV gefunden wurde (Heneine *et al.*, 1998; Paradis *et al.*, 1999; Patience *et al.*, 1998). Langzeittransplantationen von ganzen, vaskularisierten Organen sind bisher allerdings nicht beschrieben worden (Birmingham, 1999), so daß die Konsequenzen einer potentiellen PERV Expression über einen längeren Zeitraum in immunsupprimierten Patienten nicht bekannt sind.

Auch wenn die in diesem Teil der Arbeit präsentierten immunologischen Methoden unter Verwendung von PERV-spezifischen Peptidantiseren nicht so sensitiv sind wie z.B. die

PCR, ermöglichen sie doch die Unterscheidung zwischen viraler Infektion und der Expression von viralen Proteinen durch infizierte Zellen. Auch wenn die Expression von viralen Proteinen nicht immer bedeutet, daß Viruspartikel freigesetzt werden, können mit den Antiseren Routineüberprüfungen von Xenotransplantaten vor und nach einer Transplantation durchgeführt werden, insbesondere dann, wenn PERV nicht in normalen porcinen Geweben exprimiert wird (Abb. 3.12).

4.2 Molekulare Charakterisierung nativer PERV

Jüngere Berichte über provirale, replikationskompetente Vollängen PERV Sequenzen, isoliert aus der humanen Zelllinie 293 PERV-PK (Czauderna *et al.*, 2000) in Verbindung mit der Charakterisierung einer PERV-C cDNA Sequenz (PERV-MSL; Akiyoshi *et al.*, 1998) belegen, daß das porcine Genom intakte Proviren enthält, wie es für viele andere Spezies einschließlich des Menschen beschrieben worden ist (Tönjes *et al.*, 1999).

Die Durchmusterung der PK15- λ -Phagen Bibliothek führte letztendlich zur Isolierung von drei nativen, aus dem porcinen Genom stammenden Klasse A Klonen, pPK15-PERV-A(42), pPK15-PERV-A(45) sowie pPK15-PERV-A(58), und einem Klasse B Klon, pPK15-PERV-B(213).

4.2.1 Überprüfung der nativen PERV-A Klone

Für die drei Klone der Klasse A konnte durch Restriktionsanalysen, partielle Sequenzierungen und Überprüfung der Integrationsstelle (Abb. 3.25A und B, nicht gezeigt und Abb. 3.25C) gezeigt werden, daß sie identisch sind. Daß die Bandenmuster der Restriktionen der drei Klone mit *EcoRI* und *HindIII* (Abb. 3.25A und B) nicht identisch sind, kann mit einer nicht vollständigen Restriktion erklärt werden. Eine weitere Möglichkeit ergibt sich durch das vorläufige Ergebnis, daß sowohl der provirale Klon PK15-PERV-A(58) -und somit auch die beiden weiteren A Klone- als auch der Klon PK15-PERV-B(213) in der Region des SLA lokalisiert sind. Die voneinander abweichenden Bandenmuster bei der Restriktion können dann mit dem Auftreten allelischer Varianten und folglich mit Unterschieden in der Verteilung der Restriktionsschnittstellen erklärt werden. Die Charakterisierung der proviralen Struktur und der Replikationskompetenz wurde aufgrund der Übereinstimmung der Klone nur mit dem PK15-PERV-A(58) durchgeführt.

4.2.2 Struktur der nativen PERV Sequenzen

Die beiden aus der porcinen Nierenzelllinie isolierten PERV Sequenzen PK15-PERV-A(58) und PK15-PERV-B(213) zeigen die gleiche provirale Struktur wie die zuvor beschriebenen Klone 293-PERV-B(33), 293-PERV-B(43) und 293-PERV-A(42) (Czuderna *et al.*, 2000; Krach *et al.*, 2001). PK15-PERV-B(213) zeigt nur im geringen Umfang Aminosäureaustausche zu diesen „humanisierten“, aus der mit PERV infizierten humanen Zelllinie 293 isolierten Klonen (Tab. 3.3B, Abb. 3.27), wobei diese Austausche über die gesamte Sequenz der einzelnen viralen Proteine verteilt sind (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu zeigt der Klon PK15-PERV-A(58) in einem größeren Maße Aminosäureaustausche zu dem humanisierten Klasse A Klon 293-PERV-A(42) (Tab. 3.3A, Abb. 3.27). Diese Unterschiede sind für Gag und Pro/Pol ebenfalls über die gesamte Sequenz der Proteine verteilt (nicht gezeigt). Für das Env zeigt sich jedoch eine Häufung im Bereich des TM wobei die meisten der Aminosäureaustausche neutral sind. Der mögliche Einfluß der nicht-neutralen Austausche auf das replikative Potential von PK15-PERV-A(58) bleibt noch zu untersuchen.

Die Polymorphismen, die in PK15-PERV-A(58) und PK15-PERV-B(213) gefunden werden, haben weder Einfluß auf hochkonservierte Motive im Bereich des *pro/pol* Gens der C-Typ Retroviren der Säuger (Tab. 3.4) noch, im Fall des Klons PK15-PERV-A(58), auf die Bereiche im *env* Gen, die für die Bestimmung des Wirtszellspektrums wichtig sind (VRA, VRB und PRO; Le Tissier *et al.*, 1997).

Wie für andere C-Typ Retroviren (MoMLV und GaLV) bestimmt wurde (Fielding *et al.*, 2000), stellt das C-terminale Ende des Env Proteins der Klone PK15-PERV-A(58) (nt 8114-8149) und PK15-PERV-B(213) (nt 8032-8082) das putative R-Peptid dar (siehe auch 4.1.2.1). Gegenüber MoMLV und GaLV, deren R-Peptid 16 Aminosäuren umfasst (Januszski *et al.*, 1997, Fielding *et al.*, 2000), weist die Sequenz des putativen R-Peptids in PK15-PERV-B(213) sowie in den Klonen 293-PERV-B(33), 293-PERV-B(43) und 293-PERV-A(42) eine Länge von 17 Aminosäuren auf. Die entsprechende Sequenz in PK15-PERV-A(58) umfasst 11 Aminosäuren. Studien mit verkürzten Formen des R-Peptides von MoMLV haben ergeben, daß bis zu sieben Aminosäuren vom C-Terminus entfernt werden können, ohne die fusogene Aktivität des Env zu erhöhen (Yang & Compans, 1996). Da im Falle von PK15-PERV-A(58) eine Verkürzung des putativen R-Peptides von sechs Aminosäuren gefunden wurde, konnte keine Tendenz zur Fusion in den Zellen, die mit diesem Virus infiziert waren, nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Aufgrund der hohen Homologie zwischen PK15-PERV-B(213) und dem zuvor beschriebenen Klon 293-PERV-B(43) (Czuderna *et al.*, 2000; Tab. 3.3) scheint es möglich, daß PK15-PERV-B(213) den „porcinen Vorfahren“ von 293-PERV-B(43), der aus der humanen Zelllinie 293 isoliert wurde, darstellt. Dieser Klon weist jedoch in der 3'-UTR, zwischen der LTR und dem *gag* Gen, eine 12 bp Deletion auf (nt 753-764 in PK15-PERV-B(213)), die Einfluß auf die Infektiösität des Virus haben kann. Desweiteren stellt die serielle Passagierung auf humanen Zellen eine Selektion für Viren dar, die ein höheres Infektionspotential für diese Zellen besitzen (Takeuchi *et al.*, 1998). Daher ist anzunehmen, daß PK15-PERV-B(213) andere Eigenschaften als der Klon 293-PERV-B(43) aufweist. Das letztgenannte Virus resultierte aus Co-Kultivierungsversuchen mit PK15 und 293 Zellen (Patience *et al.*, 1997) und ist geraume Zeit in Kultur, so daß Rekombinations- und Adaptationsprozesse nicht ausgeschlossen werden können.

Für den Klon PK15-PERV-A(58) wurde bislang, im Gegensatz zu PK15-PERV-B(213), keine vergleichbare Sequenz aus der Zelllinie 293 PERV-PK beschrieben.

