

**Charakterisierung nativer replikations-kompetenter
porciner endogener Retroviren: Molekulare Analyse,
chromosomale Lokalisierung, Polymorphismen,
Phylogenie und Rezeptorgebrauch**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Marcus Niebert
aus Mülheim a.d. Ruhr

Frankfurt 2003

vom Fachbereich Chemische und pharmazeutische Wissenschaften der Johann
Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Walter E. Müller

Gutachter: PD Dr. Ralf R. Tönjes

Prof. Dr. Bernd Ludwig

Datum der Disputation: 25. Juni 2003

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1999 bis Dezember 2002 am Paul-Ehrlich-Institut in Langen durchgeführt.

An dieser Stelle sei allen gedankt, die auf die eine oder andere Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein Dank gilt:

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

Herrn Prof. Dr. Bernd Ludwig vom Fachbereich chemische und pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität für die fachliche und fachübergreifende Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Martin Selbert danke ich für die Durchführung der DNA-Sequenzierungen.

Frau Rahmouni und Herrn Bartel für die Unterstützung bei der Herstellung der hier als auch in den Publikationen verwendeten Abbildungen.

Herrn Dr. Klaus Boller für die Unterstützung bei der mikroskopischen Analyse und Darstellung der hier gezeigten Ergebnisse.

Den Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe: Gundi Braun, Yvonne Buckendahl, Nicole Fischer, Katrin Krach, Dr. Ulrich Krach, Dr. Gregor Scheef.

Allen Mitarbeitern benachbarter Arbeitsgruppen: Sabine Fengler, Carsten Finger, Bettina Franz, Mathias Hamdorf, Irene Hartl, Petra Hempfling, Thomas Jürgens, Yulyia Medwedowska, Christoph Merten, Heide Muckenfuß, Michael Mühlebach, Jeanette Neumann, Daphne Nikles, Dr. Isabel Schmitt, Dr. Stefanie Steidl, Dr. Jörn Stitz, Richard Schneider, Uli Tschulena, Renate Wenig, Nina Wolfrum.

Alle genannten Personen waren mir bei der Bewältigung der täglichen Probleme des Laboralltags eine große Hilfe und sorgten durch ihre Kollegialität, Witz und Humor für ein sehr angenehmes Arbeitsklima.

Abschließend gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern, ohne die weder das Studium noch das Anfertigen dieser Arbeit möglich gewesen wäre und auf die ich mich jederzeit verlassen konnte.

Veröffentlichungen

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

1. **Tönjes RR, Czauderna F, Fischer N, Krach U, Boller K, Chardon P, Rogel-Gaillard C, Niebert M, Scheef G, Werner A, Kurth R.** 2000. Molecularly cloned porcine endogenous retroviruses replicate on human cells. *Transplant Proc.* **32**: 1158-1161
2. **Niebert M, Rogel-Gaillard C, Chardon P, Tönjes RR.** 2002. Characterization of chromosomally assigned replication-competent gamma porcine endogenous retroviruses derived from a large white pig and expression in human cells. *J Virol.* **76**: 2714-2720.
3. **Niebert M, Scheef G, Tönjes RR.** 2002. Wie viele funktionale porcine endogene Retroviren (PERV) hat das Schwein? *Transplantationsmedizin* **14**: 1-5
4. **Niebert M and Tönjes RR.** 2003. Molecular cloning and functional characterization of infectious PERV and development of diagnostic tests. *In: Current Topics in Microbiology and Immunology, Vol. Xenotransplantation No. 278.* Editors: Wilson C and Salomon DR, Springer-Verlag, Heidelberg, New York, 217-237
5. **Niebert M and Tönjes RR.** 2003. Analyses of prevalence, distribution and polymorphisms of six replication-competent and chromosomally assigned porcine endogenous retroviruses (PERV) in individual pigs and pig subspecies, *Virology, im Druck*
6. **Fischer N, Krach U, Niebert M and Tönjes RR.** 2003. Detection of porcine endogenous retrovirus (PERV) using highly specific antisera. *Virology, im Druck*
7. **Niebert M, Kurth R and Tönjes RR.** 2003. Retroviral safety: Analyses of phylogeny, prevalence and polymorphisms of porcine endogenous retroviruses. *Annals of Transplantation, im Druck*
8. **Niebert M, Kurth R and Tönjes RR.** 2003. Analysen zu Phylogeny, Prevalenz und Polymorphismen porciner endogener Retroviren. *Transplantationsmedizin, im Druck*
9. **Tönjes RR and Niebert M.** 2003. Relative age of proviral porcine endogenous retrovirus sequences in *Sus scrofa* based on molecular clock hypothesis. *J. Virol*, eingereicht zur Publikation

Des weiteren wurden Teilergebnisse und entwickelte Technologien meiner Doktorarbeit am 9. März 2001 beim Deutschen Patentamt unter der Nr. 101114338 angemeldet.

10. **Tönjes RR, Krach U, Niebert M.** Replication-competent molecular clones of porcine endogenous retrovirus class A and class B derived from pig and human cells.

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG	2
VERÖFFENTLICHUNGEN	4
INHALTSVERZEICHNIS	5
1 EINLEITUNG	8
1.1 Retroelemente	8
1.2 Retroviren	11
1.2.1 Klassifikation der Retroviren	12
1.2.2 Retroviren als Vektoren	14
1.3 Endogene Retroviren	14
1.3.1 Humane endogene Retroviren	15
1.3.2 Porcine endogene Retroviren	17
1.3.3 Derzeitiger Forschungsstand zu PERV	18
1.4 Zielsetzung der Arbeit	27
2 MATERIAL UND METHODEN	29
2.1 Kultivierung von Bakterien	29
2.1.1 Bakterienstämme	29
2.1.2 Kulturbedingungen von <i>Escherichia coli</i>	29
2.1.3 Herstellung kompetenter Zellen	30
2.1.4 Transformation kompetenter Bakterienzellen	30
2.2 Kultivierung von Säugerzellen	30
2.2.1 Säugetierzelllinien	30
2.2.2 Kulturbedingungen der Säugetierzellen	32
2.2.3 Kultivierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC)	32
2.2.4 Einfrieren/Auftauen von Säugerzellen	33
2.3 Herstellung hybrider MLV/PERV-Pseudotypen	33
2.3.1 Grundprinzip der Herstellung pseudotypisierter Vektoren	33
2.3.2 Selektion hochtitriger Produzentenzellen	34
2.3.3 Prinzip der Rezeptorklonierung	35
2.4 Analysen mit kultivierten eukaryotischen Zellen	36
2.4.1 Transfektion von Säugerzellen	36
2.4.2 Infektion von Säugerzellen	36
2.4.3 Transduktion von Säugerzellen	36
2.4.4 Bestimmung des Vektortiters	37
2.4.5 Aktivitätsbestimmung der reversen Transkriptase (RT-Test)	37
2.4.6 Analytische Durchflußzytometrie GFP-positiver Zellen	38
2.4.7 Hemmung der Glykolisierung mit Tunicamycin	38
2.4.8 Neutralisation der Pseudotypvektoren durch spezifische Antikörper	38
2.5 Proteinchemische Methoden	39
2.5.1 Indirekte Immunfluoreszenzanalysen an Säugerzellen	39

2.5.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
2.5.3	<i>In vitro</i> Transkriptions-/Translations-Assay	40
2.6	Molekularbiologische Methoden	40
2.6.1	Verwendung der „ <i>large white</i> “-Bibliothek	40
2.6.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	40
2.6.3	Isolierung von BAC DNA durch CsCl-Gradientenzentrifugation	41
2.6.4	Isolierung genomischer DNA aus Blut	42
2.6.5	Isolierung genomischer DNA aus kultivierten Säugerzellen	42
2.6.6	Isolierung von Total-RNA aus Säugerzellen	42
2.6.7	Isolierung von mRNA aus Total-RNA	42
2.6.8	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	43
2.6.9	Agarosegelelektrophorese von DNA	43
2.6.10	Agarosegelelektrophorese von RNA	43
2.6.11	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	44
2.6.12	Dephosphorylierung von DNA	44
2.6.13	Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren	44
2.6.14	Ligation	44
2.6.15	T/A-Klonierung von PCR-Amplifikaten	44
2.6.16	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	45
2.6.17	Inverse PCR zur Bestimmung der genomischen Flanken der PERV-Proviren	45
2.6.18	DNA Sequenzierung	46
2.6.19	Herstellung einer 293-cDNA-Bibliothek	47
2.7	Phylogenetische Analysen	47
2.7.1	Phylogenetische Einordnung von PERV im Verhältnis zu anderen C-Typ-Retroviren	47
2.7.2	Altersabschätzung von PERV anhand der „ <i>molecular clock</i> “	48
2.8	Grundprinzipien der durchgeführten Untersuchungen	48
2.9	„Accession numbers“ der verwendeten Sequenzen	49
2.10	Verwendete Oligonukleotide	50
2.11	Verwendete Vektoren	53
3	ERGEBNISSE	55
3.1	Anwendungen von GFP-exprimierenden PERV- Pseudotyp-Vektoren	55
3.1.1	Bestimmung des Wirtszelltropismus der zwei polytrophen PERV-Klassen	55
3.1.2	Transduktionskinetik von PERV auf verschiedenen Zelllinien	59
3.1.3	Einfluß des Glykolisierungsstatus auf die Rezeptor-Hüllprotein-Interaktion	62
3.1.4	Neutralisation der Pseudotypvektoren durch spezifische Antikörper	63
3.2	Untersuchungen am R-Peptid des PERV-Hüllproteins	66
3.3	Rezeptorklonierung	68
3.4	Lokalisierung und Expression replikations-kompetenter PERV	71
3.4.1	Genetische Struktur der nativen PERV-Klone aus der „ <i>large white</i> “-Bibliothek	71
3.4.2	Genetische Merkmale der PERV LTR	73
3.4.3	Untersuchungen zur PERV-Expression und PERV-Replikation	76
3.5	Polymorphismen von PERV	82
3.5.1	Bestimmung der flankierenden genomischen Sequenzen	82
3.5.2	Prävalenz von PERV in unterschiedlichen Schweinesubspezies	82
3.5.3	Intravirale Polymorphismen	87
3.6	Phylogenetische Untersuchungen zu PERV	88
3.6.1	Einordnung von PERV im Verhältnis zu anderen C-Typ-Retroviren	88

3.6.2	Altersabschätzung von PERV im Rahmen der „ <i>molecular clock</i> “-Hypothese	90
3.7	Polymorphismen von HERV-K(C7)	94
4	DISKUSSION	97
4.1	Anwendung der PERV-Pseudotypvektoren	97
4.1.1	Wirtszelltropismus	97
4.1.2	Bedeutung des R-Peptids	97
4.1.3	Transduktionskinetik	98
4.1.4	Neutralisation durch Antikörper	99
4.1.5	Rezeptorklonierung	100
4.2	Molekulare Charakterisierung replikations-kompetenter PERV	101
4.2.1	Struktur der nativen Proviren	102
4.2.2	Infektiösität der Proviren	103
4.2.3	Flankierende chromosomale Sequenzen	104
4.2.4	Lokalisierung der replikations-kompetenten Proviren	105
4.2.5	Prävalenz von PERV in verschiedenen Schweinerassen	105
4.2.6	Intravirale Polymorphismen	107
4.2.7	Bedeutung der Isolation nativer PERV-Sequenzen	107
4.3	Phylogenetische Untersuchung von PERV	108
4.3.1	Verwandtschaftsbeziehungen zwischen C-Typ-Retroviren	108
4.3.2	„Altersbestimmung von PERV“	108
4.4	Polymorphismen von HERV-K(C7)	111
5	GEFAHRENABSCHÄTZUNG VON PERV IM RAHMEN EINER MÖGLICHEN THERAPEUTISCHEN XENOTRANSPLANTATION	113
6	ZUSAMMENFASSUNG	116
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	118
8	LITERATURVERZEICHNIS	121
9	LEBENS LAUF	134

1 Einleitung

1.1 Retroelemente

Alle eukaryotischen Zellen tragen in ihren Genomen eine Vielzahl von Sequenzen, die Ähnlichkeiten (sei es in struktureller oder funktioneller Weise) mit exogenen, infektiösen Retroviren aufweisen oder bei denen es sich um revers transkribierte und dann ins Genom integrierte zelluläre mRNA-Moleküle handelt (Brosius, 1991; Boeke and Stoye, 1997). Diese als Retroelemente bezeichneten Sequenzen sind alle durch reverse Transkription, also die Umschreibung von RNA in DNA, entstanden und bilden Schätzungen zufolge etwa 43-45% des eukaryotischen Genoms (Löwer et al., 1996; Li et al., 2001; McPherson et al., 2001).

Die Retroelemente werden nach dem Vorkommen bestimmter Strukturelemente (u.a. Kodierungskapazität für endogene oder exogene Proteine, z.B. der reversen Transkriptase (RT), sowie zellulären oder viralen Promotorsequenzen (z.B. *long terminal repeats* (LTR's)) in verschiedene Klassen eingeteilt, darunter Pseudogene, Retrogene, Retroposons, Retrotransposons und Retroviren. Diese Einteilung ist unter Darstellung der relevanten Strukturmerkmale sowie des hypothetischen Evolutionsverlaufs in Abbildung 1-1 schematisch dargestellt.

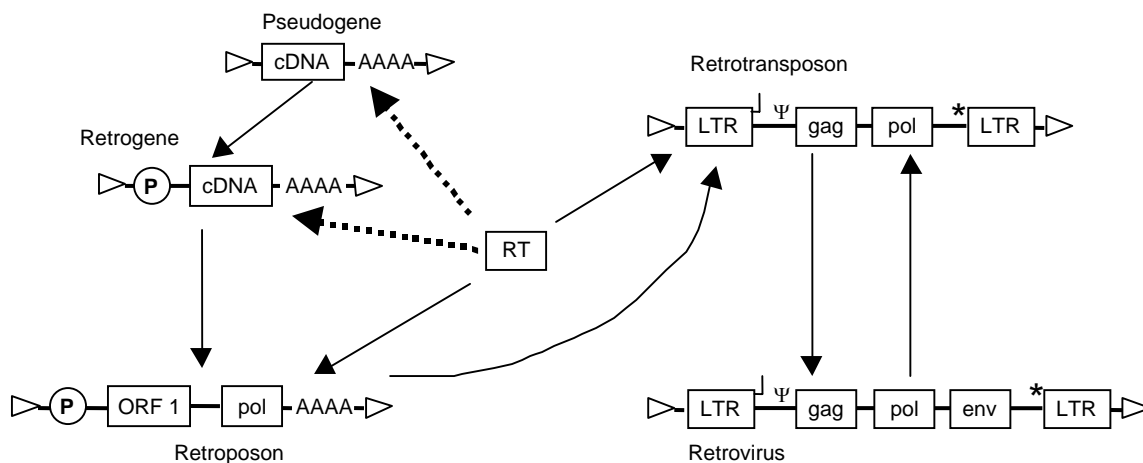


Abbildung 1-1 Klassifizierung und Evolution der Retroelemente

Schematische Darstellung der Struktur der wichtigsten Retroelemente und ihrer putativen Evolution. Gestrichelte Pfeile bedeuten eine Bildung der genetischen Elemente durch reverse Transkription, während durchgezogene Pfeile den Erwerb neuer Elemente durch Rekombination zeigen. Weitere Erläuterungen finden sich im Text. LTR: long terminal repeat; *gag*: Kapsidprotein-Gen; *pol*: Polymerase-Gen mit Kodierungskapazität für RT, RNase H und Integrase; *env*: Hüllproteingenen; \downarrow : Primerbindungsstelle (PBS); $>$: direkte Sequenzwiederholung; \textcircled{P} : Promotor; *: Polypurintrakt; Ψ : retrovirales Verpackungssignal. (Aus: Löwer et al., 1996).

Pseudogene sind prozessierte, zelluläre Gene, die revers transkribiert und dann wieder in das Genom integriert wurden. Da ihnen jegliche Promotorsequenzen fehlen,

sind sie transkriptionell inaktiv (Petrov et al., 2000). Ist noch ein zellulärer Promotor vorhanden, so werden Pseudogene auch als Retrogene bezeichnet (Löwer et al., 1996). Hierzu zählen vor allem die „*short interspersed nuclear elements* (SINE´s), die beim Menschen etwa 13% des Genoms ausmachen (Li et al., 2001; McPherson et al., 2001). Einige Vertreter der SINE´s leiten sich von partiell deletierten HERV-K LTR´s ab (Ono et al., 1987).

Ein weiteres Retroelement sind die Retroposons mit den LINE´s (*long interspersed nuclear elements*) als ihre Hauptvertreter. Im Vergleich zu den SINE´s sind die humanen LINE´s mit ~6 Kilobasen (kb) deutlich größer und besitzen einen internen RNA-Polymerase-II-Promotor (Swergold, 1990), zwei offene Leserahmen (ORF; (Dombrovski et al., 1991) und am 3´-Ende eine Polyadenylierungssequenz (Boeke and Stoye, 1997). Der erste offene Leserahmen kodiert für ein RNA-bindendes Protein mit noch unbekannter Funktion, welches je nach Spezies als Leucin-Zipper oder Zinkfinger bezeichnete Motive enthält (Covey, 1986; Holmes et al., 1992). Der zweite offene Leserahmen kodiert für die reverse Transkriptase (Ivanov et al., 1991) und ist somit adäquat zum *pol*-Gen der Retrotransposons und Retroviren. Höchstwahrscheinlich nutzen Pseudogene und SINE´s die von Retrotransposons *in trans* bereitgestellte Transpositionsmaschinerie (Weiner, 2000).

Im humanen Genom gibt es drei verschiedene LINE-Familien (L1-L3), die zusammen mit etwa 10^6 Kopien ungefähr 20% des Genoms ausmachen (Li et al., 2001). Allerdings sind nur 30-60 L1-Elemente aktiv (Sassman et al., 1997), während die anderen LINE-Vertreter durch Punktmutationen oder Deletionen defekt sind (Hutchinson et al., 1989).

Transpositionelle Aktivität von Säuger-LINE´s konnte sowohl für die Keimbahn (Katzir et al., 1985; Kazazian et al., 1988; Bratthauer and 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 (Morse et al., 1988; Miki et al., 1992) gezeigt werden. LINE-ähnliche Sequenzen finden sich zudem in fast allen eukaryotischen Organismen (Eickbush, 1992) mit Ausnahme der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) (Boeke and Stoye, 1997).

Retrotransposons gleichen Retroviren bis auf die Tatsache, daß sie kein für das Hüllprotein kodierendes Gen (*envelope-Gen* (*env*)) besitzen und somit ebenso wie SINE´s, LINE`s und Retroposons nicht infektiös sind. Gemeinsam mit den Retroviren sind den Retrotransposons die LTR´s, die Promotorsequenzen beinhalten (Löwer et

al., 1996), eine primerbindende Sequenz („*primer binding site*“, PBS), der Polypurintrakt (PPT) für die Umschreibung von RNA in DNA (Boeke and Stoye, 1997), sowie das Verpackungssignal (ψ , „*psi site*“), welches für die Einlagerung viraler RNA in zytoplasmatische, virusähnliche Partikel („*viruslike particles*“, VLP's, (Löwer et al., 1996)) verantwortlich ist. Weitere Gemeinsamkeiten finden sich im Mechanismus der Transposition via reverser Transkriptase. Aus diesen Gründen werden Retrotransposons auch entweder als evolutionäre Vorläufer oder deletierte Überreste von Retroviren angesehen (Temin, 1980; Löwer et al., 1996).

Name	Beschreibung
endogenes Retrovirus	Als Provirus in Zellen der Keimbahn integriertes Retrovirus. Durch endogenen Replikationszyklus anfällig für Defekte und deshalb oftmals nicht infektiös.
Retrotransposon	Verbindung zwischen RT und Genen, deren Proteine das Potential zur Selbstaggregation haben. Diese Proteine bilden das Äquivalent zum viralen Kapsid und verpacken das Retrotransposon.
Retroposon (LINE's)	LTR-freies Retrotransposon, das gewöhnlich einen poly(A)-Trakt oder eine ähnliche Struktur am 3'Ende aufweist. Viele sind mit Sequenzwiederholungen in der Wirts-DNA assoziiert und besitzen einen GC-reichen Promotor.
Pararetroviren	Infektiöse DNA-Viren, die über RNA-Intermediate replizieren.
Pseudogene	Seltene Re-Integration revers transkribierter zellulärer mRNA's.
Retrogen	Pseudogene, die über Promotorsequenzen verfügen und deshalb aktiv transkribiert werden, bezeichnet man als Retrogen.
SINE's (Alu)	SINE's ähneln den Retrogenen, besitzen aber keine Kodierungskapazität.
solitäre LTR	Rekombination und daraus folgende Excision der inneren Sequenzen führt zur Bildung solitärer LTR's
Retrointron	Intron mit einer Kodierungskapazität für RT. Diese scheint auch eine Intronmobilität zu ermöglichen.
Retrotranskript	Elemente, die nicht für RT kodieren und anscheinend über RNA-Intermediate transponieren. Werden durch Pol II oder Pol III transkribiert und sind zur Mobilisierung von Retrotransposons abhängig.
Retron	Ungewöhnlich verzweigte Nukleinsäure mit DNA- und RNA-Anteilen.

Tabelle 1-1 Nomenklatur der Retroelemente

Aufgeführt sind die wichtigsten Retroelemente mit einer kurzen Beschreibung. Mit Veröffentlichung und Analyse der „*draft*“-Sequenz des humanen Genoms (McPherson et al., 2001) wird der Überblick über Anzahl, Verteilung und Funktion dieser Elemente genauer werden. Sequenzen der humanen endogenen Retroviren und anderer Retroelemente machen bis zu 8% des menschlichen Genoms aus (Lander et al, 2001).
Verändert nach Boeke und Stoye (1997) sowie nach Löwer et al. (1996).

Ein zweiter Leserahmen kodiert bei den Retrotransposons für ein Protein, welches in seiner Funktion dem retroviralen Kapsidprotein (kodiert durch das *group specific antigen* (*gag*-Gen) entspricht und für die strukturelle Bildung der VLP's verantwortlich ist.

Im humanen Genom existieren über 200.000 Retrotransposons, die hier als „*transposon-like human elements*“ (THE) bezeichnet werden, und die bei einer Größe von 2-3 kb keinerlei erkennbare ORF's aufweisen (Paulson et al., 1985; McPherson et al., 2001). Daneben wurden Sequenzen des humanen endogenen Retrovirus vom Typ H (HERV-H) beschrieben, die in ihrer Struktur den Retrotransposons entsprechen (Mager and Henthorn, 1984).

1.2 Retroviren

Retroviren stellen die komplexesten Vertreter der Retroelemente dar. Neben den bereits beschriebenen Genen für *gag* und *pol* findet sich hier das *env*-Gen, daß für ein Hüllprotein kodiert, welches dem Virus durch Interaktion mit einem zellulären Rezeptor den Eintritt in seine Wirtszelle ermöglicht (Löwer et al., 1996). Somit sind die Retroviren in der Lage, infektiöse Partikel zu bilden. Die Genomstruktur, 5'LTR-*gag-pro-pol-env*-3'LTR (siehe Abbildung 2-1 C) wie sie bei den einfachen Retroviren vorliegt, ist im Prinzip bei allen Retroviren gleich (Teich, 1984; Coffin, 1992). Einige komplexe Retroviren, wie z.B. das humane Immundefizienz-Virus (HIV) oder das humane T-lymphotrope Virus (HTLV) besitzen aber noch einige zusätzliche Gene, die für regulatorische oder akzessorische Proteine kodieren und die durch alternatives Spleißen bereitgestellt werden (Coffin, 1992). Das retrovirale Genom weist außerdem vier unter den Viren einzigartige Eigenschaften auf:

1. ein diploides Genom
2. zur Replikation werden ausschließlich Proteine der wirtszelleigenen Transkriptionsmaschinerie verwendet
3. eine spezifische zelluläre tRNA ist für die Replikation notwendig
4. ihr (+)-Strang-RNA-Genom dient nach der Infektion nicht sofort als mRNA-Vorlage zur Proteinsynthese

Die ersten Untersuchungen an Retroviren gelangen Anfang des 20. Jahrhunderts Pyton Rous, der 1911 das nach ihm benannte Rous-Sarkoma-Virus (RSV) als das ursächliche Agens spontaner Sarcomata in Hühnern identifizierte (Rous, 1911). Dem vorausgegangen waren Versuche, bei denen Leukämie in Hühnern durch die Injektion zellfreier Gewebefiltrate übertragen werden konnte (Ellermann and Bang, 1908). Da aber Leukämien damals noch nicht als maligne Erkrankungen erkannt worden waren, fanden ihre Untersuchungen nicht dasselbe Echo wie die von Rous (Weiss, 1984). In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts folgte die Entdeckung von Retroviren in fast allen Eukaryoten (Herniou et al., 1998), aber erst 1964 formulierte Temin

die Hypothese der reversen Transkription (Temin, 1964), die 6 Jahre später durch die Entdeckung der reversen Transkriptase bestätigt wurde (Baltimore, 1970; Temin and Mizutani, 1970). Mit HTLV wurde das erste human-pathogene Retrovirus erst weitere 10 Jahre später entdeckt (Poiesz et al., 1980), aber bereits 1983 folgte die Entdeckung des humanen Immundefizienz-Virus (Barré-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1984).

1.2.1 Klassifikation der Retroviren

Die retroviralen Partikel weisen typischerweise einen Durchmesser von 90-140 nm auf und sind von einer Lipidmembran umgeben (Nermut and Hocley, 1996). Diese Lipidmembran entstammt den Wirtszellen und ist sowohl mit viralen als auch wirtseigenen Proteinen bedeckt, die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als sog. „spikes“ zu erkennen sind. Unter der Membran liegt eine als Matrix bezeichnete membranassoziierte Schale. Dieser Kern der Retroviren (Kapsid) weist entweder eine zylindrische, konische oder ikosaedrische Form auf (Nermut and Hocley, 1996). Das Kapsid enthält neben den viralen Enzymen reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PRO) den Ribonukleoproteinkomplex, der sich aus dem viralen Genom und dem Nukleokapsid zusammensetzt. Eine schematische Darstellung eines typischen retroviralen Genoms bzw. retroviralen Partikels ist in Abbildung 1-2 dargestellt.

Zu der Klasse der Viren, die ein RNA-Genom revers in DNA umschreiben (transkribieren), gehören laut „*International Committee on Taxonomy of Viruses*“ (ICTV)¹ drei Familien: die *Retroviridae*, die *Metaviridae* und die *Pseudoviridae*, wovon die beiden letzteren lediglich Pilze und Invertebraten als Wirte benutzen (Regenmortel et al., 2000).

Im Elektronenmikroskop lässt sich die Klasse der *Retroviridae* auf Grund ihrer Morphologie in vier Typen einteilen (Teich, 1984):

1. Viren des **A-Typ** liegen nur als intrazelluläre Partikel vor und besitzen keine Infektiosität.
2. Viren des **B-Typ** zeichnen sich durch die Bildung zytoplasmatischer toroidaler Strukturen an der Knospungsstelle aus und reife Partikel besitzen elektronendichte, exzentrische Kerne.
3. Zum **C-Typ** gehören die meisten der bis heute isolierten Retroviren. Kennzeich

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/>

nend für diese Gruppe ist, daß bis zum Knospen der Partikel keine zytoplasmatischen Virusstrukturen erkennbar sind. Reife C-Typ-Viren besitzen zentrale, elektronendichte Kerne. Die C-Typ-Viren werden noch in zwei Untergruppen unterteilt, in die Retroviren der Vögel und Säuger, sowie in die Lentiviren, zu denen auch HIV zu zählen ist.

4. Retroviren des **D-Typ** zeigen Ähnlichkeiten zu den B-Typ-Viren, reife Partikel unterscheiden sich aber durch kürzere „spikes“ auf der Oberfläche.

Nach morphologischen Kriterien sowie der evolutionären Verwandtschaft werden die *Retroviridae* in sieben Gattungen unterteilt, die in Tabelle 1-2 aufgelistet sind.

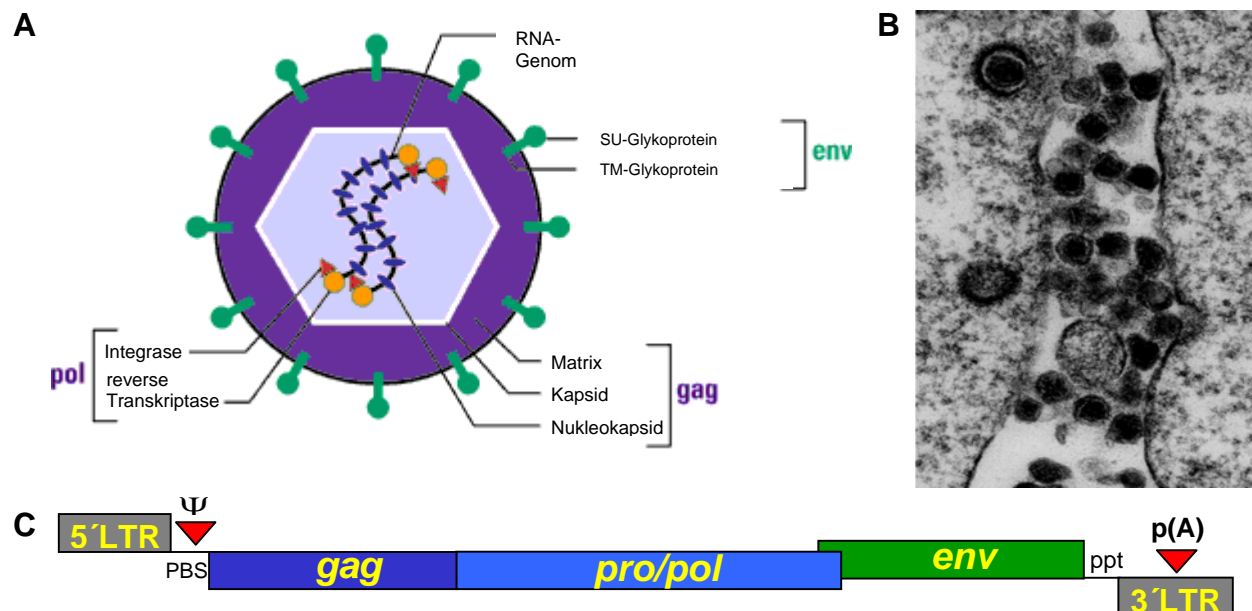


Abbildung 1-2 Darstellung der Genom- und Partikelstruktur eines generalisierbaren gamma-Typ Retrovirus.

Die durch die viralen Leserahmen kodierten Proteine sind in der Abbildung durch Klammern zusammengefaßt und in derselben Farbe gezeichnet wie das entsprechende Gen im Provirus-Schema (C). Im reifen Viruspartikel liegt das RNA-Genom mit Nukleokapsidproteinen assoziiert vor. **A:** Schematischer Aufbau eines retroviralen Partikels. **B:** Elektronenmikroskopische Darstellung eines PERV-Partikels, gefärbt mit Immungold-Markierung gegen Gag p10. Die Aufnahme wurde von Dr. Klaus Boller (Paul-Ehrlich-Institut) gemacht (Niebert and Tönjes, im Druck). **C:** Darstellung des Genoms einfacher Retroviren. LTR: long terminal repeat; PBS: Primerbindungsstelle („primer binding site“); gag, gruppenspezifisches Antigen (group specific antigen); pro/pol Protease/Polymerase Poly-protein; env, virales Hüllprotein (envelope); ψ : virales Verpackungssignal („psi site“).

ICTV-Nomenklatur	Typspezies	Struktur	Genom
Alpharetroviren	RSV	C-Typ	simpel
Betaretroviren	Mason-Pfizer monkey virus	C-Typ	simpel
Gammaretroviren	MMTV	B-Typ	simpel
Deltaretroviren	HTLV	B-Typ	simpel
Epsilonretroviren	MLV	C-Typ	komplex
Lentiviren	HIV-1, HIV-2	C-Typ	komplex
Spumaviren	Foamyvirus (Schimpanse)	B-Typ	komplex

Tabelle 1-2 Klassifizierung der Retroviridae

Die Tabelle zeigt die von der ICTV eingeteilten Gattungen der Retroviridae. Abkürzungen: RSV, Rous Sarcoma Virus; HIV, Humanes Immundefizienz-Virus; MLV, Murines Leukämie Virus; MMTV, Mouse Mammary Tumor Virus; HTLV, humanes T-lymphotropes Virus.

1.2.2 Retroviren als Vektoren

Retroviren werden auf Grund ihrer Spezifität beim Zelleintritt auch als Gentransfervektoren benutzt, um therapeutische Sequenzen gezielt in definierte Zielzellen einzubringen. Aus Sicherheitsgründen muß man allerdings die Replikationsfähigkeit des Virus einschränken oder ganz ausschalten. Letzteres erreicht man, indem man die Leserahmen der viralen Gene auf verschiedene Plasmide aufteilt, von denen nur eins das virale Verpackungssignal (ψ) besitzt. Dieses Verpackungsplasmid trägt idealerweise auch noch einen genetischen Marker (z.B. „*Green Fluorescent Protein*“ (GFP) oder eine Antibiotikaresistenz) sowie das therapeutische Gen. Stammt das *env*-Gen nicht vom gleichen Virus wie die Gene für *gag* und *pol*, so spricht man von pseudotypisierten Partikeln. Die Herstellung und Verwendung pseudotypisierter Viren in dieser Arbeit wird im Detail in Kapitel 2.3 sowie in der Abbildung 2-1 dargestellt. In dieser Arbeit werden die Pseudotyp-vektoren allerdings nicht zum Gentransfer, sondern lediglich als analytisches Werkzeug benutzt.

1.3 Endogene Retroviren

Als endogene Retroviren (ERV) bezeichnet man die Vertreter der Retroviren, deren Genome im Laufe der Evolution Zellen der Keimbahn infiziert haben und sich dort ins Wirtsgenom integrieren konnten. Abgesehen von wenigen Ausnahmen, z.B. MMTV (Wilkinson et al., 1994), fehlt den endogenen Retroviren ein exogener Lebenszyklus und die Vermehrung dieser Viren geschieht ausschließlich durch die Vermehrung der Wirtsspezies, da die Viren vertikal von Generation zu Generation entsprechend den Mendel'schen Regeln mit der Erbinformation des Wirtes weitergegeben werden (Coffin, 1984). Sie zeigen aber, evolutionär betrachtet, keine stabile Assoziation mit ihrem Wirt (Coffin, 1984). Das Fehlen eines exogenen Lebenszyklus unterbindet in

der Regel die horizontale Verbreitung durch Infektion, exogene Faktoren können aber zu einer Reaktivierung der Infektiösität führen (Reddehase et al., 2002; Kutsch et al., 2002; Arcenas and Widen, 2002).

Mittlerweile wurde für eine Vielzahl von Vertebraten die Existenz endogener Retroviren nachgewiesen (Herniou et al., 1998), wobei die meisten für ihren Wirt apathogen sind (Coffin, 1984).

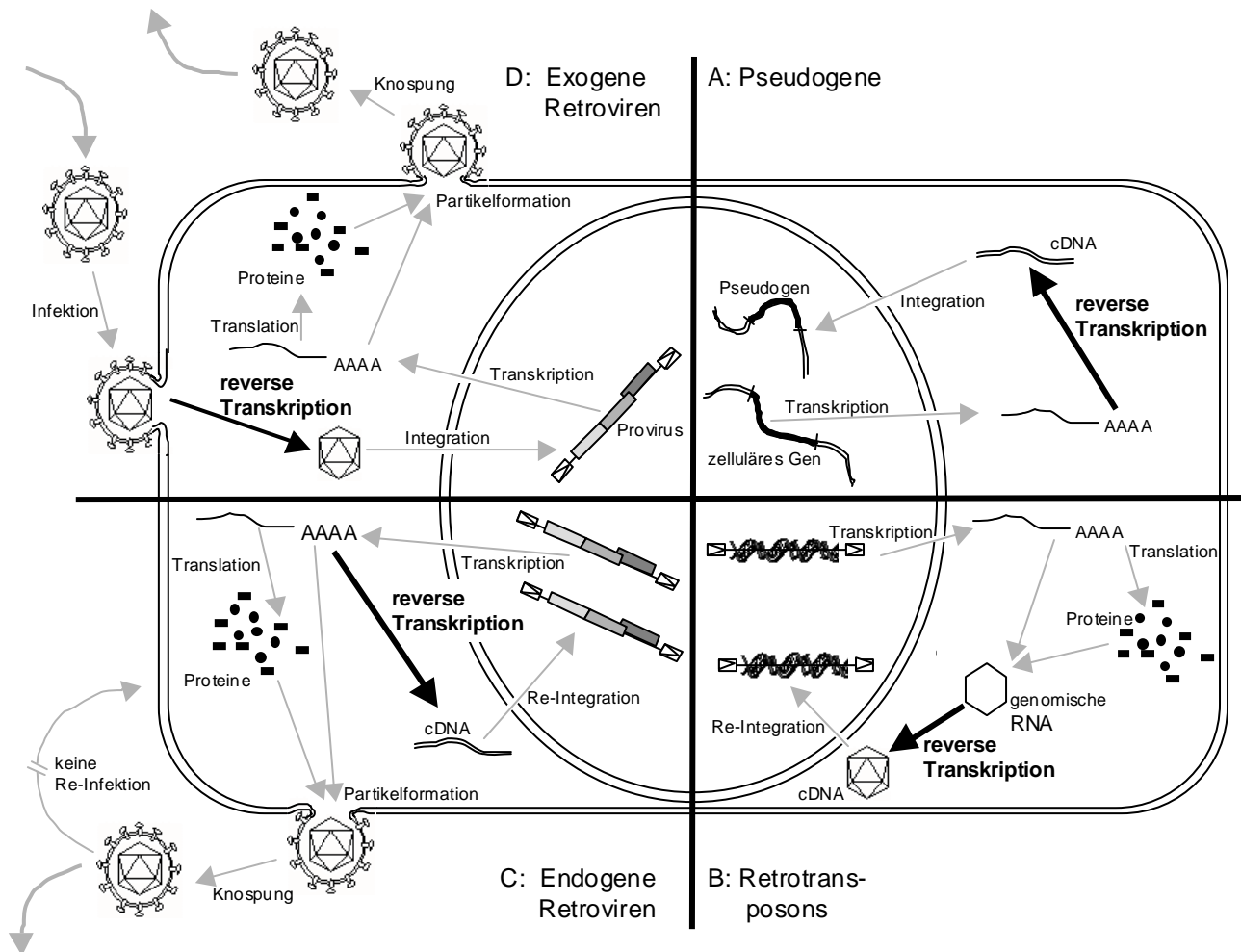


Abbildung 1-3 Lebenszyklus der Retroelemente

A. Entstehung von Pseudogenen. **B.** Transposition von Retrotransposons. **C.** Expression und Amplifikation von endogenen Retroviren. **D.** Replikationszyklus exogener Retroviren. Aus: Löwer et al. (1996)

1.3.1 Humane endogene Retroviren

Während etwa 10% des humanen Genoms aus revers transkribierten und transponierten Sequenzen besteht (Baltimore, 1985), beanspruchen die humanen endogenen Retroviren (HERV) mit einer Reihe diverser Familien, z.B. HERV-E (Repaske et al., 1983), HERV-H (Mager and Henthorn, 1984), HERV-I (Maeda et al., 1985) HERV-R (O'Connel et al., 1984), HERV-K (Ono et al., 1986) und HERV-W (Blond et al., 1999) etwa 8% des menschlichen Genoms (Lander et al, 2001). Die HERVs be

sitzen wie die anderen Retroelemente die Fähigkeit zu transponieren und können somit ihre eigene Struktur und Funktion oder die des gesamten Genoms verändern und werden als eine treibende Kraft der menschlichen Evolution betrachtet (Kambhu et al., 1990; Zhu et al., 1994).

Es gibt zwei Theorien, die die Herkunft der HERVs zu erklären versuchen. Nach gängiger Lehrmeinung haben sich zu verschiedenen Zeiten der Primatenevolution exogene Vorläufer der HERVs in Zellen der Keimbahn integriert und replizieren seither zusammen mit den übrigen Genen des Wirtes. Dies erklärt die hohe Zahl der defekten HERVs, da durch die vertikale Verbreitung des Virus keine Notwendigkeit besteht, die Integrität des viralen Genoms beizubehalten (Logg et al., 2001). Durch Vergleich der Integrationsorte in verschiedenen Spezies des Primaten-Stammbaums lassen sich nützliche Erkenntnisse über die Evolution dieser Sequenzen, benachbarter Gene oder des Menschen selbst gewinnen (Arvidsson et al., 1995; Svensson et al., 1995). Schließlich stellt sich hier aber die Frage, warum ein hochinfektiöses Virus (eine Tatsache, die man aus der hohen Anzahl verschiedener Integrationsorte und Subtypen schließen kann) nicht aus der Wirtspopulation entfernt wurde? Einige Anhaltspunkte kann man aus Vergleichen mit verwandten Tiermodellen (MMTV, JSRV, BaEV) gewinnen, wo die Viren exogene sowie endogene Vermehrungswege besitzen. In all diesen Systemen verleihen die endogenisierten Viren ihren Wirten durch den einen oder anderen Mechanismus eine gewisse Resistenz gegenüber verwandten Viren (Todaro et al., 1980; Acha-Orbea et al., 1991; Golovkina et al., 1992; Fan and Peden, 1992; Imai et al., 1994; van der Kuyl et al., 1995).

Die zweite Hypothese wurde von Temin aufgestellt und postuliert, daß sich komplexe Retroelemente fortlaufend aus primitiveren Vorläufern entwickeln (Temin and Mizutani, 1992).

Die biologisch aktivste Gruppe der humanen endogenen Retroviren bildet HERV-K, deren Vertreter für alle viralen Proteine kodieren (Löwer et al., 1993; Löwer et al., 1995) und diese *in vivo* in hoher Konzentration in Keimbahnzell-Tumoren exprimieren. Zu HERV-K zählen 25-50 Vollängenviren (Ono et al., 1986) und zusätzlich etwa 10.000 über das gesamte Genom verstreute solitäre LTRs (Leib-Mösch et al., 1993). Die bei HERV-K in der Form von B/D-Typ-Retroviren organisierten Gene von *gag*, *pro* und *pol* liegen in drei überlappenden Leserahmen und benötigen zwei „frameshift“-Ereignisse für die Translation des Gag-Pro-Pol-Vorläuferproteins. Der *env*-Leserahmen überlappt teilweise mit *pol*, wird aber durch alternatives Spleißen

einzelnen abgelesen. Des Weiteren kodiert das HERV-K-Genom für mindestens zwei akzessorische Proteine, cORF (Löwer et al., 1993; Löwer et al., 1995) und np9 (Armbruster et al., 2002), deren mRNAs durch alternatives Spleißen erzeugt werden. Die Funktion von cORF ist die eines nukleolären Lokalisierungssignals und ähnelt damit in Funktion wie auch Form dem lentiviralen Rev-Protein. Die genaue Funktion von np9 ist unbekannt, aber ihm wird eine dominante Rolle bei der malignen Entartung zugeschrieben, da eine np9-Expression ausschließlich in Tumorgewebe, nicht aber in normalen Zellen nachgewiesen werden kann (Armbruster et al., 2002).

1.3.2 Porcine endogene Retroviren

In den 70er Jahren wurden erstmals C-Typ-Viruspartikel in Kulturen stabiler Nierenkarzinomzelllinien des Schweins nachgewiesen (Breese, 1970; Armstrong et al., 1971). Im Anschluß an den Nachweis, daß es sich bei den Beobachtungen um Partikel endogener Retroviren handelt (Todaro et al., 1973), erfolgte in jüngerer Zeit die molekulare Charakterisierung und der Nachweis, daß porcine endogene Retroviren (PERV) humane Zellen infizieren können (LeTissier et al., 1997; Patience et al., 1997; Czauderna et al., 2000).

Zellfreier Kulturüberstand der porcinen Zelllinien PK15 und MPK, die spontan endogene C-Typ-Retroviren freisetzen (Armstrong et al., 1971; Torado et al., 1973; Moening et al., 1974) wurden verwendet, um für Infektionen susceptible Zelllinien zu charakterisieren. Hierbei zeigte sich, daß Überstand der Zelllinie PK15 Zelllinien vieler verschiedener Spezies, darunter auch menschliche, infizieren kann (Patience et al., 1997), während mit Überstand der Zelllinie MPK nur wieder porcine Zelllinien infiziert werden können. Durch Verwendung mit PERV-Hüllproteinen pseudotypisierter MLV-Partikel konnte das Wissen über das Wirtszellspektrum erweitert werden (Takeuchi et al., 1998). In der letzten Zeit konnten aus verschiedenen primären porcinen Zellen (mit und ohne mitogene Stimulation) PERV Partikel isoliert werden, die für humane Zellen infektiös sind (Wilson et al., 1998) und es zeigte sich, daß sich primäre humane Endothelzellen produktiv mit PERV infizieren lassen (Martin et al., 2000).

Derzeit sind vier Klassen von PERV (bezeichnet als A-D) bekannt, die sich in den Genen für das Hüllprotein unterscheiden und unterschiedliche Wirtszellspezifitäten aufweisen (LeTissier et al., 1997; Akiyoshi et al., 1998; Takeuchi et al., 1998; Patience et al., 2001). Das Wirtszellspektrum wurde in Pseudotypisierungsversuchen untersucht, wobei PERV-A und PERV-B polytrope Eigenschaften zeigen, d.h. viele

verschiedene Zelllinien verschiedener Spezies können infiziert werden, während PERV-C ein nur auf porcine Zellen beschränktes Wirtsspektrum zeigt und deshalb als ecotrop bezeichnet wird (Takeuchi et al., 1998). Von PERV-D sind bisher nur 275 Nukleotide der *env*-Sequenz bekannt (Patience et al., 2001).

Die Anzahl der proviralen Integrationen in das porcine Genom wird mit 30-50 angegeben (Patience et al., 1997).

1.3.3 Derzeitiger Forschungsstand zu PERV

Das Interesse an PERV wurde vor allem durch die möglicherweise für einen Patienten ausgehende Gefährdung im Rahmen einer (noch hypothetischen) Xenotransplantation (XTx), also der Übertragung lebender Zellen, Gewebe oder Organe zu therapeutischen Zwecken von einer Spezies auf eine andere (UNOS, 1995), geweckt. Deshalb konzentrieren sich viele Untersuchungen auf die Analyse des Infektionsrisikos bei der XTx.

Abbildung 1-5 zeigt die Herkunft von PERV und erläutert die wichtigsten von PERV im Rahmen einer XTx ausgehenden Risiken. Auf die dargestellten Gefahren wird im folgenden Text noch ausführlicher eingegangen.

Ein besonderes Merkmal von PERV ist die LTR, die in zwei prinzipiell unterschiedlichen Strukturen vorkommt (Czuderna et al., 2000). Ein LTR-Typ weist eine markante 39-bp Sequenzwiederholung („*repeat*“) in U3 auf, die aus einem 18-bp und einem 21-bp „*subrepeat*“ besteht, wobei die Anzahl der 39-bp-Wiederholungen variieren kann (siehe Abbildung 1-4 B). So findet man z.B., daß sich die LTR durch Multimerisierung der „*repeats*“ dynamisch an neue Wirtszellen anpassen kann (Scheef et al., 2001) und daß die Anzahl der „*repeats*“ die Promotoraktivität der LTR stark beeinflusst, da sie als Enhancer wirken (siehe Abbildung 1-4 C und (Scheef et al., 2001)). Diese Beeinflussung der Promotorstärke wird durch die Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren, im Besonderen NF-Y, bewirkt (Scheef et al., 2001). Anfängliche Studien zeigen außerdem, daß sich die Promotoraktivität nicht durch in der Klinik üblicherweise verwendete Immunsuppressiva beeinflussen lässt (Scheef et al., 2002) Der zweite LTR-Typ weist zwar eine rudimentäre „*repeat*“-Struktur auf, doch bildet diese keine geschlossene Einheit und zeigt auch keine Anpassung an die Wirtszelle durch Multimerisierung.

In der Zwischenzeit wurden verschiedene Antikörper gegen die viralen Proteine Gag und Env generiert und auch in unterschiedlichen diagnostischen Ansätzen getestet (Galbraith et al., 2000; Krach et al., 2000; Tacke et al., 2001; Fischer et al., 2003).

Während diese Antikörper in der Zellkultur als äußerst nützliche Werkzeuge anzusehen sind, ist ihre Effizienz in der klinischen Diagnostik jedoch zumindest fraglich, da hier die zu detektierenden Proteinmengen möglicherweise weit unterhalb der Nachweisgrenze liegen und große Mengen an Fremdprotein die Untersuchungen noch weiter stören. Als probateres Mittel erscheinen in diesem Zusammenhang verschiedene PCR-Verfahren (Switzer et al., 1999; Langford et al., 2001), deren Anwendung jedoch auch nicht ganz unproblematisch ist. Obwohl Xenotransplantate vom Immunsystem des Empfängers in der Regel binnen kürzester Zeit abgestoßen werden, bleiben einzelne, als Mikrochimärismen bezeichnete zelluläre Aggregate im Organismus zurück, die dort Jahre existieren können (Paradis et al., 1999). Eine PCR, die versucht, PERV-Sequenzen nachzuweisen, muß deshalb unterscheiden können, ob die nachgewiesenen Sequenzen von einer produktiven Infektion stammen oder aus porcinen Zellen, deren Genom ja die viralen Sequenzen beherbergt.

Die große Sorge, daß PERV den Empfänger eines xenogenen Transplantats infizieren könnten, konnte bis heute in Tiermodellen nur unbefriedigend untersucht werden. Als bestes Indiz einer Übertragbarkeit gilt ein Versuch an NOD/SCID-Mäusen, denen PERV-produzierende porcine Pankreas-Inselzellen implantiert wurden (Van der Laan et al., 2000). In diesen Mäusen konnte eine Ausbreitung des Virus auf murines Gewebe nachgewiesen werden. Doch obwohl Xenotransplantatempfänger höchstwahrscheinlich stark immunsupprimiert werden müssen, ist der Vergleich mit den NOD/SCID-Mäusen nicht ganz passend, da diese überhaupt kein Immunsystem besitzen. Dieser Versuch wurde kürzlich wiederholt (Clemenceau et al., 2002), wobei den Mäusen zusätzlich humane Zellen implantiert wurden und auch eine Infektion dieser Zellen nachgewiesen werden konnte.

Alle anderen Tierversuche konnten bisher keine Infektion nachweisen. Bei diesen Experimenten wurden den Versuchstieren entweder direkt infektiöse Viren injiziert (Specke et al., 2001; Specke et al., 2002a; Specke et al., 2002b) oder es handelt sich um Tiere, an denen experimentelle Xenotransplantationen durchgeführt wurden (Martin et al., 1998; Martin et al., 2002). Im ersten Fall konnte höchstwahrscheinlich das teils auch supprimierte Immunsystem der Tiere die Infektion verhindern, während im zweiten Beispiel die Tiere nicht lange genug überlebt haben, damit eine produktive Infektion stattfinden konnte.

Ebenfalls konnte eine retrospektive Studie an 160 Menschen, die mit Xenotransplantaten oder extrakorporalen Perfusionen behandelt wurden, keine Infek

tion nachweisen (Paradis et al., 1999), wobei auch hier die Expositionszeit zu den Transplantaten mit wenigen Tagen bis Wochen recht kurz war. Allerdings konnten noch Jahre nach der XTx Mikrochimärismen nachgewiesen werden.

Die größte Befürchtung, daß PERV mit anderen endo- oder exogenen Viren rekombinieren könnte und so ein neues gefährliches Virus entsteht, wurde bis heute wegen der schwierigen experimentellen Voraussetzungen nur unzureichend untersucht. Die meisten Berichte, die sich mit diesem Thema beschäftigt haben, gehen jedoch von einem äußerst geringen Gefährdungspotential aus (Heneine et al., 1998; Martin and Steinhoff, 1999; Specke et al., 2002b).

Der zunehmende Mangel an Spenderorganen führt zu einer stetigen Verschärfung der Situation der Patienten auf den Wartelisten der Transplantationsorganisationen (Abbildung 1-6). Die XTx könnte zukünftig, wenn auch nicht ohne Probleme, zu einer Abmilderung dieser Situation führen. Historisch gesehen liegen erste Versuche zur XTx schon sehr weit zurück, wobei der erfolgreichste Versuch aus New Orleans berichtet wird. Dort überlebte eine Frau neun Monate nach Transplantation einer Schimpansenniere mit normaler Organfunktion, bevor sie an den Nebenwirkungen der Immunsuppression verstarb (Reemstma et al., 1964). Spätere Übertragungen von Primatenorganen wurden von den Empfängern nur für kurze Zeit überlebt (Bailey et al., 1985; Starzl et al., 1993).

Die Verwendung von Primaten als Organspender in der XTx wurde in mehreren Ländern durch die jeweiligen Aufsichtsbehörden in den letzten Jahren ausgeschlossen (z.B. in den USA durch die FDA, <http://www.fda.gov/cber/gdlns/xenoprim.pdf>), was dagegen die Forschung im Hinblick auf die Verwendung von Schweinen als Organspender verstärkte. Derzeit umfassen Studien, die die Verwendung von Schweinen in der XTx betreffen, u.a. die Implantation von fötalem, neuronalem Gewebe zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen wie Parkinson oder Huntington.

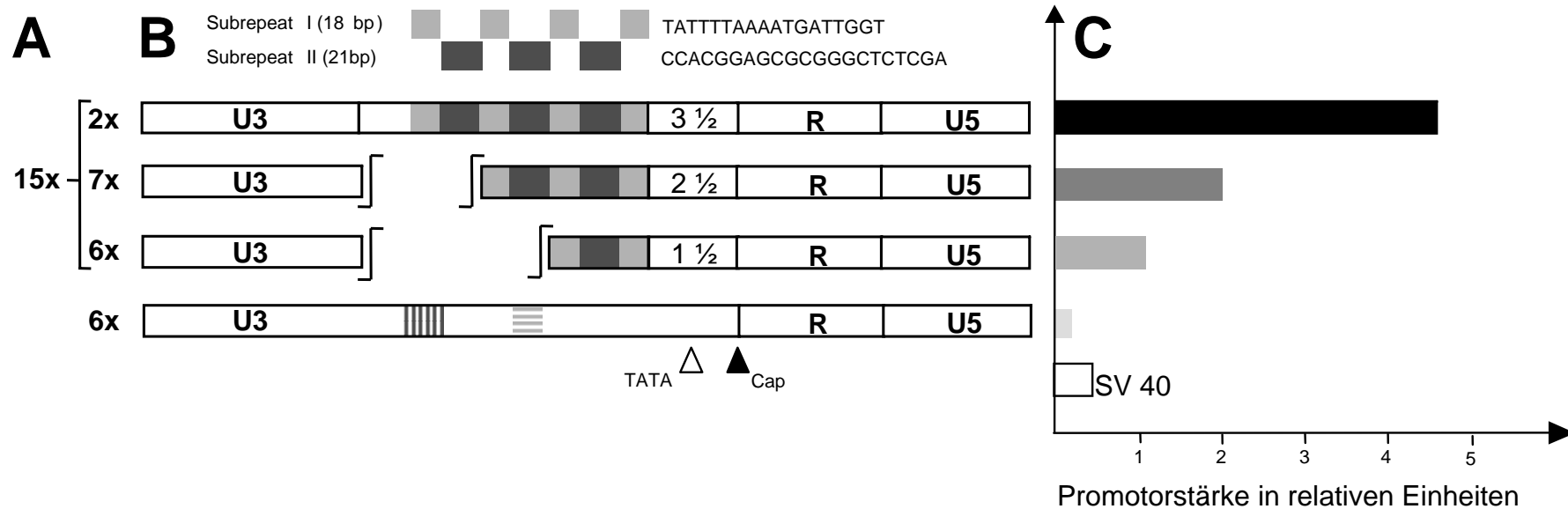


Abbildung 1-4 LTR-Struktur(en) porciner endogener Retroviren und deren Einfluß auf die transkriptionelle Aktivität

Die porcinen endogenen Retroviren weisen zwei prinzipiell unterschiedliche LTR-Strukturen auf, eine mit „repeat“-Struktur in U3 und eine ohne. Diese „repeat“-Struktur umfaßt 39 bp und besteht aus alternierenden Untereinheiten von 18 bp und 21 bp Länge. Die „repeats“ besitzen zahlreiche Bindungsstellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren, mit NF-Y als prominentesten Vertreter. Die Anzahl der „repeats“ beeinflusst die Promotoraktivität, wobei mehr „repeats“ zu einer Erhöhung der Promotorstärke führen. Allerdings geht in einigen Zelllinien diese einfache Korrelation verloren (Scheef et al., 2001).

