

**A: Retrotranspositionspotential
endogener und exogener Retroviren
und**

**B: Durchmusterung verschiedener
transgener Schweine auf Anwesenheit
replikationskompetenter PERV-A und
PERV-B sowie ekotroper PERV-C**

Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

von
Andreas Jungmann
aus Neunkirchen/Saar

Frankfurt am Main 2008

(D 30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Schwalbe

Gutachter. Prof. Dr. Dingermann
Prof. Dr. Tönjes

Datum der Disputation:

Die vorliegende Arbeit wurde in dem Zeitraum von April 2004 bis März 2007 am Paul-Ehrlich-Institut in Langen durchgeführt.

Einige Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder eingereicht unter den Titeln:

Andreas Jungmann, Thomas Preuß, Björn Petersen, Heiner Niemann, Barbara Keßler, Regina Klose, Eckhard Wolf and Ralf R. Tönjes

“Detection of polytropic replication-competent PERV-A/-B and of ecotropic PERV-C in multitransgenic pigs” Xenotransplantation 2006: 13: 584

Andreas Jungmann, Eva Dörrschuck and Ralf R. Tönjes

“Cellular interaction and retrotransposition of porcine endogenous retrovirus” Xenotransplantation 2007: 14: 372

Andreas Jungmann, Ralf R. Tönjes

“Retrotransposition- Another obstacle for Xenotransplantation?”
(im Druck, Transplantation Proceedings)

Andreas Jungmann, Vanessa Schmitt, Liliana E. Layer, Reinhard Kurth, Ralf R. Tönjes

“Retrotransposition Potential of Porcine and Human Endogenous Retroviruses“
(eingereicht im Januar 2008, Journal of Virology)

Eidesstattliche Erklärung

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

Retrotranspositionspotential endogener und exogener Retroviren
und

Durchmusterung verschiedener transgener Schweine auf Anwesenheit
replikationskompetenter PERV-A und PERV-B sowie ekotroper PERV-C

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

Neunkirchen, den

Danksagung

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

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

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

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

Allen Kollegen der Arbeitsgruppe 6/4, die mir zum größten Teil mehr als nur zu Kollegen wurden. Euch, danke für ein Arbeitsklima, welches in der Wissenschaft sicher nicht oft anzutreffen ist, das aber gerade deswegen wissenschaftliches Erörtern und Arbeiten gefördert hat: Nicole Fischer, Thomas Preuß, Melanie Krämer, Eva Dörrschuck, Kristina Sawallisch, Kurt Schönfeld, Vanessa Schmitt, Dr. Dagmar Schilling-Leiß.

Danke an weitere Mitarbeiter, welche mir durch wichtige Tipps oder auch durch unwissenschaftlichen „Freizeitstress“ geholfen haben: Daphne Nikles, Irene Hartl, Lydia Dürner, Thomas Schaser, Axel Horn, Matthias Hamdorf und AG 6/4.

Besonderer Dank gilt Frau Liliana Layer für viele wichtige praktische Hilfestellungen.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Freundin, meinen Freunden aus der Heimat und meiner Familie, für die finanzielle und moralische Unterstützung.

Merci beaucoup!

Inhaltsverzeichnis	I-III
1. Einleitung	1
1.1 Retroelemente	1
1.2 Retroviren	3
1.2.1 Virusklassifikation	6
1.2.2 Endogene Retroviren	7
1.2.2.1 Humane endogene Retroviren (HERV)	8
1.2.2.2 Porzine endogene Retroviren (PERV)	9
1.3 Xenotransplantation	10
1.3.1 Xenotransplantation und PERV	13
1.4 Retrotransposition von Retroviren	14
1.4.1 Retrotransposition und Xenotransplantation	16
1.4.2 Integration von Retroviren	16
1.5 Ziele dieser Arbeit	17
2. Material und Methoden	18
2.1 Organismen	18
2.1.1 Bakterienstämme	18
2.1.2 Säugerzellen	18
2.2 Kulturbedingungen der Bakterienstämme	19
2.2.1 Kulturmedien	19
2.2.2 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	19
2.3 Zellkultur	19
2.3.1 Kultivierung von Säugerzellen	19
2.3.2 Einfrieren/Auftauen von Säugerzellen	19
2.3.3 Transiente Transfektion von Säugerzellen	19
2.3.4 Stabile Transfektion von Säugerzellen	20
2.3.5 Aktivitätsbestimmung der reversen Transkriptase (RT)	20
2.3.6 Retrotranspositions Assay	20
2.4 Molekularbiologische Methoden	22
2.4.1 Isolierung von Nukleinsäuren	22
2.4.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	22
2.4.1.2 Isolierung genomischer DNA aus kultivierten Säugerzellen	23
2.4.1.3 Isolierung genomischer DNA aus Blut	23
2.4.1.4 Isolierung genomischer DNA aus Schweineohrstanzen	24
2.4.1.5 Isolierung genomischer RNA aus Säugerzellen	24
2.4.2 Fotometrische Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren	24
2.4.3 Agarosegelelektrophorese von DNA	24
2.4.4 Agarosegelelektrophorese von RNA	25
2.4.5 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	25
2.4.6 Auffüllen kohäsiver Enden der DNA	25
2.4.7 Dephosphorylierung von DNA	25
2.4.8 Extraktion von DNA aus Reaktionsansätzen	26
2.4.9 Ligation	26
2.4.10 Transformation	26
2.4.11 Herstellung kompetenter Bakterien	26
2.4.12 Anlegen einer λ -Phagen Genbibliothek	27
2.4.13 Phagenplaque Lifting	27
2.4.14 Transfer von Nukleinsäuren	28

2.4.15	Markierung von Restriktionsfragmenten	28
2.4.16	Hybridisierung mit DNA Fragment Sonden	28
2.4.17	Polymerasekettenreaktion (PCR)	29
2.5	Proteinbiochemische Methoden	32
2.5.1	Herstellung von Zelllysaten	32
2.5.2	Fotometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen	32
2.5.3	Proteingelelektrophorese (SDS-Page)	32
2.5.4	Immuno Blotting (Western Blotting)	33
2.5.5	Enhanced chemiluminescence (ECL)-Verfahren	33
2.5.6	Indirekte Immunfluoreszenzanalysen	33
2.6	Verwendete Oligonukleotide	34
3.	Ergebnisse	37
A.	Retrotranspositionspotential porziner endogener Retroviren	37
3.1	Klonierungsexperimente	37
3.1.1	Insertion der modifizierten Proviren von PERV-B(33) und HERV-K113 in das heterologe eukaryotische Expressionsplasmid pJW-Hyg	37
3.1.2	Konstruktion der PERV-B(33) Deletionsmutanten	41
3.1.2.1	Konstruktion der <i>gag</i> Deletionsmutante von PERV-B(33)	41
3.1.2.2	Konstruktion der <i>gag/pol</i> Deletionsmutante von PERV-B(33)	43
3.1.2.3	Konstruktion der <i>pol</i> Deletionsmutante von PERV-B(33)	44
3.1.3	Konstruktion der HERV-K113 Deletionsmutanten	45
3.1.3.1	Konstruktion der <i>gag</i> Deletionsmutante von HERV-K113	45
3.1.3.2	Konstruktion der <i>gag/pol</i> Deletionsmutante von HERV-K113	46
3.1.3.3	Konstruktion der <i>pol</i> Deletionsmutante von HERV-K113	47
3.1.4	Konstruktion des LTR regulierten PERV-B(33) Indikatorplasmids	47
3.1.4.1	Konstruktion der <i>gag/pol</i> -Deletionsmutante des LTR regulierten PERV-B(33) Indikatorplasmids	49
3.1.5	Konstruktion des LTR regulierten MoMLV Indikatorplasmids (Positivkontrolle)	50
3.1.5.1	Konstruktion der <i>gag/pol</i> -Deletionsmutante des LTR regulierten MoMLV Indikatorplasmids	51
3.1.6	Konstruktion des LTR regulierten HIV-1 Indikatorplasmids	51
3.2	Retrotranspositionsexperimente	53
3.2.1	Test der CMV regulierten HERV-, PERV- und MoMLV Plasmide	54
3.2.2	Test der LTR regulierten PERV, MoMLV und HIV-1 Plasmide	54
3.3	Analyse von Integrationsstellen der Indikatorplasmide	58
B.	Durchmusterung verschiedener transgener Schweine nach infektiösen, replikationskompetenten PERV-A sowie PERV-B und ekotropen PERV-C	59
3.4	Durchmusterung verschiedener Schweinegenome auf Anwesenheit eines Volllängen PERV-C aus primären Zellen	63

3.4.1	Phagenbibliothek	63
3.4.2	EPTS/LM-PCR	63
3.5	Chromosomale Lokalisation des Provirus PERV-C(1312)	66
3.6	Repetitive Elemente	67
4.	Diskussion	69
4.1	Ziel der Retrotranspositionsexperimente	69
4.2	Retrotranspositionsexperimente mit PERV-B(33) und MoMLV	69
4.3	Retrotranspositionsexperimente mit HERV-K113, HIV-1	71
4.4	Integrationsstellen	73
4.5	Identifikation von replikationskompetenten PERV-A und PERV-B sowie ekotropen PERV-C	73
4.6	Klonierung eines Volllängen PERV-C aus primären Zellen	74
5.	Zusammenfassung	76
6.	Anhang	77
7.	Abkürzungsverzeichnis	90
8.	Literaturverzeichnis	93

Lebenslauf

1 Einleitung

1.1 Retroelemente

Das Genom aller Eukaryoten sowie einiger Prokaryoten beinhaltet eine Vielzahl von Sequenzen, die transponierbare mobile Elemente darstellen, welche als Replikationszwischenprodukt eine RNA verwenden (Wilkinson et al. 1994). Diese Retroelemente zeigen entweder strukturelle Ähnlichkeiten und Sequenzhomologien zu infektiösen, exogenen Retroviren oder stellen aufgrund ihrer Sequenz Integrationsprodukte zellulärer mRNA dar, die revers transkribiert wurde (Boeke & Stoye 1997). Die Verwendung einer reversen Transkriptase (RT), welche Bestandteil der Retroelemente ist, um ausgehend von RNA DNA-Kopien zu synthetisieren, ist allen Retroelementen gemein. Fast die Hälfte des menschlichen Genoms (45%) besteht aus solchen, transponierbaren Elementen (Lander et al. 2001, Venter et al. 2001). Denn während eines Retrotranspositionsvorgangs erzeugt die RT neue Kopien, welche sich willkürlich über das gesamte Genom verteilen und integrieren können. Die Proteine (u.a. eine RT), welche von den long interspersed nuclear elements-1 (LINE-1) synthetisiert werden, können beliebig in einer Zelle vorkommende mRNAs revers transkribieren. Sie sind wohl hauptverantwortlich für das Vorhandensein so vieler Retroelemente.

Aufgrund struktureller Abweichungen (RT, Promotor) der unterschiedlichen Retroelemente können diese klassifiziert werden (Wilkinson et al. 1994, Löwer et al. 1996, Andersson et al. 1998). In Abbildung 1.1 ist sowohl diese Klassifikation als auch eine mögliche Evolution dargestellt.

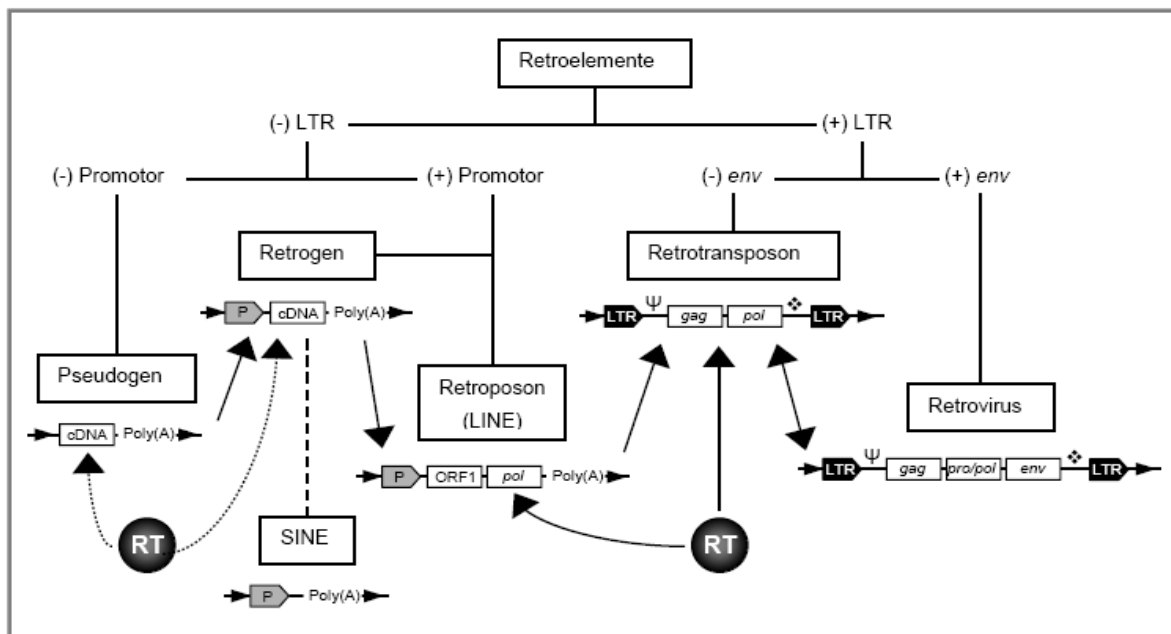


Abbildung 1.1: Klassifikation und mögliche Evolution der Retroelemente.

(Abgeändert nach Löwer et al. 1996, Andersson et al. 1998). Gepunktete Pfeile – Entwicklung von genetischen Elementen durch reverse Transkription; durchgezogene Pfeile – Erwerb neuer Elemente durch Rekombination. LTR – Long Terminal Repeat; P – Promotor; ψ – Verpackungssignal; ORF – open reading frame, gag – Kapsidprotein-Gen; pro/pol – Polymerase-Gen (codiert u.a. auch für die RT); RT – Reverse Transkriptase; env – Hüllprotein-Gen; ❖ - Polypurintrakt

Erläuterungen zu Abbildung 1.1:

Pseudogene:

reintegrierte zelluläre mRNA

Retrogene:

Pseudogene, die aufgrund eines vorhandenen Promotors aktiv transkribiert werden

Short interspersed nuclear elements (SINE):

Entsprechen Pseudogenen, codieren jedoch keinerlei Elemente (13% des humanen Genoms; Li et al. 2001; McPherson et al. 2001); manche leiten sich von partiell deletierten HERV-K LTRs ab (Ono 1986)

Non-LTR-Retrotransposons (Long interspersed nuclear elements (LINE)):

Das humane L1 Element ist etwa 6kB groß und besitzt einen internen RNA-Polymerase-II-Promotor (Swergold 1990), eine Polyadenylierungssequenz am 3'-Ende (Boeke & Stoye 1997) und zwei offene Leserahmen. Der ORF-1 ist wenig charakterisiert, enthält aber RNA-Bindungsdomänen mit Leucin-Zipper oder Zinkfinger Motiv. Der ORF-2 codiert für eine RT. (nur 21% Homologie zur retroviralen RT) (Dombrovski et al. 1991; Covey, 1986; Holmes et al. 1992; Ivanov et al. 1991).

Mit etwa 106 Kopien machen die drei existierenden LINE-Familien (L1-L3) etwa 20% des humanen Genoms aus (Li et al., 2001). Allerdings gibt es nur in der L1-Familie 30-60 aktive Elemente (Sassman et al. 1997), wobei die anderen Familien durch Punktmutationen oder Deletionen inaktiv sind (Hutchinson et al. 1989).

Die aktiven Elemente der L1-Familie können sowohl in der 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) in somatischen Zellen (Morse et al., 1988; Miki et al., 1992), als auch im Gehirn gefunden werden (Muotri et al., 2005).

LTR-Retrotransposons:

LTR-Retrotransposons ähneln Retroviren, kodieren jedoch für kein *env*-Gen. Sie sind somit wie SINE's, LINE's und Retroposons nicht infektiös. Auch besitzen sie, wie die Retroviren, flankierende LTRs, welche die Promotorelemente beinhalten (Löwer et al. 1996), eine Primerbindungsstelle (PBS), einen Polypurintrakt (PPT), und sie kodieren für ein *pol*-Gen, welches die RT beinhaltet und für ein *gag*-Gen, welches eine Kapsidpartikelbildung ermöglicht. Die transkribierte RNA kann durch das Verpackungssignal ψ (psi site) in diese virusähnlichen Partikel (viruslike particles, VLP) inkorporiert werden (Löwer et al. 1996). Da die LTR-Retrotransposons somit sehr große Ähnlichkeiten zu Retroviren besitzen, werden sie entweder als evolutionäre Vorläufer oder deletierte Überreste von Retroviren angesehen (Temin 1980; Löwer et al. 1996).

Retroviren:

Retroviren zeigen einen identischen Aufbau zu Retrotransposons. Zusätzlich kodieren sie für ein *env*-Gen, welches für die Bildung eines Hüllproteins verantwortlich ist und die Aufnahme in die Wirtszelle vermittelt.

1.2 Retroviren

Die komplexesten Vertreter der Retroelemente stellen die Retroviren dar. Peyton Rous entdeckte 1911 mit dem Rous-Sarkom-Virus den ersten Vertreter dieser Virenklasse. Aus einem an einem Sarkom erkrankten Huhn stellte er ein zellfreies Filtrat her und injizierte es in gesunde Küken, die daraufhin ebenfalls maligne Tumore des gleichen Typs entwickelten. Er fand heraus, dass das filtrierte Extrakt aus Geflügelsarkomen ein Tumovirus, das nach ihm benannte Rous-Sarkom-Virus (RSV), enthält. J.J. Bittner identifizierte 1936 das Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) als den Auslöser von malignen Milchdrüsenenerkrankungen der Maus. Das außergewöhnliche Merkmal dieser Virenklasse ist die mögliche vertikale Übertragung über die Keimbahn an Folgegenerationen.

Bei den Retroviren verläuft der Fluß der genetischen Information in umgekehrter Richtung: RNA → DNA Provirus → RNA. Erst 1970 fanden Temin und Baltimore das hierfür notwendige Enzym, die reverse Transkriptase, welches in der Lage ist, DNA aus einer RNA-Matrize zu transkribieren. Diese Aktivität hat den Retroviren ihren Namen verliehen. 1980 beschrieb Robert Gallo mit dem humanen T-Zell-Leukämie Virus (HTLV) ein Retrovirus, welches beim Menschen T-Zell-Leukämien verursachen kann. Doch nicht alle Retroviren verursachen Krebs. Die humanen Immundefizienzviren (HIV-1 und HIV-2) verursachen zum Beispiel AIDS (Gallo et al. 1984).

Retroviren besitzen ein Genom von 7-12 kB und sind in der Lage, durch den Besitz des vom *env*-Gen kodierten Hüllproteins, nach Verlassen einer Zelle neue Wirtszellen durch rezeptorvermittelten Eintritt zu infizieren (Löwer et al. 1996). Evolutionär leiten sich die Retroviren wahrscheinlich von LTR-Retrotransposons ab (Abb 1.1) (Temin 1980). Anhand der Genomstruktur kann man eine Unterteilung in zwei große Gruppen, die einfachen - und die komplexen Retroviren, vornehmen (Vogt 1997). Prinzipiell enthalten alle Vertreter drei kodierende Bereiche, welche die strukturellen und enzymatischen Grundbausteine liefern (Vogt 1997). Somit ist die Genomorganisation 5'LTR-*gag-prt/pol-env*-3'LTR für alle Retroviren gültig (Coffin 1996) und repräsentiert gleichzeitig die einfachsten Vertreter (γ -Typ Retroviren der Säuger und Vögel; Abb. 1.2). Im Gegensatz dazu stellen z.B. HIV oder HTLV komplexe Retroviren dar. Diese besitzen zusätzliche Gene, die durch alternatives Spleißen entstehen, und kodieren für Proteine, welche Funktionen wie z.B. Verstärkung der Transkription des Provirus (Coffin 1996) oder Hemmung bzw. Abbau retroviraler Restriktionsfaktoren (Goff 2004) übernehmen.

Die LTRs, welche die proviralen Gene beiderseits begrenzen, setzen sich aus je einer U3, R und U5 Region zusammen. Die U3 Region der 5'LTR beinhaltet den retroviralen Promotor bzw. generell die cis-aktiven Kontrollelemente (Rabson & Graves 1997). Der transkriptionelle Start erfolgt unmittelbar am 5'Ende der R-Region der 5'LTR, nach Bindung von mehreren zellulären Transkriptionsfaktoren an U3 (Cap Site; Coffin 1996, Rabson & Graves 1997). Die Transkription endet am 3'Ende der 3'LTR nach Polyadenylierung am poly(A)-Signal (Coffin 1996). Die U5 Region besitzt keine regulatorischen Eigenschaften, stellt aber einen sehr wichtigen Bestandteil der reversen Transkription dar (Coffin 1996).

Retroviren besitzen gegenüber anderen Viren charakteristische Eigenschaften:

- Diploides Genom
- Synthese und Prozessierung durch zelleigene Transkriptionsmaschinerie
- Assoziation des Genoms mit zelleigener tRNA an die PBS, welche der Replikation dient
- (+)-Strang RNA-Genom, welches sofort nach Infektion als Matrize zur Proteinsynthese dient

Sie besitzen eine Hülle, welche sich von der Zytoplasmamembran der Wirtszelle ableitet. Ihr Durchmesser beträgt 80-100 nm (Nermut & Hockley 1996) und sie verfügen über eine einheitliche Virionstruktur (Abb. 1.2) Die Hülle oder Membran ist mit viruseigenen Glykoproteinen besetzt, welche Produkte des *env*-Gens sind (Vogt 1997). Nach innen wird diese Membran komplett mit der Matrix ausgekleidet, womit auch ein Teil der Glykoproteine verknüpft ist. Das Kapsid, welches den Kern des Virions darstellt, kann entweder zylindrisch, isokaedrisch oder konisch geformt sein (Nermut & Hockley 1996). Es enthält neben den retroviralen Enzymen Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PRO) den Ribonukleoproteinkomplex, der sich aus viralem RNA Genom und Nukleokapsid zusammensetzt.

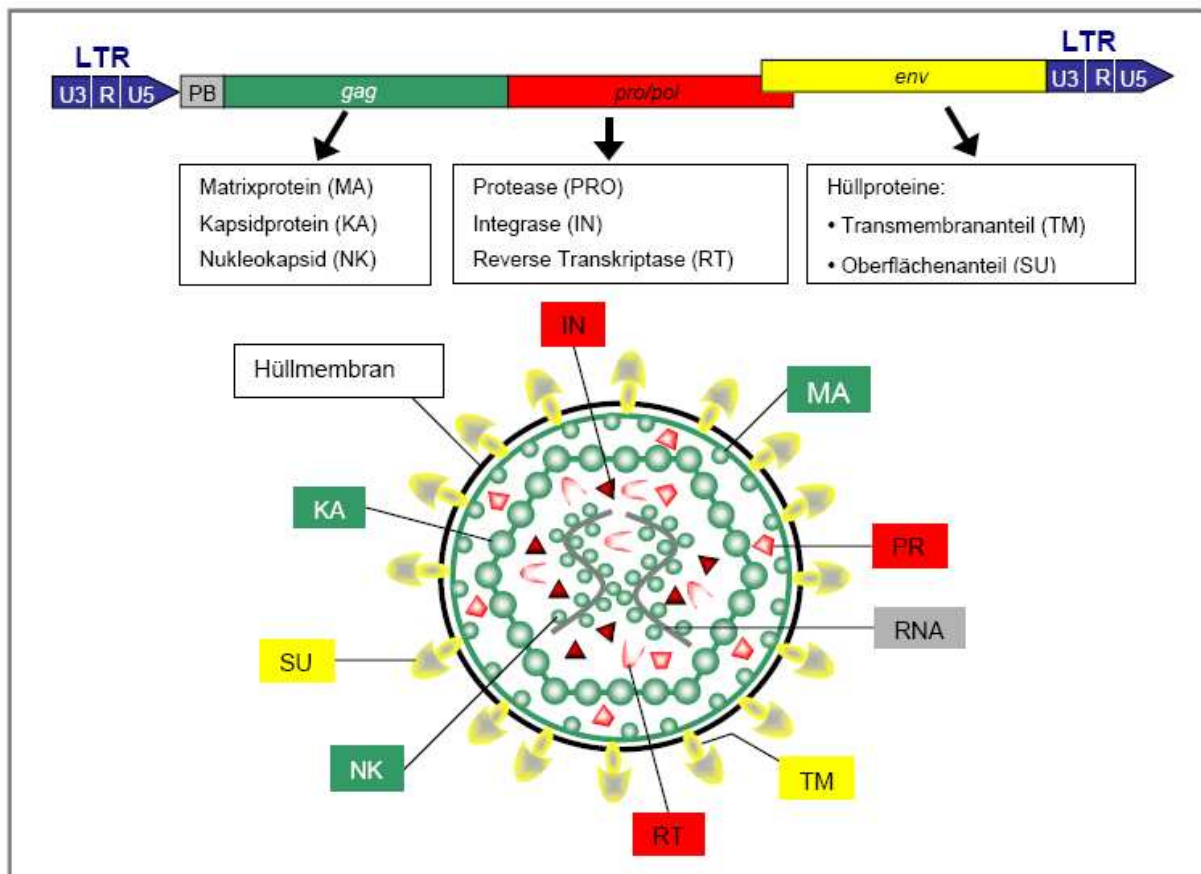


Abbildung 1.2: Genomische Struktur eines einfachen Retrovirus sowie Organisation eines Virions.

Die viralen Genprodukte (*gag*, *pro/pol*, *env*) sind farblich dargestellt und entsprechend im Virion (unten) wieder zu finden. Die zwei RNA-Stränge sind innerhalb des Kapsids im Virion mit den Nukleokapsidproteinen assoziiert. Die umschließende Hüllmembran entstammt der Zytoplasmamembran der Wirtszelle (Abgeändert nach Vogt 1997)

Der Replikationszyklus eines Retrovirus ist in Abb. 1.3 schematisch dargestellt.

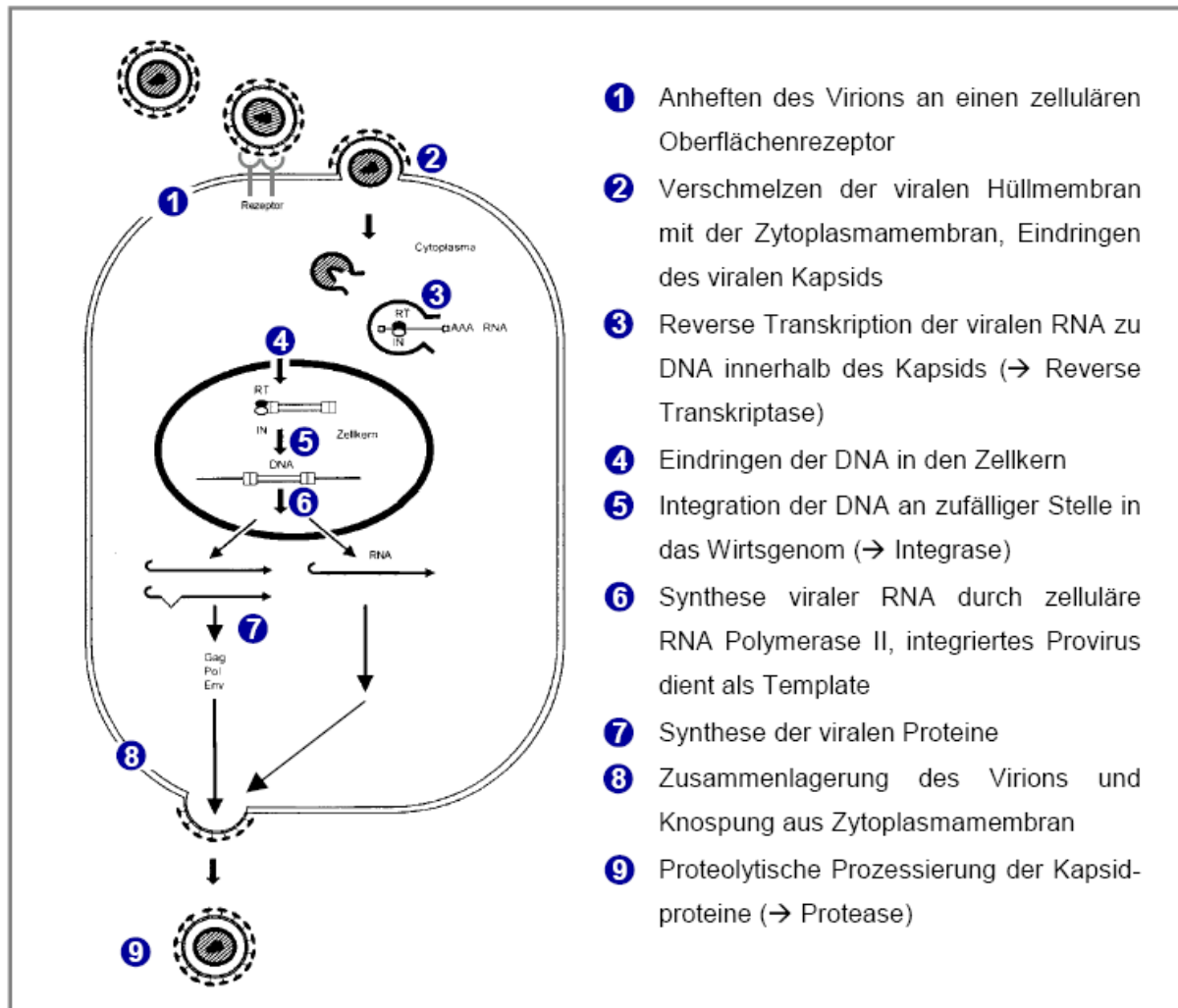


Abbildung 1.3: Replikationszyklus eines Retrovirus.

Abgeändert nach Modrow & Falke 1997.

Dieser ist eine Verknüpfung viraler (reverse Transkription, Integration) und zellulärer Mechanismen (Transkription, Translation) (Coffin 1996).

Bei einer Infektion einer Wirtszelle findet eine hochspezifische Interaktion zwischen den Oberflächenrezeptoren der Zelle und den Glykoproteinen des Virus statt, welche somit eine wichtige Determinante der Wirtsspezifität ist (Vogt 1997). Im Anschluss erfolgt die reverse Transkription innerhalb des Kapsids. Während dieser DNA-Synthese springt die RT vom 5' Ende zum 3' Ende der RNA-Matrize, wobei die provirale LTR Struktur (sowohl 5' als auch 3' U3-R-U5) wieder hergestellt wird (Vogt 1997). Der nächste Schritt ist die zufällige Integration dieses Provirus in das Genom der Wirtszelle. Damit wird es fester Bestandteil der neuinfizierten Zelle und bei jeder Zellteilung mitrepliziert (Coffin 1996). Diese Infektion ist permanent, da die Zelle keinen Mechanismus besitzt das Provirus wieder zu entfernen (Coffin 1996). Nach der Infektion des Provirus wird die Transkription durch die LTR

gesteuert, deren Aktivität abhängig von dem infizierten Zelltyp ist und somit auch den Wirtstropismus bestimmt (Ruddell 1995, Palmarini et al. 2000). Infizierte Zellen müssen bis auf die Virusproduktion keinerlei Veränderungen, wie z.B. einen zytopathischen Effekt, zeigen (Coffin 1996). Trotzdem stellt die Integration an sich einen mutagenen Vorgang dar (Vogt 1997).

1.2.1 Virusklassifikation

Eine grobe Einteilung der Retroviren wird aufgrund der Genomstruktur vorgenommen. Hier kann man einfach aufgebaute γ -Typ Retroviren (PERV, MLV) von komplexen Viren wie z.B. HIV unterscheiden. Während erstere die Genomstruktur 5'LTR-gag-prt/pol-env-3'LTR besitzen, codieren die komplexeren Viren für zusätzliche, akzessorische Proteine.

Die Klasse der Retroviren wird nach dem „*International Committee on Taxonomy of Viruses*“ (ICTV 2006) in sieben Genera eingeteilt (Tabelle 1.1). Diese basieren auf dem Verwandtschaftsgrad der homologen Sequenzen des Genoms und auf der Fähigkeit onkogen zu wirken.

	Genom	Anzahl offene Leserahmen	Vertreter	Eigenschaften
Alpharetroviren	- < 8kB - einfach	4	Aviäres Leukosevirus (ALV)	- Onkogen - C-Typ
Betaretroviren	- > 10kB - einfach	> 4	Maus Mammary Tumor Virus (MMTV), Mason Pfizer Monkey Virus (MPMV)	- Virionenzusammenbau intrazytoplasmatisch, - Onkogen - C-Typ
Gammaretroviren	- > 8kB - einfach	4	Maus Leukemie Viren (MLV), Porzine Endogene Retroviren (PERV)	- Onkogen - C-Typ
Deltaretroviren	- > 10kB - einfach	> 4	T-Zell Leukemie Virus 1 und 2 des Menschen (HTLV-1/-2) Humanes endogenes Retrovirus K (HERV-K)	- Virionenzusammenbau an der Zellmembran, - Onkogen - B-Typ - A-Typ
Epsilonretroviren	- > 10kB - komplex	> 4	Walauge Dermal Sarcoma Virus (WDSV)	- C-Typ
Spumaretroviren	- > 10kB - komplex	> 4	Humanes Foamyvirus (HFV)	- Virionenzusammenbau an der Zellmembran - B-Typ
Lentiviren	- > 10kB - komplex	> 4	Humanes Immundefizienz Virus (HIV)	- C-Typ

Tab. 1.1: Klassifikation der Retroviren

Eine ältere, aber immer noch verwendete Klassifikation beruht auf morphologischen Eigenschaften der viralen Partikel auf elektronenmikroskopischer Ebene. Hiernach werden vier Typen unterschieden (Teich 1984):

A-Typ: Diese Viren können intrazellulär nachgewiesen werden, zeigen aber keine Infektiösität (z.B.: ALV, HERV) (vgl. Abb. 1.4).

B-Typ: Die Partikel dieser Viren bilden intrazytoplasmatische toroidale Strukturen an der Stelle der Knospung und elektronendichte Kerne in reifen Partikeln aus (z.B.: MMTV) (vgl. Abb. 1.4).

C-Typ: Diese Viren zählen zu den am meisten isolierten Retroviren. Bis zum Knospen der Viren aus der Wirtszelle ist bei diesem Typ keine zytoplasmatische Virusstruktur erkennbar. Die reifen Partikel besitzen einen zentral gelegenen, elektronendichten Kern (vgl. Abb. 1.4). Die Lentiviren (HIV) und die Retroviren der Vögel und Säuger sind zwei Untergruppen der C-Typ-Viren.

D-Typ: Diese Viren zeigen ähnliche Strukturen wie die B-Typ Viren, bei den reifen Partikeln sind die „Spikes“ auf der Oberfläche der Virionen allerdings kürzer (z.B.: MPMV) (vgl. Abb. 1.4).

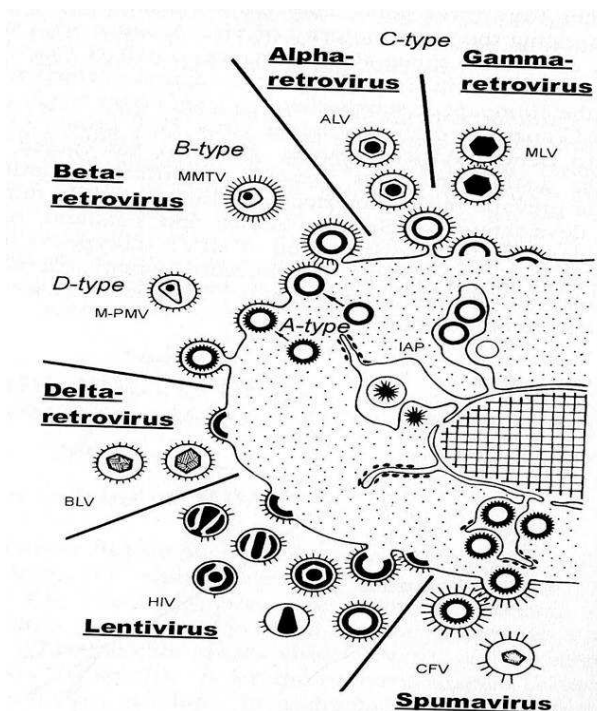


Abb.:1.4: Morphologie der Retroviren
(nach De Harven E. 1974)

1.2.2 Endogene Retroviren

Als endogene Retroviren bezeichnet man retrovirale Sequenzen, welche denen exogener Retroviren im proviralen Zustand entsprechen. Sie sind durch Infektion von Keimzellen stabil im Genom verankert und werden nach Mendelschen Regeln weitervererbt (Coffin 1996, Herniou et al. 1998). Evolutionär gesehen gibt es jüngst integrierte und altertümliche ERVs (Coffin 1996). Man findet diese Sequenzen in allen Vertebraten. Außer einiger, wenigen Ausnahmen (MMTV, JSRV, PERV) sind diese Retroviren aufgrund von Mutationen oder Deletionen in mindestens einem der Leserahmen nicht mehr in der Lage produktiv zu

replizieren (Wilkinson et al. 1994). Somit sind sie nicht pathogen für den Wirtsorganismus (Coffin 1996). In manchen Fällen kann die Existenz dieser defekten ERVs bzw. die Bildung der nicht trunktierten Proteine unterschiedliche Wirkungen haben. So bietet z.B. die Bildung des Env-Proteins Schutz gegen eine Infektion exogener Viren, und zwar genau dann, wenn diese denselben Rezeptor nutzen (Boeke & Stoye 1997). Zusätzlich können einige ERVs, trotz Apathogenität bei Mäusen, Brustkrebs hervorrufen (Coffin 1996) oder durch Rekombination zwischen einer amphotropen und polytropen Form Leukämie auslösen (Boeke & Stoye 1997). Neben der Rekombination als möglicher Basis eines Krankheitsbildes könnten z.B. auch Protoonkogene durch aktive retrovirale LTRs aktiviert werden und somit ebenfalls zur Krebsentstehung führen (Fan 1990).

1.2.2.1 Humane endogene Retroviren (HERV)

Nachdem das menschliche Genom 2001 komplett sequenziert war (Lander et al. 2001, Venter et al. 2001), stellte man fest, dass humane endogene retrovirale Sequenzen 8% des gesamten Genoms ausmachen, das vier- bis achtfache dessen was man ursprünglich angenommen hatte. Eine Klassifikation dieser HERVs wurde anhand von Homologien zu tierischen Retroviren vorgenommen und in Folge dessen in zwei Klassen unterteilt (Wilkinson et al. 1994). Die der Klasse 1 (z.B.: HERV-C) ähneln den Gammaretroviren der Säuger (MLV, PERV), die der Klasse 2 (z.B.: HERV-K) dagegen nähern sich abstammungsgeschichtlich den Beta- und Deltaretroviren der Säuger an.

Die Expression von HERV-Proteinen findet häufig in entarteten Zellen, wie z.B. Tumorzellen statt (Löwer et al. 1996). Die einzige physiologische Funktion exprimierter HERV-Proteine konnte man im Fall des Env-Proteins von HERV-W feststellen. Dieses wird als Fusogen bezeichnet und ausschließlich in Plazentazellen exprimiert, wo es an der Plazentaausbildung beteiligt ist (Blond et al. 2000). Bislang konnte kein natürlich replizierendes HERV entdeckt werden. Im Fall von HERV-K, der biologisch aktivsten Gruppe, hat man jedoch etliche, nahezu komplette Proviren, zum Teil polymorph vorkommend, genomisch gefunden. Darüber hinaus existiert in der menschlichen Bevölkerung ein ebenfalls polymorph vorkommendes HERV-K sogar mit intakten offenen Leserahmen für alle retroviralen Gene (HERV-K113) (Tuner et al. 2001). Diese gerade erwähnten Elemente dienten als Basis zur Herstellung eines künstlichen oder „Vorläufer“ HERV-K durch Vergleich ihrer Sequenzen und Bildung einer Konsensus-Sequenz (Lee et al. 2007, Dewannieux et al. 2006). Anhand dieser Proviren konnten zum ersten Mal humane endogene Retroviren bezüglich Replikation, Morphologie und Infektiosität näher charakterisiert werden.

Zuvor konnte man lediglich die von der Teratokarzinom-Zelllinie GH produzierten HTDV-Partikel mit HERV-K Sequenzen dieser Zellen in Verbindung bringen (Löwer et al. 1984, Löwer et al. 1993). Antikörper, die gegen rekombinant exprimiertes HERV-K Gag gerichtet waren, zeigten eine spezifische Reaktion gegen Proteine des HTDV (Boller et al. 1993, Löwer et al. 1993).

Die Entdeckung der HERV-K Sequenzen geht auf Ono et al. (1986) zurück. Aufgrund von Sequenzhomologien zu MMTV sowie zu IAPs (intrazisternale A-Partikel) konnte eine Konsensussequenz ermittelt werden, welche das Prototyp HERV-K darstellt. Diese ist etwa 9,5 kb groß ist, wird von zwei 968 bp großen LTRs flankiert und enthält eine PBS für eine Lysin (K) tRNA, wovon sich der Name ableitet (Ono et al. 1986). Im menschlichen Genom findet man etwa 30-50 Kopien dieser Proviren (Ono et al. 1986) sowie ca. 25.000 solitäre LTRs (Leib-Mösch et al. 1993), welche durch Rekombination der 5'- und 3'LTR des gleichen

Virus entstehen. Die Gene *gag*, *pro* und *pol* liegen in drei überlappenden Leserahmen und benötigen für die richtige Translation des Gag-Pro-Pol-Vorläuferproteins zwei Leserasterschübe. Man unterscheidet HERV-K-Typ1 und -Typ2, wobei Typ1 sich durch Fehlen eines 292bp großen Teil des aminoterminalen Endes des *env*-Leserahmens auszeichnet (Löwer et al. 1995). Dadurch werden die *pol*- und *env*-Gene als Fusionsprotein translatiert, was zu einem vorzeitigen Stopcodon im *env* führt. Das *env*-Gen des Typs2 hingegen wird zu subgenomischem *env* und zwei kurzen mRNAs gespleißt (Löwer et al. 1995) (Abb. 1.5, links). Eine dieser doppeltgespleißten mRNA codiert für das 14 kD große Rec (oder cORF) Protein, das im Nukleolus vorliegt. Dieses vermittelt, vergleichbar zu den Proteinen Rev/Rex von HIV/HTLV, den Export gespleißter und unvollständig gespleißter viraler RNA vom Kern ins Zytoplasma (Magin et al. 2000, Magin-Lachmann et al. 2001). Im Fall des Typ1 HERV-K findet ausschließlich in Tumorgewebe und entarteten Zellen ein Spleißen der *env*-Region statt, was in dem 9 kD großen Np9 Protein resultiert (Armbrüster et al. 2002). Dieses spielt vermutlich eine Rolle in der Tumorgenese (Armbrüster et al. 2004).