Die Unterschiede in den Genen zwischen den nativen und humanisierten PERV Klonen, wie sie in Tabelle 3.3A und B deutlich werden, finden sich auch in den LTRs wieder (Tab. 3.3A und B, Abb. 3.28).

Die U3 Region der LTR von PK15-PERV-B(213) sowie die der zuvor beschriebenen PERV (Czuderna *et al.*, 2000; Krach *et al.*, 2001) beinhalten eine unterschiedliche Anzahl einer 39-bp Kasette, die aus zwei Untereinheiten (21 bp und 18 bp) besteht. Der Klon PK15-PERV-B(213) trägt zwei dieser Kassetten. Wenn man die zuvor beschriebenen PERV Sequenzen und den nativen Klasse B Klon PK15-PERV-B(213) betrachtet, scheinen diese Kassetten Variationen eines Themas zu sein. Im Gegensatz zu dieser Kassettenstruktur liegen die beiden Untereinheiten im nativen Klasse A Klon PK15-PERV-A(58) getrennt voneinander in der U3 vor (Abb. 3.28), wobei jede Untereinheit zwei Nukleotidaustausche trägt. Untersuchungen legen den Schluß nahe, daß es einen direkten Zusammenhang zwischen der Anzahl der Kassetten in der U3 Region und der transkriptionellen Aktivität der LTRs gibt (Scheef *et al.*, im Druck), so daß davon auszugehen ist, daß die Teilung der Kasette in PK15-PERV-A(58) einen Einfluß auf die transkriptionelle Aktivität der LTR und damit auf die replikative Kapazität dieses Klons hat.

Zellkulturstudien mit den aus der humanen Zelllinie 293 isolierten PERV Klonen haben gezeigt, daß die Anzahl der Kassetten während der Kultur fluktuiert. Untersuchungen, ob auch die LTR des Klons PK15-PERV-A(58) während der Passagierung Veränderungen

aufweist oder die 21- bzw. 18-bp Wiederholungen zu der beschriebenen Kassettenstruktur führen können, ergaben eine LTR, die neben Deletionen in der U3 auch die Untereinheiten der Kasette fast vollständig verloren hat (Abb. 3.30). Der Einfluß dieser Veränderung auf die Aktivität der LTR bleibt zu bestimmen.

Die LTR von PK15-PERV-B(213) entspricht der zuvor beschriebenen LTR des Klon 293-PERV-B(43) (Tab. 3.3B). Die Tatsache, daß es für den humanisierten Klon eine nahezu identische LTR im porcinen Genom gibt, legt den Schluß nahe, daß diese LTR mit zwei 39-bp Kassetten kein Adaptationsprodukt an einen neuen Wirt darstellt, sondern eine originale, native Sequenz.

PCR Analysen auf genomischer DNA der Zelllinie PK15 haben ergeben, daß eine LTR, die dem Klon 293-PERV-B(33) mit vier dieser Kassetten entspricht, existiert (Krach *et al.*, 2001). Interessanterweise wurde keine LTR gefunden, die der des Klon 293-PERV-A(42) mit drei Kassetten entspricht (Czauderna *et al.*, 2000; Krach *et al.*, 2001). Es kann daher davon ausgegangen werden, daß der Klon 293-PERV-A(42) das Produkt einer Rekombination darstellt, da es unwahrscheinlich ist, daß dieser Klon sich von dem nativen Klon PK15-PERV-A(58) ableitet, wenn man die Unterschiede zwischen diesen Klonen betrachtet (Tab. 3.3A). Diesem Rekombinationsereignis steht gegenüber, daß aus einer porcinen Genombibliothek, die in künstlichen Bakterienchromosomen (bacterial artificial chromosom, BAC) kloniert wurde, eine LTR, die der des Klon 293-PERV-A(42) entspricht, isoliert wurde (Niebert *et al.*, in Vorbereitung).

Daß aus der PK15 Phagenbank kein nativer Klon isoliert wurde, der die LTR des humanisierten Klon 293-PERV-B(33) trägt, ist vermutlich mit dem Ansatz der Suche nach offenen Leserahmen verbunden, da der Klon 293-PERV-B(33) durch eine Mutation kein Startcodon für das *env* Gen trägt (Czauderna *et al.*, 2000).

4.2.3 Stammbaumanalysen verschiedener PERV Sequenzen

Ein Vergleich der Proteine von unterschiedlichen PERV, wobei auf die Klone aus der humanen Zelllinie 293 (Czauderna *et al.*, 2000; Krach *et al.*, 2001), einen PERV-C cDNA Klon aus dem Miniaturschwein (PERV-MSL; Akiyoshi *et al.*, 1998) sowie auf die beiden hier beschriebenen nativen PERV Sequenzen zurückgegriffen wurde, ergab unterschiedliche Einordnungen von individuellen Klonen in phylogenetischen Analysen (Abb. 3.27). Für Gag wurde eine Gruppierung der humanisierten Klone gefunden, wohingegen die nativen Klone sowie PERV-MSL auf unterschiedlichen Ästen lokalisiert

sind (Abb. 3.27A). Es scheint, als ob die serielle Passage von PERV auf humanen Zellen (Patience *et al.*, 1997; Czauderna *et al.*, 2000) einen speziellen Typ von Gag bevorzugt hat, oder umgekehrt, daß ein spezielles Gag Protein einen Vorteil für die produktive Infektion von humanen Zellen darstellt. Hinsichtlich der klassenspezifischen Stellung, besonders der Klasse B Klone, kann auf Basis der Pro/Pol Sequenzen spekuliert werden, daß verschiedene PERV-B Klone von einem Ur-Provirus abstammen (Abb. 3.27B). Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, daß die Env Sequenzen der humanisierten Klasse B Klone und des nativen Klasse B Klons phylogenetisch sehr nahe verwandt sind (Abb. 3.27C).

Wie in Tab. 3.3A dargestellt, zeigt der native A Klon insgesamt eine niedrigere Homologie zum humanisierten Klasse A Klon, die sich auch im phylogenetischen Abstand von Gag und Pro/Pol (Abb. 3.27A und B) zeigt. PK15-PERV-A(58) ist, mit Ausnahme des *env* (69,3%), näher verwandt zu PERV-MSL (*gag*, 97,6%, *pro/pol*, 97,5%). Im *env* spiegelt sich die klassenspezifische Zuordnung wider. (Abb. 3.27C). Es scheint, als ob PK15-PERV-A(58) eine Gruppe mit PERV-MSL bildet, die von der *env* Sequenz unabhängig ist. Bei einem Vergleich der Env Sequenzen aller Klasse A und B Klone (nicht gezeigt), zeigte PERV-MSL Deletionen in den putativen variablen Regionen (VRA und VRB), was vermuten läßt, daß die PERV-C Sequenz sich aus einem Klasse A PERV entwickelt hat, der hohe Homologien zu dem Klon PK15-PERV-A(58) aufweist.

4.2.4 Flankierende genomische Sequenzen der nativen PERV Klone

Mit dem gewählten Ansatz, PERV mittels Restriktion zu teilen, so daß die beiden LTRs inklusive der jeweiligen flankierenden genomischen Sequenzen solitär subkloniert werden konnten (Abb. 3.32), war es möglich, beide flankierenden Sequenzen des Klons PK15-PERV-B(213) zu charakterisieren. Für den Klon PK15-PERV-A(58) war dies nur für die 3'-flankierende Sequenz möglich. Die Sequenzierung der 5'-genomischen Flanke dieses Klons ergab, daß etwa die ersten 100 Nukleotide der LTR fehlen und die Sequenz stromaufwärts des LTR Fragments unmittelbar in die Sequenz der Klonierungsvektoren (λ -Phage und pBlueScript) übergeht. Dies ist damit zu erklären, daß der initiale Partialverdau des PK15 Genoms mit *Sau3AI* in der 5'-LTR (nt Position 101) von PK15-PERV-A(58) geschnitten hat. Die Klonierung in die *XhoI* Schnittstelle des λ -Phagen und die anschließende Subklonierung in die *NotI* Restriktionsschnittstelle von pBlueScript ergaben die oben beschriebene Anordnung.