Durch Vermehrung oder Verringerung der Anzahl der „repeats“ kann das Virus seine Transkriptionsaktivität regulieren und sich so an verschiedene Wirtszellen anpassen.

Die „repeat“-losen LTR´s weisen ebenfalls Sequenzbereiche auf, die homolog, aber nicht identisch zu den „repeat“-Untereinheiten sind und hier über U3 verteilt sind. Auch kommt es im Verlauf der viralen Replikation zu keiner Multimerisierung dieser Sequenzen.

Die in C gezeigte Promotoraktivität stellt nur schematisch das Verhältnis der unterschiedlichen PERV-LTR´s im Vergleich zueinander und mit dem SV40-Promotor dar. Die eigentlichen Experimente sind bei (Scheef et al., 2001) und (Scheef et al., 2002) nachzulesen.

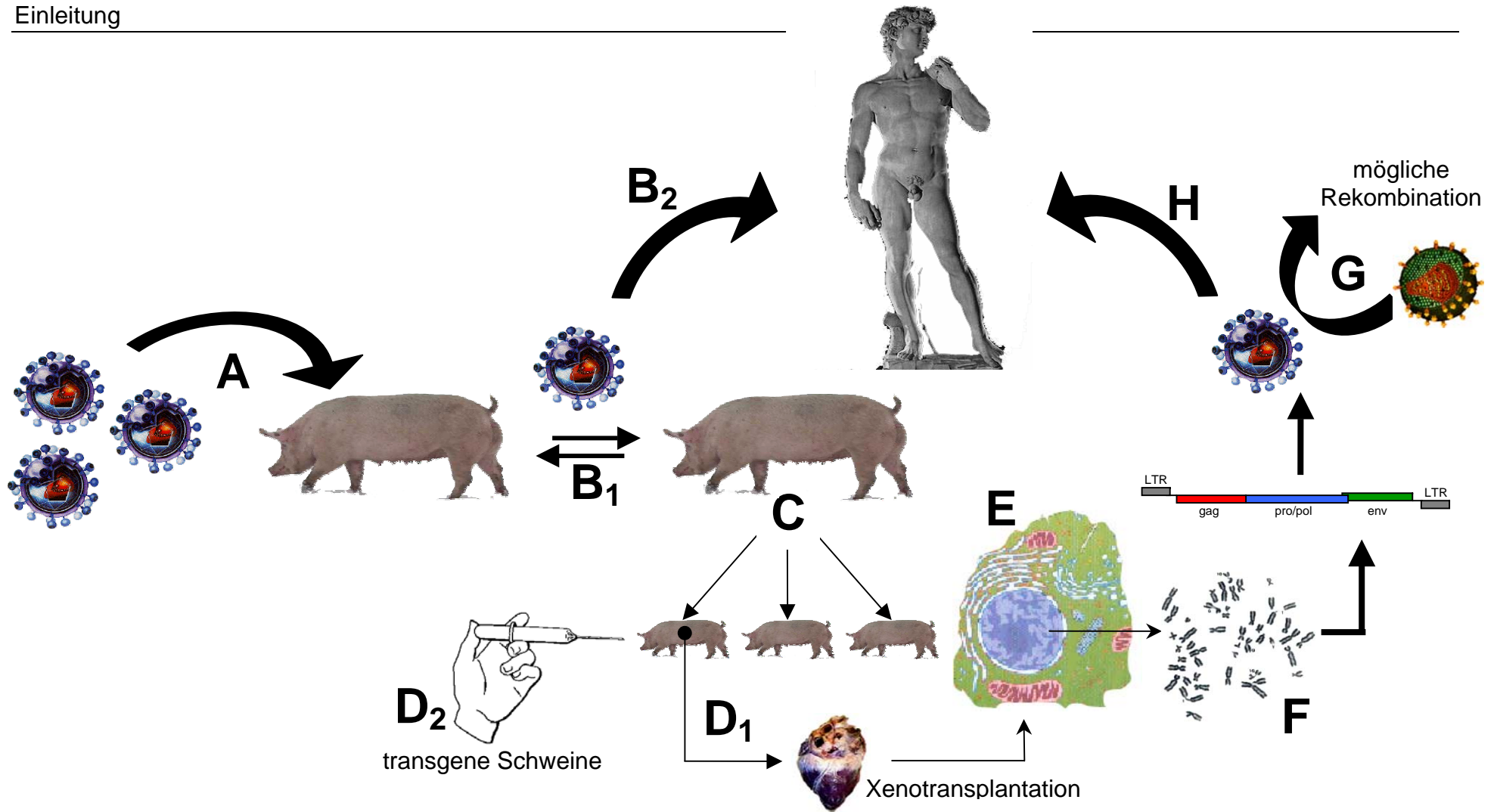


Abbildung 1-5 Lebenszyklus von PERV und mögliche heterologe Replikationswege

(A) Evolutionäre Vorläufer von PERV mit einem exogenen Lebenszyklus haben vor langer Zeit Schweine infiziert, wobei der Übertragungsweg (Blut, Tröpfcheninfektion usw.) nicht bekannt ist. (B₁). Seit damals konnte sich das Virus innerhalb einer Population horizontal ausbreiten, wobei nicht bekannt ist, ob diese (Re-)Infektionen auch noch heute stattfinden. Allerdings kann PERV *in vitro* menschliche Zellen produktiv infizieren, (B₂) jedoch konnten xenotrope Infektionen *in vivo* bisher nicht nachgewiesen werden.

(C) Nach Integration in die Keimbahn wird PERV vertikal von den Eltern auf den Nachwuchs übertragen und (E) ist somit in jeder Körperzelle präsent. Bei der XTx werden porcine Organe (D₁) zusammen mit den Proviren auf den Menschen übertragen und (D₂) bei Verwendung gentechnisch veränderter Tiere zur Verringerung der „host-vs.-graft“-Reaktion könnten diese künstlich integrierten immun-modulatorischen Eigenschaften auf das Virus übertragen werden, z.B. durch Inkorporation zellulärer Effektoren in die Virusmembran. Obwohl das porcine Genom etwa 30-50 provirale Kopien (insbesondere abhängig von der betrachteten Subspezies) auf unterschiedlichen Chromosomen beherbergt (F), ist nur ein Teil der Viren (G) funktionell (H), d.h. infektiös, replikations-kompetent und polytrop.

Werden porcine Zellen, Gewebe oder Organe im Rahmen einer erfolgreichen XTx auf den Menschen übertragen, wird der Zeitraum, in dem eine xenotrope Übertragung stattfinden kann, stark verlängert. (I) Zusätzlich besteht die Möglichkeit, daß PERV mit anderen endo- oder exogenen Sequenzen rekombiniert und so ein neues Virus entsteht.

Zur Zeit ist nur schwer abschätzbar, ob xenotransplantiertes Material mit genetisch veränderten oder rekombinierten PERV für den Menschen ein erhöhtes Infektionsrisiko darstellen (J) oder nicht und ob diese Infektion zu einer schweren Erkrankung führen würde. Im Falle einer Infektion ließe sich aber die Ausbreitung von Mensch zu Mensch (J) möglicherweise durch Impfung der sozialen Kontaktpersonen unterbinden.

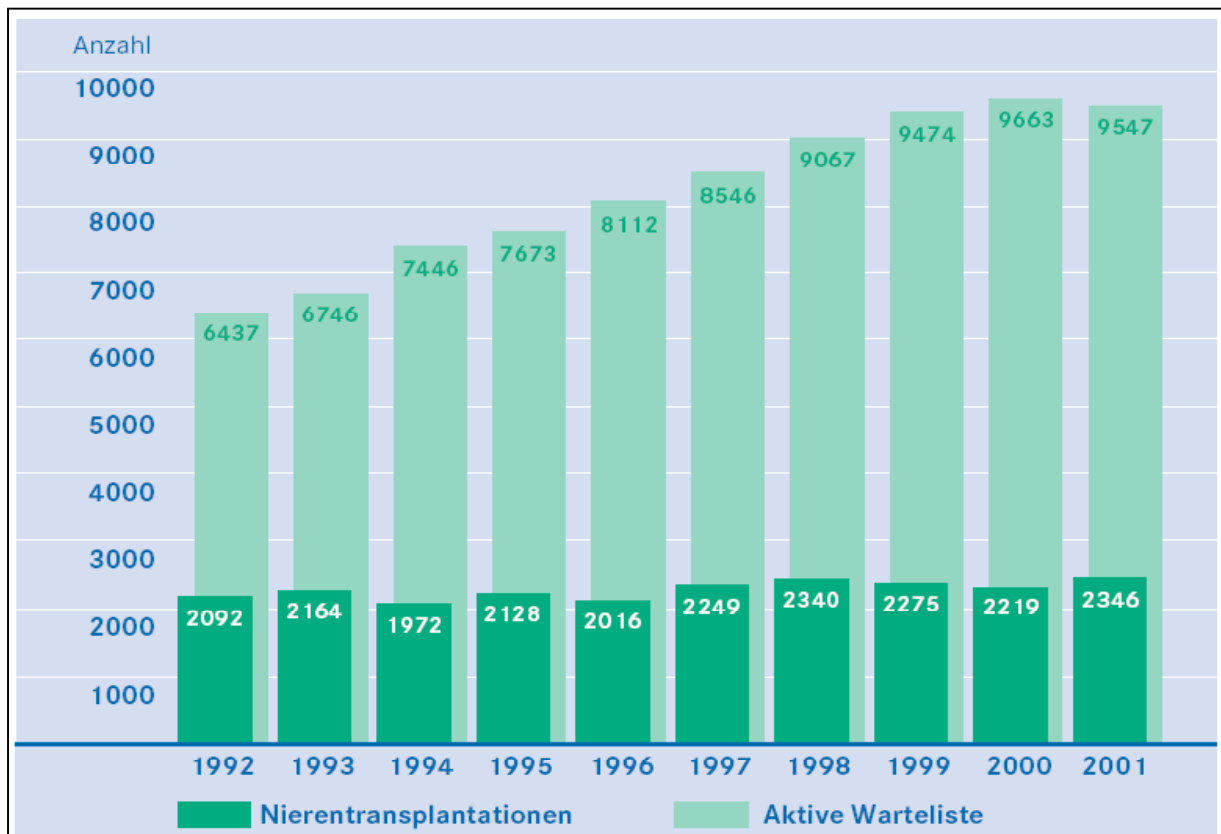


Abbildung 1-6 Warteliste für Nierentransplantationen

Vergleich der transplantierten Nieren mit den auf ein Spenderorgan wartenden Patienten im Zeitraum von 1992 bis 2001. Während die Anzahl der Nierentransplantationen über einen Zeitraum von 10 Jahren weitgehend konstant geblieben ist, ist die Anzahl der Patienten auf der Warteliste kontinuierlich gestiegen, bis im Jahr 2000 die Diskrepanz zwischen transplantierten und fehlenden Organen mit fast 7500 Patienten einen Rekordstand erreichte. Die Statistiken für die anderen transplantierbaren Organe sehen ähnlich aus, auch wenn Patienten, die auf Herzen oder Lungen warten, nicht so lange auf den Wartelisten verbleiben, weil ihr Überleben durch fehlende „bridging“-Verfahren gegenüber Dialyse-Patienten deutlich eingeschränkt ist.

Quelle: Deutsche Stiftung Organspende

Die Möglichkeit, Schweine unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen zu halten, schafft die Voraussetzungen, Tiere zu erzeugen, die weder exogene Viren noch Bakterien, Pilze oder Parasiten tragen, die für den Empfänger einer möglichen Xenotransplantation eine Gefahr darstellen können. Ausgenommen von solchen SPF-Maßnahmen bleiben aber noch unbekannt oder schlecht charakterisierte Viren, z.B. porcine Herpesviren (Stoye, 1997; Stoye, 1998; Ehlers et al., 1999) sowie endogene Retroviren, die innerhalb einer Herde vertikal von Generation zu Generation weitergegeben werden.

Wie bei allen Transplantationen (außer bei autologen Gewebespenden) kommt es auch bei der XTx zu Abstoßungsreaktionen des Empfängers gegen das übertragene Gewebe. Hierbei kann man drei Stufen unterscheiden, die durch ihre Heftigkeit, den zeitlichen Verlauf sowie die beteiligten immunologischen Effektoren gekennzeichnet sind:

1. Innerhalb weniger Minuten bis Stunden führt die **hyperakute Abstoßung** („*hyperacute rejection*“, HAR) zur Nekrose vaskularisierter Organe (Bach et al., 1995). Hier wirken präformierte Antikörper („*xenoreactive natural antibodies*“, XNA), die gegen spezifische Zuckerreste (Gal α (1-3)Gal-Epitope) auf den Endothelzellen des Schweins gerichtet sind, und zu einer raschen Aktivierung des Komplementsystems führen. Diese Komplementaktivierung führt zu einer Zerstörung des Endothels und unterbindet damit die Blutversorgung des Organs (Dorling et al., 1997).
2. Die **verzögerte Xenograft-Abstoßung** („*delayed xenograft rejection*“, DXR) setzt erst nach Tagen ein und beruht auf einem deutlich komplexeren Mechanismus, der Entzündungsmediatoren, Makrophagen und natürliche Killerzellen einbezieht. (Diamond et al., 2002; Ramirez et al., 2002; Costa et al., 2002a)
3. Über die T-Zell-vermittelte **chronische Abstoßung** ist in der Xenotransplantation noch wenig bekannt. Um diesen aus der Allotransplantation bekannten und nach mehreren Monaten auftretenden Prozeß untersuchen zu können, müssten zunächst die Überlebenszeiten der Xenotransplantate deutlich verlängert werden.

Aus den oben genannten Gründen konzentrieren sich bisherige Behandlungsansätze auf die ersten beiden Abstoßungsmechanismen.

In Experimenten konnte gezeigt werden, daß die Reduzierung des XNA-Titers im Transplantatempfänger entweder durch Immunadsorption des Bluts an α Gal-Säulen (Good et al., 1992) oder durch Injektion von α Gal-Kohlenhydratverbindungen (Ye et

al., 1994) zu einer verzögerten hyperakuten Abstoßungsreaktion führt. Ein zweiter Ansatz verfolgt die Inhibierung der Komplementkaskade, z.B. durch Gabe des löslichen Komplementrezeptors Typ I (Ryan, 1995) oder durch Injektion von Cobragift („*Cobra Venom Factor*“) (Matsuda et al., 1978; Martinelli et al., 1978; Koyamada et al., 1998). Eine Kombination beider Techniken wird durch den Einsatz transgener Schweine ermöglicht. Durch die Expression humaner komplement-regulatorischer Proteine („*regulator of complement activity*“, RCA) auf der Oberfläche von Schweinezellen soll die Komplementaktivierung unterbunden werden (Ryan, 1995). In Experimenten mit für CD55 („*decay-accelerating factor*“, DAF), CD46 (*membrane cofactor protein*, MCP) oder CD59 (*inhibitor of membrane attacking complex*, MACi) transgenen Schweinen konnte gezeigt werden, daß zumindest im Tierversuch die HAR überwunden werden konnte (Cozzi and White, 1995; McCurry et al., 1995; Cowan et al., 2000). Zusätzlich wurden „*knock-out*“-Schweine erzeugt, die das Enzym $\alpha(1,3)$ Galactosyltransferase, welches für die Bildung der α Gal-Epitope auf den Schweinezellen verantwortlich ist, nicht mehr exprimieren (Lai et al., 2002; Dai et al., 2002).

Ein Argument spricht jedoch gegen die Verwendung transgener Schweine mit immunmodulatorischen Mechanismen. Da viele Viren sich bei ihrem Zellaustritt Teile der Wirtszellmembran aneignen, könnten auf diesem Wege immunsuppressive Eigenschaften auf die Viren übertragen werden, so daß sich diese dem Immunsystem entziehen könnten. Daneben konnte gezeigt werden, daß humane RCA's Rezeptoren für verschiedene Viren darstellen (Dorig et al., 1993; Naniche et al., 1993; Ward et al., 1994; Bergelson et al., 1994; Weiss, 1998; Santoro et al., 1999).

Hinzu kommt, daß PERV nach Passagierung in humanen Zellen replikationsdefekte MLV Vektoren komplementieren konnten und diese Vektoren im Anschluß resistent gegen humanes Komplement waren (Griffiths, 2000). Dies ist ein Indiz für die größte Gefahr, die von PERV im Rahmen der XTx ausgehen könnte: Durch Rekombination von PERV mit einem anderen exo- oder endogenen Virus könnte ein neues Virus mit unbekanntem Eigenschaften entstehen.

Die Anfälligkeit von Xenotransplantatempfängern für Infektionen wird schließlich noch dadurch gesteigert, daß hohe Dosen von, aus der Allotransplantation bekannter, Immunsuppressiva wie Cyclosporin A, FK 506 oder Rapamycin verabreicht werden müssen, um das primäre Problem der HAR in den Griff zu bekommen. Aber selbst wenn dies gelingt, ist die Problematik der verzögerten und chronischen Abstoßung

dadurch noch nicht gelöst. Desweiteren ist unklar, ob transplantierte Schweineorgane überhaupt ihre Funktion über einen längeren Zeitraum ausüben können (Dorling et al., 1997) und ob sie auf die menschlichen Hormone reagieren (Quinn and Langford, 2001). Somit wird die Xenotransplantation z.Z. nur für extrakorporale Anwendungen sowie verkapselte Gewebstransplantationen in Betracht gezogen, während die Übertragung ganzer, vaskularisierter Organe bestenfalls zur Überbrückung (sog. „*bridging*“) dienen kann, bis ein passendes Allograft gefunden werden kann.

Es gibt eine Reihe von Alternativen zur Xenotransplantation, mit Vor- und Nachteilen in unterschiedlichen Bereichen. Einige dieser Verfahren sollen an dieser Stelle kurz vorgestellt werden, um eine bessere Einschätzung zur Realisierbarkeit der Xenotransplantation zu bieten.

Die einfachste Alternative wäre eine Stärkung der Bereitschaft zur Organspende. Die einzelnen europäischen Länder gehen hier unterschiedliche Wege, doch die Herangehensweise der Politik an dieses heikle Thema ist eher zurückhaltend.

Hilfreich könnte außerdem eine bessere Technologie bei der Konservierung der vorhandenen Allografts sein. Jedoch hat diese als Cryonik bezeichnete Fachrichtung in den letzten 20 Jahren kaum Fortschritte gemacht (Merkle, 1992; Baker, 1994), obwohl kürzlich einige Erfolge bei der Konservierung verschiedener Gewebe (Piemonti et al., 1999; Langerak et al., 2001; Inada, 2001), wenn auch nicht bei Organen erzielt wurden.

Die größten Hoffnungen setzen einige Forscher in das sog. „*tissue engineering*“, dessen Entwicklung aber noch ganz am Anfang steht. Beim „*tissue engineering*“ sollen aus Stammzellen, die dem Patienten entnommen oder durch therapeutisches Klonen erschaffen werden, neue Organe gezüchtet werden. Es stehen aber nicht nur ungelöste ethische Fragen diesem Vorhaben im Weg, sondern es fehlt vor allem an Wissen über die Differenzierungsvorgänge der sog. Stammzellen.

Die zur Zeit beste Alternative zur Xenotransplantation besteht in verschiedenen „*assist*“- oder „*replacement devices*“, die für Niere (Dialyse), Herz (Kunstherz), Blase, und Leber („*HepatAssist*“, Circe Biomedical) zur Verfügung stehen (Takatani, 2000; Williams et al., 2001; Patzer, 2001; D'Alessandro et al., 2002; Tsai et al., 2002; Kihara et al., 2002; Sezai et al., 2002; Verheugt, 2002). Nur das „*HepatAssist*“ von Circe[®] nutzt im Moment für die organischen Komponenten seines Systems xenogene Quellen. Da die Xenotransplantation im Moment wegen der noch nicht überwundenen Organabstoßung wohl auch nur als „*bridging*“-Lösung bis zur Verfügbarkeit eines

passenden Allotransplantats angesehen wird, muß ein Mediziner im jeweiligen Einzelfall entscheiden, welche Technik zur Anwendung kommt.

Bei einer Xenotransplantation kann es zu einer Vielzahl von Komplikationen kommen. Die augenscheinlichste ist dabei die Organabstoßung durch das Immunsystem des Transplantatempfängers.

Während sich die Organabstoßung im Modell untersuchen läßt, können physiologische Probleme auftreten, die sich erst nach erfolgreicher Xenotransplantation auf den Menschen untersuchen lassen. Zu erwartende Probleme bestehen zum einen in der nicht geklärten physiologischen Langzeitkompatibilität zwischen tierischem Organ und menschlichem Organismus, desweiteren muß geklärt werden, ob Xenotransplantate neben ihrer primären Rolle auch ihre Sekundärfunktionen in Hormon- sowie Immunsystem (Leber), bzw. der Elektrolythomöostase (Niere) erfüllen können. Bislang stehen nicht einmal für alle angesprochenen Probleme Tiermodelle, geschweige denn Lösungen bereit. Wie schwerwiegend sich die möglichen Komplikationen im klinischen Einsatz erweisen werden, kann erst der akute Fall zeigen. Ähnlich wie bei der Allotransplantation ist aber auch hier mit einer Verbesserung der Erfolgsaussichten über die Zeit zu rechnen.

Die von PERV im Rahmen einer Xenotransplantation theoretisch ausgehenden Risiken sind vielfältig. Zum einen besteht die Gefahr einer direkten Infektion des Transplantatempfängers mit PERV, was auf Grund der retroviralen Struktur des Erregers auch zu Tumorentstehung durch Insertionsmutagenese führen kann. Desweiteren könnte sich eine einmal etablierte Infektion auf die sozialen Kontaktpersonen ausdehnen. Die größte Gefahr besteht jedoch in der möglichen Rekombination mit anderen exo- oder endogenen Viren.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in drei Themengebiete, wovon sich zwei mit porcinen endogenen Retroviren beschäftigen und gemeinsam unter dem Aspekt der Sicherheitsevaluierung im Rahmen der Xenotransplantation betrachtet werden können. Das dritte Themengebiet überträgt die Betrachtungen auf das Gebiet der humanen endogenen Retroviren, um Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den Viren der beiden Spezies aufzudecken.

Die Untersuchung der porcinen endogenen Retroviren hat primär das Ziel, die Anzahl, chromosomale Position sowie die Prävalenz der replikations-kompetenten Proviren im porcinen Genom zu ermitteln, um anhand dieser Daten eine Sicherheitsab

schätzung und geeignete Vorsichtsmaßnahmen bei der Verwendung porciner Organe in der Xenotransplantation vornehmen zu können.

Die parallel dazu begonnene Etablierung von pseudotypisierten PERV auf Basis des MLV-Systems zielt auf die Charakterisierung des Rezeptors der beiden polytropen PERV, erlaubt daneben aber die Charakterisierung einiger weiterer viraler Parameter wie Wirtszelltropismus, Infektionskinetik oder Suszeptibilität gegenüber Antikörpern.

Das dritte Thema untersucht den Polymorphismus eines wichtigen Proteinmotivs in der Polymerase eines spezifischen Provirus des humanen endogenen Retrovirus HERV-K auf Chromosom 7 (Tönjes et al., 1999; Mayer et al., 1999; Mayer, 2001).

HERV stellt einen möglichen Rekombinationspartner für PERV in sog. „*worst-case-scenarios*“ der Xenotransplantation dar, aber bislang ist kein replikations-kompetentes HERV bekannt. Der untersuchte Polymorphismus könnte einen Einfluß auf die Replikationseigenschaften dieses Provirus ausüben.

2 Material und Methoden

2.1 Kultivierung von Bakterien

2.1.1 Bakterienstämme

Alle im folgenden beschriebenen Bakterien gehören zur Gattung *Escherichia coli*. Routinemäßig wurden Transformationen in DH5 α durchgeführt. Manche Anwendungen erforderten die Verwendung anderer Stämme.

DH10B	<i>Escherichia coli</i> Stamm mit dem Genotyp: F ⁻ mrcA 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)
DH5 α	<i>Escherichia coli</i> Stamm mit dem Genotyp: F ⁻ Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r _K ⁻ , m _K ⁺) phoA supE44 λ^- thi-1 gyrA96 relA1 (Life Technologies)
GM2163	<i>Escherichia coli</i> Stamm mit dem Genotyp: F ⁻ ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 rpsL136(Str ^R) dam13 Tn9(Cam ^R) xylA5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2 (NEB)
Top10	<i>Escherichia coli</i> Stamm mit dem Genotyp: F ⁻ mrcA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 galU galK rspL (Str ^R) endA1 nupG (Invitrogen)
TOP10F [']	<i>Escherichia coli</i> Stamm mit dem Genotyp: F ⁻ {lacI ^q , Tn10(Tet ^R)} mrcA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 galU galK rspL (Str ^R) endA1 nupG (Invitrogen; One Shot [®])
XL1-Blue MRA (P2)	<i>Escherichia coli</i> Stamm mit dem Genotyp: Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 end A1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac(P2 lysogen) (Stratagene)

Tabelle 2-1 Genotypen der verwendeten Bakterienstämme

Aufgelistet sind die in der Arbeit verwendeten Bakterienstämme unter Angabe der jeweiligen Genotypen sowie Bezugsquellen.

2.1.2 Kulturbedingungen von *Escherichia coli*

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

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in TB-Medium (Terrific Broth; 12 g/l Trypton, 24 g/l Hefeextrakt, 4 ml Glycerin, 17 mM KH₂PO₄, 72 mM K₂HPO₄, autoklaviert) oder in LB-Medium (Luria-Bertani; 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7, autoklaviert) bei 37°C und 250 rpm (nur Flüssigkultur). Zur Selektion von transformierten Bakterien wurden entsprechend dem Plasmid Antibiotika zugegeben. Bei Ver

wendung von Ampicillin lag die Konzentration bei 50 µg/µl, bei Chloramphenicol wurden 12,5 µg/µl eingesetzt.

2.1.3 Herstellung kompetenter Zellen

Um eine effiziente Transformation von Bakterien (siehe Kapitel 2.1.4) gewährleisten zu können, wurden die Zellen nach einer modifizierten Methode von Hanahan (1983) kompetent gemacht. Nach dem Animpfen von 100 ml LB-Medium mit 500 µl einer Übernachtskultur des jeweiligen Bakterienstamms wurde die Bakteriensuspension bei 37°C zu einer Dichte (OD₅₅₀) von 0,6 inkubiert, während alle folgenden Arbeitsschritte bei 4°C durchgeführt wurden: Die Bakterien wurden pelletiert (6000 rpm, Minifuge RF, Heraeus, Hanau) und in 40 ml TFB1 (30 mM KOAc, 100 mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15% Glycerin, pH 5,8) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten und erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien in 4 ml TFB2 (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15% Glycerin, pH 6,5) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in Aliquots á 100 µl auf Trockeneis schockgefroren und bei –80°C eingelagert.

2.1.4 Transformation kompetenter Bakterienzellen

Zur Transformation von Bakterienzellen wurden diese auf Eis aufgetaut und nach Zugabe des Ligationsansatzes (siehe Kapitel 2.6.14) (5 µl) bzw. eines Plasmides (10 ng) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem anschließenden Hitzeschock (45 s, 42°C) wurden die Bakterien mit 500 µl SOC-Medium (GIBCO/BRL, Eggenheim) versetzt und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Agaroseplatten, die mit dem entsprechenden Antibiotikum supplementiert waren, ausgestrichen und bei 37°C über Nacht oder bei Raumtemperatur für zwei Tage inkubiert.

2.2 Kultivierung von Säugerzellen

2.2.1 Säugetierzelllinien

Die im Folgenden aufgelisteten Säugetierzelllinien wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet. Neben einer kurzen Beschreibung der wichtigsten Charakteristika der Zelllinie (Abstammung, transformierendes Agens, besondere Kulturbedingungen) ist in der Regel eine Registernummer angegeben, mit deren Hilfe die Zelllinie von den Zellbanken (American Type Culture Collection (<http://www.atcc.org>) oder European Collection of Cell Cultures (<http://www.ecacc.org.uk>)) bezogen werden kann.

- 293 ECACC Nr.: 85120602,
Adenovirus-5 transformierte epitheliale Nierenzelllinie eines menschlichen Embryos (*Homo sapiens*)
- 293 PERV- PK 293-Zellen (s.o.), die nach Co-Kultivierung mit PK15-Zellen (s.u.) produktiv mit PERV infiziert sind (Patience et al., 1997).
- 293 ϕ NXg/p Bei dieser Zelllinie handelt es sich um von 293 abgeleitete retrovirale Produzentenzellen der zweiten Generation, die von Garry Nolan entwickelt wurden. Die Zellen exprimieren stabil die Gag- und Pol- Proteine von MLV, und außerdem den CD8-Oberflächenmarker, mit dessen Hilfe sich die Zellen antibiotikafrei selektionieren lassen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie angegeben unter:
<http://cmgm.stanford.edu/micro/fac/nolan>
- 293T Von Garry Nolan entwickelte Zelllinie zur Produktion retroviraler Partikel. Die Zellen exprimieren stabil (*neo*-Selektion) das „*large-T*“-Antigen, was zu einer verstärkten Expression von unter SV40-Promotorkontrolle stehenden Genen führt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie angegeben unter:
<http://cmgm.stanford.edu/micro/fac/nolan>
- 3T3 ECACC Nr.: 86110401
Embryonale Fibroblasten-Zelllinien aus der BALB/c-Maus, deren Kontaktinhibition ausgeschaltet ist
- Cos 7 ECACC Nr.: 87021302
SV40-transformierte Nierenzelllinie der afrikanischen grünen Meerkatze. Die Zellen stammen von CV-1Zellen ab, die von einer „*origin*“-defekten Mutante des SV40 transformiert wurde.
- D17 ECACC Nr.: 98090403
Osteosarcoma-Zelllinie eines adulten Hundes (*Canis familiaris*)
- HeLa ECACC Nr.: 85060701,
menschliche epitheliale Carcinoma-Zelllinie aus dem Gebärmutterhals (*Homo sapiens*)
- Mus dunni ECACC Nr.: 94101211
Fibroblasten-Zelllinie aus Zellen des Mäuseschwanzes. Diese Zelllinie erlaubt die Replikation aller vier Klassen des murinen Leukämievirus (MLV): ecotrop, amphotrop, xenotrop und zytopathisch. Der Zelllinie fehlen die meisten mit MLV verwandten endogenen Retroviren.
- MRC-5 ECACC Nr.: 97112601
Die Zelllinie wurde aus dem Lungengewebe eines 14 Wochen alten menschlichen Embryos gewonnen. Die Zellen durchlaufen etwa 60-70 Zellteilungen, bevor sie die Seneszenz erreichen.
- PG-4 ECACC Nr.: 94102703,
Moloney Sarcoma Virus (M-MST) transformierte Zelllinie der Katze (*Felis catus*)
- PK15 ATCC Nr.: CCL-33,
normale epitheliale Nierenzelllinie eines adulten Schweines (*Sus scrofa*)

Tabelle 2-2 Säugetier-Zelllinien

Aufgelistet sind alle Säugetier-Zelllinien mit Angabe ihrer Abstammungsspezies, der Gewebeart und der Bezugsnummer, mit der die betreffende Zelllinie von einer der internationalen Zellbanken bezogen werden kann. Eine Ausnahme hiervon bilden die Zelllinien 293 PERV-PK und 293 ϕ NXg/p. Erstere ist eine Überlassung von C. Patience (Czuderna et al., 2000), während letztere von Garry Nolan bezogen werden kann.

2.2.2 Kulturbedingungen der Säugetierzellen

Die Zelllinien HeLa, 293, 293T, 293 ϕ NXg/p, D17, 3T3, Mus dunni, MRC-5 und PK15 wurden in DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium), supplementiert mit 5% Glutamin, NSP und 10% hitzeinaktiviertem (56°C, 30-45 min) FKS bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit, kultiviert. Die Zelllinie Cos 7 wurde in CMRL (5% Glutamin, NSP und 10% hitzeinaktiviertem FKS) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Die Zellen wurden je nach Bedarf ein- bis zweimal wöchentlich trypsinisiert (10ml 2,5% Trypsin Melnick, 15ml 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.

Im Gegensatz zur gerade beschriebenen Methode wurden die Zelllinien 293 ϕ NXg/p und 293T nicht mit Trypsin abgelöst, sondern mit 1 mM EDTA in PBS und im Verhältnis 1:5 bis 1:10 gesplittet.

Dem Medium der Produzentenzellen der PERV-Pseudotypen wurden die Antibiotika Neomycin (G418; Calbiochem, Affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Germany) und Phleomycin (Cayla, Toulouse, Frankreich) zugesetzt.

2.2.3 Kultivierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC)

Zur Isolierung von peripheren Blutlymphozyten und Monozyten aus heparinisiertem Vollblut des Menschen wurde eine Dichtegradientenzentrifugation in Ficoll (Histopaque 1077, Sigma, Deisenhofen) durchgeführt. Hierzu wurden 15 ml Blut auf die Membran eines mit 15 ml Ficoll gefüllten Leucosep-Röhrchens (Greiner, Solingen) pipettiert und für 30 min bei 200 g bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert (2200 rpm, Minifuge T, Heraeus, Hanau). Aufgrund ihrer höheren Dichte wandern dabei die Erythrozyten und Granulozyten durch die Membran nach unten, während sich die PBMC an der Interphase sammeln. Die PBMC wurden in ein neues Röhrchen überführt und mit PBS gewaschen (1200 rpm, 10 min, Raumtemperatur). Durch die anschließende Aufnahme in hypotonische 0,86%ige Ammoniumchlorid-Lösung (10-30 min, 37°C) wurden verbliebene Erythrozyten entfernt. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zelldichte wurde auf 2×10^6

Zellen/ml eingestellt. Die Kultivierung erfolgte in RPMI-Medium (20% FKS, 2 mM L-Glutamin), dem zur Einleitung der Proliferation 10 µg/ml Phytohämagglutinin (PHA, Wellcome, Dartford, Großbritannien) und 200 U/ml Interleukin-2 (IL-2, Eurocetus, Frankfurt) zugegeben wurde.

2.2.4 Einfrieren/Auftauen von Säugerzellen

Zellen aus einer mittleren Flasche (80 cm², Nunc) wurden trypsinisiert und in 50 ml Medium aufgenommen. Nach dem Pelletieren (200g, 3 min, 4°C) wurden die Zellen in 1,8 bis 3,6 ml Einfrierlösung (90% FKS, 10% DMSO) aufgenommen, in „Cryo Vials“ (Greiner) überführt, langsam heruntergekühlt (2h bei -20°C, über Nacht bei -80°C) und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Cryoröhrchen in einem 37°C Wasserbad so schnell wie möglich aufgetaut und die Zellen in frischem Medium in kleinen Flaschen (cm²) ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt, um das DMSO zu entfernen.

2.3 Herstellung hybrider MLV/PERV-Pseudotypen

2.3.1 Grundprinzip der Herstellung pseudotypisierter Vektoren

Das hier verwendete retrovirale Gentransfersystem leitet sich vom Murinen Leukämie-Virus (MLV) ab und umfaßt drei Komponenten: (i) den retroviralen Transfervektor (pEL-GFP-N1, Clontech), (ii) den Hüllprotein-Vektor und (iii) die Verpackungszelllinie (293φNXg/p; Ory et al., 1996; Davis et al., 1997). Der retrovirale Transfervektor ist ein Plasmid, welches nicht für retrovirale Proteine kodiert, sondern nur über das Verpackungssignal ψ und die retrovirale 5'- und 3'-LTR, die zwei Selektionsmarker (GFP und neo⁺) flankieren, verfügt. Die Verpackungszelllinie exprimiert stabil die retroviralen Proteine Gag und Pol, die für Erzeugung und Verpackung des Vektorgenoms und somit für die Erzeugung retroviraler Partikel notwendig sind. Verpackungszelllinien können aber auch hergestellt werden, indem ein Helfergenom, welches für die retroviralen Strukturproteine kodiert, in Form eines weiteren Plasmids transient in die Zellen eingebracht wird. Während stabile Verpackungszelllinien einen langwierigen Selektionsprozeß durchlaufen müssen, sind transiente Linien flexibler einsetzbar, liefern aber deutlich niedrigere Vektortiter. Sowohl in stabilen wie auch in transienten Linien wurde bei dem Helfergenom das Verpackungssignal ψ deletiert, so daß virale RNA, die in der Verpackungszelllinie von dem Helfergenom abgelesen

wird, nicht in Virionen verpackt wird und keine replikationskompetenten Viren entstehen können.

Die Expressionsplasmide pFBMoALF-PERV-A und pFBMoALF-PERV-B, abgeleitet von pFBMoALF (Cosset et al., 1995), kodieren für das jeweilige Hüllprotein der polytropen PERV. Zur Verbesserung der Expression in eukaryotischen Zellen wurde der Translationsstart entsprechend der Kozak-Sequenz (Kozak, 1984) verändert.

Ein weiterer, für das G-Glykoprotein des Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G; Witte and Baltimore, 1977), kodierender Hüllproteinvektor wurde als Positivkontrolle verwendet, da VSV-G ein sehr breites Wirtszellspektrum besitzt und äußerst stabile Partikel produziert.

Nach Transfektion der Verpackungszelllinie mit dem retroviralen Vektor werden von diesem Transkripte hergestellt, die sowohl translatiert als auch in Form genomischer RNA in neue Virionen verpackt werden, welche von der Verpackungszelllinie abgegeben werden. Mit Hilfe dieser Virionen, die in der Regel replikationsdefekt sind, können Zielzellen transduziert werden, in deren Genom sich das von der übertragenen retroviralen RNA umgeschriebene Provirus stabil integriert. Dort werden das zu übertragende Gen sowie der Selektionsmarker exprimiert.

2.3.2 Selektion hochtitriger Produzentenzellen

Viele Faktoren beeinflussen den Titer von retroviralen Vektoren, z.B. die Zytotoxizität exprimierter Proteine oder das virale „*budding*“, so daß es nötig ist, eine klonale Produzentenzelllinie zu etablieren, wenn man auf einen hohen Titer² oder einen kontinuierlichen Nachschub dieser Vektoren angewiesen ist.

Hierzu werden die Zellen nach der Transfektion trypsiniert und in 10 cm Zellkulturplatten (Greiner, Solingen) in Selektionsmedium ausgesät. Nach einigen Tagen bilden sich Kolonien, die gepickt und in halbkonditioniertes Medium in 24-Lochplatten (Greiner, Solingen) überführt werden, worin die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert wachsen. Zum Test der Klone wird das Medium abgenommen (Zellreste werden durch Zentrifugation (3000g, 2 min) entfernt) und schließlich auf semi-konfluente suszeptible Indikatorzellen übertragen.

Nach etwa zwei Tagen können die Indikatorzellen auf die Expression des Reportergens analysiert werden und die Produzentenzellklone, die die höchste Expression des Reportergens bewirkt haben, werden einer weiteren Selektionsrunde unterworfen. Dieser Selektionsprozeß kann solange wiederholt werden, bis sich keine Steige

² Bei retroviralen Vektoren gelten Werte ab 1×10^5 Partikeln pro ml als ein hoher Titer

rung des viralen Titers mehr erreichen lässt. Für die Etablierung der PERV-Pseudotypen waren zwei Selektionsrunden nötig.

2.3.3 Prinzip der Rezeptorklonierung

Die Strategie zur Klonierung der PERV-Rezeptoren ist in Abbildung 2-1 schematisch dargestellt und beruht auf dem Vergleich einer suszeptiblen mit einer nicht-suszeptiblen Zelllinie. Dazu ist es zunächst notwendig, verschiedene Zelllinien auf den Virus-eintritt hin zu untersuchen (Takeuchi et al., 1998; Wilson et al., 2000).

Hat man passende permissive und nicht-permissive Linien identifiziert, überträgt man eine cDNA-Bibliothek (und damit auch das für den Rezeptor kodierende Gen) der permissiven Zelllinie in die nicht-permissive Zelllinie. Setzt man die so präparierte Zelllinie nun einem Virus oder entsprechenden Pseudotyp-Vektoren aus, können diese in die Zellen eindringen, in denen die rezeptorkodierende cDNA exprimiert wird. Bei Verwendung der Pseudotyp-Vektoren lassen sich die Rezeptor-cDNA-tragenden Zellen durch die übertragenen Reportergene (GFP und Neomycin-Resistenz) identifizieren und die cDNA kann durch PCR isoliert und analysiert werden.

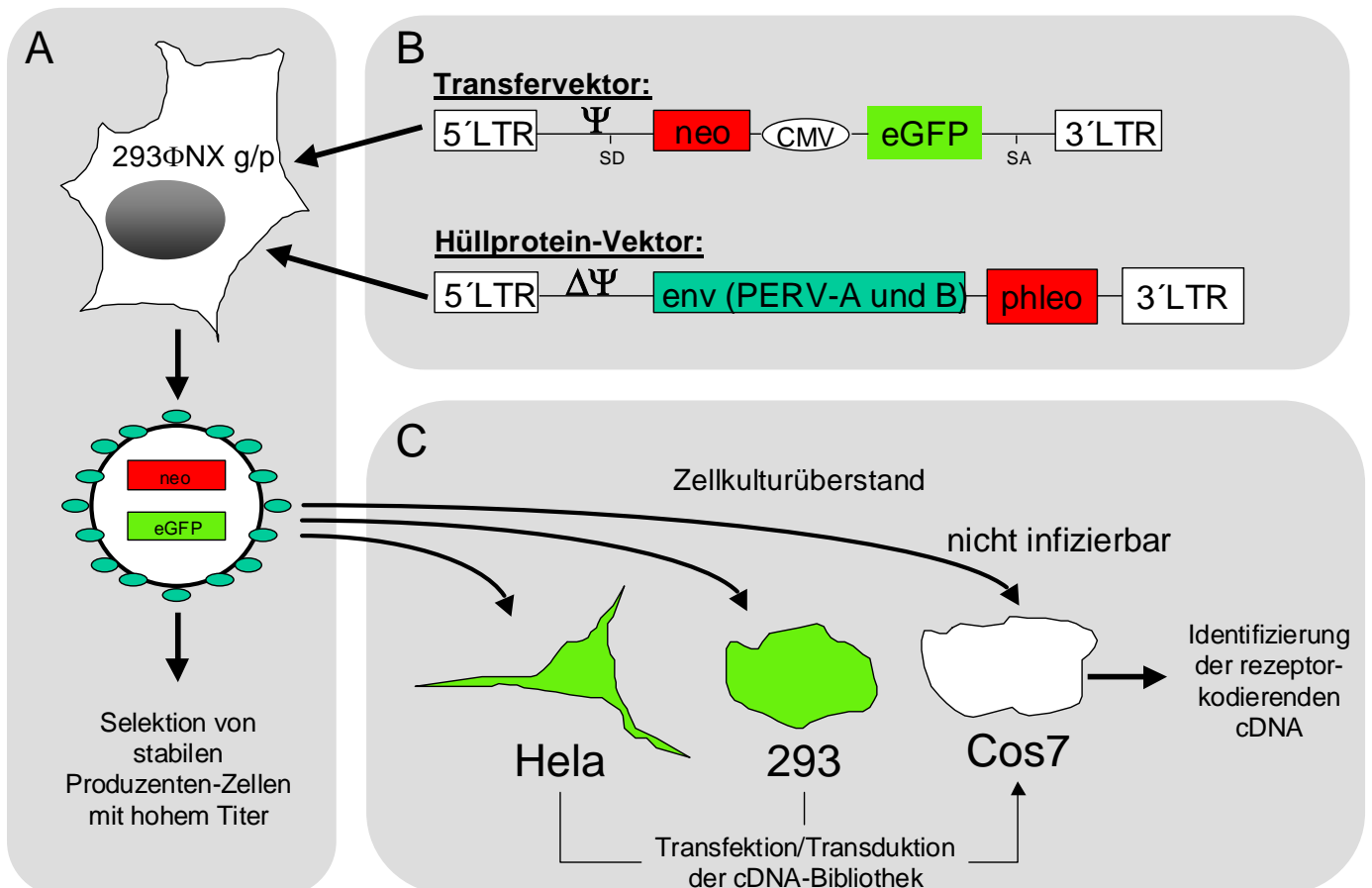


Abbildung 2-1 Schematische Darstellung der Produktion und Verwendung von PERV/MLV-Pseudotypen bei der Identifizierung des PERV-A/B-Rezeptors

A: Die Zelllinie 293 ϕ NXg/p wurde als Produzentenlinie ausgewählt. Diese Zelllinie exprimiert stabil ein MLV *gag/pol*-Konstrukt und den CD8-Rezeptor, welcher eine antibiotikafreie Selektion der Zellen durch MACS erlaubt. B: Als Transferkonstrukt wurde der kommerzielle Vektor pEL-GFP-N1 (Clontech) verwendet. Dieser trägt, flankiert von den MLV-LTRs, die zwei Reporter-Gene GFP und neo⁺. C: Zur Identifizierung der PERV-Rezeptoren wurden zunächst Zelllinien identifiziert, die suszeptibel (293, HeLa) bzw. nicht-suszeptibel (Cos7, 3T3) für PERV sind (Takeuchi et al., 1998).

2.4 Analysen mit kultivierten eukaryotischen Zellen

2.4.1 Transfektion von Säugerzellen

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

Abhängig von der verwendeten Zelllinie wurden $2-5 \times 10^5$ Zellen in Sechslöchplatten (Renner oder Greiner) ausgesät und über Nacht kultiviert. Pro Ansatz wurden 1 μ g DNA (bei mehreren Plasmiden ergab die Gesamtmenge 1 μ g), 8 μ l Lipofektamin und 100 μ l serumfreies Medium (OptiMEM, Life Technologies) gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS (ohne Mg/Ca) und OptiMEM gewaschen und anschließend mit dem Transfektionsansatz und 900 μ l OptiMEM überschichtet. Nach 5-24 stündiger Kultivierung wurde der Transfektionsmix durch serumhaltiges Medium (DMEM oder CMRL) ersetzt. Nach zwei weiteren Tagen wurde die Transfektionseffizienz bestimmt (entweder durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie (PERV α Gag p10) oder durch direkte Fluoreszenzanalyse (GFP). Zur Erzeugung von stabilen Klonen wurden die Zellen expandiert und mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt.

2.4.2 Infektion von Säugerzellen

Abhängig von der verwendeten Zelllinie wurden $2-5 \times 10^5$ Zellen in Sechslöchplatten (Renner oder Greiner) ausgesät und über Nacht kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml zellfreiem, steril filtriertem (0,45 μ m; Sartorius) virushaltigem Zellkulturüberstand infiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen entweder zur Bestimmung der Infektionseffizienz für indirekte Immunfluoreszenzanalysen fixiert oder expandiert.

2.4.3 Transduktion von Säugerzellen

Die Transduktion von Säugerzellen verlief analog zur Infektion. Das Medium der Produzentenzellen wurde 3-4 Stunden vor Versuchsbeginn gewechselt. Zur Steigerung

der Effizienz wurde die Transduktion 2-3mal im Abstand von etwa 8 Stunden wiederholt. Wenn Polybrene oder Protaminsulfat (Cornetta and Anderson, 1989) als Infektionsverstärker benutzt wurde, ist es in einer Konzentration von 6 µg/ml zu den Zellen gegeben worden und wurde für maximal 4 Stunden auf den Zellen belassen. Die Zellen wurden vor dem nächsten Transduktionsschritt gründlich mit PBS gewaschen.

2.4.4 Bestimmung des Vektortiters

Der Vektortiter wird durch Titration des Zellkulturüberstandes auf suszeptiblen Zielzellen (hier 293) durchgeführt und dient zur Bestimmung der Anzahl „infektiöser“ Partikel. Der partikelhaltige Überstand wurde in elf aufeinanderfolgenden Verdünnungsschritten (erste Verdünnung 1:10, danach 1:3) auf je 1×10^6 293-Zellen für 48 Stunden inkubiert. Durch Auszählung der GFP-positiven Zellen im FACS (siehe Kapitel 2.4.6) erfolgte mittels einer nach Spearman-Kärber modifizierten Methode die Berechnung des Titers ($TCID_{50}/ml$; Kärber, 1931; Spearman, 1908). $TCID_{50}$ („Tissue Culture Infection Dosis“) bedeutet dabei die Dosis, die notwendig ist, um 50% der Zellen zu infizieren.

2.4.5 Aktivitätsbestimmung der reversen Transkriptase (RT-Test)

Die Bestimmung der Aktivität der *reversen Transkriptase* (RT) erfolgte mittels des C-Type-RT™ Activity Assay (Cavidi Tech, Schweden) entsprechend den Anweisungen in Protokoll B des Herstellers.

Dem Assay liegt zu Grunde, daß die im Überstand von mit Retroviren transfizierten oder infizierten Zellen befindliche und an Viruspartikel gebundene RT an einem immobilisierten Template/Primer-Konstrukt einen DNA-Strang synthetisiert, in den Bromo-deoxyuridintriphosphat (BrdUTP) eingebaut wird. Die Menge des eingebauten BrdUTP wird in einem Detektionsschritt kolorimetrisch durch spezifische, mit alkalischer Phosphatase gekoppelter Antikörper bestimmt, wobei die Umsetzung eines Substrates durch die alkalische Phosphatase proportional zu der RT-Aktivität der Probe ist.

Zur Bestimmung der RT-Aktivität in Zellkulturüberständen wurden diese nach Entfernung der Zellen (Zentrifugation bei 300g, 3 min, 4°C) steril filtriert (0,45 µm; Sartorius) und in Aliquots á 200 µl bei -80°C zur späteren Messung eingefroren. Zur Gewährleistung möglichst vergleichbarer Ergebnisse wurden die Zellen 4-6 Stunden vor Entnahme der Zellkulturüberstände mit 8 ml frischen Medium versorgt.

2.4.6 Analytische Durchflußzytometrie GFP-positiver Zellen

Die Durchflußzytometrie (FACS; „*fluorescence activated cell sorting*“) ist eine Methode zur Analyse von Zellpopulationen auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften der Zellen. Es wurden fluoreszenzmarkierte Zellen, die intrazellulär GFP („*green fluorescent protein*“) exprimierten, im FACS-Gerät (FACStar Plus, Becton&Dickinson, Heidelberg) gemessen. Mit Hilfe eines Argon-Lasers wurden sie bei 488 nm angeregt und emittierten Signale der für GFP signifikanten Wellenlänge von 540 nm. Gleichzeitig wurde im Streulicht die Größe und Granularität der Zellen dargestellt.

Zur Messung wurden $2-5 \times 10^5$ Zellen resuspendiert (1 mM EDTA in PBS), pellettiert (3000 rpm, 2 min) und in 250 µl Fixierlösung (1% para-Formaldehyd in PBS) aufgenommen. Fixierte Zellen wurden möglichst sofort gemessen, bei 4°C ist eine Lagerung bis zu einer Woche möglich.

2.4.7 Hemmung der Glykolisierung mit Tunicamycin

Tunicamycin ist ein aus *Streptomyces lysosuperficus* isoliertes Antibiotikum und wirkt als Inhibitor der N-Acetylglucosamin-1-phosphattransferase (O'Reilly et al., 1992), wobei es die N-Glykosylierung unterbindet und die Ausbildung N-glykosidisch verknüpfter Protein-Kohlenhydrat-Komplexe verhindert. Die Wirksamkeit der Glykolisierungshemmung in Säugerzellen wurde im Radioimmunpräzipitationsassay bestimmt (Limbach, 1995). Zur Durchführung der Glykolisierungshemmung wurden die Indikatorzellen entweder einen Tag vor oder am Tag der Transduktion mit 0,1 µg Tunicamycin (Sigma, München) pro ml Medium versetzt. Anschließend wurden die Zellen gemäß dem Protokoll in 2.4.3 transduziert.

2.4.8 Neutralisation der Pseudotypvektoren durch spezifische Antikörper

Die partikelhaltigen Überstände (siehe Kapitel 2.3) wurden mit verschiedenen Mengen spezifischer, gegen verschiedene Regionen des Hüllproteins der PERV-Klassen A oder B gerichteter Antikörper versetzt und bei Raumtemperatur für eine Stunde parallel mit nicht behandeltem Überstand inkubiert. Anschließend wurden die Überstände nach dem in Kapitel 2.4.3 beschriebenen Protokoll auf 293φNXg/p-Zellen gegeben und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Medium gegen Frisches ausgetauscht.

Am folgenden Tag wurden die Zellen unter dem Mikroskop und im FACS (siehe Kapitel 2.4.6) auf die Transduktionseffizienz untersucht.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Indirekte Immunfluoreszenzanalysen an Säugerzellen

Konfluente, auf Deckgläschen gewachsene Zellen wurden für 15-45 min mit 2% (w/v) Formaldehyd (in PBS ohne Mg/Ca) fixiert und anschließend dreimal mit PBS (ohne Mg/Ca) gewaschen. Nach Permeabilisierung der Zellen mit 0,5% Triton-X100 (in PBS ohne Mg/Ca) für 10 min, dreimaligem Waschen mit PBS (ohne Mg/Ca) und Ab-sättigen unspezifischer Bindungsstellen mit 1% BSA (in PBS ohne Mg/Ca) wurden die Zellen mit einer 1:500-Verdünnung (in PBS Dulbecco) des Antiserums oder des Präimmunserums für 1 h inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBS Dulbecco wur-den die Zellen mit 1:1000 in PBS verdünnten Indokarbocyanin-gekoppelten (Cy3; Dianova) Sekundärantikörpern für 1 h im Dunkeln inkubiert. Zum Abschluß wurden die Zellen nochmals gewaschen und mit Mowiol (20 g Mowiol (Hoechst) in 80 ml PBS, 40 ml Glyzerin) eingedeckt.

Die indirekten IF-Analysen wurden im Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss) oder im Laserscanmikroskop (Axiovert 10, Biorad Laser MRC 600) durchgeführt.