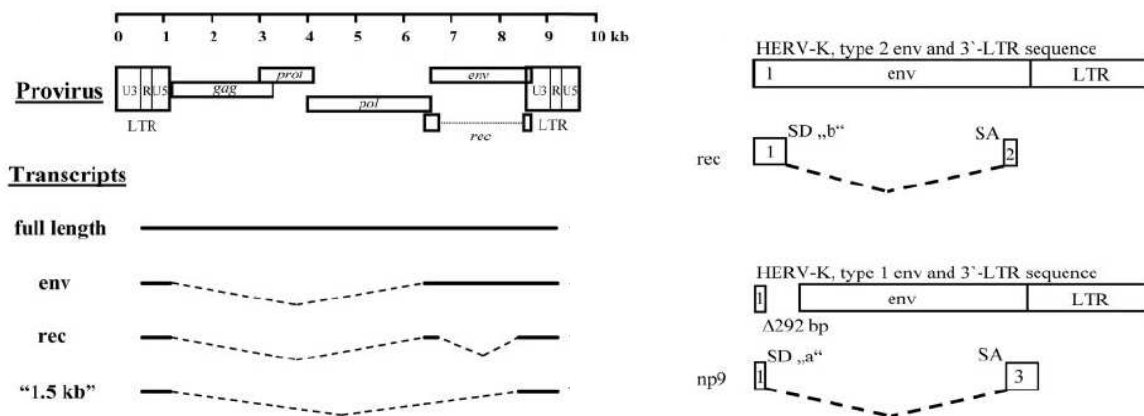


Abbildung: 1.5 Genomstruktur HERV-K (Typ1 und Typ2)

Links ist die genomische Organisation eines HERV-K (Typ2) abgebildet. Darunter die nach Transkription entstehenden, unterschiedlich gespleißten, RNAs (Vollängen-RNA zur Verpackung in das Viruspartikel, das *env*-Transkript, das *rec*-Transkript und ein weiteres Transkript); Rechts der Spleißunterschied von Typ2 und Typ1 HERV-K, was zum Einen in *Rec* resultiert und zum Anderen in *NP9*; Ursache hierfür ist eine 292bp große Deletion am 5' Ende des *env*-Leserahmens und die Nutzung einer alternativen Spleißstelle (SD "a") (Bannert & Kurth 2004).

1.2.2.2 Porzine endogene Retroviren (PERV)

Die ersten γ -Retroviren des Schweins wurden in Nierenzellkulturen entdeckt und als porzine endogene Retroviren (PERV) bezeichnet (Armstrong et al. 1971; Todaro et al. 1973). Erst im Jahr 1997 wurde durch Patience et al. gezeigt, dass diese Viren in der Lage sind, menschliche Zellen zu infizieren. Basierend hierauf erfolgte eine molekulare Charakterisierung von PERV (Czuderna et al. 2000).

Durch Infektionsstudien mit Überständen der porzinen Zelllinien PK15 und MPK, welche C-Typ Retroviren freisetzen (Armstrong et al. 1971; Torado et al. 1973; Moening et al. 1974) wurde gezeigt, dass Viren, produziert von PK15 Zellen, in der Lage sind Zellen verschiedener Spezies, auch humane, zu infizieren (Patience et al. 1997). Die Viren, welche

aus Überständen der MPK Zelllinie stammten, waren nur in der Lage wiederum porcine Zellen zu infizieren. Dieses Wissen konnte durch Pseudotypisierungsstudien mit MLV-Partikeln erweitert werden (Takeuchi et al. 1998). Zusätzlich konnte auch gezeigt werden, dass PERV primäre humane Endothelzellen produktiv infizieren kann (Martin et al. 2000).

Mittlerweile ist bekannt, dass es vier verschiedene PERV-Klassen gibt, welche sich im Wesentlichen in der *env*-Region unterscheiden und unterschiedliche Wirtsspezifitäten besitzen (Le Tissier et al. 1997, Akiyoshi et al. 1998, Takeuchi et al. 1998, Patience et al. 2001). Das Wirtszellspektrum wurde durch Pseudotypisierungsversuche bestimmt. PERV-A und -B besitzen polytrope Eigenschaften, d.h. sie können verschiedene Zellen/Zelllinien unterschiedlicher Spezies infizieren. PERV-C dagegen besitzt ekotrope Eigenschaften und weist somit ein auf porcine Zellen beschränktes Wirtsspektrum auf (Takeuchi et al. 1998). Von PERV-D kennt man bisher nur eine 275 nt große *env*-Sequenz (Patience et al. 2001), während PERV-A, -B und -C bereits vollständig charakterisiert wurden (Czuderna et al. 2000; Krach et al. 2001, Niebert et al. 2002, Preuß et al. 2006). Aufgrund weiterer, allerdings nicht infektiöser γ -Retroviren des Schweins wurden die infektiösen PERV-A, -B und PERV-C nach einer neueren Nomenklatur (Patience et al. 2001) in der Klasse γ 1 zusammengefasst.

Mit Hilfe einer BAC (künstliche bakterielle Chromosomen) Bibliothek konnten aus dem Genom der „Weißen Landrasse“ sechs intakte Proviren der Klassen A und B nachgewiesen werden. Dabei beherbergen die meisten der 30-50 Integrationsorte für PERV im Schweinengenom defekte Proviren (Le Tissier et al. 1997; Akiyoshi et al. 1998; Niebert et al. 2002). Bislang konnte lediglich ein intaktes PERV-C Provirus mit Hilfe einer genomischen Phagenbibliothek der Zelllinie MAX-T (aus d/d-haplotyp Miniaturschweinen) isoliert und charakterisiert werden (Preuß et al. 2006).

Evolutionär gesehen sind PERV etwa 7,5 Millionen Jahre alt und haben ihren Ursprung wahrscheinlich in Afrika (Tönjes et al. 2003, Niebert et al. 2004). Damals erfolgte die Artentrennung in die heutigen Schweine und deren nächsten Verwandten, den in Amerika lebenden Peccaries (Tönjes et al. 2003). PERV-A und PERV-B findet man bei allen Suiformes (Nicht-Wiederkäuer oder Schweineverwandte) bis ins Pliozän, wobei PERV-C nur in engen Verwandten des Wildschweins innerhalb des Holozäns gefunden werden kann (Niebert et al. 2004). Wahrscheinlich ist PERV-C durch Rekombination mit einem unbekanntem „Verwandten“ vor etwa 1,5 Millionen Jahren entstanden (Niebert et al. 2004) und stellt somit den jüngsten Vertreter der PERV-Familie dar.

1.3 Xenotransplantation

Die Xenotransplantation ist definiert als Verpflanzung lebender Zellen oder Organe zwischen zwei Spezies. Aufgrund der großen Diskrepanz zwischen verfügbaren Organen und darauf wartenden Patienten wäre die Nutzung tierischer Organe eine Alternative, zumindest bis ein entsprechendes Allotransplantat zu Verfügung steht. Stammesgeschichtlich kommen als geeignete Organspenderspezies besonders Primaten in Betracht. Diese sind jedoch nicht in ausreichender Zahl unter den erforderlichen hygienischen Bedingungen zu züchten und stellen zudem, aufgrund ethischer Bedenken, keine Alternative dar. Zusätzlich besteht aufgrund der nahen Verwandtschaft zum Menschen ein hohes Risiko der Infektion und somit zur Ausbildung von Zoonosen (vgl. HIV-1) (Gao et al. 1999).

Als das am Besten geeignete Organspendertier für den Menschen wird das Schwein angesehen, u. a. wegen der ähnlichen physiologischen Organe und Anatomie. Dabei stellt die immunologische Abstoßung die größte Hürde für den Einsatz solcher porciner Organe

dar. Zeitlich und mechanistisch treten drei unterscheidbare Abstoßungen auf, die hyperakute Abstoßungsreaktion (HAR), die akut vaskuläre (AVR) und die zelluläre Abstoßung (CXR). Um porzine Organe wirklich in der Klinik einzusetzen, gilt es diese auftretenden Abstoßungsreaktionen zu überwinden. Am Vielversprechendsten werden hier transgene Modifikationen angesehen.

Die Ursache der HAR bilden hauptsächlich im Menschen natürlich vorhandene Anti-Gal Antikörper, die gegen die $\alpha 1,3$ -Gal-Epitope (Galili et al. 1985) porziner Epithelien gerichtet sind und zur Folge haben, dass nach Bindung die Komplementkaskade über den klassischen Weg, induziert wird (Platt et al. 1991). Um diese Situation zu überwinden und die Expression des porzinen Hauptantigens für die HAR und AVR, das $\alpha 1,3$ -Gal-Epitop, dauerhaft zu unterbinden, wird die Erzeugung von $\alpha 1,3$ -Gal defizienten Schweine angesehen. Außerdem gibt es bereits Schweine, die Transgene für die Regulation der Komplementkaskade tragen, um diese zu inhibieren. Diese sind CD46 (MCP, membrane cofactor protein), CD55 (DAF, decay-accelerating factor) und CD59 (inhibitor of membrane attacking complex (MAC)) (Abb.: 1.6).

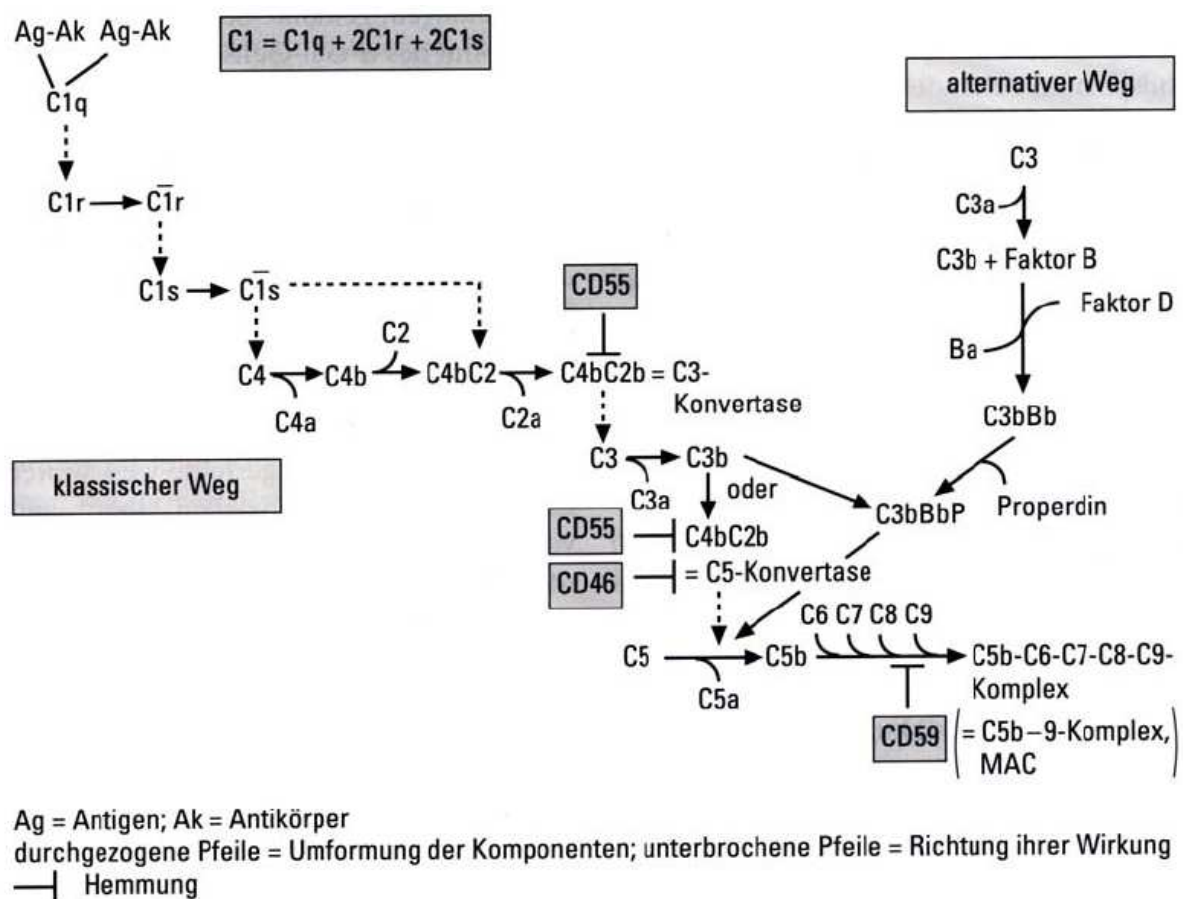


Abbildung 1.6: Übersicht über den Verlauf der Komplementkaskade.

CD55 (DAF), CD46 (MCP) und CD59 sind komplementregulierenden Faktoren, die die Aktivierung der Komplementkaskade an den dargestellten Punkten hemmen können (aus *Xenotransplantation*, Helmut Grimm, Schattauer Verlag, Stuttgart, 2003)

Die Ursache der AVR basiert auf Aktivierung von xenogenen Endothelzellen durch Nicht-anti- α Gal-Antikörper (NGA) (Schuurman et al. 2003), welche sich innerhalb von Tagen bis

Wochen nach Xenotransplantation bemerkbar macht (Bach et al. 1996). Als Hauptantigene werden hier Kohlenhydratverbindungen mit einem terminal gebundenen N-Glycolylneuraminsäure-Rest verantwortlich gemacht (Zhu & Hurst 2002). Diese Strukturen werden auf menschlichen Zellen nicht exprimiert und 85% aller Menschen tragen natürliche Antikörper gegen diese Reste (Zhu & Hurst 2002). Zusätzlich können diese NGAs auch zytolytisch wirken (Dehoux et al. 2003).

Prinzipiell bewirkt die Bindung dieser Antikörper an das Xenotransplantat die Infiltration von natürlichen Killerzellen (NK) und von Makrophagen. Hier spielen vor allem, im Gegensatz zur HAR, IgG-Antikörper eine wichtige, synergistische Rolle. Sie verstärken zusammen mit den NK, die Aktivierung der Endothelzellen, wodurch es letztendlich unter Mitwirkung von Chemokinen (IL-8, MCP-1), Adhäsionsmolekülen (E-Selektin, ICAM I, VCAM I und Faktor VII/VIIa-Rezeptor) und weiteren Zellen des Immunsystems (Leukozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten) zur Induktion der Gerinnungskaskade kommt, was zum Absterben des Xenotransplantats führt.

Eine Übersicht der relevanten Vorgänge der xenogenen Endothelzellaktivierung und somit der AVR ist in Abbildung 1.7 dargestellt.

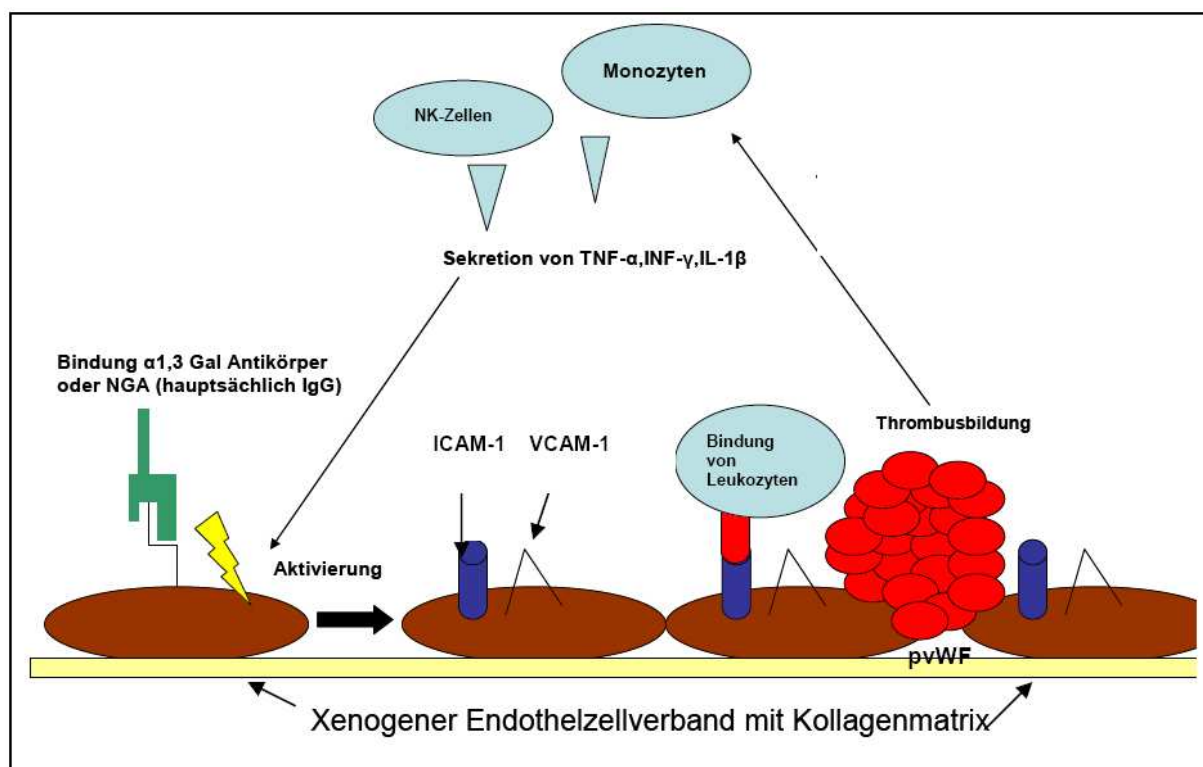


Abbildung 1.7: AVR in der xenogenen Situation.

Die Bindung der NGA Antikörper induziert eine Aktivierung der porzinen Endothelzellen. Dadurch kommt es auf der Zelloberfläche zur verstärkten Expression von ICAM I und VCAM I, was zur Bindung humaner Leukozyten mit anschließender Thrombusbildung führt. Die Verstärkung dieser Aktivierung erfolgt durch Sekretion von Cytokinen durch stimulierte Monozyten und NK.

Porzine Zellen sind braun, humane Zellen rot oder türkis dargestellt (aus Dissertation Dr. Björn Petersen, 2004)

Die zelluläre Abstoßung bildet zeitlich gesehen die letzte eintretende Abwehrreaktion. Sie beruht auf einer Aktivierung von T-Zellen im Empfängerorganismus. Dies geschieht entweder direkt durch antigenpräsentierende Zellen (APC) oder indirekt durch Phagozytose xenogener Proteine und anschließender Präsentation über MHC-Klasse-II-Moleküle. Beide Wege führen zur Schädigung des Xenotransplantats, entweder durch Ausschüttung von Zytokinen (TNF- α oder TNF- β) oder durch die Aktivierung von CD8-positiven T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen (Janeway 1997).

Nach Transplantation eines Schweineherzens in einen Pavian konnte ein Überleben des Empfängertiers bis zu 137 Tagen erreicht werden, ohne dass Symptome einer HAR beobachtet wurden (McGregor et al. 2003). Allerdings war dies neben dem transgenen Spendeorgan vor allem den hohen Dosen an Immunsuppressiva zu verdanken, welche dem Empfängertier verabreicht wurden. Das Ziel ist es verbesserte transgene Organe (z.B. bezüglich Stärke und Dauer der Expression des Transgens) und multitransgene Organe zu verwenden, wodurch neben der HAR auch die nachgeschalteten Abstoßungsreaktionen unterdrückt werden sollen.

Momentan werden neben den Transgenen zur Regulation der Komplementkaskade weitere Transgene verwendet und getestet. Dabei handelt es sich z.B. um das humane Thrombomodulin, welches nach Bindung an Thrombin die Koagulation verhindert, welche bei aktivierten xenogenen Endothelzellen verstärkt eintritt. Ein weiteres verwendetes Transgen ist TRAIL (tumor necrose factor related apoptosis inducing ligand), von welchem gezeigt wurde, dass es die primäre T-Zell vermittelte Abstoßung von Hornhaut-Allotransplantaten inhibiert (Xie et al. 2003).

1.3.1 Xenotransplantation und PERV

Da bei einer Transplantation dem Empfänger andauernd Immunsuppressiva verabreicht werden, um eine Abstoßung des Spenderorgans zu verhindern, besteht im Falle einer Xenotransplantation die Gefahr einer Infektion mit nicht arteigenen Erregern und im schlimmsten Fall die Gefahr einer Zoonose (Michaelis et al. 1994; Stoye & Coffin 1995; Fishman 1997). Porzine endogene Retroviren, welche feste Bestandteile des Genoms der Schweine sind, könnten nach erfolgter Xenotransplantation als infektiöse Partikel in den Körper des Rezipienten gelangen und dort eine Krankheit auslösen. Dieses Szenario wird durch die Tatsache unterstützt, dass PERV *in vitro* in der Lage ist, humane Zellen zu infizieren (Le Tissier et al. 1997; Patience et al. 1997). Stammen diese Partikel aus einem Organ eines transgenen Schweins, sind sie zusätzlich mit Molekülen auf ihrer Oberfläche bestückt, die sie für das menschliche Immunsystem nicht als fremd bzw. pathogen erscheinen lassen (Takeuchi et al. 1996). Dadurch wird das Infektionsrisiko erhöht. Im Schwein selbst konnte bis dato noch keine Krankheit diagnostiziert werden, die mit PERV assoziiert ist. Allerdings wurde kürzlich berichtet, dass in Melanomen bestimmter Miniaturschweine eine höhere PERV Expression gefunden werden kann als in anderen Geweben oder Organen des entsprechenden Schweins (Dieckhoff et al. 2007).

Trotzdem ist es unklar, welche Folgen eine potentielle Infektion eines Menschen zur Folge hätte. PERV ist z.B. nicht in der Lage in allen Zellen zu replizieren, die es *in vitro* infiziert, so beispielsweise im Fall von nicht-humanen primären Primatenzellen (Ritzhaupt et al. 2002).

Zu therapeutischen Zwecken wurden Patienten schon mit lebenden porzinen Geweben behandelt, worauf sich keinerlei Hinweise auf eine Infektion mit PERV einstellten. Dasselbe

gilt für Personen, die berufsbedingt ständig mit porzinem Blut und Gewebe in Kontakt gekommen sind. Allerdings konnte man in manchen Fällen Mikrochimärismen feststellen (Heneine et al. 1998; Patience et al. 1998; Paradis et al. 1999; Dinsmore et al. 2000). Hier waren jedoch die Patienten bzw. die Personen nicht immunsupprimiert, was bei einer potentiellen Xenotransplantation mindestens für einige Monate der Fall wäre.

In einem Tiermodell mit NOD/SCID (non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency) Mäusen konnte jedoch sowohl eine PERV-Infektion als auch PERV-Expression in verschiedenen Geweben, nachgewiesen werden, nachdem eine Xenotransplantation mit porzinen Inselzellen durchgeführt worden war (van der Laan *et al.* 2000). Da jedoch eine SCID-Maus über kein Immunsystem verfügt, spiegelt diese Situation nicht den immunsupprimierten Status eines potentiellen Xenotransplantatrezipienten wider. Zusätzlich wurde diese Studie durch folgende Publikationen widerlegt. Dabei wurden einerseits ebenfalls diabetischen Nacktmäusen und auch immunsupprimierten Ratten Inselzellen transplantiert. Ein PERV Nachweis in den verschiedenen Geweben der entsprechenden Tiere gelang nicht (Goto et al. 2004). In einer weiteren Arbeit wurden porzine Knochenmarkszellen parallel mit humanen, fetalen Thymus- und Leberzellen diabetischen Nacktmäusen transplantiert, wobei eine PERV Infektion nachweisbar war. Hier war allerdings der Infektion eine Pseudotypisierung mit xenotropem MLV der Maus vorausgegangen, so dass es sich in diesem Fall nur um eine indirekte PERV-Infektion handelte (Yang et al. 2004).

Eine direkte Infektion humaner Zellen, verursacht durch PERV, konnte nach Transplantation porziner Zellen oder Geweben bisher nicht gezeigt werden.

Im Fall einer Übertragung von PERV auf den Menschen findet ebenfalls eine Rekombination mit humanen endogenen Retroviren (HERV) so gut wie nicht statt (Patience et al. 2003). Trotzdem kann eine mögliche Zoonose nicht ausgeschlossen werden, wie eine Pseudotypisierungsstudie mit den PERV Klassen A, B und C zeigte (Lavillette & Kabat 2004).

1.4 Retrotransposition von Retroviren

Als Transposition wird der Transport eines DNA-Elementes von einer Position innerhalb des Genoms einer Zelle zu einer anderen bezeichnet. Dabei verbleibt das DNA-Element entweder an seiner ursprünglichen Stelle und eine Kopie davon wird an einen anderen Ort transponiert (*copy and paste*) oder das Element an sich transponiert (*cut and paste*) (Prak und Kazazian 2000). Eine Retrotransposition ist eine „copy and paste“ Transposition über RNA-Intermediate mit anschließender reverser Transkription und willkürlicher Integration an einem anderen Ort des Genoms. Diese wird potentiell von allen RT-haltigen Retroelementen (LINE-Elemente, LTR-Retrotransposons und Retroviren) durchgeführt (Prak und Kazazian 2000). Der genaue Retrotranspositionmechanismus von LTR-Retrotransposons unterscheidet sich von der retroviralen Replikation nur durch die fehlende Produktion von infektiösen Partikeln. Dies ist auf die Abwesenheit eines *env*-Gens zurückzuführen (Löwer et al. 1996) (Abb.: 1.8), welches dem Virus den Zelleintritt ermöglicht.

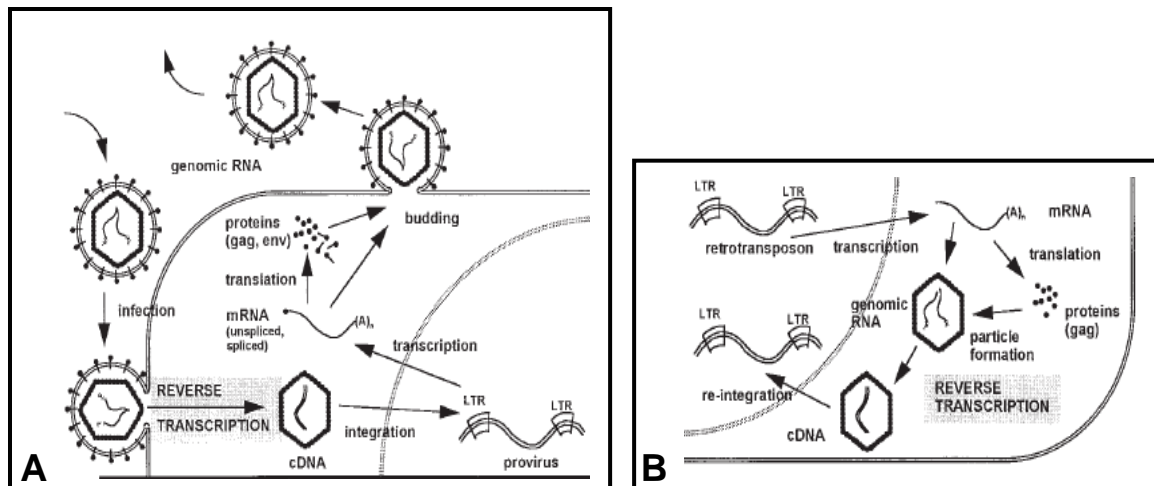


Abbildung 1.8: Vergleich retrovirale Replikation (A) und Retrotransposition (B)

Das Retrovirus (A) verlässt die Zelle und kann aufgrund des Vorhandenseins eines Hüllproteins wieder neue Zellen infizieren. Das LTR-Retrotransposon (B) zirkuliert nur intrazellulär bzw. es besteht beim Verlassen der Zelle keine Möglichkeit des Wiedereintritts (verändert nach Löwer et al. 1996).

Das murine exogene γ -Retrovirus MoMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) kann bei deletiertem *env*-Gen oder bei kompletter Deletion der viralen Leserahmen durch Transkomplementation derselben eine Retrotransposition durchführen (Tchenio und Heidmann 1991, 1992). Dabei können auch extrazelluläre Viruskapside durch elektronenmikroskopische Untersuchungen nachgewiesen werden. Diese Kapside stellen jedoch keinen Indikator der Retrotransposition dar. Das Vorhandensein dieser so genannten „virus like particles“ ist zurückzuführen auf die *in trans* bereitgestellten Proteine für Kapsid und Enzyme des Virus. Je stärker die Expression dieser Virusbestandteile ist, desto größer ist die Anzahl an VLPs und die Aktivität an reverser Transkriptase im Zellkulturüberstand (Tchenio und Heidmann 1992).

Retroviren hinterlassen gewöhnlich eine 4-6 Basenpaare (bp) umfassende Duplikation an der Stelle ihrer chromosomalen Integration (Lewinski 2006). Bei PERV und MLV betragen diese Duplikationen 4bp und im Fall von HIV sind es 5bp (Lewinski 2006).

Zusätzlich existieren u.a. von endogenen Retroviren prozessierte Pseudogene (Pavlicek 2002), wobei es sich um mRNAs derselben handelt, welche, vermittelt durch Proteine von endogenen LINE-1 Elementen, innerhalb des Genoms transponiert werden. Diese weisen im Gegensatz zu retrotransponierten Kopien retroviralen Ursprungs keine 4-6 Basenpaare umfassenden Duplikationen der Zielsequenz auf, sondern unregelmäßige, welche bis zu 18 bp umfassen können (Tchenio 1993). Zusätzlich verfügen diese Pseudogene über unterschiedlich stark verkürzte 5'-Enden, was auf eine geringe Prozessivität der reversen Transkriptase von LINE-1-Elementen zurückzuführen ist. Da es sich um revers transkribierte mRNAs handelt, verfügen diese *in trans* retrotransponierten Elemente über Poly(A)-Enden. Handelt es sich dabei um Elemente retroviralen Ursprungs, so fehlt demzufolge die komplette U5-Region der 3'LTR, da diese nicht Bestandteil der genomischen mRNA ist.

1.4.1 Retrotransposition und Xenotransplantation

Durch die willkürliche Integration des Retrotransposons stellt dieses eine Gefahr für die betreffende Zelle dar. Durch dieses Ereignis könnten Gene zerstört oder Onkogene transkribiert werden, ein Vorgang der als Insertionsmutagenese bezeichnet wird. Im Fall der nativen Retroviren MLV und PERV wurde gezeigt, dass diese Insertionen in der Nähe von Transkriptionsstartpunkten und CpG-Inseln erfolgen (Moalic 2006), was die Möglichkeit der Entartung der Zielzelle erheblich steigert. Je nachdem wie häufig dieses Ereignis stattfindet, stellt dieser Vorgang auch ein Risiko bei einer potentiellen Xenotransplantation dar. Hier würde man zwar Spendertiere verwenden, welche durch entsprechende Züchtung frei von replikationskompetenten, infektiösen Retroviren wären, allerdings sind nicht alle endogenen proviralen Elemente aus dem Genom zu entfernen (30-50 Kopien). Dies wäre durch Züchtung nur möglich, wenn alle chromosomalen Orte dieser Strukturen bekannt wären und diese sich zusätzlich durch eine polymorphe Verteilung in der Schweinepopulation auszeichnen würden (wie im Fall der replikationskompetenten Vertreter). Da dies nicht der Realität entspricht, kann auch nach Ausschluss von infektiösen Vertretern durch eine Komplementation der deletierten Proviren ein infektiöses Retrovirus entstehen. Dieses wäre zwar nicht mehr in der Lage weiter zu replizieren, jedoch nach erfolgter Integration fähig zu retrotransponieren. Dieser Vorgang wäre z.B. möglich, wenn an der Komplementation zum infektiösen Retrovirus ein *env*-deletiertes Provirus beteiligt ist.

1.4.2 Integration von Retroviren

Die Integrationsorte von Retroviren sind spätestens nach dem tragischen Fall einer französischen Gentherapiestudie von 2002 von öffentlichem Interesse geworden (Hacein-Bey-Abina et al. 2003). Im Rahmen dieser Studie wurden Kinder, welche über kein Immunsystem verfügen, einer Gentherapiestudie unterzogen. Das Fehlen des Immunsystems lässt sich auf einen angeborenen Fehler zurückführen. Im Gen der Gammakette der Immunglobuline haben sie eine Mutation und sind deshalb nur in Reinräumen lebensfähig (X-SCID - severe combined immunodeficiency). Im Rahmen dieser Studie wurden den Kindern Knochenmarkszellen entnommen und *ex vivo* mit einem retroviralen Vektor transduziert, welcher eine Bereitstellung des normalen Gens, der Gammakette der Immunglobuline, ermöglicht. Nach Rückführung der entsprechend transduzierten Zellen waren zunächst 9 von 11 der an der Studie beteiligten Patienten geheilt, was als ein Meilenstein der Gentherapie anzusehen war (Hacein-Bey-Abina 2002). Allerdings entwickelten 3 von 11 Kindern eine Leukämie, was auf den verwendeten retroviralen MLV-Vektor und dessen bevorzugte genomische Integrationsorte zurückzuführen war.

In diesem Fall, aber auch im Fall einer potentiellen Xenotransplantation, welche ebenso ein Infektionsrisiko für den humanen Empfänger und damit auch das Risiko einer Insertionsmutagenese birgt, ist das Wissen um den bevorzugten Integrationsort der entsprechenden Elemente essentiell. Eine Studie dazu (Moalic et al. 2006) hat gezeigt, dass die bevorzugten Integrationsorte von PERV und MLV nahezu identisch sind.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit umfasst zwei thematische Schwerpunkte.

Der erste Schwerpunkt liegt auf einer PCR-basierenden Durchmusterung verschiedener transgener Schweine hinsichtlich der Anwesenheit replikationskompetenter PERV-A und -B. Zusätzlich sollen PERV-C *env*-spezifische Anteile per PCR nachgewiesen werden. Dieses „PCR-„Screening“ dient dazu, Schweine zu züchten, die als potentielle Spender von Xenotransplantaten in Frage kommen, welche frei von replikationskompetenten polytropen PERV und vor allem frei von ekotropen PERV-C sind. PERV-C stellt aufgrund des Ekotropismus zwar keine direkte Infektionsgefahr dar, jedoch ist es die Basis einer A/C-Rekombinante, welche eine wesentlich höhere Infektiösität im Vergleich zu PERV-A und PERV-B aufweist. Da diese Rekombination in der Rezeptor Bindedomäne stattfindet, ist diese Variante in der Lage humane Zellen zu infizieren.

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit soll klären, ob HERV-K113 und PERV-B(33) in der Lage sind, sich mittels Retrotransposition intrazellulär zu vervielfältigen. Da sowohl im porzinen als auch im humanen Genom 30-50 Kopien dieser jeweiligen proviralen Elemente vorhanden sind, ist es wahrscheinlich, dass einige durch eine Retrotransposition entstanden sind und nicht ausschließlich durch Infektion der Keimbahn. In einem Assay, welcher auf Zellkultur und Antibiotikaselektion basiert, sollen diese Experimente durchgeführt werden. Dabei werden entsprechende Proviren verwendet, welche mit einer Indikatorkassette (*neo^{int}*) für die Retrotransposition modifiziert sind. Im Fall von PERV würde eine entsprechende Aktivität ein weiteres Risiko nach einer potentiellen Xenotransplantation bedeuten. Bezüglich HERV-K113 wäre es die erste nachgewiesene Aktivität eines solchen Elementes.

Ein verwandtes γ -Retrovirus von PERV, das murine exogene MoMLV, ist in der Lage diesen *env*-unabhängigen Vervielfältigungsmechanismus auszuführen und soll in den hier durchgeführten Experimenten als Positivkontrolle dienen.

Als Negativkontrollen sollen *gag/pol*-Deletionsmutanten der jeweiligen Konstrukte verwendet werden. Um zu gewährleisten, dass alle mit *neo^{int}* modifizierten Proviren im gleichen Maß in den verwendeten Zellen exprimiert werden, sollen alle durch denselben Promotor reguliert werden. Als Vergleich zu den identisch regulierten Konstrukten und um der realen Situation eher zu entsprechen, sollen zusätzlich Indikatorkonstrukte hergestellt werden, welche von den viruseigenen Promotoren reguliert werden.

Die beiden Schwerpunkte dieser Arbeit sind unter dem Gesichtspunkt der Risikoevaluierung im Rahmen einer potentiellen Xenotransplantation zu sehen.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen

2.1.1 Bakterienstämme

- DH5 α : *Escherichia coli* Stamm mit dem Genotyp: F⁻ Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r_K⁻, m_K⁺) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1 (Life Technologies)
- DH10B: *Escherichia coli* 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)
- GM2163: *Escherichia coli* 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: *Escherichia coli* 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': *Escherichia coli* 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 *Escherichia coli* mit dem Genotyp: Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)
- MRA (P2): 173 end A1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac(P2 lysogen) (Stratagene)

2.1.2 Säugerzellen

- 293: ECACC Nr. 85120602, Adenovirus-5 transformierte epitheliale Nierenzelllinie eines menschlichen Embryos (*Homo Sapiens*)
- 293T: Bei dieser Zelllinie handelt es sich um, von 293 abgeleitete Zellen, 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.
- D17: ECACC Nr. 98090403, Osteosarcoma-Zelllinie eines adulten Hundes (*Canis familiaris*)
- HeLa: ECACC Nr. 85060701, menschliche epitheliale Carcinoma-Zelllinie aus dem Gebärmutterhals (*Homo sapiens*)

2.2 Kulturbedingungen der Bakterienstämme

2.2.1 Kulturmedien

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

2.2.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

E.coli wurde in LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,0; autoklaviert) oder TB-Medium (12 g/l Trypton, 24 g/l Hefeextrakt, 4 ml Glycerin, 17 mM KH_2PO_4 , 72 mM K_2HPO_4 ; autoklaviert), bei 25-37°C unter Schütteln (200 rpm), kultiviert. Transformierte Bakterien wurden durch Zugabe der Antibiotika Ampicillin (50 µg/µl, Boehringer Mannheim) oder Kanamycin (50 µg/µl, Sigma) selektioniert.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Kultivierung von Säugerzellen

Die Zelllinien 293 und HeLa wurden in DMEM, unter Zugabe von L-Glutamin (2 mM), Penicillin (100 Units/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) (SP), NEA (Not Essential Aminoacids) sowie 10% hitzeinaktiviertem FKS (30 min 56°C), kultiviert. Die Kultivierungsbedingungen der Zelllinie 293T erforderte zusätzlich noch die Zugabe von Neomycin (500 µg/ml). Die Zelllinie D17 wurde in MEM kultiviert, welches mit SP, L-Glutamin, FKS und NEA versetzt wurde. Alle Zellen wurden zweimal pro Woche trypsiniert (10 ml 2,5% Trypsin Melnick, 15 ml Versen (159 mM NaCl, 3 mM KCl, 6,6 mM Na_2HPO_4 , 1,5 M KH_2PO_4 , 0,2 mM Titriplex) und 30 ml PBS ohne Mg/Ca)), im Verhältnis 1:2 bis 1:10 gesplittet und bei 37°C und 5 % CO_2 im Zellinkubator, kultiviert.

2.3.2 Einfrieren/Auftauen von Säugerzellen

Die Zellen wurden jeweils in einer mittelgroßen Flasche (80 cm², Nunc) bis zur Konfluenz kultiviert, anschließend trypsiniert und in 30 ml Kultivierungsmedium aufgenommen. Nach Pelletierung (200 x g, 3 min, 4°C) erfolgte, zellzahlabhängig, die Aufnahme in 1,5 bis 3 ml Einfrierlösung (90 % FKS, 10 % DMSO, Sigma). Nach Überführung in Einfriergefäße (Cryo Vials, Greiner) und 2h Lagerung bei -20°C, wurden die Zellen nach Übernachtinkubation bei -80°C, in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Cryo Vials bei 37°C (in der Hand) schnellstmöglich aufgetaut und in frischem Kultivierungsmedium ausgesät. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel, um das restliche DMSO des Einfriermediums, zu entfernen.

2.3.3 Transiente Transfektion von Säugerzellen

Die Transfektion der verwendeten Säugerzellen erfolgte entweder mittels Lipofectamine (Invitrogen, Karlsruhe), das den Gentransfer in eukaryotische Zellen durch Ausbildung von stabilen DNA-Liposomen-Komplexen vermittelt oder mit GeneJuice (Merck Bioscience, Darmstadt), ein auf Polyamin basierendes Transfektionsreagenz.

Lipofectamine

Es wurden 3×10^5 Zellen pro Sechsllochplatte (35 mm^2 , Nunc) ausgesät und über Nacht kultiviert. Pro Transfektionsansatz wurden 1-3 μg Plasmid-DNA, sowie 2-25 μl Lipofectamine, je in 100 μl serumfreien Medium (Optimem 1, Life Technologies) verdünnt, gemischt und zur Komplexbildung 15-45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen der zu transfizierenden Zellen mit PBS (ohne Mg/Ca) und Optimem 1 wurde 1 ml des DNA-Liposomen-Komplexes, nach Verdünnung mit 800 μl Optimem 1 zugegeben. Nach 4 bis 5 Stunden wurde der Transfektionsansatz durch serumhaltiges Medium ersetzt. Nach ein bis zwei weiteren Tagen wurde die Selektion auf positiv transfizierte Zellen durch Zugabe von Hygromycin (200-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) eingeleitet oder die Zellen zur Bestimmung der Transfektionseffizienz für indirekte Immunfluoreszenzanalysen, fixiert.

GeneJuice

Wiederum wurden 3×10^5 Zellen pro Sechsllochplatte (35 mm^2 , Nunc) ausgesät und über Nacht kultiviert. Pro μg DNA (1-3 μg wurden eingesetzt) wurden 3-6 μl GeneJuice verwendet. Je Transfektionsansatz wurde zu 100 μl Medium tropfenweise GeneJuice gegeben, gut gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die zu transfizierende Plasmid-DNA zugegeben, gemischt und 5-15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Ansatz wurde tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach ein bis zwei weiteren Tagen wurde die Selektion auf positiv transfizierte Zellen durch Zugabe von Hygromycin (200-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) eingeleitet oder die Zellen zur Bestimmung der Transfektionseffizienz für indirekte Immunfluoreszenzanalysen fixiert.

2.3.4 Stabile Transfektion von Säugerzellen

Die Transfektion erfolgte analog entweder mit Lipofectamine oder GeneJuice. Zur Herstellung einer stabilen Transfektion wurden die Zellen entweder mit Hygromycin (200-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder G418 (500-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) fortan kultiviert. Somit wurde die eingebrachte DNA ein stabiler Bestandteil des Zellgenoms.

2.3.5 Aktivitätsbestimmung der reversen Transkriptase (RT)

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

Zur Bestimmung der RT-Aktivität in Zellkulturüberständen wurden diese steril filtriert (0,45 μm ; Sartorius) und in Aliquots zu 100 μl bei -80°C gelagert.