Die Frage, ob PK15-PERV-A(58) auch mit einer trunkierten 5'-LTR im Genom der Zelllinie PK15 vorliegt, kann nicht beantwortet werden. Die Auswirkungen einer derartigen Verkürzung, von putativen, noch zu klärenden Einflüssen auf die Promotoraktivität abgesehen, sind relativ gering, da nach einer Aktivierung des Virus innerhalb der sich anschließenden reversen Transkription die U3 Region der 5'-LTR wieder komplettiert wird. Daß die 5'-LTR von pPK15-PERV-A(58) in einen funktionalen Zustand versetzt werden kann, zeigte sich in den Zellkulturuntersuchungen. Mit von transfizierten Zellen stammenden, PERV-haltigen Überständen konnten Zellen infiziert werden, in denen sich anschließend die Integration von PERV im Genom, wozu eine intakte 5'- und 3'-LTR nötig ist, nachweisen ließ (Abb. 3.34).

Die Tatsache, daß sich auf pPK15-PERV-A(58) via PCR die komplette 5'-LTR amplifizieren ließ, kann nur mit einem PCR-Artefakt erklärt werden (nicht gezeigt), wobei Amplifikate der 3'-LTR, erzeugt mit dem Vorwärts-Primer, mit Amplifikaten der 5'-LTR, erzeugt mit dem Primer, der im Bereich der PBS revers bindet, hybridisieren und somit eine komplette LTR erzeugen. Unterstützt wird diese Theorie durch Untersuchungen auf den getrennten Flanken des Klons pPK15-PERV-A(58), wobei sowohl auf dem Konstrukt pBS/PERV(58)/5'Flanke als auch auf pVL1392/PERV(58)/3'Flanke mit dem 5'-LTR Primerpaar kein Amplifikat erhalten wurde (nicht gezeigt). Hinzu kommt, daß bei nicht vollständigen *Afl*III-Restriktionen von pPK15-PERV-A(58), die noch teilweise die 3'-flankierende Sequenz enthielten, das PCR Amplifikat für die 5'-LTR deutlich schwächer ausfiel als auf pPK15-PERV-A(58) (nicht gezeigt).

Die Integration von Retroviren in das Genom der Wirtszelle führt zu einer Duplikation der Sequenz an der Integrationsstelle. Die Länge der direkten Wiederholung, die zwischen vier und sechs Nukleotiden lang sein kann, wird vom Virus bestimmt und beträgt zum Beispiel bei HIV fünf Nukleotide (Brown, 1997). Für PERV konnte eine direkte Wiederholungssequenz von vier Nukleotiden bestimmt werden.

Mit den charakterisierten Sequenzen für die 3'-flankierenden Bereiche der beiden nativen Klone konnten verschiedene Schweinerassen auf PERV-Integration hin überprüft werden, wobei sich sowohl in Miniaturschweinen als auch in Deutsche Landrasse Schweinen und Mikro Pigs beide Proviren detektieren ließen. Dies kann als Indiz für eine relativ homogene Verteilung dieser Klone innerhalb unterschiedlicher Rassen des Schweines gewertet werden.

Die Tatsache, daß erste Untersuchungen zur Lokalisation der beiden Klone im porcinen Genom darauf hinweisen, daß sie im Bereich des SLA (dem porcinen Analogon zum HLA)

integriert sind, hat Einfluß auf die potentielle Durchführbarkeit, PERV-freie Schweine durch Züchtung herzustellen. Auf der anderen Seite ergibt sich aus der Verfügbarkeit von flankierenden genomischen Sequenzen die Möglichkeit mittels der hier vorgestellten PCR-Diagnostik, nach Schweinen zu suchen, die diese Integrationen nicht aufweisen.

4.2.5 Infektiösität nativer PERV

Für die beiden Klone PK15-PERV-A(58) und PK15-PERV-B(213) konnte die Fähigkeit, verschiedene Zelllinien zu infizieren, nachgewiesen werden. Zum einen war es möglich, auf genomischer DNA von Zellen, die mit diesen Klonen infiziert waren, via PCR provirale Integrationen zu detektieren (Abb. 3.34) und zum anderen konnte auf infizierten Zellen die Expression von viralen Proteinen nachgewiesen werden (Abb. 3.35). Die unterschiedlichen Intensitäten in den Fluoreszenzen (nicht gezeigt) sind auf verschiedene Stärken der Infektion, bedingt durch das Replikationsverhalten des jeweiligen Virus, und die verwendeten Zelllinien zurückzuführen. Daneben hat die Menge an Virus, die bei der Infektion eingesetzt wurde, einen Einfluß. Die Titer der virushaltigen Überstände wurden nicht bestimmt, wobei für PERV in Pseudotypexperimenten allerdings relativ geringe Titer bestimmt wurden. Desweiteren wurde in der gleichen Studie für die Zelllinie PK15 eine TCID₅₀ von 100/ml ermittelt (Takeuchi *et al.*, 1998).

Neben anderen Zelllinien ist die humane Nierenzelllinie 293 als suszeptibel für die Infektion mit PERV beschrieben worden (Patience *et al.*, 1987; Takeuchi *et al.*, 1998). Keiner der beiden nativen Klone zeigte hohe RT Werte auf diesen Zellen (PK15-PERV-A(58): 15 mU/ml, PK15-PERV-B(213): 4 mU/ml; Abb. 3.36). In Übereinstimmung damit haben Pseudotypexperimente unter Verwendung des *env* Gens von PERV-A, PERV-B und PERV-C gezeigt, daß das PERV-A *env* den Eintritt in 293 Zellen mit einer höheren Effizienz vermittelt (Takeuchi *et al.*, 1998). Diese Studie konzentrierte sich allerdings auf den Tropismus von PERV und nicht auf die replikativen Fähigkeiten des Virus. Diese Analysen verwendeten nur die *env* Gene und schlossen damit andere Interaktionen der Viren mit der Wirtszelle sowie die Wirkung regulatorischer Elemente, wie sie zum Beispiel in der proviralen LTR zu finden sind, aus.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Wahl der Zelllinie, die zur Herstellung der zur Infektion eingesetzten Überstände genutzt wurde (293), einen Einfluß auf die beobachtete Aktivität von PK15-PERV-A(58) nach Infektion von 293 Zellen hat. Für den humanisierten Klon 293-PERV-A(42) ist jedoch beschrieben worden, daß nach Infektion

von verschiedenen Zellen mit PERV-haltigem Überstand, der auf HeLa Zellen hergestellt wurde, PG-4 Zellen die höchsten RT Werte aufwiesen (Krach *et al.*, 2001). Dies deutet darauf hin, daß im Rahmen der Versuchsdauer Adaptationsprozesse keinen größeren Einfluß zu haben scheinen.

In einer neueren Publikation werden für 293 Zellen, die mit PERV von PK15 Zellen infiziert wurden, RT Werte von 0,1 mU/ml angegeben. Desweiteren zeigte die Zelllinie PK15 in dieser Studie selber lediglich eine Aktivität von 1,6 mU/ml (Van der Laan *et al.*, 2000). Diese Daten unterstreichen die hier vorgelegten Befunde, daß die beiden nativen Klone PK15-PERV-A(58) und PK15-PERV-B(213) replikationskompetent sind.

Ein zusätzlicher Beleg für die Anwesenheit von infektiösen Partikeln ist, daß sich auf mit PK15-PERV-A(58) infizierten 293 Zellen elektronenmikroskopisch Viren des C-Typs in unterschiedlichen Stadien der Infektion nachweisen ließen (Abb. 3.37A-D).

4.2.6 Bedeutung der Isolation nativer PERV Sequenzen

In der oben genannten Publikation konnte für NOD/SCID Mäuse gezeigt werden, daß nach der Transplantation von porcinen Inselzellen, produktive PERV Infektionen auftraten (Van der Laan *et al.*, 2000). Die Charakterisierung von replikationskompetenten, nativen Proviren und die Bestimmung der Integrationsorte im porcinen Genom dieser PERV kann helfen, Schweine zu identifizieren, die geringere Mengen an PERV produzieren oder frei von individuellen Proviren sind.