2.5.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinlösungen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gel-elektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970). Verwendet wurden dis-kontinuierliche Gele, die sich aus einem niederprozentigem Sammelgel zur Konzen-tration der Proteine, und einem höherprozentigen Trenngel zusammen-setzten. Die 5%igen Sammelgele enthielten neben entsprechend verdünnter Lösung A (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid) 25% 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. Diese enthielten neben Lösung A 25% Lösung B (1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,4% SDS). Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0,1% Ammoniumper-sulfat (APS, Gibco) und 0,05% TEMED (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% Glyzerin, 20 mg/l Bromphe-nolblau) aufgenommen und 5 Minuten bei 90°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte in 1x Elektrophorese-Laufpuffer (4x Laufpuffer: 0,1 M Tris/HCl (pH 8,3), 0,77 M Gly-cin, 0,4% SDS) über 1,5 Stunden bei 30 mA/Gel.

2.5.3 *In vitro* Transkriptions-/Translations-Assay

Zur Suche nach offenen Leserahmen wurden die viralen Gene einzeln mittels genspezifischer PCR amplifiziert, wobei der Vorwärts-Primer zusätzlich zur Gensequenz die T7-Promotorsequenz (TAATACGACTCACTATAGGGAACAG) enthält (siehe Tabelle 2-5).

Die so erzeugten PCR-Fragmente wurden mit Retikulozytenlysat (*in vitro* transcription/translation assay, Promega) unter Anwesenheit von ³⁵S-Methionin inkubiert und entstandene Proteine auf einem SDS-PAGE aufgetrennt.

Der Größenvergleich der entstandenen Proteine erlaubte eine Aussage über die Kodierungskapazität der analysierten viralen Gene, ohne daß diese sequenziert werden müssen.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Verwendung der „*large white*“-Bibliothek

Zur Suche nach replikations-kompetenten PERV wurden 21 Klone einer genomischen Bibliothek des „*large white*“-Schweins genutzt, die freundlicherweise von C. Rogel-Gaillard zur Verfügung gestellt wurden (Rogel-Gaillard et al., 1999). Die Bibliothek deckte mit zahlreichen Fragmenten von Größen zwischen 100 kb und 250 kb das gesamte porcine Genom ab und war in artifiziellen Bakterienchromosomen (BAC, „*bacterial artificial chromosomes*“) konstruiert. Die in den BAC's enthaltenen Genom-Fragmente sind chromosomal lokalisiert (siehe Abbildung 3-16, Rogel-Gaillard et al., 1999) und durch geeignete Voruntersuchungen konnten die genannten 21 Klone als wahrscheinlichste Integrationsorte replikations-kompetenter PERV bestimmt werden (Rogel-Gaillard et al., 1999).

Zur weiteren Einschränkung wurden die 21 BAC's mit Hilfe der PCR auf PERV-Sequenzen untersucht, die vollständige, offene Leserahmen in einer zusammenhängenden Organisation aufwiesen. 0,5-1,0 µg DNA (siehe Kapitel 2.6.3) der nach dieser zweiten Selektion verbliebenen Klone wurde in 293 und HeLa-Zellen transfiziert (siehe Kapitel 2.4.1), um die Expression viraler Proteine *in vivo* zu verfolgen (siehe Kapitel 2.4.5 und Kapitel 2.5).

2.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

2.6.2.1 Minipräparation durch alkalische Lyse

Die Plasmidaufreinigung aus Minikulturen von Bakterien erfolgte nach einer Methode von Birnboim und Doly (1979). Zellen aus einer 1,5 ml Übernachtskultur wurden durch

Zentrifugation geerntet (16000g, 30 s, Raumtemperatur) 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 (16000g, 5 min, Raumtemperatur). Die Plasmid-DNA wurde aus dem Überstand durch Zugabe von 2 Volumen 100% Äthanol und kurzer Inkubation auf Eis gefällt und anschließend durch Zentrifugation (16000g, 5 min, Raumtemperatur) pelletiert. Das Pellet wurde in 60 µl RNase A (0,1 mg/ml; Boehringer Mannheim) haltigem TE-Puffer resuspendiert.

2.6.2.2 Midi-/Maxipräparation

Die Präparation von Plasmid-DNA im Midi- und Maximaßstab erfolgte mit dem QIAGEN Midi- bzw. Maxi-Kit nach den Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden). Zellen aus 50 ml bzw. 250 ml Übernachtskulturen wurden durch Zentrifugation (6000g, 4 min, 4°C) pelletiert und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer resuspendiert und lysiert. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte an Anionenaustauscher-säulen, die nach einer Äthanol-fällung durch Zentrifugation (16000g, 30 min, 4°C) pelletierte DNA wurde in Wasser resuspendiert. Die Verwendung von „endofree“-Puffern gewährleistete die Entfernung bakterieller Endotoxine, die u.U. die Transfektion eukaryotischer Zellen beeinträchtigen könnten.

2.6.3 Isolierung von BAC DNA durch CsCl-Gradientenzentrifugation

Ein zentrales Problem bei der Isolierung hochmolekularer chromosomaler DNA ist die Entfernung von anderen hochmolekularen Komponenten der Zelle, an erster Stelle Protein, ohne daß die DNA dabei zerstört wird. Die gleichmäßige Wanderung der Partikel in einer Ultrazentrifuge wird durch mechanische Vibrationen, Wärmegradienten und Konvektionen gestört. Diese Störungen können durch Zentrifugation in einem Dichtegradienten verringert werden. Geeignete Substanzen zur Bildung eines Gradienten sind Saccharose, Glycerin, Cäsiumchlorid, Cäsiumsulfat und weniger gebräuchliche Stoffe wie Ficoll und Metrizamid. Der Gradient kann entweder mit einem Gradienten-Mischer vorgeformt bzw. von Hand aufgetragen werden oder bei der Zentrifugation selbst gebildet werden. Der Gradient ist am Boden des Zentrifugenröhrchens am dichtesten und nimmt mit der Höhe an Dichte ab. Die Wahl der Eigenschaften des Gradienten hängt vom gewünschten Verwendungszweck ab.

2.6.4 Isolierung genomischer DNA aus Blut

Die Isolierung genomischer DNA aus humanen Blutproben erfolgte mit dem QIAamp DNA Blood Kit (QIAGEN, Hilden) entsprechend den Instruktionen des Herstellers. Als Ausgangsmaterial wurden 10 ml heparinisiertes Vollblut eingesetzt.

Die isolierte DNA wurde in Wasser gelöst, auf 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt (siehe Kapitel 2.6.8) und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.6.5 Isolierung genomischer DNA aus kultivierten Säugerzellen

Zur Herstellung von Kernextrakten wurde eine konfluent bewachsene, mittlere Zellkulturflasche (80 cm^2 , Nunc) dreimal mit kaltem PBS (ohne Mg/Ca) gewaschen und die Zellen in 10 ml kaltem PBS mit einem Schaber (Nunc) abgelöst. Nach Zentrifugation (500g, 10 min, 4°C) wurden die pelletierten Zellen in 4 ml Lysispuffer (10 mM TrisHCl (pH 7,6), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 5mM MgCl_2 , 0,5% NP40) lysiert. Nach erneuter Zentrifugation (1600g, 2 min, 4°C) wurden die pelletierten Zellkerne in 500 μl Proteinase K-Puffer (10 mM Tris (pH 7,8), 0,5% SDS) und 2,5 μl Proteinase K (20 mg/ml, Boehringer Mannheim) resuspendiert und für 4 h bei 50°C verdaut. Die Isolation von genomischer DNA erfolgte über Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender Äthanol-fällung.

2.6.6 Isolierung von Total-RNA aus Säugerzellen

Die Isolierung von Total-RNA ist eine Weiterführung des Protokolls 2.6.5. Nachdem die Zellkerne abzentrifugiert wurden, wird zur Gewinnung der Total-RNA der Überstand mit einem Volumen saurem Phenol (pH 4,5; 0,5% SDS; 65°C) versetzt, für 10 Minuten geschüttelt und dann mit 5000 rpm zentrifugiert. Phenolreste werden durch anschließende Behandlung mit Phenol/Chloroform und Chloroform entfernt und die Total-RNA wird schließlich durch Zugabe von Natriumacetat (3M; 1/10 Vol.) und Äthanol (2,5 Vol.) gefällt, in DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert und bei – 80°C gelagert.

2.6.7 Isolierung von mRNA aus Total-RNA

Die Isolierung von mRNA wurde mit dem Oligo(dT)-mRNA-Kit von Pharmacia (New Jersey, USA) nach den Instruktionen des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip dieses Kits beruht darauf, daß die mRNA aus einer Total-RNA-Präparation (siehe Kapitel 2.6.5) mit ihrem poly(A)⁺-Überhang an Oligo(dT)-gekoppelter Cellulose hängen bleibt und von dort isoliert werden kann. Eine solche Präparation enthält durch

schnittlich etwa 50% mRNA, wobei sich die Reinheit mit einem zweiten Aufreinigungsschritt auf 90% steigern läßt. Es lassen sich etwa 2% der eingesetzten Total-RNA-Menge als mRNA isolieren. Die isolierte mRNA wurde in DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert und bei -80°C eingefroren.

Die Konzentrationsbestimmung der mRNA erfolgte nicht nach dem unter 2.6.8 beschriebenen Prinzip, sondern durch einen „dot blot“ auf ein 1 mm dickes Agarosegel ($2\ \mu\text{g EtBr/ ml}$) im Vergleich mit einer seriellen Verdünnung von DNA bekannter Konzentration unter UV-Beleuchtung.

2.6.8 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

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

2.6.9 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte elektrophoretisch. Dazu wurde Agarose (Life Technologies) in 1xTAE-Puffer (40 mM Tris(Acetat, 1 M EDTA, pH 8,0) aufgekocht und mit $0,5\ \mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid (Roth) versetzt. Bei Fragmenten mit einer Größe unter 500 Basenpaaren wurde an Stelle von TAE 1xTBE-Puffer (18 g Tris-Base, 5,5 g Borsäure, 4 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 1 l H_2O) verwendet. Zum Auftragen wurden die Proben mit 1/5 Volumen Gelladepuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 30% Glyzerin) gemischt. In Abhängigkeit von der Fragmentgröße erfolgte die Auftrennung bei 5 bis 12 V/cm über einen Zeitraum von 2-20 Stunden in 0,8 bis 2%igen Agarosegelen.

2.6.10 Agarosegelelektrophorese von RNA

Die Auftrennung von RNA entspricht der DNA-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.6.9) mit folgenden Abweichungen: Vor einer Gelelektrophorese muß die RNA denaturiert werden (DMSO-Mix³ und Glyoxal (40% in H_2O) bei 50°C für 60 min), um Sekundärstrukturen bei der Auftrennung zu verhindern. Als Puffer wird bei der RNA-Gelelektrophorese 10 mM Phosphatpuffer (Natriumphosphat, pH 6,8) verwendet, weshalb der Puffer während der gesamten Laufzeit umgewälzt werden muß, um ei

³ DMSO-Mix: 87,5% DMSO, 3,5% 0,5 M NaPO_4 , 1,5% 20% SDS, 7,5% H_2O

nen pH-Umschlag und damit eine Denaturierung der RNA zu verhindern. Außerdem wird der Agarose kein Ethidiumbromid zugesetzt.

2.6.11 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des „*Jetsorb Gel Extraction Kit*“ (Genomed) nach den Angaben des Herstellers. Nach der chemischen Zersetzung der Agarosegelmatrix wird die DNA an Glasperlen gebunden, von denen sie mit Wasser eluiert werden kann.

2.6.12 Dephosphorylierung von DNA

Zur Verhinderung der Rezirkulierung linearisierter Vektoren wurden diese dephosphoryliert. Restringierte Vektoren wurden zuerst bei 37°C für 20 min mit 0,5 U alkalischer Phosphatase des Kalbes (CIP, Pharmacia) und anschließend bei 50°C für 20 min mit 1 U bakterieller alkalischer Phosphatase (BAP) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA gestoppt.

2.6.13 Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Zur Entfernung von Proteinen aus Reaktionsansätzen wurden diese mit 1 Volumen Phenol (pH 4,5 bei RNA; pH 7,4 bei DNA; Carl Roth GmbH, Karlsruhe) versetzt, kurz gemischt und zur Phasentrennung zentrifugiert. Die Nukleinsäuren wurden durch anschließende Äthanol-fällung zurückgewonnen.

2.6.14 Ligation

Die Verknüpfung von Insert- und Vektor-DNA erfolgte durch T4-DNA-Ligase (Life Technologies). 10-50 ng Vektor-DNA wurden mit 4 µl 5xLigase-Puffer, 1 µl Enzym (4,5 Weiss-Einheiten) und der äquimolaren Menge Insert-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei 8°C über Nacht inkubiert. 4 µl des Ligationsansatzes wurden für die Transformation (siehe Kapitel 2.1.4) in kompetente *E. coli*-Stämme (siehe Kapitel 2.1.1) verwendet.

2.6.15 T/A-Klonierung von PCR-Amplifikaten

Bei der Klonierung von PCR-Produkten (siehe Kapitel 2.6.16 und Kapitel 2.6.17) macht man sich die Eigenschaft der Taq-DNA-Polymerase zu Nutze, Matrizen-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 System wurde in der Form des Vektors pGEMT-Easy (siehe Abbildung 2-3 C, Promega) verwendet, mit dem die Ligation (siehe Kapitel 2.6.14) erfolgte.

2.6.16 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 AmpliTaqGold (Perkin-Elmer). Im Falle der AmpliTaqGold war eine Verlängerung der initialen Denaturierung von 3 auf 10 Minuten notwendig, innerhalb derer die Polymerase aktiviert wurde.

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Größen zwischen 5 und 15 kb wurde das ExpandLong PCR System (Roche) verwendet. An Heizblöcken kamen der Mastercycler Gradient (Eppendorf), Genius (Techne) und der PE 3700 (Perkin Elmer) zur Anwendung.

2.6.17 Inverse PCR zur Bestimmung der genomischen Flanken der PERV-Proviren

Die inverse PCR (iPCR) erlaubt die Bestimmung unbekannter, flankierender DNA-Sequenzen ausgehend von einer definierten Zielregion, indem man zunächst die Ziel-DNA mit einem Restriktionsenzym schneidet und anschließend eine Ligation unter solchen Bedingungen durchführt, die die Selbstligation der Fragmente begünstigt. Passenderweise sucht man die Restriktionsenzyme so aus, daß sie möglichst selten, am besten nur einmal, in der bekannten Zielsequenz schneiden. Schließlich führt man eine PCR-Reaktion durch mit Primern, die auf beiden Seiten von der bekannten Sequenz weg orientiert sind. Restriktionsfragmente, die in einer amplifizierbaren Länge religiert sind, dienen als Ausgangsprodukt für die PCR.

Für die inverse PCR wurden je 2 µg DNA der BAC-Klone mit 15 U eines passenden Restriktionsenzym im jeweiligen Restriktionspuffer für 4 Std. bei 37 °C verdaut und die Enzyme bei 70 °C für 30 Min. deaktiviert. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl und wurde durch Zugabe von 60 µl 5 x Ligationspuffer (Gibco/BRL), 10 U T4 Ligase (Boehringer Mannheim) und H₂O auf 300 µl erhöht. Die Ligationsreaktion wurde bei 15 °C über Nacht inkubiert. Die DNA wurde durch Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließende Äthanol-Fällung aufgereinigt und schließlich in 50 µl ddH₂O resuspendiert. Von jedem Ansatz wurden 5 µl als Matrize für die PCR entnommen. PCR-Produkte wurden in den Vektor pGemT-Easy (siehe Kapitel 2.6.15) kloniert.

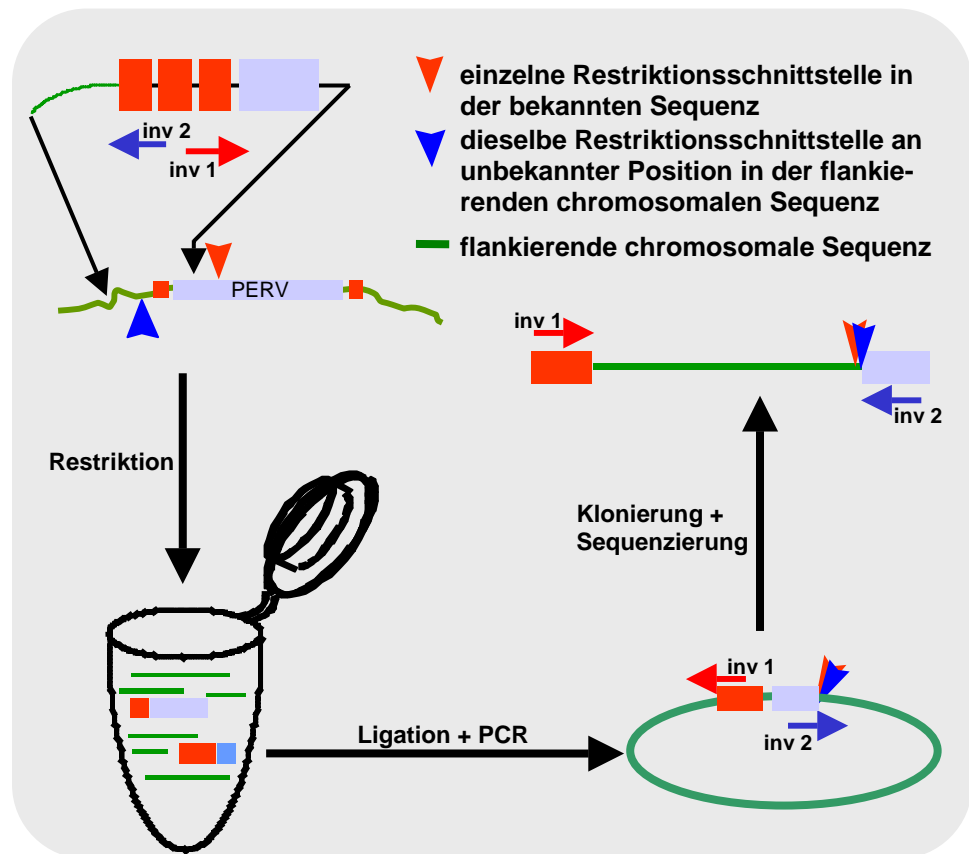


Abbildung 2-2 Schematische Darstellung der inversen PCR.

Die *inverse PCR* (Ochman *et al.*, 1988) ist eine spezifische Anwendung der allgemeinen Polymerase-Kettenreaktion. Sie erlaubt ausgehend von bekannten Sequenzen die Amplifikation unbekannter Gensegmente in deren direkter Nachbarschaft.

Hierzu wird ein DNA-Fragment mit einer Endonuklease verdaut, die (bevorzugt) nur einmal in der bekannten Sequenz und hoffentlich auch in der unbekannt flankierenden Sequenz schneidet. Wegen dieser Unsicherheit müssen mehrere verschiedene Endonukleasen ausprobiert werden.

Die geschnittene DNA wird dann unter Bedingungen religiert, die eine Zirkularisierung der DNA begünstigen. Durch diese Vorgehensweise kommen Segmente der bekannten Sequenz beiderseits der Unbekannten zu liegen, so daß sich diese durch Wahl entsprechender Primer (*inv 1*, *inv 2*) amplifizieren läßt.

2.6.18 DNA Sequenzierung

Sequenzierungen von DNA-Fragmenten wurden dankenswerterweise durch Herrn Martin Selbert (Paul-Ehrlich-Institut) unter Verwendung des automatischen Sequencers ABI Prism 377 (Applied Biosystems) nach der Methode des fluoreszenz-markierten Strangabbruchs durchgeführt. Die verwendeten Chemikalien stammten von der Firma Applied Biosystems, überschüssige Nukleotide wurden mit Hilfe von Sepharose-Säulen (Qiagen) entfernt.

Die computergestützte Auswertung der Sequenzen erfolgte mit den Programmen Sequence-Navigator (ABI), DNAsis (Hitachi) und BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Einige sehr lange Fragmente von HERV wurden außer Haus bei der Firma SeqLab (Göttingen) mittels „*primerwalking*“ sequenziert. Datenbankab

gleiche wurden via Internet mit dem Programm BLASTN (NCBI, Washington) durchgeführt.

2.6.19 Herstellung einer 293-cDNA-Bibliothek

Nachdem die Gewinnung von Total-RNA und mRNA nach den unter 2.6.6 und 2.6.7 beschriebenen Methoden durchgeführt wurde, geschah die eigentliche Synthese der cDNA mit dem „*cDNA library construction kit*“ von Stratagene (Heidelberg) gemäß den Instruktionen des Herstellers.

Das Prinzip der cDNA-Synthese beruht darauf, daß, ausgehend vom poly(A)-Schwanz der mRNA, mit polyA-Primern der cDNA-Erststrang synthetisiert wird. Zur Synthese des Erststranges werden methylierte dNTP's verwendet. Dies verhindert, daß die cDNA bei sukzessiven Behandlungen mit methylierungssensitiven Restriktionsendonukleasen nicht verdaut wird.

Nach der Synthese des Erststranges wird die RNA abgedaut, der Zweitstrang synthetisiert und ein Adapter anligiert. Um die Eigenschaften der Bibliothek zu verbessern, wird eine Größenfraktionierung angeschlossen, um den Anteil der Vollängenfragmente in der Bibliothek zu erhöhen. Durch nachfolgenden Verdau mit Endonukleasen (*EcoRI*, *XhoI*) kann die cDNA in einen entsprechenden Vektor (pcDNA3.1/Zeo⁺, Invitrogen, DeSchelp, Niederlande) ligiert werden.

Zur Verbesserung der Übertragbarkeit in eukaryotische Zellen wurde das cDNA-Insert mit flankierenden Vektor-Primern (rekombinante *SfiI*-Schnittstellen) amplifiziert und in einen retroviralen Expressionsvektor (pLIB, Clontech, Palo Alto, USA) kloniert.

2.7 Phylogenetische Analysen

2.7.1 Phylogenetische Einordnung von PERV im Verhältnis zu anderen C-Typ-Retroviren

Zur Untersuchung der phylogenetischen Verwandtschaft wurden die Gene („*maximum-likelihood*“-Methode) sowie die Proteine („*unweighted-pair*“-Analyse) der verschiedenen replikations-kompetenten PERV untereinander sowie mit verschiedenen anderen C-Typ-Retroviren verglichen. Die Sequenzausrichtung („*alignment*“) erfolgte mit ClustalW (Thompson et al., 1994), während zur weiteren Untersuchung die Programme Paup* 4.0 (Swofford, 2000), „*PHYLP*“ (Felsenstein, 1989) „*DAMBE*“ (Xia and Xie, 2001) und MEGA-2 (Kumar et al., 2001) eingesetzt wurden. Die Durchführung der Analysen erfolgte nach Hall (2001).

2.7.2 Altersabschätzung von PERV anhand der „*molecular clock*“

Die Hypothese der evolutionären Uhr beruht auf der Annahme, daß informations-tragende Makromoleküle wie Proteine oder Nukleinsäuren sich in einem beobachteten Zeitraum für eine betrachtete Spezies stets mit einer konstanten Mutationsrate verändern (Ayala and Fitch, 1997). Die Hypothese hat sich als elegantes Werkzeug erwiesen, evolutionäre Geschehnisse zu analysieren, für die fossile oder andere Hinweise nicht oder nur in unzureichender Menge zur Verfügung stehen.

Das Alter von Retroviren kann man unter dieser Voraussetzung sehr einfach analysieren, wenn man 5´LTR´s mit 3´LTR´s vergleicht. Unter der Annahme, daß beide LTR´s zum Zeitpunkt der Integration in das Wirtsgenom die gleiche Sequenz aufwiesen, kann jeder Nukleotidunterschied als ein Evolutionsereignis gewertet werden. Diese Ereignisse treten bei Retroviren etwa alle 100.000 bis 300.000 Jahre auf (Shih et al., 1991; Dangel et al., 1995; Mager and Freeman, 1995; SanMiguel et al., 1998; Johnson and Coffin, 1999). Schwierig wird dieses Verfahren, wenn man aus genomischer DNA die korrespondierenden 5´LTR´s und 3´LTR´s ermitteln muß. Dieses Problem konnte durch Verwendung der „*large white*“-Bibliothek (siehe Kapitel 2.6.1) umgangen werden, da jeder BAC-Klon durchschnittlich nur ein Provirus bzw. virale Sequenzen enthält, was durch PCR überprüft wurde.

Folgende vollständige oder partielle Sequenzen von Hüllprotein-Genen wurden für erweiterte Analysen genutzt: AY099324, AY099323 (Bartosch et al., 2002), AF426946, AF426942, AF426940, AF426937, AF426936, AF426935, AF426933, AF426927, AF426928; AF426925, AF426924, AF426921, AF426917, AF426916 (Lee et al., 2002), AF296168 (Chang, unveröffentlicht), AJ288592, AJ288591, AJ288590, AJ288589, AJ288588, AJ288586, AJ288585, AJ288584 (Bosch et al., 2000), AF038600 (Akiyoshi et al., 1998), Y12239 (LeTissier et al., 1997).

Die Sequenzabgleiche und Berechnungen zur Altersbestimmung anhand der „*molecular clock*“-Hypothese wurden mit den Programmen ClustalW (Thompson et al., 1994) und „*DAMBE*“ (Xia and Xie, 2001) durchgeführt.

2.8 Grundprinzipien der durchgeführten Untersuchungen

2.8.1 Anwendungen von PERV-Pseudotypvektoren

In erster Linie sollen die PERV-Pseudotypvektoren zur Identifikation der PERV-Rezeptoren mittels cDNA-Screening dienen. Der leichte Nachweis der Vektoren erlaubt

aber auch Untersuchungen zu Wirtszelltropismus, Transduktionskinetik und Neutralisierbarkeit mittels spezifischer Antikörper.

2.8.2 Lokalisierung replikationskompetenter PERV

Die Identifikation replikations-kompetenter PERV wurde nach etablierten Prinzipien durchgeführt (Czuderna et al., 2000; Krach et al., 2001). Die Verwendung einer porcinen Genomquelle (Rogel-Gaillard et al., 1999) sollte jedoch Aussagen über Anzahl und Lokalisierung und die damit für die XTx verbundenen Risiken ermöglichen. Eine Bestimmung der chromosomalen flankierenden Sequenzen der Proviren würde einen spezifischen Nachweis definierter Proviren und damit Untersuchungen über Prävalenz und Polymorphismen von PERV ermöglichen.

2.8.3 Phylogenetische Untersuchungen an PERV

Durch Analyse der Nukleotid- sowie der Aminosäuresequenzen verschiedenster PERV soll das evolutionäre Alter dieser Viren anhand der „*molecular clock*“-Hypothese bestimmt werden. Von besonderem Interesse sind Erkenntnisse darüber, ob die „*repeat*“-lose oder die „*repeat*“-tragende LTR die ursprüngliche Form der PERV-LTR darstellt.

2.8.4 Polymorphismen bei HERV

Das auf Chromosom 7 lokalisierte HERV-K (Tönjes et al., 1999) weist eine Punktmutation in seinem *pol*-Leserahmen auf, wodurch das konservierte Aminosäure-Motiv YIDD der reversen Transkriptase in das nicht funktionale Motiv CIDD umgewandelt wird.

Mit Hilfe der flankierenden chromosomalen Sequenz sollte das Provirus in verschiedenen humanen DNA-Proben per PCR spezifisch amplifiziert und die relevante Position im *pol*-Gen durch Sequenzanalyse auf mögliche Polymorphismen, die die Funktionalität der reversen Transkriptase wieder herstellen, untersucht werden.

2.9 „*Accession numbers*“ der verwendeten Sequenzen

Die in dieser Arbeit neu ermittelten Sequenzen der Proviren PERV-A(Bac-130A12), PERV-A(Bac-151B10), PERV-A(Bac-463H12) und PERV-B(Bac-192B9) sowie deren flankierende genomische Sequenzen wurden in Genbank abgelegt (Tabelle 2-3).

PERV-A(Bac-130A12)*	AJ279056
PERV-A(Bac-130A12), 3'-Flanke	AJ304824
PERV-A(Bac-151B10)*	AF435967
PERV-A(Bac-151B10), 3'-Flanke	AX546220
PERV-A(Bac-463H12)*	AF435966

PERV-A(Bac-463H12), 5´-Flanke	AX546219
PERV-B(Bac-192B9)*	AJ293656
PERV-B(Bac-192B9), 3´-Flanke	AJ303092

Tabelle 2-3 „Accession numbers“ der beschriebenen Sequenzen

Diese Tabelle faßt die in der Arbeit gefundenen und in *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) hinterlegten Sequenzen zusammen.

* Niebert et al., 2001

** Patentnummer 101114338, Deutsches Patentamt

Sequenzen, von denen Primer abgeleitet oder die für Homologieuntersuchungen verwendet wurden, sind ebenfalls in *Genbank* abgelegt. Diese im folgenden aufgelisteten Sequenzen waren nicht Teil dieser Arbeit und die jeweilige Referenz ist angegeben.

293-PERV-B(33)	AJ133816	Czauderna et al., 2000
293-PERV-B(43)	AJ133818	Czauderna et al., 2000
293-PERV-A(42)	AJ133817	Czauderna et al., 2000
PK15-PERV-A(58)	AJ293656	Krach et al., 2001
PK15-PERV-B(213)	AJ293657	Krach et al., 2001
3´ genom. Flanke zu PK15-PERV-A(58)	AJ291758	Krach et al., 2001
5´ genom. Flanke zu PK15-PERV-B(213)	AJ291759	Krach et al., 2001
3´ genom. Flanke zu PK15-PERV-B(213)	AJ291760	Krach et al., 2001
PERV-MSI	AF038600	Akiyoshi et al., 1998
Gibbon Ape Leukemia Virus (GaLV)	NC_001885	Delassus et al., 1989
Moloney Murine Leukemia Virus (MoMuLV)	NC_001501	Shinnick et al., 1981
Feline Leukemia Virus (FeLV)	NC_001940	Stewart et al., 1986
Koala retrovirus (KoRV)	AF151794	Hanger et al., 2000
Baboon endogenous virus (BaEV)	D10032	Kato et al., 1987
HERV-K C7	Y18890	Tönjes et al., 1999

Tabelle 2-4 „Accession numbers“ zusätzlicher Sequenzen

Die in dieser Tabelle zusammengefaßten Sequenzen wurden nicht in dieser Arbeit ermittelt, fanden aber Verwendung zum Zweck der Homologieanalyse.

2.10 Verwendete Oligonukleotide

Die für PCR und Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide sind in der nachfolgenden Tabelle unter Angabe der Sequenz, Abstammungsklon, Position und, soweit anwendbar, Referenz, aufgeführt.

Name	Sequenz	Position
Sequenzier-Primer PERV *		
PK 1	TTGACTTGGGAGTGGGACGGGTAAC	2927-2949
PK 2	GGTAACCCACTCGTTTTCTGGTCA	2954-2966
PK 3	CATCTTTGACGAAGCCCTACACAG	3673-3696
PK 4	ATCCAACACCCTCAGGTGACCCTC	3716-3739
PK 5	CTGTGTAGGGCTTCGTCAAAGATG	3696-3673
PK 6	GAGGGTCACCTGAGGGTGTGGAT	3739-3716
PK 7	CCCACCCATCACCCAGGATTTTTT	2884-2861
PK 8	TTCCTAATGGTTGTAGCAGCACTG	2849-2826
PK 9	AGGGTTCAAGAACTCCCCGACCAT	3651-3675
PK 10	AGGCGCTCACTGGGAAGTGGACTT	5444-5457
PK 11	AGTGGACTTCACTGAGGTAAAGCC	5449-5473

Name	Sequenz	Position
PK 12	GGTGGCTTCCCCTTAGTCTCTTTC	5432-5409
PK 13	CCTGGAGGTATTCTGGAAGGATTAG	5409-5385
PK 14	TTCGGTGATGCGCGCTTTCGGTTG	832-855
PK 15	ACAGACACTCAGAACAGAGACGCC	830-807
PK 16	GAAAGAGACTAAGGGAAGCCACCA	5409-5433
PK 17	GCTAATCTTCCAGAATACCTCCAG	5384-5408
PK 18	TAACCAGCTGTCCCTGTTCTTACG	7642-7619
PK 19	CCCTAATCCGAGCATTACAGCTAG	7607-7584
PK 20	TGGTCGGTTATACCGATAGTCATA	7559-7535
PK 21	AAGGACCACTTCCTCAGGATGGTA	7529-7505
PK 22	AAAGAGAACCCGTATCCCTTACCC	7561-7584
PK 23	AGCTGTAATGCTCGGATTAGGGAC	7586-7609
PK 24	AAGGTCCTAGCTCTAGAAGAACAT	2696-2719
PK 25	GACAATCCAGCAGTAGTGCCTTC	3825-3801
PK 26	ACGCACAAGACAAAGACACACGAA	1134-1111
PK 27	CTTGTCTACAGTTTAAATATGGGA	1136-1159
PK 28	AGTCCTTACGGTCTGAGAGGACAG	884-861
PK 29	ATCAGCAGACGTGCTAGGAGGATC	894-918
PK 30	TGGATGACCACCCTGCTTTCTGCT	7977-8000
PK 31	GAACCATCCTTCAAACCACCCCTG	7964-7941
PK 32	TGCTCCTGTTACTTACAGTTGGGC	8023-8046
PK 33	TCTCTTCCCTTCGACGCCTCTCT	7933-7910
PK 34	AAAGGATGAAAATGCAACCTAACC	8233-8210
PK 35	CCCCACTTCTTGCTTTGTTAATAG	8186-8207
PK 36	GAACCCAGGAGGTTAATAAAAAGC	8244-8267
PK 37	CTAGAGGTCAGTTTCTCCTTGGCT	8162-8139
PK 40	TAATCGCCTTATCTGGATTCTGTAA	177-200
PK 41	GTCAACTCATTTCTGTTATCTTA	175-151
PK 42	TGACTGGCACCATAGAAGAATTGA	8415-8439
PK 43	AAGTGTGACCTTCTACCTATTTAC	8329-8306
PK 44	CTGGAATTGTCTGACCTAG	3815-3833
PK 45	GCTAAGAAGGCCAGATTTGC	3848-3868
PK 46	GCCATCCTCTTACCTTCCAC	4670-4689
PK 47	CTTCCGTCTAGTGAACCAGGTTAG	4637-4659
AGOWA 1	GTA ACTCAGCCTCCTGTTAAC	2372-2353
AGOWA 2	CCCGTGAGGCGTTGGGGATC	1873-1854
AGOWA 3	CAGTCTGAAAATGATTGCC	1367-1348
AGOWA 4	ACGAAGCCCTACACAGGGAC	3681-3700
AGOWA 5	CCTCCCTGACGTA ACTAAAC	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	GTACCTTCTAAGCAGTCCCTG	3801-3782
AGOWA 12	AGGGGAGACGGGGTTCGGAC	2727-2746
AGOWA 13	CGGTATTTCTTGAGAGGCTC	2208-2227
AGOWA 14	CCCGTCTCTATCCTAAGGCG	6880-6861
AGOWA 15	GAAGGAAAATCAATGTGACC	7206-7226
AGOWA 16	AGCCTCTGTTCTCTAGGCTC	5449-5968
AGOWA 17	CAGGCCAGTAGTAAACGCC	6306-6324
AGOWA 18	TAACCTTTCTCTAAGCTTGC	7910-7891
AGOWA 19	ACAGTGACACCCGTATCAAGG	6400-6381
AGOWA 20	AATCCAACAGGGCATCCTAG	3325-3344
AGOWA 21	TAAAGATAAGAGCTGCTCCCC	6704-6724
AGOWA 22	TTGTTCCAGGGCCTGCTATCC	123-143
AGOWA 23	AGCCAGCAGGGTCTGGAATTC	8301-8292

Name	Sequenz	Position
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	CGCAGGATTTCCCGCCAAC	735-716
PERV-5'-LTR	TGAAAGGATGAAAATGCAACCTAAC	1-25
Differenzierungs-Primer PERV		
Diff-A-for**	ATCCTACCAGTTATAATCAAT	6640-6660
Diff-A-rev**	GATTAAAGGCTTCAGTGTGG	7332-7313
Diff-B-for*	GGATAAATGGTATGAGCTGG	6790-6809
Diff-B-rev*	GCTCATAAACACAGTACTAT	7362-7342
T7-Promotor-Primer für PTT		
T7-gag-for***	CTTGTGCGTCCTTGTCTACAG	1126-1146
T7-gag-rev	CTTCAAAGTTACCCTGGGCTCG	2776-2755
T7-pol-for***	GCTACAACCATTAGGAAAAC	2833-2852
T7-pol-rev	GAGTTCGGGCTGTCCACAAGG	6343-6323
T7-env-for***	CCACTAGACATTTGAAGTTC	6155-6175
T7-env-rev	GTTAATAGTTCTAATCTTAGAAC	8163-8141
5'- und 3'- Primer in der flankierenden genomischen Sequenz des jeweiligen BAC-Klons		
5'-FI 130A12 for #1	GATAGCCATAAATTGGTGTTAG	
5'-FI 130A12 for #2	ACTTGACATGCCTGAAGTTTAT	
3'-FI 151B10 rev #1	AGACAGTCTCTCAATAATTGG	
3'-FI 151B10 rev #2	TGAGGAAAAACCTCTAGAAGA	
3'-FI 463H12 rev #1	TTTACAAAATATTAACGCTTACAA	
3'-FI 463H12 rev #2	AACCCTATTTGGTAATTTTCTAAA	
3'-FI 192B9 rev #1	AAACAACCAGTGACAAAACCTAGG	
3'-FI 192B9 rev #2	TACCAGCTGCTGCCCCCATCATGT	
3' FI UK(58) rev #1	GTGGGTGTGGCCCTAAAAAG	
5' FI UK(213) for #1	GAACAGTGCAACTTCGGGGAC	
5' FI UK(213) for #2	GGAATCTCCTATTTAACAAGC	
3' FI UK(213) rev #1	GACATAGTGTCCATGAGGATG	
Sequenzier-Primer HERV****		
Pol rev #1	GCTATTGCCAGTCCAGCATTGGCAAC	4561-4536
Pol rev #2	CTGCTTGCGAGAAATGTATAACAGTC	4533-4509
C7 5'FI int	ATGCTGACGTTTGGGCTTGTATCC	
Pol for #1	GGCTGTTACAGGACTTGTCCGCATAG	3588-3613
Pol for #2	TAATTATAATTGATCTAAAGGATT	4231-4254
SD inv #1 (rev)	CTAGCTTCTTCCGAGCGCACAAGC	1104-1081
SD inv #2 (rev)	TTACCGTAAGGCTGACTGTAGATG	1080-1057
HERV LTR for #1	GCAAGAGAGATCAGATTGTTACTG	12-35
HERV LTR for #2	GCAAGAGAGATCAGATTGTTACT	230-254
HERV LTR rev #1	ATGTGTATGCATATCTAAAAGCACA	640-664
HERV gag for #1	ATGGGGCAAATAAAAGTAAAATT	1112-1135
HERV gag for #2	ACATTGCGAATATGTAGCAGAGCC	1500-1524
HERV gag for #3	TTGGGAGATTCTGGCAAATCGTC	2158-2181
HERV gag rev #1	TAGAACGACATTGACTAGCCCAATG	2911-2879
HERV gag rev #2	TACTTCCTGGGTCTTGGATTTTTTCCC	2417-2391
HERV gag rev #3	CTTCTCCAGGTGGCATCGGTTCTAAC	1991-1966
HERV pol for #1	TCTAAATTTGATAAAAATGGGCAAC	2900-2924
HERV pol for #2	AGAATAGGAGGGCTTGAAGCACTG	3400-3423
HERV pol for #3	CAAATGAACAGTTAGAAAAGGGTCAT	4036-4061
HERV pol rev #1	TCTTCTGAATTACAAACACAGGAGAA	4113-4088
HERV pol rev #2	GTATATATCCCATCTTGGTCATGA	3825-3800

Name	Sequenz	Position
HERV pol rev #3	TCAGGATTGGCGTTTTTCATATGCCAT	2571-2546
Primer zur cDNA-Qualitätskontrolle (humane "house-keeping"-Gene)*****		
β-Aktin for	GGGAAATCGTGCGTGACATTAAG	M10277
β-Aktin rev	TGTGTTGGCGTACAGGTCTTTG	
γ-Aktin for	AAGTACCCCATTTGAGCATGGC	M19283
γ-Aktin rev	CACAGCTTCTCCTTGATGTCGC	
hu-Phosphatase 1 for	AAGTACCCCGAGAACTTCTTCCTG	X70848
hu-Phosphatase 1 rev	TGAGGTCCAAGTCGTGCTTGTG	
Ribosyl. Faktor 1 for	GCCAGTGTCTTCCACCTGTC	M84327
Ribosyl. Faktor 1 rev	GCCTCGTTCACACGCTCTCTG	
Ribosyl. Faktor 3 for	CTTTGGAAACCTTCTCAAGAGCC	M84327
Ribosyl. Faktor 3 rev	TAGTGTCTCCAGAGGGGTCGAATC	

Tabelle 2-5 Verwendete Oligonukleotide

Hier sind die Oligonukleotide aufgelistet, die in der PCR und der Sequenzierung verwendet wurden. Die Bezugssequenzen, auf deren Basis die Oligonukleotide ausgewählt wurden und auf die sich die Positionsangabe bezieht, sind durch Indizes gekennzeichnet. Die Orientierung der Oligonukleotide ist 5' → 3'.

Das Präfix 5'-FI bezieht sich auf die 5'- genomische Flanke des jeweiligen Klons, während das Präfix 3'-FI die 3'-Seite kennzeichnet. Die Numerierung namentlich gleicher Primer kennzeichnet Primerpaare, die in „nested“-Ansätzen eingesetzt wurden. Dabei kennzeichnet #1 den äußeren und #2 den inneren Primer.

Die cDNA-Kontroll-Primer weisen humane Gene unterschiedlicher Abundanz nach. Dabei ergibt sich bei der Amplifikation von RNA/cDNA bzw. gDNA unterschiedlich große Produkte. Die angegebenen „accession number“ geben die gDNA-Klone an, von denen die Primer abgeleitet sind.

- * Abgeleitet von 293-PERV-B(33) (Czuderna et al., 2000)
- ** Abgeleitet von 293-PERV-A(42) (Czuderna et al., 2000)
- *** die T7-forward-Primer besitzen am 5'-Ende die Sequenz des T7-Promotors zur Initiation der Translation: TAATACGACTCACTATAGGGAACAG
- **** Abgeleitet von HERV-K (C7) (Tönjes et al., 1999)
- ***** Die Primersequenzen stammen aus dem Stratagene cDNA-Analyse-Kit

2.11 Verwendete Vektoren

Dieses Kapitel listet die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren auf. Auf Grund der Vielzahl der mit diesen Vektoren hergestellten Konstrukte (insbesondere pLIB und pcDNA3.1/Zeo⁺ bei der Konstruktion der cDNA-Bibliothek sowie pGemTEasy bei vielen Zwischenklonierungen für die Sequenzierung) gebe ich an dieser Stelle nur die Vektor-Grundgerüste an.

Für keinen der genannten Vektoren existiert ein *Genbank*-Eintrag, die Vektoren lassen sich über die Webseiten der Hersteller beziehen. Eine Ausnahme bildet der Vektor pMBMoALF, den ich von Y. Takeuchi (Takeuchi et al., 1998) in Form des PERV-A-Expressionsvektors erhalten habe, auf dessen Grundlage ich den PERV-B- sowie die beiden um das R-Peptid trunkierten Expressionsvektoren kloniert habe. Die Vektorkarte zu pMBMoALF ist unvollständig und nähere Informationen zu diesem Vektor finden sich in (Cosset et al., 1995).

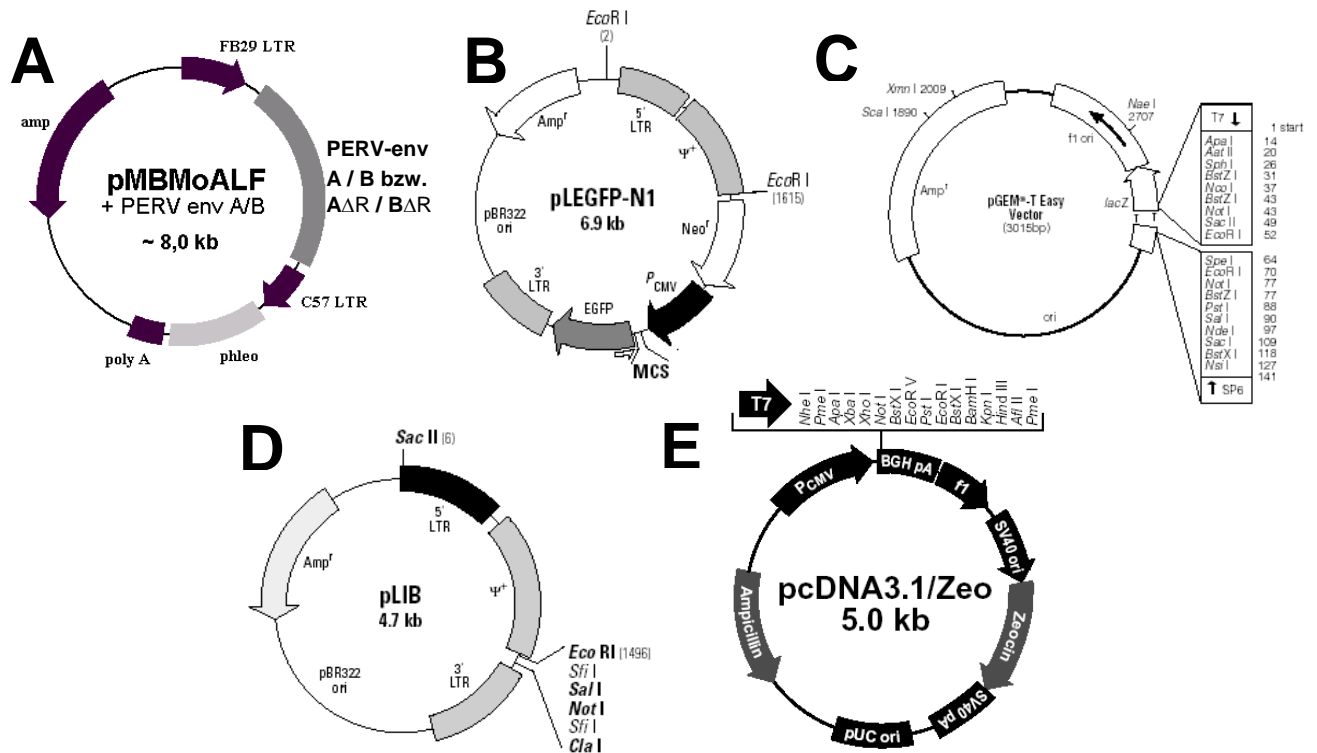


Abbildung 2-3 Karten der verwendeten Vektoren

A. pMBMoALF-PERV-A/B und $\Delta A/\Delta B$; Dies sind die Hüllprotein- Expressions-vektoren, die bei der Herstellung der PERV-Pseudotypvektoren (siehe Kapitel 2.3) verwendet wurden. Die in der Abbildung wiedergegebene Vektorkarte beruht auf Approximationen, da genaue Angaben über diesen Vektor nur unzureichend verfügbar sind. **B.** pLEGFP-N1 (Clontech); retroviraler Transfervektor, der bei der Herstellung der PERV-Pseudotypvektoren (siehe Kapitel 2.3) verwendet wurde. **C.** pGemTEasy (Promega); universeller Kloniervektor mit Blau-Weiß-Selektion zum einfachen Klonieren von PCR-Fragmenten (T/A-Klonierung, siehe Kapitel 2.6.13). **D.** pLIB (Clontech); kleiner retroviraler Transfervektor mit LTR-getriebener Expression des Inserts, der zur Herstellung der cDNA-Bibliothek verwendet wurde. Ist zu großen Teilen homolog zum MLV-Genom. **E.** pcDNA 3.1/Zeo⁺ (Promega); retroviraler Transfervektor mit eukaryotischem Promotor (CMV) zur Expression des Inserts, der zur Herstellung der cDNA-Bibliothek verwendet wurde. Die Zeocin-Resistenz erlaubt eine Doppelselektion.

3 Ergebnisse

3.1 Anwendungen von GFP-exprimierenden PERV- Pseudotyp-Vektoren

3.1.1 Bestimmung des Wirtszelltropismus der zwei polytropen PERV-Klassen

Mit Hilfe der in der Produzentenzelllinie 293ΦNXg/p erzeugten MLV/PERV-Pseudotypvektoren (siehe Kapitel 2.3.1 und Abbildung 2-1) wurde der Wirtszelltropismus der beiden polytropen PERV-Klassen bestimmt. Da der Wirtszelltropismus schon in früheren Publikationen untersucht wurde (Takeuchi et al., 1998; Wilson et al., 2000), beschränkt sich die vorliegende Arbeit auf 11 ausgewählte Zelllinien, jedoch werden hier erstmals fluoreszenzmarkierte (GFP) und hochtitrige Pseudotypvektoren genutzt, um den Tropismus zu untersuchen. Neben den transformierten Zelllinien wurden auch menschliche PBMC (siehe Kapitel 2.2.3) auf ihre Suszeptibilität gegenüber den polytropen PERV untersucht.

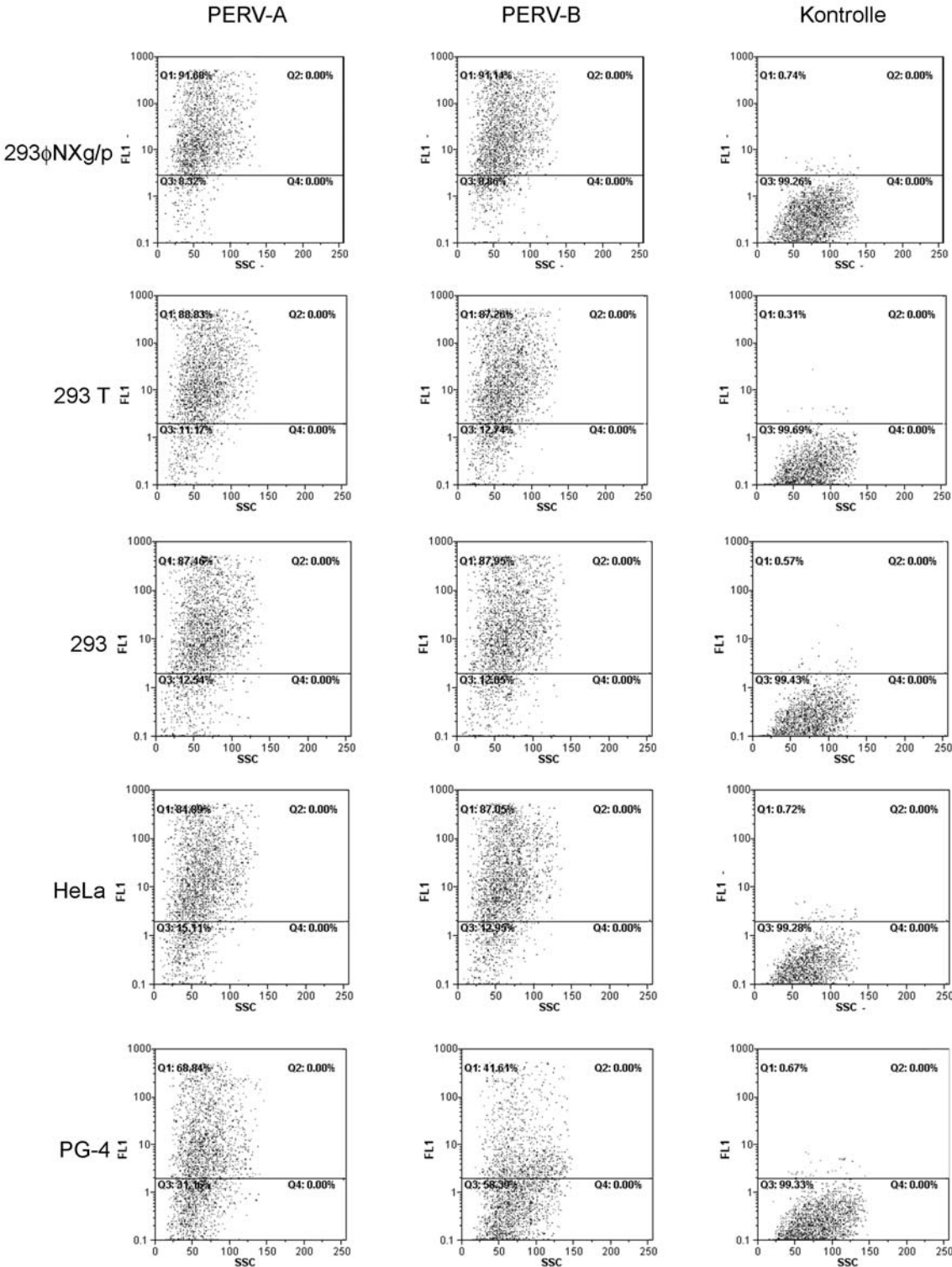
Die Bestimmung der Suszeptibilität erfolgte durch Inkubation semi-konfluenten Zellen der angegebenen Zelllinien mit unverdünntem Überstand und anschließender Quantifizierung der Transduktionseffizienz anhand der GFP-Expression im FACS (siehe Kapitel 2.4.6).