2.3.6 Retrotranspositions-Assay

Um Retrotranspositionereignisse detektieren zu können, wurde ein Neomycin Indikatorsystem verwendet (Freeman et al. 1994). Dieses besteht aus einem revers orientierten Neomycingen, welches von einem „vorwärtsgerichteten“ Intron unterbrochen ist und durch einen SV40 Promotor reguliert wird. Das Intron wird 5' und 3' von Spleißdonor und

- akzeptorstellen flankiert. Das Indikatorgen wird anstelle des für die Retrotransposition nicht notwendigen *env*-Gens in die Moleklarklone der untersuchten Proviren eingefügt. Zusätzlich ist ein eigenständiges Hygromycinresistenzgen zur Selektion transfizierter Zellen Bestandteil der fertigen Konstrukte. Nach erfolgter Transfektion der Konstrukte und Integration in das Wirtsgenom kann das modifizierte Provirus transkribiert werden und zur Bildung der mRNA gespleißt werden. Dabei wird das Intron, welches das Neomycingen unterbricht, entfernt. Anschließend erfolgt die reverse Transkription dieser mRNA durch die provirale RT. Die entstehende DNA reintegriert an anderer Stelle in das Wirtsgenom und vermittelt der entsprechenden Zelle eine Resistenz gegen G418, ein Neomycinanalog (Abb. 2.1). Somit beherbergen alle Zellen, welche resistent gegen G418 sind, ein Retrotranspositionereignis.

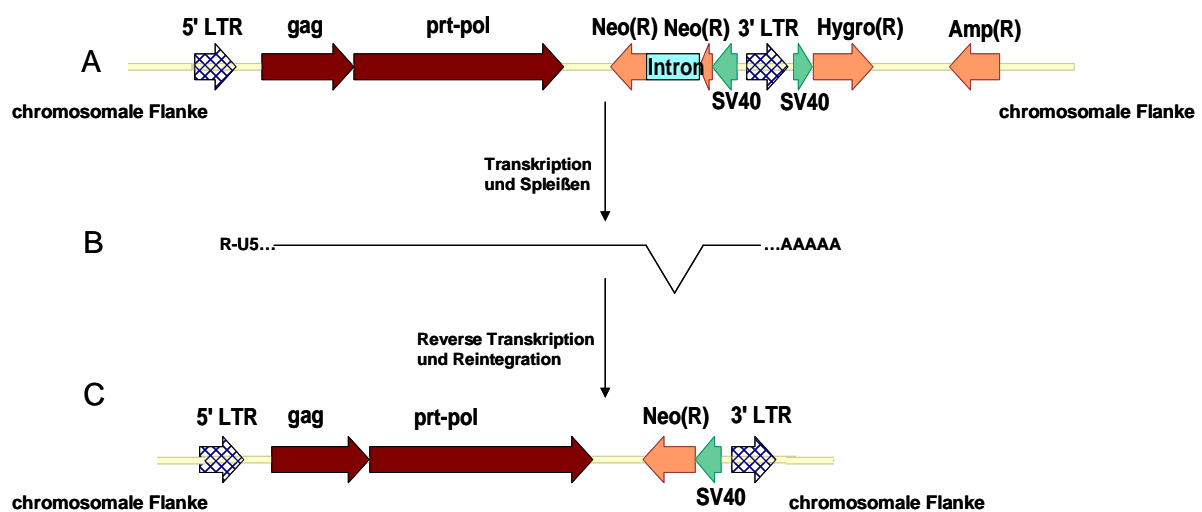


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Neomycin-Indikatorsystems

Nach Transfektion und anschließender Integration ins Genom der Zellen werden die mit Neomycin markierten Konstrukte transkribiert (A). Dabei wird das Intron, welches das Neomycingen unterbricht, herausgespleißt (B) und die mRNA von der reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben, welche an einer anderen Stelle des Genoms reintegriert (C).

Der experimentelle Ablauf eines Retrotranspositionsassays ist in Abb. 2.2 schematisch dargestellt. Nach Transfektion wurden hygromycinresistente Zellen bis zu einer Zellzahl von 10^6 - 10^7 expandiert. Anschließend wurden diese entweder in Triplikaten zu 1 Mio oder 2 Mio ausgesät und am darauffolgenden Tag mit G418 versetzt (500-1000 $\mu\text{g/ml}$) oder ungezählt direkt mit G418 behandelt. Nach 10-14 Tagen wurden die resultierenden neomycinresistenten Zellkolonien entweder zur Auszählung mit Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblau Lösung (Merck, Darmstadt) angefärbt (die zuvor gezählten) oder abgesaugt und zur weiteren Analyse (EPTS/LM-PCR, magnetic extension primer tag selection/ligation mediated) einzeln expandiert. Aus der gefärbten Fraktion wurde, ausgehend von der Anzahl der ursprünglich ausgesäten Zellen, die Frequenz der Retrotransposition berechnet.

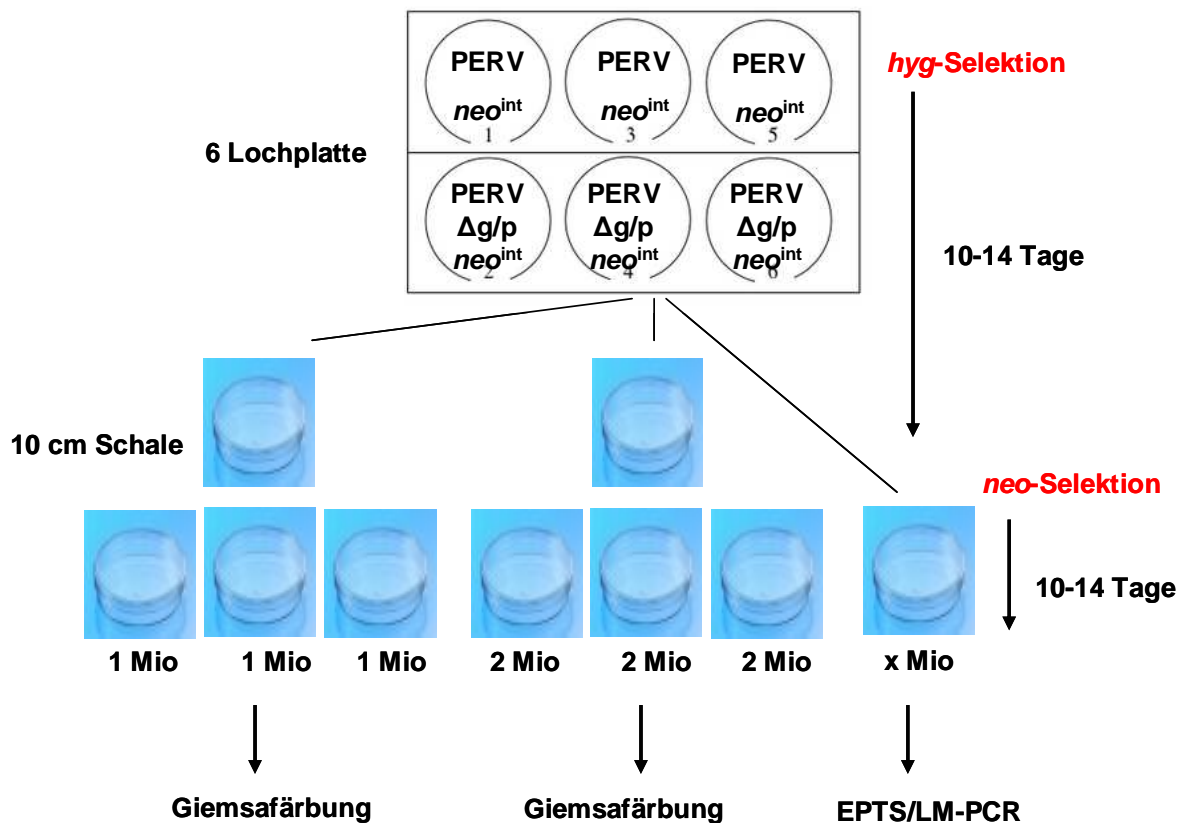


Abb. 2.2: Experimenteller Ablauf des Retrotranspositions Assays

Transfektion von Zellen in 6-Lochplatten mit anschließender 10-14 Tage dauernder Hygromycin Selektion. Währenddessen wurden die Zellen, ausgehend von einem Loch einer 6 Lochplatte, expandiert, bis drei 10 cm Schalen konfluent bewachsen waren. Dann wurden die Zellen von zwei dieser Schalen gezählt und einerseits dreimal 1 Mio, andererseits dreimal 2 Mio Zellen, auf drei neue 10cm Schalen ausgesät und mit G418 versetzt. Den verbleibenden Zellen der dritten Schale wurde ungezählt G418 zu gegeben. Nach 10-14 Tagen wurden die überlebenden Zellen der beiden gezählten Fraktionen gefärbt, die der ungezählten zur weiteren Analyse expandiert (EPTS/LM-PCR).

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.4.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Alkalische Lyse

Bakterienzellen aus einer 5 ml Übernachtskultur (TB-Medium) wurden pelletiert (30 sec bei 13.000 Upm) und in 100 μ l kaltem GTE-Puffer (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA), resuspendiert. Nach Zugabe von 200 μ l Lysis Puffer (200 mM NaOH, 1 % SDS), wurden die Zellen 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150 μ l 3 M Natriumacetat zur Neutralisation wurden Zelltrümmer und chromosomale DNA pelletiert (5 min, 13.000 Upm). Die Plasmid-DNA wurde aus dem Überstand durch Zugabe von zwei Volumen Ethanol (96-100%) 2 min auf Eis gefällt und anschließend pelletiert (5 min, 13.000 Upm). Nach Trocknen wurde das Pellet in 30-60 μ l RNase A-haltigem (0,1 mg/ml, Boehringer Mannheim) Puffer aufgenommen.

Minipräparation (QIAprep® Miniprep)

Die Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (5 ml Bakterienkultur) erfolgte zusätzlich mit dem QIAprep® Miniprep Spin Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Anionentauschersäulen.

Diese Methode wurde nur verwendet, wenn die Plasmide sequenziert werden sollten, da die hier gewonnene DNA eine größere Reinheit besitzt als bei der zuvor beschriebenen alkalischen Lyse.

Midi-und Maxipräparation

Die Präparation von Plasmid-DNA im größeren Maßstab (50-250 ml Bakterienkultur) erfolgte mit dem QIAfilter Plasmid Midi bzw. Maxi Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Anionentauschersäulen. Die Verwendung des EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) gewährleistete die Entfernung bakterieller Endotoxine aus dem Präparationsansatz, da diese die Transfektion eukaryotischer Zellen inhibieren können.

2.4.1.2 Isolierung genomischer DNA aus kultivierten Säugerzellen

Die Präparation genomischer DNA aus Säugerzellen wurde mit dem QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurde jeweils aus etwa 10^6 Zellen (ein Loch einer Sechslöchplatte) die genomische DNA isoliert. Auch hier wird die DNA mittels Anionentauschersäule aufgereinigt.

2.4.1.3 Isolierung genomischer DNA aus Blut

QIAamp DNA Blood Kit

Die Isolierung genomischer DNA aus porzinen Blutproben erfolgte mit dem QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen) entsprechend den Instruktionen des Herstellers. Als Ausgangsmaterial wurden 10 ml in EDTA aufgenommenes Vollblut eingesetzt.

Die isolierte genomische DNA wurde in einer entsprechenden Menge H_2O_{dest} gelöst und bei 4°C gelagert.

Präparation nach Blin und Stafford

Hochmolekulare genomische DNA aus Blut zur Generierung von Genbanken wurde mittels Tris-äquilibriertem Phenols in Anlehnung an ein Protokoll von Blin und Stafford (1976) isoliert. Hierzu wurde wässriges Phenol mit Tris/HCl pH 8,0 versetzt, gut durchmischt und nach Phasentrennung die wässrige Phase verworfen. Dies wurde dreimal wiederholt bis die phenolische Phase einen pH-Wert von mehr als 7,8 aufwies.

Zunächst wurde das frisch entnommene Blut mit einem sechstel ACD-Mix (0,48 g Zitronensäure, 1,32 g Natriumcitrat, 1,47 g Glucose; auffüllen mit Wasser auf 100 ml und sterilfiltrieren über 0,45 µm Filter) versetzt, um eine Koagulation zu verhindern. Anschließend

wurde dieser Ansatz 15 min bei 4°C und 4.500 Upm, zentrifugiert. Die dabei entstehenden „Pellets“ wurden in 10 ml Extraktionspuffer (10 mM Tris, 100 mM EDTA, 0,5% SDS) aufgenommen und 1 Stunde bei 37°C mit RNaseA (10 mg/ml) behandelt. Anschließend wurde Proteinase K (20 µg/ml) zugegeben und 3 Stunden bei 54°C inkubiert bevor erstmals 10 ml 0,5 M Tris äquilibriertes Phenol zur Extraktion zugegeben wurde. Nach dreimaliger Wiederholung dieses Schrittes wurde die im Überstand befindliche DNA mit 1/5 Volumen 10 M NH₄-Acetat und 2 Volumen 100% Ethanol bei 4°C über Nacht gefällt. Am nächsten Tag wurde der Ansatz 25 min bei 5.000 Upm und 4°C zentrifugiert, anschließend einmal mit 80% Ethanol gewaschen und danach zum Trocknen invertiert. Als Letztes wurde eine dem DNA-Pellet entsprechende Menge Tris-EDTA (TE)-Puffer zugegeben und die Konzentration der DNA-Lösung fotometrisch bestimmt.

2.4.1.4 Isolierung genomischer DNA aus Schweineohrstanzen

Zur Isolierung genomischer DNA aus Schweineohrstanzen wurden diese nach Zerkleinerung zunächst über Nacht mit 500 µl HOM-Puffer (80 mM EDTA, 160 mM Sucrose, 100 mM TrisCl pH 8,0, 0,5% SDS) und 10 µl Proteinase K (20 µg/µl) inkubiert. Am nächsten Tag wurden 700 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) und 200 µl 4,5 M NaCl zugegeben, gemischt und anschließend 3 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Nach Zentrifugation entstanden verschiedene Phasen, wobei die oberste, wässrige Phase, welche die DNA enthält, in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Die DNA wurde durch Zugabe von Isopropanol präzipitiert. Nach zweimaligem Waschen mit 70%-igem Ethanol wurde das Pellet getrocknet und in einer geeigneten Menge TE-Puffer aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

2.4.1.5 Isolierung genomischer RNA aus Säugerzellen

Die Isolierung von Total-RNA aus Säugerzellen erfolgte mittels des TRIzol-Reagenz (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Nach Homogenisierung im Phenol- und GTC-haltigen TRIzol-Reagenz wurden die Phasen durch Zugabe von Chloroform getrennt und die RNA mit Isopropanol präzipitiert. Die Reinheit der gewonnenen RNA wurde fotometrisch überprüft und eine mögliche Degradation durch Gelelektrophorese der glyoxylierten RNA ausgeschlossen. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.4.2 Fotometrische Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Die fotometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren beruht auf den unterschiedlichen Absorptionsmaxima von Nukleinsäuren (260 nm) und Proteinen (280 nm). Für reine DNA liegt der Quotient von OD₂₆₀/OD₂₈₀ (OD = optische Dichte) zwischen 1,6 und 1,8, für reine RNA zwischen 2,0 und 2,2. Die Messung erfolgte im Fotometer (Amersham Bioscience, GeneQuant *pro*).

2.4.3 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte elektrophoretisch. Dazu wurde Agarose (Invitrogen) 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. Zum Auftragen wurden die Proben mit 1/6 Volumen Gelladepuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 30% Glycerin) gemischt. In Abhängigkeit der Fragmentgröße erfolgte die Auftrennung bei 5 bis 12 V/cm über einen Zeitraum von 1-20 Stunden in 0,8 bis 2%-igen Agarosegelen.

2.4.4 Agarosegelelektrophorese von RNA

Die Auftrennung von RNA entspricht der DNA-Gelelektrophorese mit folgenden Abweichungen: Vor einer Gelelektrophorese muss die RNA denaturiert werden (DMSO-Mix (87,5% DMSO, 3,5% 0,5 M NaPO_4 , 1,5% 20% SDS, 7,5% H_2O) 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 einen pH-Umschlag und damit eine Denaturierung der RNA zu verhindern. Außerdem wird der Agarose kein Ethidiumbromid zugesetzt. Das Gel wird nach Ende der Elektrophorese zur Visualisierung der RNA unter UV-Licht kurz in einem Ethidiumbromidbad inkubiert.

2.4.5 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des *GeneClean Turbo Kit* (Qbiogene) nach Angaben des Herstellers. Hierbei wird die DNA nach Zersetzung der Agarose an eine Matrix gebunden und kann nach Waschen eluiert werden.

2.4.6 Auffüllen kohäsiver Enden der DNA

Wenn DNA Fragmente ligiert werden sollten, welche zuvor mit Enzymen restringiert wurden, die unterschiedliche Enden bilden, wurden diese mit Hilfe der Klenow Large Fragment Polymerase (NEB) oder der T4 DNA Polymerase (NEB) aufgefüllt. Durch Zugabe von Nukleotiden wurden somit glatte Enden produziert, welche ligiert werden konnten.

2.4.7 Dephosphorylierung von DNA

Um zu verhindern, dass nach einer Restriktion die linearisierte DNA sich wieder rezirkuliert, wurde diese dephosphoryliert. Dazu wurde diese 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. Anschließend wurde die DNA aufgereinigt.

Alternativ wurde die Antarctic Phosphatase (New England Biolabs) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dieses Enzym kann hitzeinaktiviert werden, so dass eine anschließende Aufreinigung der DNA überflüssig wird.

2.4.8 Extraktion von DNA aus Reaktionsansätzen

Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus Reaktionsansätzen (z.B. nach Dephosphorylierung), wurden diese mit 1 Volumen Phenol (pH 7,4; Roth) versetzt, kurz gemischt und zur Phasentrennung zentrifugiert. Durch anschließende Ethanolfällung wurde die DNA zurückgewonnen.

Extraktion mit Hilfe einer Säulenmatrix

Hierbei wurden das GeneClean Turbo Kit (QBiogene) und das QIAspin PCR Purification (Qiagen) Kit nach Angaben der Hersteller verwendet.

2.4.9 Ligation

Zur kovalenten Verknüpfung von Insert- und Vektor-DNA wurden äquimolare Mengen der zu verknüpfenden Fragmente eingesetzt und durch die Verwendung der T4-DNA Ligase (Invitrogen) zusammengefügt. In einem Reaktionsvolumen von 10-20 µl wurden 10-200 ng Vektor-DNA mit 1 µl T4 DNA Ligase (2U) und entsprechende Mengen von 5x T4 DNA Ligase Puffer und Insert-DNA bei 4-37°C für 1-48 Stunden inkubiert. Nach Inkubation wurde der Ligationsansatz kurz bei -20°C eingefroren. Zur anschließenden Transformation in kompetente *E. coli* Stämme wurden 4-20 µl des Ligationsansatzes eingesetzt.

2.4.10 Transformation

Kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 4-20 µl eines Ligationsansatzes oder im Falle einer Retransformation mit 1-10 ng Plasmid DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (42°C, 45 sec) wurden die Zellen zwei Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mit 400-900 µl SOC-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,05% NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Glucose, pH 7,0) versetzt. Zur Regeneration wurden die Zellen für 1 h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Selektionsnährboden ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.4.11 Herstellung kompetenter Bakterien

Die DNA Aufnahme von Bakterien ist nur möglich, wenn diese dafür kompetent gemacht wurden. Um diese Kompetenz zu erlangen wurden 100 ml Kulturen der Bakterienstämme DH5α, DH10B, TOP 10 F' oder GM2163 bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,55, kultiviert. Nach Inkubation auf Eis (5 min) wurden die Zellen pelletiert (3.700 x g, 10 min, 4°C) und in 20 ml Lösung TFB1 (30 mM KAc, 100 mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂·2H₂O, 50 mM MnCl₂·4H₂O, 15% Glycerin (v/v), pH 5,8) resuspendiert und erneut 5 min auf Eis inkubiert. Nach wiederholtem Pelletieren wurden die Zellen in 2 ml Lösung TFB2 (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15% Glycerin (v/v), pH 6,5) aufgenommen und für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden 100 µl Aliquots auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.4.12 Anlegen einer λ -Phagen Genbibliothek

Für die Generierung einer λ -Phagen Genbibliothek wurde hochmolekulare genomische DNA aus PBMCs von Schweinen partiell mit der Restriktionsendonuklease *Sau3AI* restringiert. Die Enzymkonzentration wurde so eingestellt, dass der Großteil der Restriktionsfragmente eine Größe von 9-23 kb aufwies, was der Insertkapazität des Lambdaphagen (FIX/XhoI Partial Fill-In Vector-Systems (Stratagene)) entspricht. Zur Erzeugung Vektor-kompatibler Enden wurden die Restriktionsfragmente mit den Desoxynukleosidtriphosphaten dGTP und dATP aufgefüllt. 0,3 μ g der aufgefüllten Genomfragmente wurden in Gegenwart von 1 mM rATP in einem Ligationsansatz mit 1 μ g λ -Vektor (Stratagene) vereinigt. Der Ligationsansatz wurde aliquotiert und zu den Verpackungsextrakten (Gigapack II Gold, Stratagene) gegeben. Die Verpackungsreaktion wurde nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur durch die Zugabe von 500 μ l SM-Puffer und Chloroform (20 μ l) abgestoppt. Durch kurzes Zentrifugieren wurden Zelltrümmer des Verpackungsextraktes sedimentiert. Die Überstände konnten bei 4°C gelagert oder direkt titriert werden. Zur Titration wurden Bakterien des Stammes *E.coli* XL1 in 50 ml LB Medium, das mit 0,2% Maltose und 10 mM $MgSO_4$ supplementiert war, kultiviert. Die Bakterien wurden geerntet und mit $MgSO_4$ auf eine OD_{600} von 0,55 eingestellt und für 15 min bei 37°C mit 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} Verdünnungen des Überstandes inkubiert. Das Gemisch aus Bakterien und adhären Phagen wurde mit 48°C warmer Agarose gemischt und auf NZY-Agarplatten (5 g NaCl, 2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 g Hefeextrakt, 10 g NZ Amine, ad 1 Liter mit deionisiertem H_2O , pH7,5, autoklaviert) ausplattiert. Der Titer des Überstandes wurde nach über Nacht-Inkubation bei 37°C durch Auszählen der Plaques im Bakterienrasen bestimmt. Zur Amplifikation der Genbank wurden die aliquotierten Überstände vereinigt und analog zur Titration auf 24x24 cm NZY-Agarplatten (Nunc) ausplattiert. Die konfluent lysierten Platten wurden mit SM-Puffer überschichtet. Die Elution der Phagen in den Puffer fand während einer 24-stündigen Inkubation unter leichtem Schwenken bei 4°C statt. Das Phageneluat wurde gesammelt und durch Zugabe von 1 μ l/ml Chloroform für eine dauerhafte Lagerung bei 4°C konserviert.

2.4.13 Phagenplaque Lifting

Zur Durchmusterung der Phagenbibliothek wurden sechs große Petrischalen (~500 cm²), deren Bakterienrasen nahezu komplett lysiert waren, mit Nylonmembranen bedeckt. Die Membranen wurden abgezogen und mit der anhaftenden Phagen-DNA je eine Minute in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl), Neutralisationslösung 1 (0,5 M Tris-HCl (pH 7,5), 1,5 M NaCl) und Neutralisationslösung 2 (2x SSC, 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5)) geschwenkt. Die DNA-Fixierung erfolgte durch zweistündiges Backen bei 80°C in einem Wärmeofen. Die Membranen wurden wie unter 2.4.14 beschrieben behandelt. Die Petrischalen wurden im Kühlschrank gelagert bis anhand der Autoradiogramme positive Phagenplaques identifiziert und isoliert werden konnten. Mit einer Pasteurpipette wurden entsprechende Bereiche ausgestochen und zur Elution der Phagen in SM-Puffer überführt. Die Durchmusterung wurde bis zur Homogenität der Klone wiederholt.

2.4.14 Transfer von Nukleinsäuren

Kapillarblotting nach Southern

Das Prinzip dieser Methode ist der Transfer eines DNA-Bandenmusters aus einem Agarosegel auf Nitrocellulose- oder Nylonmembranen vermittelt durch einen Kapillarstrom. Für diesen Zweck erfolgte im Anschluss an die Agarosegelelektrophorese eine 30-minütige Denaturierung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) der DNA. Sofern die zu transferierenden Fragmente größer als 10 kb waren wurde vorher eine Depurinierung (15 min, 0,2 N HCl) durchgeführt, um durch Fragmentierung der DNA einen vollständigen Transfer zu gewährleisten. Nach zweimaliger Inkubation für 15 min in Neutralisationslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris/HCl pH 7,5) wurde das Gel auf Whatman-3MM-Papier gebettet, welches in ein mit 20x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0) gefülltes Reservoir taucht. Direkt auf das Gel wurde eine Nylonmembran (Hybond N, Hybond N⁺, Amersham oder Porablot NY amp, Machery und Nagel) plaziert. Die Seitenränder wurden, zur Verhinderung seitlicher Diffusionsströme, mit Haushaltsfolie abgedichtet und der Blotaufbau durch mehrere Lagen 3MM-Papier (Whatman) sowie einen Stapel saugfähigem Papier, welcher mit einem Gewicht beschwert wurde, abgeschlossen. Nach Beendigung des Transfers wurde die DNA durch UV-Bestrahlung in einem UV-Transilluminator (Stratagene) kovalent an die Nylonmembran gebunden. Die Membranen wurden entweder bei 4°C gelagert oder direkt hybridisiert (2.4.16).

2.4.15 Markierung von Restriktionsfragmenten

Die radioaktive Markierung von Restriktionsfragmenten erfolgte mit dem Multiprime DNA Labelling System (Amersham), nach Feinberg und Vogelstein (1983). Hierzu wurden 5-50 ng des durch Isolation aus einem Agarosegel aufgereinigten Restriktionsfragmentes (Sonde) zusammen mit 5 µl eines randomisierten Hexanukleotidgemisches sowie 10 µl eines 10x Puffers thermisch denaturiert (5 min; 100°C) und auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 2 Einheiten Klenow DNA-Polymerase und 5 µl ³²P dCTP folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA abgestoppt und zur Entfernung nicht inkorporierter Radionukleotide über eine Sephadex G50 Säule (Pharmacia) fraktioniert. Die spezifische Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde im Szintillationszähler durch Čerenkov-Messung quantifiziert.

2.4.16 Hybridisierung mit DNA Fragment Sonden

Zur Unterdrückung unspezifischer Hybridisierungen der Sonden DNA wurden die Nylonmembranen in Rollbehältern einer einstündigen Vorinkubation bei 65°C in Hybridisierungslösung (5x Denhardt, 6x SSC, 0,5% SDS, 50 µg/ml Hefe-tRNA (Life Technologies)) unterzogen. Die doppelsträngigen Sonden wurden durch zehnmütiges Kochen denaturiert und 500.000-1.000.000 cpm/ml in frischer Hybridisierungslösung auf die prähybridisierten Membranen gegeben. Die Sonden verblieben für 16-72 h im Hybridisierungssofen bevor ungebundene Sonden DNA von den Membranen entfernt wurde. Zunächst wurde zweimal mit Waschpuffer I (2x SSC; 0,1 % SDS) für 30 min bei 65°C inkubiert. Es schloß sich eine einstündige Inkubation im Waschpuffer II (0,1x-0,75x SSC; 0,1 % SDS) bei 65°C an. Die Stringenz der Waschschrirte wurde durch die SSC-Konzentration

im Waschpuffer II variiert. Anschließend wurden die Membranen in Plastikfolien eingeschweißt und die komplementäre Anbindung von radioaktiv markierter Sonden DNA mittels Autoradiographie detektiert.

2.4.17 Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR

Spezifische DNA-Bereiche wurden mittels PCR (Saiki et al. 1985) amplifiziert. Zum Einsatz kam die rekombinante thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase AmpliTag (PE Applied Biosystems).

Zur Amplifikation größerer DNA-Fragmente (5-15 kb) wurde zum Einen das ExpandLong PCR System (Roche) verwendet und zum Anderen die Phusion Polymerase (New England Biolabs). An Heizblöcken kamen der Mastercycler Gradient (Eppendorf) und der Genius (Techne) zur Anwendung.

Ein Standardansatz (20 µl) enthielt 10xPCR Puffer (10 mM Tris/HCl (pH 8,5), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% Gelatine), je 4 µM Primer, 10 mM dNTPs, 10-300 ng DNA und 1 U Taq-Polymerase.

Allen PCR-Programmen ging eine initiale Denaturierung bei 94 bis 98°C, für 3 min voraus. Die Zyklen begannen erneut mit einer Denaturierung (30-45 sec). Die Dauer und die Temperatur bei Oligonukleotidbindung (Annealing) sowie die Dauer der Verlängerung (Elongation) der neuentstehenden DNA Stränge unterscheiden sich in Abhängigkeit von der Länge des zu erwarteten DNA-Fragments und der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide (Primer). Nach 25-35 Zyklen bestehend aus Denaturierung, Annealing (30 sec – 1 min) und Elongation (1 min – 10 min), schloß eine finale Elongation von 10-20 min die PCR ab.

RT-PCR

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

EPTS/LM-PCR

Die EPTS/LM-PCR (magnetic extension primer tag selection/ligation mediated) (Schmidt et al. 2001) erlaubt die Bestimmung unbekannter, flankierender DNA-Sequenzen, ausgehend von einer definierten Zielregion. Zur Bestimmung der 3' flankierenden genomischen Flanken von retrotransponierten Kopien wurde die Ziel-DNA mit einem Restriktionsenzym geschnitten, welches innerhalb des Retrotransposons 5' (stromaufwärts) der ursprünglichen Spleißstelle des Introns und innerhalb des Neomycingens liegt (vgl. Abb. 2.3). Anschließend erfolgte die „Primer Extension“, eine PCR mit nur einem biotinyliertem, neomycinspezifischen Primer, der spezifisch für die gespleißte Variante des Retrotransposons ist und somit nur an das Neomycin der retrotransponierten Kopie bindet. Nach Aufreinigung dieser PCR-Reaktion wurden an Streptavidin gekoppelte magnetische „Beads“ (Kügelchen) zugegeben, wonach

Streptavidin an das Biotin des Primers bzw. der spezifischen Amplifikate bindet und diese durch Einsatz eines Magneten von unspezifischen Amplifikaten getrennt werden. Anschließend wurde den spezifischen Amplifikaten ein Linker angefügt, der die Sequenz des Reversprimers für die abschließende PCR liefert (vgl. Abb. 2.3). Dabei wurde als Vorwärtsprimer erneut ein neomycinspezifisches Oligonukleotid verwendet. Resultierende Amplifikate unterschiedlicher Größe wurden subkloniert (pCR Blunt TOPO II, Invitrogen) und nach Restriktionsanalyse zur Sequenzierung geschickt.

1-2 µg genomische DNA wurden restringiert mit 6U eines Enzyms (*MscI*, *Scal*) (NEB), über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend mit dem GeneClean Turbo Kit (QBiogene) aufgereinigt. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte HeLa Zellen während als Positivkontrolle zur Amplifikation einer zum *neo*-Gen benachbarten Region mit 1 ng von pSV2neo (Clontech, Heidelberg) vermischte HeLa Zellen verwendet wurden. Für die „primer extension“ (95°C für 5 min, 65°C für 30 min und 72° C für 30 min) wurde die aufgereinigte und restringierte genomische DNA zum folgenden Reaktionsmix hinzu gegeben:

2,5U	Cloned Pfu DNA Polymerase (Stratagene)
5µl	10x Cloned Pfu DNA Polymerase-Reaktionspuffer
250µM	dNTPs (Eurogentec)
0,25µM	5'biotinylierte neospezifischer Primer GS177 (Operon, Köln)
aqua dest. ad 50µl	

Anschließend wurde dieser Reaktionsmix wiederum mit dem GeneClean Turbo Kit (QBiogene) aufgereinigt, um überschüssige biotinylierte Oligonukleotide zu entfernen. Nach Elution in 40 µl H₂O und Vermischen mit 200µg Streptavidin gekoppelten magnetischen „Beads“ (Dynabeads M-280 Streptavidin, Dynal Biotech, Hamburg), welche in 40 µl 2X BW Puffer (10 mM Tris HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 2 M NaCl) gelöst wurden, wurde der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur in einem Überkopfrötator inkubiert. Danach wurde diese Reaktion auf einen magnetischen Separationsständer (Promega) gestellt, wobei die magnetischen „Beads“, mit den daran gekoppelten spezifischen Amplifikaten isoliert wurden. Der Überstand wurde verworfen und die geschnittene, am Magneten haftende DNA, zweimal mit 100 µl H₂O gewaschen und anschließend in einem 10 µl Ligationmix resuspendiert (6U T4 DNA Ligase (Invitrogen), 2 µl 5xLigase Puffer, 10 µM Linker OC [wird durch Annealing der Oligonukleotide GS117 und GS118 hergestellt] und aqua dest ad 10 µl). Die Ligation wurde bei 16°C über Nacht durchgeführt. Am nächsten Tag wurde die Reaktion zweimal mit 100 µl H₂O gewaschen und in 10 µl aqua dest. resuspendiert, wovon 2 µl zur folgenden PCR eingesetzt wurden.

2µl „Ligation“
3U Expand Long Range Ploymerase Mix (Roche)
5µl 10xExpand Long Template PCR Puffer 1
200µM dNTPs (Eurogentec)
25µM Primer GS94
25µM Primer OCI (Linker OC spezifisch)
ad aqua dest 50µl

Das folgende PCR-Programm wurde verwendet:

Einleitende Denaturierung der DNA:

94°C 5 min

Exponentielle Amplifikation:

94°C	30 sec (Denaturierung der DNA)	} 35 Zyklen
62°C	45 sec (Primeranlagerung)	
68°C	3 min (Elongation)	

Abschließende DNA Elongation:

68°C 10 min

Die PCR-Produkte wurden auf einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt und mit dem GeneClean Turbo Kit (QBiogene) reisoliert. Nach Subklonierung und Restriktionsanalyse wurden entsprechende Fragmente zur Sequenzierung geschickt (MWG Biotech AG, Martinsried).

In Abbildung 2.3 ist eine schematische Darstellung der EPTS/LM-PCR gezeigt.

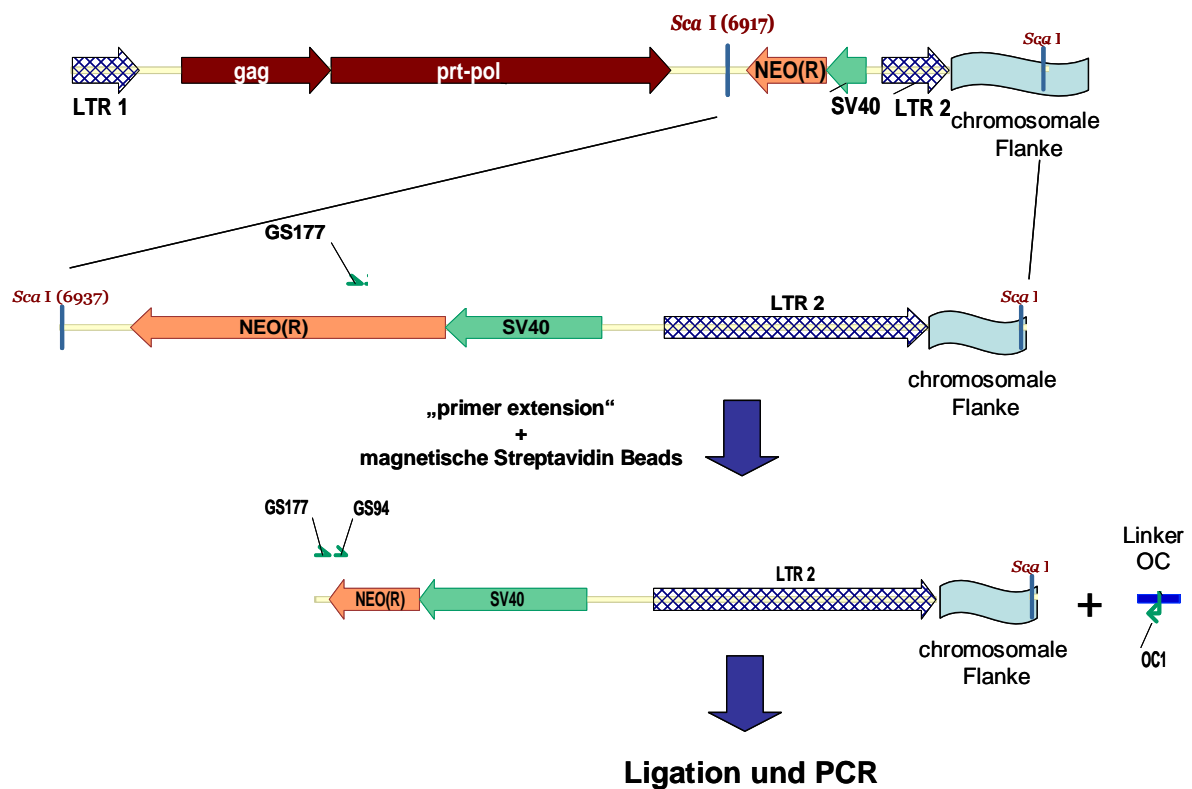


Abb. 2.3: Schematische Darstellung einer EPTS/LM-PCR
(Erläuterungen s. Text)

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Herstellung von Zelllysaten

Zelllysate wurden von konfluent bewachsenen 6 Lochplatten hergestellt. Hierzu wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS ohne Mg und Ca gewaschen und anschließend in 1 ml kaltem PBS + 1 mM EDTA abgelöst, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 1 ml PBS zugegeben. Nach Zentrifugation (10 min, 1200 Upm, 4°C) wurde das Zellpellet einmal mit PBS gewaschen, erneut abzentrifugiert und 200 µl Lysierpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM EDTA, 0,15 M NaCl, 1% NP40), welcher PI (Proteaseinhibitoren) (100x PI-Lösung: 100 mM PMSF, 1 mg/ml Aprotinin, 1 mg/ml Leupeptin, 1 mg/ml Pepstatin) enthält, zugegeben. Nach einstündiger Lyse auf Eis wurde der Ansatz abzentrifugiert (10 min, 13000 Upm, 4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

2.5.2 Fotometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Der Proteingehalt einer Probe wurde mittels BCA Proteinassay bei der OD_{562} bestimmt. Dabei werden 5 µl der Probe mit 1 ml BCA (1 ml BCA + 49 ml $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Proteine reduzieren im alkalischen Milieu Cu^{2+} zu Cu^+ . Die Bichinolin-4-carbonsäure reagiert mit Cu^+ , wobei zwei Bichinolinsäure-Moleküle einen intensiv purpur gefärbten Chelatkomplex mit dem Cu^+ -Ion eingehen. Als Standard wurde eine BSA-Verdünnungsreihe verwendet (ausgehend von 2 mg/ml wurde 1:1 verdünnt bis zu einer Konzentration von 31,25 µg/ml), wovon jeweils 50 µl mit 1 ml BCA versetzt wurden und ebenfalls 30 min bei 37°C inkubiert wurde. Somit entsprechen 2 mg/ml 100 µg/µl Protein, 1 mg/ml 50 µg/µl Protein usw. Als Nullwert diente eine Wasserkontrolle (50 µl H_2O + 1 ml BCA).

2.5.3 Proteingelelektrophorese (SDS-Page)

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

Die Proben wurden in 1x Probenpuffer (4x Probenpuffer: 0,25 M Tris-HCl (pH 6,8), 4% SDS, 10% Mercaptoethanol, 20% Glycerin, 20 mg/L Bromphenolblau) aufgenommen und 5 min bei 90°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte in 1x Elektrophorese-Laufpuffer (4x Elektrophorese-Laufpuffer: 0,1 M Tris-HCl (pH 8,3), 0,77 M Glycin, 0,4% SDS) über 1,5 h bei 30 mA/Gel.

2.5.4 Immuno Blotting (Western Blotting)

Die Übertragung von Proteinen, welche in der SDS-Page aufgetrennt wurden, auf eine Membran erfolgte im Semi-Dry Blot-Verfahren. Die Gele wurden hierzu auf in Blotting-Puffer (25 mM Tris-HCl (pH 8,3), 192 mM Glycin, 20% Methanol) getränkte Filterpapiere (Whatmann-3MM) überführt und mit einer in Methanol präinkubierten PVDF-Membran (Immobilon-P; Millipore) und einer weiteren Lage Filterpapier überschichtet. Nach Entfernen von Luftblasen wurde der Blottingvorgang eingeleitet (BIO-RAD Trans-Blot[®]SD Semi-Dry Transfer Cell (120mA konst /Gel)).

Unspezifische Bindungsstellen wurden nach dem Blotten durch 30 minütige Inkubation der Membranen in 1% Tween 20 (in PBS ohne Mg/Ca) und anschließender einstündiger Inkubation in Magermilchpulver (Blocken) abgesättigt. Danach wurden die Blots mit den Primärantikörpern (1:1000 bis 1:5000 in Magermilchpulver) für 1h bei RT oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach drei 5-minütigen Waschschritten mit 0.1% Triton X-100 (in PBS ohne Mg/CA) erfolgte die Inkubation mit Sekundärantikörpern. Diese mit Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekoppelten Antikörper sind spezifisch gegen die „Produktions-Spezies“ des Primärantikörpers gerichtet. Hierbei kamen zum Einsatz: Anti-Kaninchen (Dianova) und Anti-Maus (Dianova) Antikörper. Nach drei weiteren 5-minütigen Waschschritten erfolgte der Nachweis der Proteine mit dem ECL-System.

2.5.5 Enhanced chemiluminescence (ECL)-Verfahren

Die ECL-Reaktion wurde mit dem ECL Detection Reagent Kit (Amersham) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die an den Sekundärantikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase setzt bei der Spaltung ihres Substrates (ECL Solution 1 und 2 im Verhältnis 1:1) Energie in Form von Chemilumineszenz frei. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgt auf speziellen Filmen (Hyperfilm ECL, Amersham). Je nach Stärke des Signals wurden die Filme zwischen 10 Sekunden und 5 Minuten exponiert.

2.5.6 Indirekte Immunfluoreszenzanalysen

In Sechslachplatten wurden 3×10^5 Zellen auf Objekträgern ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz für 15-45 min mit 4% (w/v) Formaldehyd (in PBS ohne Mg/Ca) fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (ohne Mg/Ca) erfolgte eine Permeabilisierung der Zellen mit 0,5% Triton X-100 (in PBS ohne Mg/Ca). Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS (ohne Mg/Ca) gewaschen ehe unspezifische Bindungsstellen mit 1% BSA (in PBS ohne Mg/Ca) abgesättigt wurden. Die Zugabe von Antiserum oder Präimmenserum erfolgte in einer 1:500 Verdünnung (in PBS Dulbecco) gefolgt von 1 h Inkubationszeit. Für den Nachweis der PERV-Expression in transfizierten Zellen wurde der PERV Gag p10 Antikörper (Krach et al. 2000) verwendet.

Nach drei Waschrissen mit PBS Dulbecco wurden die Proben für 1 h im Dunkeln mit dem Sekundärantikörper inkubiert, welcher 1:1000 in PBS Dulbecco verdünnt wurde und Indokarbocyanin (Cy3; Dianova) gekoppelt ist. Abschließend erfolgte die Eindeckung der Zellen mit Mowiol (20 g Mowiol 4.88 (Hoechst) in 80 ml PBS, 40 ml Glycerin).