Die vorliegende Arbeit läßt keine exakte Aussage über die Anzahl von replikationskompetenten Viren im porcinen Genom zu. Im Zusammenhang mit den hier beschriebenen Proviren, der Charakterisierung von PERV aus der Zelllinie 293 PERV-PK (Czauderna *et al.*, 2000) und der Beschreibung von proviralen Sequenzen aus dem Genom von Large White Schweinen (Niebert *et al.*, in Vorbereitung) ist es jedoch möglich, eine Abschätzung vorzunehmen. Von den ca. 50 proviralen Integrationen, die für PERV beschrieben worden sind (Patience *et al.*, 1997; Le Tissier *et al.*, 1997), scheinen höchstens zehn für replikationskompetente Viren zu kodieren, so daß die Züchtung PERV freier Schweine nicht gänzlich unmöglich erscheint.

Aspekte, die im Zusammenhang mit der Verwendung von Schweinen für potentielle Xenotransplantationen zu bewerten bleiben, sind zum einen die exakte Lokalisation der Proviren im porcinen Genom, da vorläufige Abgleiche der flankierenden Sequenzen Homologien zum hochpolymorphen SLA ergeben haben. Zum anderen müssen potentielle

Auswirkungen von Rekombinations- und Adaptationsprozessen, die, wie beschrieben, auftreten können, untersucht werden, um das Risiko von Xenozoonosen, die von PERV ausgehen, auszuschließen oder zu minimieren.

5. Zusammenfassung

Vertikal, durch Vererbung weitergegebene endogene Retroviren stellen ein Infektionsrisiko im Rahmen von Transplantationen von Zellen, Geweben und Organen des Schweins auf den Menschen (Xenotransplantationen) dar. Zwei Klassen von endogenen C-Typ Retroviren des Schweins (PERV), die humane Zellen *in vitro* infizieren können, sind bekannt. Eine molekulare und immunologische Kontrolle von Xenotransplantatempfängern hinsichtlich einer potentiellen Infektion mit PERV ist daher unumgänglich.

Im Rahmen der immunologischen Detektion von PERV wurden Peptidantiseren gegen das Gag und das Env Protein von PERV hergestellt und auf ihre Verwendbarkeit in unterschiedlichen Assays getestet. Seren, gerichtet gegen das Matrixprotein (p30) und das Nukleokapsid (p10) aus dem Gag Polyprotein sowie Seren gegen den Oberflächenanteil (gp70, SU) und den transmembranen Anteil (p15E, TM) des Env Proteins von PERV zeigten unter anderem Funktionalität in Westernblot- und indirekten IF-Analysen, Immunperoxidase Assays und Immunogoldmarkierungen. Während mit den beiden Gag Antiseren und dem Env p15E Antiserum beide polytropen PERV Klassen nachgewiesen werden können, läßt das SU-Antiserum eine spezifische Detektion von PERV der Klasse B zu.

Die Charakterisierung von PERV, die für humane Zellen infektiös sind, führte zur Isolierung von vier nativen proviralen Vollängen Sequenzen aus einer Genombibliothek der porcinen Nierenzelllinie PK15. Drei dieser Klone wurden mittels PCR der Klasse A (PK15-PERV-A(42), PK15-PERV-A(45) und PK15-PERV-A(58)), der vierte Klon der Klasse B (PK15-PERV-B(213)) zugeordnet. Für die drei A Klone konnte gezeigt werden, daß sie identisch sind, so daß die weitergehende Charakterisierung mit dem Klon PK15-PERV-A(58) durchgeführt wurde. Der B Klon wies hohe Homologie zu dem zuvor beschriebenen, aus der humanen Zelllinie 293 PERV-PK isolierten Klon 293-PERV-B(43) (Czauderna *et al.*, 2000) auf, ist jedoch nicht identisch mit diesem. Der Klon PK15-PERV-A(58) zeigt nahe Verwandtschaft zu 293-PERV-A(42) im *env* Gen und zu dem Klasse C cDNA Klon PERV-MSL (Akiyoshi *et al.*, 1998) in der LTR, im *gag* und *pro/pol* Gen. Für beide nativen proviralen Klone wurden die flankierenden genomischen Sequenzen bestimmt sowie der Nachweis erbracht, daß sie in unterschiedlichen Schweinerassen vorhanden sind. Sowohl PK15-PERV-A(58) als auch PK15-PERV-B(213) zeigten Replikationskompetenz nach der Infektion von suszeptiblen Zelllinien. Von den ca. 30 bis

50 PERV Integrationen im porcinen Genom (Patience *et al.*, 1997; Le Tissier *et al.*, 1997) scheinen demnach weniger als zehn für replikationskompetente Viren zu kodieren.

Durch die Möglichkeit, die Expression von viralen Proteinen zu detektieren, sowie Schweine auf die Integration von spezifischen PERV, die Infektionspotential besitzen, zu screenen, leisten die Ergebnisse dieser Arbeit einen Beitrag dazu, Xenotransplantationen in mikrobiologischer Hinsicht sicherer zu machen.

6. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AcNPV	<i>Autographa californica</i> nuclear polyhedrosis virus
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
BVES	Baculovirus Expressions System
CA	Kapsidprotein (capsid)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DXR	verzögerte Abstoßungsreaktion (delayed xenograft rejection)
E(A)	Env der Klasse A
E(B)	Env der Klasse B
ECL	verstärkte (enhanced) Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymabsorptionstest (enzyme linked immuno sorbent assay)
Env	Oberflächenmolekül der Retroviren (envelope)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fa.	Firma
FKS	Fötale Kälberserum
G	<i>gag</i>
Gag	Polyprotein der Struktur-Virusproteine (group specific antigen)
GPP	<i>gag-pro-pol</i> Konstrukt
HAR	hyperakute Abstoßungsreaktion
His	Histidin
HRP	Meerrettich Peroxidase (horseradish peroxidase)
IF	Immunfluoreszenz
IN	Integrase
IPAP	Immunperoxidase Assay
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KLH	„keyhole limpets hemocyanin“
LTR	„long terminal repeat“
MA	Matrixprotein
MLV	murines Leukämievirus
MSD	„membrane spanning domain“
NC	Nukleokapsidprotein (nucleocapsid)
NOD	„non-obese diabetes“
NSP	Neomycin, Streptomycin, Penicillin
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte (Extinktion)
OPD	O-Phenylendiamindihydrochlorid
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)

PBS	Phosphat gepufferte Saline (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PERV	porcines endogenes Retrovirus
pfu	Einheit des Virustiters (plaque forming unit)
p.i.	post infektion
PTT	„protein truncation test“
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PRO	Protease
QPF	qualifiziert pathogenfrei
RT	reverse Transkriptase
SCID	„severe combined immunodeficiency“
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SLA	Schweine Leukozytenantigen
SPF	spezifisch pathogenfrei
SSC	Natriumcitrat (saline sodium citrate)
SU	Oberflächenanteil des Env (surface)
TAE	TRIS-Essigsäure-EDTA
TBE	TRIS-Borsäure-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TCID ₅₀	„tissue culture infectious dosis; 50%“
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	transmembraner Anteil des Env (transmembrane)
TM-EM	Transmissionselektronenmikroskopie
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSN	Transfektionsüberstand (transfection supernatant)
Tx	Transplantation
U	Einheit (unit)
UTR	„untranslated region“
VS	virushaltiger Überstand (virus stock)
vs	versus
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid
XNA	„xenoreactive natural antibodies“
XTx	Xenotransplantation

7. Literaturverzeichnis

Akiyoshi DE, Denaro M, Zhu H, Greenstein JL, Banerjee P, Fishman JA (1998) Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine. *J. Virol.* **72**: 4503-4507.

Allan JS (1996) Xenotransplantation at a crossroad: prevention versus progress. *Nature Med.* **2**: 18-21.

Armstrong JA, Porterfield JS, De Madrid AT (1971) C-type virus particles in pig kidney cell lines. *J. Gen. Virol.* **10**: 195-198.

Bach FH, Robson SC, Winkler H, Ferran C, Stuhlmeier KM, Wrighton CJ, Hacock WW (1995) Barriers to xenotransplantation. *Nature Med.* **1**: 869-873.