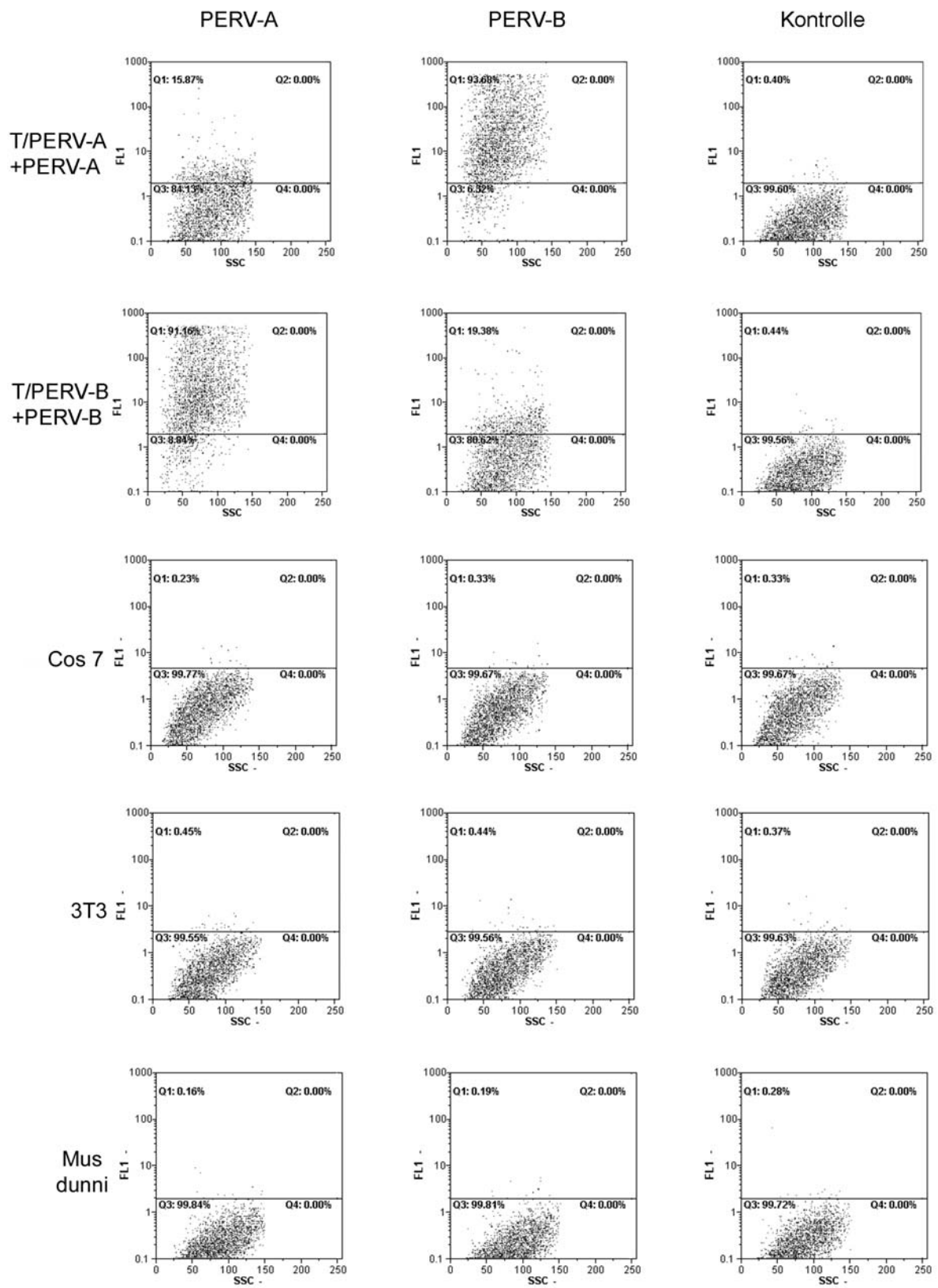
Generell lassen sich die untersuchten Zellen in suszeptible und in nicht-suszeptible Zelllinien einteilen. Nur die Zelllinien PG-4 und MRC-5 (Abbildung 3-1) zeigen eine unterschiedliche Suszeptibilität für die verschiedenen PERV-Klassen.

Während frühere Publikationen (Takeuchi et al., 1998; Wilson et al., 2000) auch Unterschiede bei den hochsuszeptiblen Zelllinien 293, den davon abgeleiteten Zelllinien 293T und 293ΦNXg/p sowie bei HeLa-Zellen gefunden haben, konnten diese Unterschiede nur mit Pseudotypen der ersten Generation bestätigt werden, deren Titer bei etwa 10^3 bis 10^4 lag. Nach Selektion hochtitriger Produzentenzellen wurden die zu beobachteten Unterschiede marginal, nach 100facher Verdünnung der Überstände waren die Unterschiede wieder zu beobachten (nicht gezeigt).

Inkubiert man die Überstände auf Zellen, die bereits PERV-Hüllproteine exprimieren (T/PERV-A/B⁴), so findet eine effiziente Transduktion nur bei der jeweils entgegengesetzten Kombination von Zelllinie und Überstand statt (also T/PERV-A mit PERV-B-Überstand und umgekehrt). Bei gleichem Hüllprotein in Zelle und Überstand sinkt die Transduktionsrate auf 15% bis 20%.

⁴ TelCeB6-Zellen von Y. Takeuchi, die *lacZ*-transgene PERV-Pseudotypvektoren produzieren





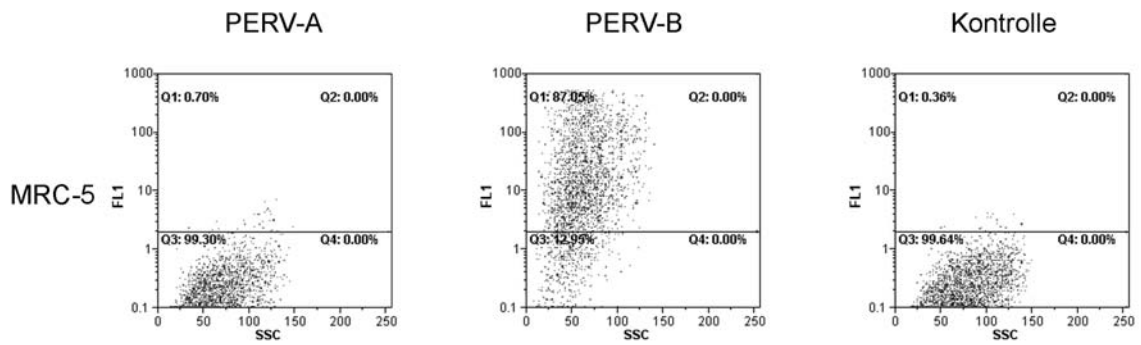


Abbildung 3-1 FACS-Analyse des Wirtszelltropismus der polytropen PERV-Klassen A und B

11 verschiedene Zelllinien wurden mit Überständen der PERV-Pseudotypen transduziert und die Transduktionseffizienz wurde im FACS gemessen. In der Abbildung dargestellt sind der Prozentsatz der GFP-positiven Zellen nach Transduktion mit PERV-A-Pseudotypen (erste Spalte), PERV-B-Pseudotypen (zweite Spalte) und in der Kontrolle die Eigenfluoreszenz der jeweiligen Zelllinie (dritte Spalte).

Die Transduktion der PBMC ließ sich im FACS wegen der geringen Effizienz nicht messen, da die Anzahl der das Transgen exprimierenden Zellen im Bereich der natürlichen Hintergrundreaktivität lag. Deshalb konnten die wenigen positiven Zellen nur im Fluoreszenzmikroskop dokumentiert werden (Abbildung 3-2).

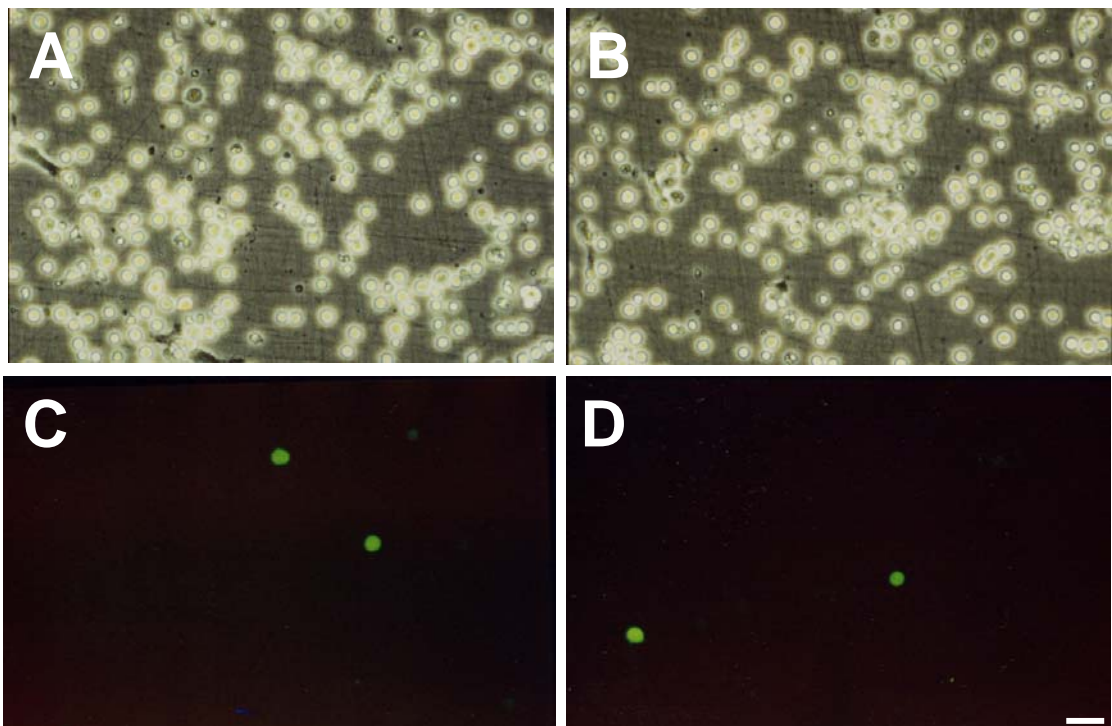


Abbildung 3-2 Mit PERV-Pseudotypvektoren transduzierte humane PBMC

Stimulierte PBMC wurden mit Überstand der PERV-A (A,C) und PERV-B (B,D) Pseudotypen inkubiert. 48 Stunden später wurde die Transgen-Expression (GFP) im Fluoreszenzmikroskop dokumentiert. Der Vergleich von Hellfeldaufnahmen (A, B) mit Fluoreszenzaufnahmen (C, D) zeigt die geringe Transduktionseffizienz. Diese war so niedrig, daß eine Quantifizierung im FACS (siehe Abbildung 3-2) nicht möglich war. Der Maßbalken (D) entspricht 50 µm.

3.1.2 Transduktionskinetik von PERV auf verschiedenen Zelllinien

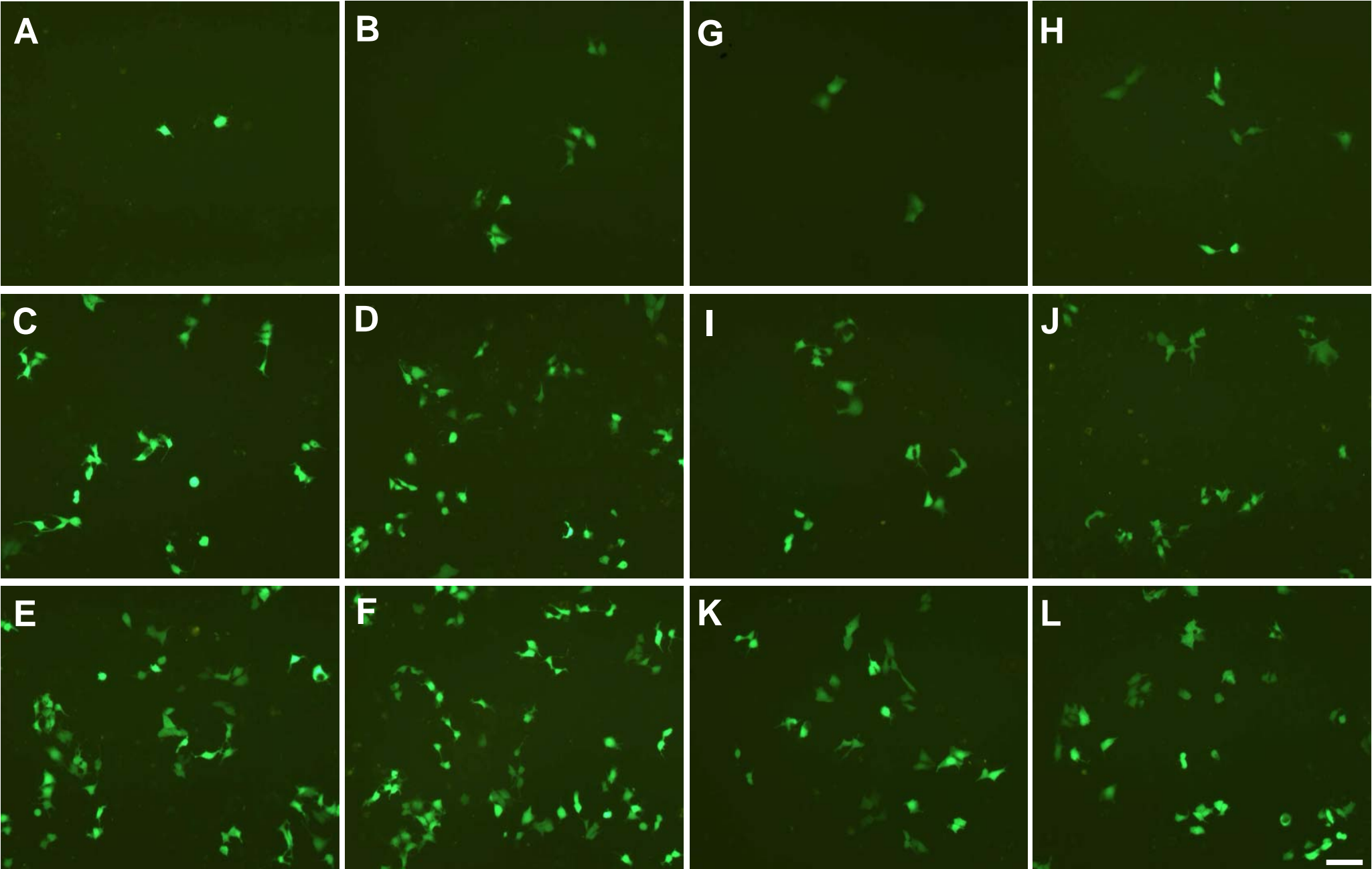
Zur Messung der Infektionskinetik von PERV wurden Pseudotypvektor-haltige Überstände auf den beiden hoch suszeptiblen Zelllinien 293 und HeLa für verschieden lange Zeiträume inkubiert. Um Unterschiede sichtbar zu machen wurden im Unterschied zu 3.1.1 zehnfach verdünnte Überstände verwendet. Die Transduktionseffizienz wurde nach 48 Stunden durch Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert und durch FACS-Analyse quantifiziert.

Auf beiden Indikatorzelllinien und mit beiden PERV-Klassen konnten schon nach kurzer Zeit (5 min, siehe Abbildung 3-3, A+G und Abbildung 3-4, A+G) erste Transduktionsereignisse festgestellt werden. Während die Transduktionskinetik für die untersuchten Zelllinien in Abhängigkeit der verwendeten PERV-Klasse unterschiedlich verläuft, stellt sich nach etwa drei Stunden (180 min, siehe Abbildung 3-3, E+K und Abbildung 3-4, E+K) die maximale Transduktionseffizienz ein, die sich kaum von den Werten der Übernacht-Inkubation (Abbildung 3-3, F+L, Abbildung 3-4, F+L) unterscheidet.

Die PERV-A-Pseudotypen transduzieren dabei 293-Zellen schneller als die PERV-B-Pseudotypen und erreichen einen höheren Endtiter (Abbildung 3-5, über-Nacht-Kultivierung). Das Verhältnis auf HeLa-Zellen ist sowohl in Bezug auf Geschwindigkeit als auch auf Höhe des Endtiters umgekehrt zu Gunsten der PERV-B-Pseudotypen (nicht gezeigt).

Abbildung 3-3 (Seite 60) Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Transduktionskinetik der beiden polytropen PERV-Klassen A und B auf der Zelllinie 293

Zellfreier Zellkulturüberstand der Produzentenzelllinie 293 ϕ g/p+A/B wurde in 1:10facher Verdünnung auf frische 293-Zellen übertragen und nach 5 min (**A+G**), 10 min (**B+H**), 45 min (**C+I**), 90 min (**D+J**), 180 min (**E+K**) und nach Übernacht-Inkubation (**F+L**) entfernt. Die zeitabhängige Transduktionseffizienz wurde nach 24-stündiger Kultivierung anhand der GFP-Expression am Fluoreszenzmikroskop dokumentiert. Die Transduktionseffizienz der PERV-A-Pseudotypen ist in **A-F** dargestellt, die der PERV-B-Pseudotypen in **G-L**. Der Maßbalken (L) entspricht 100 μ m.



Ergebnisse

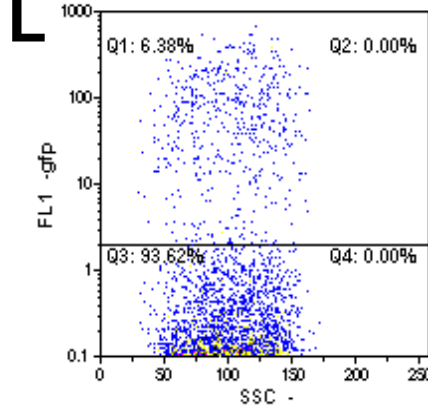
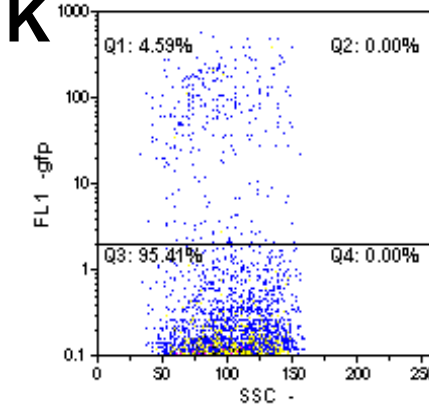
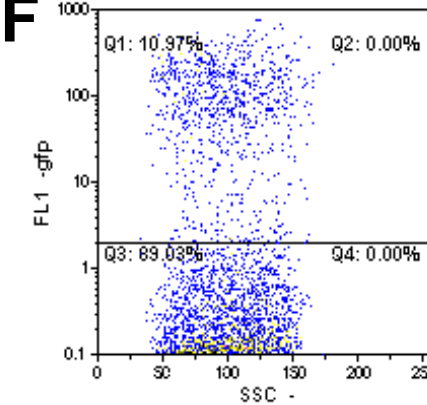
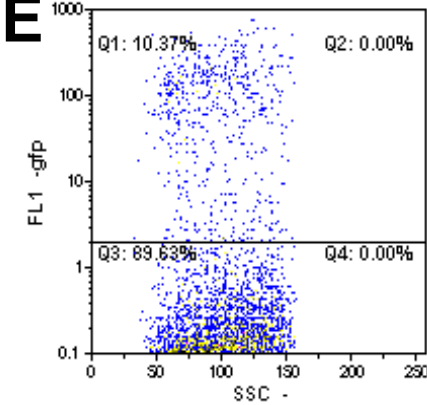
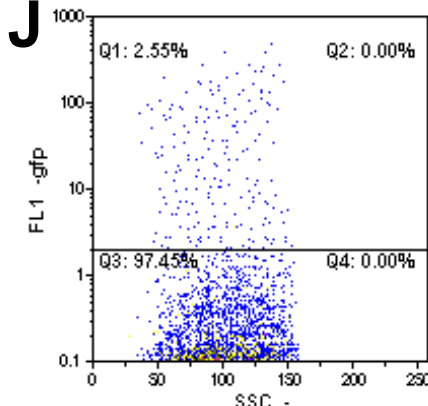
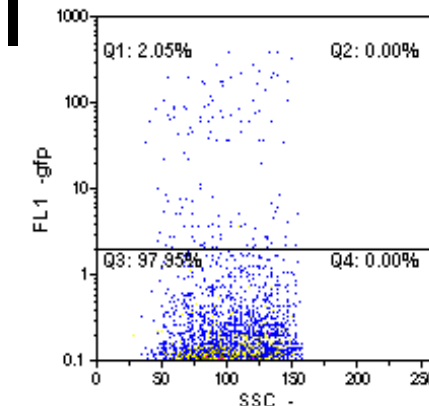
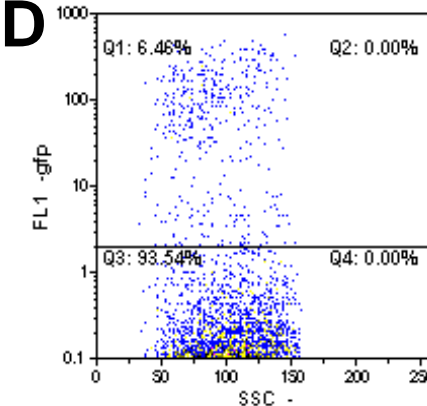
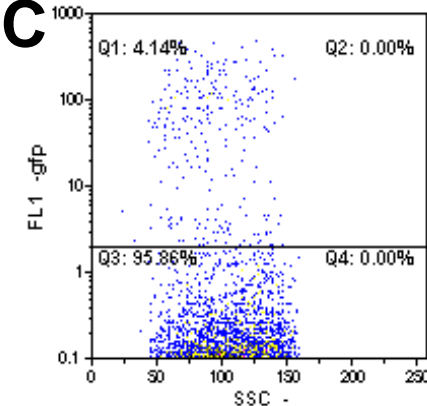
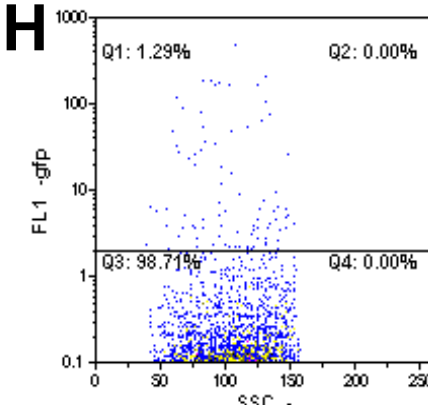
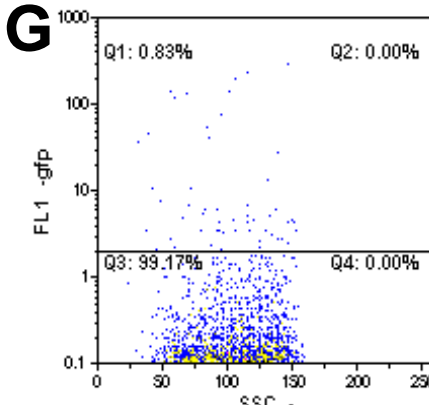
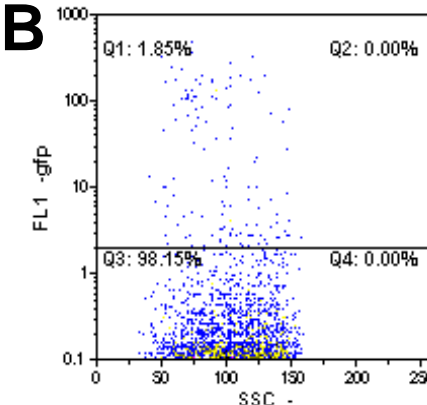
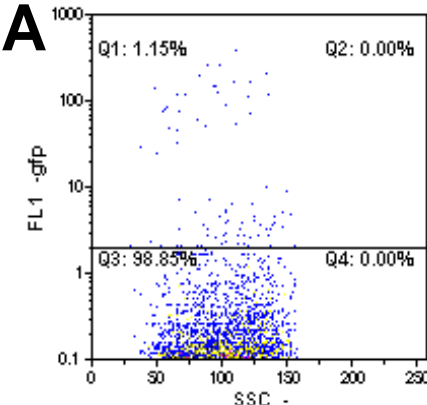
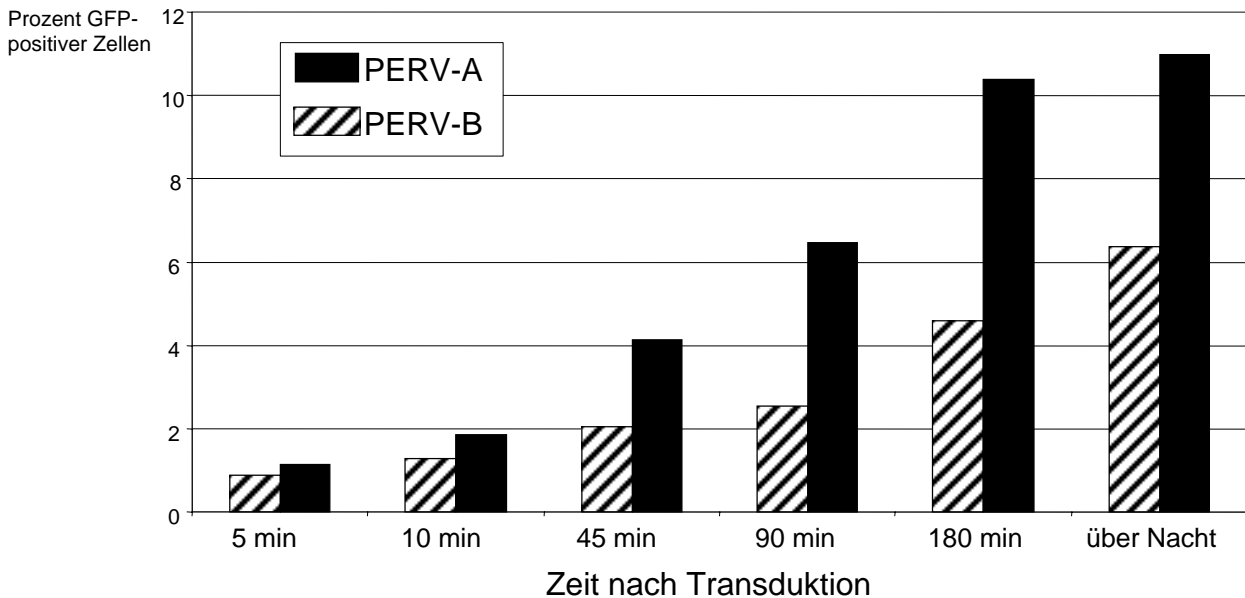


Abbildung 3-4 (Seite 61) FACS-Analyse der Transduktionskinetik von PERV

Die in Abbildung 3-3 dokumentierten Zellen wurden im FACS einer genaueren Quantifizierung unterzogen. Die Bezeichnung der einzelnen Panels entspricht der in Abbildung 3-3: 5 min (**A+G**), 10 min (**B+H**), 45 min (**C+I**), 90 min (**D+J**), 180 min (**E+K**) und nach Übernachts-Inkubation (**F+L**); Die Transduktionseffizienz der PERV-A-Pseudotypen sind in **A-F** dargestellt, die der PERV-B-Pseudotypen in **G-L**.

**Abbildung 3-5 Transduktionskinetik von PERV**

Das Diagramm zeigt die Transduktionskinetik der PERV-A/B-Pseudotypvektoren auf der Zelllinie 293 anhand der im FACS ermittelten Transduktionseffizienzen (Abbildung 3-4) als prozentualen Anteil der GFP-positiven Zellen von der pro Ansatz insgesamt eingesetzten Zellzahl.

3.1.3 Einfluß des Glykolisierungsstatus auf die Rezeptor-Hüllprotein-Interaktion

Die Identifizierung der Rezeptoren der polytropen PERV beruht auf der Interaktion der Pseudotypvektoren mit dem auf den Zellen exprimierten Rezeptoren (siehe Kapitel 2.3.3). Um auszuschließen, daß eine posttranslationale Glykosylierung der Rezeptorproteine in den untersuchten Zelllinien die Interaktion beeinflusst, wurde der Glykolisierungsstatus der Zielzellen untersucht. Durch Zugabe von Tunicamycin zur Zellkultur (siehe Kapitel 2.4.7) wurde die Glykolisierung zellulärer Proteine unterbunden, während durch Vergleich von unter normalen Kulturbedingungen permissiven und nicht-permissiven Zelllinien der Einfluß der Glykolisierung getestet wurde.

Durch Behandlung von normalerweise suszeptiblen 293- und HeLa-Zellen mit Tunicamycin konnte keine Verringerung der Transduktionseffizienz von PERV-A oder PERV-B-Pseudotypvektoren festgestellt werden. Zugabe von Tunicamycin zu normalerweise nicht-suszeptiblen Cos7- oder 3T3-Zellen führte zu keiner Steigerung der Transduktionseffizienz (Daten nicht gezeigt).

3.1.4 Neutralisation der Pseudotypvektoren durch spezifische Antikörper

In der Vergangenheit wurden verschiedene Antiseren gegen PERV entwickelt, deren Wirksamkeit in immunologischen Verfahren wie Western Blot, ELISA oder Immunfluoreszenzanalysen nachgewiesen wurde (Krach et al., 2000; Specke et al., 2001; Tacke et al., 2001; Fischer et al., 2003). Im Rahmen einer Sicherheitsabschätzung von PERV in der XT_x wäre es aber wünschenswert zu wissen, ob im Falle einer Infektion des Transplantatempfängers dessen Ärzte oder Kontaktpersonen nach einer Impfung, durch gegen PERV gerichtete Antikörper, vor einer Ansteckung geschützt wären.

Da ein funktionierendes Tiermodell der PERV-Infektion noch nicht vorliegt, wurden die PERV-Pseudotypvektoren gewählt, um die neutralisierende Wirkung der Antiseren zu überprüfen. Da die Pseudotypvektoren nur das Hüllprotein von PERV exprimieren, konnten nur die gegen Teile dieses Proteins gerichteten Antiseren (α gp70(B) und α p15E; siehe Abbildung 3-6; Fischer et al., 2003) getestet werden.

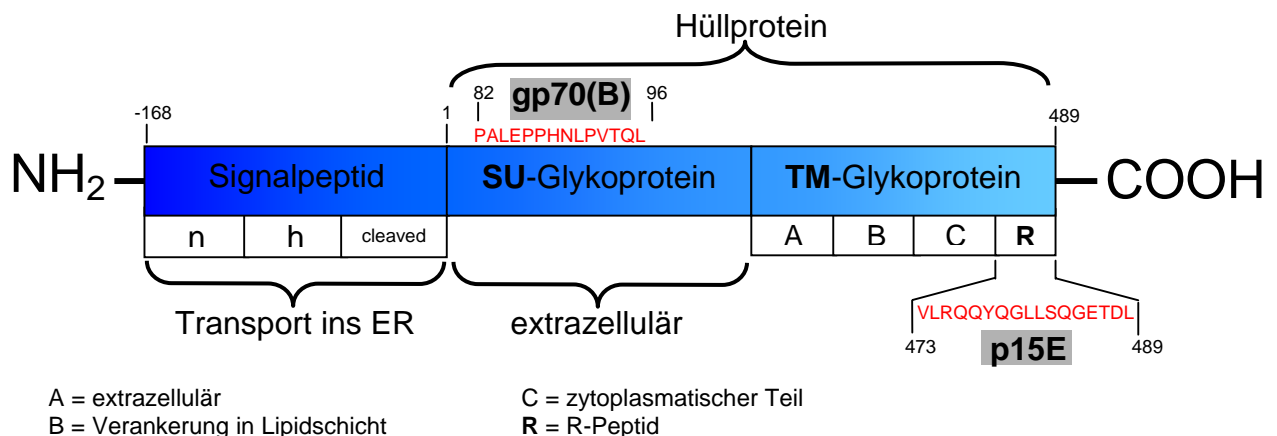


Abbildung 3-6 Struktur des PERV-Hüllproteins und Positionen, gegen die Antikörper erzeugt wurden

Das Hüllprotein der Retroviren lässt sich funktionell in verschiedene Teilbereiche unterteilen. Das Signalpeptid steuert den intrazellulären Transport des Proteins ins ER und wird vor der Reifung abgespalten. Das SU-Glykoprotein („*surface unit*“) stellt den extrazellulären Teil des Hüllproteins dar und ist für die Rezeptorbindung zuständig, während das TM-Glykoprotein („*transmembrane*“) die Verankerung in der Virushülle und die Anbindung an das Capsid bewerkstelligt. Nach Abspaltung des R-Peptids (artifizial (Kapitel 3.2) oder während der Virusreifung) erhöhen sich stark die fusogenen Eigenschaften des Hüllproteins. Von U. Krach wurden zwei Antiseren gegen das SU-Glykoprotein (gp70(B)) sowie gegen das R-Peptid (p15E) erzeugt. Während das Serum gegen p15E nicht zwischen den polytropen PERV-Klassen diskriminiert, erkennt das gegen das SU-Glykoprotein gerichtete Antiserum nur PERV-B. In der Grafik sind die Orte, gegen die immunisiert wurde, gekennzeichnet (graue Boxen) und die zur Immunisierung verwendete Peptidsequenz ist angegeben (rot). Weitere Informationen zu Herstellung und Spezifität der Seren findet sich in (Fischer et al., 2003).

Dazu wurden Pseudotypvektor-haltige Überstände (PERV-A und PERV-B) für eine Stunde mit steigenden Mengen (0, 10, 25, 50, 75 und 100 μ l) der zwei gegen das Hüllprotein gerichteten Antiseren inkubiert und dann auf Indikatorzellen (293) gegeben.

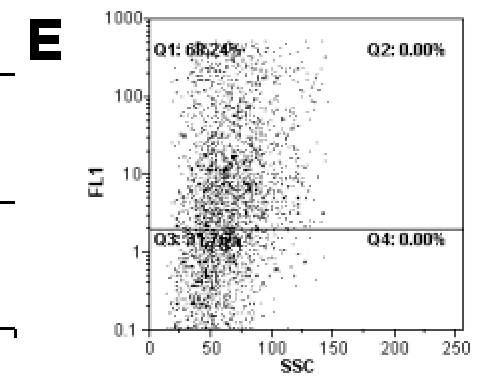
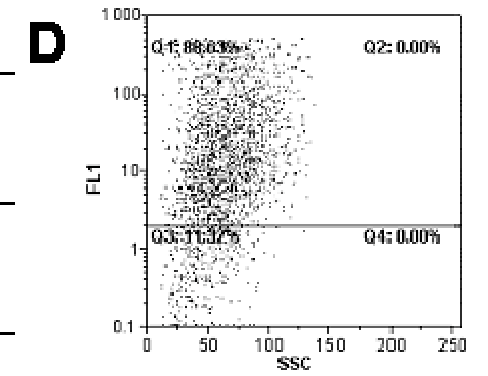
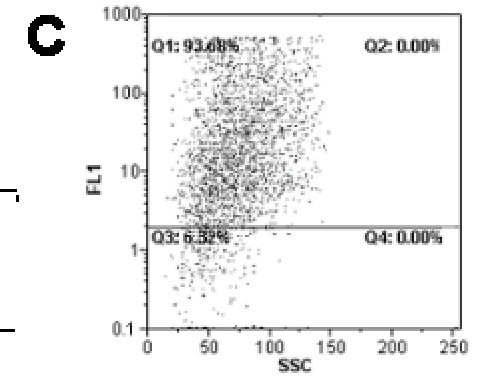
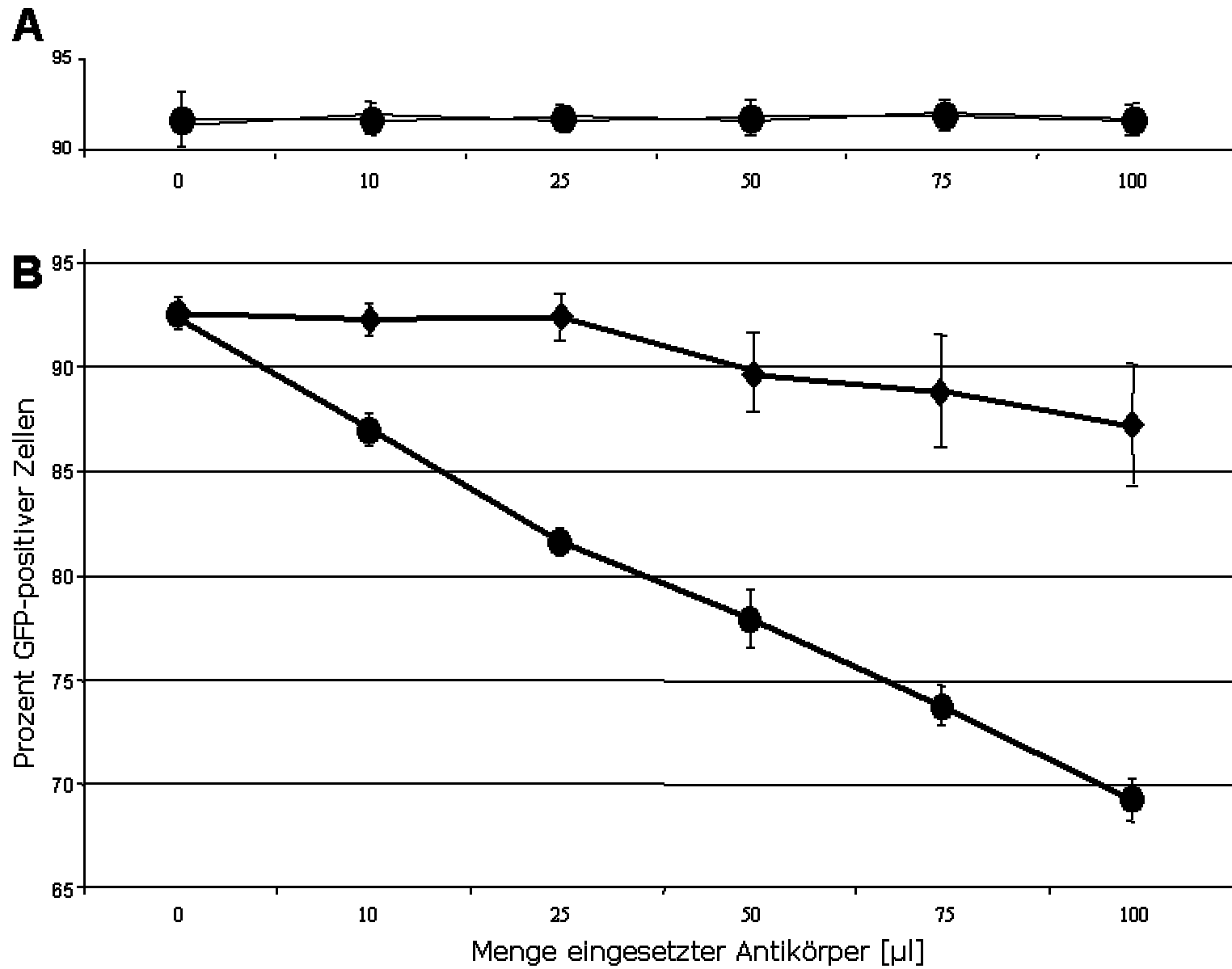
Die resultierende Transduktionseffizienz wurde anschließend im FACS bestimmt (Abbildung 3-7 C-E). Partikel im PERV-A-Überstand lassen sich durch keins der verwendeten Antiseren neutralisieren. Die beobachtete Transduktionseffizienz ist selbst bei Zugabe der höchsten Antiserum-Menge von 100 μ l identisch mit der des unbehandelten Überstands (Abbildung 3-7A).

Gegen die PERV-B-Pseudotypen wirken die Antiseren unterschiedlich stark. Das gegen das R-Peptid gerichtete Antiserum α p15E führt bei Zugabe der höchsten Menge zu einer Reduktion der Transduktionseffizienz um 5% (Abbildung 3-7 B, Raute), wobei die beobachtete Reduktion am Rand der Signifikanzgrenze liegt und somit nicht unbedingt als spezifisch angesehen werden muß. Das gegen das SU-Glykoprotein gerichtete Antiserum α gp70(B) senkte bei Zugabe von 100 μ l die Transduktionseffizienz um etwa 25% (Kreis). Hierbei ist zu beachten, daß das Komplement im Medium hitzeinaktiviert wurde (siehe Kapitel 2.2.2) und somit die beobachtete Reduktion der Transduktionseffizienz auf sterische Hinderungen bei der Hüllprotein-Rezeptor-Interaktion zurückzuführen ist.

Abbildung 3-7 (Seite 65) Neutralisation der PERV-Pseudotyp-Vektoren

Pseudotypvektor-haltige Überstände (PERV-A und PERV-B) wurden für eine Stunde mit steigenden Mengen (0, 10, 25, 50, 75 und 100 μ l) zweier gegen PERV gerichteter Antiseren (α gp70(B) und α p15E; siehe Abbildung 3-6; Fischer et al., 2003) inkubiert und dann auf Indikatorzellen (293) gegeben. Die resultierende Transduktionseffizienz wurde im FACS bestimmt. **A.** Partikel im PERV-A-Überstand lassen sich durch keins der Antiseren neutralisieren, die Transduktionseffizienz ist selbst bei Zugabe der höchsten Antiserum-Menge identisch mit der des unbehandelten Überstands. **B.** Gegen die PERV-B-Pseudotypen haben die Antiseren verschieden starke Effekte. α p15E führt bei Zugabe der höchsten Menge zu einer Reduktion der Transduktionseffizienz um 5% (Raute), während α gp70(B) die Transduktionseffizienz um etwa 25% senkt (Kreis). C-E. FACS-Analyse der Indikatorzelllinie 293 nach Zugabe der jeweils mit 100 μ l Antiserum inkubierten Überstände. **C.** PERV-A mit α gp70(B), **D.** PERV-B mit α p15E **E.** PERV-B mit α gp70(B).

Ergebnisse



3.2 Untersuchungen am R-Peptid des PERV-Hüllproteins

Zur Aktivierung der Hüllprotein-vermittelten Fusion von Zell- und Virusmembran bei C-Typ-Viren bedarf es der proteolytischen Abspaltung eines als R-Peptid bezeichneten und im Falle von PERV aus 17 Aminosäuren bestehenden Polypeptids am C-Terminus des Hüllproteins.

Durch Generierung von *env*-Expressionsvektoren sollte überprüft werden, ob auch bei PERV die Zell-Virus-Fusion durch Abspaltung des R-Peptids eingeleitet wird und ob durch Verwendung trunkierter Hüllproteine eine Steigerung des Titers der PERV-Pseudotypen erreicht werden kann.

Durch Auswahl entsprechender Primer wurden um das R-Peptid verkürzte Hüllproteine von PERV-A und PERV-B auf Basis der Moleklarklone 293-PERV-A(42) bzw. 293-PERV-B(33) erzeugt und in den Expressionsvektor pMBMo-ALF (Cosset et al., 1995) kloniert, wobei das Fehlen der R-Peptide durch Sequenzierung überprüft wurde. Die Expressionsvektoren mit den trunkierten Hüllproteinen werden zur Unterscheidung von den Vollängenkonstrukten (siehe Kapitel 2.3 sowie Abbildung 2-1 und Abbildung 2-3) mit dem Suffix ΔR gekennzeichnet.

Durch Transfektion der Expressionsvektoren in für PERV susceptible 293-Zellen konnte gezeigt werden, daß die verkürzten Hüllproteine einen starken fusogenen Effekt aufwiesen und in der Zellkultur zu starker Syncytienbildung führten (Abbildung 3-8). Dabei lag die fusogene Aktivität von PERV-A ΔR deutlich über der von PERV-B ΔR (Abbildung 3-9), obwohl die Aminosäuresequenz am C-Terminus bei beiden Formen identisch ist (Tabelle 3-1). Die Bestimmung der Stärke der fusogenen Aktivität erfolgte durch Auszählen der gebildeten Syncytien unter dem Mikroskop 20 Stunden nach Transfektion. Unbehandelte oder mit dem Wildtyp-Hüllproteinvektor transfizierte 293-Zellen zeigten nur eine ganz geringe Syncytienbildung, an der auch nur wenige Einzelzellen beteiligt waren. Die durch die Expression der trunkierten Hüllproteine induzierten Syncytien enthielten bis zu 100 Zellkerne, wobei bei Verwendung von PERV-A ΔR durchschnittlich mehr Kerne pro Syncytium auftraten als bei PERV-B ΔR .

Bei Analyse der Expression der Klone PERV-A(Bac-130A12) und PERV-A(Bac-151B10) (siehe Kapitel 3.4.3), die beide ein leicht verkürztes R-Peptid besitzen (siehe Tabelle 3-1, PERV-2), konnte gegenüber dem Wildtyp-R-Peptid keine erhöhte Neigung zur Syncytienbildung festgestellt werden.

Durch Einbringen der Expressionsvektoren in die Verpackungszelllinie 293ΦNXg/p (siehe Kapitel 2.3 und Kapitel 2.4.1) sollte überprüft werden, ob sich der Titer der Pseudotypen durch Hüllproteine mit erhöhter fusogener Aktivität verbessern läßt. Aber auch hier setzte eine rasche Syncytienbildung ein, durch die die Zellen schnell abstarben und der resultierende Titer war deutlich geringer als bei der Verwendung der Hüllproteine in voller Länge (Abbildung 3-8).

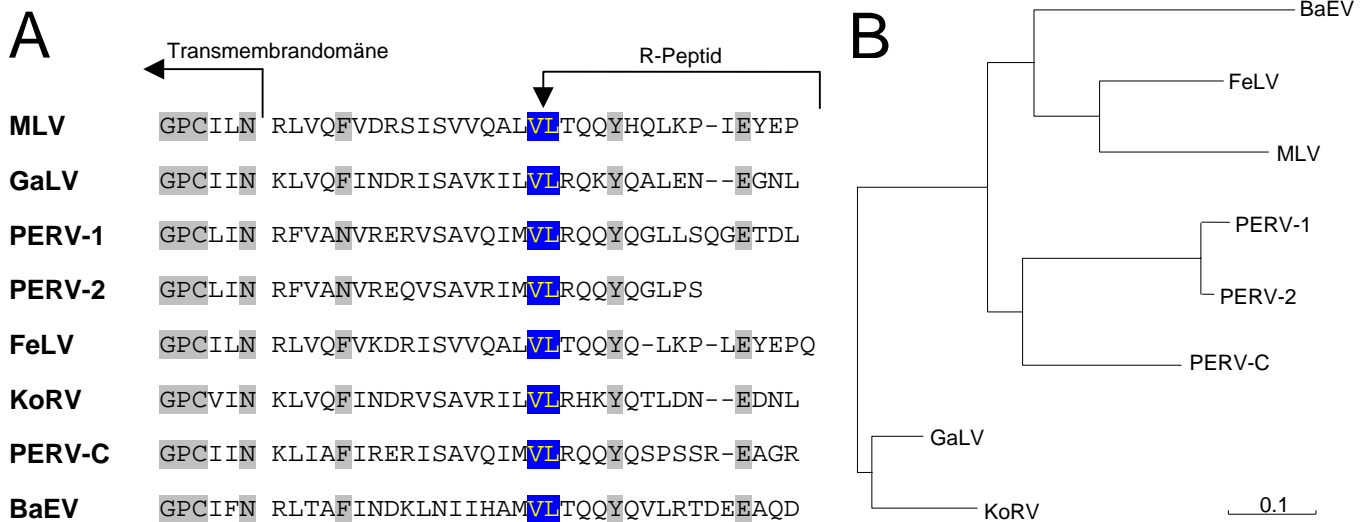


Tabelle 3-1 Sequenzvergleich der R-Peptide verschiedener C-Typ-Retroviren

A. Die R-Peptide verschiedener C-Typ-Retroviren weisen durchaus heterologe Aminosäuresequenzen auf, aber einige wenige Positionen sind hoch konserviert (grau hinterlegt). Die putative Proteasespaltstelle liegt zwischen Valin (V) und Leucin (L, blau hinterlegt). Prinzipiell unterscheiden sich die R-Peptide von PERV-A und PERV-B nicht und besitzen die mit PERV-1 bezeichnete 17 Aminosäuren lange Sequenz. Die beiden Klone PERV-A(Bac-130A12) und PERV-A(Bac-151B10) besitzen dagegen ein trunkiertes, nur 10 Aminosäuren langes R-Peptid (PERV-2). **B.** Die Stammbaum-Darstellung zeigt, daß sich die Struktur der R-Peptide in drei Gruppen unterteilen läßt, wovon eine durch die drei PERV-Klassen gebildet wird, während zur zweiten Gruppe BaEV, FeLV sowie MLV und zur dritten Gruppe GaLV und KoRV gehören.

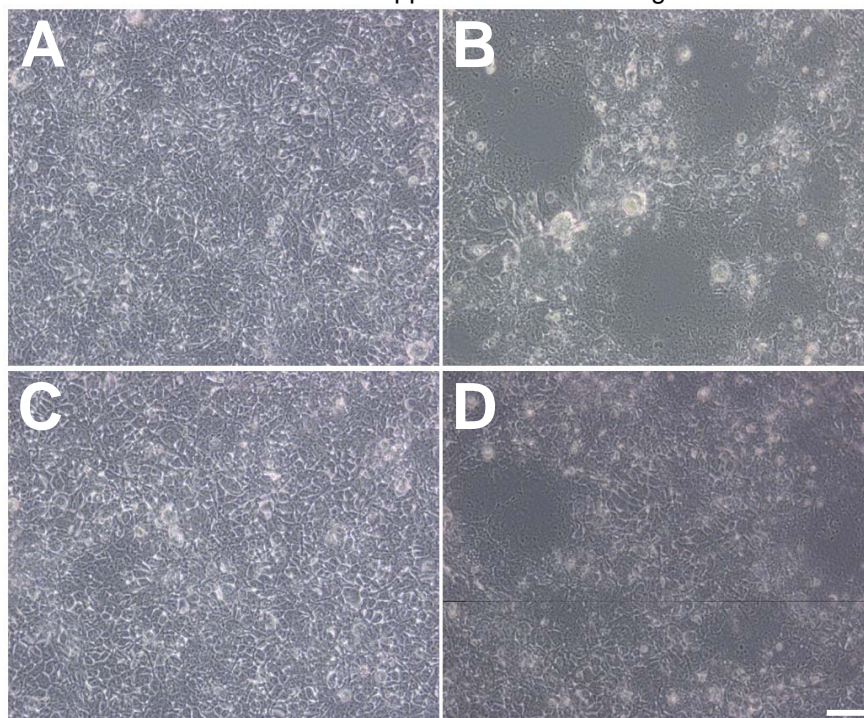


Abbildung 3-8 Induktion von Zellfusion durch das R-Peptid

Vergleich zwischen 293-Zellen, die mit Expressionsplasmiden des Hüllproteins von PERV-A und -B transfiziert wurden (A und C) und 293-Zellen, die mit Expressionsplasmiden transfiziert wurden, bei denen der Leserahmen des Hüllproteins um die Sequenz des R-Peptids trunziert wurde (B und D).

Während sich in A und C ein durchgehender Zellrasen zeigt, sind in B und D deutliche Syncytien zu erkennen. Während die Größe einzelner Syncytien bei beiden Hüllproteinen zwischen 20-50 Kernen schwankte, war die Anzahl der Syncytien bei der Verwendung von PERV-encAΔR höher. Die Quantifizierung ist in Abbildung 3-9 dargestellt. Der Maßbalken (D) entspricht 100 µm.

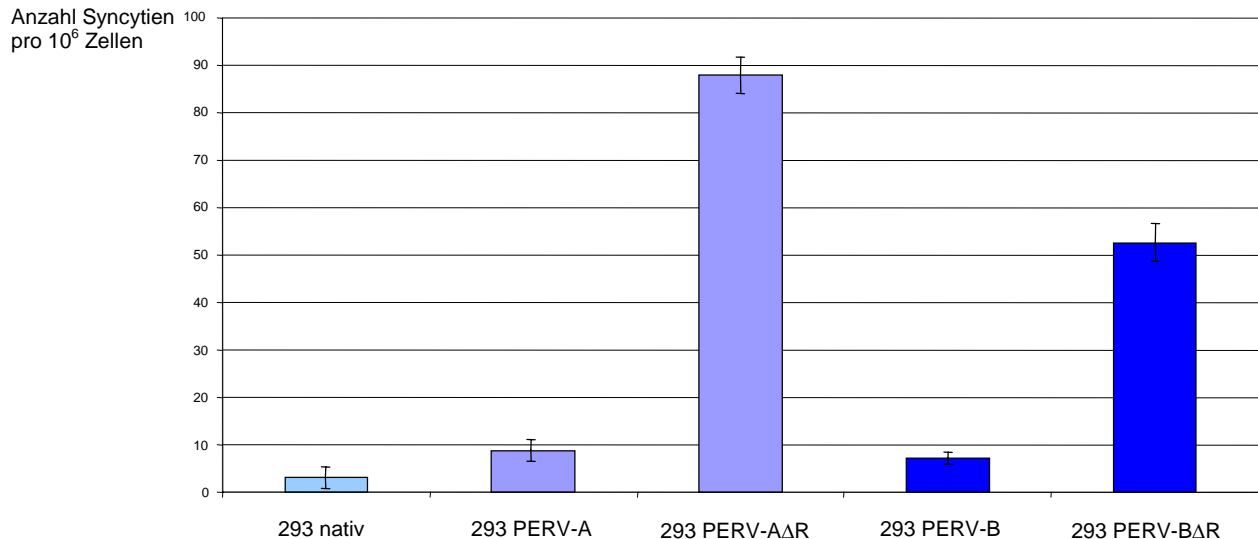


Abbildung 3-9 Quantitative Auswertung der Syncytieninduktion nach Transfektion der Hüllproteine von PERV-A und PERV-B in 293-Zellen

Die Anzahl der nach Transfektion von 293-Zellen mit den *env*-Expressionsplasmiden gebildeten Syncytien wurde durch Auszählung dreier unabhängiger Experimente unter dem Mikroskop bestimmt.

Die geringe Syncytienbildung in nativen 293-Zellen läßt sich durch Transfektion der Vollängen-Expressionplasmide (293 PERV-A, 293-PERV-B) nur geringfügig steigern. Bei Transfektion der trunzierten *env*-Expressionsplasmide steigt die Zahl der Syncytien aber um das 10fache (PERV-AΔR) bzw. um das 5fache (PERV-BΔR) an.

Eine umfassende Betrachtung der fusogenen Eigenschaften der Hüllproteine verschiedener C-Typ Retroviren unter Berücksichtigung der putativen R-Peptide findet sich in Bobkova et al., 2002.

3.3 Rezeptorklonierung

Über die Zwischenschritte der Isolierung von Total-RNA und mRNA wurde eine cDNA-Bibliothek der Zelllinie 293 in dem Vektor pcDNA3.1/Zeo⁺ (Abbildung 2-3 E) hergestellt. Die Qualität der Bibliothek, also die Repräsentation möglichst vieler, seltener und vollständiger cDNAs wurde mit Hilfe des „*cDNA quality control primer sets*“ von Stratagene überprüft (Abbildung 3-10 C). Dieser Set enthält intronüberspannende Primer für niedrig, mäßig und hoch exprimierte Gene des humanen Genoms,

Ergebnisse

womit sich sowohl DNA-Kontaminationen testen als auch die Repräsentation der Bibliothek überprüfen lässt.