Die indirekten Immunfluoreszenzanalysen wurden in einem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss) oder in einem Laserscan Mikroskop (Axiovert 10, Zeiss, Laser MRC 600, Biorad) betrachtet und digitalisiert aufgenommen.

2.6 Verwendete Oligonukleotide

Im Folgenden sind die verwendeten Oligonukleotide aufgelistet. Wenn damit eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle eingefügt werden sollte, wurde ein Linker hinzugefügt. Dabei handelt es sich um eine Abfolge von einigen Basen, welche sich 5' (stromaufwärts) der Schnittstelle befinden und manchen Restriktionsenzymen die Erkennung ihrer Zielsequenz „erleichtern“.

5'- und 3'- Oligonukleotide in der flankierenden genomischen Sequenz des genannten BAC- oder λ -Phagen-Klons

Name	Sequenz in 5' – 3' Richtung	Position
192B9 3'Flanke rev1	AAACAACCAAGTGCACAAAAGTAGG	
130A12 5'rev1	GATAGCCATAAATTGGTGTTAG	
BAC1 5 Flanke for1	AATAGATCGACCTAATTCTCCGAC	
BAC1 5 Flanke for2	TCAACAATTGCCTGAAGCATACCA	
463H12 5FL for 1	ATGACCACCCTGCTTTCTGCT	
463H12 5FL for 2	ATGGTACTTAGGCAACAGTAC	
BAC1 5FL rev AJ	CAGACCAGGCTCTTCTCCAGG	
BAC1 5FL for AJ	CCTGGAAGAAGAGCCTGGTCTG	
463H12 3FL rev1 AJ	CTTGAATGGGGGGAGCCACCTTC	
463H12 3FL rev2 AJ	GGGGTTATAAGAGTTGGGGAACCCC	
3'Flanke 1312rev_1	GTATAGTAGCAAACCCCAATATG	
3'Flanke 1312rev_2	CGTGCCTTCTCTTGCAAGCAAC	430-408 (3' von 1312)
5'Flanke1312for	GGTGACCAAAGGGGAAAGAGGAG	54-31 (5' von 1312)

PERV-spezifische Oligonukleotide

Name	Sequenz in 5' – 3' Richtung	Position
PK1 ¹	TTGACTTGGGAGTGGGACGGGTAAC	2927-2949
PK6 ¹	GAGGGTCACCTGAGGGTGTGGAT	3739-3716
PK26 ¹	ACGCACAAGACAAGACACACGAA	1134-1111
PK29 ¹	ATCAGCAGACGTGCTAGGAGGATC	894-918
PK30 ¹	TGGATGACCACCCTGCTTTCTGCT	7977-8000
PERV-B(33) 3'LTRfor ¹	GTATCTATCGATCCTTCCCAGTTCTAAGAT	8163-8180
PERV-B(33) 3'LTRrev ¹	ATTTAAATCGATGCTAGCTGAAAGGCCAGTAAA	8918-8904
PERV-B(33) R for Not ¹	TCGGAAGCGGCCGCGGGCCGAGTCTCTAC	545-560
PERV-B(33)pol revNot ¹	AGCGTTGCGGCCGCCTACTGGCCTGGGGAG	6316-6301
PERV-C for ²	CTGACCTGGATTAGAACTGGAAG	6606-6628
PERV-C rev ²	TATGTTAGAGGATGGTCTGGTC	6887-6865
PERV-C for ²	GTGCTCTCCTCAGACCTAGATTAC	6635-6659
PERV-C rev ²	CGTCAAGACCGTATTTGGTCC	6842-6822

HERV-spezifische Oligonukleotide³

Name	Sequenz in 5' – 3' Richtung	Position
HERV-K113 pol for	AACCAGCCACCAGGTTTCAGTGGGA	4330-4353
HERV-K113 pol rev	CCAGCATTGGCAACCTCTGCTTGC	4549-4526
HERV-K113 5'FL for4	GCCATCGATTGTACAGTAATAAAATCAA	(-221)-(-212)
HERV-K113 3'FL rev4	ACATGCAGACGTTTAGTTTTGATTTACA	9604-9585
HERV-K113 3'LTR for	CACCTCATCGATCCCAACAGCTCCGACGAG	8423-8440
HERV-K113 3'LTR rev	ATCGAAATCGATGCTAGCTGTAGGGTGGGTTG	9472-9458
HERV-K113 R for Not	CACAGAGCGGCCGCGAGATAGGGAAAAACC	561-576
HERV-K113pol revNot	ATTCACGCGGCCGCTTAGCTGCAGCTGCTC	6749-6734

Oligonukleotide zur Sequenzierung

Name	Sequenz in 5' – 3' Richtung	Position
PERV-B(33) 3'LTRSeqfor ²	GCTTTGTTGTGAACCCATAAAAAGC	8711-8735
HERV-K113 3'LTRSeqfor ³	CTTTGAGAAACACCCACAGATG	9272-9293
Neo-intSV40Seqrev ⁴	CTGCTTGCCGAATATCATGG	3211-3192
Seq. Mut GAG 33 ²	GGAGCCCTATATCCTTACGTGGCAAGAC	1390-1417
Seq. Mut GAG113 ³	GCAGCTTTAGAACCATTCAACAGAAG	1379-1406

Oligonukleotide zum PCR-Nachweis der Anwesenheit der verwendeten Resistenzgene

Name	Sequenz in 5' – 3' Richtung	Position
Neo-1 (rev)	TGGAGAGGCTATTCGGCTATG	
Neo-3 (for)	TCCACCATGATATTCGGCAAGCAG	
HYG 1 AJ	CGTCTGTCGAGAAGTTTCTGATCG	
HYG 2 AJ	GTACTTCTACACAGCCATCGGTCC	
Neo-intSV40for3Hind ⁴	CAGTGAAAGCTTGC GGCCGCGCTTGCGTGCAGGTCG	2911-2926

Oligonukleotide für EPTS/LM PCR

Name	Sequenz in 5' – 3' Richtung	Position
OCI	GACCCGGGAGATCTGAATTC	
OCII	AGTGGCACAGCAGTTAGG	
PERV-CforBiotin	[BioTEG]CTGACCTGGATTAGAAGTGAAG	6606-6628
GS117	GACCCGGGAGATCTGAATTCAGTGGCACAGCAGTTAGG	
GS118	CCTAACTGCTGTGCCACTGAATTCAGATCTCCCG	
GS177_Biotin	[BioTEG]CCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCTCGTCTGAAGCT	
GS94	GGACAGGTCGGTCTTGACAAAAGAACCG	
5'Klon9	CAGCAGTTGGGAGACAAG	
5'Klon6	CTGGCCTCAGGTGATCTGTCTG	

Tab 2.1: Verwendete Oligonukleotide

Auflistung der für Sequenzierungen und PCR verwendeten Primer. Die Orientierung der Oligonukleotide ist 5' - 3'. Die entsprechenden Ausgangssequenzen auf denen die Oligonukleotide basieren sind durch Nummern gekennzeichnet.

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

1 Abgeleitet von 293-PERV-B(33) (Czuderna et al. 2000)

2 Abgeleitet von MAX-T PERV-C(1312) (Preuß et al. 2006)

3 Abgeleitet von RP11-398B1 HERV-K113 (Turner et al. 2001)

4 Abgeleitet von Vektor pNeo-intSV40

Kursiv geschriebene Basen eines Oligonukleotids kennzeichnen den Linker, unterstrichene Basen kennzeichnen Restriktionsschnittstellen.

[BioTEG] bedeutet Biotinylierung des entsprechenden Oligonukleotids

3 Ergebnisse

A. Retrotranspositionspotential porziner endogener Retroviren

3.1 Klonierungsexperimente

Um zu überprüfen, ob porzine endogene Retroviren, hier anhand des Molekularklons PERV-B(33), und humane endogene Retroviren, hier HERV-K113 (basierend auf dem BAC-Klon RP11-398B1, Turner et al. 2001), in der Lage sind zu retrotransponieren, wurden zunächst entsprechende Indikatorkonstrukte hergestellt. Diese enthalten anstelle des für die Retrotransposition nicht notwendigen *env*-Gens eine Neomycin-Indikator-Kassette (*neo^{int}*) (Freeman et al. 1994), welche einen indirekten Nachweis einer Retrotransposition ermöglicht.

Zusätzlich wurden die verwendeten Konstrukte mit einem Hygromycinresistenzgen versehen, um nach erfolgter Transfektion Zellen zu selektieren, welche solch ein Konstrukt aufgenommen haben und somit potentielle Retrotranspositionereignisse beherbergen können.

Außerdem wurden einerseits alle so markierten Proviren (außer HIV-1) mit demselben heterologen Promotor (CMV, Promotor des Cytomegalievirus) versehen, um die resultierenden Ergebnisse vergleichen zu können. Andererseits wurde ein auf dem Moloney Murine Leukemie Virus basierendes Indikatorkonstrukt verwendet, welches von dem viruseigenen Promotor (LTR) reguliert wird, da für dieses bereits eine Retrotranspositionaktivität gezeigt worden war (Heidmann et al. 1988).

LTR regulierte Konstrukte wurden auch von dem Molekularklon PERV-B(33) und dem humanen Immundefizienz Virus 1 (HIV-1) hergestellt, da auch in diesem Fall noch keine Aktivität, im Sinne einer Retrotransposition, beschrieben wurde.

Als Negativkontrollen wurden Deletionsmutanten der Leserahmen *gag/pol* sowie zusätzlich Kapsid (*gag*)- und Polymerase (*pol*)-Deletionsmutanten, im Falle der CMV regulierten Konstrukte, hergestellt.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der einzelnen Klonierungsschritte und die Klonierungsstrategie dargestellt.

3.1.1 Insertion der modifizierten Proviren von PERV-B(33) und HERV-K113 in das heterologe eukaryotische Expressionsplasmid pJW-Hyg

In den Abbildungen 3.1 - 3.3 ist die Klonierungsstrategie anhand des Provirus PERV-B(33) dargestellt (Die Klonierung von HERV-K113 wurde analog mit entsprechenden Oligonukleotiden durchgeführt. Das entsprechende MoMLV-Konstrukt war bereits im Labor vorhanden, Dissertation XinLi Nan 1998).

Einleitend wurde die 3'LTR einschließlich des Polypurintraktes via PCR ausgehend von dem Molekularklon pGTePERV-B(33) Δ chrom (bzw. BAC-Klon RP11-398B1 bei HERV-K113, Turner et al. 2001) mit den Oligonukleotiden PERV-B(33) 3'LTR for und PERV-B(33) 3'LTR rev amplifiziert (bzw. entsprechende HERV-K113 Oligonukleotide). Die hier verwendeten

Oligonukleotide beinhalteten je eine Restriktionsschnittstelle für *ClaI*, wobei der Reversprimer zusätzlich noch eine *NheI*-Schnittstelle besitzt. Nach Restriktion mit *ClaI* konnte das resultierende PCR-Produkt in den Zielvektor pNeo-intSV40 (trägt die Indikatorkassette), der ebenfalls mit *ClaI* restringiert wurde, eingefügt werden (Abb. 3.1). Der resultierende Vektor pNeo-intSV40 3'LTR PERV-B(33) beinhaltet somit die Indikatorkassette und 3' (stromabwärts) davon die 3'LTR des entsprechenden Provirus (vgl. Abb. 3.1).

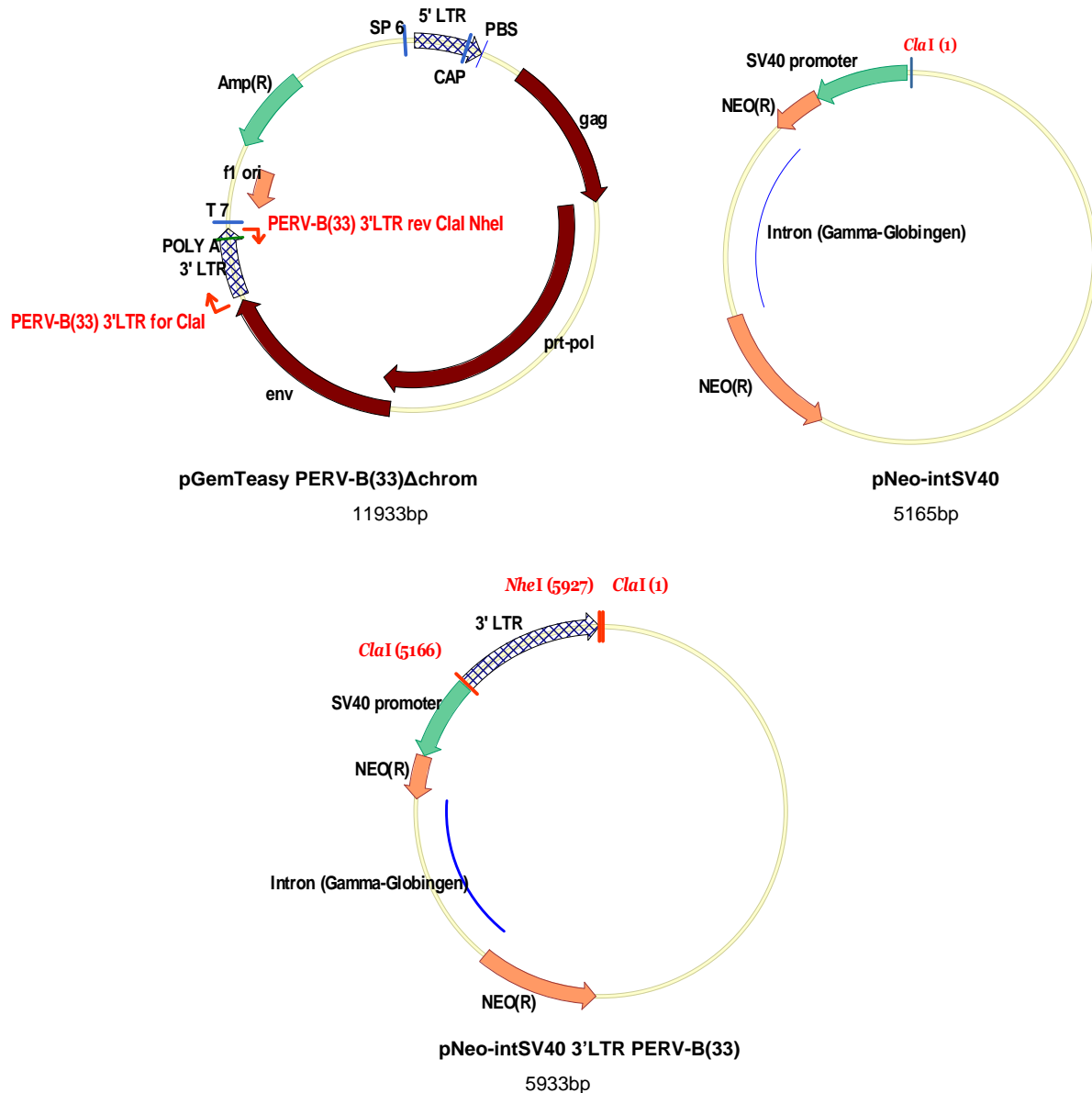


Abb. 3.1: Insertion der 3'LTR des Provirus stromabwärts der Neomycin Indikatorkassette

Im nächsten Schritt wurde, basierend auf dem beschriebenen Plasmid pNeo-intSV40 3'LTR PERV-B(33) (bzw. -HERV-K113), die Indikatorkassette mit angefügter 3'LTR mittels PCR amplifiziert. Die hierfür verwendeten Primer (der Reversprimer entspricht dem der ersten PCR) beinhalteten eine *HindIII* Schnittstelle 5' und eine *NheI* Schnittstelle 3'. Dieses Amplifikat wurde über die genannten Restriktionsschnittstellen in den Vektor pJW-Hyg (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Harriet Robinson) (Lu et al. 1996), der

gleichfalls entsprechend vorbehandelt wurde, eingefügt. Bei pJW-Hyg handelt es sich um einen eukaryotischen Expressionsvektor, welcher für einen CMV Promotor und ein Hygromycinresistenzgen codiert.

Der neu entstandene Vektor pJW Neo-intSV40 3'LTR PERV-B(33) Hyg trägt in 5'-3' Orientierung einen CMV-Promotor mit folgender revers orientierter Indikatorkassette (*neo^{int}*), die 3'LTR des entsprechenden Provirus, ein Hygromycinresistenzgen und ein Ampicillinresistenzgen zur Selektion in eu- bzw. prokaryotischen Zellen (vgl. Abb. 3.2).

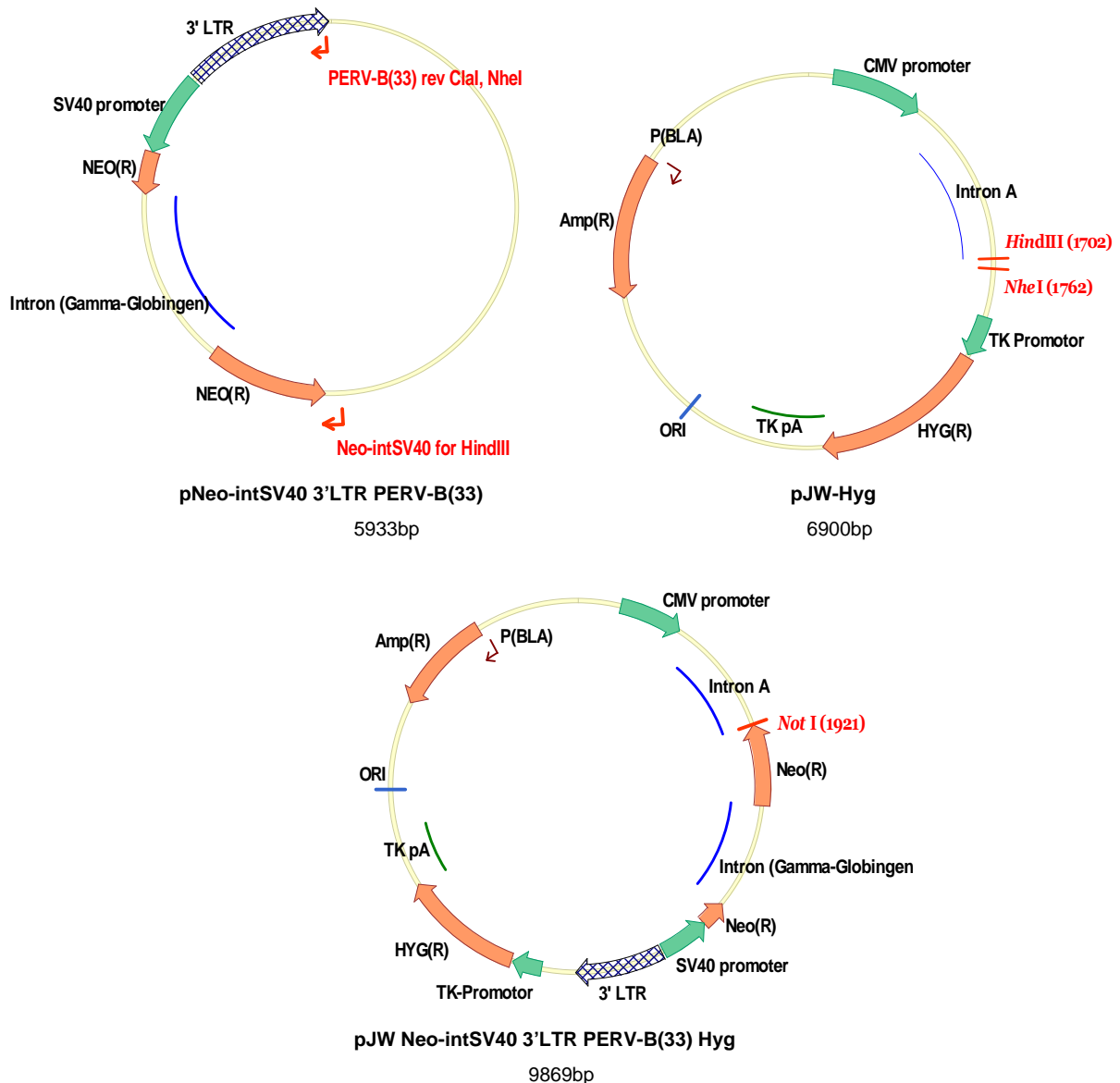


Abb. 3.2: Insertion der Indikatorkassette mit 3'LTR in den eukaryotischen Expressionsvektor pJW-HYG

Abschließend musste der noch fehlende provirale Teil eingefügt werden. Hierzu wurde der zuletzt klonierte Vektor pJW Neo-intSV40 3'LTR PERV-B(33) Hyg mit dem Restriktionsenzym *NotI* restringiert, welches bei der Amplifikation der Indikatorkassette und der 3'LTR Bestandteil des Vorwärtsprimers war. Hierzu war es zunächst notwendig zwei bereits vorhandene *NotI*-Restriktionsschnittstellen des Basisvektors pJW-HYG „stillzulegen“. Dies wurde mittels einer Kinetik des Restriktionsenzym *NotI* ermöglicht. Dabei wurden

Restriktionsansätze nach unterschiedlichen Zeitpunkten inaktiviert und nach Agarosegelelektrophorese der Ansatz ausgewählt, bei welchem der Vektor linearisiert vorlag bzw. erst eine der zwei Restriktionsschnittstellen benutzt wurde. Nach Aufreinigung des linearisierten Vektors und Auffüllen der überhängenden Enden wurde das Plasmid religiert und erneut mit *NotI* restringiert, um die verbleibende Schnittstelle gleichermaßen „stillzulegen“.

Das provirale Stück wurde ausgehend von dem Moleklarklon pGTePERV-B(33) Δ chrom (BAC-Klon RP11-398B1 bei HERV-K113, Turner et al. 2001) amplifiziert. Dabei wurden Oligonukleotide verwendet, welche je eine *NotI* Schnittstelle beinhalteten und den Bereich von der R-Region der 5'LTR bis zum Ende des Polymerasegens vervielfältigten.

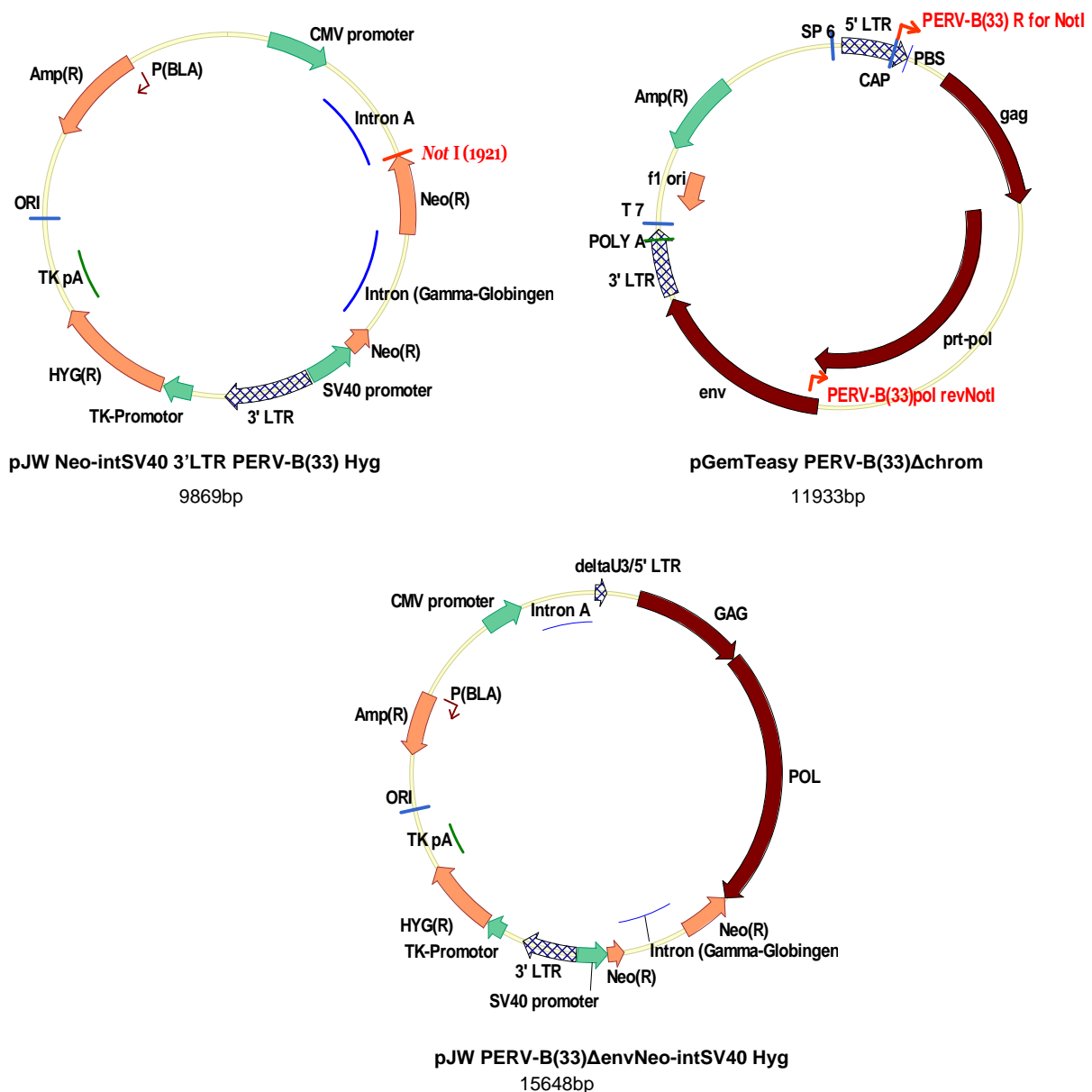


Abb. 3.3: *Insertion der proviralen Region „R“ bis Ende pol in den Vektor pJW Neo-intSV40 3'LTR PERV-B(33) HYG*

Der fertige Vektor pJWPERV-B(33) Δ envNeo-intSV40Hyg beinhaltet somit den proviralen Anteil mit revers orientierter Indikatorkassette anstelle des env-Gens, welcher von einem

heterologen CMV-Promotor *in vitro* transkribiert werden kann (vgl. Abb. 3.3). Nach erfolgter Transkription in einer eukaryotischen Zelle sollte folglich eine mRNA gebildet werden, welche einer proviralen mRNA entspricht. D.h. alle Elemente (R-Regionen, PBS, PPT) und Enzyme (RT, IN), die für eine reverse Transkription und erneute Integration benötigt werden, sind vorhanden. Infolgedessen sind diese veränderten Proviren potentiell in der Lage, einen *env*-unabhängigen, intrazellulären Retrotranspositionszyklus zu vollziehen.

3.1.2 Konstruktion der PERV-B(33) Deletionsmutanten

Für die Deletionsmutantenherstellung von PERV-B(33) wurde das PCR-Amplifikat, welches den Bereich von der R-Region der 5'LTR bis zum Ende des Polymerasegens enthält in den Vektor pcDNA3.1(-) subkloniert. Daraus entstand der Vektor pcDNA3.1 R-Pol PERV-B(33). Zusätzlich wurde der Vektor pBAC-2cp gp1 als Vektor zur Subklonierung verwendet (Abb. 3.4).

Diese Vektoren dienten als Basis zur Herstellung der Deletionsmutanten, bevor abschließend alle Fragmente in den Zielvektor pJW-Hyg kloniert wurden.

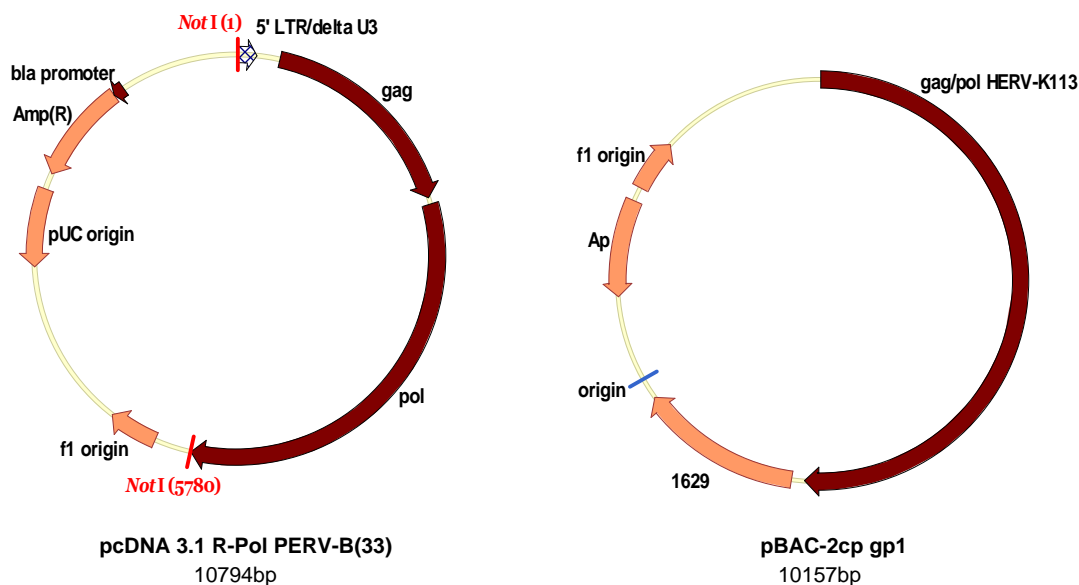


Abb. 3.4: Zur Subklonierung bei der Herstellung der PERV-B(33) Deletionsmutanten verwendete Vektoren

3.1.2.1 Konstruktion der gag-Deletionsmutante von PERV-B(33)

Für die Herstellung der *gag*-Deletionsmutante wurde der Vektor pcDNA3.1 R-Pol PERV-B(33) mit *Sac*II und *Age*I restringiert (Abb. 3.5) und dieses Fragment (2342bp) in den Vektor pBAC-2cp gp1, der mit denselben Enzymen behandelt wurde, subkloniert. In diesem Vektor, pBAC-2cp Gag B(33), war es dann möglich eine *gag*-Deletionsmutante zu erstellen, was vorher aufgrund zu vieler Restriktionsschnittstellen nicht durchführbar gewesen wäre.

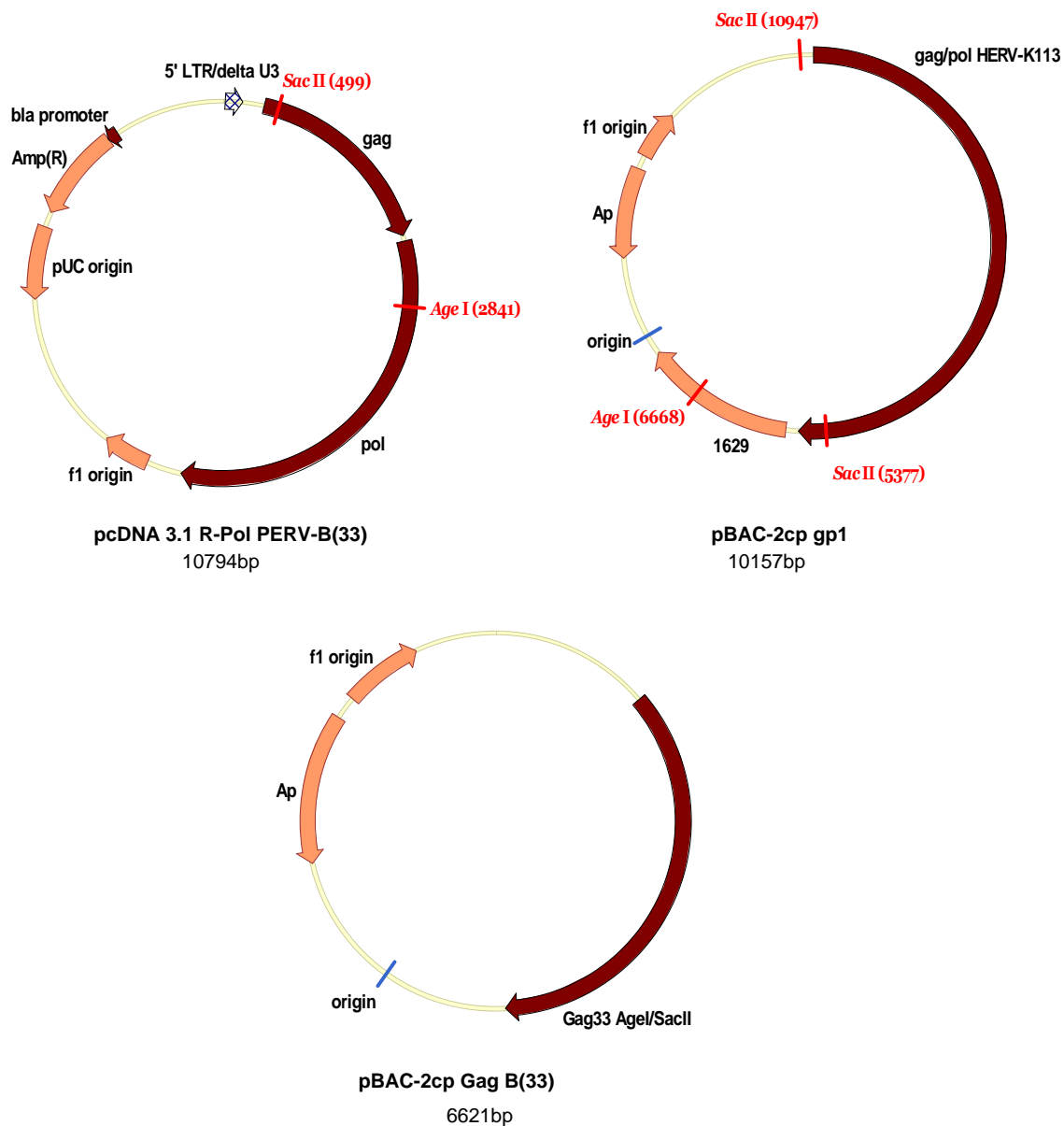


Abb. 3.5 Subklonierung des gag-Fragmentes von PERV-B(33) zur Herstellung einer gag-Deletionsmutante

Im nächsten Schritt wurde der Vektor pBAC-2cp Gag33 mit *Pvu*II und *Xba*I restringiert (Abb. 3.6), wobei eine gag-Deletionsmutante entstand. Anschließend wurden die Überhänge mit der T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und religiert. Nun konnte die entstandene Mutante mit den einleitend verwendeten Restriktionsenzymen *Sac*II und *Age*I in den Vektor pcDNA 3.1 R-Pol PERV-B(33) (ebenfalls restringiert mit *Age*I/*Sac*II) zurückgeführt werden (Abb. 3.6).

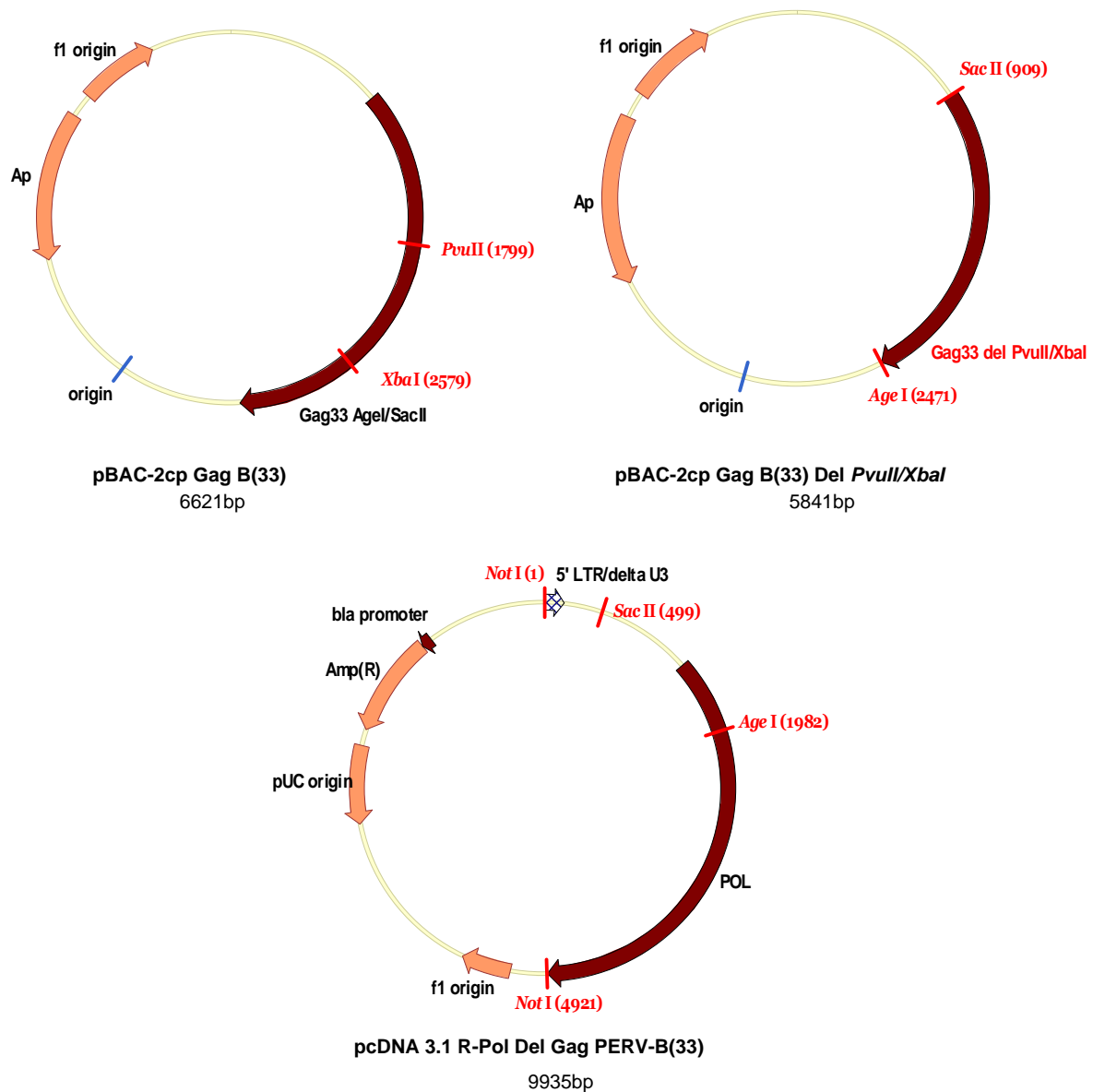


Abb. 3.6 Fertigstellung der *gag*-Deletionsmutante von PERV-B(33)

3.1.2.2 Konstruktion der *gag/pol*-Deletionsmutante von PERV-B(33)

Die *gag/pol*-Deletionsmutante wurde ausgehend von dem Vektor pcDNA3.1 R-Pol PERV-B(33) durch Restriktion mit dem Enzym *NarI* (Abb. 3.7) hergestellt. Das dabei entstehende 7234bp große Fragment wurde nach Agarosegelelektrophorese reisoliert und religiert. Daraus entstand der Vektor pcDNA R-Pol Del Gag/Pol PERV-B(33).

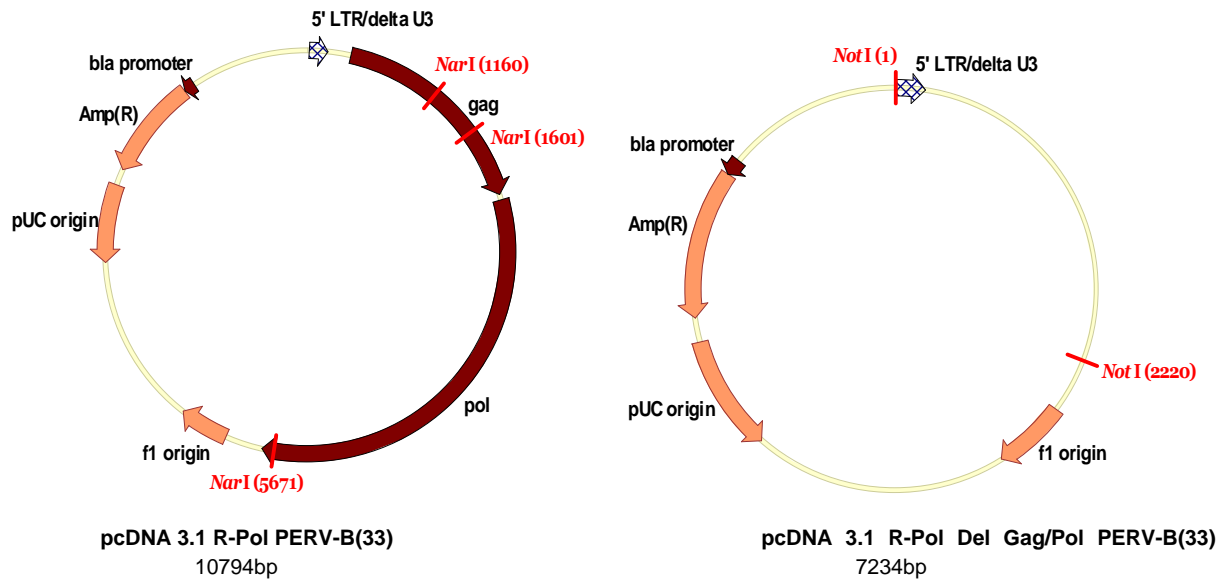


Abb. 3.7 Restriktion des proviralen Anteils von PERV-B(33) zur gag/pol-Deletionsmutante

3.1.2.3 Konstruktion der pol-Deletionsmutante von PERV-B(33)

Für die Herstellung der *pol*-Deletionsmutante wurde der Vektor pcDNA3.1 R-Pol PERV-B(33) mit den Restriktionsenzymen *Age*I und *Bsr*GI behandelt (Abb. 3.8). Das 8253 bp große Fragment wurde nach Agarosegelelektrophorese reisoliert und nach Auffüllen der Überhänge mit der T4 DNA Polymerase religiert. Daraus entstand der Vektor pcDNA R-Pol Del Pol PERV-B(33).