Bailey LL, Nehlsen-Cannarella SL, Concepcion W, Jolley BW (1985) Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate. *JAMA* **254**: 3321-3329.

Baltimore D (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature* **226**: 1209-1211.

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

Banerjee PT, Patience C, Andersson GK; Bio-Tansplant, INC. (3/2000) Molecular sequence of swine retrovirus and methods of use. Patent Nr. WO 00/11187.

Barnes WM (1994) PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2216-2220.

Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rosenbaum W, Montagnier L (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**: 868-871.

Battini JL, Danos O, Heard JM (1995) Receptor-binding domain of murine leukemia virus envelope glycoprotein. *J. Virol.* **69**: 713-719.

Bergelson JM, Mohanty JG, Crowell RI, St John NF, Lublin DM, Finberg RW (1995) Coxsackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay-accelerating factor (CD55). *J. Virol.* **69**: 1903-1906.

Birmingham K (1999) FDA subcommittee finds no evidence of PERV transmission. *Nature Med.* **5**: 855.

Bishop JM, Varmus H (1984) Functions and origins of retroviral transforming genes. In: *RNA tumor viruses*. 2nd Edition. Edit.: Weiss R, Teich N, Varmus H, Coffin J. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, S. 999-1108.

- Blusch JH, Patience C, Takeuchi Y, Templin C, Roos C, von der Helm K, Steinhoff G, Martin U** (2000) Infection of nonhuman primate cells by pig endogenous retrovirus. *J. Virol.* **74**: 7687-7690.
- Boeke JD, Stoye JP** (1997) Retrotransposons, endogenous retroviruses, and the evolution of retroelements. In: *Retroviruses*. Edit.: Coffin JM, Huges SH, Varmus HE. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, S. 343-436.
- Boller K, Jansen O, Schuldes H, Tönjes RR, Kurth R** (1997) Characterization of the antibody response specific for the human endogenous retrovirus HTDV/HERV-K. *J. Virol.* **71**: 4581-4588.
- Bracy JL, Sachs DH, Iacomini J** (1998) Inhibition of xenoreactive natural antibody production by retroviral gene therapy. *Science* **281**: 1845-1847.
- Bratthauer GL, Fanning TF** (1992) Active LINE-1 retrotransposons in human testicular cancer. *Oncogene* **7**: 507-510.
- Breese SS Jr** (1970) Virus-like particles occurring in cultures of stable pig kidney cell lines. Brief report. *Arch. Gesamte Virusforschung* **30**: 401-414.
- Breimer ME, Björck E, Svalander CT, Bengtsson A, Rydberg L, Lie-Karlsen K, Attman P-O, Aurell M, Samuelsson BE** (1996) Extracorporeal ("ex vivo") connection of pig kidneys to humans. I. Clinical data and studies of platelet destruction. *Xenotransplantation* **3**: 328-339.
- Brosius J** (1991) Retroposons-Seeds of Evolution. *Science* **251**: 753.
- Brown PO** (1997) Integration. In: *Retroviruses*. Edit.: Coffin JM, Huges SH, Varmus HE. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, S. 161-204.
- Chari RS, Collins BH, Magee JC, DiMaio JM, Kirk AD, Harland RC, McCann RL, Platt JL, Meyers WC** (1994) Treatment of hepatic failure with ex vivo pig-liver perfusion followed by liver transplantation. *N. Engl. J. Med.* **331**: 234-237.
- Cheng S, Fockler C, Barnes WM, Higuchi R** (1994) Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 5694-5699.
- Coffin JM** (1984) Endogenous viruses. In: *RNA tumor viruses*. 2nd Edition. Edit.: Weiss R, Teich N, Varmus H, Coffin J. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, S. 1109-1203.
- Coffin JM** (1992) Structure and classification of retroviruses. In: *The Retroviridae*. Edit.: Levy JA. Plenum, New York. S. 19-50.
- Coffin JM** (1996) Retroviridae: The viruses and their replication. In: *Fields Virology*. 3rd Edition. Edit.: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, *et al.* Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia, S. 1767-1847.

Cordonnier A, Casella J-F, Heidmann T (1995) Isolation of novel human endogenous retrovirus-like elements with foamy virus-related *pol* sequence. *J. Virol.* **69**: 5890-5897.

Covey SN (1986) Amino acid sequence homology in *gag* region of reverse transcribing elements and the coat protein of cauliflower mosaic virus. *Nucleic Acids Res.* **14**: 623-633.

Cowan PJ, Aminian A, Barlow H, Brown AA, Chen C-G, Fiscaro N, Francis DMA, Goodman DJ, Han W, Kurek M, Nottle MB, Pearse MJ, Salvaris E, Shinkel TA, Stainsby GV, Stewart AB, D'Apice JF (2000) Renal xenografts from triple-transgenic pigs are not hyperacutely rejected but cause coagulopathy in non-immunosuppressed baboons. *Transplantation* **69**: 2504-2515.

Cozzi E, White DJG (1995) The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nature Med.* **1**: 964-966.

Cramer DV (1995) The use of xenograft for acute hepatic failure. *Transplant. Proc.* **27**: 80-82.

Cunningham D, Fernandez-Suarez X, Herring C, Whittam A, Galbraith D, Onions D, Langford G (1999) Expression of porcine endogenous retrovirus in hDAF transgenic pig. (Abstract) 5th Congress of the International Xenotransplantation Association, Nagoya, Japan.

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

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

Deininger PL, Batzer ME (1993) in *Evolutionary Biology*. Edit: Hecht MK, MacIntyre RJ & Cleggs MT. Plenum, New York, Ausgabe 27, S. 157-196.

Dickson C, Eisenman R, Fan H, Hunter E, Teich N (1984) Protein biosynthesis and assembly. In: *RNA tumor viruses*. 2nd Edition. Edit.: Weiss R, Teich N, Varmus H, Coffin J. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, S. 513-648.

Dinsmore JN, Manhart C, Raineri R, Jacoby DB, 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.

Dorig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD (1993) The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* **75**: 295-305.

Dombroski BA, Mathias SL, Nanthakumar E, Scott AF, Kazazian HH Jr. (1991) Isolation of an active human transposable element. *Science* **64**: 1-30.

Dorey E (2000) PERV data renew xeno debate. *Nature Biotechnol.* **18**: 1032-1033.

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

Ehlers B, Ulrich S, Goltz M (1999) Detection of two novel porcine herpesviruses with high similarity to gammaherpesviruses. *J. Gen. Virol.* **80**: 971-978.

Eickbush TH (1992) Transposing without ends: the non-LTR retrotransposable elements. *New Biol.* **4**: 430-440.

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

Ellermann V, Bang O (1908) Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zentralb. Bakteriol. Parasitenkd. Infectiionskr. Hyg. Abt. Orig.* **46**: 595-609.

Feng YX, Moore SP, Garfinkel DJ, Rein A (2000) The genomic RNA in Ty1 virus-like particles is dimeric. *J. Virol.* **74**: 10819-10821.

Fiane AE, Mollnes TE, Degré M (2000) Pig endogenous retrovirus - a threat to clinical xenotransplantation. *APMIS* **108**: 241-250.

Fielding AK, Chapel-Fernandes S, Chadwick MP, Bullough FJ, Cosset F-L, Russell SJ (2000) A hyperfusogenic Gibbon Ape Leukemia envelope glycoprotein: targeting of a cytotoxic gene by ligand display. *Human Gene Therapy* **11**: 817-826.

Fink JS, Schumacher JM, Ellias SL, Palmer EP, Saint-Hilaire M, Shannon K, Penn R, Starr P, VanHorne C, Kott HS, Dempsey PK, Fishman JA, Raineri R, Manhart C, Dinsmore J, Isacson O (2000) Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell Transplantation* **9**: 372-278.

Fishman JA (1997) Xenosis and xenotransplantation: addressing the infectious risks posed by an emerging technology. *Kidney Int.* **51**(Suppl. 58): 41-45.

Frank H (1987) Oncovirinae: type C oncoviruses. In: *Animal virus structure*, Edit.: Nermut MV & Steven AC. Elsevier Science Publishers B.V.; aus der Reihe „Perspectives in medical virology“, Vol. 3, S. 273-287.