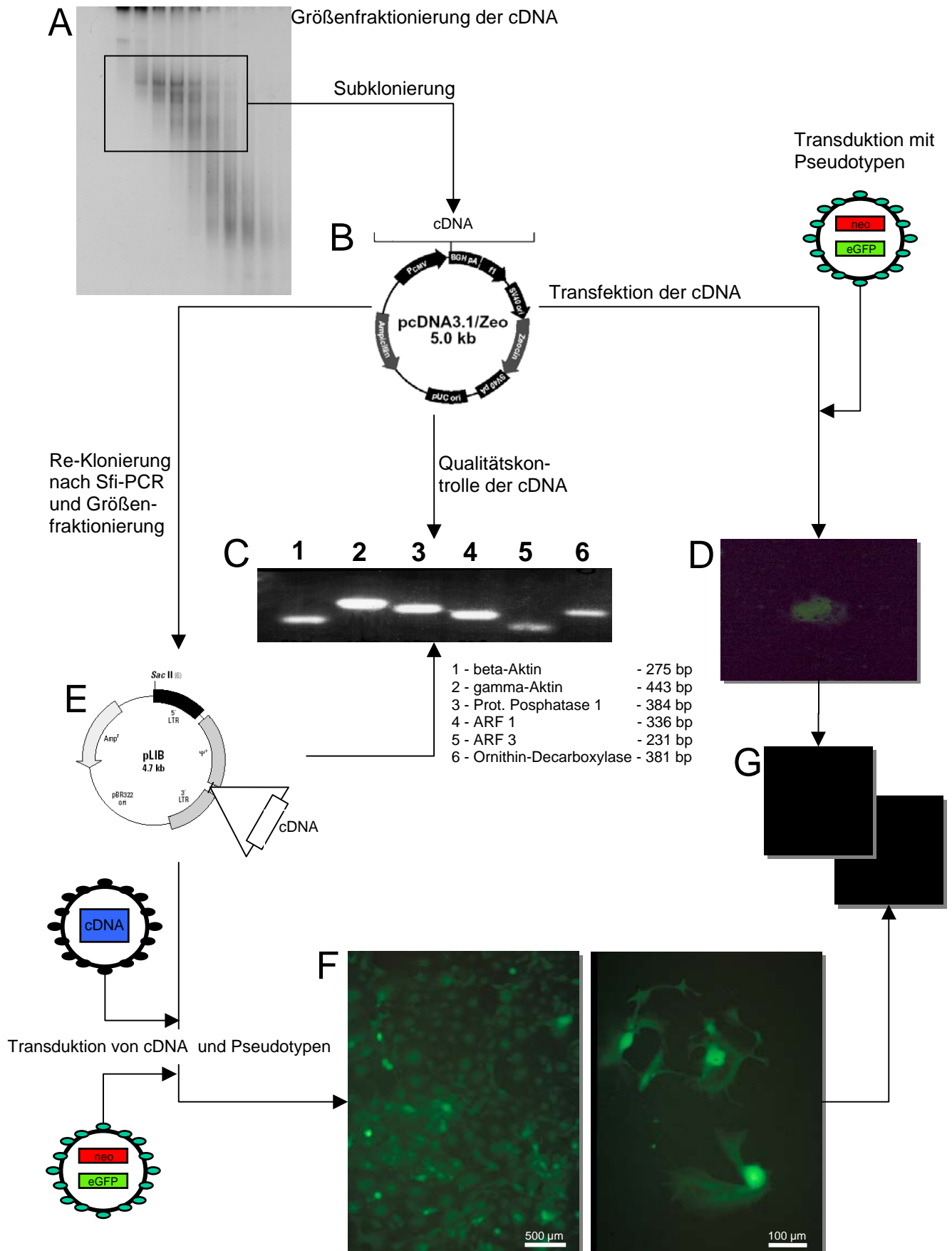


Abbildung 3-10 Ablauf und Ergebnis der PERV-Rezeptorklonierung

Die radioaktiv markierte cDNA wurde fraktioniert (**A**) und Fragmente zwischen 4kb und 1kb wurden in den Vektor pcDNA3.1/Zeo⁺ kloniert (**B**). Die Qualität der cDNA wurde überprüft, indem verschieden häufig vorkommende Haushaltsgene per PCR amplifiziert wurden (**C**). 1µg der cDNA wurde in 3T3 sowie Cos7-Zellen transfiziert, die nach zweitägiger Expression der cDNA mit Pseudotyphaltigen Überstand transduziert wurden. Die Expression des Transgens wurde am Fluoreszenzmikroskop verfolgt (**D**). Zur Verbesserung der Effizienz wurde die cDNA im pcDNA3.1/Zeo⁺-Vektor mit Sfi-rekombinanten Primern amplifiziert. Fragmente zwischen 1kb und 4 kb wurden in den retroviralen Expressionvektor pLIB kloniert (**E**) und die Qualität der cDNA-Bibliothek wurde prinzipiell wieder per PCR überprüft (**C**).

cDNA-Pseudotypen mit VSV-G-Hüllproteinen und MLV-Transfervektor wurden analog der PERV-Pseudotypen generiert (siehe Kapitel 2.3.1) und in die 3T3- bzw Cos7-Zellen transduziert.

Nach zweitägiger Expression der cDNA wurde wieder mit PERV-Pseudotypen transduziert und die Transgenexpression nach weiteren zwei Tagen bestimmt (**F**). Durch Neomycin-Selektion wurden die transduzierten Zellen in der Zellkultur angereichert, um schließlich genomische DNA für die PCR-Analyse zu gewinnen (siehe Kapitel 2.6.5).

Weder nach Transfektion/Transduktion der cDNA-Vektoren noch bei Behandlung nativer Zielzellen mit den PERV-Pseudotypvektoren konnte eine Expression des Transgens beobachtet werden (**G**, vergleiche Abbildung 3-1).

Die Transfektion dieser ersten cDNA-Bibliothek in Cos7- oder 3T3-Zellen erbrachte nach anschließender Transduktion mit PERV-Pseudotypvektoren einzelne GFP-positive Zellen, die dem Konzept (2.3.3) zufolge die rezeptorkodierende cDNA exprimieren (Abbildung 3-10 D). Die geringe Anzahl der positiven Zellen erlaubte allerdings keine Selektion und damit Anreicherung dieser Zellen, um auf isolierter DNA die rezeptorkodierende cDNA per PCR zu amplifizieren.

Nach Amplifikation der cDNA auf Grundlage des ersten Vektors per PCR und rekombinanten Primern mit Sfi-Schnittstelle wurden die resultierenden Fragmente in einen retroviralen Transfervektor (Abbildung 2-3 D) kloniert, der die Herstellung cDNA-haltiger Partikel auf Basis von MLV- (*gag/pol*) und VSV-G- (*env*) Plasmiden analog zur Herstellung der PERV-Pseudotypvektoren erlaubte. Gegenüber der Transfektion konnten die Zielzellen mit deutlich höherer Effizienz transduziert werden. Der retrovirale Transfervektor besitzt jedoch keine Antibiotikaresistenz, auf die er in Zellkultur selektioniert werden könnte. Bei nachfolgender Transduktion mit PERV-Pseudotypvektoren ergab sich eine Steigerung der GFP-positiven Zellen um den Faktor 100 (Abbildung 3-10 F). Hierbei waren Versuche auf den 3T3-Zellen jedoch erfolgreicher, als Parallelansätze auf Cos7-Zellen.

Nach Selektion der doppeltransduzierten 3T3-Zellen mit Neomycin konnten antibiotikaresistente, GFP-positive Klone geerntet und vermehrt werden, aus denen nach Isolierung genomischer DNA die rezeptorkodierende cDNA per PCR amplifiziert werden sollte.

3.4 Lokalisierung und Expression replikations-kompetenter PERV

Zur Suche nach replikations-kompetenten PERV erhielten wir von unserer französischen Kooperationsgruppe (P. Chardon und C. Rogel-Gaillard) 21 BAC-Klone, die bei vorangegangenen Untersuchungen positiv für alle drei viralen Leserahmen getestet wurden und damit die besten Kandidaten darstellten, um nach replikations-kompetenten PERV zu suchen (Rogel-Gaillard et al., 1999).

Diese 21 BAC-Klone wurden weiteren Analysen unterzogen, darunter genspezifische PCR, anschließender Test auf offene Leserahmen (*in vitro* Transkriptions/Translations-Assay, siehe Kapitel 2.5.3) und Vollängen-PCR zum Nachweis, ob die viralen Leserahmen in einer kolinearen Struktur organisiert sind. Diese Testergebnisse sind in Tabelle 3-4 zusammengefasst. Auf Grund dieser Voruntersuchungen wurden die vier Klone PERV-A(Bac-130A12), PERV-A(Bac-151B10), PERV-A(Bac-463H12) und PERV-B(Bac-192B9) ausgewählt und funktionellen Analysen in der Zellkultur (Immunfluoreszenzanalyse und RT-Test) unterworfen.

3.4.1 Genetische Struktur der nativen PERV-Klone aus der „*large white*“-Bibliothek

Die Sequenzierung der nativen Proviren PERV-A(Bac-130A12), PERV-A(Bac-151B10), PERV-A(Bac-463H12) und PERV-B(Bac-192B9) enthüllte die gleiche genetische Struktur, wie sie bei zuvor aus der humanen Zelllinie 293 PERV-PK (Czuderna et al., 2000) und der porcinen Zelllinie PK15 (Krach et al., 2001) isolierten PERV gefunden wurde.

Wegen der großen Ähnlichkeiten (siehe Tabelle 3-3) zwischen den einzelnen Klonen möchte ich die genetische Struktur hier der Einfachheit halber nur an Klon PERV-A(Bac-130A12) erläutern, die Daten der anderen drei Klone finden sich in Abbildung 3-11 und Tabelle 3-2.

Der Klon PERV-A(Bac-130A12) ist 8918 bp lang. Das *gag*-Gen startet bei nt 1153 und ist colinear mit dem *pro/pol*-Leserahmen (nt 2875-6309). Das Amber STOP-Codon (UAG) an Position nt 2727, das die beiden Gene voneinander trennt, wird, wie für PERV beschrieben (Akiyoshi et al., 1998; Czuderna 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).

Vergleiche der Nukleotid- und den davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen der vier BAC-Klone mit den zwei anderen aus einer porcinen Quelle isolierten Klonen PK15-PERV-A(58) und PK15-PERV-B(213) (Krach et al., 2001) ergaben hohe Übereinstimmungswerte (> 95%), die in Tabelle 3-3 zusammengefasst sind.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	Cap	PBS	SD	SA	Poly A
PERV-A(Bac-130A12)	702	1153	2727	2875	6309	6185	8149	8216	8918	540	706	761	5949	8810
PERV-A(Bac-151B10)	703	1148	2725	2873	6302	6177	8141	8180	8911	541	707	762	5912	8775
PERV-A(Bac-463H12)	630	1077	2651	2820	6239	6115	8097	8125	8751	467	633	689	5873	8646
PERV-B(Bac-192B9)	668	1115	2689	2837	6277	6150	8123	8173	8840	506	671	727	5911	8744

Tabelle 3-2 Nukleotid-Positionen von Genen und genetischen Elementen der vier replikations-kompetenten PERV.

Die Tabelle gibt einen Überblick über die Positionen der wichtigsten Strukturmerkmale der vier PERV. Die benutzte Nomenklatur korrespondiert mit Abbildung 3-11. Cap, „Cap Site“; PBS, Primerbindungsstelle; SD, „splice donor“; SA, „splice acceptor“; Poly A, Polyadenylierungssignal

		Prozent Nukleotid- und Aminosäure-Homologie (in Klammern) mit den angegebenen PERV Sequenzen			
		PERV-A(Bac-130A12)	PERV-A(Bac-151B10)	PERV-A(Bac-463H12)	PERV-B(Bac-192B9)
Vergleich zu PK15-PERV-A (58)	LTR	99,9 (n.a.)	98,4 (n.a.)	70,1 (n.a.)	63,4 (n.a.)
	<i>gag</i>	99,8 (98,9)	94,0 (94,7)	97,0 (99,1)	95,2 (95,0)
	<i>pro/pol</i>	99,7 (98,4)	97,0 (96,8)	96,0 (95,1)	96,7 (n.a.)
	<i>env</i>	99,8 (98,0)	99,4 (98,0)	98,6 (98,7)	71,6 (65,6)
Vergleich zu PK15-PERV-B (213)	LTR	67,5 (n.a.)	66,8 (n.a.)	94,8 (n.a.)	82,9 (n.a.)
	<i>gag</i>	95,2 (95,6)	90,0 (93,2)	97,0 (97,9)	99,2 (98,3)
	<i>pro/pol</i>	96,5 (95,9)	94,0 (95,4)	94,0 (93,8)	99,3 (n.a.)
	<i>env</i>	71,5 (64,6)	71,5 (64,6)	71,9 (65,5)	99,4 (99,1)

Tabelle 3-3 Vergleich der Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzen der Proviren PERV-A(Bac-130A12), PERV-A(Bac-151B10), PERV-A(Bac-463H12) und PERV-B(Bac-192B9).

*native PERV isoliert aus der Zelllinie PK15

n.a., nicht anwendbar. Entweder wird die Nukleotidsequenz nicht in Protein translatiert (LTRs) oder weil STOP-Codons verhindern, daß die Sequenz translatiert wird (im Falle des *pol* Gens von Klon PERV-B(Bac-192B9)).

Homologiewerte wurden mit der Analysesoftware DNASIS (Hitachi) ermittelt.

Hoch konservierte Aminosäuremotive, wie sie für C-Typ-Retroviren beschrieben wurden (z.B. N-Terminus von Gag (Shinnick et al., 1981), N-Terminus von p30 (Oroszlan et al., 1981), die Aspartylprotease (Coffin, 1992), die reverse Transkriptase (Xiong and Eickbush, 1990) und die gp70/p15E-Spaltstelle (LeTissier et al., 1997; Akiyoshi et al., 1998)) sind auch bei den vier BAC-Klonen vorhanden.

3.4.2 Genetische Merkmale der PERV LTR

Während die genetische Organisation der viralen ORFs wenige Unterschiede aufweist, konnten bei den vier Proviren zwei prinzipiell verschiedene LTR-Strukturen identifiziert werden, wie sie schon zuvor in (Scheef et al., 2001) und (Scheef et al., 2002) beschrieben wurden und die signifikant die Stärke der viralen Replikation beeinflussen. Eine schematische Darstellung der vier LTRs findet sich in Abbildung 3-12. Die PERV LTR unterteilt sich in U3, R und U5, ist, abhängig von der „repeat“-Struktur (siehe unten) zwischen 630 und 703 Nukleotide lang, und wird durch die invertierte Wiederholungssequenz TGAAAGG/CCTTTCA begrenzt.

Die zwei prinzipiell verschiedenen LTR-Strukturen unterscheiden sich durch die An- bzw. Abwesenheit von 39bp-„repeats“ in U3, die in unterschiedlich vielen Wiederholungen aufeinander folgen. Diese 39bp-Wiederholung setzt sich wiederum aus einer 21bp- und einer 18bp-Untereinheit zusammen (Abbildung 1-4), wobei am 5'-Ende der Wiederholungssequenz immer eine einzelne 18bp-Untereinheit liegt.

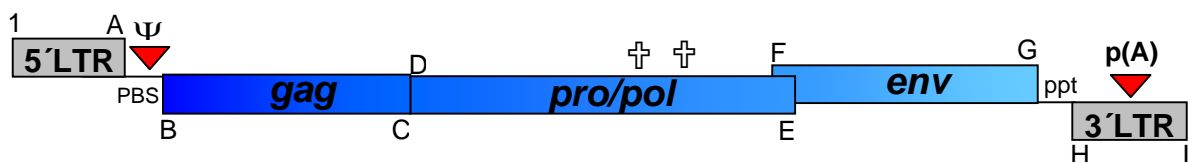


Abbildung 3-11 Genetische provirale Struktur der nativen PERV, die aus der „large-white“-Bibliothek isoliert wurden

Diese Abbildung zeigt den strukturellen Aufbau der vier aus der „large white“-Bibliothek isolierten PERV, wobei die Buchstaben A bis I die Start- bzw. Stop-Nukleotide der eingezeichneten viralen Leseraster bezeichnen und sich auf die in Tabelle 3-2 angegebenen Werte beziehen. LTR: long terminal repeat; PBS: Primerbindungsstelle (primer binding site); gag, gruppenspezifisches Antigen (group specific antigen); pro/pol Protease/Polymerase Polyprotein; env, virales Hüllprotein (envelope); ψ : virales Verpackungssignal (psi site).

† bezeichnet die beiden STOP-Mutationen im pol-Gen des Klons PERV-B(Bac-192B9) an den Positionen nt 4687 und nt 5251 (vergleiche Kapitel 3.5.3, Kapitel 4.2.6 und Abbildung 3-19).

Klon #	Chromosom- position	LTR Typ	PERV Klasse	Gag Expression	RT- Test	Volllängen PCR	gag	pol	env	provirale Integration
130A12	1q2.4	w/o repeat	A	+	+	+	+	+	+	+
242 D 4	13q4.9	w/o repeat	A	+	-	-	+	-	-	-
151B10	1q2.3	w/o repeat	A	+	+	+	+	+	+	+
141G12	1q2.11	w/o repeat	A	-	-	+	-	-	+	-
463H12	3p1.5	2 ½	A	+	+	+	+	+	+	+
305F5	5q2.3	w/o repeat	A	-	-	+	trunk	+	+	-
258A11	3p1.5	1 ½	A	-	-	-	+	+	+	-
135E5	8p1.2	2 ½	A	-	-	-	+	trunk	-	-
253B6	13q4.2	w/o repeat	A	-	-	-	+	-	trunk	-
383E10	13q4.3	2 ½	A	-	-	-	+	+	-	-
1079D8	17q1.2	2 ½	A	-	-	-	+	+	-	-
192 B 9	7p1.1	3 ½	B	+	-	+	+	+	+	-
484 G4	7p1.2→p1.1	1 ½	B	-	-	-	+	-	+	-
161B7	4p1.1	2 ½	B	-	-	+	trunk	+	+	-
783D7	9q2.6	1 ½	B	-	-	+	+	-	trunk	-
667G4	17q2.1	1 ½	B	-	-	+	+	trunk	-	-
534G4	17q2.1	3 ½	B	-	-	+	+	-	+	-
498D8	14q1.1	2 ½	B	-	-	+	trunk	trunk	+	-
1058D6	11q1.2	2 ½	B	-	-	-	+	-	-	-
647G4	11q1.4	1 ½	B	-	-	-	+	-	trunk	-
80H6	14q2.8	1 ½	B	-	-	-	+	+	-	-

Tabelle 3-4 Zusammenfassung der Analysen auf verschiedenen BAC-Klonen

Insgesamt wurden 21 BAC-Klone, die PERV-Sequenzen tragen (Rogel-Gaillard et al., 1999) analysiert. In der Tabelle zusammengefasst sind die Ergebnisse der verschiedenen Voruntersuchungen (Kapitel 3.4.2). 1 ½, 2 ½ und 3 ½ beschreibt die Anzahl der 39bp-Wiederholungen, während w/o „repeat“ die LTRs ohne distinkte Sequenzwiederholungen in U3 beschreibt. Die LTR-Differenz beschreibt die zwischen den zwei LTRs eines Provirus gefundenen Sequenzunterschiede und A bzw. B designiert die PERV-Klasse. +, positiver Nachweis; -, negativer Nachweis, trunk, Nachweis eines trunkierten Gen- oder Proteinfragments in PCR oder PTT. Die replikations-kompetenten (siehe Diskussion für 192B9) Proviren sind fett hervorgehoben.

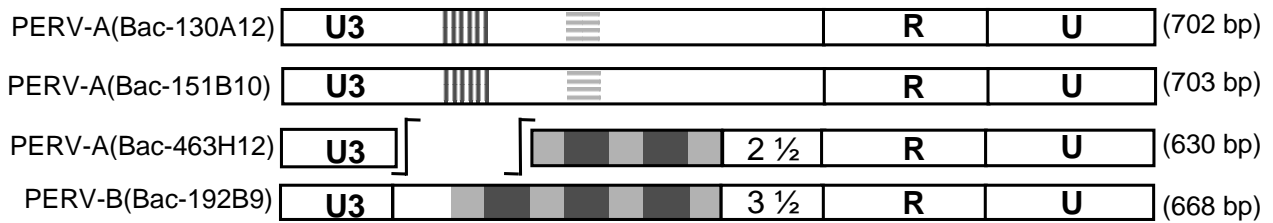


Abbildung 3-12 LTR-Strukturen der vier BAC-Klone

Während sich die PERV-LTR in die Bereiche U3, R und U5 gliedert, besitzen die vier BAC-Klone verschiedene LTR-Strukturen, die sich besonders durch die Anordnung von 21bp- bzw. 18bp langen Sequenzabschnitten in U3 unterscheiden. Die Klone PERV-A(Bac-130A12) und PERV-A(Bac-151B10) weisen nur je eine 21bp- und eine 18bp-Sequenz auf, die getrennt in U3 liegen. Diese Sequenzen unterscheiden sich durch einen Nukleotidaustausch von den „repeats“ der anderen beiden Klone.

Die Klone PERV-A(Bac-463H12) und PERV-B(Bac-192B9) besitzen dezidierte Sequenzwiederholungen, in denen sich die 21bp- und die 18bp-Sequenz in charakteristischer Weise abwechseln. Der Klon PERV-A(Bac-463H12) besitzt 2 ½, der Klon PERV-B(Bac-192B9) 3 ½ „repeats“.

Hellgraue Box, 18bp-Sequenz (TATTTTAAAATGATTGGT); dunkelgraue Box, 21bp-Sequenz (CCACGGAGCGCGGGCTCTCGA); die gestreiften Boxen stellen die um ein Nukleotid veränderten Sequenzen dar.

Die LTR des Klons PERV-A(Bac-463H12) besitzt 2 ½ „repeats“ und entspricht damit den LTRs der Klone 293-PERV-B(43) (Czauderna et al., 2000) bzw. PK15-PERV-B(213) (Krach et al., 2001), während die LTR des Klons PERV-B(Bac-192B9) mit 3 ½ Wiederholungen der LTR des Klons 293-PERV-B(33) (Czauderna et al., 2000) entspricht.

Die LTRs der Klone PERV-A(Bac-130A12) und PERV-A(Bac-151B10) besitzen zwar zu den oben beschriebenen Sequenzen homologe 21bp- sowie eine 18bp-Untereinheiten, jedoch weisen die Sequenzen hier einen Nukleotidaustausch auf und sind nicht in einem gemeinsamen Block organisiert, sondern liegen voneinander getrennt in der U3-Region. Dieser LTR-Typ entspricht der LTR von Klon PK15-PERV-A(58) (Krach et al., 2001) und weist gewisse Homologien zu der LTR von PERV-MSL (Akiyoshi et al., 1998) auf (65,6%). Bei aus der humanen PERV-infizierten Zelllinie 293-PERV-PK isolierten Proviren findet sich keine LTR dieses Typs.

Da sich die Anzahl der 39bp-Wiederholungen der LTRs der Molekularklone 293-PERV-A(42), 293-PERV-B(33) und 293-PERV-B(43) (Czauderna et al., 2000) in Zellkultur verändert (Scheef et al., 2001), wurde untersucht, ob dieses Phänomen auch bei den BAC-Klonen auftritt. Eine PCR-Analyse mit für die 5´-LTR spezifischen Primern (PERV-5´-LTR-for vs. PERV-PBS-rev, siehe Tabelle 2-5) auf genomischer DNA mit durch BAC-Klone transfizierten 293-Zellen ergab, daß eine Multimerisierung der „repeat“-Strukturen nur für den Klon PERV-A(Bac-463H12), der die typischen

39bp-Wiederholungen besitzt, zu beobachten war (Abbildung 3-13, Spur 4). Klon PERV-B(Bac-192B9), der ebenfalls „repeat“-Elemente besitzt, ist nicht replikationskompetent (Abbildung 3-13, Spur 5) und die beiden „repeat“-losen Klone PERV-A(Bac-130A12) und PERV-A(Bac-151B10) zeigten nur die für die Ausgangsklone typische Bande von etwa 730 bp (Abbildung 3-13, Spuren 2+3).

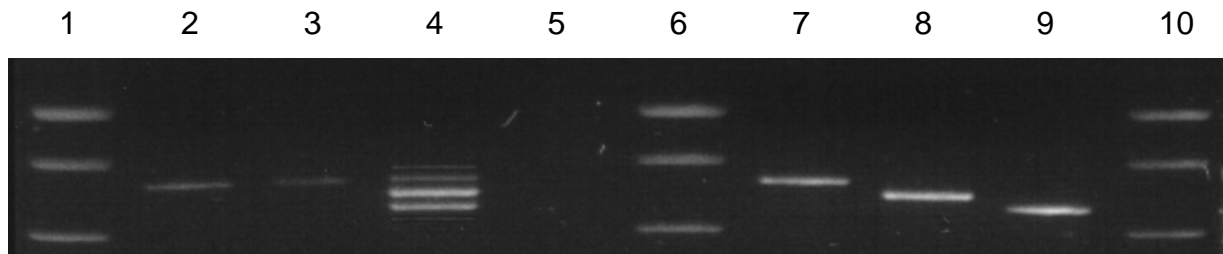


Abbildung 3-13 PCR-Amplifikation der 5'-LTR der BAC-Klone auf genomischer DNA infizierter 293-Zellen mit LTR-spezifischen Primern.

Amplifikate der 5'-LTRs der BAC-Klone in Zellkultur nach etwa vierwöchiger Kultivierung.

1,6,10, Molekulargewichtsstandard (SmartLadder, Eurogentec); **2**, PERV-A(Bac-130A12); **3**, PERV-A(Bac-151B10); **4**, PERV-A(Bac-463H12); **5**, PERV-B(Bac-192B9). Zur Kontrolle Plasmid-DNA der PERV-Moleklarklone mit definierter LTR-Struktur: **7**, 293-PERV-B(33); **8**, 293-PERV-B(43); **9**, 293-PERV-A(42)

3.4.3 Untersuchungen zur PERV-Expression und PERV-Replikation

Aufbauend auf Versuchen mit PERV-Moleklurklonen aus der Zelllinie 293-PERV-PK (Czauderna et al., 2000) wurde die Funktionalität der Proviren in der Zellkultur überprüft. Da mehrere Publikationen (Takeuchi et al., 1998; Wilson et al., 2000) (siehe Kapitel 3.1.1) gezeigt haben, daß verschiedene Zelllinien in Abhängigkeit der PERV-Klasse unterschiedlich suszeptibel für PERV sind, wurden die beiden Zelllinien HeLa und 293, die sich als die empfänglichsten Zelllinien herausstellten, für die weiteren Experimente ausgewählt.

Für initiale Experimente wurden 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen der Zelllinien HeLa und 293 mit je 1 μg BAC DNA transfiziert. Zellfreier Überstand dieser Zellen wurde nach mehrtägiger Kultivierung auf frische Zellen übertragen, um die Fähigkeit zur produktiven Infektion zu überprüfen.

Zellen beider Linien wurden sowohl nach Transfektion (Abbildung 3-15 A,B,C; E,F,G; I,J,K und M,N,O und Abbildung 3-16 A) als auch nach Infektion (Abbildung 3-15 D,H,L,P und Abbildung 3-16 B) durch Immunfluoreszenzanalyse und RT-Test auf Expression viraler Proteine und damit auf eine produktive Vermehrung von PERV untersucht.

Unter Verwendung des Gag p10 Antiserums (Krach et al., 2000) konnte nach Transfektion auf beiden Zelllinien und für alle vier Klone zunächst die Expression des

viralen Proteins nachgewiesen werden. Bei Klon PERV-B(Bac-192B9) hielt diese Expression aber nur für etwa drei Tage an (Abbildung 3-15 M-P), während bei den anderen Klonen im Verlauf der Kultivierung eine Vermehrung der Gag-exprimierenden Zellen festgestellt werden konnte (Abbildung 3-15). Auch nach Übertragung von zellfreiem Kulturüberstand 32 d.p.t. konnte eine Proteinexpression bei den Klonen PERV-A(Bac-130A12), PERV-A(Bac-151B10) und PERV-A(Bac-463H12) nachgewiesen werden (Abbildung 3-15 D,H,I).

Da die Expression des viralen Gag-Proteins nicht unmittelbar mit der Replikation des Virus korreliert sein muß, wurde als weiterer Test die Anwesenheit von partikelgebundener RT-Aktivität im Zellkulturüberstand überprüft.

Wie zu erwarten, konnte diese Aktivität nur für die Klone PERV-A(Bac-130A12), PERV-A(Bac-151B10) und PERV-A(Bac-463H12) sowohl nach Transfektion (Abbildung 3-16 A) als auch nach Infektion (Abbildung 3-16 B) im Überstand nachgewiesen werden.

Die Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom stellt einen charakteristischen Schritt im Lebenszyklus der Retroviren dar. Zum Nachweis der Integration wurde genomische DNA infizierter 293-Zellen durch CsCl-Gradientenzentrifugation (siehe Kapitel 2.6.3) aufgereinigt, um extrachromosomale Viruskopien zu entfernen. Diese DNA wurde per PCR auf die Anwesenheit von PERV getestet. Mit spezifischen Primern für die pro/pol-Region (PK2+PK6, Tabelle 2-5) konnte für die Klone PERV-A(Bac-130A12), PERV-A(Bac-151B10) und PERV-A(Bac-463H12) das erwartete Amplifikat von 742 bp nachgewiesen werden (Abbildung 3-14).

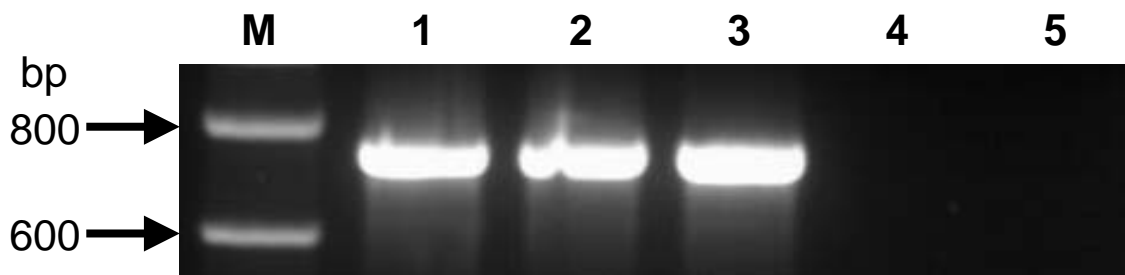
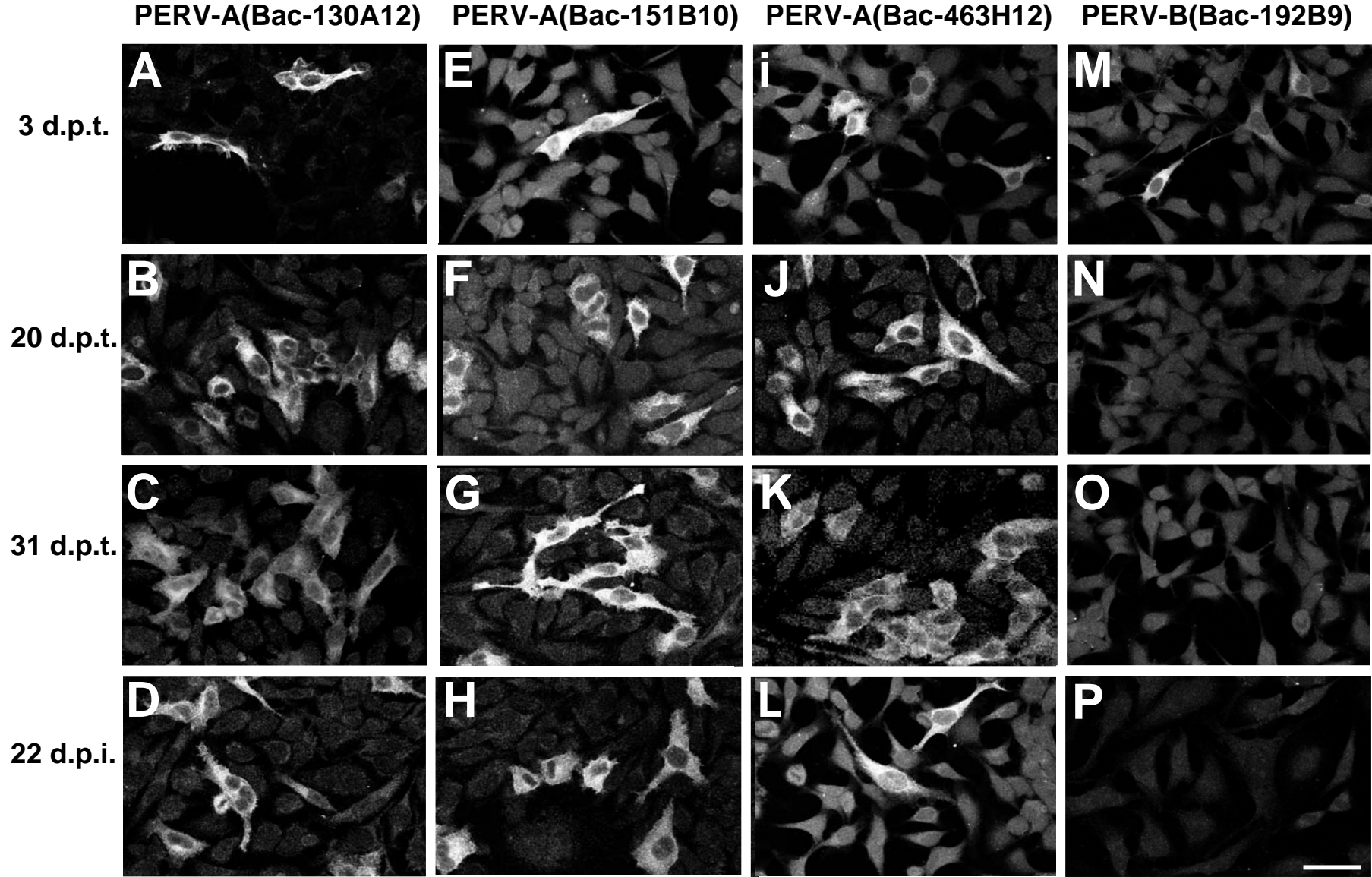


Abbildung 3-14 PCR auf genomischer DNA mit BAC-Klonen infizierter 293-Zellen mit LTR-spezifischen Primern.

Zum Nachweis der produktiven Infektion mit PERV wurde genomische DNA von 293-Zellen 31 d.p.i. per PCR mit *pol*-spezifischen Primern (PK2 und PK5, siehe Tabelle 2-5) auf Integration der Proviren getestet. **M**, SmartLadder (Eurogentec); **1**, PERV-A(Bac-130A12); **2**, PERV-A(Bac-151B10); **3**, PERV-A(Bac-463H12); **4**, PERV-B(Bac-192B9); **5**, nicht-infizierte 293-Zellen. Das resultierende PCR-Fragment ist 742 bp groß.



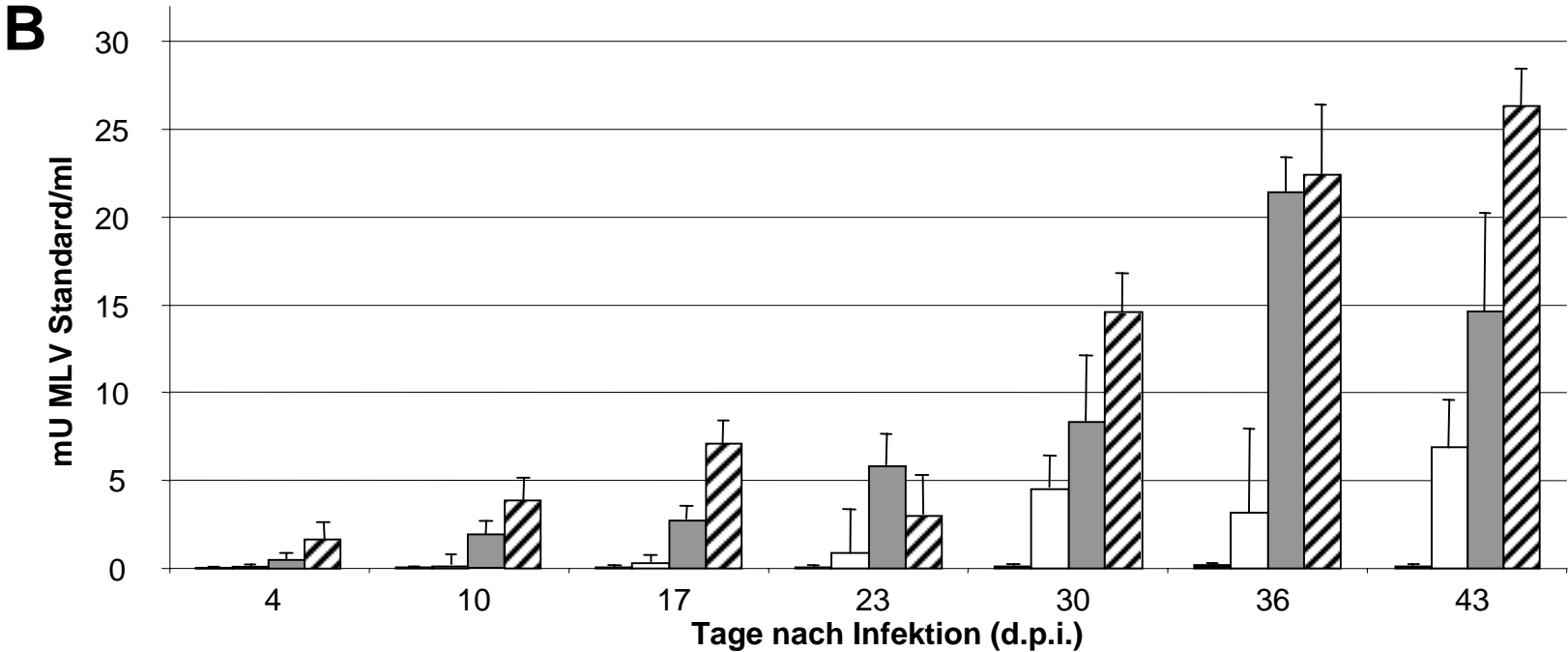
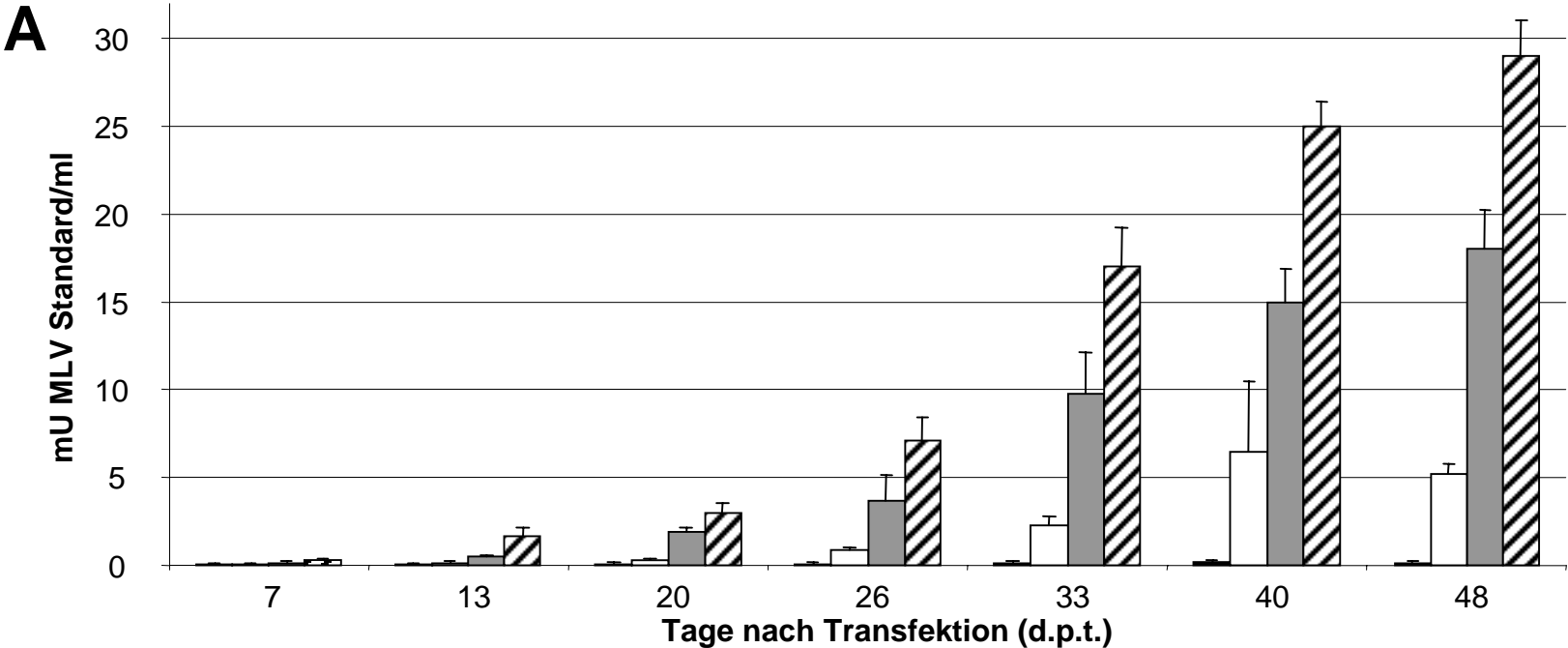


Abbildung 3-15 (Seite 78) Indirekte Immunfluoreszenzanalyse der PERV-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion bzw. nach Infektion

Die Fähigkeit proviraler PERV in BAC-Klonen, Zellen produktiv zu infizieren, wurde in der Zellkultur mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzanalyse mit einem spezifisch gegen Gag p10 gerichteten Antiserum (Krach et al., 2000) nach Transfektion von BAC DNA getestet.

Wie hier am Beispiel von HeLa-Zellen gezeigt ist (A bis P), kann die Gag-Expression in einer steigenden Anzahl von Zellen für die Klone Bac-130A12, Bac-151B10 und Bac-463H12 nach Inkubation mit Gag p10 Antiserum nach 3, 20 und 31 Tagen nach Transfektion (d.p.t.), gezeigt werden, was die Replikations-Kompetenz dieser drei Proviren beweist. Bei Bac-192B9 zeigt sich eine Immunreaktivität nur bis etwa 3 d.p.t. und verschwindet wieder bei länger andauernder Kultivierung der Zellen (M to O). Diese anfängliche Reaktivität Bac-192B9-transfizierter Zellen mit dem Gag-Antiserum lässt sich mit transienter, LTR-getriebener Expression des Gag-Protein kurz nach Transfektion erklären. Wird die transfizierte DNA bei andauernder Kultivierung aus der Kultur entfernt, lässt die Expression wieder nach.

Die Übertragung zellfreier Kulturüberstände von transfizierten HeLa-Zellen 32 d.p.t. auf frische Zellen zeigte die Präsenz infektiöser Virionen im Überstand. Exemplarisch sind Ergebnisse der Infektiosität dieser Virionen für die Klone PERV-A(Bac-130A12), PERV-A(Bac-151B10) und PERV-A(Bac-463H12) (mit Ausnahme von Klon PERV-B(Bac-192B9) 22 Tage nach Infektion (d.p.i.) in den Feldern D, H, L und P gezeigt.

Gleiche Ergebnisse wurden nach Transfektion bzw. Infektion von 293-Zellen mit den vier BAC-Klonen erzielt (nicht gezeigt). Der Maßstab entspricht 50 µm (P).

Abbildung 3-16 (Seite 79) RT-Test anhand des Zellkultur-Überstandes mit BAC-Klonen transfizierter bzw. infizierter 293-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten

Die Fähigkeit proviraler PERV in BAC-Klonen, Zellen produktiv zu infizieren, wurde in der Zellkultur mit Hilfe des RT-Tests (CavidiTech, Uppsala, Schweden) nach Transfektion von BAC DNA in 293-Zellen getestet (A). Die Übertragung zellfreier Kulturüberstände von transfizierten 293-Zellen 32 d.p.t. auf frische Zellen zeigte die Präsenz infektiöser Virionen im Überstand. Diese infizierten Zellen wurden für 43 Tage kultiviert (B).

Die RT-Aktivität steigt mit andauernder Kultivierung an und erreicht je nach Klon Höchstwerte zwischen 15 und 25 mU. Ein kurzfristiger Rückgang der RT-Aktivität lässt sich durch Ausdünnungseffekte beim Splitten erklären. Gleiche Ergebnisse wurden nach Transfektion bzw. Infektion von HeLa-Zellen mit den vier BAC-Klonen erzielt (nicht gezeigt).

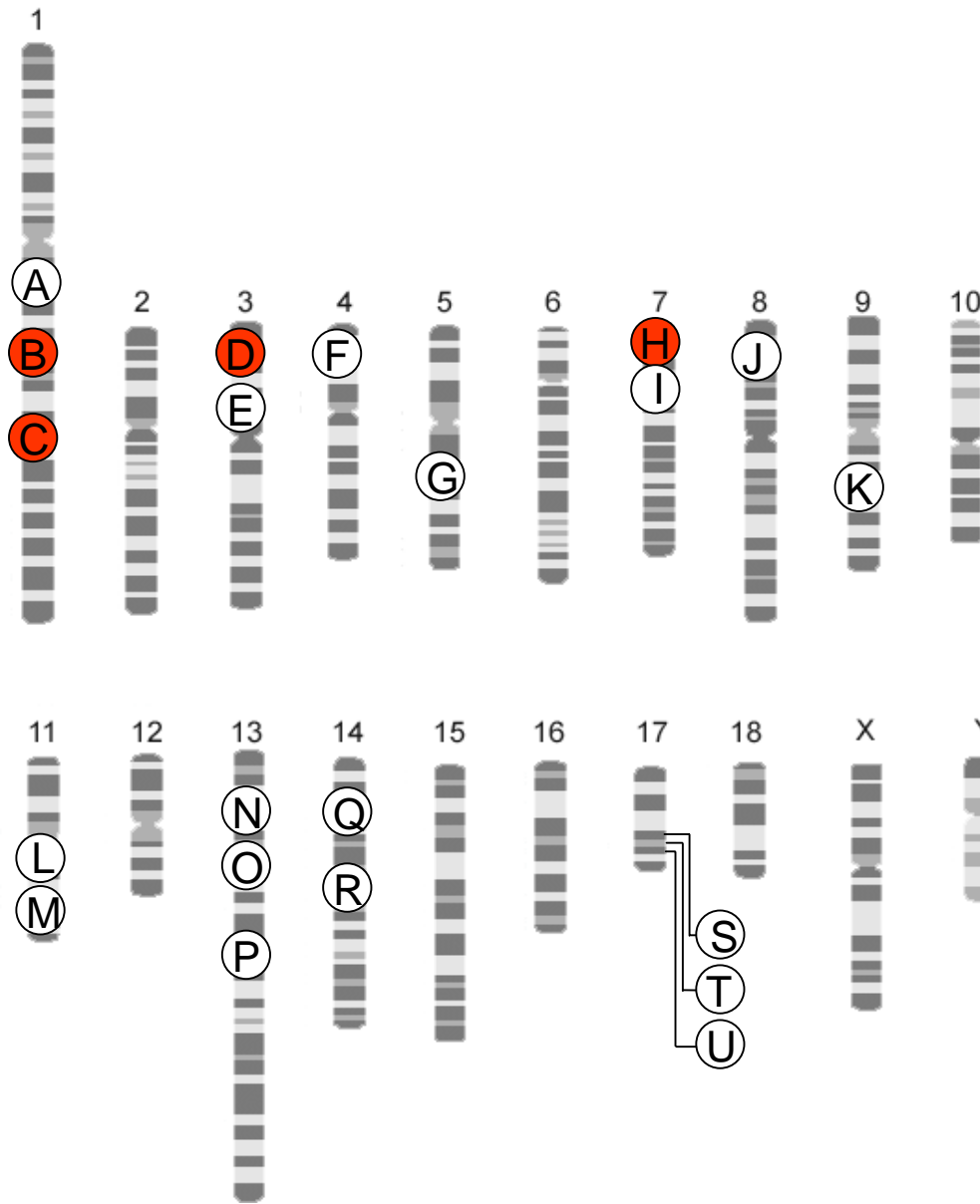
PERV-A(Bac-130A12), grau; PERV-A(Bac-151B10), weiß; PERV-A(Bac-463H12), gestreift; PERV-B(Bac-192B9), schwarz.

Als Standard wurde MLV RT benutzt.

Abbildung 3-17 (Seite 81) Chromosomale Lokalisierung von PERV

Dargestellt ist das Karyogramm des porcinen Genoms nach Echard (1974), wobei die Buchstaben die Position der 21 PERV beschreiben, die in den untersuchten BAC-Klonen identifiziert wurden sowie die beiden Proviren, die von U. Krach (Krach et al., 2001) aus einer Bibliothek der porcinen Zelllinie PK15 isoliert wurden. Die replikations-kompetenten Proviren sind fett gedruckt bzw. rot unterlegt.

Für den Klon PERV-B(Bac-192B9) war neben der chromosomalen Lokalisierung (Rogel-Gaillard et al., 1999) mit Hilfe der flankierenden genomischen Sequenz noch die Kartierung des Insertionsortes auf gen-spezifischer Basis möglich. Nach einem Abgleich mit der BLAST-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) liegt dieser Provirus im BAT1-Gen auf Chromosom 7, was sich mit dem von Rogel-Gaillard kartierten Insertionsort deckt (Rogel-Gaillard et al., 1999). Bei BAT1 handelt es sich um eine putative RNA-Helicase aus der DEAD-Familie.



	Klon	Position	Klasse	LTR Struktur
(A)	141G12	1q2.1	A	w/o repeat
(B)	130A12	1q2.4	A	w/o repeat
(C)	151B10	1q2.3	A	w/o repeat
(D)	463H12	3p1.5	A	2 ½
(E)	258A11	3p1.5	A	1 ½
(F)	161B7	4p1.1	B	2 ½
(G)	305F5	5q2.3	A	w/o repeat
(H)	192B9	7p1.1	B	3 ½
(I)	484G4	7p1.2	B	1 ½
(J)	135E5	8p1.2	A	2 ½
(K)	783D7	9q2.6	B	1 ½
(L)	1058D6	11q1.2	B	2 ½
(M)	647G4	11q1.4	B	1 ½
(N)	253B6	13q4.3	A	w/o repeat
(O)	383E10	13q4.3	A	2 ½
(P)	242D4	13q4.9	A	w/o repeat
(Q)	498D8	14q1.1	B	2 ½
(R)	80H6	14q1.4	B	1 ½
(S)	1079D9	17q1.2	A	2 ½
(T)	667G4	17q2.1	B	1 ½
(U)	534G4	17q2.1	B	3 ½
(V)	UK(58)	???	A	w/o repeat
(W)	UK(213)	???	B	2 ½

3.5 Polymorphismen von PERV

3.5.1 Bestimmung der flankierenden genomischen Sequenzen

Essentiell für die Untersuchung inter- und intraviraler Polymorphismen bei PERV war eine Methode zur Unterscheidung der einzelnen Proviren in genomischer DNA. Die Unterscheidungsmöglichkeit ergibt sich durch Verwendung der flankierenden genomischen Sequenzen, die spezifisch für jedes einzelne Provirus sind und mit Hilfe der inversen PCR (Kapitel 2.6.17) ermittelt wurden. Auf genomischer DNA kann ein Provirus nur per PCR spezifisch nachgewiesen werden, wenn ein Primer in der PERV-Sequenz und der Gegenprimer in der chromosomal flankierenden Sequenz liegt. Beim Nachweis über die 5'-Flanke wurde PK26rev als Gegenprimer verwendet (PK30 beim „*semi-nested*“-Ansatz), beim Nachweis über die 3'-Flanke war PK22 der Gegenprimer (PK30 beim „*semi-nested*“-Ansatz).

Die Nukleotidsequenzen der chromosomalen Flanken wurden in Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) eingereicht (Tabelle 2-3) und die Sequenzen der davon abgeleiteten Primer sind in Tabelle 2-5 aufgeführt.

Die flankierenden genomischen Sequenzen der Klone PK15-PERV-A(58) und PK15-PERV-B(213) sowie die davon abgeleiteten Primer wurden von U. Krach ermittelt und in Genbank unter den „*accession numbers*“ AJ291758 (3'-Flanke von PK15-PERV-A(58)), AJ291759 und AJ291760 (5'- bzw. 3'-Flanke von PK15-PERV-B(213)) abgelegt.

3.5.2 Prävalenz von PERV in unterschiedlichen Schweinesubspezies

Da die Kenntnis der flankierenden chromosomalen Sequenzen der vier bzw. sechs Proviren deren spezifischen Nachweis in genomischen Proben ermöglichte, ließ sich nun die Prävalenz von PERV bestimmen und damit die Möglichkeit evaluieren, ob sich PERV durch Züchtung aus einer für die Xenotransplantation vorgesehenen Herde entfernen lässt.

Da das „*large white*“-Schwein die Genomquelle der vier hier beschriebenen Proviren ist (Rogel-Gaillard et al., 1999) und mit seiner weiten europäischen Verbreitung auch als Ausgangspunkt der Zelllinie PK15, aus der die von U. Krach isolierten Proviren stammen, angesehen werden kann, lag es nahe, die Analyse mit Schweinen dieser Sub-Spezies zu beginnen. Diese und weitere Untersuchungen sind in Tabelle 3-5 auf einer per-Individuum-Basis und in Tabelle 3-6 auf einer per-Spezies-Basis zusammengefaßt.