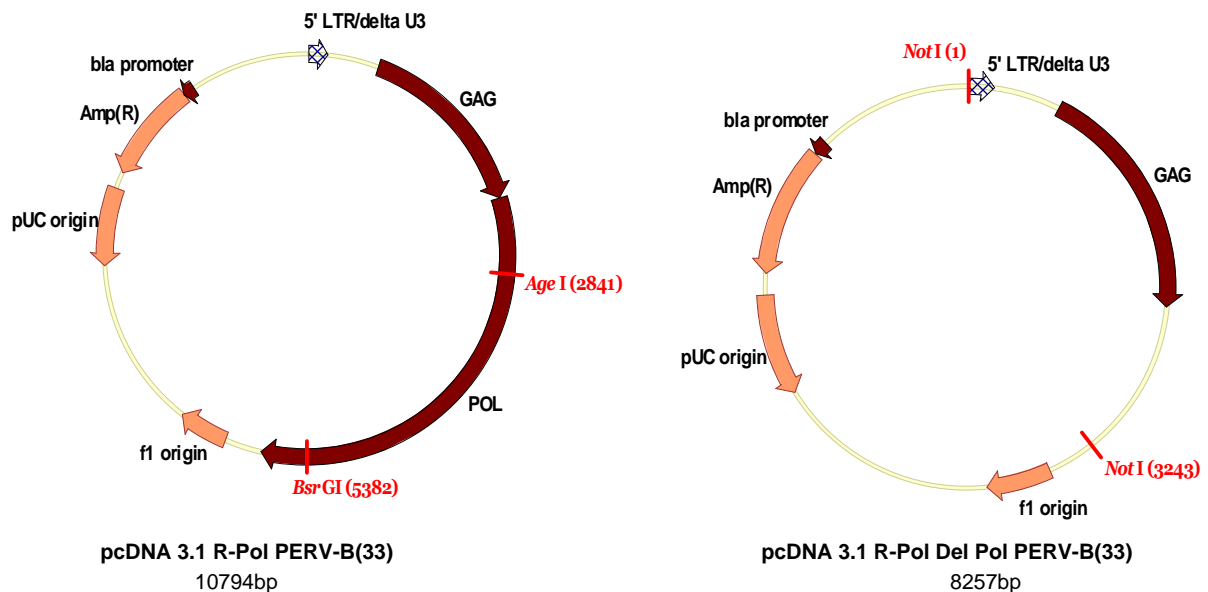


Abb. 3.8: Restriktion des proviralen Anteils von PERV-B(33) zur pol-Deletionsmutante

Im Fall der *gag*-Deletionsmutante (3.1.2.1, Abb. 6) wurde das Vorhandensein des richtigen Leserahmens mit Hilfe einer Sequenzierung des mutierten Bereichs bestätigt. Dies war

notwendig um zu gewährleisten, dass der stromabwärts folgende *pol*-Leserahmen im richtigen Leseraster vorliegt.

3.1.3 Konstruktion der HERV-K113 Deletionsmutanten

Nun wurden von dem analog hergestellten Konstrukt pJWHERV-K113 Δ envNeo-intSV40Hyg (vgl. Abb. 3.3, S. 40) Deletionsmutanten von *gag*, *gag-pol* und *pol* hergestellt. Einerseits sollte sichergestellt werden, dass potentielle Retrotranspositionereignisse von Polymerase und Kapsidprotein abhängige Mechanismen sind und andererseits nicht durch Proteine von endogenen LINE-1 (Long interspersed nuclear elements) vermittelt werden. Die Deletionen der Leserahmen wurden nicht im Zielvektor pJW-Hyg durchgeführt, da darin zu viele Restriktionsschnittstellen vorhanden waren.

Für die Mutantenherstellung wurde das PCR-Amplifikat von HERV-K113, in den Vektor pET-Duet-1 subkloniert. Das Amplifikat enthält den Bereich von der R-Region der 5'LTR bis zum Ende des Polymerasegens. Daraus entstand der Vektor pET-Duet R-Pol HERV-K113 (Abb. 3.9). Dieser Vektor diente als Basis zur Herstellung der Deletionsmutanten bevor abschließend alle Fragmente in den Zielvektor pJW-Hyg kloniert wurden.

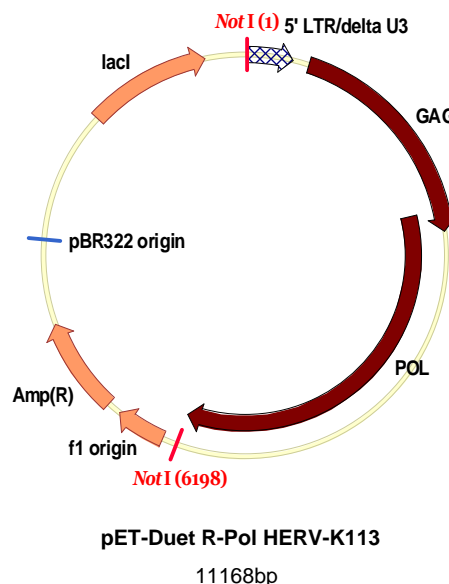


Abb. 3.9: *Insertion des PCR-Amplifikates des Provirus HERV-K113 von R-Pol in den Vektor pET-Duet1*

3.1.3.1 Konstruktion der *gag*-Deletionsmutante von HERV-K113

Für die *gag*-Deletionsmutante wurde das Plasmid pET-Duet R-Pol HERV-K113 mit den Restriktionsenzymen *PshAI* und *BbvCI* behandelt (Abb. 3.10), nach gelelektrophoretischer Auftrennung das 10157bp große Fragment reisoliert, anschließend die überhängenden Enden mit der T4 DNA Polymerase aufgefüllt und zuletzt religiert. Daraus entstand das Plasmid pET-Duet R-Pol Del Gag HERV-K113.

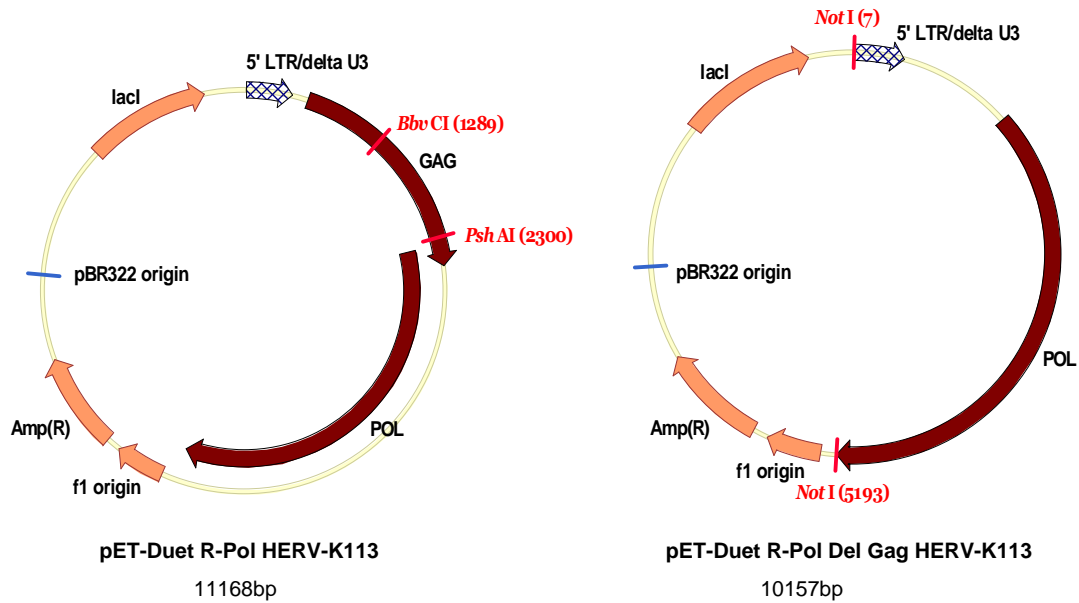


Abb. 3.10: Restriktion des proviralen Anteils von HERV-K113 zur gag-Deletionsmutante

3.1.3.2 Konstruktion der gag/pol-Deletionsmutante von HERV-K113

Für die gag/pol-Deletionsmutante wurde der Ausgangsvektor mit den Enzymen BgII und XbaI restringiert (Abb.3.11), nach gelelektrophoretischer Auftrennung das 5805 bp große Fragment reisoliert und nach Auffüllen der überhängenden Enden mit der T4 DNA Polymerase religiert. Daraus entstand das Plasmid pET-Duet R-Pol Del Gag/Pol HERV-K113.

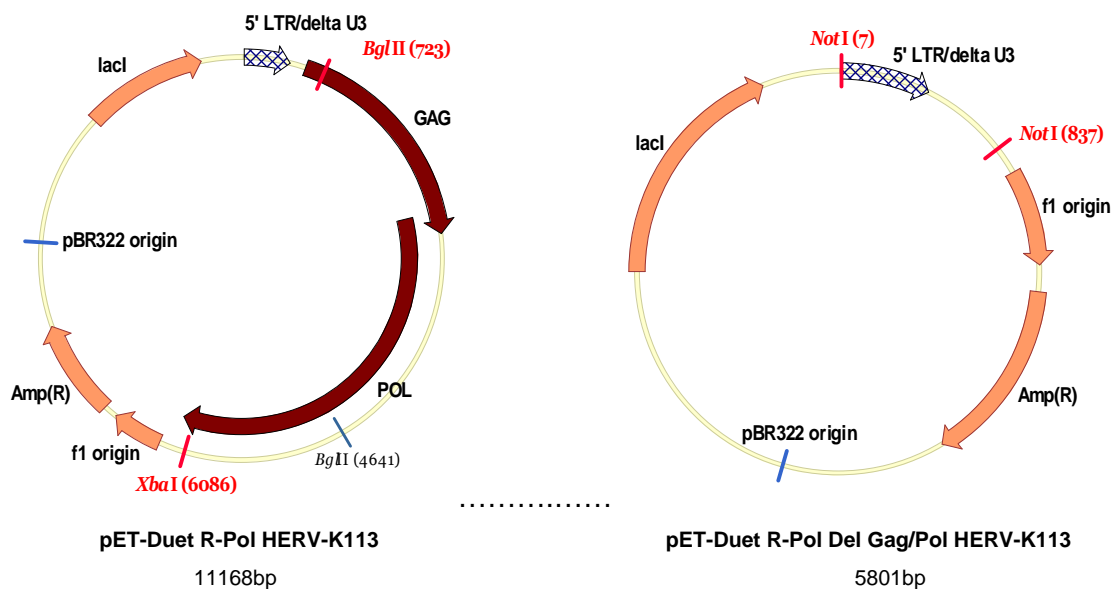


Abb. 3.11: Restriktion des proviralen Anteils von HERV-K113 zur gag/pol-Deletionsmutante

3.1.3.3 Konstruktion der *pol*-Deletionsmutante von HERV-K113

Für die *pol*-Deletionsmutante wurde das Konstrukt pET-Duet R-Pol HERV-K113 mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *XbaI* behandelt (Abb. 3.12) und nach gelelektrophoretischer Auftrennung das 7788 bp große Fragment sofort religiert, da bei den hier verwendeten Enzymen die gleichen Überhänge entstehen. Daraus entstand das Plasmid pET-Duet R-Pol del Pol HERV-K113.

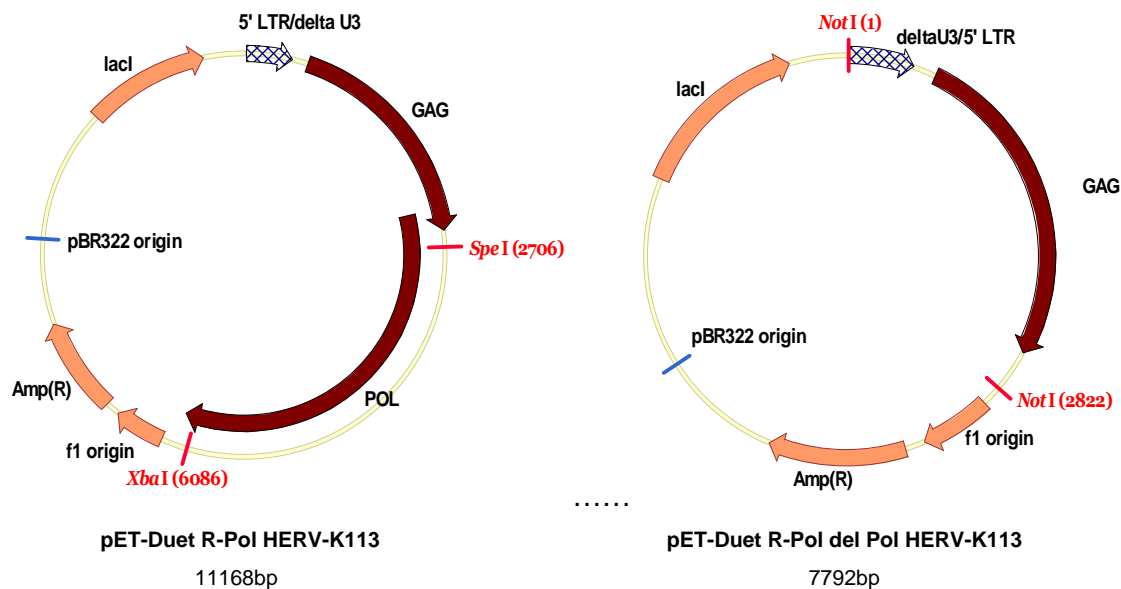


Abb. 3.12: Restriktion des proviralen Anteils von HERV-K113 zur *pol*-Deletionsmutante

Das Vorhandensein des richtigen Leserahmens im Fall der *gag*-Deletionsmutante (3.1.3.1, Abb. 3.10) wurde mit Hilfe einer Sequenzierung des mutierten Bereichs bestätigt. Dies war notwendig um zu gewährleisten, dass der stromabwärts folgende *pol*-Leserahmen im richtigen Leseraster vorliegt.

3.1.4 Konstruktion des LTR regulierten PERV-B(33) Indikatorplasmids

Im Folgenden ist die Klonierung der PERV-B(33) „Positivkontrolle“ dargestellt, welche sich durch die Verwendung des PERV eigenen Promotors und ein anderes „Plasmidrückgrat“ von den bisher beschriebenen Konstrukten unterscheidet.

Ausgehend von dem Moleklarklon pGTePERV-B(33) Δ chrom wurde der *env*-Leserahmen mit Hilfe der Restriktionsenzyme *KpnI* und *PacI* deletiert (Abb. 3.13), um an dieser Stelle die beschriebene Neomycin-Indikatorkassette einzufügen. Diese wurde aus dem Donorplasmid pNeo-intSV40, mit den Restriktionsenzymen *SacII* und *Clal* restringiert. Da bei diesen Restriktionen ungleiche, kohäsive Enden erzeugt wurden, mussten jeweils die entstandenen Überhänge aufgefüllt werden, so dass glatte Enden entstanden (Abb. 3.13).

Daraus resultierte eine ungerichtete Ligation, wobei das Plasmid pGemTeasy PERV-B(33) Δ Env Neo-intSV40 entstand. Aufgrund dieser ungerichteten Klonierung (glatte Enden) musste die Orientierung des Inserts mittels Restriktionsanalysen überprüft werden.

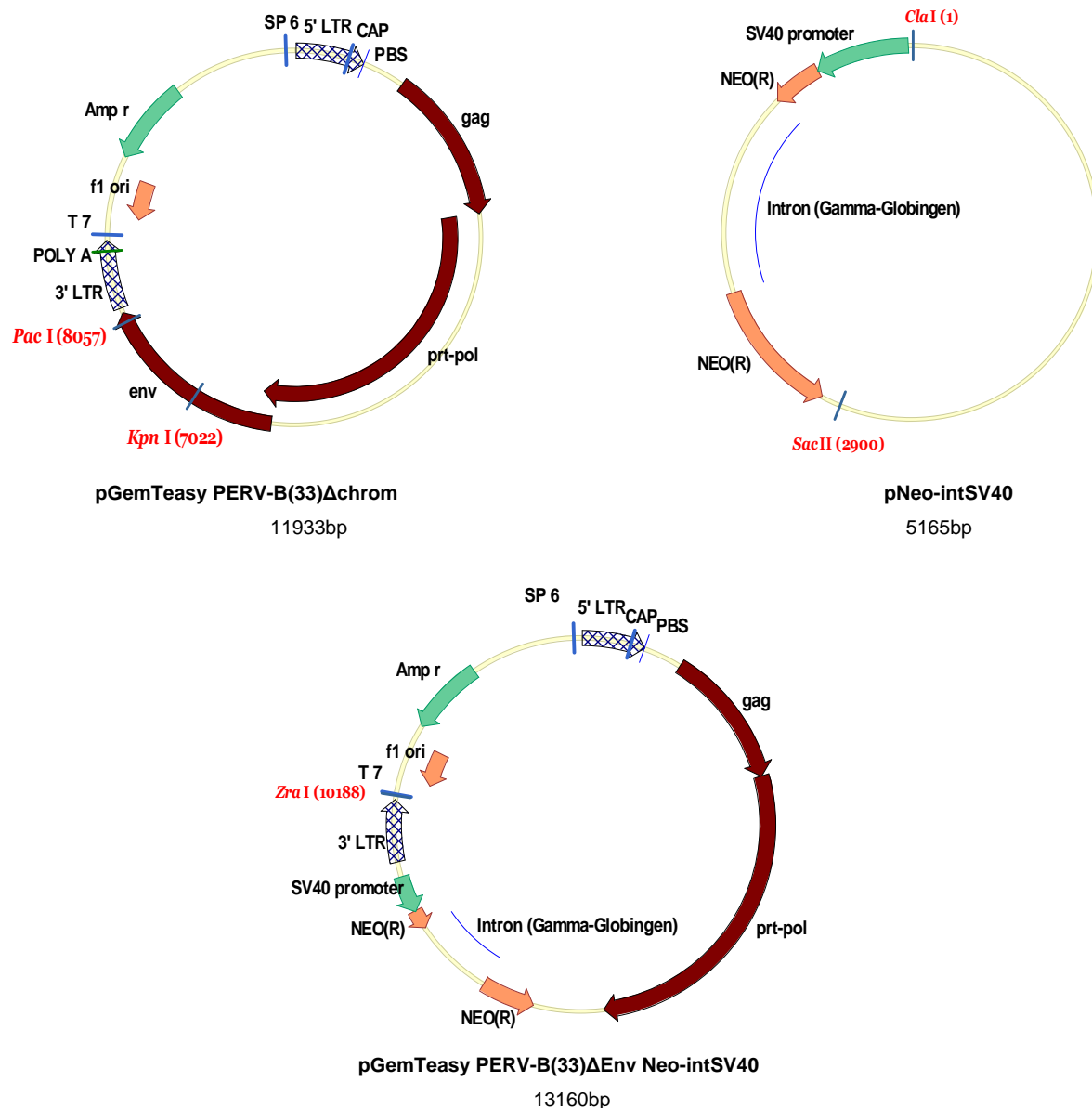


Abb 3.13: *Insertion der Neomycin-Indikatorkassette anstelle des env-Gens des Molekularklons PERV-B(33)*

Zur Selektion transfizierter Zellen wurde abschließend das Plasmid pGemTeasy PERV-B(33)ΔEnv Neo-intSV40 durch ein Hygromycinresistenzgen ergänzt. Dieses wurde über die glatte Enden produzierenden Restriktionsenzyme *PvuII* und *XmnI* aus dem Expressionsvektor pcDNA 3.1 Hygro(+) (Invitrogen) restringiert und anschließend 3' (stromabwärts) der 3'LTR eingefügt (Abb. 3.14). Zuvor wurde das Indikatorkonstrukt mit dem glatte Enden produzierenden Restriktionsenzym *ZraI* restringiert (Abb. 3.14). Daraus resultierte der fertige Vektor pGemTeasy PERV-B(33)ΔEnv Neo-intSV40 Hyg.

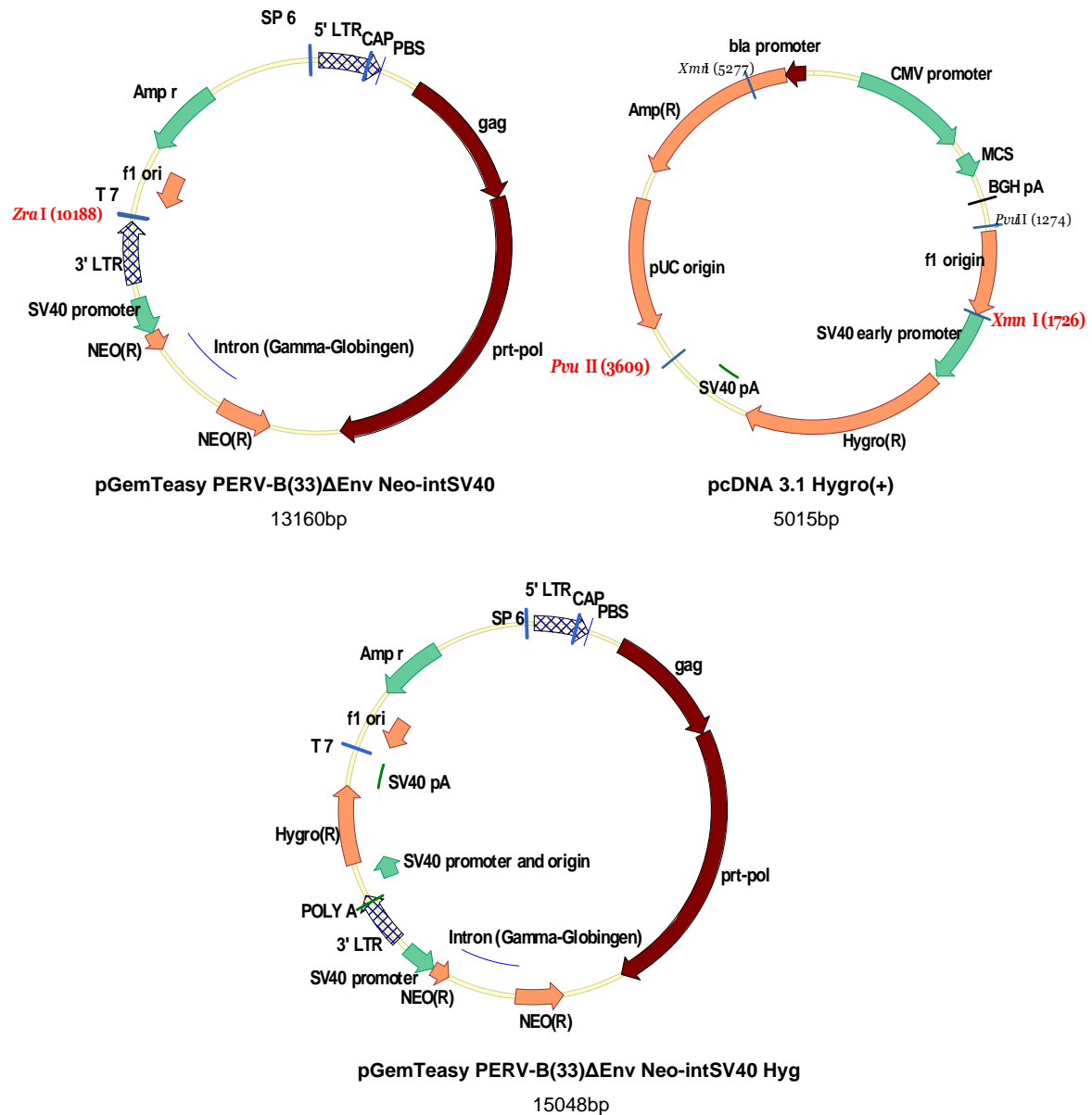


Abb. 3.14 Insertion des Hygromycinresistenzgens zum PERV-B(33) Indikatorkonstrukt

3.1.4.1 Konstruktion der *gag/pol*-Deletionsmutante des LTR regulierten PERV-B(33) Indiktorplasmids

Zur Herstellung der *gag/pol*-Deletionsmutante wurde das PERV-B(33)-Indikatorkonstrukt mit den glatte Enden produzierenden Restriktionsenzymen *NruI* und *EcoM* restringiert und das 10197bp große Fragment religiert.

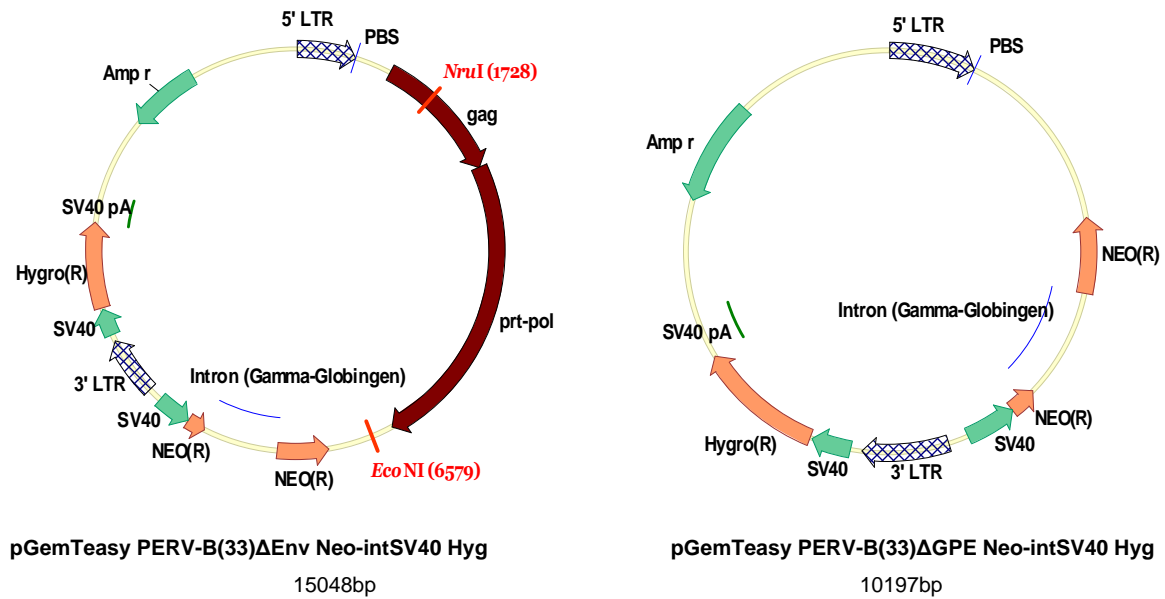
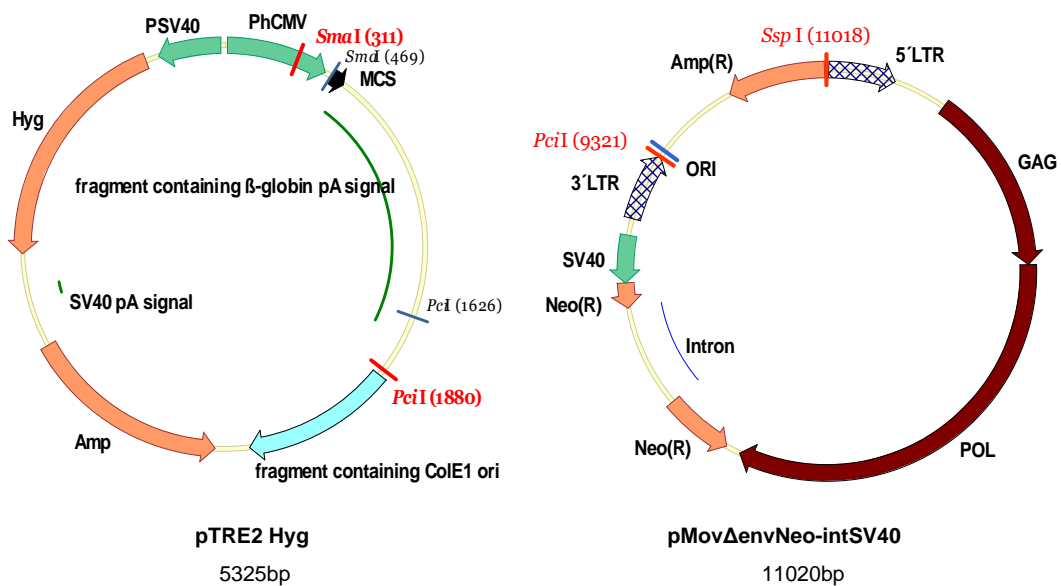


Abb. 3.15 Restriktion des proviralen Anteils von PERV-B(33) zur gag/pol-Deletionsmutante

3.1.5 Konstruktion des LTR regulierten MoMLV Indikatorplasmids (Positivkontrolle)

Nachstehend ist die Konstruktion der MoMLV-Positivkontrolle dargestellt. Hierzu wurde das Hüllprotein deletierte MoMLV Indikatorkonstrukt pMovΔenvNeo-intSV40 (war bereits aus einer vorangegangenen Dissertation vorhanden, XinLi Nan 1998) mit *PciI* und *SspI* restringiert, um den proviralen Anteil in das Hygromycin tragende Plasmid pTRE2Hyg zu klonieren, welches mit *SmaI* und *PciI* Restriktion zur Klonierung vorbereitet wurde (Abb. 3.15). Der resultierende Vektor enthält somit neben einer Hygromycinkassette zur Selektion von transfizierten Zellen zusätzlich ein *neo^{int}*-markiertes MoMLV-Provirus.



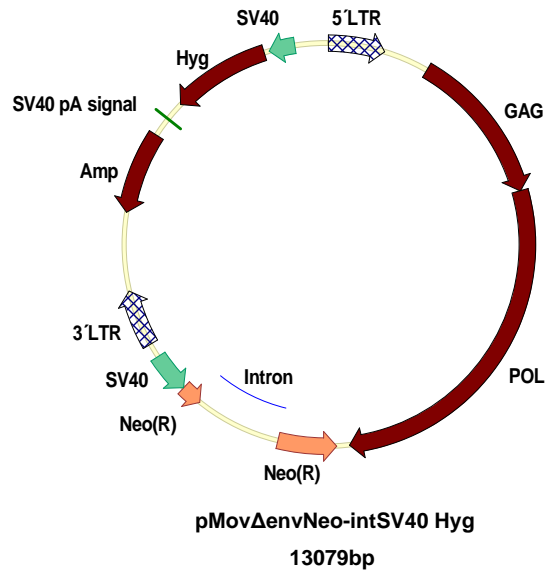


Abb. 3.16 Konstruktion des MoMLV Indikatorkonstruktes

3.1.5.1 Konstruktion der *gag/pol*-Deletionsmutante des LTR regulierten MoMLV Indikatorplasmids

Zur Herstellung der *gag/pol*-Deletionsmutante wurde das MoMLV-Indikatorkonstrukt mit dem Restriktionsenzym *Bgl*III restringiert und religiert.

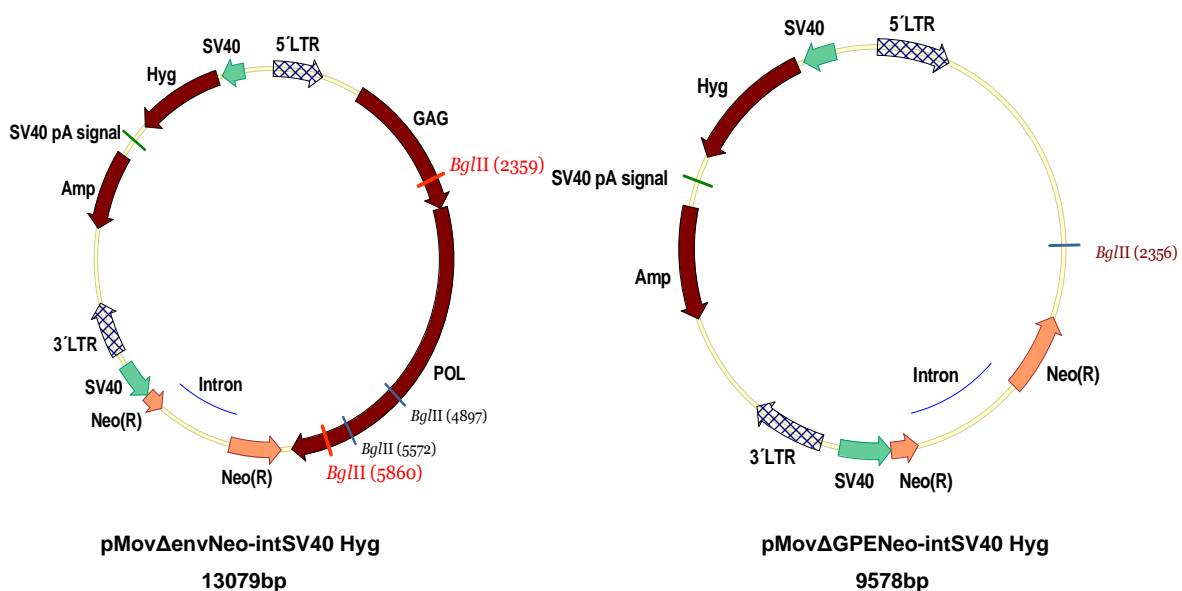


Abb. 3.17 Restriktion des proviralen Anteils von MoMLV zur *gag/pol*-Deletionsmutante

3.1.6 Konstruktion des LTR regulierten HIV-1 Indikatorplasmids

Ein weiteres Konstrukt, welches verwendet wurde, war ein mit *neo^{int}*-markiertes HIV-1 Provirus. Ausgehend von dem Vektor pNL4-3ΔenvEGFP (Mühlebach et al. 2005), welches

anstelle des *env*-Gens eine EGFP-Kassette trägt, wurde die oben beschriebene Indikatorkassette kloniert. Im ersten Schritt wurde die EGFP-Kassette von pNL4-3ΔenvEGFP durch *Not*I, *Sac*II-Restriktion deletiert. Die *neo*^{int}-Indikatorkassette wurde durch *Bsp*120 *Sac*II-Restriktion aus dem Donorplasmid pNeo-intSV40 entfernt und gerichtet in den vorbereiteten Vektor kloniert (Abb. 3.18). Daraus entstand der Vektor pNL4-3ΔenvNeo-intSV40.

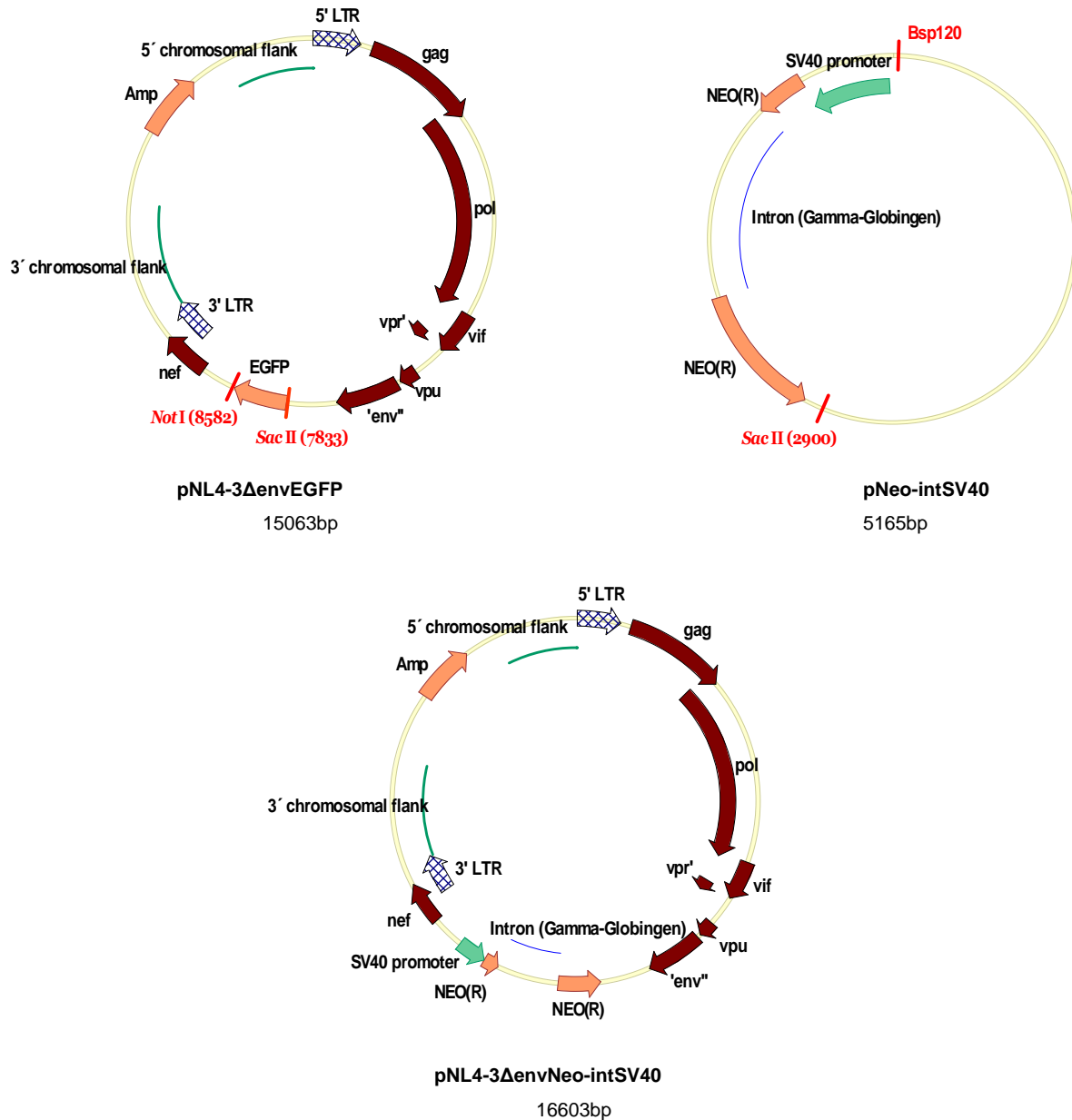


Abb. 3.18 Insertion der Neomycin Indikatorkassette anstelle des proviralen HIV-1 *env*-Gens

Zur Selektion nach erfolgter Transfektion wurde eine Hygromycinkassette eingefügt, welche über *Msc*I, *Nru*I-Restriktion (glatte Enden produzierend) aus dem Vektor pCEP4 restringiert wurde. Dieses Fragment wurde in den *Psi*I (glatte Enden produzierend) restringierten Vektor pNL4-3ΔenvNeo-intSV40 eingefügt, woraus der Vektor pNL4-3ΔenvNeo-intSV40 TK-Hyg entstand, welcher zur Transfektion verwendet wurde (Abb. 3.19).

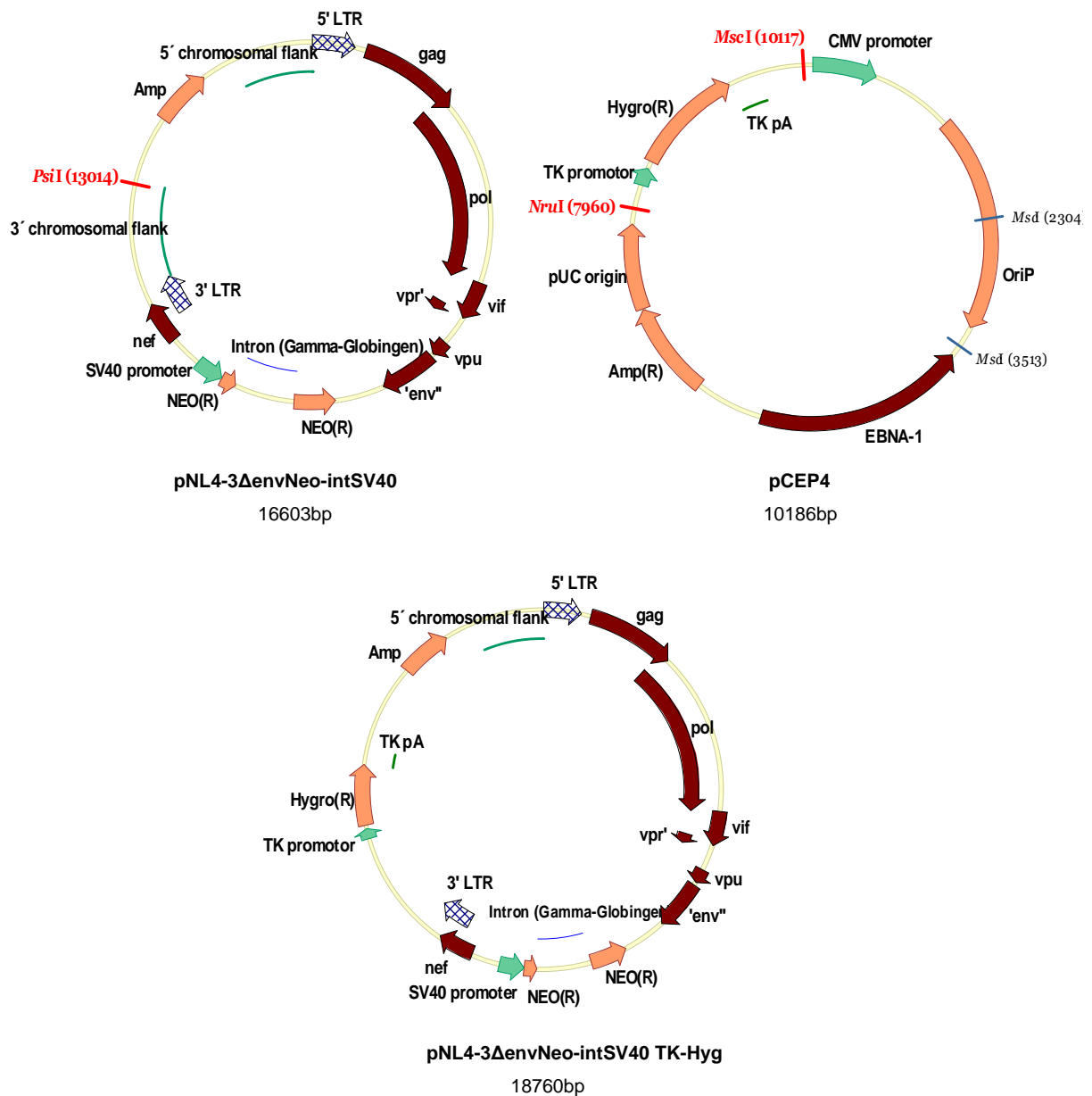


Abb. 3.19 Insertion einer Hygromycin-Resistenzkassette in das HIV-Indikatorkonstrukt

3.2 Retrotranspositionsexperimente

Alle oben beschriebenen Konstrukte wurden in 293- und HeLa-Zellen transfiziert, die HERV-Konstrukte zusätzlich in D17-Zellen (eine Hundezelllinie). Dadurch sollte nach Detektion potentieller Retrotranspositionseignisse einer möglichen Komplementierung und dadurch Fälschung durch endogene HERV-Sequenzen vorgebeugt werden.

In Abbildung 2.2 (S.22) ist der Versuchsablauf schematisch für PERV-B(33) dargestellt.

Nach Transfektion wurden die Zellen zunächst 10-14 Tage mit Hygromycin versetzt, so dass nach beendeter Selektion und Vermehrung auf drei Gewebekulturschalen ausschließlich Zellen überlebten, die ein modifiziertes Provirus aufgenommen hatten. Nachdem dreimal eine Million Zellen oder dreimal 2 Millionen Zellen auf jeweils eine neue Gewebekulturschale

ausplattiert wurden, erfolgte die Verwendung von G418 (Neomycinanalogon). Dabei wurde von einem Loch einer Sechsllochplatte ausgegangen. Diese Neomycinselektion wurde im Fall der dritten Gewebekulturschale eingeleitet ohne die Zellen zu zählen und neu auszuplattieren. Nach 10-14 Tagen Neomycinbehandlung wurden die gezählten Zellen mit Giemsa gefärbt, um die Retrotranspositionsfrequenz durch Auszählen der resistenten Zellen zu bestimmen. Die ungezählten, resistenten Zellen wurden von den Gewebekulturschalen „geerntet“, in eine 96 Lochplatte überführt, bis auf etwa 10^5 Zellen vermehrt und nach Isolierung der genomischen DNA auf Integration des retrotransponierten Provirus analysiert.