Garfinkel DJ (1992) Retroelements in microorganisms. In: *The Retroviridae*, Vol. 1. Edit.: Levy JA. Plenum Press, New York, S. 107-158.

Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Sheare GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, White G, Foster P, Markham PD (1984) Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**: 500-503.

Gelderblom HR (1987) Oncovirinae: type D oncovirus. In: *Animal virus structure*. Edit.: Nermut MV & Steven AC. Elsevier, Amsterdam, S. 289-294.

Good AH, Cooper DKC, Malcolm AJ, Ippolito RM, Koren E, Neethling FA, Ye Y,

Zuhdi N, Lamontagne LR (1992) Identification of carbohydrate structures that bind human anti-porcine antibodies: implications for discordant xenografting in humans. *Transplant. Proc.* **24**: 559-5562.

Green LM and Berg JM (1989) A retroviral Cys-Xaa2-Cys-Xaa4-His-Xaa4-Cys peptide binds metal ions: spectroscopic studies and a proposed three-dimensional structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 4047-4051.

Greenstein JL, Sachs DH (1997) The use of tolerance for transplantation across xenogeneic barriers. *Nature Biotechnol.* **15**: 235-238.

Griffiths PD (2000) Xenotransplantation: one trotter forward, one claw back. *Lancet* **356**: 1049-1050.

Groth CG, Korsgren O, Tibell A, Tollemar J, Möller E, Bolinder J, Östman J, Reinholt FP, Hellerström C, Andersson A (1994) Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. *Lancet* **344**: 1402-1404.

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

Hanger JJ, Bromham LD, McKee JJ, O'Brien TM, Robinson WF (2000) The nucleotide sequence of koala (*Phascolarctos cinereus*) retrovirus: a novel type C endogenous virus related to gibbon ape leukemia virus. *J. Virol.* **74**: 4264-4272.

Heneine W, Tibell A, Switzer M, Sandstrom P, Rosales VG, Mathews A, Korsgren O, Chapman LE, Folks TM, Groth CG (1998) No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenograft. *The Lancet* **352**: 695-699.

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

Herr W (1984) Nucleotide sequence of AKV murine leukemia virus. *J. Virol.* **49**: 471-478.

Hirose Y, Takamatsu M, Harada F (1993) Presence of *env* genes in members of the RTVL-H family of human endogenous retrovirus-like elements. *Virology* **192**: 52-61.

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

Holmes SE, Dombroski BA, Krebs CM, Boehm CD, Kazazian HH (1994) A new retrotransposable human L1 element from the LRE 2 locus on chromosome 1q produces a chimaeric insertion. *Nature Genet.* **7**: 143-148.

Hughes SH (1982) Sequence of the long terminal repeat and adjacent segments of the endogenous avian virus Rous-associated virus 0. *J. Virol.* **43**: 191-200.

Hutchinson CA, Hardies SC, Loeb DD, Shehee WR, Edgell MH (1989) LINE and related retroposons: long interspersed repeated sequences in the eucaryotic genome. In: *Mobile DNA*. Edit.: Berg D & Howe M. American Society for Microbiology, Washington D.C., S. 599-617.

Imaizumi T, Lankfort KL, Burton WV, Fodor WL, Kocsis JD (2000) Xenotransplantation of transgenic pig olfactory ensheathing cells promotes axonal regeneration in rat spinal cord. *Nature Biotechnol.* **18**: 949-953.

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

Ivanov VA, Melnikov AA, Siunov AV, Fodor JJ, Ilyin YV (1991) Authentic reverse transcriptase is encoded by *jockey*, a mobile *Drosophila* element related to mammalian LINES. *EMBO J.* **10**: 1099-1116.

Januszewski MM, Cannon PM, Chen D, Rozenberg Y, Anderson F (1997) Functional analysis of the cytoplasmic tail of moloney murine leukemia virus envelope protein. *J. Virol.* **71**: 3613-3619.

Kalendar R, Tanskanen J, Immonen S, Nevo E, Schulman AH (2000) From the cover: genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimate divergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 6603-6607.

Kato S, Matsuo K, Nishimura N, Takahashi N, Takano T (1987) The entire sequence of baboon endogenous virus DNA: A chimeric structure of murine type C and simian type C retroviruses. *J. Genet.* **62**: 127-137.

Katzir N, Rechavi G, Cohen JB, Unger T, Simoni F, Segal S, Cohen D, Givol D (1985) "Retroposon" insertion into the cellular oncogen *c-myc* in canine transmissible venereal tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 1054-1058.

Kazazian HH Jr., Wong C, Youssoufian H, Scott AF, Phillips DG, Antonarakis SE (1988) Haemophilia A resulting from *de novo* insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature* **332**: 164-166.

Kingsmore SG, Giros B, Suh D, Beniarz M, Caron MG, Seldin MF (1994) Glycine receptor β -subunit gene mutation in spastic mouse associated with LINE-1 element insertion. *Nature Genet.* **7**: 136-142.

Kohrman DC, Harris J, Meisler MH (1996) Mutation detection in the *med* and *medJ* alleles of the sodium channel *Scn8a*. Unusual splicing due to a minor class AT \rightarrow AC intron. *J. Biol. Chem.* **271**: 17576-17581.

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

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Le Tissier P, Stoye JP, Takeuchi Y, Patience C, Weiss RA (1997) Two sets of human-tropic retrovirus. *Nature* **389**: 681-682.

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

Löwer R, Boller K, Hasenmaier B, Korbmacher C, Müller-Lantzsch N, Löwer J, Kurth R (1993) Identification of endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 4480-4484.

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

Mager DL, Henthorn PS (1984) Identification of a retrovirus-like repetitive element in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 7510-7514.

Mager DL, Freeman JD (1987) Human endogenous retrovirus genome with type C *pol* sequences and *gag* sequences related to human T-cell lymphotropic viruses. *J. Virol.* **61**: 4060-4066.

Martin SL (1991) Ribonucleoprotein particles with LINE-1 RNA in mouse embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 4804-4807.

Mathias SL, Scott AF, Kazazian HJ, Boeke JD, Gabriel A (1991) Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. *Science* **254**: 1808-1810.

Martin U, Kiessig V, Blusch JH, Haverich A, von der Helm K, Herden T, Steinhoff G (1998) Expression of pig endogenous retrovirus by primary porcine endothelial cells and infection of human cells. *Lancet* **352**: 692-694.

Martin U, Winkler ME, Id M, Radeke H, Arseniev L, Takeuchi Y, Simon AR, Patience C, Haverich A, Steinhoff G (2000) Productive infection of primary human endothelial cells by pig endogenous retrovirus (PERV). *Xenotransplantation* **7**: 138-142.

Matthews AL, Brown J, Switzer W, Folks TM, Heneine W, Sandstrom PA (1999) Development and validation of a western immunoblot assay for detection of antibodies to porcine endogenous retrovirus. *Transplantation* **67**: 939-943.

McCurry KR, Kooyman DL, Alvarado CG, Cotterell AH, Martin MJ, Logan JS, Platt JL (1995) Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury. *Nature Med.* **1**: 423-427.

Medstrand P, Blomber J (1993) Characterization of novel reverse transcriptase encoding human endogenous retroviral sequences similar to type A and type B retroviruses: differential expression in normal human tissues. *J. Virol.* **67**: 6778-6787.

Meric C and Goff SP (1989) Characterization of Moloney murine leukemia virus mutants

with single-amino-acid substitutions in the Cys-His box of the nucleocapsid protein. *J. Virol.* **63**: 1558-1568.

Michaels MG, Simmons RL (1994) Xenotransplant-associated zoonoses. *Transplantation* **57**: 1-7.

Miki Y, Nishisho I, Horii A, Miyoshi Y, Utsunomiya J, Kinzler KW, Vogelstein B, Nakamura Y (1992) Disruption of the *APC* gene by a retrotransposal of L1 sequence in a colon cancer. *Cancer Res.* **52**: 643-645.

Moennig V, Frank H, Hunsmann G, Ohms P, Schwarz H, Schäfer W (1974) C-type particles produced by permanent cell line from a leukemic pig. II. Physical, chemical, and serological characterization of the particles. *Virology* **57**: 179-188.