Ergebnisse

		PERV-A(Bac- 130A12)	PERV-A(Bac- 151B10)	PERV-A(Bac- 463H12)	PERV-B(Bac- 192B9)	293-PERV- A(58)	293(PERV- B(213))
1	Deutsche Landrasse RKI-U247	+	-	-	+	-	-
2	Deutsche Landrasse RKI-U245	+	-	-	+	+	+
3	Deutsche Landrasse RKI-U235	+	+	-	+	+	single LTR
4	Deutsche Landrasse RKI-U232	+	+	-	-	+	-
5	Deutsche Landrasse RKI-U229	-	+	-	+	+	single LTR
6	Deutsche Landrasse RKI-U222	-	+	-	+	+	+
7	Deutsche Landrasse RKI-U093	+	-	-	-	+	+
8	Deutsche Landrasse RKI-U087	+	+	-	+	+	+
9	Deutsche Landrasse RKI-U292	-	+	-	-	+	+
10	Deutsche Landrasse RKI-U291	-	+	-	+	+	+
11	Deutsche Landrasse RKI-U280	-	+	-	-	+	+
12	Deutsche Landrasse RKI-U272	-	-	+	+	+	-
13	Deutsche Landrasse RKI-U267	-	+	-	+	+	+
14	Deutsche Landrasse RKI-U265	+	+	-	+	+	+
15	Deutsche Landrasse RKI-U257	-	+	-	+	+	+
16	Deutsche Landrasse RKI-U256	+	-	-	+	+	+
17	Deutsche Landrasse RKI-U324	-	-	+	+	+	-
18	Deutsche Landrasse RKI-U323	-	-	+	+	+	+
19	Deutsche Landrasse RKI-U314	-	-	-	+	+	-
20	Deutsche Landrasse RKI-U312	-	+	-	+	+	+
21	Deutsche Landrasse RKI-U303	-	-	-	+	+	+
22	Deutsche Landrasse RKI-U300	-	-	-	+	+	+
23	Deutsche Landrasse PEI 1	-	-	-	-	+	+
24	Deutsche Landrasse PEI 2	-	+	-	-	-	-
25	Deutsche Landrasse PEI 3	+	-	-	+	-	-
26	Deutsche Landrasse PEI 4/5	+	-	-	+	-	-
27	Deutsche Landrasse PEI 94	-	-	+	+	+	+
28	Deutsche Landrasse PEI 95	+	+	-	+	+	+
29	Deutsche Landrasse PEI 97	-	-	+	+	-	-
30	Deutsche Landrasse PEI 100	-	-	+	+	-	-
31	Deutsche Landrasse PEI 101	+	-	-	+	-	-
32	Deutsche Landrasse PEI 105	-	-	-	+	-	-
33	Deutsche Landrasse PEI 106	+	-	-	+	-	-
34	Deutsche Landrasse PEI 013	-	-	+	+	-	-
35	Deutsche Landrasse PEI ♥23	-	-	-	+	-	-
36	Miniaturschwein PEI #1	+	-	-	+	+	+
37	Miniaturschwein PEI #2	-	-	+	+	+	+
38	d/d Miniaturschwein # 369*	-	-	-	-	-	-
39	d/d Miniaturschwein # 370*	-	-	-	-	-	-
40	d/d Miniaturschwein # 371*	-	-	-	-	-	-

Ergebnisse

	PERV-A(Bac-130A12)	PERV-A(Bac-151B10)	PERV-A(Bac-463H12)	PERV-B(Bac-192B9)	293-PERV-A(58)	293(PERV-B(213))
41 d/d Miniaturschwein # 379*	-	-	-	-	-	-
42 d/d Miniaturschwein # 380*	-	-	-	-	-	-
43 d/d Miniaturschwein # 385*	-	-	-	-	-	-
44 d/d Miniaturschwein # 392*	-	-	-	-	-	-
45 d/d Miniaturschwein # 393*	-	-	-	-	-	-
46 d/d Miniaturschwein # 397*	-	-	-	-	-	-
47 d/d Miniaturschwein # 398*	-	-	-	-	-	-
48 d/d Miniaturschwein # 399*	-	-	-	-	-	-
49 d/d Miniaturschwein # 403*	-	-	-	-	-	-
50 d/d Miniaturschwein # 404*	-	-	-	-	-	-
51 d/d Miniaturschwein # 405*	-	-	-	-	-	-
52 d/d Miniaturschwein # 406*	-	-	-	-	-	-
53 d/d Miniaturschwein # 1**	-	-	-	-	-	-
54 d/d Miniaturschwein # 2**	-	-	-	-	-	-
55 d/d Miniaturschwein # 3**	-	-	-	-	-	-
56 d/d Miniaturschwein # 4**	-	-	-	-	-	-
57 d/d Miniaturschwein # 5**	-	-	-	-	-	-
58 d/d Miniaturschwein # 6**	-	-	-	-	-	-
59 d/d Miniaturschwein # 7**	-	-	-	-	-	-
60 d/d Miniaturschwein # 8**	-	-	-	-	-	-
63 Westran-Schwein #6	-	+	-	-	-	+
64 Westran-Schwein #95	-	-	-	-	-	-
65 Westran-Schwein #111	-	-	-	-	-	-
66 Westran-Schwein #137	-	-	-	-	+	+
67 Westran-Schwein #150	+	-	-	-	+	-
68 Westran-Schwein #175	-	-	-	-	-	-
69 Westran-Schwein #193	+	-	-	-	+	-
70 Westran-Schwein #246	-	-	-	-	-	-
71 Westran-Schwein #296	-	-	-	+	-	-
72 Westran-Schwein #298	-	-	-	+	-	-
73 Wildschwein # 553	+	-	-	-	-	-
74 Wildschwein # 558	+	-	-	-	-	+
75 Wildschwein # 561	-	+	-	-	-	-
76 Wildschwein # 564	-	-	-	-	-	+
77 Wildschwein # 569	-	-	+	-	-	+
78 Wildschwein # 579	-	-	-	+	-	-
79 Wildschwein # 533	-	-	-	-	-	-
80 Wildschwein # 536	-	-	-	-	-	-
81 Wildschwein # 550	+	-	+	-	-	-
82 Wildschwein # 584	-	-	-	+	+	-

	PERV-A(Bac-130A12)	PERV-A(Bac-151B10)	PERV-A(Bac-463H12)	PERV-B(Bac-192B9)	293-PERV-A(58)	293(PERV-B(213))
83 Wildschwein # 538	-	+	-	-	-	-
84 Wildschwein # 547	+	-	+	-	+	-
85 Wildschwein # 544	-	+	-	-	-	+
86 Wildschwein # 541	-	-	-	-	+	+
87 PK15 Zelllinie (PEI)	+	+	-	+	+	+

Tabelle 3-5 Analyse der Prävalenz von sechs PERV in unterschiedlichen Schweinerassen

Per PCR wurden verschiedene Individuen verschiedener Schweinerassen auf die Präsenz sechs verschiedener PERV getestet. (+) bestätigt die Präsenz des jeweiligen Provirus in der getesteten Probe, während (-) auch durch eine nested PCR keinen Nachweis des jeweiligen Provirus ermöglichte. (Single LTR) beschreibt die Abwesenheit des jeweiligen Provirus, jedoch konnte an dessen Stelle eine solitäre LTR nachgewiesen werden.

Die mit PEI gekennzeichneten Proben wurden im Paul-Ehrlich-Institut entnommen, während uns die übrigen Proben von Kooperationspartnern überlassen wurden. Die genomische DNA der d/d-haplotypisierten Miniaturschweine wurde uns von Dr. Henry Salmon, Laboratoire Lymphocytes et Immunité des Muqueuses, INRA, Nouzilly, Frankreich, zur Verfügung gestellt, während Dr. Bernhard Ehlers, Robert-Koch-Institut, Berlin, Deutschland, DNA-Proben weiterer „Deutsche Landrasse“-Schweine sowie von Wildschweinen bereitstellte. Von Chris Moran erhielten wir genomische DNA der im südpazifischen Raum endemischen „Westran“-Schweine.

Bei den mit d/d gekennzeichneten Miniaturschweinen handelt es sich um homozygote Tiere des bezeichnenden Haplotyps, von denen uns genomische DNA von zwei Herden von Henry Salmon (*, Laboratoire Lymphocytes et Immunité, INRA, Frankreich, (Kaeffer et al., 1990; Kaeffer et al., 1991)) und von Clive Patience (**, ImmergeBT, USA, (Oldmixon et al., 2002)) zur Verfügung gestellt wurde.

	PERV-A(Bac-130A12)	PERV-A(Bac-151B10)	PERV-A(Bac-463H12)	PERV-B(Bac-192B9)	PK15-PERV-A(58)	PK15-PERV-B(213)
Deutsche Landrasse	13/35	14/35	7/35	29/35	24/35	18/35
Miniaturschwein	1/2	0/2	1/2	2/2	2/2	2/2
d/d Miniaturschwein *	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
d/d Miniaturschwein **	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
Westran-Schwein	2/10	1/10	0/10	2/10	3/10	2/10
Wildschwein	4/14	3/14	3/14	2/14	3/14	5/14

Tabelle 3-6 Zusammenfassung der Ergebnisse der Tabelle 3-5 auf einer „pro- Rasse-Basis“

Diese Tabelle faßt die in Tabelle Tabelle 3-5 einzeln aufgeführten Ergebnisse der Übersichtlichkeit halber auf einer „Pro-Spezies-Basis“ zusammen. Angegeben sind die als positiv getesteten Proben als Anteil der insgesamt pro Rasse getesteten Proben.

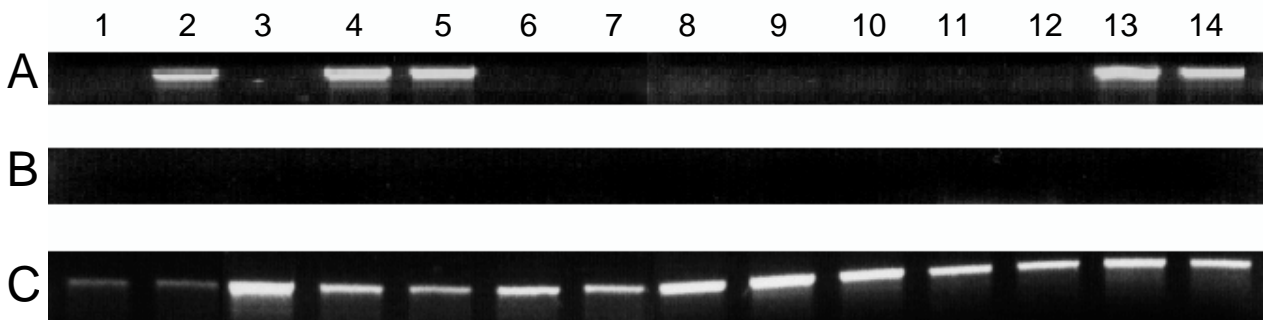


Abbildung 3-18 Spezifischer Nachweis proviraler PERV in verschiedenen Individuen unterschiedlicher Schweinespezies

A. Nachweis der Integration von Klon PK15-PERV-A(213) in Wildschweinen (Proben 73-86). **B.** Nachweis der Integration von Klon PK15-PERV-A(213) in Minischweinen des Haplotyps d/d (Proben 38-51). **C.** Überprüfung der DNA-Integrität der Minischwein-DNA durch Primer, die gegen das Haushaltsgen ARF-3 gerichtet sind (Proben 38-51).

Die Untersuchung zur Prävalenz von PERV in „*large white*“-Schweinen (Tabelle 3-5, Proben 1-35) enthüllte eine starke Heterogenität sowohl in Bezug auf die Proviren als auch in Bezug auf die Individuen. Kein Provirus kam bei allen untersuchten Individuen vor und kein Individuum trug alle Proviren.

Die Anwendung der gleichen Untersuchungstechnik auf Miniaturschweine (Tabelle 3-5, Proben 36-37), auf Miniaturschweine des d/d-Haplotyps⁵ (Tabelle 3-5, Herde I⁶, Proben 38-52; Herde II⁷ 53-60), auf „*Westran*“-Schweine⁸ (Tabelle 3-5, Proben 61-72) und auf Wildschweine⁹ (Tabelle 3-5, Proben 73-86), sowie auf die Zelllinie PK 15 (Tabelle 3-5, Probe 87) erlaubt drei verschiedene Beobachtungen:

Die vom „*large white*“-Genom abgeleiteten flankierenden chromosomalen Sequenzen der Proviren eignen sich zum Nachweis dieser Proviren auch in unterschiedlichen Schweinerassen.

Das Vorkommen der sechs getesteten Proviren scheint in „*Westran*“-Schweinen und Wildschweinen geringer zu sein als in „*large white*“-Schweinen.

⁵ Die Miniaturschweine des d/d-Haplotyps sind homozygot für die d-Variante der SLA Klasse II Antigene

⁶ Die Proben der französischen Herde wurden freundlicherweise von Henry Salmon „Laboratoire Lymphocytes et Immunité, INRA, Frankreich, (Kaeffer et al., 1990; Kaeffer et al., 1991) zur Verfügung gestellt

⁷ Die Proben der amerikanischen Herde wurden freundlicherweise von Clive Patience, ImmergeBT, Boston, USA, (Oldmixon et al., 2002)) zur Verfügung gestellt

⁸ Bei den „*Westran*“-Schweinen handelt es sich um eine endemisch in Australien lebende Rasse, die aus zwei vor etwa 200 Jahren von Siedlern ausgesetzten Hausschweinen hervorgegangen sind. Die genomischen Proben wurden freundlicherweise von Chris Moran zur Verfügung gestellt.

⁹ Die Proben der deutschen Wildschweine wurden freundlicherweise von Bernhard Ehlers, Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland, zur Verfügung gestellt.

In keinem Individuum der d/d-Miniaturschweine (Tabelle 3-5, Proben 38-60) konnte eines der sechs Proviren nachgewiesen werden.

3.5.3 Intravirale Polymorphismen

Da sich die Verteilung der PERV zwischen Individuen und Rassen offensichtlich stark unterscheidet, sollte an einem Beispiel untersucht werden, ob es auch signifikante Unterschiede innerhalb der Sequenz eines definierten Provirus gibt, wenn man ein ausreichend großes Probenvolumen untersucht.

Als interessantester Kandidat für diese Untersuchung erschien PERV-B(Bac-192B9), der in seiner Sequenz zwei Punktmutationen im *pol*-Gen besitzt (nt 4687 und nt 5251), wodurch es zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation kommt und somit eine Replikation verhindert wird (Kapitel 3.4.3) .

Da die chromosomale flankierende Sequenz des Klons bekannt ist (Kapitel 3.5.1), konnten Kopien spezifisch aus genomischen Proben von mehreren „*large white*“-sowie Miniaturschweinen (siehe Tabelle 3-5, Proben 25-35 und 36-37) per PCR amplifiziert und im entsprechenden Bereich zwischen nt 4687 und nt 5251 sequenziert werden.

Von den 13 untersuchten Proben zeigten 8 Proben an beiden Position eine Reversion der Stop-Mutation zurück zum offenen Leserahmen (für Tryptophan kodierendes TGG an Position nt 4687 und für Glutamin kodierendes CAG an Position nt 5251). 4 Proben zeigten die Reversion zumindest einer der beiden Stop-Mutationen zurück zum offenen Leserahmen und nur eine Probe zeigte zwei Punktmutationen, wie sie im Klon aus der „*large white*“-Bibliothek bestimmt wurden. In Abbildung 3-19 ist beispielhaft an einer Probe (Tabelle 3-5, Probe 28) die Reversion an Position nt 4687 dokumentiert.

Die Replikations-Kompetenz der Klone mit offenem Leserahmen wurde nicht experimentell überprüft, da Sequenzübereinstimmungen mit nachgewiesenermaßen replikations-kompetenten Klonen (Homologie >99% mit 293-PERV-B(33), siehe Tabelle 3-3) mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf schließen lassen, daß diese Proviren zu einer produktiven Infektion in der Lage sind.

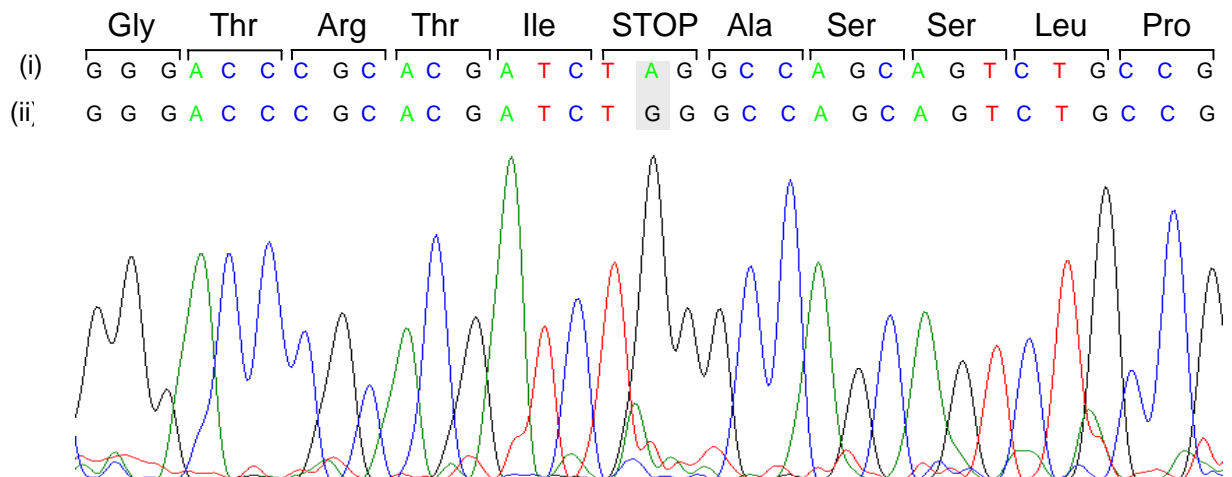


Abbildung 3-19 Einzelnukleotid-Polymorphism („single nucleotide polymorphism“, SNP) innerhalb des *pol*-Gens bei dem replikations-defizienten Klon PERV-B(Bac-192B9)

Der *pol*-Leserahmen von Klon PERV-B(Bac-192B9) weist zwei „*in-frame*“-Stopmutationen an den Positionen nt 4687 und nt 5251 auf. Das Chromatogramm zeigt beispielhaft eine revertierte Punktmutation an der Position 4687 in Probe 28 eines Individuums (graue Box, siehe Tabelle 3-5). (i) zeigt die Aminosäuresequenz von Klon PERV-B(Bac-192B9), wie er in der BAC-Bibliothek gefunden wurde und (ii) zeigt die dazu korrespondierende Nukleotidsequenz. In (iii) findet sich die Nukleotidsequenz der Probe 28, wo das STOP-Codon zu Tryptophan (Trp) revertiert ist.

3.6 Phylogenetische Untersuchungen zu PERV

3.6.1 Einordnung von PERV im Verhältnis zu anderen C-Typ-Retroviren

Unter den verschiedenen C-Typ-Virusgenomen bildet KoRV eine „*outgroup*“, während BaEV, FeLV, GaLV und MLV eine von PERV getrennte, aber für alle C-Typ-Retroviren bzw. Proviren gleichweit entfernte Gruppe bildet. Die Sequenzunterschiede betragen etwa 40%. Vergleicht man die Vollängengenome der bisher aus unterschiedlichen genomischen Quellen isolierten PERV, so bestimmt vor allem die LTR-Struktur die phylogenetische Einteilung der PERV (siehe Abbildung 3-20). Eine Einteilung anhand der unterschiedlichen Hüllproteine ist nur für PERV-MSL zu erkennen.

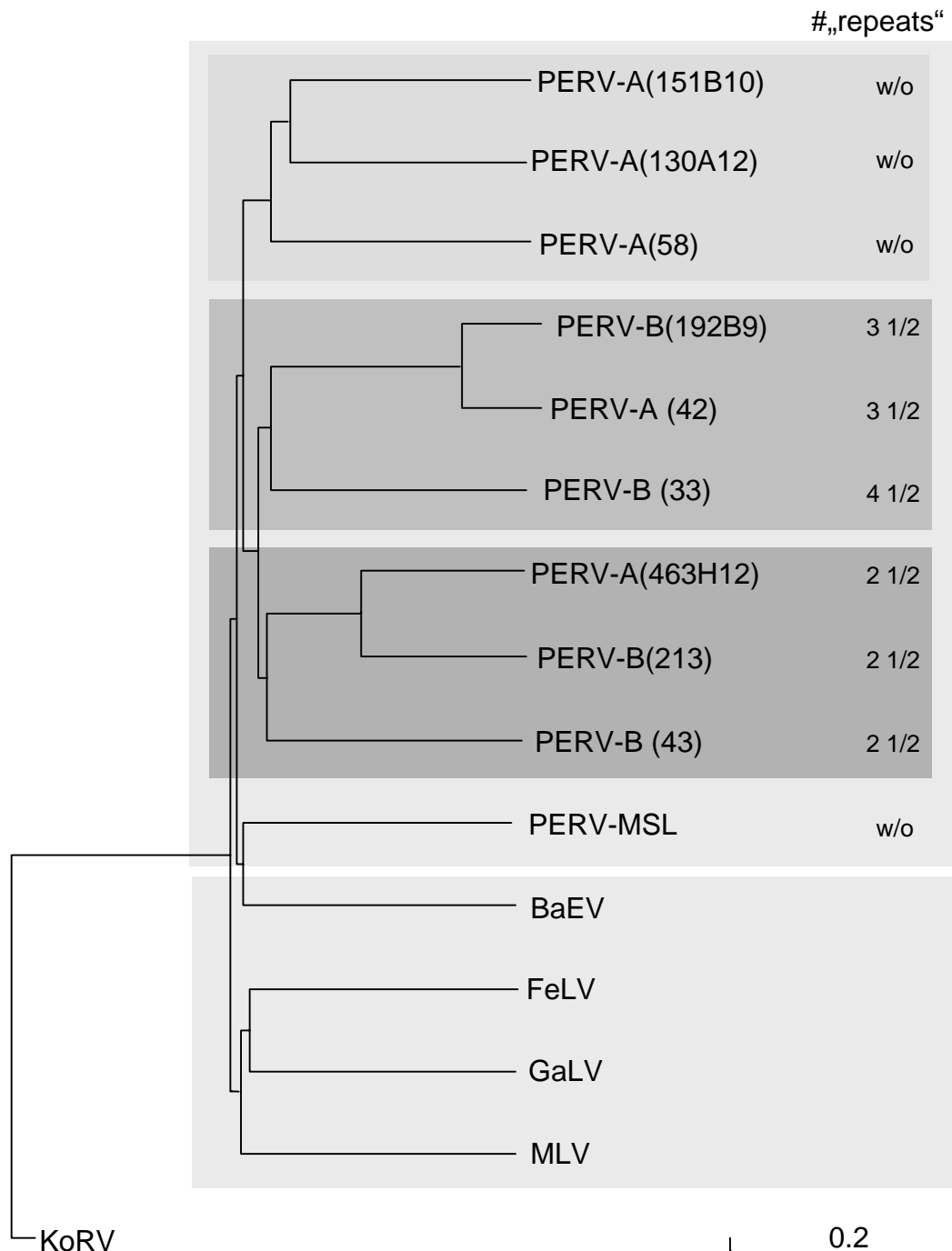


Abbildung 3-20 Phylogenetischer Vergleich zwischen C-Typ-Retroviren fünf verschiedener Spezies und aus verschiedenen genomischen Quellen isolierter PERV

Zur Erstellung des Phylogramms wurden die Vollängensequenzen von 14 individuellen C-Typ-Retroviren verwendet und in das Programm „*PHYLIP* (Felsenstein, 1989) eingegeben. Der Maßbalken gibt die Heterogenität der Sequenzen in Prozent an (0,1 entspricht 10%).

Untersucht man die Phylogenie der viralen Gene getrennt nach *gag*, *pol* und *env*, so ergibt sich für *gag* und *pol* eine deutliche Gruppenbildung der aus dem „*large white*“-Genom isolierten Klone (Abbildung 3-21, A und B, graue Boxen), jeweils flankiert von den aus der anderen porcinen Quelle (Krach et al., 2001) isolierten Proviren, wäh

rend die aus der humanen PERV-infizierten Zelllinie 293-PERV-PK isolierten Proviren (Czuderna et al., 2000) wiederum eine eigene Gruppe bilden.

Betrachtet man jedoch die *env*-Sequenzen, so dominiert deutlich eine Auftrennung auf Basis der PERV-Klasse, ohne das eine Abhängigkeit von der Genomquelle zu erkennen wäre (Abbildung 3-21 C).

3.6.2 Altersabschätzung von PERV im Rahmen der „*molecular clock*“-Hypothese

Die Abschätzung des evolutionären Alters von PERV wurde durch Sequenzvergleich der LTR- sowie Env-Sequenzen chromosomal definierter Proviren (siehe Tabelle 3-4 und Abbildung 3-16) durchgeführt. Zur Anwendung der „*molecular clock*“-Hypothese muß eine konstante Evolutionsrate vorausgesetzt werden, deren Existenz mit dem Programm „*DAMBE*“ (Xia and Xie, 2001) unter Anwendung des Tamura-Nei-Substitutionsmodells¹⁰ (Tamura and Nei, 1993) nachgewiesen werden kann (Abbildung 3-22).

Durch Analysen an endogenen Retroviren der Primaten (HERV) ist bekannt, daß endogene Retroviren Mutationen mit einer Rate von ungefähr $2,3 \times 10^{-9}$ Substitutionen pro Nukleotidposition und Jahr anhäufen (Johnson and Coffin, 1999). Bei einer durchschnittlichen LTR-Länge von 700 bp der PERV-LTRs ergibt das 100.000 bis 450.000 Jahre pro Nukleotidaustausch.

Anhand dieser Werte wurden die in Tabelle 3-8 angegebenen Werte mit mittleren Werten sowohl für die Anzahl Mutationen pro LTR als auch Jahre pro Substitution geschätzt.

¹⁰ Das Modell beschreibt die Berechnung der evolutionären Distanz (d) zwischen Nukleotidsequenzen. Dabei ist g die Substitutionsrate der Nukleotide Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), und Thymin (T) sowie (Y) für Pyrimidine, während gR das Verhältnis der Transitionen (s) zu den Transversionen (v) darstellt. Die transitionellen Differenzen (P) werden durch $P = n_s/n$, die transversionellen Differenzen (Q) durch $Q = n_v/n$ berechnet, wobei n die Anzahl der Nukleotide angibt.

$$d = -\frac{2g_A g_G}{g_R} \log_e \left(1 - \frac{g_R}{2g_A g_G} P_1 - \frac{1}{2g_R} Q\right) - \frac{2g_T g_C}{g_Y} \log_e \left(1 - \frac{g_Y}{2g_T g_C} P_2 - \frac{1}{2g_Y} Q\right) - 2(g_R g_Y - \frac{g_A g_G g_Y}{g_R} - \frac{g_T g_C g_R}{g_Y}) \log_e \left(1 - \frac{1}{2g_R g_Y} Q\right)$$

$$s = -\frac{2g_A g_G}{g_R} \log_e \left(1 - \frac{g_R}{2g_A g_G} P_1 - \frac{1}{2g_R} Q\right) - \frac{2g_T g_C}{g_Y} \log_e \left(1 - \frac{g_Y}{2g_T g_C} P_2 - \frac{1}{2g_Y} Q\right) + 2\left(\frac{g_A g_G g_Y}{g_R} - \frac{g_T g_C g_R}{g_Y}\right) \log_e \left(1 - \frac{1}{2g_R g_Y} Q\right)$$

$$v = -2g_R g_Y \log_e \left(1 - \frac{1}{2g_R g_Y} Q\right)$$

Ergebnisse

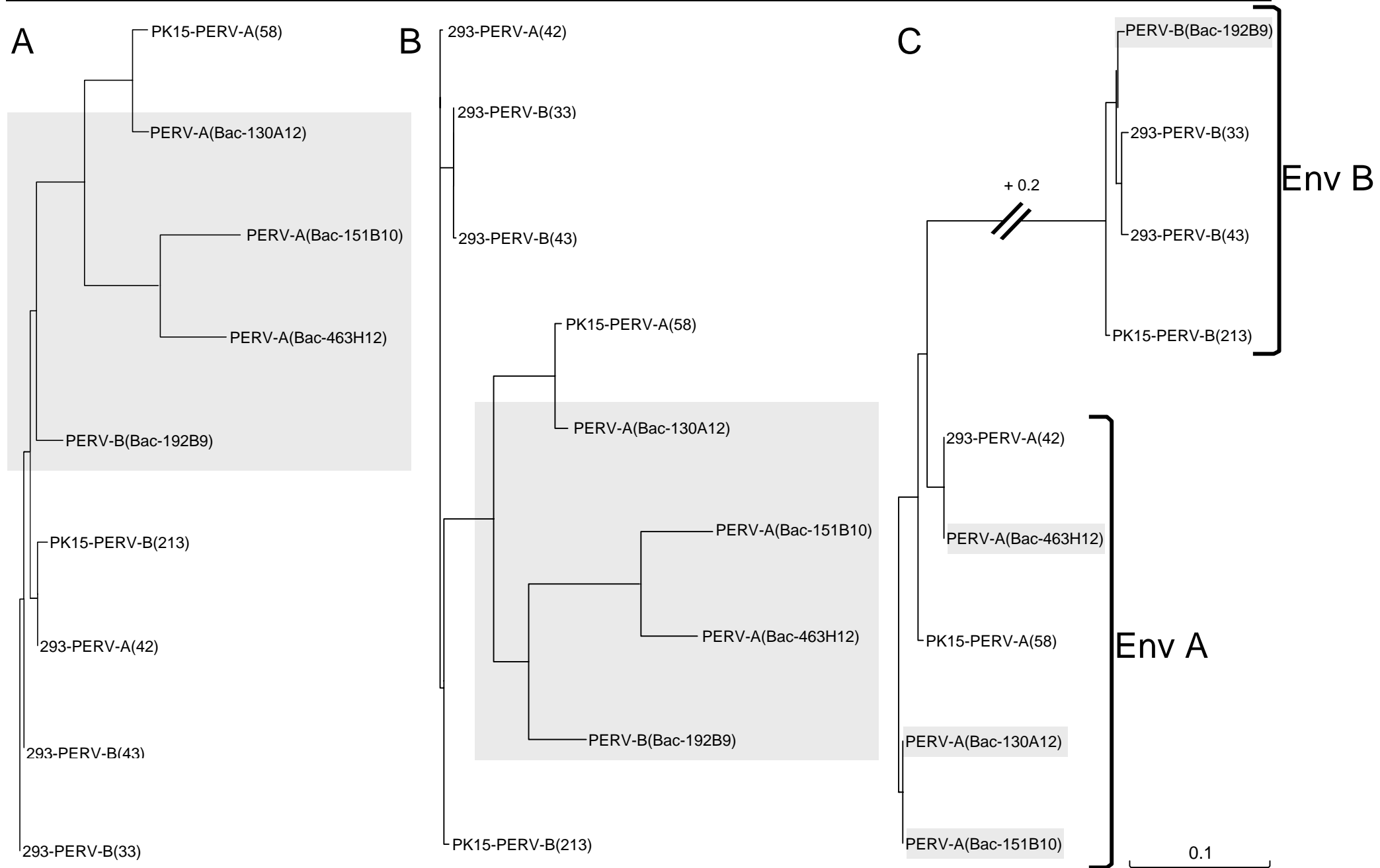


Abbildung 3-21 Phylogenetischer Vergleich der viralen Proteine nativer aus der PK15-Zelllinie bzw. dem „large white“-Genom isolierter Proviren mit „humanisierten“ Proviren aus der 293-PERV-PK-Zelllinie

Mit Hilfe des Programms „*PHYLIP*“ (Felsenstein, 1989) wurden die Verwandtschaftsbeziehungen der viralen Proteine Gag, Pol und Env untersucht. Die aus der „large white“-Bibliothek isolierten Proviren bzw. deren Proteine sind grau unterlegt.

A. Analyse des Kapsidproteins Gag. **B.** Analyse des Protease-Polymerase-Polypeptids Pol. **C.** Analyse des Hüllproteins Env. Der Maßbalken gibt die Heterogenität der Sequenzen in Prozent an (0,1 entspricht 10%). Die Unterbrechung in (C) bedeutet einen Sequenzunterschied der PERV-A/B-Hüllproteine von etwa 30%.

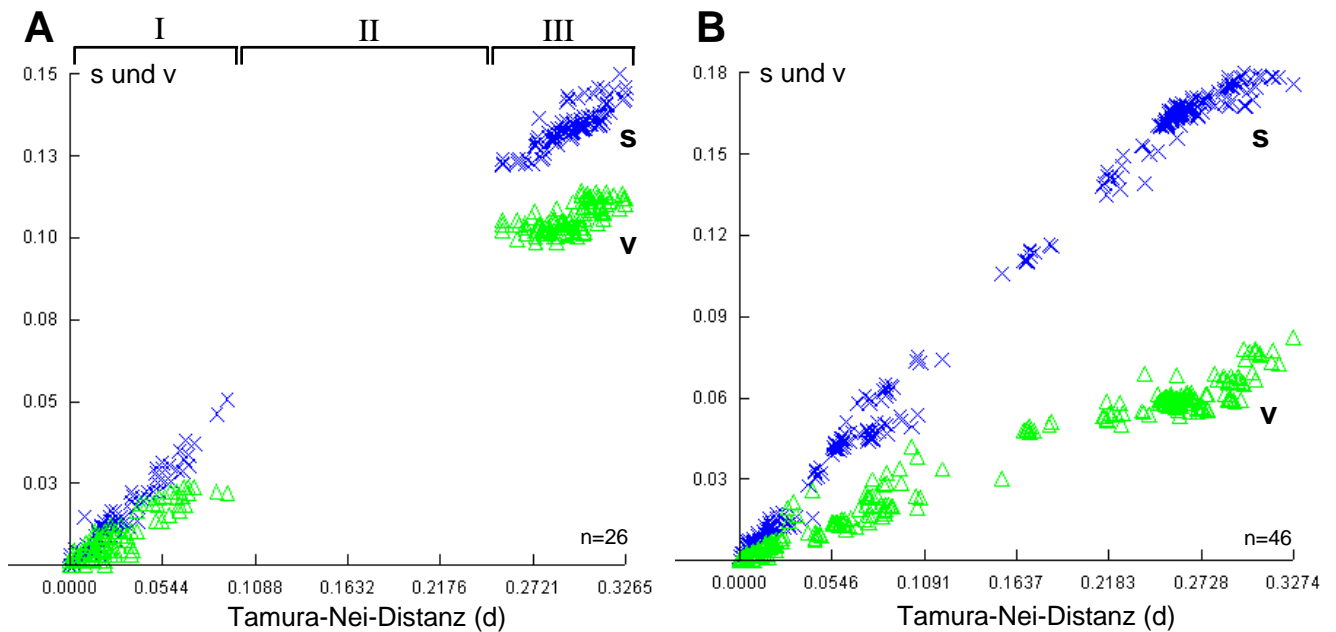


Abbildung 3-22 Transitions-/Transversions-Plot

Die Nukleotidsequenzen der LTRs (**A**) sowie der Hüllprotein-Gene (**B**) der zur Bestimmung des evolutionären Alters von PERV benutzten Proviren, die in der „large white“-Bibliothek identifiziert wurden (Abbildung 3-16), sowie Sequenzen aus der Datenbank (Genbank, siehe 2.7.1), wurden mit dem Programm „*DAMBE*“ (Xia and Xie, 2001) auf ihr Verhältnis der Transitionen (s) und Transversionen (v) unter Berücksichtigung des Tamura-Nei-Substitutionsmodells untersucht.

Das deutlich dominante Vorkommen der Transitionen belegt eine konstante Evolutionsrate und erlaubt daher die Altersbestimmung nach der „*molecular clock*“-Hypothese. s, Transitionen; v, Transversionen; n, Anzahl der untersuchten Sequenzen.

DATEN-SET	LOG LIKELIHOOD		2(LN ML – LN MLK)	χ^2 (0.95) (FREIHEITSGRADE)	STATISTISCHE SIGNIFIKANZ (P)	ABLEHNUNG DER NULL-HYPOTHESE
	ML	MLK				
LTR	-1968,13	-2727,04	1517,81	23	0,001	NEIN
env	-7334,43	-10017,67	5366,47	35	0,001	NEIN

Tabelle 3-7 Test des „maximum-likelihood“-Ratios der „molecular-clock“-Hypothese

Berechnung der statistischen Signifikanz p (unter Verwendung des χ^2 -Tests) der Nullhypothese, daß PERV sich konstant und damit entsprechend einer „*molecular clock*“ entwickelt. Die Nullhypothese wird abgelehnt, wenn p größer als 0,05 ist. ML, „maxi

maximum likelihood-Methode; MLK, „*maximum likelihood*“-Methode mit erzwungener „*molecular clock*“ unter Verwendung der ML-Topology.

	w/o „repeats“	1 ½ „repeats“	2 ½ „repeats“	3 ½ „repeats“
Anzahl	6	6	7	2
Ø Anzahl Mutationen	4±3	12±5	9±6	2±1
~ Alter	min.	400.000	1,1x10 ⁶	900.000
	max.	3,1x10 ⁶	7,6x10 ⁶	6,7x10 ⁶

Tabelle 3-8 Geschätztes Alter der PERV-Proviren durch Vergleich der 5´- und 3´- LTR-Unterschiede

Von den 21 chromosomal lokalisierten Klonen wurden die 5´- und 3´-LTRs amplifiziert und sequenziert. Durch Sequenzvergleich konnten die Nukleotidunterschiede in den korrespondierenden LTRs bestimmt werden.

Altersangaben in Jahren mit der geringsten (min) und längsten (max) Zeitspanne seit der viralen Integration in das Wirtsgenom.

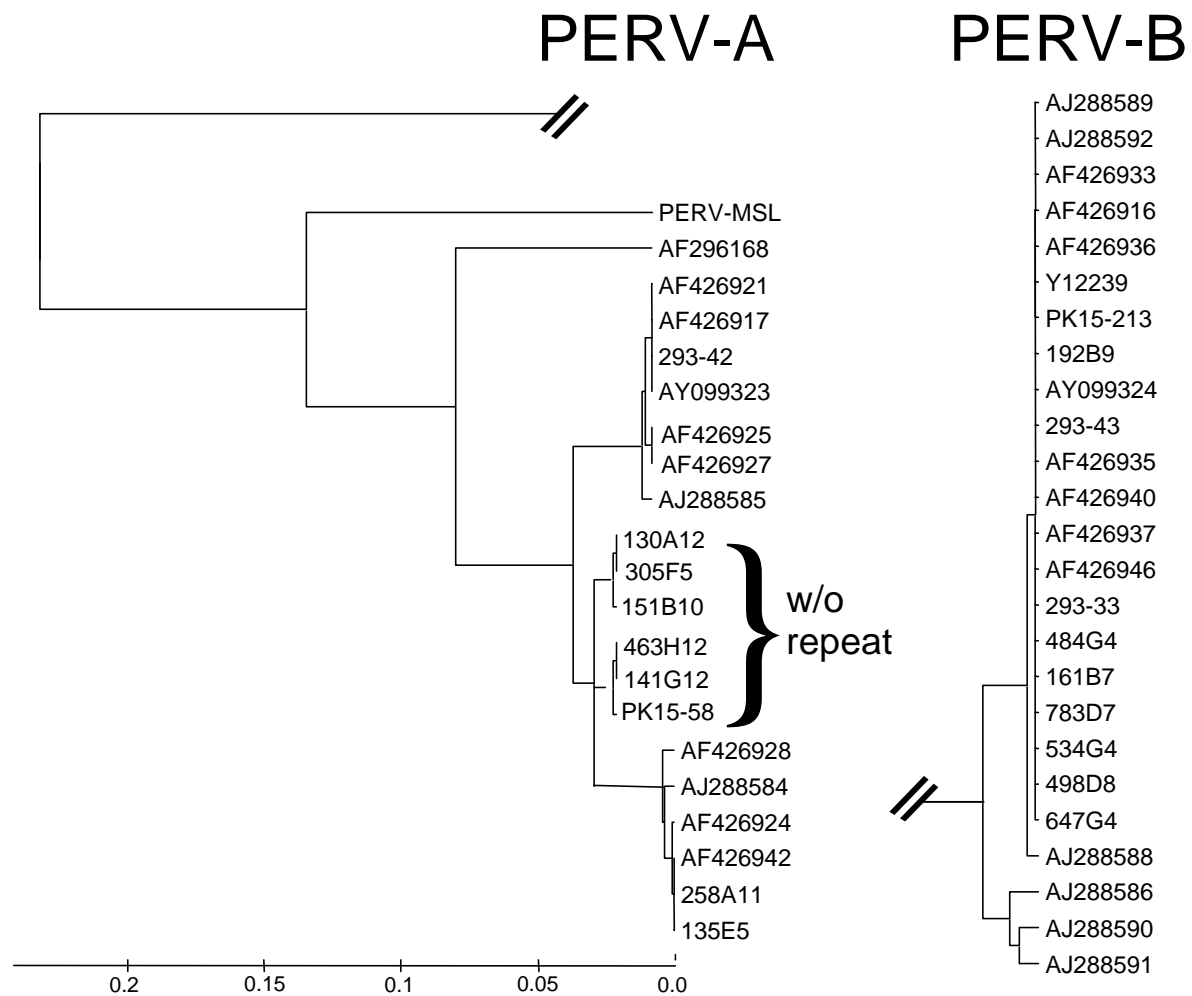


Abbildung 3-23 Phylogenetischer Stammbaum anhand von PERV-Hüllproteinen

Um neben der Datierung durch den Sequenzvergleich der PERV-LTRs eine weitere Altersabschätzung vornehmen zu können, wurden 46 PERV-Hüllproteine miteinander verglichen. Da sich die PERV-Sequenzen entsprechend einer „*molecular clock*“ entwickeln, könnte man auch hier auf das genaue Alter zurückrechnen, benötigt dafür aber einen Fixpunkt, etwa ein archäologisch belegtes Datum für mindestens eine der Sequenzen.

Da dieser Fixpunkt in dieser Analyse nicht gegeben ist, läßt sich am vorliegenden Stammbaum nur ablesen, daß auch bei Vergleich der Hüllproteine solche Proviren mit „*repeat*“-loser LTR phylogenetisch jünger sind.

Die durch den Sequenzvergleich der 5´- und 3´-LTRs der Proviren erhaltene Datierung (Tabelle 3-8) läßt sich prinzipiell auch durch Sequenzvergleiche an den viralen Proteinen (hier: Hüllprotein) bestätigen. Diese Methode benötigt allerdings einen aus anderen, z.B. archäologischen Quellen datierten Fixpunkt, da eine interne Referenz fehlt. Da phylogenetische Daten zur Ordnung der Suidae insgesamt sehr knapp sind, steht uns ein solcher Fixpunkt für eine genaue Datierung nicht zur Verfügung, so daß wir den errechneten Stammbaum nur relativ zu sich selbst auswerten können.

Diese Auswertung bestätigt allerdings den aus der LTR-Sequenzanalyse bekannten Befund, daß Proviren mit „*repeat*“-loser LTR phylogenetisch jünger sind als solche Proviren, die in ihrer LTR eine Variation der „*repeat*“-Struktur tragen.

3.7 Polymorphismen von HERV-K(C7)

Das HERV-K-Provirus auf Chromosom 7 (HERV-K(C7), (Tönjes et al., 1999; Mayer et al., 1999; Mayer, 2001) ist neben HERV-K113 und HERV-K115 (Turner et al., 2001) das intakteste bis heute beschriebene humane endogene Retrovirus. Während die viralen Leserahmen vorhanden sind, liegt ein hauptsächlich Defekt, der dieses Virus an der Replikation hindert, an einer Punktmutation im *pol*-Leserahmen, der das funktionale, hoch konservierte YIDD-Motiv der Polymerase in ein nicht-funktionales CIDD-Motiv verwandelt.

Analog zur Vorgehensweise bei PERV-B(Bac-192B9) (siehe 3.5.3) wurde eine Großzahl an humanen Probanden daraufhin untersucht, ob es bei einigen Individuen zu einer Reversion der Punktmutation kommt. Um spezifisch das gesuchte HERV-K(C7) auf humaner genomischer DNA zu amplifizieren, wurde wieder ein Primer in die für dieses Provirus spezifische 5´-flankierende chromosomale Region gelegt, während der Gegenprimer im *pol*-Gen stromabwärts von der zu untersuchenden nt-Position bindet. Die genaue PCR-Strategie ist in Abbildung 3-24 dargestellt. Hierzu wurden drei Probandengruppen untersucht. Gesunde Kaukasier, Kaukasier mit dem Base-dow-Syndrom sowie eine kleinere Gruppe afrikanischer bzw. asiatischer Abstammung.

Die Struktur von HERV-K(C7) sowie die verwendete PCR-Strategie ist in Abbildung 3-24 dargestellt.

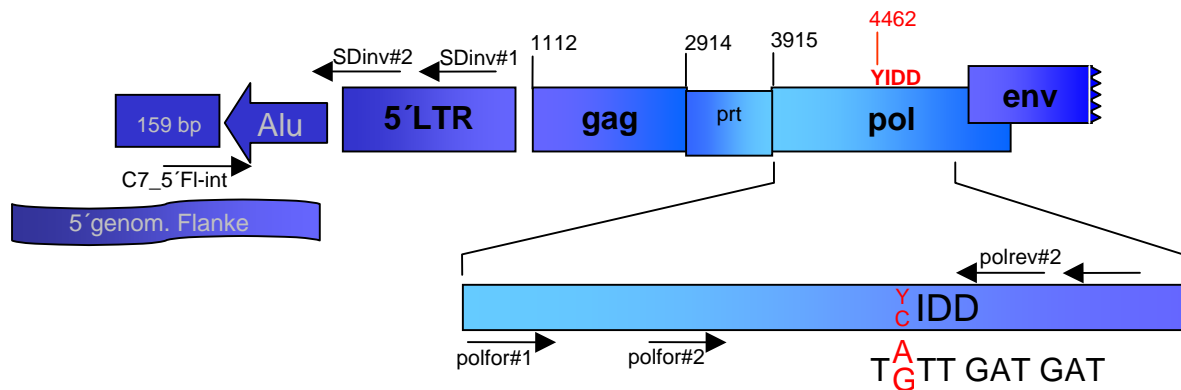


Abbildung 3-24 Struktur und PCR-Strategie zur Untersuchung intraviraler Polymorphismen bei HERV-K(C7)

Für HERV-K(C7) steht die gesamte provirale Sequenz sowie die flankierenden chromosomalen Sequenzen zur Verfügung.

Die Abbildung ist nicht maßstabsgerecht und stellt die 3'-Flanke nicht dar. Die wichtigsten Nukleotidpositionen sind angegeben und eine genaue Karte findet sich in (Tönjes et al., 1999).

In einem ersten Amplifikationsschritt wurde ein etwa 5000 bp großes Fragment des Provirus amplifiziert (nt -300 bis nt 4561), wobei der in der 5'-flankierenden chromosomalen Region bindende Vorwärtsprimer sicherstellte, daß nur dieses Provirus amplifiziert werden konnte. Mit diesem Fragment als Matrize wurde in einem zweiten Amplifikationsschritt ein 945 bp große Amplifikat (nt 3588 bis nt 4533) im Bereich der Punktmutation amplifiziert.

Insgesamt wurden 32 Probanden untersucht (Tabelle 3-9). Davon waren 24 Kaukasier, wovon 10 am Basedow-Syndrom erkrankt waren. 8 Probanden waren afrikanischer bzw. asiatischer Abstammung. Von den 8 untersuchten Nicht-Kaukasieren waren 6 heterozygot für die Reversion des CIDD- zum YIDD-Motiv, wohingegen nur 1 von 24 untersuchten Kaukasieren dieselbe heterozygote Reversion aufwies. Obwohl der heterozygot getestete Kaukasier am Basedow-Syndrom erkrankt ist, kann keinerlei Korrelation zu diesem Krankheitsbild und dem Vorkommen von HERV-K(C7) nachgewiesen werden. Ein homozygotes Vorkommen des YIDD-Motivs (bzw. dessen Nukleotidsequenz) konnte bei keinem der Probanden festgestellt werden.

	Ethnie	Krankheit	Gen-Status
1	afrikanisch	-	Homozygot C
2	afrikanisch	-	Homozygot C
(A) 3	afrikanisch	-	Heterozygot Y/C
(B) 4	asiatisch	-	Heterozygot Y/C
5	asiatisch	-	Heterozygot Y/C
6	asiatisch	-	Heterozygot Y/C
(C) 7	asiatisch	-	Heterozygot Y/C
(D) 8	indisch	-	Heterozygot Y/C
9	kaukasisch	-	Homozygot C
10	kaukasisch	-	Homozygot C
11	kaukasisch	-	Homozygot C
12	kaukasisch	-	Homozygot C
13	kaukasisch	-	Homozygot C
14	kaukasisch	-	Homozygot C
15	kaukasisch	-	Homozygot C
16	kaukasisch	-	Homozygot C
17	kaukasisch	-	Homozygot C
18	kaukasisch	-	Homozygot C
19	kaukasisch	Basedow	Homozygot C
20	kaukasisch	Basedow	Homozygot C
21	kaukasisch	Basedow	Homozygot C
22	kaukasisch	Basedow	Homozygot C
(E) 23	kaukasisch	Basedow	Heterozygot Y/C
24	kaukasisch	Basedow	Homozygot C
25	kaukasisch	Basedow	Homozygot C
26	kaukasisch	Basedow	Homozygot C
27	kaukasisch	Basedow	Homozygot C
28	kaukasisch	Basedow	Homozygot C
29	kaukasisch	-	Homozygot C
30	kaukasisch	-	Homozygot C
31	kaukasisch	-	Homozygot C
32	kaukasisch	-	Homozygot C
Tera 1	Zelllinie	-	Homozygot C

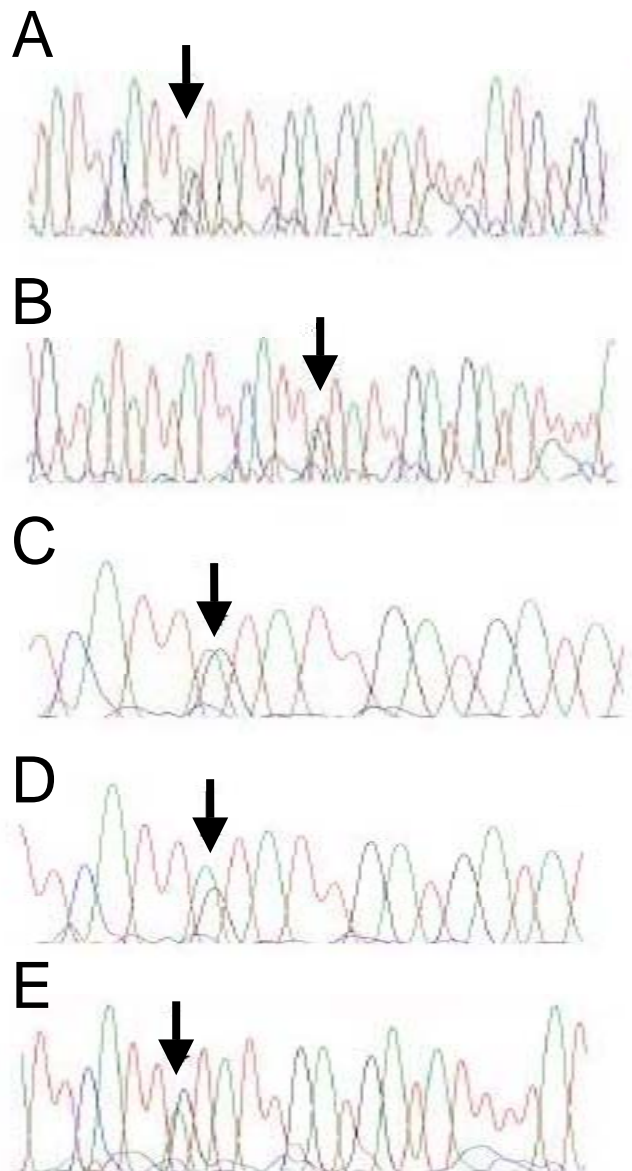


Tabelle 3-9 Aufstellung der auf die Punktmutation des Polymerase-Gens in HERV-K(C7) untersuchten Patienten

In 32 Proben (31 Patienten und eine HERV-K-positive Teratokarzinoma-Zelllinie) wurde per PCR mittels spezifischer Primer ein Teil von HERV-K(C7) amplifiziert und nach Sequenzierung des *pol*-Fragments (945 bp, nt 3588 bis nt 4533) auf die Beschaffenheit einer bestimmten hochkonservierten Sequenz untersucht.

Die Sequenz kodiert in dem publizierten Provirus für das nicht funktionale Aminosäuremotiv CIDD. In einigen, meist nicht-kaukasischen Individuen konnte jedoch das Vorkommen des funktionalen Motivs YIDD heterozygot nachgewiesen werden.

Die Chromatogramme in A bis E zeigen Sequenzierungen und korrespondieren mit den in der Tabelle entsprechend markierten Patienten. Die Pfeile kennzeichnen die Position der untersuchten Punktmutation.

In der betreffenden Position sind immer die Nukleotide Adenin (A, grün) und Guanin (G, schwarz) zu finden, wobei die Intensität der beiden zusammen detektierten Nukleotide in etwa halb so stark ist wie die Intensität der einzeln detektierten Nukleotide. Dies ist die erwartete Beobachtung für ein heterozygotes Allel in genomischer DNA.

4 Diskussion

4.1 Anwendung der PERV-Pseudotypvektoren

4.1.1 Wirtszelltropismus

Der Wirtszelltropismus von PERV (Takeuchi et al., 1998; Wilson et al., 2000) wurde an dieser Stelle vor allem in Hinblick auf die angestrebte Rezeptorklonierung (siehe Kapitel 2.3.3, 3.3 und 4.1.5) untersucht. Die Transduktionseffizienz der PERV-Pseudotypvektoren schwankt offensichtlich mit der Menge der eingesetzten Partikel, so daß sichergestellt werden mußte, daß die zur Rezeptorklonierung ausgewählten Cos7- und 3T3-Zellen auch bei Verwendung der hochtitrigen Vektorüberstände keinen Zelleintritt zulassen.

Die erfolgreiche Transduktion von PBMC konnte dagegen erstmals hier gezeigt werden und weist darauf hin, daß Zellen des Immunsystems, die im Falle der XTx als erste mit freigesetzten Partikeln in Kontakt kommen, ebenfalls, wenn auch in geringen Maße, suszeptibel für eine PERV-Infektion sind. Dieser Zelleintritt könnte bei den (teilweise) phagozytotisch aktiven PBMC aber auch unspezifisch durch Vesikel und nicht rezeptorvermittelt geschehen. Während dies den Nachweis viraler Nukleinsäure in den Zellen erklären würde (s.u.), deutet die Expression des Transgens jedoch auf einen spezifischen Zelleintritt hin.

In der Literatur finden sich Berichte, wonach PBMC zwar von PERV infiziert werden können, aber keine virale Replikation ermöglichen (Ritzhaupt et al., 2002). Da PBMC zumindest für den Zelleintritt von PERV permissiv zu sein scheinen, wenn auch mit einer sehr geringen Frequenz (< 0,1 %), müssen sie über einen anderen Mechanismus zur Unterdrückung der PERV-Replikation verfügen. Da die Untersuchungen mittels Zellkultur durchgeführt wurden, ist deshalb denkbar, daß infizierte PBMC auf Grund des virusinduzierten Stresses schneller absterben, als sie eine Infektion an andere Zellen weitergeben können. Ein weiteres Modell für den Nachweis des Zelleintritts, nicht aber der Replikation, könnte eine phagozytische Aufnahme der Viruspartikel durch wenige PBMC sein.

4.1.2 Bedeutung des R-Peptids

Für eine erfolgreiche Infektion müssen Viren ihre Membran mit der ihrer Wirtszelle verschmelzen. Während dieser Vorgang bei einigen Viren in Abhängigkeit vom pH-Wert des umgebenden Mediums geschieht (z. B. Influenza; Skehel and Wiley, 2000), löst bei Retroviren die Rezeptorbindung den Fusionsprozeß aus. Bedingung dafür ist

jedoch die proteolytische Abspaltung des R-Peptids durch die virale Protease während der Partikelbildung (Green et al., 1981; Henderson et al., 1985).

Deletiert man den als R-Peptid bezeichneten Bereich (17 Aminosäuren) am C-Terminus von Hüllproteinen der C-Typ-Retroviren, so zeigen diese Proteine eine deutlich erhöhte fusogene Aktivität, wenn sie in Zellkultur exprimiert werden. Daraus läßt sich schließen, daß die Zell-Virus-Fusion nach der Anbindung des Partikels an die Zelle, wie bei anderen C-Typ-Retroviren auch bei PERV, durch eine proteolytische Abspaltung des R-Peptids aktiviert wird (Green et al., 1981; Henderson et al., 1985). Obwohl sich der C-Terminus der Hüllproteine der beiden polytropen PERV deutlich von anderen retroviralen Hüllproteinen unterscheidet, sind auch bei PERV hochkonservierte Aminosäuren zu erkennen (Tabelle 3-1, grau hinterlegt), die essentiell für eine Steigerung der fusogenen Aktivität sind. Da die Sequenzen der Hüllproteine der verschiedenen C-Typ-Retroviren trotz einiger konservierter Positionen stark variieren, ist eine einfache Identifizierung der R-Peptid-Schnittstelle nicht möglich. Indirekte Hinweise vom Gibbon Ape Leukemia Virus (GaLV; Fielding et al., 2000; Christodoulopoulos and Cannon, 2001) deuten darauf hin, daß die Schnittstelle zwischen dem bei allen C-Typ-Hüllproteinen hochkonservierten Aminosäurepaar Leucin (L) und Valin (V) liegt (siehe Tabelle 3-1). Die fusogene Aktivität von PERV-A Δ R lag deutlich höher als die von PERV-B Δ R (Abbildung 3-9), obwohl beide Hüllproteine in der Aminosäuresequenz ihres C-Terminus übereinstimmen. Dies deutet darauf hin, daß nicht nur die Abspaltung des R-Peptids für die Steigerung der fusogenen Eigenschaften der viralen Hüllproteine verantwortlich ist, sondern es noch mindestens einen weiteren Faktor geben muß.