3.2.1 Test der CMV regulierten HERV-, PERV- und MoMLV Plasmide

Die entsprechenden Konstrukte wurden, wie oben beschrieben, in verschiedene Zelllinien transfiziert. In diesem Experiment und mehreren Wiederholungen konnte für kein CMV-reguliertes Konstrukt und in keiner verwendeten Zelllinie eine Retrotransposition nachgewiesen werden.

3.2.2 Test der LTR regulierten PERV-, MoMLV- und HIV-1 Plasmide

Die entsprechenden Konstrukte für PERV, MoMLV und HIV-1 und die dazugehörigen Deletionsmutanten wurden in 293- und HeLa Zellen transfiziert. Im Gegensatz zu den 293 Zellen konnten in HeLa Zellen Retrotranspositionereignisse detektiert werden, wonach alle weiteren Versuche sich auf diese Zelllinie beschränkten. Allerdings war auch in diesen Zellen kein Nachweis einer HIV Retrotransposition möglich. Exemplarisch sind im Folgenden (Abb. 3.20; 3.21) die Ergebnisse eines Experimentes der Indikatorstrukture von MoMLV und PERV-B(33), nach Färbung mit Giemsa, dargestellt. Alle weiteren Ergebnisse der Retrotranspositionsexperimente können im Anhang (S. 77ff.) nachgeschlagen werden.

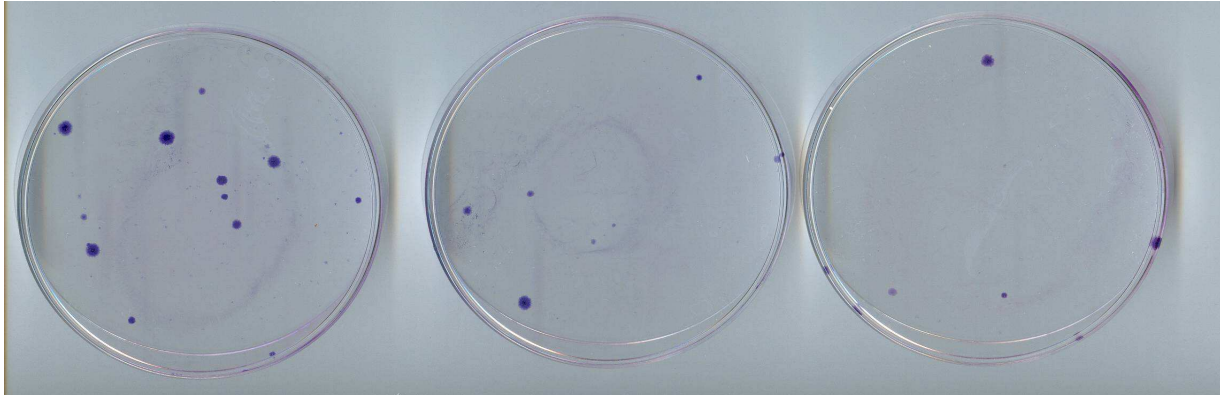


Abb. 3.20: Retrotranspositionereignisse von PERV-B(33) ausgehend von jeweils 10^6 Zellen (Experiment 1C) (s. Abb. 3.22)

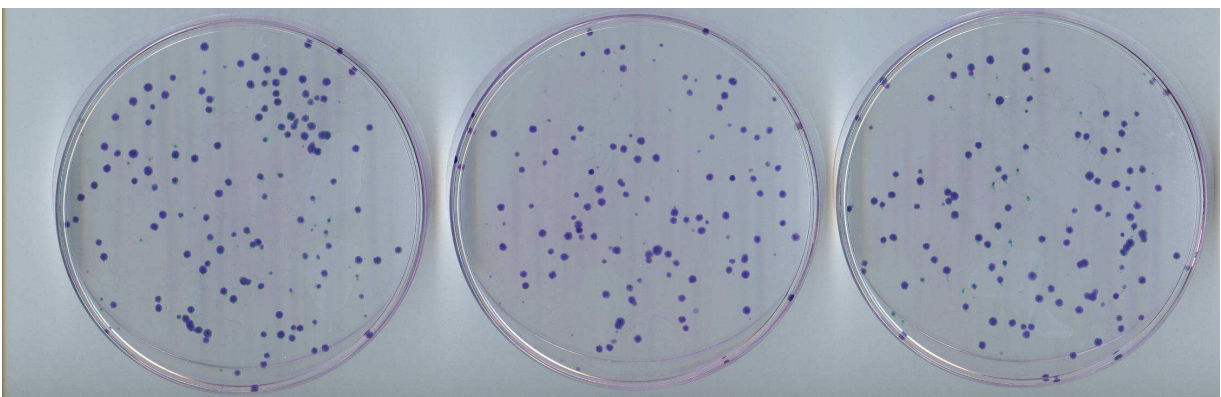


Abb. 3.21: Retrotranspositionereignisse von MoMLV ausgehend von jeweils $2 \cdot 10^6$ Zellen (Experiment 2C) (s. Abb. 3.25))

Bei den entsprechenden *gag*, *gag/pol* und *pol* Deletionsmutanten wurden keine Retrotranspositionereignisse nachgewiesen.

Zur Berechnung der Retrotranspositionsfrequenz wurde die Anzahl der *neo^r* Zellen durch die Anzahl der ausplattierten *hyg^r* Zellen dividiert. Daraus resultiert die Häufigkeit einer Retrotransposition bezogen auf die Anzahl der eingesetzten Zellen (s. Tab. 3.1). Die maximale Frequenz für PERV-B(33) betrug $1,2 \cdot 10^{-6}$ pro Zelle und Generation, bzw. $8 \cdot 10^{-6}$ für MoMLV. Damit ist die Retrotranspositionsfrequenz von PERV-B(33) etwa um das siebenfache geringer als die von MoMLV.

In folgenden Abbildungen sind die Zusammenfassungen der Retrotranspositionsexperimente, sortiert nach verwendetem Provirus und Anzahl ausgesäter Zellen, grafisch dargestellt.

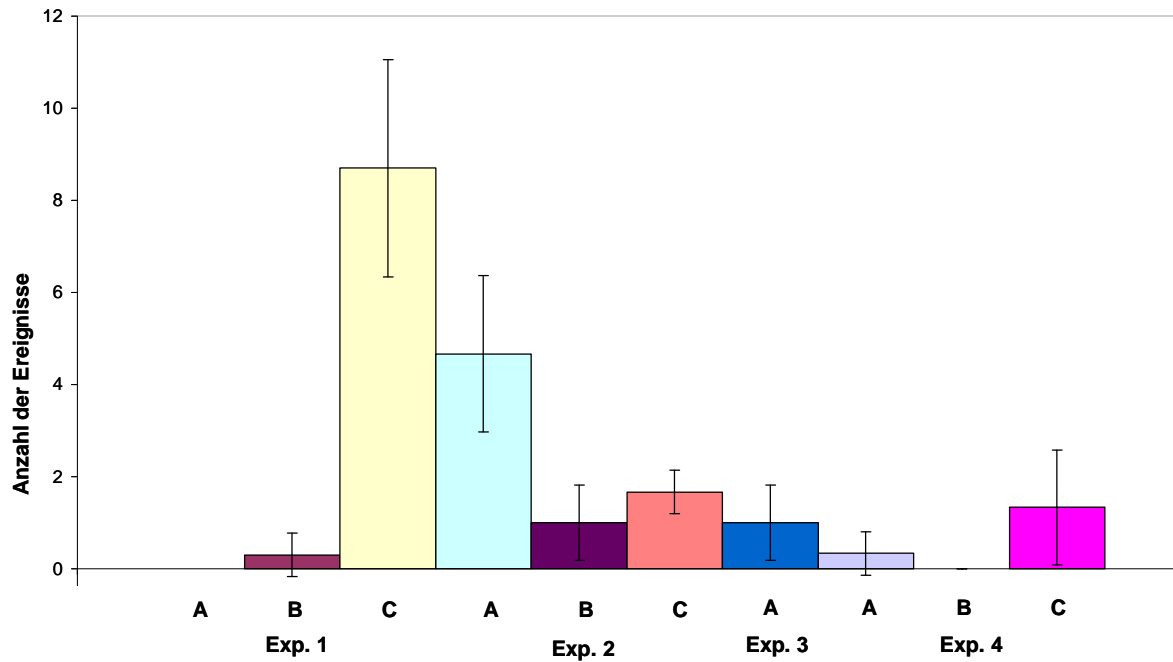


Abb.: 3.22 Zusammenfassung der Retrotranspositionsexperimente des Indikatorkonstruktes von PERV-B(33) mit 10^6 eingesetzten Zellen

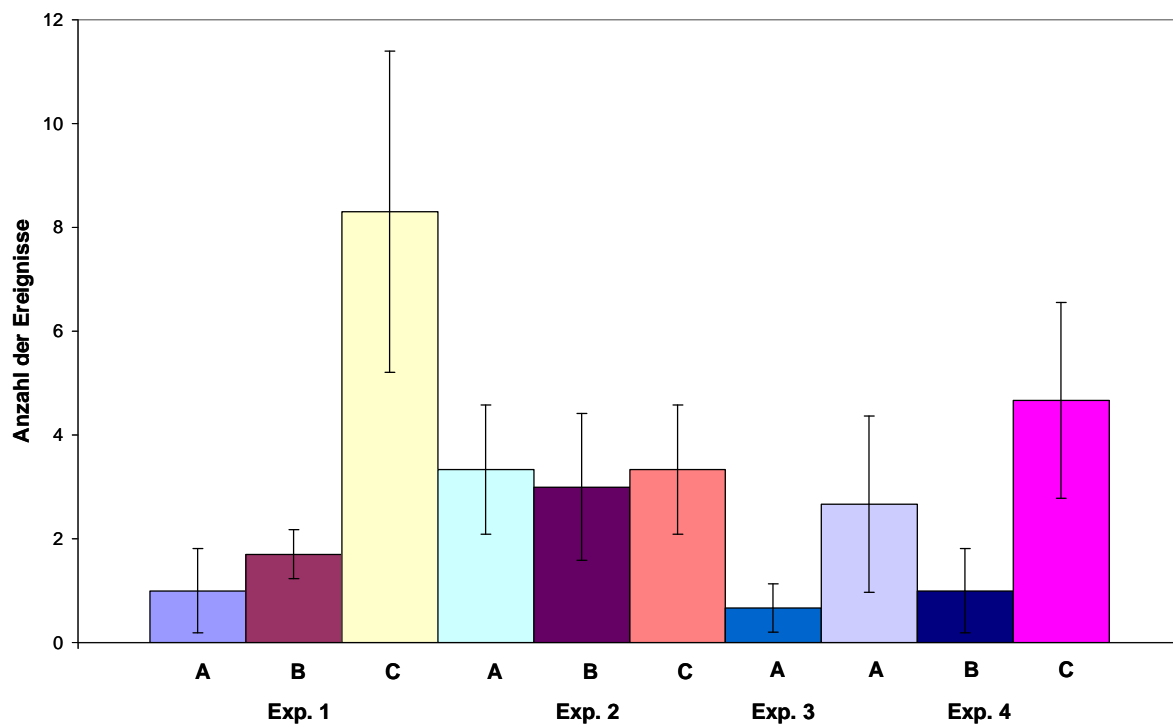


Abb. 3.23: Zusammenfassung der Retrotranspositionsexperimente des Indikatorkonstruktes von PERV-B(33) mit $2 \cdot 10^6$ eingesetzten Zellen

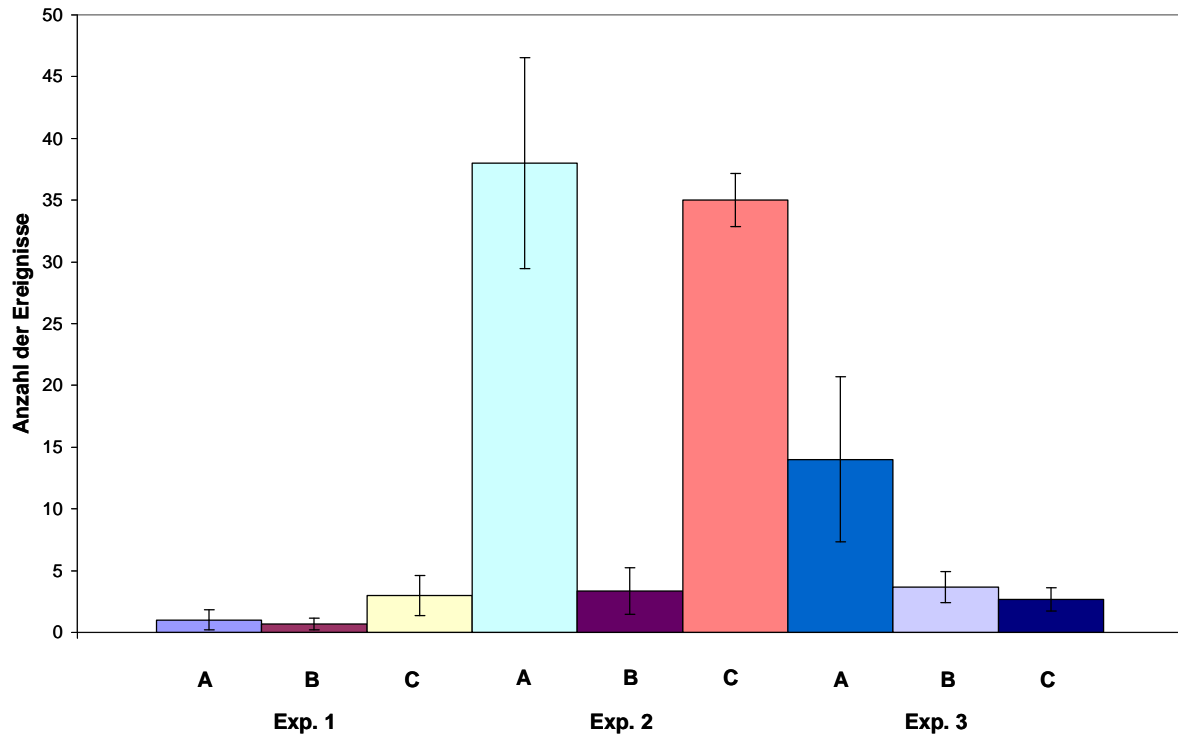


Abb. 3.24: Zusammenfassung der Retrotranspositionsexperimente des Indikatorkonstruktes von MoMLV mit 10^6 eingesetzten Zellen

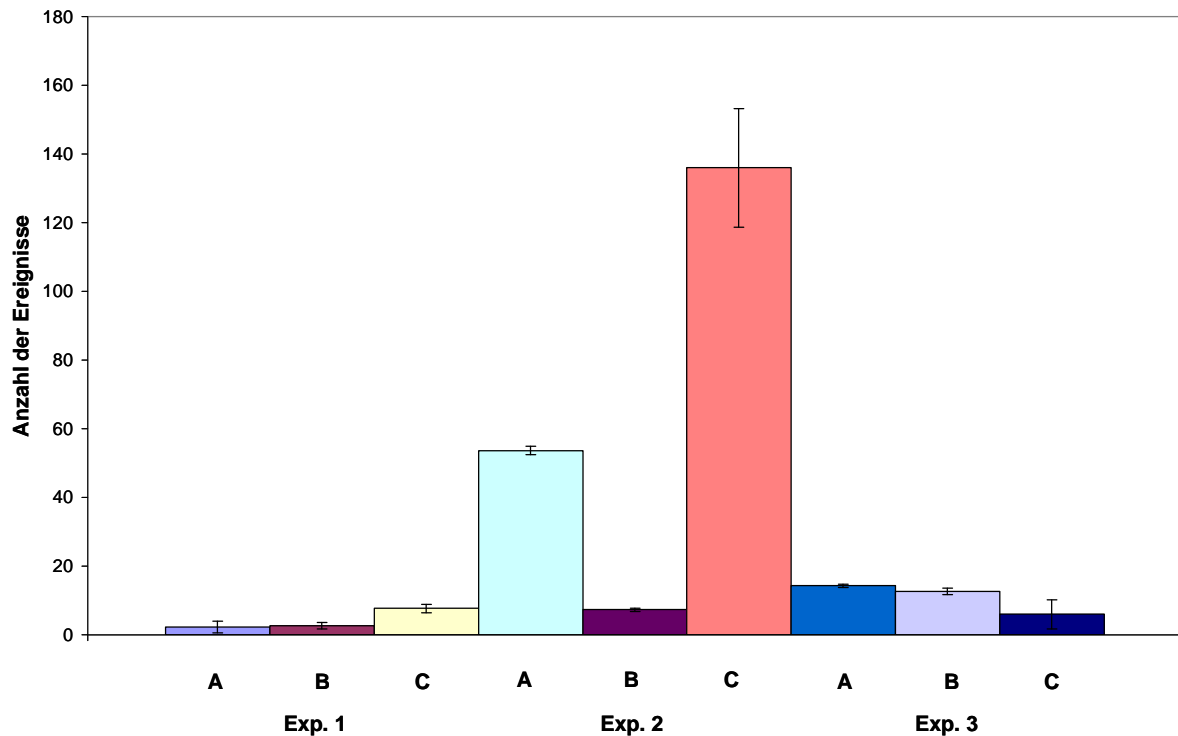


Abb. 3.25: Zusammenfassung der Retrotranspositionsexperimente des Indikatorkonstruktes von MoMLV mit $2 \cdot 10^6$ eingesetzten Zellen

In folgender Tabelle sind die Ergebnisse der Retrotranspositionsexperimente dargestellt. Diese sind nach Provirus und der jeweiligen Anzahl ausgesäter Zellen sortiert. Zusätzlich

sind die minimal [min] und maximal [max] detektierten Retrotranspositionsereignisse mit entsprechender, daraus resultierender, maximaler [max] Retrotranspositionsfrequenz angegeben.

	PERV-B(33)		MoMLV	
Anzahl Zellen (z)	1 Million	2 Millionen	1 Million	2 Millionen
Retrotranspositionsereignisse (x) [min-max]	0-12	0-11	0-45	0-160
Frequenz (y) $y = x/z$ [max]	$1,2 \cdot 10^{-6}$	$5,5 \cdot 10^{-7}$	$4,5 \cdot 10^{-6}$	$8 \cdot 10^{-6}$

Tab. 3.1: *Retrotranspositionsfrequenzen der Indikatorkonstrukte von PERV-B(33) und MoMLV*

3.3 Analyse von Integrationsstellen der Indikatorkonstrukte

Die Analyse der Integrationsstellen erfolgte mit Hilfe der EPTS/LM-PCR, eine spezielle PCR, für die Charakterisierung einzelner Integrationsorte. Wie in Abb. 2.2 (Material und Methoden) dargestellt ist, wurde ein bestimmter Anteil hygromycinresistenter Zellen nicht gezählt und neu ausgesät, sondern direkt mit G418 behandelt. Die resultierenden neomycinresistenten Kolonien wurden geerntet und einzeln bis zu einem konfluenten Loch einer 12 Lochplatte vermehrt. Darauf basierend wurde die genomische DNA präpariert und in eine EPTS/LM-PCR eingesetzt. In diesem Experiment sollte gezeigt werden, dass die retrotransponierten Proviren ein retrovirales Integrationsmuster aufweisen und über vollständige 3'Enden verfügen. Dies wäre nicht der Fall, wenn die detektierten Retrotranspositionen durch Proteine von endogenen LINE-1 vermittelt worden wären.

Es wurden drei Integrationen sowohl von PERV-B(33) als auch von MoMLV untersucht, welche alle ein typisches retrovirales Integrationsmuster aufwiesen. Dieses Muster zeichnet sich durch eine Sequenzverdopplung von 4 Basenpaaren (TSD=Target Site Duplication) aus, welche die retrotransponierten Kopien flankieren (vgl. Abb. 3.26 und 3.27 [rot]). Zusätzlich verfügen die detektierten Kopien über vollständige 3'Enden, womit eine LINE-1 vermittelte Retrotransposition ausgeschlossen werden kann.

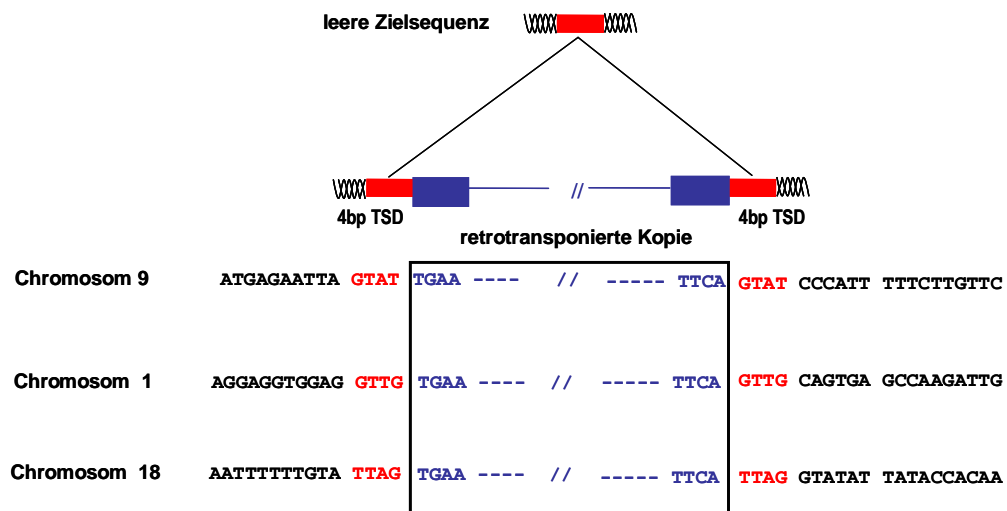


Abb. 3.26: Untersuchte Integrationsstellen des Indikatorplasmids von PERV-B(33)

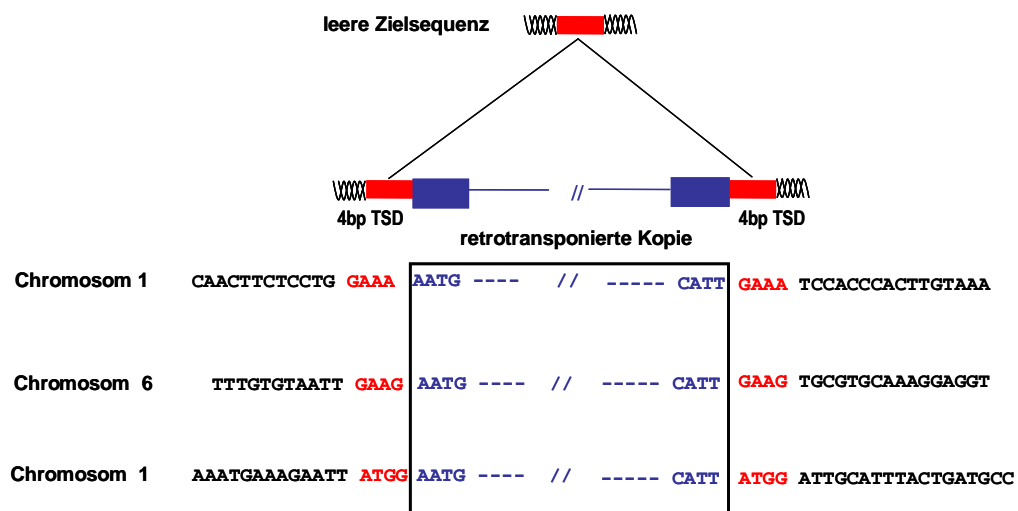


Abb. 3.27: Untersuchte Integrationsstellen des Indikatorplasmids von MoMLV

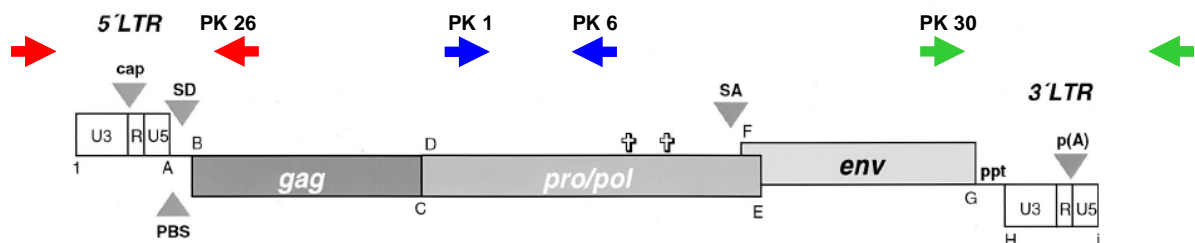
B. Durchmusterung verschiedener transgener Schweine nach infektiösen, replikationskompetenten PERV-A und PERV-B sowie ekotropen PERV-C

Um eine virologische Sicherheit bei einer potentiellen Xenotransplantation zu gewährleisten, sollten nach Möglichkeit nur Organe von Schweinen verwendet werden, welche keine infektiösen Proviren in ihrem Genom beherbergen. Aus diesem Grund ist es notwendig alle Schweine, die für eine mögliche Xenotransplantation in Frage kommen, auf Anwesenheit von replikationskompetenten Proviren zu untersuchen. Dies ist dadurch möglich, dass die Genorte von allen vier bisher bekannten, nativ vorkommenden replikationskompetenten PERV-A/ -B bekannt sind (Niebert et al. 2002). Somit kann man mit Hilfe einer PCR auf Anwesenheit dieser Proviren testen. Man verwendet dabei Oligonukleotidpaare, die einerseits spezifisch für das Provirus sind (PK26 und PK30) und andererseits spezifisch für die entsprechende chromosomale Flanke (Niebert et al. 2002, 2003). In Abb. 3.28 ist diese PCR schematisch dargestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden genomische DNAs von

verschiedenen transgenen Schweinen verwendet und auf Anwesenheit der entsprechenden Proviren getestet (s. Tab 3.2 und Tab. 3.3). Einleitend wurden alle DNA-Proben in einer PCR mit Hilfe des PCR Oligonukleotidpaares PK1 und PK6 (s. Abb. 3.28, blau) auf Brauchbarkeit getestet.

Die Primer PK26 und PK30 wurden als PERV spezifische Oligonukleotide in Kombination mit dem jeweiligen Flankenprimer des entsprechenden Provirus verwendet (vgl. Abb. 3.28).

Zusätzlich sind alle Schweine aus den Tabellen 3.2 und 3.3 auf die Anwesenheit von PERV-C untersucht worden. PERV-C ist zwar ekotrop, allerdings ist es das Rückgrat einer Rekombinante PERV-A/C, welche xenotrop ist. Bei dieser PCR-Analyse, welche ebenfalls auf genomischer DNA basiert, wurde ein PERV-C envelope-spezifisches Stück nachgewiesen. Hierzu wurden die Oligonukleotide PERV-C for und PERV-C rev verwendet, womit nach erfolgter PCR bei Anwesenheit der entsprechenden Sequenz ein etwa 280bp großes Fragment entsteht (s. Abb. 3.29, rot). Die Ergebnisse dieser Analyse sind in den Tabellen 3.2 und 3.3 dargestellt.



Niebert and Tönjes 2003

Abb. 3.28 Schematische Darstellung des Ablaufs des Nachweises replikationskompetenter PERV-A/B

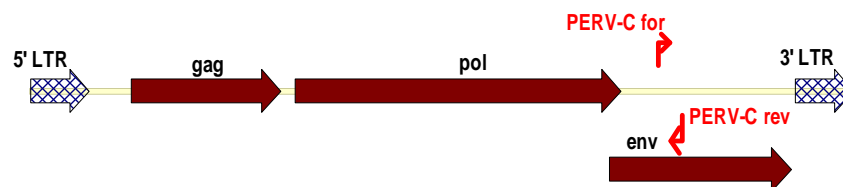


Abb. 3.29 Schematische Darstellung des Nachweises von PERV-C env spezifischen Sequenzen mittels gezeigter Oligonukleotiden (rot)

replikationskompetente PERV-A/B und PERV-C					
Nummer/Name	Transgen	151B10	192B9	463H12	PERV-C
8475	TRAIL	-	+	-	+
8646	CD55	-	+	-	+
8661	TRAIL	-	-	-	+
8666	TRAIL	-	-	-	+
8675	aMHC	+	+	+	+
8726	TRAIL	+	+	+	+
8727	TRAIL	+	+	+	-
9013	aMHC	+	-	+	+
9023	TRAIL	-	+	-	+
9075	TRAIL/HLA-E	+	+	+	+
9077	TRAIL/HLA-E	n.d.	n.d.	n.d.	+
9228	TRAIL/HLA-E	-	+	-	+
9230	TRAIL/HLA-E	+	+	+	+
9231	TRAIL/HLA-E	-	+	-	+
9234	CD55	-	+	-	-
9235	CD55	+	-	+	-
9236	CD55	+	+	+	-
9237	CD55	-	-	-	+
9238	CD55	+	-	n.d.	+
9242	CD55	+	-	+	+
9426	hDAF/TRAIL	+	+	+	+
9427	HLA-E	+	+	+	+
9428	hDAF/HLA-E	+	+	+	+
9430	TRAIL	+	-	+	+
9431	HLA-E/TRAIL	+	-	+	+
9432	HLA-E	+	+	+	+
9433	wt	-	+	-	+
9434	hDAF	+	-	+	+
9480		n.d.	n.d.	n.d.	+
9481		n.d.	n.d.	n.d.	+
9484		n.d.	n.d.	n.d.	+
9485		n.d.	n.d.	n.d.	+
9486		n.d.	n.d.	n.d.	+
9487		n.d.	n.d.	n.d.	+
9488		n.d.	n.d.	n.d.	+
9489		n.d.	n.d.	n.d.	+
9490		n.d.	n.d.	n.d.	+
9491		n.d.	n.d.	n.d.	+
9492		n.d.	n.d.	n.d.	+

Nummer/Name	Transgen	151B10	192B9	463H12	PERV-C
9495		n.d.	n.d.	n.d.	+
9496		n.d.	n.d.	n.d.	+
9497		n.d.	n.d.	n.d.	+
9498		n.d.	n.d.	n.d.	+
9499		n.d.	n.d.	n.d.	+
9500		n.d.	n.d.	n.d.	+
9501		n.d.	n.d.	n.d.	+
9502		n.d.	n.d.	n.d.	+
9504		n.d.	n.d.	n.d.	+
9505		n.d.	n.d.	n.d.	+
9507		n.d.	n.d.	n.d.	+
9508		n.d.	n.d.	n.d.	+
9509		n.d.	n.d.	n.d.	+
9510		n.d.	n.d.	n.d.	+
9511		n.d.	n.d.	n.d.	+
9512		n.d.	n.d.	n.d.	+
9513		n.d.	n.d.	n.d.	+
9515		n.d.	n.d.	n.d.	+
9517		n.d.	n.d.	n.d.	+
9518		n.d.	n.d.	n.d.	+
9519		n.d.	n.d.	n.d.	+
9520		n.d.	n.d.	n.d.	+
9523		n.d.	n.d.	n.d.	+
9524		n.d.	n.d.	n.d.	+
9525		n.d.	n.d.	n.d.	+
9526		n.d.	n.d.	n.d.	+
9528		n.d.	n.d.	n.d.	+
9529		n.d.	n.d.	n.d.	+
9530		n.d.	n.d.	n.d.	+
9531		n.d.	n.d.	n.d.	+
9532		n.d.	n.d.	n.d.	+
9533		n.d.	n.d.	n.d.	+
9482		n.d.	n.d.	n.d.	+
9493		n.d.	n.d.	n.d.	+
9506		n.d.	n.d.	n.d.	+
9514		n.d.	n.d.	n.d.	+
9521		n.d.	n.d.	n.d.	+
9527		n.d.	n.d.	n.d.	+

Tab. 3.1 Durchmusterung verschiedener transgener Schweine (Neustadt/Mariensee)

+: Schwein enthält entsprechendes Provirus

-: Schwein enthält entsprechendes Provirus nicht

n.d.: nicht definiert

		replikationskompetente PERV-A/B und PERV-C			
		151B10	192B9	463H12	PERV-C
Nummer/Name	Transgen				
Ni371	TRAIL/CD59	+	-	-	+
Ni372	TRAIL/CD59	-	-	-	+
Ni373	TRAIL/CD59	+	-	-	+
Ni376	TRAIL/CD59	-	+	+	+
Ni334	CD55/CD59	+	+	+	+
Ni336	CD55/CD59	+	+	-	+
Klon21	CD55/CD59	+	+	+	+
Kloneber 3	pot. Gal-Ko	+	-	-	+
Klon6	pot. Gal-Ko	-	+	+	-
Klon7	pot. Gal-Ko	-	+	-	+
Klon10	pot. Gal-Ko	+	+	-	-
Klon18	pot. Gal-Ko	+	+	+	-
Ni390	hDAF	+	+	+	+
Ni391	CD59/hDAF	+	+	+	+
Ni392	CD59/hDAF	-	+	-	+

Tab. 3.2 Durchmusterung verschiedener transgener Schweine (München)

+: Schwein enthält entsprechendes Provirus

-: Schwein enthält entsprechendes Provirus nicht

3.4 Durchmusterung verschiedener Schweinegenome auf Anwesenheit eines Vollängen PERV-C aus primären Zellen

3.4.1 Phagenbibliothek

Nachdem verschiedene genomische DNAs von transgenen Schweinen auf die Anwesenheit von PERV-C *env*-Sequenzen untersucht worden waren, sollte ein Vollängen PERV-C mit Hilfe einer Phagenbibliothek isoliert werden. Hierzu wurden solche DNAs von Schweinen ausgewählt, die in der oben genannten „PERV-C *env*-PCR“ (Abb. 3.29) ein positives Signal ergaben. Dieses Fragment wurde ehemals auch als Sonde bei der erfolgreichen Klonierung eines PERV-C Provirus aus der MAX-T Zelllinie verwendet (Preuß et al. 2006).

Leider konnte wegen Zeitmangels aus dieser eigens hergestellten Phagenbibliothek kein natürlich vorkommendes Provirus isoliert werden.

3.4.2 EPTS/LM-PCR

Parallel zur Phagenbibliothek wurde eine andere Strategie verfolgt, bei der mit Hilfe der EPTS/LM-PCR neue 3' Flanken von PERV-C Proviren gefunden wurden. Als Oligonukleotid für die EPTS/LM-PCR wurde eine biotinylierte Version des Vorwärtsprimers verwendet, der

auch zur Durchmusterung nach PERV-C envelope Sequenzen Verwendung fand (PERV-C for).

Die neu identifizierten Flanken sollten als Basis zur Identifikation der chromosomalen Lage und der Klonierung von kompletten Proviren dienen. Als Ausgangsmaterial wurde sowohl genomische DNA der Zelllinie MAX-T als auch DNA des transgenen Schweins 372 (Neustadt/Mariensee) verwendet. Mit diesem Ansatz gelang, es sieben weitere PERV-C Proviren oder zumindest 3'Enden dergleichen zu finden, welche auch in einer PCR auf Basis genomischer Schweine DNAs zum Teil zu detektieren waren. Zur Klonierung eines Volllängen PERV-C mit genomischer DNA als Ausgangsmaterial ist es notwendig über die Sequenz beider Flanken zu verfügen. Da in den bisher in der Datenbank hinterlegten Sequenzen des Schweinegenoms keine Übereinstimmung zu den hier gefundenen Flanken zu finden war, gelang eine Klonierung eines kompletten PERV-C aufgrund mangelnder Zeit nicht mehr.

In der folgenden Abbildung (Abb. 3.30) ist ein Sequenzvergleich zwischen den neu identifizierten 3' Flanken und der bereits bekannten Flankensequenz von PERV-C(1312) dargestellt.

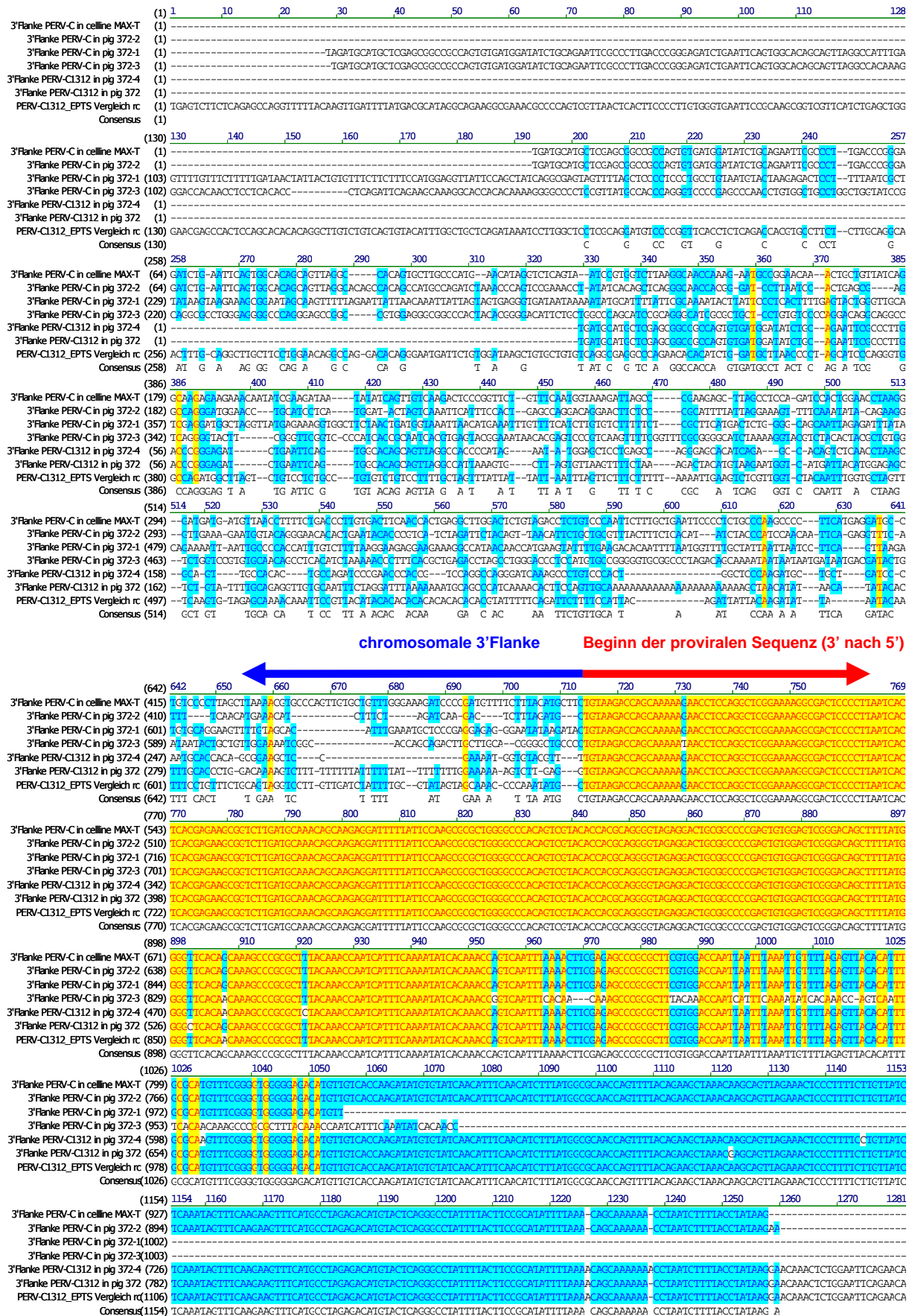


Abb. 3.30: Vergleich der identifizierten 3'Flanken von verschiedenen PERV-C mit der Flankensequenz des Klons 1312

3.5 Chromosomale Lokalisation des Provirus PERV-C(1312)

Aus einer vorangegangenen Arbeit wurde ein PERV-C Provirus (PERV-C(1312)) aus der Zelllinie MAX-T isoliert (Preuß et al. 2006). Da dieses Isolat zusätzlich zu dem Provirus auch über flankierende chromosomale Bereiche verfügte, sollte in diesem Fall auch eine chromosomale Zuordnung vorgenommen werden. Für diese Zuordnung wurde ein RH-Panel verwendet, wobei die Hybridisierungsprobe auf folgender PCR basierte (Abb. 3.31). Bei dieser PCR (mit den Oligonukleotiden 5'Flanke for und 3'Flanke rev) werden 482bp der Präintegrationsstelle des Provirus amplifiziert, da eine Zuordnung in Verbindung mit dem Provirus nicht möglich war (Abb. 3.31).

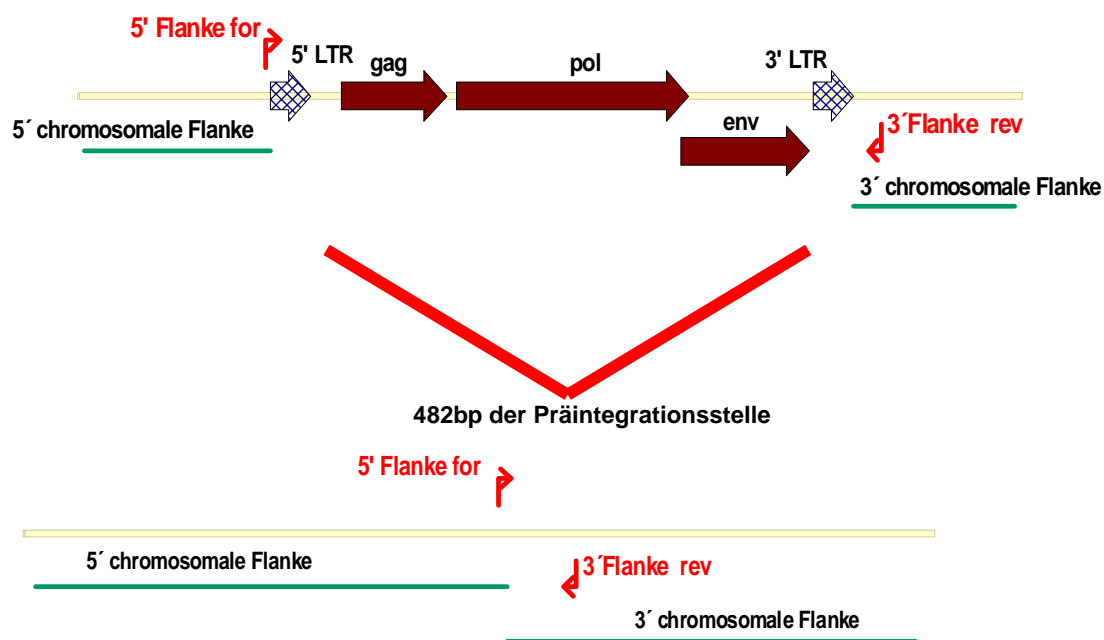


Abb. 3.31: Schematische Darstellung der PCR zur Ermittlung der Präintegrationsstelle eines Provirus mit Hilfe eines RH-Panel

Mit Hilfe dieses Vorgehens konnte das Provirus PERV-C1312 dem langen Arm des porzinen Chromosoms 2 (SSC2, *sus scrofa chromosome 2*) zugeordnet werden (vgl. Abb. 3.32) (vielen Dank an Dr. Andreas Spötter vom Institut für Tierzucht und Vererbungsforschung in Hannover für die Durchführung des RH-Panels).

In der folgenden Abbildung sind alle bisher identifizierten, replikationskompetenten PERV-A, -B (rot) und -C chromosomal zugeordnet (Niebert et al. 2002; Krach et al. 2001).