Moore R, Dixon M, Smith R, Peters G, Dickson C (1987) Complete nucleotide sequence of a milk-transmitted mouse mammary tumor virus: Two frameshift suppression events are required for translation of *gag* and *pol*. *J. Virol.* **61**: 480-490.

Morse B, Rothberg VJ, Sandorfer JM, Astrin SM (1988) Insertional mutagenesis of the *myc* locus by a LINE-1 sequence in a human breast carcinoma. *Nature* **333**: 87-90.

Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MS (Edit.) (1994) Virus taxonomy: The classification and nomenclature of viruses. In: *Retroviridae*. Springer-Verlag, Wien.

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

Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, Roubardin-Combe C, Gerlier D (1993) Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J. Virol.* **67**: 6025-6032.

Narita N, Nishio H, Kitoh Y, Ishikawa R, Minami R, Nakamura H, Matsuo M (1993) Insertion of a 5' truncated L1 element into the 3' end of exon 44 of the dystrophin gene resulted in skipping of the exon during splicing in a case of Duchenne muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* **91**: 1862-1867.

Nermut MV, Hockley DJ (1996) Comparative morphology and structural classification of retroviruses. In: *Morphogenesis and maturation of retroviruses*. Edit.: Kräusslich H-G. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, S. 1-24.

O'Connell C, O'Brien S, Nash WG, Cohen M (1984) ERV3, a full-length human endogenous provirus: Chromosomal localization and evolutionary relationship. *Virology* **138**: 225-235.

O'Neill RR, Buckler CE, Theodore TS, Martin MA, Repaske R (1985) Envelope and long terminal repeat sequences of a cloned infectious NZB xenotropic murine leukemia virus. *J. Virol.* **53**: 100-106.

Onions D, Cooper DKC, Alexander TJJ, Brown C, Claassen E, Foweraker JE,

- Harris DL, Mahy BWJ, Minor PD, Oserhaus ADME, Pastoret P-P, 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, Perry AC** (2000) Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* **289**: 1188-1190.
- Ono M, Yasunaga T, Miyata T, Ushikubo H** (1986) Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. *J. Virol.* **60**: 589-598.
- Ono M, Kawakami M, Takezawa T** (1987) A novel human nonviral retroposon derived from an endogenous retrovirus. *Nucleic Acids Res.* **15**: 8725-8737.
- O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA** (1994) Baculovirus expression vectors: a laboratory manual. Oxford University Press.
- Oroszlan S, Copeland TD, Gilden RV, Todaro GJ** (1981) Structural homology of the major internal proteins of endogenous type C viruses of two distantly related species of Old World monkeys, *Macaca arctoides* and *Colobus polykomos*. *Virology* **115**: 262-271.
- Paradis K, Langford G, Long Z, Heneine W, Sandstrom P, Switzer WM, Chapman LE, Lockey C, Onions D, Otto E** (1999) Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. *Science* **285**: 1236-1241.
- Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA** (1997) Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nature Med.* **3**: 282-286.
- Patience C, Patton GS, Takeuchi Y, Weiss RA, McClure MO, Rydberg L, Breimer ME** (1998) No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidney. *The Lancet* **352**: 699-701.
- Patience C, Switzer WM, Takeuchi Y, Griffiths DJ, Goward ME, Heneine W, Stoye JP, Weiss RA** (2001) Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species. *J. Virol.* **75**: 2771-2775.
- Paulson KE, Deka N, Schmid CW, Misra R, Schindler CW, Rush MG, Kadyk L, Leinwand L** (1985) A transposon-like element in human DNA. *Nature* **316**: 359-361.
- Perou CM, Pryor RJ, Naas TP, Kaplan J** (1997) The bg allele mutation is due to a LINE-1 retrotransposition. *Genomics* **42**: 366-368.
- Petropoulos C** (1997) Retroviral taxonomy, protein, structure, sequences, and genetic maps. In: *Retroviruses*. Edit.: Coffin JM, Huges SH, Varmus HE. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, S. 757-806.
- Petrov DA, Sangster TA, Spencer Johnston J, Hartl DL, Shaw KL** (2000) Evidence for DNA loss as a determinant of genome size. *Science* **287**: 1060-1062.
- Pitkin Z, 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.

Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC (1980) Detection and isolation of type-C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 7415-7419.

Polejaeva IA, Chen S-H, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KHS (2000) Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* **407**: 86-90.

Pruitt K, Baldwin WM 3d, Marsh HC Jr, Lin SS, Yeh CG, Bollinger RR (1991) The effect of soluble complement receptor type 1 on hyperacute xenograft rejection. *Transplantation* **52**: 868-873.

Pruitt K, Kirk AD, Bollinger RR, Marsh HC Jr, Collins BH, Levin JL, Mault JR, Heinle JS, Ibrahim S, Rudolph AR et al. (1994) The effect of soluble complement receptor type 1 on hyperacute rejection of porcine xenografts. *Transplantation* **57**: 363-370.

Reed L, Muench H (1938) A simple method for estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* **27**: 493-497.

Reemstma K, McCracken BH, Schlegel JU et al., (1964) Renal heterotransplantation in man. *Ann. Surg.* **160**: 384-410.

Rein A, Mirro J, Gordon Haynes J, Ernst SM, Nagashima K (1994) Function of the cytoplasmic domain of a retroviral transmembran protein: p15E-p2E cleavage activates the membran fusion capacity of the murine leukemia virus Env protein. *J. Virol.* **68**: 1773-1781.

Repaske R, Steele PE, O'Neill RR, Rabson AB, Martin MA (1985) Nucleotide sequence of full-length human endogenous retroviral segment. *J. Virol.* **54**: 764-772.

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

Ryan US (1995) Complement inhibitory therapeutics and xenotransplantation. *Nature Med.* **1**: 967-968.

Sachs DH (1994) The pig as a xenograft donor. *Path. Biol.* **42**: 217-219.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Ehrlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickel cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Santoro F, Kennedy PE, Locatelli G, Malnati MS, Berger EA, Lusso P (1999) CD46 is

a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* **99**: 817-827.

Sassman DM, Dombroski BA, Moran JV, Kimberland TP, Naas RJ, DeBerardinis A, Gabriel A, Swergold GD, Kazazian HH (1997) Many human L1 elements are capable of retrotransposition. *Nature Genet.* **16**: 37-43.

Sauter M, Schommer S, Kremmer E, Remberger K, Dolken G, Lemm I, Buck M, Best B, Neumann-Haefelin D, Müller-Lantzsch N (1995) Human endogenous retrovirus K10: expression of Gag protein and detection of antibodies in patients with seminomas. *J. Virol.* **69**: 414-421.

Scheef G, Fischer N, Krach U, Tönjes RR (2001) The number of a U3 repeat box acting as a transcriptional enhancer in long terminal repeats of polytropic replication-competent porcine endogenous retroviruses dynamically fluctuates during serial passages on human cells. *J. Virol.* [im Druck]

Sharma A, Okabe J, Birch R, McClellan SB, Martin MJ, Platt JL, Logan JS (1996) Reduction in the level of gal(α 1,3)gal in transgenic mice and pigs by the expression of an α (1,2)fucosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 7190-7195.

Shinnick TM, Lerner RA, Sutcliff JG (1981) Nucleotide sequence of Moloney murine leukemia virus. *Nature* **293**: 543-548.

Singer M (1982) SINES and LINES: highly repeated short and long interspersed sequences in mammalian genomes. *Cell* **28**: 433-434.

Smit AFA (1993) Identification of a new, abundant superfamily of mammalian LTR-retrotransposons. *Nucleic Acids Res.* **21**: 1863-1872.

Smit AFA, Riggs AD (1995) MIRs are classic, tRNA-derived SINES that amplified before a mammalian radiation. *Nucleic Acids Res.* **23**: 98-102.

Starzl TE, Fung J, Tzakis A, Todo S, Demetris AJ, Marino IR, Doyle H, Zeevi A, Warty V, Michaels M, et al., (1993) Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet* **341**: 65-71.