Die ausbleibende Titersteigerung bei der Verwendung der trunkierten Hüllprotein-Expressionsvektoren zur Pseudotypvektor-Herstellung läßt sich mit der starken Syncytienbildung auch in der Produzentenzelllinie (293 Φ NXg/p) erklären. Selbst wenn das trunkierte Hüllprotein bessere Infektionseigenschaften besitzen sollte, führt seine Expression zu einem Verschmelzen und damit zu einem raschen Absterben der Zellkultur. Zellen, die das trunkierte Hüllprotein exprimieren, sterben im Durchschnitt nach 48 Stunden, so daß sich kein nennenswerter Titer bilden kann.

4.1.3 Transduktionskinetik

Die Bestimmung der Transduktionskinetik mit Wildtyp-Viren ist auf Grund des schwierigen Nachweises problematisch. Weder Immunfluoreszenz, RT-Test noch

quantitative RT-PCR können die wenigen, in den ersten Stunden der Infektion übertragenen Genome zuverlässig und quantitativ nachweisen.

Die Transduktion der Zielzellen mit den Pseudotypvektoren läßt sich dagegen fast in Echtzeit dokumentieren und selbst einzelne Transduktionsereignisse lassen sich sichtbar machen. Zusätzlich werden die Ergebnisse durch replizierende Viren nicht verfälscht. Der Nachteil der Methode besteht jedoch darin, daß lediglich der Einfluß der PERV-Hüllproteine untersucht werden kann, nicht aber der Beitrag der unterschiedlichen PERV-LTRs. Da man bei der Abschätzung zur Transplantationssicherheit die Geschwindigkeit des Zelleintritts getrennt von der sich daran anschließenden Replikation betrachten kann, ist diese Einschränkung zu akzeptieren. Der Zelleintritt ist Voraussetzung für eine Infektion, außerdem können eingedrungene Retroviren durch Insertionsmutagenese maligne Erkrankungen verursachen, auch wenn es nicht zu einer produktiven Infektion kommt.

Die Tatsache, daß erste Transduktionsereignisse schon noch 5 Minuten zu beobachten sind, bedeutet ein erhöhtes Risiko während einer Xenotransplantation, denn schon eine kurzzeitige Exposition zu porcinem Gewebe könnte für eine Übertragung ausreichen. Relativiert wird der Befund allerdings durch zwei andere Hinweise. Porcines Gewebe setzt normalerweise keine Viruspartikel frei, so daß der zu erwartende Titer noch viel geringer als bei den Pseudotypexperimenten sein wird. Dies könnte sich allerdings durch mechanische sowie chemische Stimulation während einer XTx ändern. Außerdem verfügt der Transplantatempfänger auch bei starker Immunsuppression noch über ein Immunsystem, was den Zeitpunkt der Infektion verzögern kann.

Bei Verwendung der 1:100 verdünnten Überstände zeigen die PERV-A-Pseudotypvektoren auf 293-Zellen einen deutlich schnelleren und höheren Anstieg bei der Anzahl der transduzierten Zellen als PERV-B (siehe Abbildung 3-3, Abbildung 3-4 und Abbildung 3-5), bei HeLa-Zellen ist die Situation umgekehrt (Daten nicht gezeigt). Unterschiede in der Transduktionseffizienz sind nicht zu beobachten, wenn unverdünnter Überstand (Titer ca. 1×10^6 /ml) verwendet wird (Abbildung 3-1).

4.1.4 Neutralisation durch Antikörper

Eine Impfung von Transplantatempfängern sowie deren Ärzten und Kontaktpersonen könnte bei Auftreten einer PERV-Infektion die Ausbreitung des Erregers verhindern. Um eine mögliche Impfstrategie in Betracht zu ziehen, muß aber zunächst geklärt werden, ob gegen PERV gerichtete Antikörper, die bisher lediglich zur immunologi

schen Detektion verwendet wurden (Krach et al., 2000; Tacke et al., 2001; Fischer et al., 2003), auch neutralisierende Eigenschaften besitzen.

Hierzu wurden gegen das PERV-B-Hüllprotein gerichtete Antikörper gegen die Pseudotypvektoren eingesetzt, deren Transduktionseffizienz sich bei erfolgreicher Inhibition reduzieren sollte. Gegen PERV-A gerichtete Antikörper wurden zwar generiert (U. Krach, unveröffentlicht), diese zeigten aber schon in immunologischen Assays keine Spezifität und wurden hier nur als Kontrolle genutzt (nicht gezeigt).

Die fehlende Reaktivität der gegen PERV-A gerichteten Antiseren zeigt, daß die beobachtete Neutralisationswirkung nicht durch zytotoxische oder apoptoseinduzierende Effekte, vermittelt durch unspezifische Bindung der Antikörper an zelluläre Oberflächenrezeptoren, ausgelöst wird. Ein weiterer Nachweis der spezifischen Neutralisation ist die fehlende Inhibition der PERV-A-Pseudotypen durch das eingesetzte, gegen gp70(B) gerichtete Antiserum.

Die Inhibition der PERV-B-Pseudotypen durch gp70(B) beruht wahrscheinlich auf der sterischen Hinderung der Hüllprotein-Rezeptor-Bindung, da das Komplementsystem im Medium hitzeinaktiviert ist (siehe Kapitel 2.2.2), weshalb es die Virionen nicht antikörpervermittelt lysieren kann. Demgegenüber ist aber davon auszugehen, daß nach einer Impfung, selbst im Falle einer Immunsuppression bei der XTx, die Neutralisationswirkung noch stärker sein sollte als die in der Zellkultur beobachtete.

Als wahrscheinlich unspezifisch ist dagegen die Reduktion der Transduktionseffizienz nach Zugabe des p15E-Serums zu betrachten. Da dieses gegen das R-Peptid gerichtet ist (siehe 4.1.2 und Abbildung 3-6), sollte es bei spezifischer Bindung auch mit den PERV-A-Pseudotypen reagieren, es senkt aber nur die Transduktionseffizienz der PERV-B-Pseudotypen um etwa 5% bei Verwendung der höchsten Konzentration, was gerade an der statistischen Signifikanzgrenze liegt. Bei Western Blot-Analysen mit diesem Antiserum kommt es nur bei PERV-B-Hüllproteinen ebenfalls zu einer unspezifischen Reaktion (Fischer et al., 2003). Diese unspezifische Reaktivität dürfte auch hier die geringe Verschlechterung des Vektortiters bewirken.

4.1.5 Rezeptorklonierung

Die Klonierung des PERV-A- sowie des PERV-B-Rezeptors ist fehlgeschlagen, obwohl vielversprechende Ansätze auf einen baldigen erfolgreichen Abschluß deuten.

So konnten notwendige Vorexperimente wie die Etablierung stabiler, hochtitriger Pseudotypvektoren und die Herstellung einer cDNA-Bibliothek der PERV-suszeptiblen Zelllinie 293 erfolgreich abgeschlossen. Ebenfalls konnte die Effizienz des aus

gewählten Selektionsverfahrens durch Umklonierung der cDNA-Bibliothek in einen retroviralen Transfer-/Expressionsvektor deutlich gesteigert werden. In diesem Zusammenhang kann auf Grund der durchgeführten Positiv- und Negativkontrollen davon ausgegangen werden, daß die beobachteten GFP-positiven und Neomycin-resistenten Zellen tatsächlich die rezeptorkodierende cDNA enthalten.

Die abschließende Isolierung der rezeptorkodierenden cDNA stellte sich dann auch als das entscheidende Problem heraus, was sich rückblickend auf mehrere methodenbasierte Fehlentscheidungen zurückführen läßt.

Durch Verwendung des retroviralen Transfer-/Expressionsplasmids (pLIB) konnte zwar die Frequenz der positiv selektionierten Zellen deutlich erhöht werden, jedoch besitzt dieser Vektor zum einen keinen zweiten Selektionsmarker und zum anderen ist er zu großen Teilen homolog zum MLV-Genom. Dieses trifft ebenfalls auf den verwendeten Transfervektor der PERV-Pseudotypvektoren (pEL-GFP-N1) zu, der weiterhin enthält die wegen der höheren Effizienz als Indikatorzellen letztlich ausgewählten 3T3-Zellen als murine Zelllinie provirale MLV-Sequenzen. Diese Umstände führen in der PCR zur Amplifikation der rezeptorkodierenden cDNA zu multimeren Banden, die sich nicht eindeutig auswerten lassen.

Der fehlende Selektionsmarker im pLIB-Vektor kann außerdem dazu führen, daß die rezeptorkodierende cDNA in dem kurzen Zeitraum, der bis zur Isolation der genomischen DNA verstreicht, aus den Zellen eliminiert wird. Zusammen mit der oben beschriebenen Kreuzreaktivität in der PCR wird der Nachweis des rezeptorkodierenden Inserts nochmals erschwert.

4.2 Molekulare Charakterisierung replikations-kompetenter PERV

Berichte über replikations-kompetente PERV, die aus der humanen, PERV-infizierten Zelllinie 293-PERV-PK isoliert wurden (Czauderna et al., 2000) sowie die Beschreibung der PERV-MSL-Sequenz durch (Akiyoshi et al., 1998) zeigen, daß das Schwein ebenfalls intakte Proviren besitzt, wie es bereits für viele andere Spezies beschrieben wurde (Coffin, 1984).

Die Untersuchung der genomischen Bibliothek eines „*large white*“-Schweins sollte die Anzahl und Position der replikations-kompetenten Proviren bestimmen und führte schließlich zur Isolierung von vier Proviren: PERV-A(Bac-130A12), PERV-A(Bac-151B10) und PERV-A(Bac-463H12) und PERV-B(Bac-192B9).

4.2.1 Struktur der nativen Proviren

Die vier aus der „*large white*“-Bibliothek isolierten Proviren zeigen die gleiche genomische Struktur wie zuvor beschriebene PERV (Czauderna et al., 2000; Krach et al., 2001) mit lediglich geringen Aminosäureaustauschen. Diese Unterschiede verteilen sich über die gesamte Sequenz der einzelnen Proviren, wobei sich die meisten Differenzen im Kapsid sowie der Polymerase finden, während das Hüllprotein zwischen den Proviren die höchste Homologie besitzt. Die gefundenen Polymorphismen haben allerdings keinerlei Einfluß auf hochkonservierte Bereiche des *pro/pol*-Gens oder des *env*-Gens (VRA, VRB und PRO; LeTissier et al., 1997) und die meisten der gefundenen Aminosäureaustausche sind neutral. Der mögliche Einfluß der nicht-neutralen Austausche auf das replikative Verhalten der Proviren muß noch in weiteren Studien untersucht werden.

Auf Grund der hohen Homologie zwischen dem Klon PERV-B(Bac-192B9) mit den aus der humanen Zelllinie 293-PERV-PK isolierten Klonen 293-PERV-B(33) und 293-PERV-B(43) (Czauderna et al., 2000) scheint es möglich, daß es sich bei PERV-B(Bac-192B9) um den porcinen Vorfahren dieser zwei „humanisierten“ Klone handelt. Die aus der „*large white*“-Bibliothek isolierte Sequenz weist zwar zwei Stop-Mutationen auf, diese sind jedoch in einer Vielzahl von Individuen nicht vorhanden (siehe Kapitel 3.5.3 und Kapitel 4.2.6) und können demnach vernachlässigt werden. Die unterschiedliche Struktur der LTRs erklärt sich durch die Fähigkeit von PERV, die Anzahl der 39bp-„*repeats*“ während der Replikation dynamisch zu verändern. Die gefundenen LTR-Strukturen des porcinen wie der „humanisierten“ Proviren stellen also nur eine Momentaufnahme zum Zeitpunkt der Bibliothekserstellung dar.

PERV besitzen zwei grundsätzlich verschiedene LTR-Strukturen. Die Klone PERV-A(Bac-463H12) und PERV-B(Bac-192B9) besitzen eine LTR, die sich durch distinkte 39bp-Sequenzwiederholungen in U3 auszeichnen und die zuvor schon bei den aus der humanen Zelllinie 293-PERV-PK isolierten Proviren gefunden wurden (Czauderna et al., 2000). Die 39bp-Sequenz setzt sich wiederum aus einer 21bp- und einer 18bp-Sequenz zusammen und ihre Anzahl schwankt dynamisch während der Replikation der Proviren (Scheef et al., 2001).

Die Klone PERV-A(Bac-130A12) und PERV-A(Bac-151B10) besitzen eine LTR, die zwar über zu den „*repeat*“-Strukturen homologe Sequenzen verfügt, diese liegen hier jedoch getrennt in U3 vor und jede Untereinheit trägt zwei Nukleotidaustausche. Für diese Proviren wurde kein entsprechendes Homolog in der humanen Zelllinie 293-

PERV-PK gefunden. Dies könnte bedeuten, daß die bei diesen beiden Klonen gefundene LTR-Struktur (siehe Kapitel 3.4.2) und die damit verbundene geringe Replikationseffizienz es diesen Proviren nicht erlaubt, humane Zellen zu infizieren. Untersuchungen weisen darauf hin, daß es einen direkten Zusammenhang zwischen der Anzahl der Sequenzwiederholungen in U3 und der Replikationsstärke des betroffenen Provirus gibt (Scheef et al., 2001). Es ist also naheliegend, anzunehmen, daß die räumliche Trennung der „repeat“-Strukturen in den Klonen PERV-A(Bac-130A12) und PERV-A(Bac-151B10) die transkriptionelle Aktivität dieser Proviren negativ beeinflusst.

Die dynamische Veränderung der 39bp-Sequenzwiederholungen in der PERV-LTR wird als Anpassung der transkriptionellen Aktivität an humane Zellen diskutiert (Scheef et al., 2001; Scheef et al., 2002). Die Tatsache, daß LTRs mit einer variablen „repeat“-Anzahl auch im porcinen Genom gefunden wurden, legt den Schluß nahe, daß es sich hierbei um keinen human-spezifischen Adaptationsprozeß handelt, sondern das dieser Prozeß ein natürlicher Mechanismus von PERV ist.

4.2.2 Infektiösität der Proviren

Drei der vier aus der „large white“-Bibliothek isolierten Klone besitzen die Fähigkeit, auf verschiedenen humanen Zellen zu replizieren. Diese Fähigkeit konnte zum einen durch Nachweis der Expression viraler Proteine (siehe Abbildung 3-15 und Abbildung 3-17) als auch durch Detektion der Integration viraler Genome in die DNA der Wirtszellen (siehe Abbildung 3-14) gezeigt werden. Die initial bei Klon PERV-B(Bac-192B9) zu beobachtende Expression des viralen Kapsids (Abbildung 3-15) ist auf eine LTR-getriebene Expression der transfizierten DNA zurückzuführen. Mit zunehmender Kultivierungsdauer und damit einhergehender Verdünnung der viralen Genome ist die Proteinexpression nicht mehr nachweisbar.

Die gemessene RT-Aktivität (Abbildung 3-17) ist im Vergleich zu Werten, die mit den aus der Zelllinie 293-PERV-PK isolierten Molekularklonen erreicht werden können (Czuderna et al., 2000), um etwa das 10fache geringer. Diese liegt für die Klone PERV-A(Bac-130A12) und PERV-A(Bac-151B10) bei 10-15 mU/ml und ist sicherlich in der LTR-Struktur begründet (Abbildung 3-12), die nur eine äußerst geringe transkriptionelle Aktivität aufweist (Scheef et al., 2001). Daß der Klon PERV-A(Bac-463H12) mit 25 mU/ml im Vergleich zu homologen Molekularklonen deutlich schwächer repliziert, ist höchst wahrscheinlich in einigen kleineren Sequenzunterschieden zu suchen, deren genauer Einfluß auf die Replikation aber noch untersucht werden

muß. Für den replikations-defizienten Klon PERV-B(Bac-192B9) muß auf Grund seiner hohen Homologie zu 293-PERV-B(43) angenommen werden, daß Klone ohne Stop-Mutationen (Tabelle 3-5, Proben 25-35) dieselbe Aktivität zeigen würden wie der aus 293-PERV-PK isolierte Molekularklon. Im Vergleich zu Publikationen, die durch Kokultivierung mit PK15-Zellen infizierte 293-Zellen untersucht haben (0,1 mU/mU bis 1,6 mU/ml; Van der Laan et al., 2000)), zeigen die vorgelegten Befunde jedoch eindeutig die Replikationskompetenz der isolierten Proviren.

F. Czauderna hat drei funktionale Proviren aus der PERV-infizierten Zelllinie 293-PERV-PK isoliert, deren LTRs alle eine „repeat“-Struktur besitzen (Czauderna et al., 2000). Eine LTR-spezifische PCR auf genomischer DNA der 293-PERV-PK-Zelllinie und die anschließende Sequenzierung von sechs Fragmenten (die „repeat“-lose LTR sowie die LTR mit 3 ½ „repeats“ sind etwa 700bp lang und lassen sich daher auf einem Agarosegel nicht voneinander unterscheiden) ergab in allen Fällen den Nachweis der „repeat“-tragenden LTR (Daten nicht gezeigt). Obwohl die Anzahl der untersuchten PCR-Fragmente für eine statistisch einwandfreie Aussage noch zu gering ist, legt die Kombination der beiden unabhängigen Untersuchungen nahe, daß die „repeat“-losen PERV *in vivo* nicht in der Lage sind, die Speziesbarriere zu überwinden, obwohl diese Proviren artifiziell (durch Transfektion, vergleiche Kapitel 3.4.3) dazu gebracht werden können, auf humanen Zellen, wenn auch schwach, zu replizieren.

4.2.3 Flankierende chromosomale Sequenzen

Mit Hilfe der inversen PCR wurden die flankierenden chromosomalen Sequenzen der vier aus der „large white“-Bibliothek isolierten Proviren bestimmt, wobei es jedoch nur möglich war, je eine Flanke pro Provirus zu identifizieren. Dies mag dadurch erklärt werden, daß die Integrationsorte von PERV oftmals in repetitiven Sequenzen des porcinen Genoms liegen (Rogel-Gaillard et al. (1999) und persönliche Kommunikation), so daß die gewählte Methode, die auf einzelne Restriktionsschnittstellen angewiesen ist, nicht ausreichend effizient funktioniert hat.

Durch Identifikation der flankierenden chromosomalen Sequenzen ergibt sich die Möglichkeit, die einzelnen Proviren spezifisch in genomischen Proben nachzuweisen, was dazu genutzt wurde, verschiedene Individuen unterschiedlicher Schweinerassen auf die Verteilung von PERV zu untersuchen. Die Kenntnis über Vorkommen, Anzahl und Lokalisierung der PERV ermöglicht die Züchtung von Schweinen, die keinerlei vollständige replikations-kompetente Proviren mehr enthalten. Lediglich der

auf Chromosom 7 im SLA des Schweins lokalisierte Klon PERV-B(Bac-192B9) könnte auf Grund der Heterogenität in diesem Bereich durch simple Züchtung schwierig zu entfernen sein. Die zahlreichen Sequenzen trunkierter PERV machen eine vollständige Eliminierung aus dem porcinen Genom aber sehr unwahrscheinlich, so daß bei einer potentiellen XTx auch dann noch die Gefahr der Rekombination mit anderen Viren bestehen bleibt.

4.2.4 Lokalisierung der replikations-kompetenten Proviren

Durch Verwendung der BAC-Bibliothek (Rogel-Gaillard et al., 1999) konnten die chromosomalen Positionen der identifizierten Proviren bestimmt werden (siehe Abbildung 3-16). Durch Abgleich der flankierenden chromosomalen Sequenzen mit der Genomdatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sollte aber auch eine Identifikation des Insertionsortes auf einer Gen-spezifischen Ebene durchgeführt werden. Dies gelang aber nur für Klon PERV-B(Bac-192B9), da die Analyse des porcinen Genoms noch nicht sehr weit fortgeschritten ist. Die BLAST-Analyse ergab eine Integration im BAT1-Gen (Peelman et al., 1995) mit 100% Konfidenz. BAT1 ist im porcinen SLA Komplex auf Chromosom 7 lokalisiert und kodiert für eine putative konservierte RNA-Helicase aus der DEAD Familie. Die Position von BAT1 auf Chromosom 7 ist konsistent mit der früheren Bestimmung von PERV-B(Bac-192B9) auf demselben Chromosom durch (Rogel-Gaillard et al., 1999). Die Integrationsorte der anderen Proviren ließen sich auf diese Weise eben nicht weiter einschränken, weil die Informationen über das porcine Genom noch recht unvollständig sind.

Bei den chromosomal nicht lokalisierten Klonen PK15-PERV-A(58) und PK15-PERV-B(213) wurde eine Positionsbestimmung mit einem somatischen Zellhybrid-Panel (Chevalet et al., 1997) versucht. Die Analyse erbrachte jedoch keine aussagekräftigen Daten, was an exzessiven Rearrangements der chromosomalen Struktur innerhalb der immortalisierten PK15-Zelllinie liegen kann (nicht gezeigt). Desweiteren ist es möglich, daß einzelne provirale Insertionen durch Strangbrüche inaktiviert wurden, auf diese Weise PERV-freie Zellen reinfiziert wurden und sich das „neue“ Virus an einer anderen Stelle integriert hat. Diese Möglichkeit wird durch die Tatsache gestützt, daß U. Krach mehrere Kopien desselben Provirus aus der PK15-Bibliothek isolieren konnte.

4.2.5 Prävalenz von PERV in verschiedenen Schweinerassen

Mit Ausnahme der d/d-Miniaturschweine aus zwei verschiedenen Herden konnten PERV in allen untersuchten Schweinerassen nachgewiesen werden, wobei es je

doch zu starken Schwankungen in der Häufigkeit, sowohl zwischen den untersuchten Proviren als auch bei den Schweinerassen, kommt.

Dies läßt den Schluß zu, daß die bei einer Schweinerasse (hier: „*large white*“ und PK15) klonierten flankierenden Sequenzen zur Reihenuntersuchung („*screening*“) aller Schweinerassen geeignet sind und daß sich die Virusbelastung zumindest seit der Domestizierung der Schweine vor etwa 4000 bis 7000 Jahren nicht grundlegend geändert hat. Während sich die im eurasisch-afrikanischen Raum gezüchteten Schweine vermutlich alle aus einer gemeinsamen (oder zumindest vermischten) Ursprungspopulation entwickelt haben, sind bei Schweinerassen in Australien und Amerika durchaus sog. „*founder*“-Effekte zu beobachten.

Die endemisch in Australien beheimateten „*Westran*“-Schweine stammen von einem einzelnen Schweinepaar ab, daß dort vor etwa 200 Jahren von europäischen Siedlern ausgesetzt wurde (Kim et al., 2002). Diesem Gründerpaar (engl. „*founder*“) fehlte offenbar der Klon PERV-A(Bac-463H12), denn dieser ist in keinem der untersuchten Individuen nachzuweisen.

Noch signifikanter ist der Effekt bei den aus Amerika stammenden Miniaturschweinen zu beobachten. In den durch Inzucht auf einen definierten Haplotypen (hier: d/d) hin gezüchteten Schweine ist kein einziges der replikations-kompetenten Proviren nachzuweisen.

Einige der untersuchten Miniaturschweine wurden als Nicht-Transmitter von PERV beschrieben (Oldmixon et al., 2002), was sich durch die Abwesenheit der replikations-kompetenten Proviren erklären läßt. Da aber einige der Miniaturschweine doch infektiöse Partikel freisetzen (C. Patience, persönliche Kommunikation), muß mindestens ein weiteres Provirus vorhanden sein, das in diesem Fall nicht in der „*large white*“-Bibliothek vorhanden war. Auf Grund dieser heterogenen Verteilung der PERV ist es unbedingt notwendig, einen entsprechend gründlichen Assay bei jeder für die XTx vorgesehenen Herde durchzuführen.

Aus der durchgeführten Untersuchung läßt sich desweiteren entnehmen, daß die Anzahl von PERV insgesamt betrachtet in freilebenden Schweinen (deutsche Wildschweine und „*Westran*“-Schweine, siehe Tabelle 3-6) geringer ist als in industriell gezüchteten Tieren (Tabelle 3-6), was mit dem Befund einer kürzlich erschienenen Publikation übereinstimmt, wonach die Anzahl der Proviren in Inzuchtlinien zunimmt (Mang et al., 2001).

4.2.6 Intravirale Polymorphismen

In Bezug auf intravirale Polymorphismen war vor allem der replikations-defiziente Klon PERV-B(Bac-192B9) von Interesse. Da die Replikationsdefizienz lediglich durch zwei Punktmutationen bewirkt wurde, war die Wahrscheinlichkeit hoch, in einer genügend großen Individuenzahl ein Provirus zu finden, das einen intakten *pol*-Leserahmen besaß.

In der Tat besaß die Mehrheit (8 von 13) der untersuchten Proben ein offenes Leseraster für *pol*, und bei weiteren 4 von 13 Proben war zumindest eine der beiden Punktmutationen revertiert.

Die Beobachtungen legen zwei Schlüsse nahe. Zum einen zeigt die Heterogenität der 13 untersuchten Proben, daß man sich bei der Suche nach replikations-kompetenten Klonen nicht auf eine genomische Quelle verlassen sollte, da die genetische Variabilität gerade von Retroviren außerordentlich hoch ist (Negroni and Buc, 2001a; Negroni and Buc, 2001b). So können bei einer Analyse nicht nur Proviren übersehen werden, die im Probenmaterial nicht vorhanden sind (Kapitel 4.2.5), auch intravirale Variationen können zu falsch negativen Schlußfolgerungen führen. Dies ist besonders dann zu beachten, wenn unterschiedliche Rassen oder ethnische Gruppen (siehe Kapitel 4.4) miteinander verglichen werden sollen.

Auf der anderen Seite könnte die beobachtete Häufung der Stop-Mutationen im *pol*-Leserahmen die beginnende Inaktivierung des Provirus anzeigen. Von den untersuchten chromosomalen Positionen (Tabelle 3-4) sowie bei vielen von Rogel-Gaillard et al. (1999) beschriebenen Positionen handelt es sich um defekte PERV. Dieser Trend zur Inaktivierung der Viren ist aus evolutionären Gründen zu erwarten, vor allem wenn man HERV betrachtet (Leib-Mösch et al., 1993; Mayer et al., 1997; Mayer et al., 1998). Da dieser Prozeß mit Mutationen in der Polymerase beginnt, ist nachvollziehbar, da Störungen an dieser Position direkt mit der viralen Replikation interferieren und daher am wenigsten toleriert werden können (Negroni and Buc, 2001a).

4.2.7 Bedeutung der Isolation nativer PERV-Sequenzen

Die Übertragung von PERV auf NOD/SCID-Mäuse nach Transplantation porciner Zellen zeigt, daß im Rahmen einer XTx bei starker Immunsuppression durchaus eine Infektionsgefahr von PERV ausgeht (Van der Laan et al., 2000). Die Charakterisierung von replikations-kompetenten Proviren und die Bestimmung ihrer Integrationsorte im porcinen Genom kann dazu genutzt werden, PERV-freie bzw. PERV-arme Schweine zu züchten und den Zuchterfolg diagnostisch zu überprüfen.

Desweiteren sind nun 6 distinkte, replikations-kompetente Proviren bekannt (Krach et al., 2001; Niebert et al., 2002), so daß sich die Gesamtzahl, die wahrscheinlich nur geringfügig darüber liegt, besser abschätzen läßt.

4.3 Phylogenetische Untersuchung von PERV

4.3.1 Verwandtschaftsbeziehungen zwischen C-Typ-Retroviren

Der Sequenzvergleich der Vollängen-Genome von verschiedenen PERV mit anderen Vollängen-Genomen von C-Typ-Retroviren dient der Einordnung von PERV in den Kontext der gamma-Retroviren. Das bestimmende Strukturmerkmal der PERV ist nicht in erster Linie ihr Hüllprotein, von dem es drei Klassen (A, B, C) gibt, sondern die Struktur ihrer LTR.

Mit Ausnahme von KoRV, welches hier die „*outgroup*“ stellt, ist PERV mit allen anderen C-Typ-Retroviren etwa gleich nah verwandt, wobei die Homologien bei etwa 60% liegen.

Daraus läßt sich schließen, daß PERV unabhängig von den anderen Viren entstanden sein muß, oder daß ein gemeinsamer Ursprung schon sehr weit zurück liegt.

4.3.2 „Altersbestimmung von PERV

In nahezu allen bisher untersuchten Genomen kommen Transitionen ($T \leftrightarrow C$, $A \leftrightarrow G$) mit deutlich höherer Frequenz vor als Transversionen ($T \leftrightarrow A$, $T \leftrightarrow G$, $C \leftrightarrow A$, $C \leftrightarrow G$) (Wakeley, 1994; Wakeley, 1996b). Während das Transition/Transversion- (s/v)-Bias bei nukleärer DNA vernachlässigt werden kann, muß es bei sich unabhängig entwickelnden Sequenzen wie mitochondrialer DNA oder Proviren berücksichtigt werden (Wakeley, 1996a). Hinzu kommt, daß sich mit zunehmendem zeitlichen Abstand zwischen der Divergenz zweier Sequenzen die Wahrscheinlichkeit einer zweiten Substitution an einer beliebigen Nukleotidposition erhöht, wodurch der Anstieg der gezählten Sequenzunterschiede verlangsamt wird. Hierdurch wird das einfache Zählen der Sequenzunterschiede als Methode zur Alterbestimmung zu einem unzuverlässigen Werkzeug, und die Verlangsamung muß auf die eine oder andere Weise korrigiert werden. Bei retroviralen Sequenzen hat sich für diese Korrektur das Tamura-Nei-Modell etabliert (Tamura and Nei, 1993).

Die Abschätzung der s/v-Ratio ist notwendig, um eine verlässliche Abschätzung von Sequenzabständen und phylogenetischen Rekonstruktionen zu erhalten. Da Transitionen und Transversionen mit zunehmender Divergenz der Sequenzen linear ansteigen und Transitionen häufiger vorkommen als Transversionen, steigen im s/v-

Plot Transitionen steiler an als Transversionen. Im Falle einer Substitutionssättigung, d.h. wenn multiple Substitutionen pro Nukleotidposition stattgefunden haben, degradiert das phylogenetisch auswertbare Signal langsam. Dieser Zustand ist dadurch detektierbar, dass die Anzahl der Transversionen langsam die der Transitionen übersteigt. Somit zeigen die s/v-Plots in Abbildung 3-22, daß keine Substitutionssättigung stattgefunden hat und die untersuchten PERV-Sequenzen anhand des „*molecular clock*“-Modells datiert werden können.

Während der s/v-Plot für die Hüllprotein-Gene (Abbildung 3-22 B) einen linearen Verlauf über die gesamte phylogenetische Distanz aufweist, zeigt der s/v-Plot der LTR-Sequenzen eine deutliche Unterbrechung (Abbildung 3-22 A II). Diese Lücke erklärt sich durch das Vorkommen der unterschiedlichen „*repeat*“-Strukturen bei den PERV-LTRs. In den meisten Nukleotidpositionen weichen die LTRs nur durch einzelne Punktmutationen voneinander ab (Abbildung 3-22 A I). Berücksichtigt man jedoch die „*repeats*“, so steigt die beobachtete phylogenetische Distanz sprunghaft an (Abbildung 3-22 A III).

Die Feststellung, daß PERV sich entsprechend einer „*molecular clock*“ entwickelt, erlaubt es, neben den LTR-Sequenzvergleichen auch die Analyse der viralen Proteine zur Datierung heranzuziehen. Da diese Methode aber wegen der fehlenden internen Referenz einen auf z.B. archäologischen Datierungen basierenden Fixpunkt benötigt, kann diese Methode hier nur zur relativen Altersabschätzung genutzt werden. Die in Abbildung 3-23 dargestellte Analyse bestätigt dabei jedoch den Befund des LTR-Sequenzvergleichs, nachdem Proviren mit „*repeat*“-loser LTR phylogenetisch jünger sind als solche, deren LTR das PERV-typische „*repeat*“-Motiv besitzen.

Der für diese Datierung benötigte externe Fixpunkt kann z.B. durch Analyse von PERV-Sequenzen der Pekari (Tayassuidae, Abbildung 4-1) ermittelt werden. Da der Zeitraum, in dem sich Suidae und Tayassuidae getrennt haben, aus archäologischen Ausgrabungen annähernd bekannt ist (vor $\sim 7,4 \times 10^6$ Jahren), wäre damit das Alter von PERV näherungsweise zu bestimmen.

Da in Pekari keine PERV-Sequenzen nachzuweisen sind (Daten nicht gezeigt), kann daraus geschlossen werden, daß sich PERV erst nach der Trennung der beiden Ordnungen ausschließlich in den eurasischen Suidae verbreitet hat. Da der Zeitraum der Trennung der beiden Ordnungen mit dem ältesten für PERV in der LTR-Sequenzanalyse ermittelten Alter ($7,6 \times 10^6$ Jahre, Tabelle 3-8) koinzidiert, könnte man spekulieren, daß das Auftreten von PERV diese Trennung bewirkt hat.

Betrachtet man die Verbreitung der Schweine (Unterordnung Suidae, Abbildung 4-1), so liegen die Ursprünge in Südostasien, woher sie sich vor etwa 7000 Jahren zusammen mit menschlichen Zivilisationen als Nutzvieh oder Kulturfolger entlang der menschlichen Handelswege über Vorderasien bis nach Afrika und Europa ausgebreitet haben.

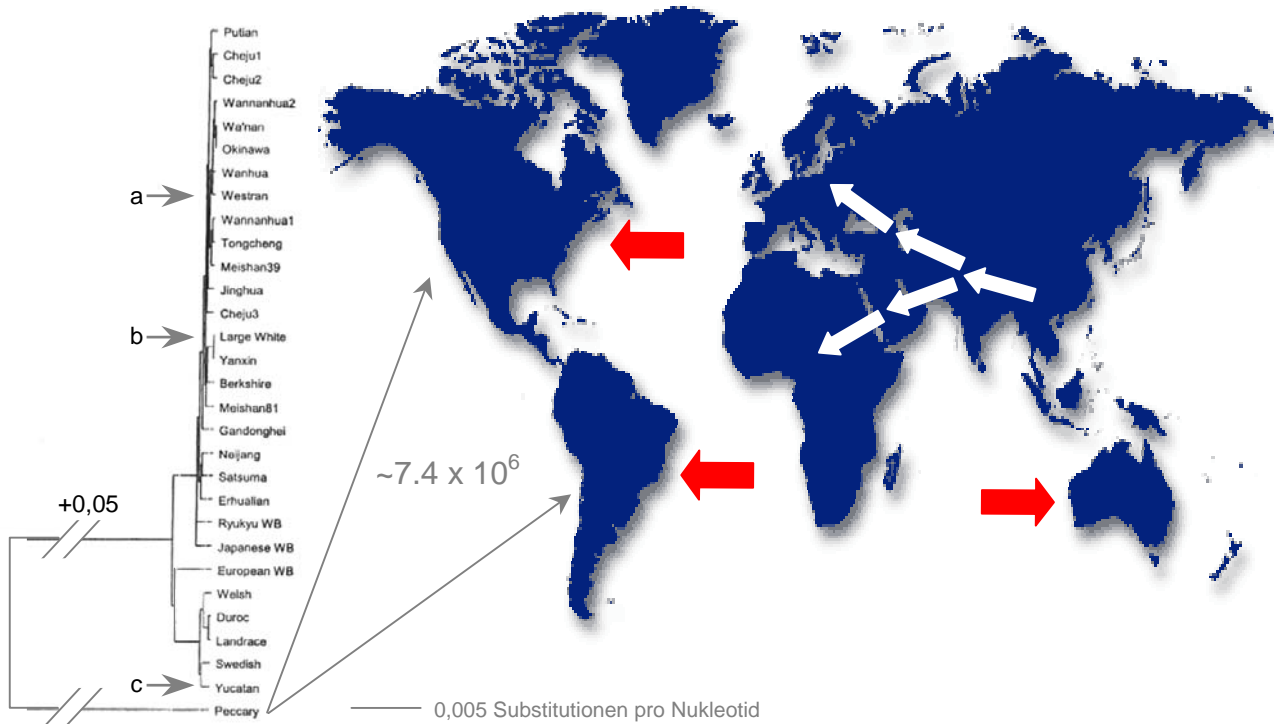


Abbildung 4-1 Stammbaum der Suidae (Schweine) und ihre geographische Verbreitung

Im phylogenetischen Stammbaum auf Grundlage des mitochondrialen DNA-D-Loops (Kim et al., 2002) sind die in dieser Arbeit untersuchten Schweinesubspezies durch Pfeile (a, b, c) gekennzeichnet.

Auf der Weltkarte sind die Wanderungsbewegungen der Suidae, ausgehend von Südostasien, durch weiße Pfeile gekennzeichnet, während rote Pfeile die Ansiedlung von Schweinen durch den Menschen in neuen Habitaten während der Kolonialisierung der vorigen Jahrhunderte anzeigen.

Die in (Süd-)Amerika lebenden Pekari sind die nächsten Verwandten der Suidae, entwickeln sich aber schon seit $7,4 \times 10^6$ Jahren getrennt.

Artiodactyla -> Suiformes -> Suidae -> *Sus spp.*

Artiodactyla -> Suiformes -> Tayassuidae -> *Pecari spp.*

Schweine kommen auf den amerikanischen und australischen Kontinenten nicht nativ vor, sondern wurden erst von europäischen Siedlern im Laufe der kolonialen Entdeckungsreisen ab dem 15. Jahrhundert dort angesiedelt. Abgesehen von industriellen Großzuchten können viele Schweineherden in Amerika oder Australien (siehe „Westran“-Schweine) deshalb als endemische Ableger ihrer eurasischen Vorfahren angesehen werden.

Die nächsten Verwandten der Schweine sind die (süd-)amerikanischen Pekari (Unterordnung Tayassuidae), die sich vor etwa 10 Millionen Jahren von den Schweinen abgespalten haben.

Der phylogenetische Vergleich anhand des mitochondrialen DNA-D-Loops in Abbildung 4-1 (Kim et al., 2002) zeigt, daß alle Rassen dieser eurasischen Schweine sehr eng miteinander verwandt sind, wohingegen die Pekari eine sehr große phylogenetische Distanz aufweisen.

Die enge phylogenetische Verwandtschaft der verschiedenen eurasischen Subspezies macht plausibel, warum die vom „*large white*“-Genom abgeleiteten chromosomalen Sequenzen der Proviren zum proviralen Nachweis auch in anderen Subspezies genutzt werden konnten (Abbildung 4-1 a,b). Dahingegen kann das Fehlen der Proviren in den d/d-Miniaturschweinen (Abbildung 4-1 c, dort als Yucatan bezeichnet) auf zweierlei Weise gedeutet werden. Die Miniaturschweine (Yucatan) besitzen die größte phylogenetische Distanz zu allen anderen eurasischen Subspezies. Das Fehlen der replikations-kompetenten PERV könnte also ein natürliches Phänomen darstellen oder durch glückliche Auswahl der Gründertiere und wiederholte Inzucht bedingt sein. Andererseits mag die geringere Verwandtschaft verhindern, daß die von den chromosomalen Flanken abgeleiteten Sequenzen sinnvoll zum Provirus-Nachweis genutzt werden können. Dagegen spricht jedoch die Tatsache, daß andere Strukturgene (ARF-3, Abbildung 3-18) nachgewiesen werden können und daß eine Veränderung von gleichzeitig sechs Loci sehr unwahrscheinlich ist.

4.4 Polymorphismen von HERV-K(C7)

Obwohl mehrere Vollängensequenzen von HERV-K im menschlichen Genom nachgewiesen werden konnten (Ono et al., 1986; Tönjes et al., 1999; Mayer et al., 1999; Mayer, 2001), konnte die Funktionalität und Replikations-Kompetenz dieser Viren bisher nicht nachgewiesen werden. Allerdings konnte die in Teratokarzinomazelllinien zu beobachtende Partikelbildung auf HERV-K zurück-geführt (Boller et al., 1993) und die transkriptionelle Aktivität von HERV-K in diesen Zellen anhand des komplexen Spleißmusters nachgewiesen werden (Löwer et al., 1993). Rekombinante HERV-K-Proteine wie Protease und Integrase (Schommer et al., 1996; Kitamura et al., 1996) sowie reverse Transkriptase und RNase H (Berkhout et al., 1999) zeigten *in vitro* enzymatische Aktivität, so daß prinzipiell funktionale Proteine auch im humanen Genom kodiert sind. Der Nachweis, daß transkriptionelle Aktivität auch in PBMCs gesunder Individuen nachweisbar ist (Medstrand et al., 1992) und daß gegen HERV-K-

Proteine gerichtete Antikörper bei verschiedenen Krebspatienten nachgewiesen wurden (Andersson et al., 1996), läßt darauf schließen, daß biologisch aktive Vertreter von HERV-K existieren.

Die verschiedenen im Genom des Menschen vorkommenden HERV-Loci werden unabhängig von ihrer Kodierungskapazität mit Suszeptibilitäten für verschiedene Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht (Kambhu et al., 1990; Stauffer et al., 2001). Am verbreitetsten ist dabei die Korrelation mit juvenilem Diabetes mellitus, aber auch das Basedow-Syndrom, rheumatoide Arthritis und andere Erkrankungen werden im Zusammenhang mit HERV genannt. Eine konkrete Verbindung zwischen Erkrankung und Virus konnte jedoch noch nicht nachgewiesen werden. Sind aber bestimmte Virusallele vorhanden, so steigt statistisch signifikant das Risiko, an einer mit diesem Allel korrelierten Erkrankung zu leiden.

Die hier untersuchte Kopie von HERV-K weist eine Mutation in der Polymerase auf, die das für die Funktionalität des Enzyms essentielle Sequenzmotiv YXDD auf Grund einer Punktmutation in CIDD verwandelt (Tönjes et al., 1999). Das Vorkommen des Sequenzmotivs YXDD ist für alle bisher als funktional beschriebenen reversen Transkriptasen beschrieben worden (Larder et al., 1987; Xiong and Eickbush, 1988; Poch et al., 1989) und der funktionale Defekt der HERV-K-RT wurde anhand rekombinanter Proteine nachgewiesen (Berkhout et al., 1999).

Obwohl weder Ono et al. (1986) noch Mayer et al. (1999) in ihren Arbeiten Variationen des *pol*-Gens beschrieben haben, war die Wahrscheinlichkeit, in einer genügend großen Individuenzahl allelische Varianten des YXDD/CIDD-Motivs zu finden, recht groß.

Während in kaukasischen Proben nur ein aus 24 (Tabelle 3-9) Sequenzmotiven (CIDD → YIDD) intakt nachgewiesen werden konnte, kam die allelische Variation mit signifikanter Häufung heterozygoter Kopien des YIDD-Motivs in ethnischen Gruppen asiatischer bzw. afrikanischer Herkunft vor (6 aus 8 Proben, Tabelle 3-9).

Eine Sequenzierung des *gag-pol*-Bereichs einiger der YIDD-Proben ergab übereinstimmende Homologien mit der beschriebenen Sequenz.

5 Gefahrenabschätzung von PERV im Rahmen einer möglichen therapeutischen XTx

Eine Aussage, ob PERV in einer therapeutischen XTx ein Risiko darstellt, läßt sich heute noch nicht abschließend beantworten, da viele entscheidende Fragen noch offen sind. Deshalb möchte ich an dieser Stelle versuchen, eine Sicherheitsabschätzung auf dem momentanen Wissensstand durchzuführen.

Da es sich bei PERV um Retroviren handelt, sind drei mögliche Sicherheitsrisiken in Betracht zu ziehen:

1. PERV löst in seinem neuen Wirt eine Krankheit aus, deren Mechanismus bisher verborgen geblieben ist.
2. PERV integriert in das Wirtsgenom und führt mittels Insertionsmutagenese zur malignen Entartung der Wirtszelle und schließlich zur Tumorentstehung.
3. PERV rekombiniert mit anderen exo- oder endogenen Viren des neuen Wirtes. Ein solcher Vorgang kann wiederum zu einer unter (1.) beschriebenen Situation führen.

Wie beschrieben sind PERV in der Lage, auf humanen Zellen zu replizieren und sich an neue Wirtszellen anzupassen (Scheef et al., 2001). Diese Aussage trifft dabei aber nur auf die PERV zu, die in ihrer LTR eine dezidierte „repeat“-Struktur aufweisen, nicht aber auf die „repeat“-losen PERV (Scheef et al., 2001). Da die „repeat“-tragenden PERV bereits im porcinen Genom vorkommen (Krach et al., 2001; Niebert et al., 2002), stellt nicht die „repeat“-Struktur an sich, sondern nur die Variation der „repeat“-Anzahl eine Adaptation an den neuen xenogenen Wirt dar (Scheef et al., 2001; Scheef et al., 2002).

Während eine bisher unbeobachtete Krankheit reine Spekulation ist (PERV ist weder pathogen in seinem natürlichen Wirt, noch gibt es irgendwelche Berichte über ungewöhnliche Erkrankungen in der langen Geschichte der Koevolution von Mensch und Schwein), sind die beiden anderen Risikofaktoren bei anderen Erregern schon beobachtet worden und somit als potentiell gefährlich einzuschätzen.

PERV zählt, da es für kein virales Onkogen kodiert, zu den nicht-akut transformierenden Retroviren, d.h., PERV kann, wie im Prinzip alle Retroviren, durch Integration seiner Erbinformation in das Genom der Wirtszelle diese transformieren, was wiederum auf zwei Wegen geschehen kann. Zum einen kann der Integrationsvorgang an sich zelluläre Leserahmen disruptieren und auf diese Weise zur Entartung der Zelle führen (Yoder et al., 1997) oder virale Spleißorte in das Wirtsgenom einführen,

so daß falsch gespleißte Genprodukte mit fehlerhafter oder neuer Funktion entstehen (Löwer, 1999). Der zweite denkbare Mechanismus wird als Promotor-Insertion bezeichnet und stellt zelluläre Protoonkogene nach der viralen Insertion unter die Kontrolle des viralen Promotors, wobei die Pathogenität des Virus durch Stärke und Gewebespezifität des viralen Promotors beeinflusst wird (Gisselbrecht et al., 1987; Maeda and Kim, 1990; Girard et al., 1996).

Die Rekombination onkogener Viren mit endogenen oder anderen exogenen Sequenzen wurde bereits mehrfach beschrieben (Yoder et al., 1997; Löwer, 1999) und im murinen Modell, wo dieser Vorgang zur Ausbildung hochpathogener Varianten geführt hat, ausführlich untersucht (Coffin, 1996a; Coffin, 1996b).

Der Austausch von LTR-Sequenzen könnte bei einer solchen Rekombination zu einer Veränderung der transkriptionellen Aktivität führen, während der Austausch von *env*-Sequenzen zu einem verändertem Rezeptorgebrauch führen könnte. Letzteres hätte möglicherweise einen erweiterten Wirts- und/oder Gewebetropismus zur Folge (Löwer, 1999).

Erst kürzlich wurden ausgedehnte Rekombinationsereignisse zwischen *env*-Genen der beiden polytropen PERV-Klassen in „*Westran*“-Schweinen beschrieben. Obwohl es sich hier um homologe Rekombinationen handelt, mögen heterologe Rekombinationen zwischen PERV und anderen Viren nun wahrscheinlicher erscheinen (Lee et al., 2002).

Bei der Gefahrenabschätzung ist jedoch zu bedenken, daß PERV in seinem natürlichen Wirt funktionell, aber transkriptionell aktiv ist (Patience et al., 1997) und daß Menschen präformierte, gegen spezifische porcine Zuckerreste gerichtete xenoreaktive Antikörper besitzen, die zu einer schnellen Inaktivierung freigesetzter PERV führen (Dorling et al., 1997). Relevant werden die geschilderten Sicherheitsbedenken also erst, wenn gentechnisch veränderte Schweine als Organspender eingesetzt werden, die so verändert wurden, um die natürlichen Abwehrmechanismen zu umgehen (Sandrin and McKenzie, 1994; Kaiser, 2002; Lai et al., 2002; Costa et al., 2002b; Diamond et al., 2002; Dai et al., 2002).

Desweiteren scheint es durch die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse möglich zu sein, replikations-kompetente PERV aus einer Herde durch Züchtung zu entfernen oder direkt Schweinespezies für die XTx auszuwählen, die eine natürliche geringe Belastung mit PERV aufweisen. In diesem Fall blieben nur noch die defekten bzw. solitären PERV-Leserahmen über, so daß die Insertionsmutagenese ebenso

wie „neue“ Krankheiten als Risikofaktoren ausgeschlossen werden können. Das weiterhin bestehende Risiko, insbesondere der heterologen Rekombination setzt nun allerdings ein humanes Pathogen voraus, daß in der Lage ist, porcine Zellen zu infizieren, um dort mit endogenen porcinen Sequenzen zu rekombinieren. Zumindest für den Fall von HERV wurde bis heute kein replikations-kompetentes Provirus beschrieben.

6 Zusammenfassung

Fest ins Genom integrierte und durch Vererbung (vertikal) weitergegebene endogene Retroviren stellen ein Risiko im Rahmen einer therapeutischen Übertragung von tierischen Zellen, Geweben oder Organen auf den Menschen dar. Bei Verwendung der als Spender bevorzugten Schweine sind zwei Klassen von C-Typ-Retroviren (PERV) bekannt, die zumindest *in vitro* humane Zellen infizieren können. Deshalb sind eine molekulare Kenntnis und eine genetische bzw. immunologische Kontrolle dieser Viren zur Vermeidung einer potentiellen Infektion von Xenotranplantatempfängern wünschenswert.

Die Analyse einer genomischen Bibliothek des „*large white*“-Schweins führte zur Charakterisierung von vier nativen proviralen Vollängensequenzen, von denen drei in der Lage sind, auf humanen Zellen zu replizieren, während ein Provirus zwei Stop-Mutationen im Polymerase-Gen trägt. Die Klone PERV-A(Bac-130A12), PERV-A(Bac-151B10) und PERV-A(Bac-463H12) gehören zur Klasse A, der Klon PERV-B(Bac-192B9) wird der Klasse B zugeordnet. Alle vier Klone weisen hohe Homologien zu bereits beschriebenen Sequenzen (Czauderna et al., 2000; Krach et al., 2001) auf, sind mit diesen jedoch nicht identisch. Die Bestimmung der flankierenden genomischen Sequenzen ermöglicht den spezifischen Nachweis der Proviren in genomischer DNA und zeigt, daß die vom „*large white*“-Schwein abgeleiteten Sequenzen zur Untersuchung verschiedener Schweinerassen geeignet sind. Desweiteren konnte gezeigt werden, daß die im Klon PERV-B(Bac-192B9) beobachteten Punktmutationen in einigen der untersuchten Individuen revertiert sind. Die Untersuchung von 86 einzelnen Proben aus 5 verschiedenen Rassen zeigt eine sehr heterogene Verteilung der PERV und würde damit eine Züchtung (in Bezug auf replikationskompetente Viren) PERV-freier Schweine ermöglichen. Dies erübrigt sich aber durch die Tatsache, das Miniaturschweine des d/d-Haplotyps für die getesteten Proviren bereits negativ sind. Faßt man die vier hier und die in der Literatur beschriebenen Proviren (Czauderna et al., 2000; Krach et al., 2001) zusammen, scheinen von den etwa 30-50 Integrationsorten im porcinen Genom (LeTissier et al., 1997; Patience et al., 1997) zwischen sechs und zehn¹¹ replikations-kompetente Proviren zu enthalten.

¹¹ Während sechs replikations-kompetente Proviren im porcinen Genom beschrieben wurden (Krach et al., 2001; Niebert et al., 2002), berichtet C. Patience von mindestens einem siebten unbekanntem Provirus (vergleiche Kapitel 4.2.5). Desweiteren zeigt die vorliegende Arbeit die heterogene Verteilung der PERV, so daß weitere Proviren in bisher nicht untersuchtem genomischen Material gefunden werden könnten. Dieser Tatsache wird durch die Angabe von bis zu möglicherweise zehn replikations-kompetenten Proviren Rechnung getragen.

Für den Fall, daß bei einer XTx Partikel freigesetzt werden, geben die Versuche mit den Pseudotypvektoren Hinweise darauf, daß eine Infektion schon nach wenigen Minuten stattfinden kann und damit auch nach einer raschen Entfernung des Organs persistieren könnte. Diese freigesetzten Partikel lassen sich aber durch Antikörper neutralisieren, so daß es möglich erscheint, Patienten sowie deren Ärzte und Kontaktpersonen zu impfen, um einer potentiellen Infektion vorzubeugen.

Darüber hinaus scheinen die phylogenetisch jüngeren Viren mit der „*repeat*“-losen LTR die Fähigkeit verloren zu haben, xenotrop Zellen zu infizieren, da Proviren mit dieser LTR-Struktur weder aus einer 293-PERV-PK-Bibliothek isoliert werden konnten (Czuderna et al., 2000), noch konnten solche Elemente in genomischer DNA dieser Zelllinie nachgewiesen werden.

Mit der Untersuchung des Infektionsverhaltens von PERV und durch die Möglichkeit, in der XTx verwendete Schweine auf die Präsenz replikations-kompetenter PERV hin zu testen und die chromosomal lokalisierten Proviren eventuell durch Züchtung zu entfernen, leistet die vorliegende Arbeit einen Beitrag dazu, zukünftige Xenotransplantationen in virologischer Hinsicht sicherer zu machen.