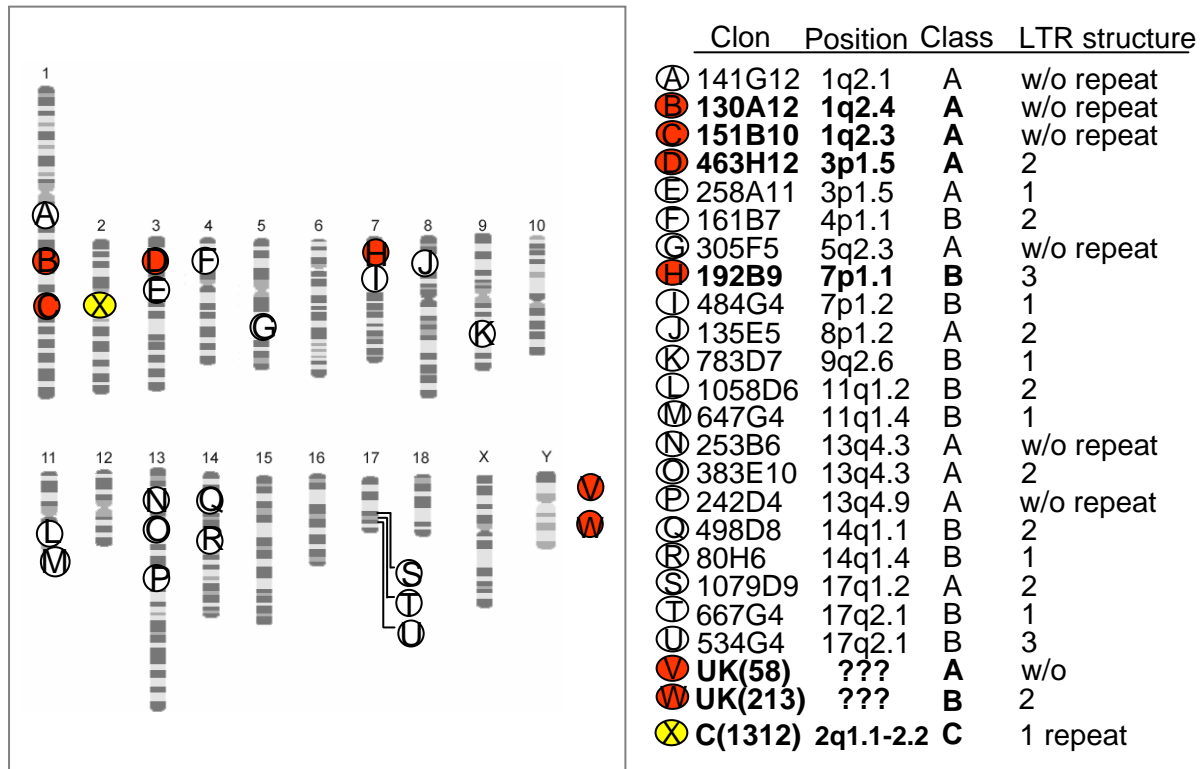


Abb. 3.32: Chromosomale Lokalisation der replikationskompetenten PERV-A und -B (rot), sowie von PERV-C(1312) (gelb)

(freundlicherweise von Prof. Dr. R. R. Tönjes zur Verfügung gestellt)

Bei den übrigen Proviren handelt es sich um replikationsinkompetente PERV. Die Proviren UK(58) und UK(213) sind zwar replikationskompetent, konnten aber chromosomal nicht zugeordnet werden (Krach et al. 2001).

Die Präintegrationsstelle von PERV-C(1312) war in allen untersuchten DNA-Proben transgener Schweine nachweisbar (vgl. Tab 3.2). Allerdings war ein Nachweis in Verbindung mit dem Provirus ausschließlich in der Zelllinie MAX-T möglich (Daten nicht gezeigt).

3.6 Repetitive Elemente

Da das Schweinegenom noch nicht komplett sequenziert ist und die identifizierten Sequenzen der 3'Flanken keine Übereinstimmung mit bisher bekannten Sequenzen ergaben, wurde eine weitere Strategie verfolgt, um ein Vollängen PERV-C aus den verwendeten Proben zu klonieren. Mit Hilfe von porzinen SINE (Short Interspersed Nuclear Elements), welche über das gesamte Genom verstreut zu finden sind, sollte dies ermöglicht werden. Dazu wurde einerseits ein Oligonukleotid verwendet, welches spezifisch für die entsprechende 3'Flanke ist und zusätzlich in Richtung des Provirus orientiert ist. Als Gegenstück wurde ein Oligonukleotid verwendet, welches spezifisch für ein porzines SINE ist. Da ein Provirus nur auf einem Chromosom integriert vorliegt und das Schwesterchromosom demzufolge die Präintegrationsstelle enthält, sollte es so ermöglicht werden die Sequenz der unmittelbaren 5'Flanke zu vervielfältigen. Davon ausgehend könnte man mit Hilfe der Flankenprimer in Verbindung mit PERV-C spezifischen Primern ein komplettes Virus amplifizieren.

Da die Orientierung dieser SINE unterschiedlich ist, wurde einerseits ausschließlich das Oligonukleotid verwendet, welches spezifisch für das SINE ist. Andererseits wurde dieses Oligonukleotid in Verbindung mit den Primern verwendet, welche spezifisch für die jeweiligen Flanken sind. Die Amplifikate, welche nur in diesem Ansatz vervielfältigt wurden und nicht in der SINE spezifischen PCR auftraten, waren von Interesse.

Leider führte auch dieser Ansatz aufgrund von Zeitmangel zu keinem positiven Ergebnis.

4 Diskussion

4.1 Ziel der Retrotranspositionsexperimente

Im Fall einer Xenotransplantation mit Schweinen als Donortieren besteht im Menschen das Risiko einer Infektion durch replikationskompetente porcine endogene Retroviren. Diese sind zumindest *in vitro* in der Lage, humane Zellen zu infizieren (Patience et al. 1997).

Das Risiko einer Infektion *in vivo* kann allerdings zusätzlich durch die vielen deletierten und mutierten proviralen Sequenzen, welche das porcine Genom beherbergt, gesteigert werden. Durch diese Elemente ist es selbst nach Entfernen der replikationskompetenten Proviren möglich, dass durch eine Komplementation derselben ein infektiöses Virus gebildet wird. Dieses wäre dann in der Lage nach erfolgter Xenotransplantation, humane Zellen zu infizieren. Nach diesem Ereignis wird das Genom des Virus ein fester Bestandteil des Genoms der infizierten humanen Zelle. Wenn die Deletion oder Mutation dieses Virusgenoms ausschließlich den „envelope“ Leserahmen betrifft, ist es möglich dass trotz verloren gegangener Infektiosität das Risiko einer Retrotransposition besteht, einem *env* unabhängigen Mechanismus. Dieser Vorgang ist an sich schon als mutagen an zu sehen, genau wie die Integration eines Retrovirus. Zusätzlich liegen die bevorzugten Integrationsstellen von PERV in der Nähe von Transkriptionstartpunkten und CpG-Inseln, was das Risiko einer Entartung der Zielzelle erheblich steigert (Moalic et al. 2006).

Um dieses Risiko abschätzen zu können wurden Proviren von MoMLV (Positivkontrolle) und PERV-B(33) modifiziert indem anstelle des *env*-Gens eine Neomycin-Indikatorkassette (*neo^{int}*) eingefügt wurde (Freeman et al. 1994). Das Neomycingen der Indikatorkassette ist durch ein Intron unterbrochen. Nach Transkription, Spleißen, reverser Transkription und Reintegration kann das Neomycin transkribiert werden, worauf der betreffenden Zelle eine Resistenz gegen G418 (Neomycinanalogon) vermittelt wird. Dies ermöglicht den indirekten Nachweis einer Retrotransposition *in vitro*.

In gleicher Weise wurden solche Indikatorkonstrukte von HERV-K113 (Turner et al. 2001) und HIV-1 hergestellt. Aufgrund der HERV unüblichen polymorphen Verteilung und nicht mutierten offenen Leserahmen des Provirus HERV-K113 handelt es sich hierbei um ein potentiell aktives Element. Um dies zu überprüfen wurde HERV-K113 Bestandteil dieser Studie. HIV-1 betreffend gibt es in der Literatur keine Studie die einen Nachweis einer Retrotransposition gezeigt hat, wodurch es ebenfalls Bestandteil dieser Arbeit wurde.

4.2 Retrotranspositionsexperimente mit PERV-B(33) und MoMLV

Der Nachweis einer Retrotransposition gelang im Fall von PERV-B(33) und der Positivkontrolle MoMLV. Das exogene murine Retrovirus MoMLV retrotransponiert in den hier durchgeführten Experimenten siebenmal so oft wie das porcine endogene Gegenstück. Bezüglich MoMLV entspricht die Frequenz der Retrotransposition bereits durchgeführten, ähnlichen Studien (Tchenio und Heidmann, 1991).

Der Unterschied im Retrotranspositionspotential spiegelt das Verhalten des nativen MoMLV wider, welches sich in einer höheren Infektiosität naiver Zellen im Vergleich zum nativen PERV-B(33) zeigt (Martina et al. 2005). Dies liegt u.a. daran, dass der Rezeptor, welcher von MoMLV benutzt wird, um Zellen zu infizieren, auf mehreren Zelltypen exprimiert wird, was eine effektivere Infektion im Vergleich zu PERV ermöglicht. Da in den hier durchgeführten

Experimenten nicht infiziert, sondern transfiziert wurde, ist in beiden Fällen die Transfektionseffizienz mittels Kotransfektionen mit einem Vektor (pEGFP-C1, Clontech), der das „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) exprimiert, durch Fluoreszenzanalysen bestätigt worden. Diese war für die modifizierten Proviren von MoMLV und PERV-B(33) identisch (nicht gezeigt). Die Ursache der unterschiedlichen Retrotranspositionsaktivität muss demzufolge virusspezifisch sein. Somit ist dieser Unterschied entweder auf eine stärkere Promotoraktivität, was eine stärkere Expression der benötigten strukturellen und enzymatischen Viruselemente zur Folge hätte, und/oder eine effektivere reverse Transkriptase Aktivität im Fall von MoMLV zurückzuführen.

Um dies zu klären müssten einerseits vergleichende Promotorstudien durchgeführt werden, z.B. durch Verwendung eines Luciferase Assays, wobei die entsprechenden retroviralen LTRs, also die Promotoreinheiten, als Regulatoren des Luciferasegens fungieren. Anhand der Intensität der entstehenden Lichtemission könnte daraufhin indirekt die Promotorstärke bestimmt werden.

Andererseits müsste die RT-Aktivität der beiden Retroviren verglichen werden, z.B. durch Generierung entsprechender Viruspartikel, welche mit VSV-G pseudotypisiert sind, damit eine Untersuchung erfolgen kann, die unabhängig von der Infektiosität ist. Nach Transduktion naiver Zellen mittels dieser Pseudotypen könnte anschließend anhand eines Indikators (z.B. EGFP) indirekt die RT Prozessivität bestimmt werden.

Bezüglich PERV-B(33) und auch MoMLV konnte allerdings keine Retrotransposition gezeigt werden, wenn die Promotoreinheit, die U3-Region der 5'LTR, gegen einen heterologen CMV-Promotor ausgetauscht wurde. Dies ist zumindest bezüglich PERV-B(33) ungewöhnlich, da in früher durchgeführten Promotorstudien mittels Luciferase Assays, gezeigt wurde, dass die CMV-Promotoreinheit potenter ist als die 5'LTR des PERV-B(33) Provirus (Scheef et al. 2001). Dies war seinerzeit in allen untersuchten Zelllinien der Fall, inklusive HeLa Zellen, welche auch in dieser Arbeit verwendet wurden.

Bezüglich der Transfektionseffizienz und der daraus resultierenden hygromycinresistenten Zellen war auch hier kein Unterschied zwischen den verwendeten Konstrukten (CMV reguliert oder nicht) festzustellen. Dies wurde wiederum durch Kotransfektionen eines EGFP exprimierenden Plasmids (pEGFP-C1, Clontech) überprüft. Somit ist entweder das transfizierte, modifizierte Provirus durch den CMV-Promotor nicht stark genug reguliert worden oder es waren aufgrund der PCR-basierenden Konstruktion des CMV regulierten Plasmids von PERV essentielle Elemente für die reverse Transkription (RT) nicht vorhanden. Möglicherweise ist für die RT im Fall von PERV-B(33) am 3'Ende mehr als nur der provirale Polypurintrakt (PPT) und die 3'LTR notwendig, z.B. ein Abschnitt des 3'Endes des Hüllproteinleserahmens, welcher bei der Amplifikation mittels PCR nicht berücksichtigt wurde. Dieser Abschnitt ist bei dem Konstrukt, welches durch den natürlichen Promotor reguliert wird, aufgrund der Klonierungsstrategie noch vorhanden. Im Fall des CMV regulierten MoMLV Konstruktes, welches in einer vorangegangenen Arbeit schon Verwendung fand, war ebenfalls keine Retrotranspositionsaktivität nachzuweisen. In der genannten Arbeit wurde eine Frequenz von $1,08 \cdot 10^{-7}$ bezüglich dieses Konstrukts gezeigt (Dissertation XinLi Nan 1998). Dies konnte in den hier durchgeführten Experimenten nicht bestätigt werden.

Möglicherweise sind die CMV regulierten Konstrukte bevorzugt „stillgelegt“ worden. Beispielsweise könnte es durch eine Methylierung zu keiner oder nur einer sehr geringen Transkription kommen. Eine gute Expression der strukturellen und enzymatischen Einheiten

ist allerdings aufgrund der aus der Literatur bekannten seltenen Vorkommen von Retrotranspositionereignissen bei LTR-Retrotransposons essentiell. Die Stärke der Expression hätte zusätzlich zu den Immunfluoreszenzanalysen, anhand von Western Blot Analysen, am besten zu verschiedenen Zeitpunkten, überprüft werden können

Ein entscheidender Unterschied zwischen den CMV regulierten und den LTR regulierten Konstrukten von PERV-B(33) und MoMLV sind möglicherweise die jeweils verwendeten Plasmidrückgrate. Das LTR regulierte Konstrukt von PERV-B(33) hat ein Klonierungsvektor als Rückgrat (pGemTeasy, Promega), das von MoMLV einen deletierten Vektor für eine extrachromosomale Replikation. Die CMV regulierten Konstrukte sind hingegen Bestandteil eines eukaryotischen Expressionsvektors. Dadurch sollten eigentlich keine Unterschiede bezüglich einer Retrotransposition entstehen, sicher wäre es aber besser alle modifizierten Proviren, mit dem gleichen Plasmidrückgrat zu verwenden.

Aufgrund dieser Ergebnisse war ein Vergleich zwischen „natürlich“ reguliert und CMV reguliert nicht möglich. Daraus folgend war auch kein Promotor unabhängiger Vergleich der Retrotranspositionsfähigkeit zwischen PERV und MoMLV möglich.

Basierend auf den ermittelten Daten dieser Arbeit kann man sagen, dass das Risiko einer Insertionsmutagenese eines porzinen endogenen Retrovirus, vermittelt durch eine Retrotransposition, nach erfolgter Xenotransplantation, als sehr gering einzuschätzen ist. 12 Ereignisse in einer Million Zellen pro Zelle und Generation sind sehr wenig und biologisch nicht relevant. Selbst bei einer Anschaltung eines Onkogens würde diese geringe Anzahl an Zellen nicht notwendigerweise zu einem Krankheitsbild führen.

4.3 Retrotranspositionsexperimente mit HERV-K113 und HIV-1

Im Fall von HERV-K113 und HIV-1 konnten keine Retrotranspositionereignisse detektiert werden. Da das Indikator-konstrukt von HERV-K113 auf gleiche Art und Weise hergestellt wurde wie das von PERV-B(33), waren möglicherweise auch hier nicht alle notwendigen Elemente einer reversen Transkription vorhanden. Zudem ist auch eine ausreichende Transkription der enzymatischen und strukturellen Elemente aufgrund des verwendeten Expressionsvektors in Frage zu stellen (vgl. 4.1).

Bezüglich HERV-K113 bestätigt dieses Ergebnis eine Studie mit einem künstlich hergestellten HERV-K (HERV-K PHOENIX). Bei diesem HERV-K handelt es sich um eines von zweien (das zweite ist HERV-Kcon), welche aus einer Konsensussequenz aller bekannten, kompletten Proviren abgeleitet wurde und sogar replikationskompetent sind (Dewannieux et al. 2006; Lee et al. 2007). Allerdings konnte auch für dieses „Vorläufer“ HERV-K in einem Retrotranspositions-Assay keine entsprechende Aktivität nachgewiesen werden (Dewannieux et al. 2006). Zusätzlich ist aus der Aminosäuren-Konsensussequenz ersichtlich, dass das in dieser Arbeit verwendete HERV-K113 im Vergleich zu den beiden replikationskompetenten HERV-Kcon und HERV-K PHOENIX, eine Mutation im Bereich der reversen Transkriptase besitzt. Diese Mutation liegt an Position 185 des Polymerase-Leserahmens innerhalb des RT Leserahmens. An dieser Stelle besitzen die funktionalen HERV-K eine Glutaminsäure, während bei HERV-K113 eine Asparaginsäure vorhanden ist. In einer weiteren Studie wurde mittels rekombinanter Baculoviren gezeigt, dass HERV-K113 in der Lage ist Partikel zu bilden. Allerdings war auch hier wegen der genannten Mutation keine Reverse Transkriptase Aktivität messbar (Boller et al. 2008).

Da dies der einzige Unterschied in der RT Domäne ist, liegt hier die Ursache der nichtfunktionalen reversen Transkriptase des HERV-K113 Provirus (Abb 4.1), wodurch eine potentielle Retrotransposition sowieso nicht möglich gewesen wäre.



Abb. 4.1: Aminosäurevergleich des RT-Leserahmens von HERV-K113 mit seinen aktiven Verwandten HERV-K PHOENIX und HERV-Kcon

Der RT-Leserahmen in gelb dargestellt. Angrenzend sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts (blass gelb) befinden sich benachbarte Bereiche des pol-Leserahmens.

Die Untersuchungen an HERV-K113 sollten dazu dienen, eine Aktivität eines humanen endogenen Retrovirus zu zeigen. Da dieses Provirus polymorph in der Bevölkerung vorkommt und über intakte offene Leserahmen verfügt (Turner et al. 2001) und somit im Vergleich zu seinen „Verwandten“ einen relativ jungen Vertreter darstellt, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Nachweis einer Retrotranspositions-Aktivität versucht. Zudem geht man davon aus, dass die vielen proviralen Sequenzen bzw. Kopien der humanen endogenen Retroviren teilweise durch Retrotransposition entstanden sind.

Möglicherweise ist der Mechanismus der Retrotransposition von Retroviren auf die einfachen Vertreter die γ -Retroviren beschränkt, wozu PERV und MoMLV gehören. Diese sind strukturell die nächsten Verwandten der LTR-Retrotransposons bzw. sind aus diesen evolutionär gesehen entstanden (Löwer et al. 1996).

Komplexe Retroviren wie HIV (Lentivirus) oder solche, die zumindest über weitere, akzessorische Gene verfügen wie HERV-K, sind nach den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen nicht in der Lage zu retrotransponieren. Eine Ausnahme bilden allerdings die Foamyviren, eine Unterklasse der Retroviren (Spumaviren), welche zu den komplexen Viren gehören, bei denen eine Retrotransposition allerdings Bestandteil des Replikationszyklus ist (Linial 1999).

4.4 Integrationsstellen

Die in dieser Arbeit untersuchten Integrationsstellen der markierten Proviren weisen alle flankierende Duplikationen auf, welche 4 Basenpaare umfassen. Diese Anzahl an Sequenzduplikationen (Target Site Duplication, TSD) ist charakteristisch für die nativen, replikationskompetenten Vertreter von PERV und MoMLV (Moalic et al. 2006). Durch das Vorhandensein dieser regelmäßigen TSDs kann man eine durch Proteine von endogenen LINE-1 Elementen vermittelte Retrotransposition ausschließen. In diesem Fall wäre eine unregelmäßige Anzahl an TSDs vorhanden, welche bis zu 18 Basenpaare umfassen könnten.

Zusätzlich verfügen alle gefundenen retrotransponierten Kopien über komplette 3'LTRs. Bei Vermittlung durch endogene LINE-1 Elemente wäre zu erwarten, dass die U5-Region der 3'LTR nicht vorhanden ist und die provirale Sequenz mit einer poly(A)-Sequenz endet. LINE-1 Elemente retrotransponieren willkürlich mRNAs und somit müssen die in dieser Weise entstehenden Kopien über mRNA charakteristische poly(A)- Enden verfügen.

Eine Nichtbeteiligung dieser Elemente wird auch durch die Negativkontrollen, die Deletionsmutanten, bestätigt. In diesen Fällen waren keinerlei Retrotranspositionereignisse nachzuweisen. Dies wäre ausschließlich möglich mit Hilfe von *in trans* zur Verfügung gestellter Proteine nämlich von endogenen LINE-1 (Pavlicek et al. 2002). Allerdings würde man in diesem Fall eine Frequenz der Retrotransposition erwarten, welche sich im Bereich 10^{-8} befindet und somit wesentlich geringer ist, als bei den in dieser Arbeit ermittelten Werten (Maestre et al. 1995).

4.5 Identifikation von replikationskompetenten PERV-A und PERV-B sowie ekotropen PERV-C

Die Durchmusterung von transgenen Schweinen nach replikationskompetenten PERV ist ein wichtiger Schritt, um bei einer möglichen Xenotransplantation einer Zoonose vorzubeugen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach drei replikationskompetenten PERV „gescreent“, welche mit Hilfe einer genomischen Phagenbibliothek eines Schweins der Rasse „Large White“ identifiziert worden waren (Niebert et al., 2002). Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass noch weitere infektiöse PERV im Schweinegenom existieren. Ein Indiz dafür sind zwei weitere infektiöse Vertreter, welche mit Hilfe einer Phagenbibliothek aus der Zelllinie 293 PERV-PK15 isoliert wurden (Krach et al. 2001). Ein Nachweis dieser Proviren ist allerdings nicht möglich, da eine chromosomale Zuordnung in diesen Fällen nicht gelang. Die Ursache hierfür ist in der Basis der Phagenbibliothek zu suchen. Da hier genomische DNA einer Zelllinie als Ausgangsmaterial verwendet wurde, ist aufgrund einer wahrscheinlichen Entartung dieser Linie eine chromosomale Zuordnung nicht mehr möglich.

Das Risiko einer Infektion *in vivo* kann teilweise dadurch ausgeschlossen werden, dass die chromosomale Lage von vier replikationskompetenten porzinen Retroviren bekannt ist und diese über eine PCR zu identifizieren sind. Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse hierzu zeigen, dass drei Proviren eine polymorphe Verteilung innerhalb der Schweinepopulation aufweisen. Durch ein entsprechendes „Vorscreening“ wäre somit ein Ausschluss dieser Elemente aus dem Genom der potentiellen Donortiere durch konventionelle Züchtung möglich.

Allerdings sollen als Spendertiere bevorzugt Schweine zum Einsatz kommen, welche den d/d Haplotyp für das Schweine-Leukozyten-Antigen (SLA) besitzen (Sachs, 1994). Zellen dieser Tiere setzen nur ekotropes PERV-C frei (Oldmixon et al. 2002). Diese stellen durch den Ekotropismus kein direktes Infektionsrisiko dar. Allerdings wurde *in vitro* eine Infektion humaner Nierenzellen gezeigt, nachdem periphere mononukleäre Blutzellen eines d/d-Haplotyp Schweines stimuliert wurden (Wilson et al. 1998). Nach Analyse des Ursprungs dieser Infektion stellte man fest, dass es sich hier um eine Rekombination eines PERV-C mit einem PERV-A handelte (Wilson et al. 1998). Dabei ereignete sich diese Rekombination in der Rezeptorbinde Domäne des Virus, wobei ein Stück PERV-C durch PERV-A ersetzt wurde und somit ein Polytypismus des rekombinierten Virus entstand. In darauf folgenden Studien mit MLV-Partikeln, welche mit dem oben beschriebene rekombinanten *env*-Gen pseudotypisiert wurden (Wilson et al. 2000, Harrison et al. 2004), zeigte sich eine höhere RT-Aktivität der so produzierten Partikel im Vergleich zu den nativen PERV-Partikeln. Dadurch schützt die Verwendung von Schweinen, welche ausschließlich PERV-C Partikel freisetzen, nicht vor einer Infektion.

Somit kommt einem entsprechendem „Vorscreening“ auf PERV-C eine große Bedeutung zu. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe einer PCR, durch welche ein Nachweis *env*-spezifischer PERV-C Fragmente möglich ist, alle vorhandenen Proben transgener Schweine auf Anwesenheit dieses Virus überprüft. Auch hier sind die Elemente polymorph verteilt (zumindest die *env*-Anteile derselben), so dass ein Ausschluss von PERV-C aus dem Genom der Schweine durch konventionelle Züchtung möglich erscheint.

4.6 Klonierung eines Vollängen PERV-C aus primären Zellen

Die Identifikation eines Vollängen PERV-C aus primären Zellen sollte mit Hilfe einer Phagenbibliothek gelingen. PERV-C ist die Basis einer A/C Rekombinante, die bisher nur *ex vivo* nachgewiesen wurde, bzw. von der nur kleine Bereiche des Provirus genomisch identifiziert werden konnten (Martin et al. 2006). Würde man durch Klonierung von Vollängen PERV-C Proviren in den Besitz dazugehöriger chromosomaler Flanken kommen, so wäre eine chromosomale Zuordnung möglich. Darauf aufbauend könnte man wiederum eine PCR etablieren mit deren Hilfe man schon im Vorfeld, in transgenen Schweinen, welche für die Xenotransplantation in Frage kommen würden, nach eben diesen PERV-C screenen könnte. Mit diesem Schritt würde man gleichfalls das Risiko einer Rekombinante PERV-A/C ausschließen.

Im Fall des Klons PERV-C(1312), welcher mit Hilfe einer genomischen Phagenbibliothek der Zelllinie MAX-T isoliert wurde (Preuß et al. 2006), waren nach Isolation sowohl 5' als auch 3' Flanken vorhanden. Ein PCR-Screening mit Oligonukleotiden, die einerseits spezifisch für die chromosomalen Flanken und andererseits spezifisch für das Provirus sind, gelang allerdings in keiner getesteten DNA-Probe ein Nachweis. Das Provirus war nur in der Zelllinie MAX-T, woraus es isoliert wurde, nachweisbar. Da es sich dabei um eine Zelllinie handelt und diese oft entartet sind, wurde mit Hilfe der Flankensequenzen in einem RH-Panel die Präintegrationsstelle identifiziert. Diese war in allen untersuchten Schweineproben nachweisbar.

Southern Blot Analysen mit einer PERV-C *env* spezifischen Sonde zeigten mehrere Kopien von PERV-C Sequenzen innerhalb verschiedener porziner DNAs (Preuß et al. 2006).

Genomische DNA der Zelllinie MAX-T ergab in dieser Analyse die höchste Kopienzahl an PERV-C spezifischen Sequenzen, weswegen diese Zelllinie als Basis der genomischen Phagenbibliothek verwendet wurde. In der Tat wurden noch drei weitere PERV-C Proviren aus dieser Phagenbibliothek isoliert, welche aber unterschiedlich starke Deletionen hatten (Preuß et al. 2006). Vermutlich handelt es sich aber auch bei diesen Proviren um Vollängen PERV-C, da die Ursache der Deletionen durch die Klonierungsstrategie hervorgerufen wurde.

Parallel zur Erstellung einer Phagenbibliothek wurde versucht mit Hilfe der EPTS/LM-PCR (Schmidt et al. 2001) an weitere Flankensequenzen zum Klonieren eines PERV-C Provirus zu gelangen. Durch die Flankensequenzen könnte man wiederum eine chromosomale Lokalisation mit Hilfe eines RH-Panel durchführen. Mit diesem Ansatz wurden sieben weitere 3' Flanken ermittelt, von denen in einem ersten Versuch zwei in Verbindung mit einem PERV-C Provirus in verschiedenen Schweineproben zu detektieren waren. Auf Basis dieser Daten könnte man versuchen an die 5'Flanke der Proviren zu gelangen und somit eine Klonierung per PCR zu ermöglichen. Die Ermittlung der 5'Flanke wäre möglich in dem man auf Basis der Sequenz der 3'Flanke ein in Richtung des Provirus orientiertes biotinyliertes Oligonukleotid verwendet und damit erneut eine EPTS/LM-PCR anwendet.

Alternativ könnte man ein bis auf die Biotinylierung identisches Oligonukleotid in Verbindung mit einem porzinen SINE (Short interspersed nuclear elements) spezifischen Oligonukleotid verwenden. Dabei wären solche Amplifikate von Interesse, welche im Vergleich zu einer PCR, bei der ausschließlich SINE Oligonukleotide verwendet werden, hinzukommen.

Mit Kenntnis der Sequenzen der 5'Flanken wäre anschließend aufzuzeigen, ob es sich bei den sieben identifizierten 3'Flanken von PERV-C Proviren um komplette Vertreter handelt.

Diese Ansätze könnten allerdings schon bald überflüssig sein, denn die Sequenzierung des Schweinegenoms geht ständig voran. Infolgedessen werden die hier in dieser Arbeit neu identifizierten 3'Flanken früher oder später chromosomalen Bereichen zugeordnet werden können.

5 Zusammenfassung

Bei endogenen Retroviren handelt es sich um feste Bestandteile des Genoms. Im Fall von PERV (porzine endogene Retroviren) existieren zusätzlich infektiöse, xenotrope Vertreter. Aufgrund dieser Tatsache ist es notwendig, diese replikationskompetenten Proviren aus dem Genom potentieller Donortiere für die Xenotransplantation zu entfernen.

Mit dem Wissen um die chromosomale Lage und der damit verbundenen Möglichkeit des Nachweises per PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass aufgrund einer polymorphen Verteilung ein Ausschluss dieser funktionellen Proviren, mittels konventioneller Züchtung, möglich ist. Allerdings stellen sowohl die deletierten und mutierten proviralen Sequenzen durch eine Rekombination oder eine Komplementation, als auch ekotrope PERV-C ein Restrisiko im Falle einer Xenotransplantation dar.

Es ist eine PERV-A/C Rekombinante beschrieben *ex vivo* worden, welche eine höhere Infektiosität aufweist als alle bisher untersuchten PERV. Bis auf die Rezeptor-Bindedomäne stellt dieses Virus ein PERV-C dar. Deshalb sollten chromosomal PERV-C identifiziert werden, um bei polymorpher Verteilung im Schweinegenom durch entsprechende Züchtung diese aus dem Genom heraushalten zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es mit Hilfe einer speziellen PCR gelungen sieben Integrationsorte von PERV-C zu identifizieren. Da das Genom des Schweins bisher noch nicht komplett sequenziert ist, war es noch nicht möglich die gefundenen chromosomalen Bereiche zu kartieren. Dies wäre wiederum die Basis für eine Durchmusterung von Schweinen auf die Anwesenheit der gefundenen Proviren. Des Weiteren ist noch nicht bekannt, ob es sich bei diesen PERV-C um vollständige Proviren handelt, da aufgrund der verwendeten PCR und der sehr hohen Homologie verschiedener PERV untereinander nur provirale 3'Enden mit entsprechenden Flanken identifiziert werden konnten. Zusätzlich wurden in den Proben transgener Schweine PERV-C *env* spezifische Anteile nachgewiesen. Die Verteilung dieser Sequenzen, welche ebenfalls polymorph ist, gibt zwar keinen Aufschluss über die Anwesenheit eines Volllängen Provirus, jedoch ist aufgrund dieser Verteilung gleichfalls ein Ausschluss dieses Virus durch herkömmliche Züchtung möglich.

Auf der anderen Seite besteht ein weiteres Risiko nach einer Xenotransplantation, wenn ein infektiöses PERV durch Komplementation gebildet wird, welches als Erbinformation ein *env*-deletiertes Provirus trägt. Das komplementierte PERV könnte potentiell, nach erfolgter Xenotransplantation, menschliche Zellen infizieren. Daraufhin wäre es zwar nicht mehr in der Lage infektiöse Partikel zu bilden, jedoch besteht noch das Risiko einer Retrotransposition, welche an sich schon mutagen wirkt. Zusätzlich könnten durch diesen Vorgang Gene zerstört oder Onkogene angeschaltet werden. Um dieses Risiko abschätzen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit modifizierte Proviren von PERV-B(33) und MoMLV (Positivkontrolle) hergestellt und in einem Retrotranspositions Assay getestet. Die Modifikation der Proviren beinhaltete die Deletion des für die Retrotransposition nicht notwendigen *env*-Leserahmens, im Austausch gegen eine inserierte Indikatorkassette für die Retrotransposition (*neo^{int}*). Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnte im Fall des Molekularklons PERV-B(33) eine Frequenz der Retrotransposition von maximal $1,2 \cdot 10^{-6}$ pro Zelle und Generation ermittelt werden. Demzufolge stellt eine Retrotransposition von *env*-deletierten proviralen porzinen Sequenzen nach erfolgter Xenotransplantation ein minimales Risiko dar.

6 Anhang

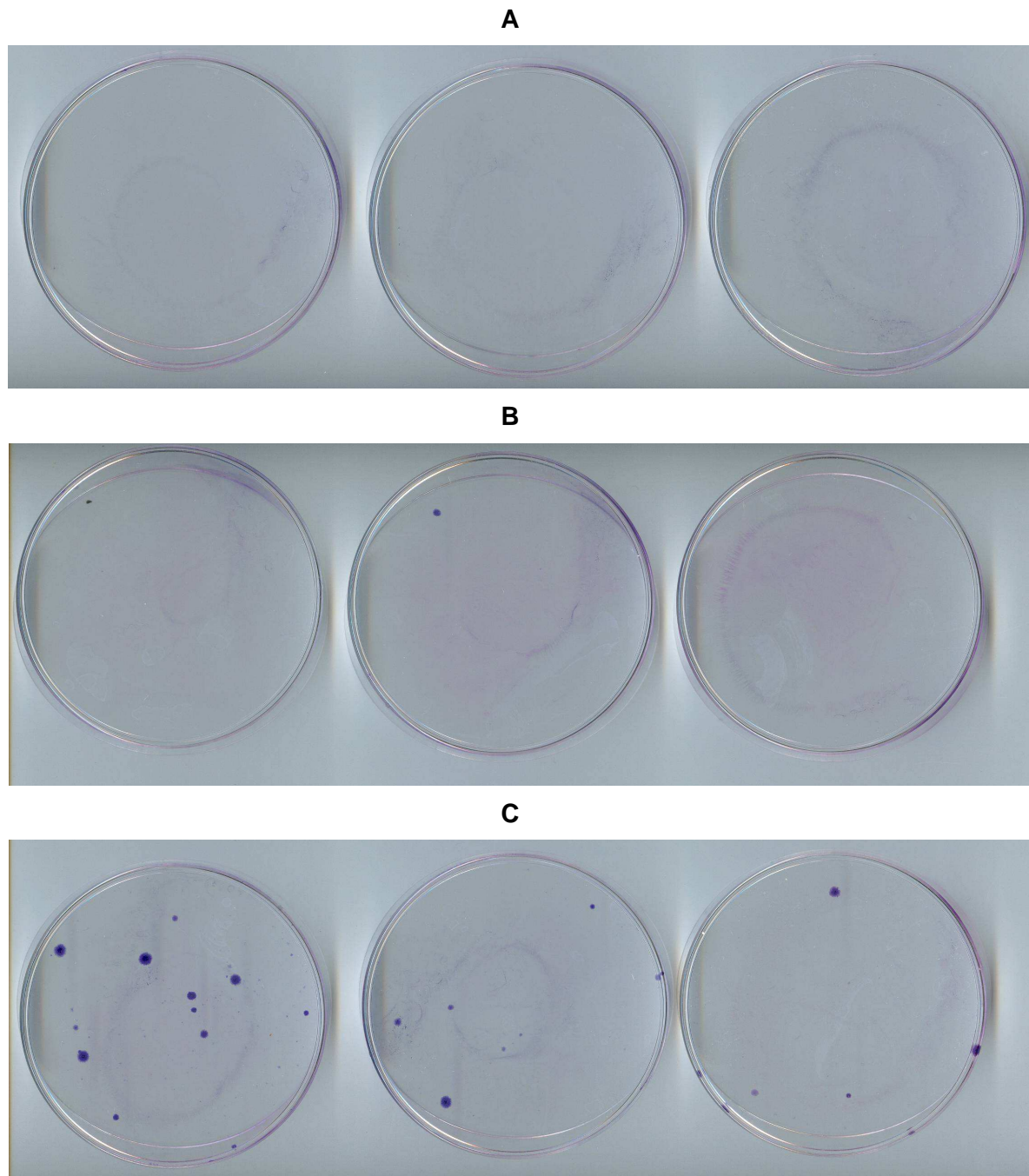


Abb. 6.1: Retrotranspositionseignisse von PERV-B(33) ausgehend von jeweils 10^6 Zellen in Triplikaten (Experiment 1; s. Abb. 3.22)

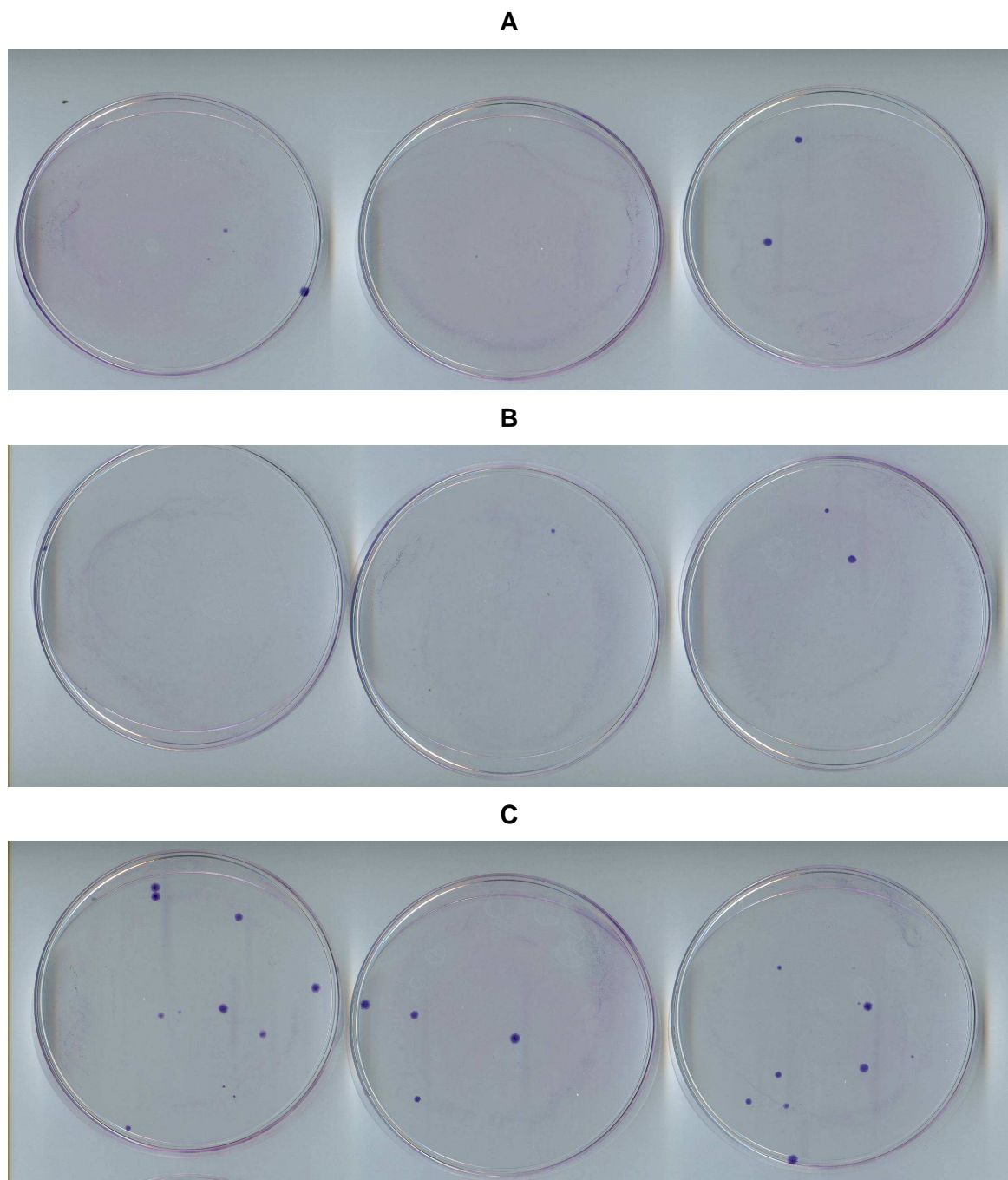


Abb. 6.2: *Retrotranspositionereignisse von PERV-B(33) ausgehend von jeweils $2 \cdot 10^6$ Zellen in Triplikaten (Experiment 1; s. Abb. 3.23)*