Stewart MA, Warnock M, Wheeler A, Wilkie N, Mullins JI, Onions DE, Neil JC (1986) Nucleotide sequences of a feline leukemia virus subgroup A envelope gene and long terminal repeat and evidence for the recombinational origin of subgroup B viruses. *J. Virol.* **58**: 825-834.

Stoye PJ, Coffin JM (1987) The four classes of endogenous murine leukemia viruses: Structural relationship and potential for recombination. *J. Virol.* **61**: 2659-2669.

Stoye PJ, Coffin JM (1995) The danger of xenotransplantation. *Nature Med.* **1**: 1100.

Stoye PJ (1997) Proviruses pose potential problems. *Nature* **386**: 126-127.

Sotye PJ (1998) Endogenous retroviruses and xenotransplantation. *SGM Quarterly* **25**: 130.

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

Tacke SJ, Kurth R, Denner J (2000) Porcine endogenous retroviruses inhibit human immune cell function: risk for xenotransplantation? *Virology* **268**: 87-93.

Takahara T, Ohsumi T, Kuromitsu J, Shibata K, Sasaki N, Okazaki Y, Shibata H, Sato S, Yoshiki A, Kusakabe M, Muramatsu M, Ueki M, Okuda K, Hayashizaki Y (1996) Dysfunction of the Orleans reeler gene arising from exon skipping due to transposition of a full-length copy of an active L1 sequence into the skipped exon. *Hum. Mol. Genet.* **5**: 989-993.

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

Takeuchi Y, Liang S-H, Bieniasz PD, Jäger U, Porter CD, Friedmann T, McClure MO, Weiss RA (1997) Sensitization of Rhabdo-, Lenti-, and Spumaviruses to human serum by galactosyl(α 1-3)galactosylation. *J. Virol.* **71**: 6174-6178.

Takeuchi Y, Patience C, Magre S, Weiss, RA, Banerjee PT, Le Tissier P, Stoye JP (1998) Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus. *J. Virol.* **72**: 9986-9991.

Takeuchi Y (2000) Risk of zoonosis in xenotransplantation. *Transplant. Proc.* **32**: 2698-2700.

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

Temin HM (1964) Nature of the provirus of Rous sarcoma. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* **17**: 557-570.

Temin HM (1980) Origin of retroviruses from cellular movable genetic elements. *Cell* **21**: 599-600.

Temin HM, Mizutani S (1970) RNA-directed DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **226**: 1211-1213.

Thomas CA, jr. (1971) The genetic organisation of chromosomes 3027. *Annu. Rev. Genet.* **5**: 237-256.

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

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

- Tönjes RR, Czauderna F, Kurth R** (1999) Genome wide screening, cloning, chromosomal assignment and expression of full-length human endogenous retrovirus type K (HERV-K). *J. Virol.* **73**: 9187-9195.
- Torado GJ, Benveniste RE, Lieber MM, Sherr C** (1973) Characterization of a type C virus released from the porcine cell line PK(15). *Virology* **58**: 65-74.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.
- Ullu E, Tschudi C** (1984) Alu sequences are processed 7SL RNA genes. *Nature* **312**: 171-172.
- UNOS** (1995) Annual report of the U.S. Scientific Registry for Transplant Recipients and the Organ Procurement and Transplantation Network: transplant data 1988-1994 USA: UNOS/US Department of Health and Human Service.
- Van der Laan LJW, Lockey C, Griffeth BC, Frasier FS, Wilson CA, Onions DE, Hering BJ, Long Z, Otto E, Torbett BE, Salomon DR** (2000) Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* **407**: 90-94.
- Ward T, Pipkin PA, Clarkson NA, Stone DM, Minor PD, Almond JW** (1994) Decay-accelerating factor CD55 is identified as the receptor for echovirus 7 using CELICS, a rapid immuno-focal cloning method. *EMBO J.* **13**: 5070-5074.
- Weiner AM, Deininger PL, Efstratiadis A** (1986) Nonviral retrotransposons: genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. *Annu. Rev. Biochem.* **55**: 631-661.
- Weiner AM** (2000) Do all SINEs lead to LINEs? *Nature Genet.* **24**: 332-333.
- Weiss RA** (1984) Origins of contemporary RNA tumor virus research. In: *RNA tumor viruses*. 2nd Edition. Edit.: Weiss R, Teich N, Varmus H, Coffin J. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, S. 1-24.
- Weiss RA** (1998) Transgenic pigs and virus adaption. *Nature* **391**: 327-328.
- Wendler JF, Wessler SR** (2000) Retrotransposon-mediated genome evolution on a local ecological scale. *PNAS* **97**: 6250-6252.
- Wilkinson DA, Mager DL, Leong JA** (1994) Endogenous human retroviruses. In: *The Retroviridae*. Vol. 1. Edit.: Levy JA. Plenum Press, New York, S. 465-535.
- Wilson CA, Wong S, Muller J, Davidson CE, Rose TM, Burd P** (1998) Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *J. Virol.* **72**: 3082-3087.
- Wilson CA, Wong S, VanBrocklin M, Federspiel MJ** (2000) Extended analysis of the in vitro tropism of porcine endogenous retrovirus. *J. Virol.* **74**: 49-56.

- Xia W, Fearon DT, Moore FD Jr, Schoen FJ, Ortiz F, Kirkman RL** (1992) Prolongation of guinea pig cardiac xenograft survival in rats by soluble human complement receptor type 1. *Transplant. Proc.* **24**: 479-480.
- Xia W, Fearon DT, Krikman RL** (1993) Effect on repetitive doses of soluble human complement receptor type 1 on survival of discordant cardiac xenografts. *Transplant. Proc.* **25**: 410-411.
- Xiong Y, Eickbush TH** (1990) Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J.* **9**: 3353-3362.
- Yang C, Compans RW** (1996) Analysis of the cell fusion activities of chimeric simian immunodeficiency virus-murine leukemia virus envelope proteins: inhibitory effects of the R peptide. *J. Virol.* **70**: 248-254.
- Yang Y-G, deGoma E, Ohdan H, Bracy JL, Xu Y, Iacomini J, Thall AD, Sykes M** (1998) Tolerization of anti-gal α 1-3gal natural antibody-forming B cells by induction of mixed chimerism. *J. Exp. Med.* **178**: 1335-1342.
- Ye Y, Neethling FA, Niekrasz M, Koren E, Richards SV, Martin M, Kosanke S, Oriol R, Cooper DK** (1994) Evidence that intravenously administered alpha-galactosyl carbohydrates reduce baboon serum cytotoxicity to pig kidney cells (PK15) and transplanted pig hearts. *Transplantation* **58**: 330-337.
- Yuan B, Campbell S, Bacharach E, Rein A, Goff SP** (2000) Infectivity of Moloney murine leukemia virus defective in late assembly events is restored by late assembly domains of other retrovirus. *J. Virol.* **74**: 7250-7260.

Lebenslauf

Name

Ulrich Krach

geboren am 23. Februar 1969 in Köln

Schulbildung

Grundschule in Liblar	1975 - 1979
Gottfried-Kinkel Realschule in Liblar	1979 - 1985
Allgemeine Hochschulreife Ville Gymnasium in Liblar	1985 - 1988

Hochschulausbildung

Beginn des Studiums der Biologie/Diplom an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn	10/1991
Erwerb des Vordiploms	10/1993
Studienschwerpunkte im Hauptstudium: Mikrobiologie, Molekularbiologie, Biochemie und Genetik	
Diplomarbeit an der Technischen Universität Hamburg-Harburg unter der Leitung von Prof. Dr. Märkl und Prof. Dr. Galinski (Universität Bonn). Thema: "Untersuchung zur thermophilen Vorbehandlung von stärkehaltigem Abwasser"	05/1996 - 02/1997
Studienabschluß: Diplom-Biologe, Gesamtnote: sehr gut	02/1997
Promotionsstudiengang am Paul-Ehrlich-Institut, Bundesamt für Sera und Impfstoffe in Langen unter der Leitung von Prof. Dr. Ludwig (Universität Frankfurt) und Dr. Tönjes. Thema: "Molekulare Charakterisierung und immunologische Detektion von porcinen endogenen Retroviren (PERV)"	12/1997