7 Abkürzungsverzeichnis

Ψ	retrovirales Verpackungssignal
Aminosäuren	
Ala, A	Alanin
Arg, R	Arginin
Asn, N	Asparagin
Asp, D	Asparaginsäure
Cys, C	Cystein
Glu, E	Glutamat
Gln, Q	Glutamin
Gly, G	Glycin
His, H	Histidin
Ile, I	Isoleucin
Leu, L	Leucin
Lys, K	Lysin
Met, M	Methionin
Phe, F	Phenylalanin
Pro, P	Prolin
Ser, S	Serin
Thr, T	Threonin
Trp, W	Tryptophan
Tyr, Y	Tyrosin
Val, V	Valin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection (http://www.atcc.org)
BAC	bakterielles artifizielles Chromosom
BaEV	„Baboon Endogenous Retrovirus“
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin („ <i>bovine serum albumin</i> “)
CA	Kapsidprotein („ <i>capsid</i> “)
d	Tag („ <i>day</i> “)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („ <i>desoxyribonucleic acid</i> “)
DXR	verzögerte Abstoßungsreaktion („ <i>delayed xenograft rejection</i> “)
E(A)	Env der Klasse A
E(B)	Env der Klasse B
ECACC	European Collection of Cell Cultures (http://www.ecacc.org.uk)
ECL	verstärkte („ <i>enhanced</i> “) Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymabsorptionstest („ <i>enzyme linked immuno sorbent assay</i> “)
Env	Oberflächenmolekül der Retroviren („Envelope“)
<i>env</i>	für das Oberflächenmolekül Env kodierendes Gen
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERV	endogenes Retrovirus
Fa.	Firma
FeLV	„Feline Leukaemia Virus“
FKS	Fötale Kälberserum

g	Erdbeschleunigung (Gravitation)
Gag	gruppenspezifisches Antigen der Retroviren
<i>gag</i>	für das gruppenspezifische Antigen kodierendes Gen
GaLV	„Gibbon Leukaemia Virus“
GFP	grünfluoreszierendes Protein
h	Stunde („ <i>hour</i> “)
HAR	hyperakute Abstoßungsreaktion
HERV	humanes endogenes Retrovirus
His	Histidin
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HRP	Meerrettich Peroxidase („ <i>horseradish peroxidase</i> “)
HTLV	humanes T-lymphotropes Virus
IF	Immunfluoreszenz
IN	Integrase
<i>in</i>	für die Integrase IN kodierendes Gen
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KoRV	„Koala Retrovirus“
LINE	„ <i>long interspersed nuclear elements</i> “
LTR	long terminal repeat
MA	Matrixprotein
min	Minute
MLV	murines Leukämievirus
NC	Nukleokapsidprotein („ <i>nucleocapsid</i> “)
neo	Gen des Resistenzmarkers Neomycin
NSP	Gemisch aus Neomycin, Streptomycin, Penicillin
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen („ <i>open reading frame</i> “)
p.i.	post Infektion
p.t.	post Transfektion
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Pimerbindungsstelle („ <i>primer binding site</i> “)
PBS	phosphatgepufferte Saline („ <i>phosphate buffered saline</i> “)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („ <i>polymerase chain reaction</i> “)
PERV	porcines endogenes Retrovirus
pfu	Einheit des Virustiters („ <i>plaque forming unit</i> “)
Pol	Polymerase bzw. reverse Transkriptase
<i>pol</i>	für die reverse Transkriptase kodierendes Gen
PPT	Polypurintrakt
Pro	Protease
<i>pro</i>	für die Protease kodierendes Gen
PTT	Protein Truncation Test
QPF	qualifiziert pathogenfrei
RCA	komplement-regulatorische Proteine („ <i>regulator of complement activity</i> “)
RNA	Ribonukleinsäure („ <i>ribonucleic acid</i> “)
mRNA	Boten-RNA („ <i>messenger RNA</i> “)
RSV	Rous-Sarkoma-Virus
RT	reverse Transkriptase

s	Sekunde
s.o. / s.u.	siehe oben / siehe unten
SCID	schwere kombinierte Immunschwäche („ <i>severe combined immunodeficiency</i> “)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SINE	„ <i>short interspersed nuclear elements</i> “
SLA	Schweine Leukozytenantigen
SN	Überstand („ <i>supernatant</i> “)
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus („ <i>single nucleotide polymorphism</i> “)
SPF	spezifisch pathogenfrei
SSC	Natriumcitrat („ <i>saline sodium citrate</i> “)
SU	Oberflächenanteil des Env („ <i>surface</i> “)
TAE	TRIS-Essigsäure-EDTA
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TCID ₅₀	„ <i>tissue culture infectious dose, 50%</i> “
TEMED	N,N,N,N-tetramethylethyldiamin
TM	transmembraner Anteil des Env
TM-EM	Transmissionselektronenmikroskopie
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tx	Transplantation
U	Einheit („ <i>unit</i> “)
UTR	nicht-translatierte („ <i>untranslated</i> “) Region
vs	versus
w/o	Ohne („ <i>without</i> “)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactosid
XNA	xenoreaktive natürliche Antikörper
XTx	Xenotransplantation

8 Literaturverzeichnis

- ACHA-ORBEA, H., SHAKHOV, A. N., SCARPELLINO, L., KOLB, E., MULLER, V., VESSAZ-SHAW, A., FUCHS, R., BLOCHLINGER, K., ROLLINI, P., BILLOTTE, J., and ET AL. (1991). Clonal deletion of V beta 14-bearing T cells in mice transgenic for mammary tumour virus. *Nature* **350**(6315), 207-211.
- AKIYOSHI, D. E., DENARO, M., ZHU, H., GREENSTEIN, J. L., BANERJEE, P., and FISHMAN, J. A. (1998). Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine. *J. Virol.* **72**, 4503-4507.
- ANDERSSON, A. C., MERZA, M., VENABLES, P., PONTEN, F., SUNDSTROM, J., COHEN, M., and LARSSON, E. (1996). Elevated levels of the endogenous retrovirus ERV3 in human sebaceous glands. *J Invest Dermatol* **106**(1), 125-128.
- ARCENAS, R., and WIDEN, R. H. (2002). Epstein-Barr virus reactivation after superinfection of the BJAB-B1 and P3HR-1 cell lines with cytomegalovirus. *BMC Microbiol* **2**(1), 20.
- ARMBRUESTER, V., SAUTER, M., KRAUTKRAEMER, E., MEESE, E., KLEIMAN, A., BEST, B., ROEMER, K., and MUELLER-LANTZSCH, N. (2002). A novel gene from the human endogenous retrovirus k expressed in transformed cells. *Clin Cancer Res* **8**(6), 1800-1807.
- ARMSTRONG, J. A., POTTERFIELD, J. S., and DEMADRID, A. T. (1971). C-type virus particles in pig kidney cell lines. *J. Gen. Virol.* **10**, 195-198.
- ARVIDSSON, A. K., SVENSSON, A. C., WIDMARK, E., ANDERSSON, G., RASK, L., and LARHAMMAR, D. (1995). Characterization of three separated exons in the HLA class II DR region of the human major histocompatibility complex. *Hum Immunol* **42**(3), 254-264.
- AYALA, F. J., and FITCH, W. M. (1997). Genetics and the origin of species: an introduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(15), 7691-7697.
- BACH, F. H., ROBSON, S. C., WINKLER, H., FERRAN, C., STUHLMEIER, K. M., WRIGHTON, C. J., and HANCOCK, W. W. (1995). Barriers to xenotransplantation. *Nat Med* **1**(9), 869-873.
- BAILEY, L. L., NEHLSSEN-CANNARELLA, S. L., CONCEPCION, W., and JOLLEY, B. W. (1985). Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate. *JAMA* **254**, 3321-3329.
- BAKER, D. M. (1994). Cryonic preservation of human bodies -- a call for legislative action. *Dickinson Law Rev* **98**(4), 677-711.
- BALTIMORE, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase4 in virions of RNA tumor viruses. *Nature Med* **226**, 1209-1211.
- BALTIMORE, D. (1985). Retroviruses and retrotransposons: the role of reverse transcription in shaping the eukaryotic genome. *Cell* **40**, 481-482.
- BARRÉ-SINOSSI, F., CHERMANN, J. C., REY, F., NUGEYRE, M. T., CHAMARET, S., GRUEST, J., DAUGUET, C., AXLER-BLIN, C., VÉZINET-BRUN, F., ROUZIOUX, C., ROSENBAUM, W., and MONTAGNIER, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871.
- BARTOSCH, B., WEISS, R. A., and TAKEUCHI, Y. (2002). PCR-based cloning and immunocytological titration of infectious porcine endogenous retrovirus subgroup A and B. *J Gen Virol* **83**(Pt 9), 2231-2240.
- BERGELSON, J. M., CHAN, M., SOLOMON, K. R., ST JOHN, N. F., LIN, H., and FINBERG, R. W. (1994). Decay-accelerating factor (CD55), a

- glycosylphosphatidylinositol- anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(13), 6245-6249.
- BERKHOUT, B., JEBBINK, M., and ZSIROS, J. (1999). Identification of an active reverse transcriptase enzyme encoded by a human endogenous HERV-K retrovirus. *J Virol* **73**(3), 2365-2375.
- BLOND, J. L., BESEME, F., DURET, L., BOUTON, O., BEDIN, F., PERRON, H., MANDRAND, B., and MALLET, F. (1999). Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *J Virol* **73**(2), 1175-1185.
- BOBKOVA M., STITZ J., ENGELSTADTER M., CICHUTEK K., BUCHHOLZ C. J. (2002). Identification of R-peptides in envelope proteins of C-type retroviruses. *J Gen Virol* **83**(9), 2241-2246.
- BOEKE, J. D., and STOYE, J. P. (1997). Retrotransposons, endogenous retroviruses and the evolution of retroelements. In "Retroviruses" (J. M. Coffin, S. H. Hughes, and H. E. Varmus, Eds.), pp. 343-436. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- BOLLER, K., KONIG, H., SAUTER, M., MUELLER-LANTZSCH, N., LOWER, R., LOWER, J., and KURTH, R. (1993). Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV. *Virology* **196**(1), 349-3453.
- BOSCH, S., ARNAULD, C., and JESTIN, A. (2000). Study of full-length porcine endogenous retrovirus genomes with envelope gene polymorphism in a specific-pathogen-free Large White swine herd. *J Virol* **74**(18), 8575-8581.
- BRATTHAUER, G., and FANNING, T. F. (1992). Active LINE-1 retrotransposons in human testicular cancer. *Ocogene* **7**, 507-510.
- BREESE, S. S., JR. (1970). Virus-like particles occurring in cultures of stable pig kidney cell lines. Brief report. *Arch Gesamte Virusforsch* **30**(4), 401-404.
- BROSIUS, J. (1991). Retroposons - Seeds of Evolution. *Science* **251**, 753.
- CHEVALET, C., GOUZY, J., and SANCRISTOBAL-GAUDY, M. (1997). Regional assignment of genetic markers using a somatic cell hybrid panel: a WWW interactive program available for the pig genome. *Comput Appl Biosci* **13**(1), 69-73.
- CHRISTODOULOPOULOS, I., and CANNON, P. M. (2001). Sequences in the cytoplasmic tail of the gibbon ape leukemia virus envelope protein that prevent its incorporation into lentivirus vectors. *J Virol* **75**(9), 4129-4138.
- CLEMENCEAU, B., JEGOU, D., MARTIGNAT, L., and SAI, P. (2002). PERV infection of mouse and human cells by SPF pig islets in nude mice. *Diabetologia* **45**(6), 914-923.
- COFFIN, J. M. (1984). Endogenous viruses. 2nd ed. In "RNA tumor viruses" (R. Weiss, N. Teich, H. Varmus, and J. Coffin, Eds.), pp. 1109-1203. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- COFFIN, J. M. (1992). Structure and classification of retroviruses. In "The retroviridae" (J. A. Levy, Ed.). Plenum, New York.
- COFFIN, J. M. (1996a). HIV viral dynamics. *Aids* **10 Suppl 3**, 75-84.
- COFFIN, J. M. (1996b). The scoop on HIV mutations. *J Int Assoc Physicians AIDS Care* **2**(7), 45.
- CORNETTA, K., and ANDERSON, W. F. (1989). Protamine sulfate as an effective alternative to polybrene in retroviral-mediated gene-transfer: implications for human gene therapy. *J Virol Methods* **23**(2), 187-194.

- COSSET, F. L., TAKEUCHI, Y., BATTINI, J. L., WEISS, R. A., and COLLINS, M. K. (1995). High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J Virol* **69**(12), 7430-7436.
- COSTA, C., BARBER, D. F., and FODOR, W. L. (2002a). Human NK cell-mediated cytotoxicity triggered by CD86 and Gal alpha 1,3- Gal is inhibited in genetically modified porcine cells. *J Immunol* **168**(8), 3808-3816.
- COSTA, C., ZHAO, L., BURTON, W. V., ROSAS, C., BONDIOLI, K. R., WILLIAMS, B. L., HOAGLAND, T. A., DALMASSO, A. P., and FODOR, W. L. (2002b). Transgenic pigs designed to express human CD59 and H-transferase to avoid humoral xenograft rejection. *Xenotransplantation* **9**(1), 45-57.
- COVEY, S. N. (1986). Amino acid sequence homology in gag region of reverse transcribing elements and the coat protein gene of cauliflower mosaic virus. *Nucleic Acids Res* **14**(2), 623-633.
- COWAN, P. J., AMINIAN, A., BARLOW, H., BROWN, A. A., CHEN, C. G., FISICARO, N., FRANCIS, D. M. A., GOODMAN, D. J., HAN, W., KUREK, M., NOTTLE, M. B., PEARSE, M. J., SALVARIS, E., SHINKEL, T. A., STAINSBY, G. V., STEWART, A. B., and D'APIECE, J. F. (2000). Renal xenografts from triple-transgenic pigs are not hyperacutely rejected but cause coagulopathy in non-immunosuppressed baboons. *Transplantation* **69**, 2504-2515.
- COZZI, E., and WHITE, D. J. G. (1995). The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nature Med* **1**, 964-966.
- CZAUADERNA, F., FISCHER, N., BOLLER, K., KURTH, R., and TÖNJES, R. R. (2000). Establishment and characterization of molecular clones of porcine endogenous retroviruses replicating on human cells. *J Virol* **74**(9), 4028-4038.
- DAI, Y., VAUGHT, T. D., BOONE, J., CHEN, S. H., PHELPS, C. J., BALL, S., MONAHAN, J. A., JOBST, P. M., MCCREATH, K. J., LAMBORN, A. E., COWELL-LUCERO, J. L., WELLS, K. D., COLMAN, A., POLEJAEVA, I. A., and AYARES, D. L. (2002). Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol* **20**(3), 251-255.
- D'ALESSANDRO, D. A., RAO, V., DIGIORGI, P. L., NAKA, Y., and OZ, M. C. (2002). Current options for mechanical heart technology. *J Card Surg* **17**(1), 81-88.
- DANGEL, A. W., BAKER, B. J., MENDOZA, A. R., and YU, C. Y. (1995). Complement component C4 gene intron 9 as a phylogenetic marker for primates: long terminal repeats of the endogenous retrovirus ERV-K(C4) are a molecular clock of evolution. *Immunogenetics* **42**(1), 41-52.
- DAVIS, J. L., WITT, R. M., GROSS, P. R., HOKANSON, C. A., JUNGLES, S., COHEN, L. K., DANOS, O., and SPRATT, S. K. (1997). Retroviral particles produced from a stable human-derived packaging cell line transduce target cells with very high efficiencies. *Hum Gene Ther* **8**(12), 1459-1467.
- DELASSUS, S., SONIGO, P., and WAIN-HOBSON, S. (1989). Genetic organization of gibbon ape leukemia virus. *Virology* **173**(1), 205-213.
- DIAMOND, L. E., BYRNE, G. W., SCHWARZ, A., DAVIS, T. A., ADAMS, D. H., and LOGAN, J. S. (2002). Analysis of the control of the anti-gal immune response in a non-human primate by galactose alpha1-3 galactose trisaccharide-polyethylene glycol conjugate. *Transplantation* **73**(11), 1780-1787.
- DOMBROVSKI, B. A., MATHIAS, S. L., NANTHAKUMAR, E., SCOTT, A. F., and JR., H. H. K. (1991). Isolation of an active human transposable element. *Science* **64**, 1-30.

- DORIG, R. E., MARCIL, A., CHOPRA, A., and RICHARDSON, C. D. (1993). The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonton strain). *Cell* **75**, 295-305.
- DORLING, A., RIESBECK, K., WARRENS, A., and LECHER, R. (1997). Clinical xenotransplantation of solid organs. *Lancet* **349**, 867-871.
- ECHARD, G. (1974). Chromosomal banding patterns and karyotype evolution in three pig kidney cell strains (PK15, F and RP). *Chromosoma* **45**(2), 133-149.
- EHLERS, B., ULRICH, S., and GOLTZ, M. (1999). Detection of two novel porcine herpesviruses with high similarity to gammaherpesviruses. *J. Gen. Virol.* **80**, 971-978.
- EICKBUSH, T. H. (1992). Transposing without ends: the non-LTR retrotransposable elements. *New Biol* **4**, 430-440.
- ELLERMANN, V., and BANG, O. (1908). Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zentralb. Bakteriol. Parasitenkd. Infectiionskr. Hyg. Abt. Orig.* **46**, 595-609.
- FAN, L., and PEDEN, K. (1992). Cell-free transmission of Vif mutants of HIV-1. *Virology* **190**(1), 19-29.
- FELSENSTEIN, J. (1989). PHYLIP -- Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**, 164-166.
- FIELDING, A. K., CHAPEL-FERNANDES, S., CHADWICK, M. P., BULLOUGH, F. J., COSSET, F.-L., and RUSSEL, S. J. (2000). A hyperfusogenic Gibbon Ape Leukemia envelope glycoprotein: targeting of a cytotoxic gene by ligand display. *Human Gene Therapy* **11**, 817-826.
- FISCHER, N., KRACH, U., NIEBERT, M., and TÖNJES, R. R. (2003, im Druck). Detection of porcine endogenous retrovirus (PERV) using highly specific antisera against Gag and Env. *Virology*.
- GALBRAITH, D. N., KELLY, H. T., DYKE, A., REID, G., HAWORTH, C., BEEKMAN, J., SHEPHERD, A., and SMITH, K. T. (2000). Design and validation of immunological tests for the detection of Porcine endogenous retrovirus in biological materials. *J Virol Methods* **90**(2), 115-124.
- GALLO, R. C., SALAHUDDIN, S. Z., POPOVIC, M., SHEARE, G. M., KAPLAN, M., HAYNES, B. F., PALKER, T. J., REDFIELD, R., OLESKE, J., SAFAI, B., WHITE, G., FOSTER, P., and MARKHAM, P. D. (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**, 500-503.
- GIRARD, L., HANNA, Z., BEAULIEU, N., HOEMANN, C. D., SIMARD, C., KOZAK, C. A., and JOLICOEUR, P. (1996). Frequent provirus insertional mutagenesis of Notch1 in thymomas of MMTVD/myc transgenic mice suggests a collaboration of c-myc and Notch1 for oncogenesis. *Genes Dev* **10**(15), 1930-1944.
- GISSELBRECHT, S., FICHELSON, S., SOLA, B., BORDEREAUX, D., HAMPE, A., ANDRE, C., GALIBERT, F., and TAMBOURIN, P. (1987). Frequent c-fms activation by proviral insertion in mouse myeloblastic leukaemias. *Nature* **329**(6136), 259-261.
- GOLOVKINA, T. V., CHERVONSKY, A., DUDLEY, J. P., and ROSS, S. R. (1992). Transgenic mouse mammary tumor virus superantigen expression prevents viral infection. *Cell* **69**(4), 637-645.
- GOOD, A. H., COOPER, D. K. C., MALCOLM, A. J., IPPOLITO, R. M., KOREN, E., NEETHLING, F. A., YE, Y., ZHUDI, N., and LAMONTAGNE, L. R. (1992). Identification of carbohydrate structures that bind human anti-porcine antibodies: implications for discordant xenografting in humans. *Transplant. Proc.* **24**, 5559-5562.

- GREEN, N., SHINNICK, T. M., WITTE, O., PONTICELLI, A., SUTCLIFFE, J. G., and LERNER, R. A. (1981). Sequence-specific antibodies show that maturation of Moloney leukemia virus envelope polyprotein involves removal of a COOH-terminal peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(10), 6023-6027.
- GRIFFITHS, P. D. (2000). Xenotransplantation: one totter forward, one claw back. *Lancet* **356**, 1049-1050.
- HALL, B. (2001). "Phylogenetic trees made easy." Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- HANGER, J. J., BROMHAM, L. D., MCKEE, J. J., O'BRIEN, T. M., and ROBINSON, W. F. (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.
- HENDERSON, L. E., SOWDER, R., SMYTHERS, G., BENVENISTE, R. E., and OROSZLAN, S. (1985). Purification and N-terminal amino acid sequence comparisons of structural proteins from retrovirus-D/Washington and Mason-Pfizer monkey virus. *J Virol* **55**(3), 778-787.
- HENEINE, W., TIBELL, A., SWITZER, W. M., SANDSTROM, P., ROSALES, G. V., MATHEWS, A., KORSGREN, O., CHAPMAN, L. E., FOLKS, T. M., and GROTH, C. G. (1998). No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts. *Lancet* **352**(9129), 695-699.
- HERNIOU, E., MARTIN, J., MILLER, K., COOK, J., WILKINSON, M., and TRISTEM, M. (1998). Retroviral diversity and distribution in vertebrates. *J Virol* **72**(7), 5955-5966.
- HOLMES, S. E., DOMBROSKI, B. A., KREBS, C. M., BOEHM, C. D., and KAZAZIAN, H. H. (1994). A new retrotransposable human L1 element from the LRE 2 locus on chromosome 1q produces a chimaeric insertion. *Nature Genetics* **7**, 143-148.
- HOLMES, S. E., SINGER, M. F., and SWERGOLD, G. D. (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**(28), 19765-19768.
- HUTCHINSON, C. A., HARDIES, S. C., DLOEB, D., SHEHEE, W. R., and EDGELL, M. H. (1989). LINE and related retrotransposons: long interspersed repeated sequences in the eucaryotic genome. In "Mobile DNA" (D. Berg, and M. Howe, Eds.), pp. 599-617. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- IMAI, S., OKUMOTO, M., IWAI, M., HAGA, S., MORI, N., MIYASHITA, N., MORIWAKI, K., HILGERS, J., and SARKAR, N. H. (1994). Distribution of mouse mammary tumor virus in Asian wild mice. *J Virol* **68**(5), 3437-3442.
- INADA, H. (2001). Cryopreservation and engraftment potential of peripheral blood stem cells: pediatric experience. *Kurume Med J* **48**(2), 151-157.
- IVANOV, V. A., MELNIKOV, A. A., SIUNOV, A. V., FODOR, J. J., and ILYIN, Y. V. (1991). Authentic reverse transcriptase is encoded by jockey, a mobile Drosophila element related to mammalian LINEs. *EMBO J.* **10**, 1099-1116.
- JOHNSON, W. E., and COFFIN, J. M. (1999). Constructing primate phylogenies from ancient retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(18), 10254-10260.
- KAEFFER, B., BOTTREAU, E., MARCON, D., OLIVIER, M., LANTIER, I., and SALMON, H. (1991). Histocompatible miniature pig (d/d) haplotype: Generation of hybridomas secreting A or M monoclonal antibody. *Hybridoma* **10**, 731-744.

- KAEFFER, B., BOTTREAU, E., PHAN THANH, L., OLIVIER, M., and SALMON, H. (1990). Histocompatible miniature boar model: selection of transformed cell lines of B and T lineages producing retrovirus. *Int J Cancer* **46**, 481-488.
- KAISER, J. (2002). Xenotransplantation. Cloned pigs may help overcome rejection. *Science* **295**(5552), 25-27.
- KAMBHU, S., FALLDORF, P., and LEE, J. S. (1990). Endogenous retroviral long terminal repeats within the HLA-DQ locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(13), 4927-4931.
- KATO, S., MATSUO, K., NISHIMURA, N., TAKAHASHI, N., and 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, J. B., UNGER, T., SIMONI, F., SEGAL, D., COHEN, D., and GIVOL, D. (1985). Retroposon insertion into the cellular oncogene c-myc in canine transmissible venereal tumor. *PNAS* **82**, 1054-1058.
- KAZAZIAN, H. H., WONG, C., YOUSSEF, H., SCOTT, A. F., PHILIPPS, D. G., and ANTONARAKIS, S. E. (1988). Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature Biotechnol* **332**, 164-166.
- KIHARA, S., KAWAI, A., ENDO, M., KOYANAGI, H., and KUROSAWA, H. (2002). Extracorporeal membrane oxygenation and left ventricular assist device: a case of double mechanical bridge. *Heart Vessels* **16**(4), 164-166.
- KIM, K. I., LEE, J. H., LI, K., ZHANG, Y. P., LEE, S. S., GONGORA, J., and MORAN, C. (2002). Phylogenetic relationships of Asian and European pig breeds determined by mitochondrial DNA D-loop sequence polymorphism. *Anim Genet* **33**(1), 19-25.
- KINGSMORE, S. G., GIROS, B., SUH, D., BENIARZ, M., CARON, M. G., and SELDIN, M. F. (1994). Glycine receptor beta-subunit gene mutation in spastic mouse associated with LINE-1 element insertion. *Nature Genetics* **7**, 136-142.
- KITAMURA, Y., AYUKAWA, T., ISHIKAWA, T., KANDA, T., and YOSHIKI, K. (1996). Human endogenous retrovirus K10 encodes a functional integrase. *J Virol* **70**(5), 3302-3306.
- KOHRMAN, D. C., HARRIS, J., and MEISLER, M. (1996). Mutation detection in the med and medJ alleles of the sodium channel Scn8a. Unusual splicing due to a minor class AT to AC intron. *J. Biol. Chem* **271**, 17576-17581.
- KOYAMADA, N., MIYATAKE, T., CANDINAS, D., MARK, W., HECHENLEITNER, P., HANCOCK, W. W., SOARES, M. P., and BACH, F. H. (1998). Transient complement inhibition plus T-cell immunosuppression induces long-term survival of mouse-to-rat cardiac xenografts. *Transplantation* **65**(9), 1210-1215.
- KOZAK, M. (1984). Selection of initiation sites by eucaryotic ribosomes: effect of inserting AUG triplets upstream from the coding sequence for preproinsulin. *Nucleic Acids Res* **12**(9), 3873-3893.
- KRACH, U., FISCHER, N., CZAUDERNA, F., KURTH, R., and TÖNJES, R. R. (2000). Generation and testing of a highly specific anti-serum directed against porcine endogenous retrovirus nucleocapsid. *Xenotransplantation* **7**(3), 221-229.
- KRACH, U., FISCHER, N., CZAUDERNA, F., and TÖNJES, R. R. (2001). Comparison of replication-competent molecular clones of porcine endogenous retrovirus class A and class B derived from pig and human cells. *J. Virol* **75**(5465-5472).
- KUMAR, S., TAMURA, K., JAKOBSEN, I. B., and NEI, M. (2001). MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* **17**(12), 1244-1245.

- KUTSCH, O., BENVENISTE, E. N., SHAW, G. M., and LEVY, D. N. (2002). Direct and quantitative single-cell analysis of human immunodeficiency virus type 1 reactivation from latency. *J Virol* **76**(17), 8776-8786.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259), 680-685.
- LAI, L., KOLBER-SIMONDS, D., PARK, K. W., CHEONG, H. T., GREENSTEIN, J. L., IM, G. S., SAMUEL, M., BONK, A., RIEKE, A., DAY, B. N., MURPHY, C. N., CARTER, D. B., HAWLEY, R. J., and PRATHER, R. S. (2002). Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* **295**(5557), 1089-1092.
- LANDER, E. S., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**(6822), 860-921.
- LANGERAK, S. E., GROENINK, M., VAN DER WALL, E. E., WASSENAAR, C., VANBAVEL, E., VAN BAAL, M. C., and SPAAN, J. A. (2001). Impact of current cryopreservation procedures on mechanical and functional properties of human aortic homografts. *Transpl Int* **14**(4), 248-255.
- LANGFORD, G. A., GALBRAITH, D., WHITTAM, A. J., MCEWAN, P., FERNANDEZ-SUAREZ, X. M., BLACK, J., SHEPHERD, A., and ONIONS, D. (2001). In vivo analysis of porcine endogenous retrovirus expression in transgenic pigs. *Transplantation* **72**(12), 1996-2000.
- LARDER, B. A., KEMP, S. D., and DARBY, G. (1987). Related functional domains in virus DNA polymerases. *Embo J* **6**(1), 169-175.
- LEE, J. H., WEBB, G. C., ALLEN, R. D., and MORAN, C. (2002). Characterizing and mapping porcine endogenous retroviruses in Westran pigs. *J Virol* **76**(11), 5548-5556.
- LEIB-MÖSCH, C., HALTMEIER, M., WERNER, T., GEIGL, E. M., BRACK-WERNER, R., FRANCKE, U., ERFLE, V., and HEHLMANN, R. (1993). Genomic distribution and transcription of solitary HERV-K LTRs. *Genomics* **18**(2), 261-269.
- LETISSIER, P., STOYE, J., TAKEUCHI, Y., PATIENCE, C., and WEISS, R. A. (1997). Two sets of human-tropic retrovirus. *Nature* **389**, 681-682.
- LI, W. H., GU, Z., WANG, H., and NEKRUTENKO, A. (2001). Evolutionary analyses of the human genome. *Nature* **409**, 847-849.
- LIMBACH, C. (1995). Klonierung, Charakterisierung Expression des Hüllproteins des humanen endogenen Retrovirus. *Doktorarbeit, Universität Frankfurt*, 32-33.
- LOGG, C. R., LOGG, A., TAI, C. K., CANNON, P. M., and KASAHARA, N. (2001). Genomic stability of murine leukemia viruses containing insertions at the Env-3' untranslated region boundary. *J Virol* **75**(15), 6989-6998.
- LÖWER, R. (1999). The pathogenic potential of endogenous retroviruses: facts and fantasies. *Trends in Microbiology* **7**(9), 350-356.
- LÖWER, R., BOLLER, K., HASENMAIER, B., KORBMACHER, C., MÜLLER-LANTZSCH, N., LÖWER, J., and KURTH, R. (1993). Identification of endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation. *PNAS* **90**, 4480-4484.
- LÖWER, R., LÖWER, J., and KURTH, R. (1996). The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(11), 5177-5184.
- LÖWER, R., TÖNJES, R. R., KORBMACHER, C., KURTH, R., and LÖWER, J. (1995). Identification of a Rev-related protein by analysis of spliced transcripts of the human endogenous retroviruses HTDV/HERV-K. *J Virol* **69**(1), 141-149.

- MAEDA, M., SHIMIZU, A., IKUTA, K., OKAMOTO, H., KASHIHARA, M., UCHIYAMA, T., HONJO, T., and YODOI, J. (1985). Origin of human T-lymphotrophic virus I-positive T cell lines in adult T cell leukemia. Analysis of T cell receptor gene rearrangement. *J Exp Med* **162**(6), 2169-2174.
- MAEDA, N., and KIM, H. S. (1990). Three independent insertions of retrovirus-like sequences in the haptoglobin gene cluster of primates. *Genomics* **8**(4), 671-683.
- MAGER, D. L., and FREEMAN, J. D. (1995). HERV-H endogenous retroviruses: presence in the New World branch but amplification in the Old World primate lineage. *Virology* **213**(2), 395-404.
- MAGER, D. L., and HENTHORN, P. S. (1984). Identification of a retrovirus-like repetitive element in human DNA. *PNAS* **81**, 7510-7514.
- MANG, R., MAAS, J., CHEN, X., GOUDSMIT, J., and VAN DER KUYL, A. C. (2001). Identification of a novel type C porcine endogenous retrovirus: evidence that copy number of endogenous retroviruses increases during host inbreeding. *J Gen Virol* **82**(Pt 8), 1829-1834.
- MARTIN, U., KIESSIG, V., BLUSCH, J. H., HAVERICH, A., HELM, K. V. D., HERDEN, T., and STEINHOFF, G. (1998). Expression of pig endogenous retrovirus by primary porcine endothelial cells and infection of human cells. *Lancet* **352**, 692-694.
- MARTIN, U., and STEINHOFF, G. (1999). [Porcine endogenous retroviruses (PERV): in vitro artifact or a big problem for xenotransplantation?]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **106**(4), 146-149.
- MARTIN, U., TACKE, S. J., SIMON, A. R., SCHRODER, C., WIEBE, K., LAPIN, B., HAVERICH, A., DENNER, J., and STEINHOFF, G. (2002). Absence of PERV specific humoral immune response in baboons after transplantation of porcine cells or organs. *Transpl Int* **15**(7), 361-368.
- MARTIN, U., WINKLER, M. E., ID, M., RADEKE, H., ARSENIJEV, L., TAKEUCHI, Y., SIMON, A. R., PATIENCE, C., HAVERICH, A., and STEINHOFF, G. (2000). Productive infection of primary human endothelial cells by pig endogenous retrovirus (PERV). *Xenotransplantation* **7**, 138-142.
- MARTINELLI, G. P., MATSUDA, T., WAKS, H. S., and OSLER, A. G. (1978). Studies on immunosuppression by cobra venom factor. III. On early responses to sheep erythrocytes in C5-deficient mice. *J Immunol* **121**(5), 2052-2055.
- MATSUDA, T., MARTINELLI, G. P., and OSLER, A. G. (1978). Studies on immunosuppression by cobra venom factor. II. On responses to DNP-Ficoll and DNP-Polyacrylamide. *J Immunol* **121**(5), 2048-2051.
- MAYER, J. (2001). Status of HERV in human cells: expression and coding capacity of human proviruses. *Dev Biol* **106**, 439-441.
- MAYER, J., MEESE, E., and MUELLER-LANTZSCH, N. (1997). Multiple human endogenous retrovirus (HERV-K) loci with gag open reading frames in the human genome. *Cytogenet Cell Genet* **78**(1), 1-5.
- MAYER, J., MEESE, E., and MUELLER-LANTZSCH, N. (1998). Human endogenous retrovirus K homologous sequences and their coding capacity in Old World primates. *J Virol* **72**(3), 1870-1875.
- MAYER, J., SAUTER, M., RÁCZ, A., SCHERER, D., MUELLER-LANTZSCH, N., and MEESE, E. (1999). An almost-intact human endogenous retrovirus K on human chromosome 7. *Nature Genetics* **21**, 257-258.
- MCCURRY, K. R., KOOYMAN, D. L., ALVARADO, C. G., COTTERELL, A. H., MARTIN, M. J., LOGAN, J., and PLATT, J. L. (1995). Human complement regulatory proteins

- protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury. *Nature Med* **1**, 423-427.
- MCPHERSON, J. D., et al. (2001). A physical map of the human genome. *Nature* **409**(6822), 934-941.
- MEDSTRAND, P., LINDESKOG, M., and BLOMBERG, J. (1992). Expression of human endogenous retroviral sequences in peripheral blood mononuclear cells of healthy individuals. *J Gen Virol* **73**(Pt 9), 2463-2466.
- MERKLE, R. C. (1992). The technical feasibility of cryonics. *Med Hypotheses* **39**(1), 6-16.
- MIKI, Y., NISHISHO, I., HORII, A., MIYOSHI, Y., UTSUNOMIYA, J., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B., and NAKAMURA, Y. (1992). Disruption of the APC gene by a retrotransposal of L1 sequence in a colon cancer. *Cancer Res* **52**, 643-645.
- MOENNING, V., FRANK, H., HUNSMANN, G., OHMS, P., SCHWARZ, H., and SCHÄFER, W. (1974). I. 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.
- MORSE, B., ROTHBERG, V. J., SANDORFER, J. M., and ASTRIN, S. M. (1988). Insertional mutagenesis of the myc locus by a LINE-1 sequence in a human breast carcinoma. *Nature* **333**, 87-90.
- NANICHE, D., VARIOR-KRISHNAN, G., CERVONI, F., WILD, T. F., ROSSI, B., RABOURDIN-COMBE, C., and 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., KITO, Y., ISHIKAWA, R., MINAMI, R., NAKAMURA, H., and 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.
- NEGRONI, M., and BUC, H. (2001a). Mechanisms of retroviral recombination. *Annu Rev Genet* **35**, 275-302.
- NEGRONI, M., and BUC, H. (2001b). Retroviral recombination: what drives the switch? *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(2), 151-155.
- NERMUT, M. V., and HOCLEY, D. J. (1996). Comparative morphology and structural classification of retroviruses. In "Morphogenesis and maturation of retroviruses" (H. G. Kräusslich, Ed.), pp. 1-24. Springer-Verlag, Berlin.
- NIEBERT, M., ROGEL-GAILLARD, C., CHARDON, P., and TÖNJES, R. R. (2002). Characterization of chromosomally assigned replication-competent gamma porcine endogenous retroviruses derived from a large white pig and expression in human cells. *J Virol* **76**(6), 2714-2720.
- NIEBERT, M., and TÖNJES, R. R. (im Druck). Molecular cloning and functional characterization of infectious PERV and development of diagnostic tests. In "Current Topics in Microbiology and Immunology" (W. C. and S. D., Eds.). Springer Press, New York.
- O'CONNEL, C., O'BRIEN, S., NASH, W. G., and COHEN, M. (1984). ERV3, a full-length human endogenous provirus: Chromosomal localization and evolutionary relationship. *Virology* **138**, 225-235.
- OLDMIXON, B. A., WOOD, J. C., ERICSSON, T. A., WILSON, C. A., WHITE-SCHARF, M. E., ANDERSSON, G., GREENSTEIN, J. L., SCHUURMAN, H. J., and PATIENCE, C. (2002). Porcine endogenous retrovirus transmission characteristics of an inbred herd of miniature swine. *J Virol* **76**(6), 3045-3048.

- ONO, M., KAWAKAMI, M., and TAKEZAWA, T. (1987). A novel human nonviral retroposon derived from an endogenous retrovirus. *Nucleic Acid Res* **15**, 8725-8737.
- ONO, M., YASUNAGA, T., MIYATA, T., and USHIKUBO, H. (1986). Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. *J. Virol.* **60**, 589-598.
- O'REILLY, D., MILLER, L., and LUCKOW, V. (1992). "Baculovirus expression vectors." A laboratory manual (W. H. Freeman, Ed.), New York.
- OROSZLAN, S., COPELÖAND, T. D., GILDEN, R. V., and TODARO, G. J. (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* **11**, 262-271.
- ORY, D. S., NEUGEBOREN, B. A., and MULLIGAN, R. C. (1996). A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21), 11400-11406.
- PARADIS, K., LANGFORD, G., LONG, Z., HENEINE, W., SANDSTROM, P., SWITZER, M., CHAPMAN, L. E., LOCKEY, C., ONIONS, D., and 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., SWITZER, M., TAKEUCHI, Y., GRIFFITHS, D. J., GOWARD, M. E., HENEINE, W., STOYE, J. P., and WEISS, R. A. (2001). Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species. *J. Virol* **75**, 2771-2775.
- PATIENCE, C., TAKEUCHI, Y., and WEISS, R. (1997). Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nature Med* **3**, 282-286.
- PATZER, J. F., 2ND. (2001). Advances in bioartificial liver assist devices. *Ann N Y Acad Sci* **944**, 320-333.
- PAULSON, K., DEKA, N., SCHMID, C., MISRA, R., SCHINDLER, C., RUSH, M., KADYK, L., and LEINWAND, L. (1985). A transposon-like element in human DNA. *Nature* **316**, 359-361.
- PEELMAN, L. J., CHARDON, P., NUNES, M., RENARD, C., GEFFROTIN, C., VAIMAN, M., VAN ZEVEREN, A., COPPIETERS, W., VAN DE WEGHE, A., BOUQUET, Y., and ET AL. (1995). The BAT1 gene in the MHC encodes an evolutionarily conserved putative nuclear RNA helicase of the DEAD family. *Genomics* **26**(2), 210-218.
- PEROU, C., PRYOR, R., NAAS, T., and KAPLAN, J. (1997). The bg allele mutation is due to a LINE-1 retrotransposition. *Genomics* **42**, 366-368.
- PETROV, D., SANGSTER, T., SPENCER-JOHNSTON, J., HARTL, D., and SHAW, K. (2000). Evidence for DNA loss as a determinant of genome size. *Science* **287**, 1060-1062.
- PIEMONTE, L., BERTUZZI, F., NANO, R., LEONE, B. E., SOCCI, C., POZZA, G., and DI CARLO, V. (1999). Effects of cryopreservation on in vitro and in vivo long-term function of human islets. *Transplantation* **68**(5), 655-662.
- POCH, O., SAUVAGET, I., DELARUE, M., and TORDO, N. (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *Embo J* **8**(12), 3867-3874.
- POIESZ, B., RUSCETTI, F., GAZDAR, A., BUNN, P., MINNA, J., and GALLO, R. C. (1980). Detection and isolation of C-type retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *PNAS* **77**, 7415-7419.

- QUINN, G., and LANGFORD, G. (2001). The porcine endogenous retrovirus long terminal repeat contains a single nucleotide polymorphism that confers distinct differences in estrogen receptor binding affinity between PERV A and PERV B/C subtypes. *Virology* **286**(1), 83-90.
- RAMIREZ, P., CHAVEZ, R., MAJADO, M., MUNITIZ, V., MUNOZ, A., HERNANDEZ, O., PALENCIANO, C. G., PINO-CHAVEZ, G., LOBA, M., MINGUELA, A., YELAMOS, J., GAGO, M. R., VIZCAINO, A. S., ASENSI, H., CAYUELA, M., SEGURA, B., MARIN, F., RUBIO, A., FUENTE, T., ROBLES, R., BUENO, F. S., SANSANO, T., ACOSTA, F., RODRIGUEZ, J. M., RIOS, A., MONTOYA, M., NAVARRO, F., CABEZUELO, J., COZZI, E., WHITE, D. J., and PARRILLA, P. (2002). Transgenic pig-to-baboon liver xenotransplantation: clinical, biochemical, and immunologic pattern of delayed acute vascular rejection. *Transplant Proc* **34**(1), 319-320.
- REDDEHASE, M., PODLECH, J., and GRZIMEK, N. (2002). Mouse models of cytomegalovirus latency: overview. *J Clin Virol* **25 Suppl 2**, 23.
- REEMSTMA, K., MCCRACKEN, B., and SCHLEGEL, J. (1964). Renal heterotransplantation in man. *Ann. Surg* **160**, 384-410.
- REGENMORTEL, M. H. V. v., FAUQUET, C. M., BISHOP, D. H. L., CARSTENS, E. B., ESTES, M. K., LEMON, S. M., MANILOFF, J., MAYO, M. A., MCGEOCH, D. J., PRINGLE, C. R., and WICKNER, R. B. (2000). "Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.". VIIIth report of the ICTV Academic Press, SanDiego.
- REPASKE, R., O'NEILL, R. R., STEELE, P. E., and MARTIN, M. A. (1983). Characterization and partial nucleotide sequence of endogenous type C retrovirus segments in human chromosomal DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(3), 678-682.
- RITZHAUPT, A., VAN DER LAAN, L. J., SALOMON, D. R., and WILSON, C. A. (2002). Porcine endogenous retrovirus infects but does not replicate in nonhuman primate primary cells and cell lines. *J Virol* **76**(22), 11312-20.
- ROGEL-GAILLARD, C., BOURGEOUX, N., BILLAULT, A., VAIMAN, M., and CHARDON, P. (1999). Construction of a swine BAC library: application to the characterization and mapping of porcine type C endoviral elements. *Cytogenet. Cell. Genet* **85**, 205-211.
- ROUS, P. (1911). A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med* **13**, 397-411.
- RYAN, U. (1995). Complement inhibitory therapeutics and xenotransplantation. *Nature Med* **1**, 967-968.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E., and MANIATIS, T. (1989). "Molecular Cloning: A laboratory manual." 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SANDRIN, M. S., and MCKENZIE, I. F. (1994). Gal alpha (1,3)Gal, the major xenoantigen(s) recognised in pigs by human natural antibodies. *Immunol Rev* **141**, 169-190.
- SANMIGUEL, P., GAUT, B. S., TIKHONOV, A., NAKAJIMA, Y., and BENNETZEN, J. L. (1998). The paleontology of intergene retrotransposons of maize. *Nat Genet* **20**(1), 43-45.
- SANTORO, F., KENNEDY, P., LOCATELLI, G., MALNATI, M., BERGER, E., and LUSSO, P. (1999). Cd46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* **99**, 817-827.

- SASSMAN, D., DOMBROSKI, B. A., MORAN, J., KIMBERLAND, T., NAAS, T., DEBERARDINIS, A., GABRIEL, A., SWERGOLD, G., and KAZAZIAN, H. H. (1997). Many human L1 elements are capable of retrotransposition. *Nature Genetics* **16**, 37-43.
- SCHEEF, G., FISCHER, N., FLORY, E., SCHMITT, I., and TÖNJES, R. R. (2002). Transcriptional Regulation of Porcine Endogenous Retroviruses Released from Porcine and Infected Human Cells by Heterotrimeric Protein Complex NF-Y and Impact of Immunosuppressive Drugs. *J Virol* **76**(24), 12553-12563.
- SCHEEF, G., FISCHER, N., KRACH, U., and TÖNJES, R. R. (2001). The number of a U3 repeat box acting as an enhancer in long terminal repeats of polytropic replication-competent porcine endogenous retroviruses dynamically fluctuates during serial virus passages in human cells. *J Virol* **75**(15), 6933-6940.
- SCHOMMER, S., SAUTER, M., KRAUSSLICH, H. G., BEST, B., and MUELLER-LANTZSCH, N. (1996). Characterization of the human endogenous retrovirus K proteinase. *J Gen Virol* **77**(Pt 2), 375-379.
- SEZAI, A., ARUSOGLU, L., MINAMI, K., EL-BANAYOSY, A., and KORFER, R. (2002). Implantation of biventricular assist devices for chronic heart transplant rejection. *Ann Thorac Surg* **74**(2), 609-611.
- SHIH, A., COUTAVAS, E. E., and RUSH, M. G. (1991). Evolutionary implications of primate endogenous retroviruses. *Virology* **182**(2), 495-502.
- SHINNICK, T., LERNER, R., and SUTCLIFF, J. (1981). Nucleotide sequence of Moloney murine leukemia virus. *Nature* **293**, 543-548.
- SKEHEL, J. J., and WILEY, D. C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* **69**, 531-69.
- SPECKE, V., PLESKER, R., COULIBALY, C., BOLLER, K., and DENNER, J. (2002a). Productive infection of a mink cell line with porcine endogenous retroviruses (PERVs) but lack of transmission to minks in vivo. *Arch Virol* **147**(2), 305-319.
- SPECKE, V., SCHURMAN, H. J., PLESKER, R., COULIBALY, C., OZEL, M., LANGFORD, G., KURTH, R., and DENNER, J. (2002b). Virus safety in xenotransplantation: first exploratory in vivo studies in small laboratory animals and non-human primates. *Transpl Immunol* **9**(2-4), 281-288.
- SPECKE, V., TACKE, S. J., BOLLER, K., SCHWENDEMANN, J., and DENNER, J. (2001). Porcine endogenous retroviruses: in vitro host range and attempts to establish small animal models. *J Gen Virol* **82**(Pt 4), 837-844.
- STARZL, T., FUNG, J., TZAKIS, A., TODO, S., DEMETRIS, A., MARINO, I., DOYLE, H., ZEEVI, A., WARTY, V., and MICHEALS, M. G. (1993). Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet* **341**, 65-71.
- STAUFFER, Y., MARGUERAT, S., MEYLAN, F., UCLA, C., SUTKOWSKI, N., HUBER, B., PELET, T., and CONRAD, B. (2001). Interferon-alpha-induced endogenous superantigen. a model linking environment and autoimmunity. *Immunity* **15**(4), 591-601.
- STEWART, M., WARNOCK, M., WHEELER, A., WILKIE, N., MULLINS, J., ONIONS, D., and NEIL, J. (1986). Nucleotide sequence 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, J. (1997). Proviruses pose potential problems. *Nature* **286**, 126-127.
- STOYE, J. (1998). Endogenous retroviruses and xenotransplantation. *SGM Quarterly* **25**, 130.

- SVENSSON, A. C., SETTERBLAD, N., SIGURDARDOTTIR, S., RASK, L., and ANDERSSON, G. (1995). Primate DRB genes from the DR3 and DR8 haplotypes contain ERV9 LTR elements at identical positions. *Immunogenetics* **41**(2-3), 74-82.
- SWERGOLD, G. (1990). Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter. *Mol. Cell. Biol* **10**, 6718-6729.
- SWITZER, W. M., SHANMUGAM, V., CHAPMAN, L., and HENEINE, W. (1999). Polymerase chain reaction assays for the diagnosis of infection with the porcine endogenous retrovirus and the detection of pig cells in human and nonhuman recipients of pig xenografts. *Transplantation* **68**(2), 183-188.
- PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony and other methods (software): Sinauer Associates, Sunderland, MA
- TACKE, S. J., BODUSCH, K., BERG, A., and DENNER, J. (2001). Sensitive and specific immunological detection methods for porcine endogenous retroviruses applicable to experimental and clinical xenotransplantation. *Xenotransplantation* **8**(2), 125-135.
- 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., and 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.
- TAKATANI, S. (2000). Cardiac prosthesis as an advanced surgical therapy for end-stage cardiac patients: current status and future perspectives. *J Med Dent Sci* **47**(3), 151-165.
- TAKEUCHI, Y., PATIENCE, C., MAGRE, S., WEISS, R., BANERJEE, P., LETISSIER, P., and STOYE, J. (1998). Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus. *J. Virol* **72**, 9986-9991.
- TAMURA, K., and NEI, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* **10**(3), 512-526.
- TEICH, N. (1984). Taxonomy of retroviruses. 2nd ed. In "RNA tumor viruses" (R. A. Weiss, N. Teich, H. Varmus, and J. Coffin, Eds.), pp. 25-208. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- TEMIN, H. M. (1964). Nature of the provirus of Rous sarcoma. *Natl. Cancer Inst. Monogr* **17**, 557-570.
- TEMIN, H. M. (1980). Origin of retroviruses from cellular movable genetic elements. *Cell* **21**, 599-600.
- TEMIN, H. M., and MIZUTANI, S. (1970). RNA-directed DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **226**, 1211-1213.
- TEMIN, H. M., and MIZUTANI, S. (1992). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. 1970. *Biotechnology* **24**, 51-56.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., and GIBSON, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**(22), 4673-4680.
- TODARO, G. J., CALLAHAN, R., RAPP, U. R., and DE LARCO, J. E. (1980). Genetic transmission of retroviral genes and cellular oncogenes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **210**(1180), 367-385.

- TODARO, G. J., SCOLNICK, E. M., PARKS, W. P., LIVINGSTON, D. M., and AARONSON, S. A. (1973). Detection of type C viruses in normal and transformed cells. *Johns Hopkins Med J Suppl* **2**, 231-244.
- TÖNJES, R. R., CZAUDERNA, F., and 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, G., BENVENISTE, R., LIEBER, M., and SHERR, C. (1973). Characterization of a type C virus released from porcine cell line PK15. *Virology* **58**, 65-74.
- TSAI, F. C., MARELLI, D., LAKS, H., MORIGUCHI, J., SOPHER, M., BRESSON, J., MOGHADDAM, S., KUBAK, B., ESMAILIAN, F., ARDEHALI, A., PLUNKETT, M., LITWIN, P., and KOBASHIGAWA, J. (2002). Short-term bridge to heart transplant using the BVS 5000 external ventricular assist device. *Am J Transplant* **2**(7), 646-651.
- TURNER, G., BARBULESCU, M., SU, M., JENSEN-SEAMAN, M. I., KIDD, K. K., and LENZ, J. (2001). Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. *Curr Biol* **11**(19), 1531-1535.
- UNOS/US Department of Health and Human Service. (1995). Annual report of the U:S: Scientific Registry for Transplant Recipients and the Organ Procurement and Transplantation Network: transplant data 1988-1994. UNOS.
- VAN DER KUYL, A. C., DEKKER, J. T., and GOUDSMIT, J. (1995). Distribution of baboon endogenous virus among species of African monkeys suggests multiple ancient cross-species transmissions in shared habitats. *J Virol* **69**(12), 7877-7887.
- VAN DER LAAN, L. J. W., LOCKEY, C., GRIFFETH, B. C., FRASIER, F. S., WILSON, C. A., ONIONS, D., HERING, B. J., LONG, Z., OTTO, E., TORBETT, B. E., and SALOMON, D. R. (2000). Infection by porcine endogenous retrovirus after islet cell xenotransplantation in SCID mice. *Nature* **407**, 90-94.
- VERHEUGT, F. W. (2002). [The electric heart assist device for patients on the waiting list for a heart transplant: a bridge too far]. *Ned Tijdschr Geneesk* **146**(8), 351-352.
- WAKELEY, J. (1994). Substitution-rate variation among sites and the estimation of transition bias. *Mol Biol Evol* **11**(3), 436-442.
- WAKELEY, J. (1996a). The excess of transitions among nucleotide substitutions: new methods of estimating transition bias underscore its significance. *TREE* **11**, 158-163.
- WAKELEY, J. (1996b). The variance of pairwise nucleotide differences in two populations with migration. *Theor Popul Biol* **49**(1), 39-57.
- WARD, T., PIPKIN, P. A., CLARKSON, N. A., STONE, D. M., MINOR, P. D., and ALMOND, J. W. (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, A. M. (2000). Do all SINEs lead to LINEs? *Nature Genetics* **24**, 332-333.
- WEISS, R. A. (1984). Origins of contemporary RNA tumor virus research. 2nd ed. In "RNA tumor viruses" (R. Weiss, N. Teich, H. Varmus, and J. Coffin, Eds.), pp. 1-24. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- WEISS, R. A. (1998). Transgenic pigs and virus adaptation. *Nature* **391**, 327-328.
- WILKINSON, D. A., MAGER, D. L., and LEONG, J. A. (1994). Endogenous human retroviruses. In "The retroviridae" (J. A. Levy, Ed.), Vol. 1, pp. 465-535. Plenum Press, New York.

-
- WILLIAMS, M., OZ, M., and MANCINI, D. (2001). Cardiac assist devices for end-stage heart failure. *Heart Dis* **3**(2), 109-115.
- WILSON, C. A., WONG, C., VANBROCKLIN, M., and FEDERSPIEL, M. J. (2000). Extended analysis of the in vitro tropism of porcine endogenous retrovirus. *J. Virol* **74**, 49-56.
- WILSON, C. A., WONG, S., MULLER, J., DAVIDSON, C. E., ROSE, T. M., and BURD, P. (1998). Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *J. Virol* **72**, 3082-3087.
- WITTE, O. N., and BALTIMORE, D. (1977). Mechanism of formation of pseudotypes between vesicular stomatitis virus and murine leukemia virus. *Cell* **11**(3), 505-511.
- XIA, X., and XIE, Z. (2001). DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered* **92**(4), 371-373.
- XIONG, Y., and EICKBUSH, T. H. (1988). Similarity of reverse transcriptase-like sequences of viruses, transposable elements, and mitochondrial introns. *Mol Biol Evol* **5**(6), 675-690.
- XIONG, Y., and EICKBUSH, T. H. (1990). Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J.* **9**, 3353-3362.
- YE, Y., NEETHLING, F. A., NIEKRASZ, M., KOREN, E., RICHARDS, S. V., MARTIN, M. A., KOSANKE, S., ORIOL, R., and COOPER, D. K. C. (1994). Evidence that intravenously administered alpha-galactosyl carbohydrates reduce baboon serum cytotoxicity to pig kidney cells (PK15) and transplanted pig hearts. *Transplantation* **58**, 330-337.
- YODER, J. A., WALSH, C. P., and BESTOR, T. H. (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* **13**(8), 335-340.
- ZHU, Z. B., JIAN, B., and VOLANAKIS, J. E. (1994). Ancestry of SINE-R. C2 a human-specific retroposon. *Hum Genet* **93**(5), 545-551.

Lebenslauf

Name: Marcus Niebert

Wohnort: Behringstraße 4
64291 Darmstadt
Tel.: 06150-991022
e-mail: niema@pei.de

geboren: 10.05.1974 in Mülheim a.d. Ruhr

Familienstand: ledig

Schulbildung: Jun. 1980 – Jun. 1984 Besuch der Städt.
Gemeinschaftsgrundschule an der
Gathestraße

Aug. 1984 – Jun. 1993 Besuch der Gustav-Heinemann-
Gesamtschule mit Abitur

Okt. 1993 - Dez. 1998 Studium der Biologie an der Ruhr-
Universität Bochum

**Thema der
Diplomarbeit:** Untersuchung der Expression der Kaliumkanäle Kv3.1b und Kv3.2 in
Interneuronen im visuellen Cortex der Ratte

Betreuer: Prof. Dr. Petra Wahle

Apr. 1999-Sept. 2002 Doktorarbeit am Paul-Ehrlich-Institut in
Langen (Hess.)

**Thema der
Doktorarbeit:** Charakterisierung replikations-kompetenter porciner endogener
Retroviren: Molekulare Analyse, chromosomale Lokalisierung,
Polymorphismen und Rezeptorgebrauch

Betreuer: PD. Dr. Ralf R. Tönjes

seit Sept. 2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Robert Koch-Institut in Berlin