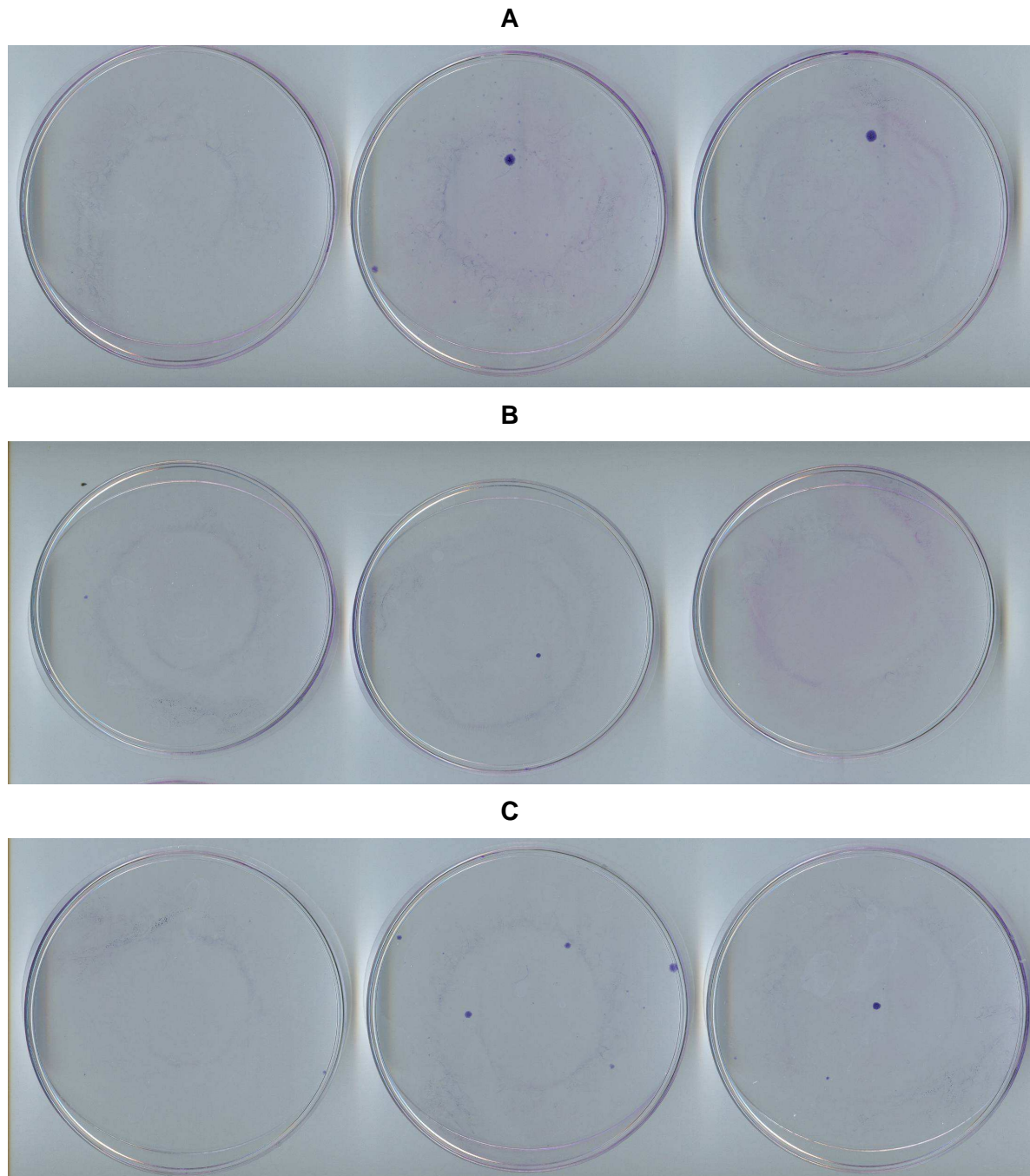


Abb. 6.3: *Retrotranspositionereignisse von MoMLV ausgehend von jeweils 10^6 Zellen in Triplikaten (Experiment 1; s. Abb. 3.24)*

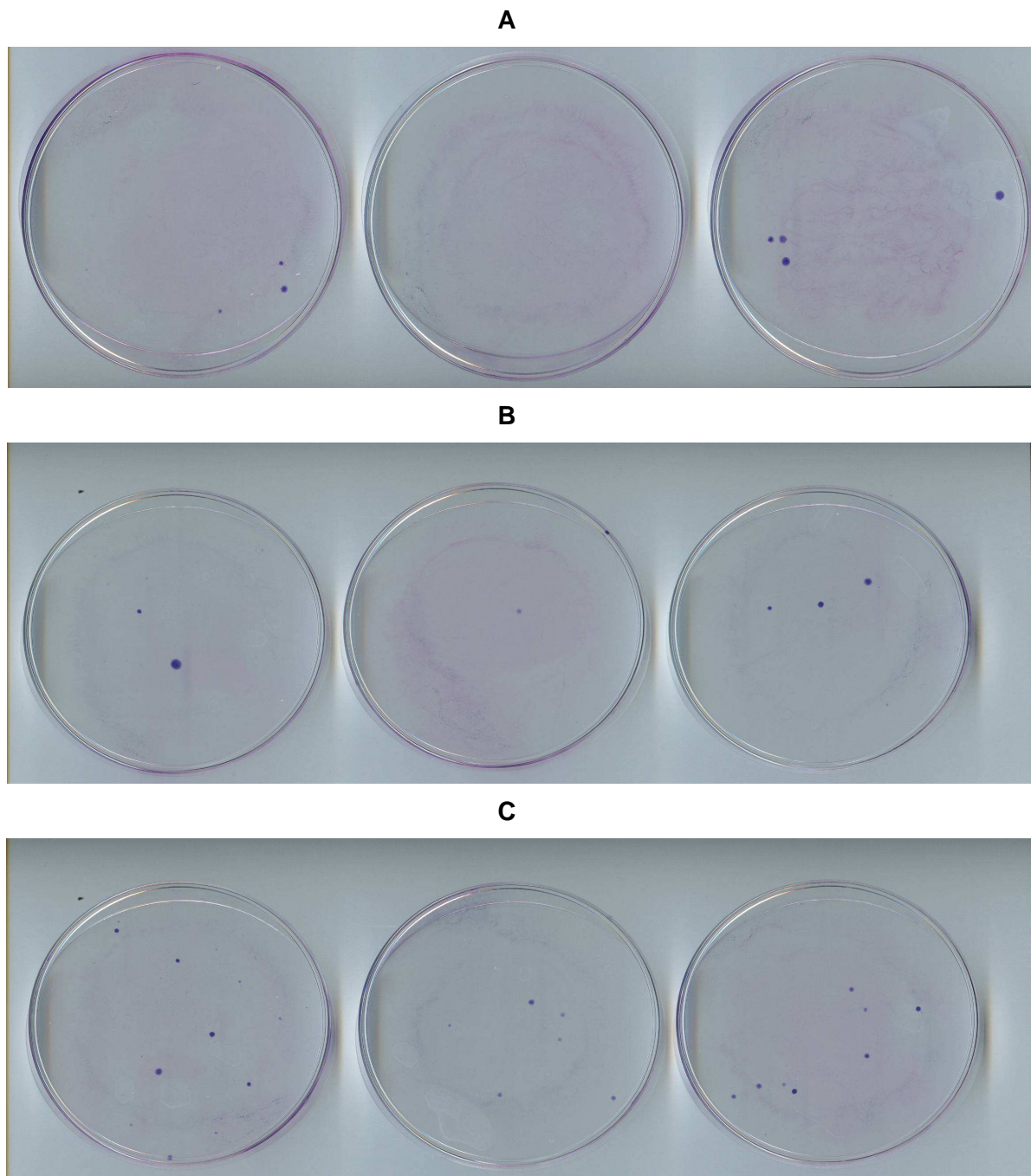


Abb. 6.4: *Retrotranspositionereignisse von MoMLV ausgehend von jeweils $2 \cdot 10^6$ Zellen in Triplikaten (Experiment 1; s. Abb. 3.25)*

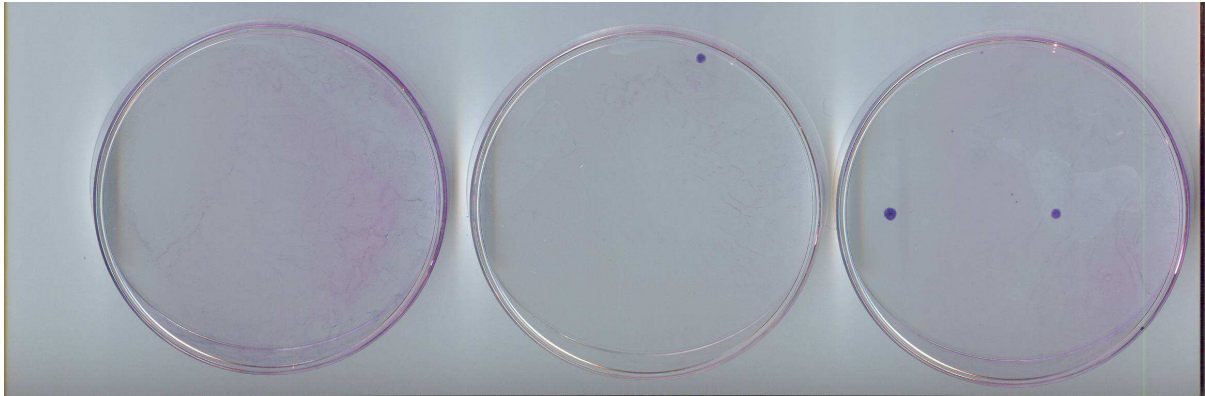
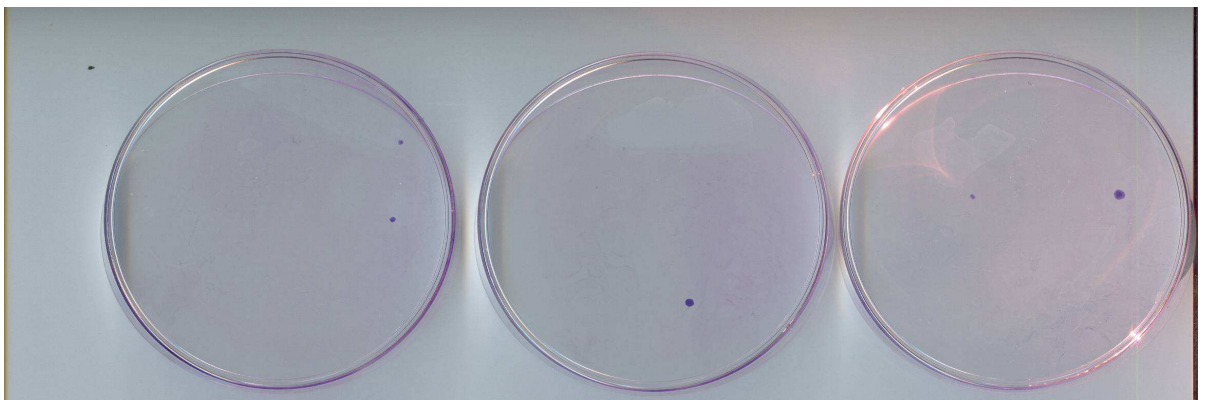
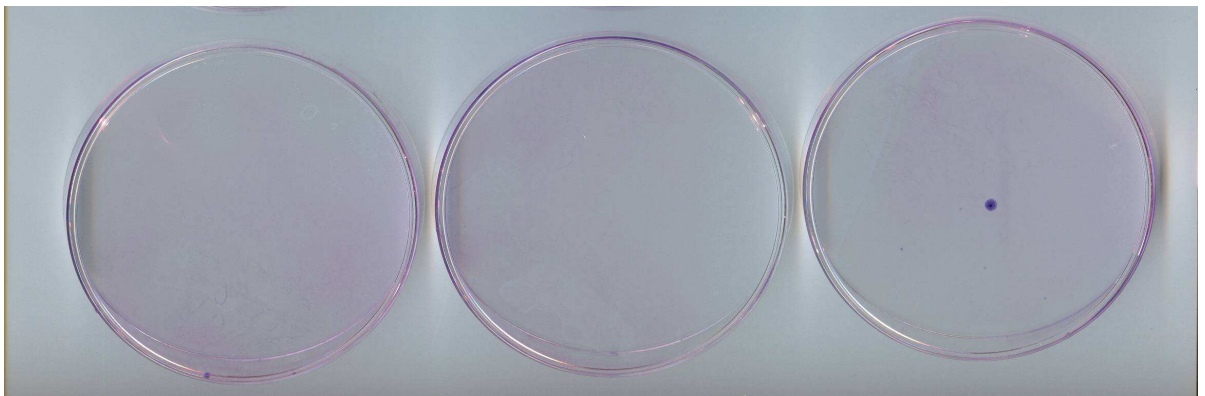
A**B****C**

Abb. 6.5: Retrotranspositionereignisse von PERV-B(33) ausgehend von jeweils 10^6 Zellen in Triplikaten (Experiment 2; s. Abb. 3.22)

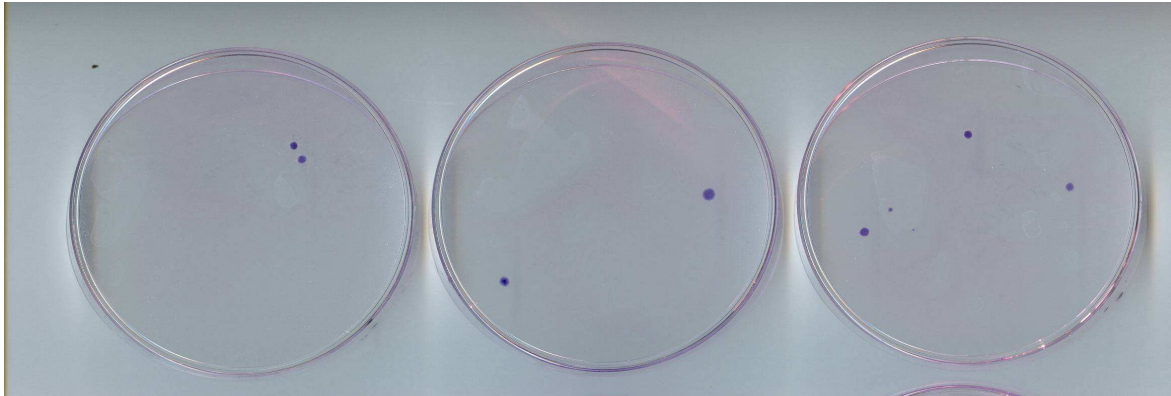
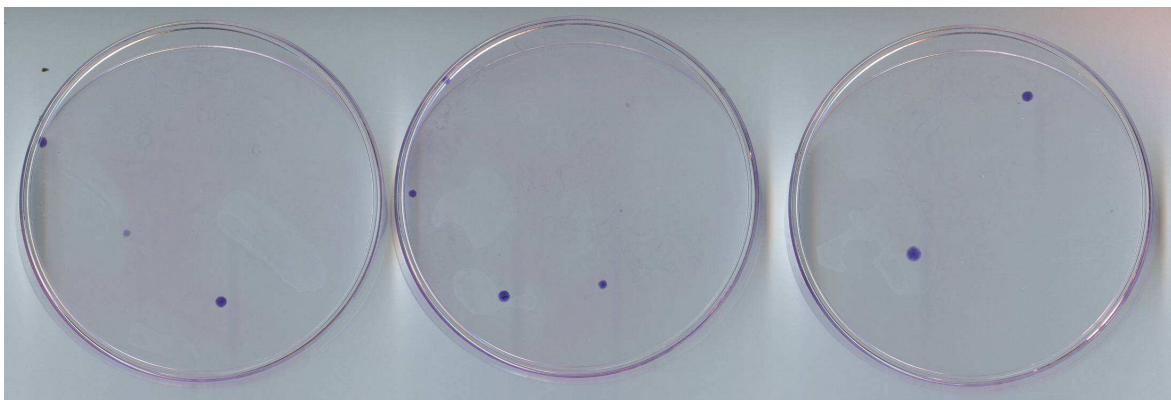
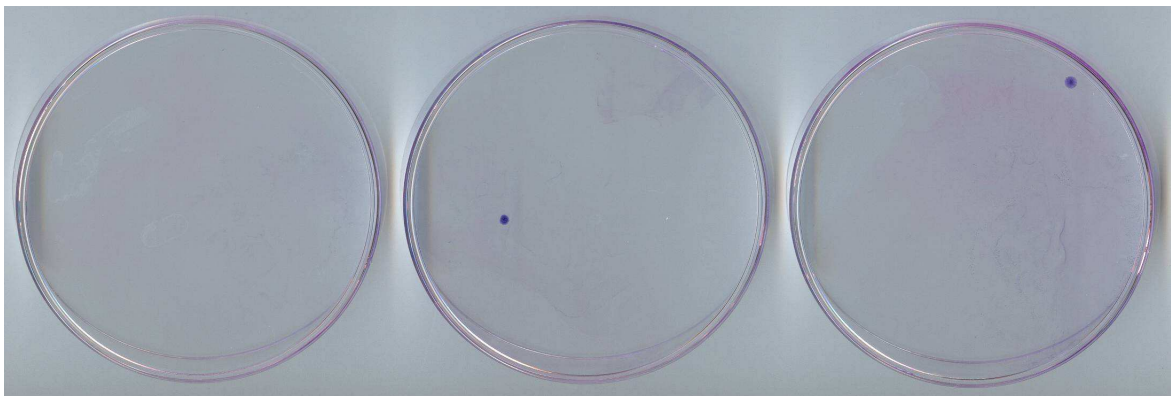
A**B****C**

Abb. 6.6: *Retrotranspositionereignisse von PERV-B(33) ausgehend von jeweils $2 \cdot 10^6$ Zellen in Triplikaten (Experiment 2; s. Abb. 3.23)*

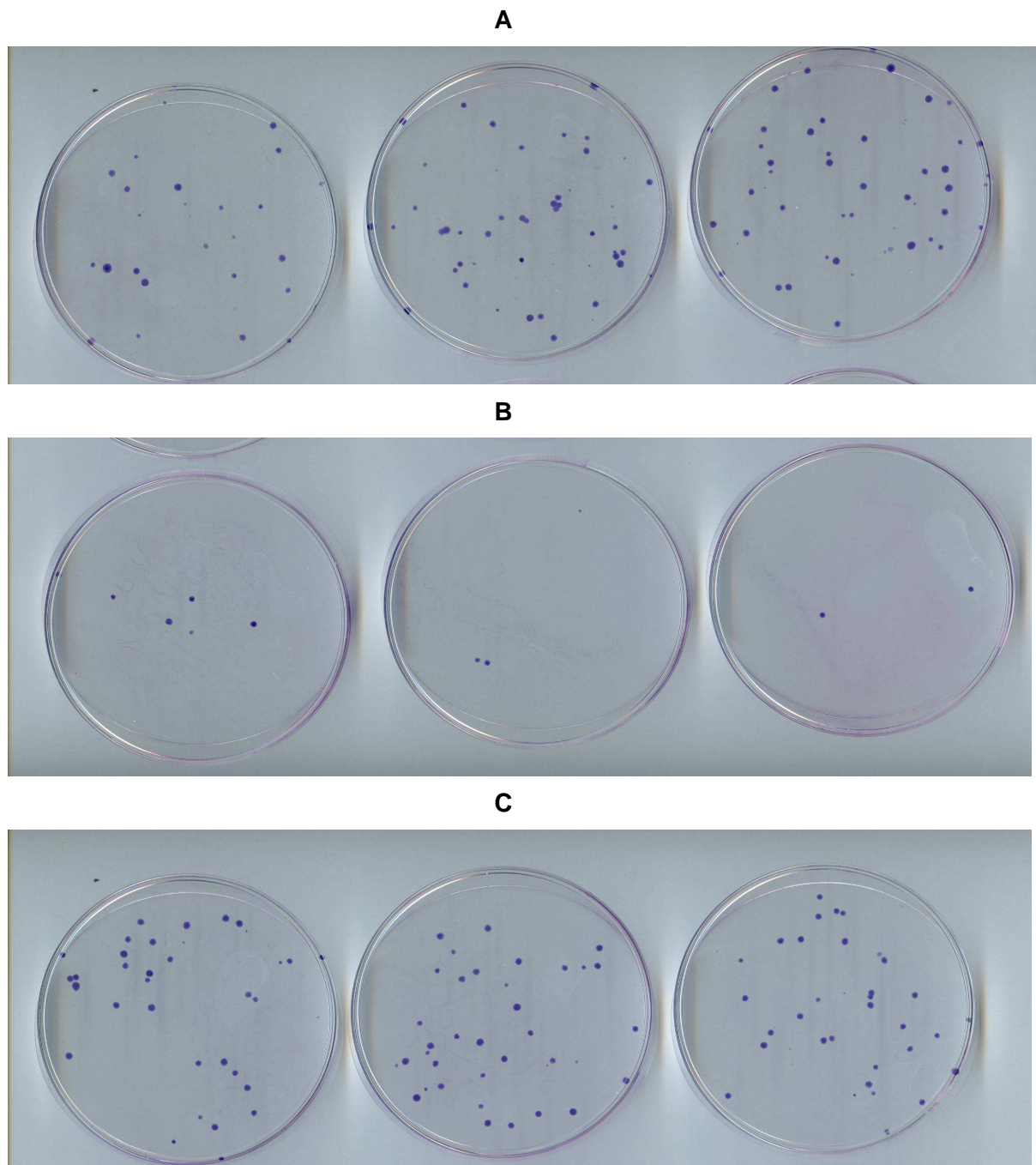


Abb. 6.7: *Retrotranspositionereignisse von MoMLV ausgehend von jeweils 10^6 Zellen in Triplikaten (Experiment 2; s. Abb. 3.24)*

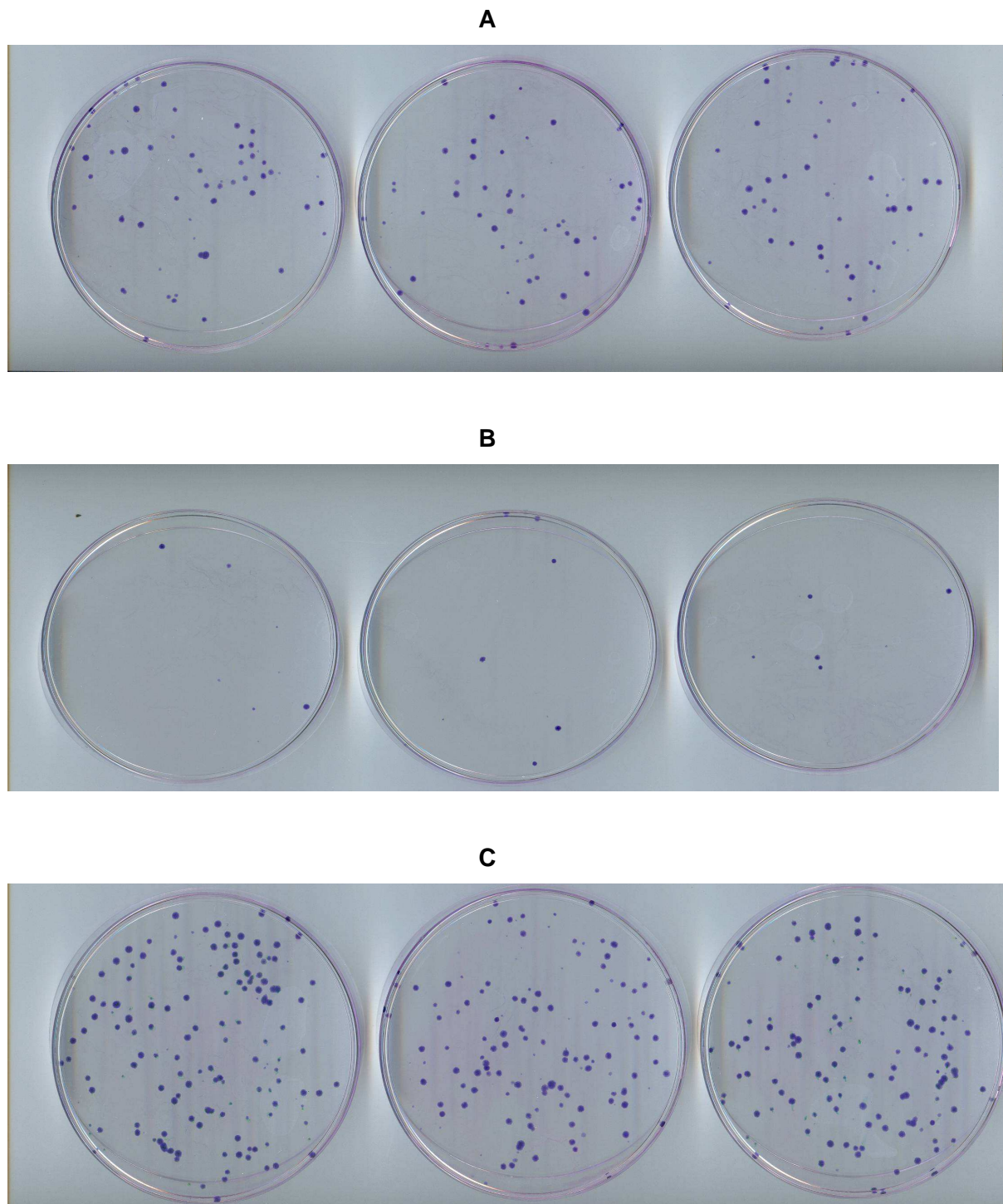


Abb. 6.8: *Retrotranspositionereignisse von MoMLV ausgehend von jeweils $2 \cdot 10^6$ Zellen in Triplikaten (Experiment 2; s. Abb. 3.25)*

A

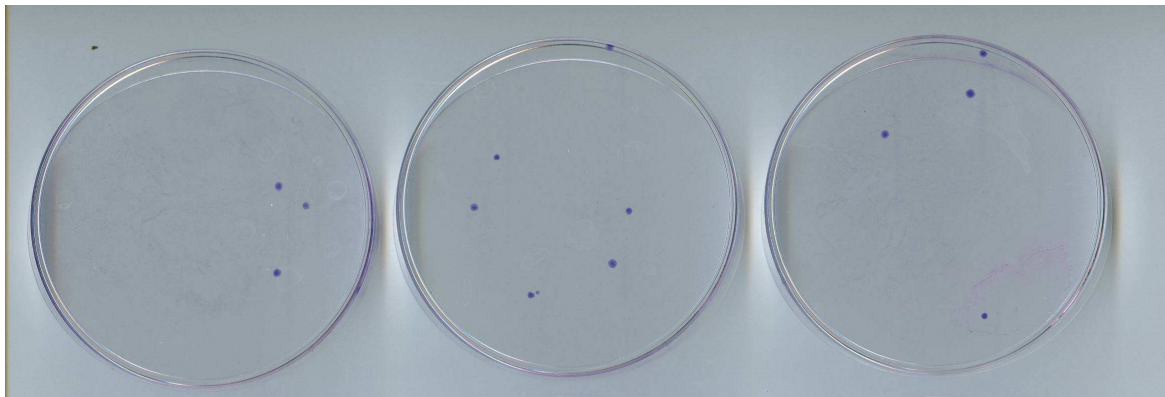


Abb. 6.9: Retrotranspositionereignisse von PERV-B(33) ausgehend von jeweils 10^6 Zellen in Triplikaten (Experiment 3; s. Abb. 3.22) keine Ereignisse detektierbar bei zwei Platten des Triplikats

A

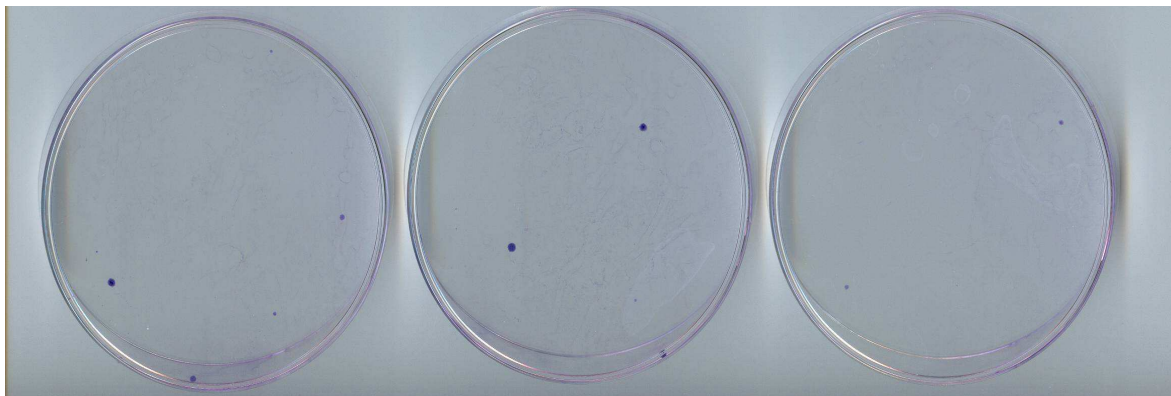


Abb. 6.10: Retrotranspositionereignisse von PERV-B(33) ausgehend von jeweils $2 \cdot 10^6$ Zellen in Triplikaten (Experiment 3; s. Abb. 3.23) keine Ereignisse detektierbar bei zwei Platten des Triplikats

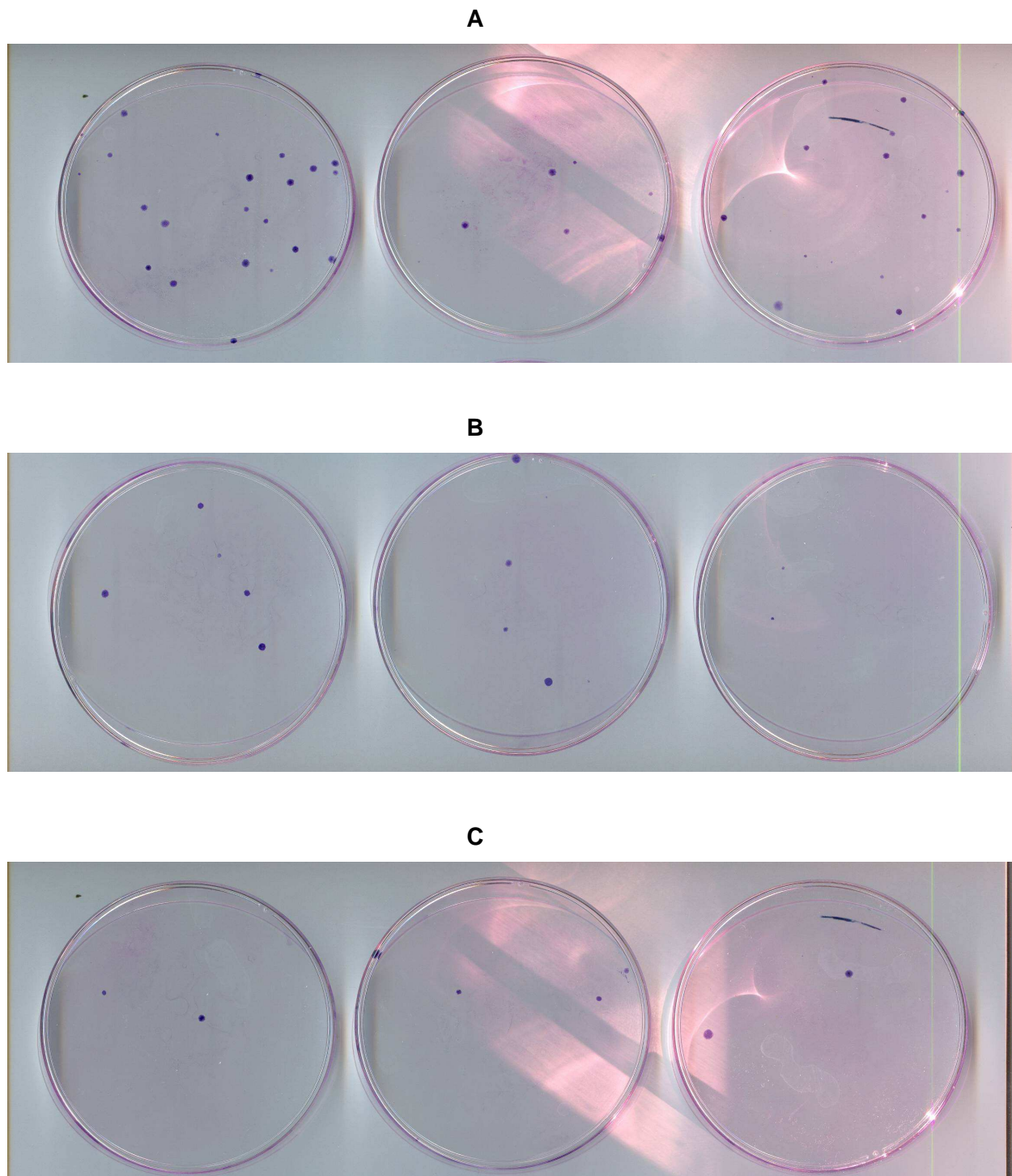


Abb. 6.11: *Retrotranspositionereignisse von MoMLV ausgehend von jeweils 10^6 Zellen in Triplikaten (Experiment 3; s. Abb. 3.24)*

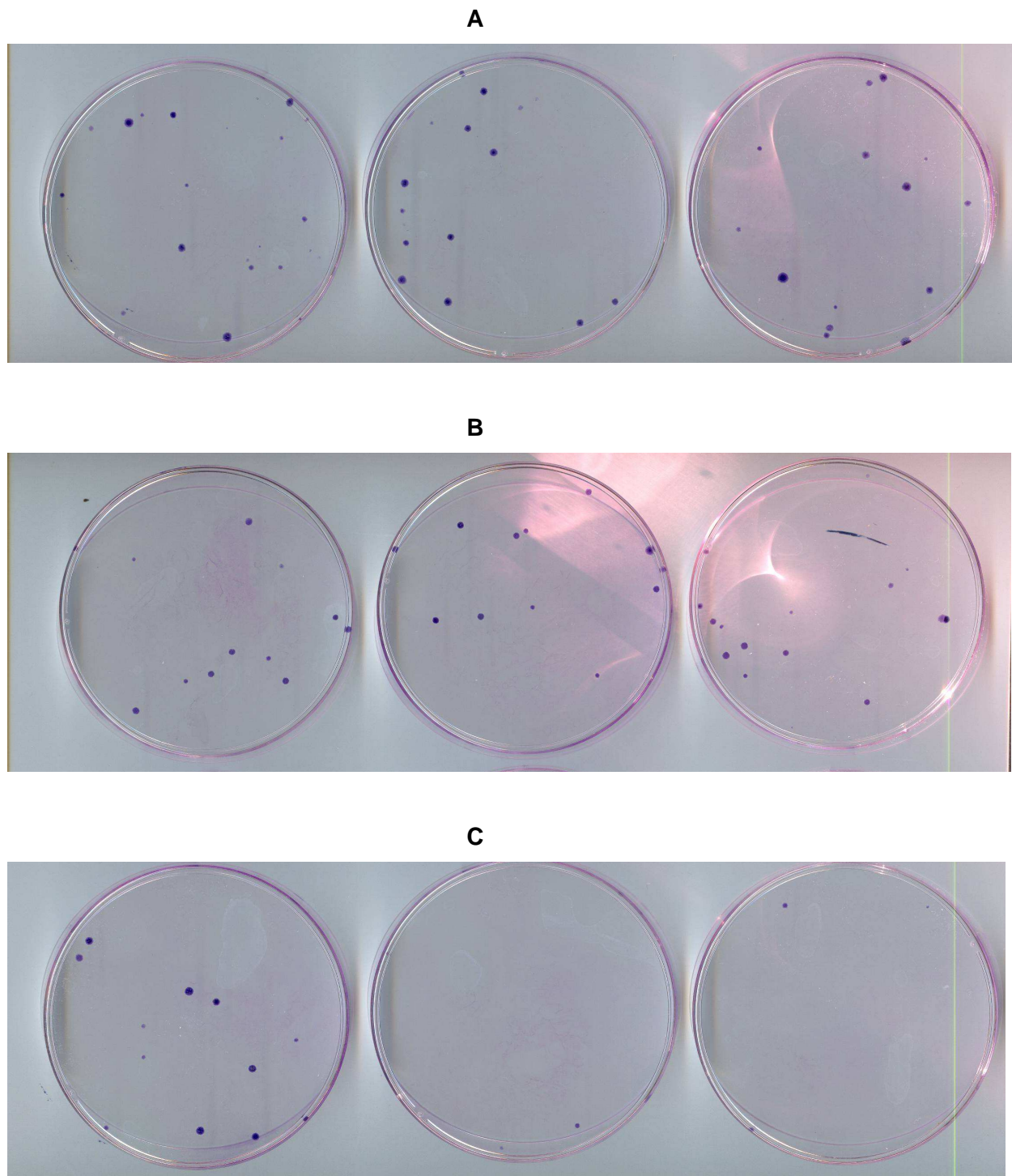


Abb. 6.12: *Retrotranspositionereignisse von MoMLV ausgehend von jeweils $2 \cdot 10^6$ Zellen in Triplikaten (Experiment 3; s. Abb. 3.25)*

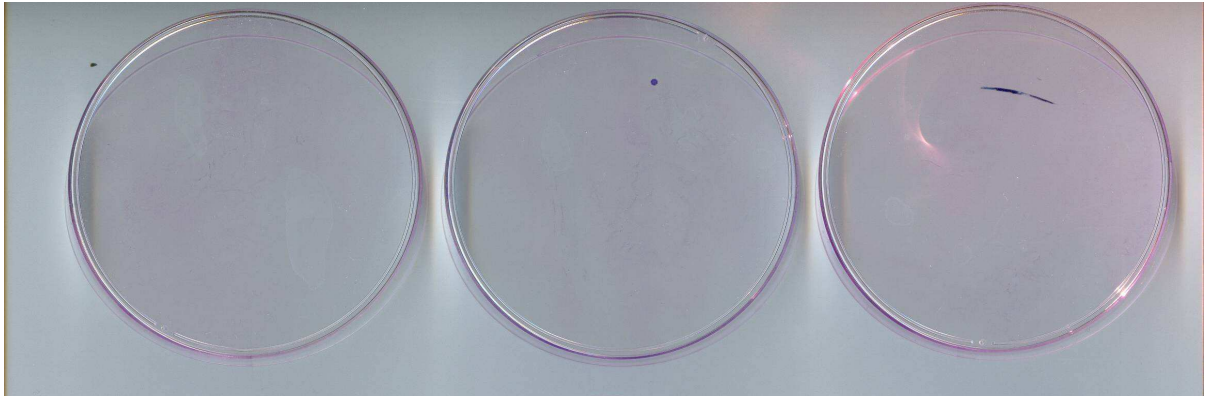
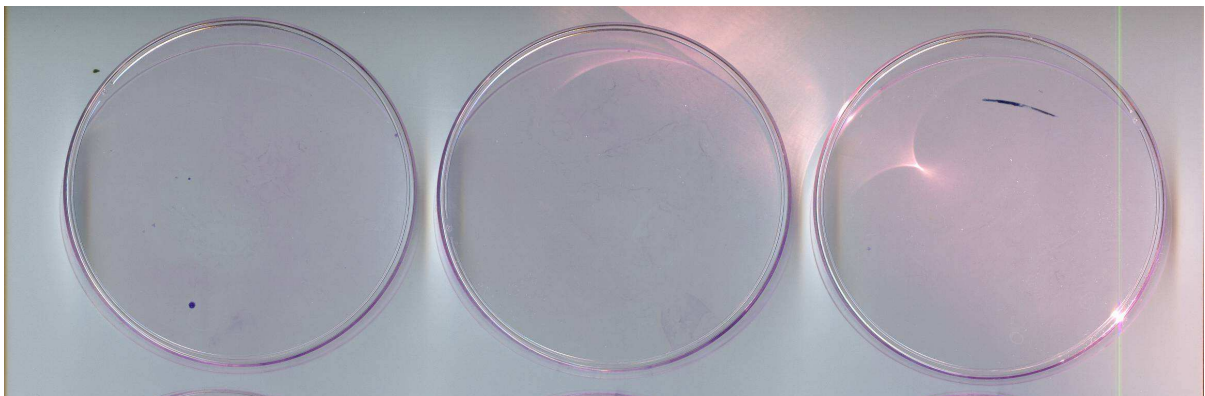
A**B****C**

Abb. 6.13: Retrotranspositionereignisse von PERV-B(33) ausgehend von jeweils 10^6 Zellen in Triplikaten (Experiment 4; s. Abb. 3.22)

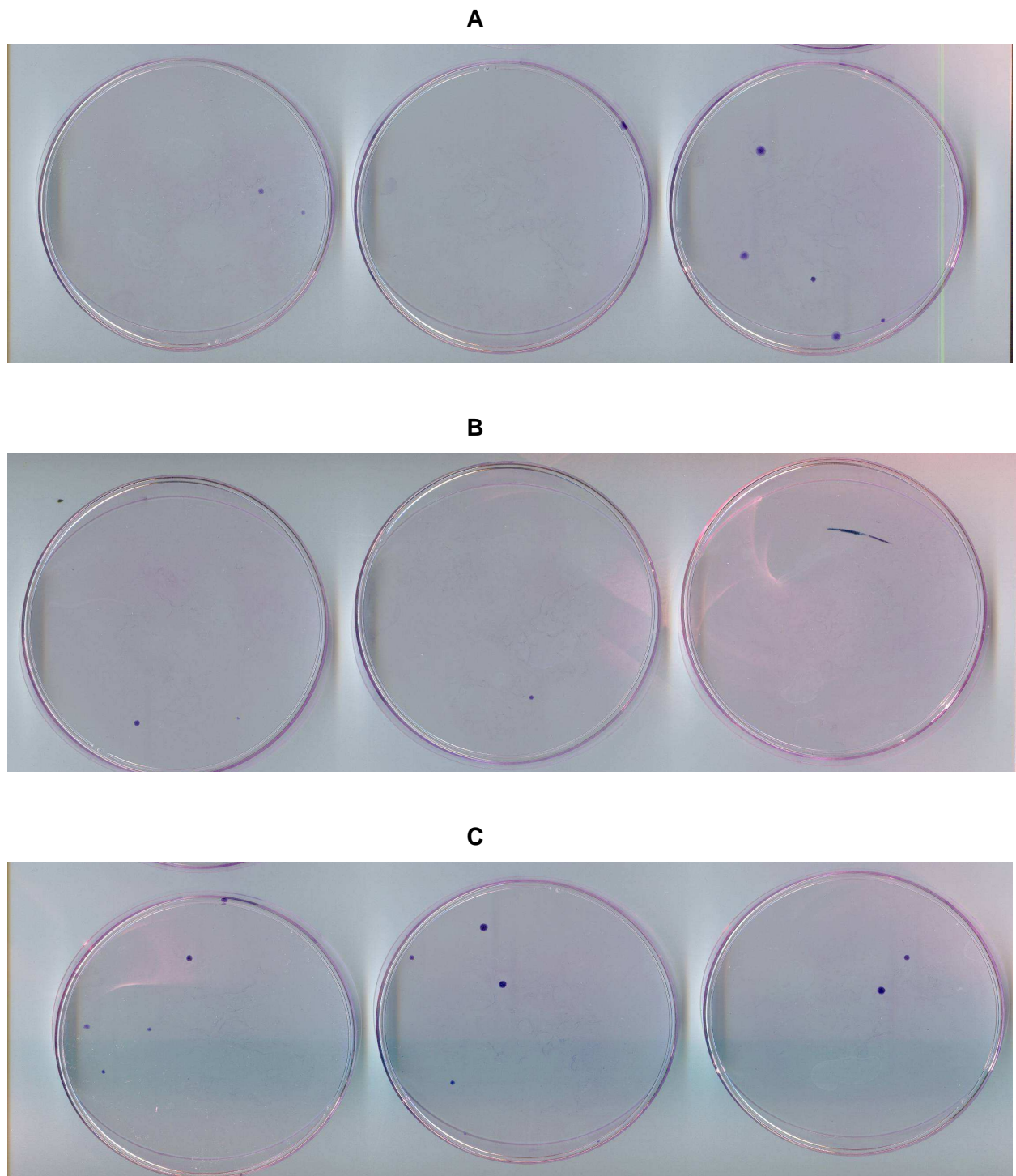


Abb. 6.14: *Retrotranspositionereignisse von PERV-B(33) ausgehend von jeweils $2 \cdot 10^6$ Zellen in Triplikaten (Experiment 4; s. Abb. 3.23)*

7. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
aqua dest.	destilliertes Wasser
APC	Antigenpräsentierende Zellen
AS	Aminosäure
AVR	akut vaskuläre Abstoßungsreaktion
BAP	bakterielle alkalische Phosphatase
BCA	Bichinonsäure (bicinchoninic acid)
bp	Basenpaare
BrdUTP	Bromo-deoxyuridintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CA	Kapsidprotein (capsid)
Cap site	7-Methylguanosintriphosphatmodifikation
CIP	intestinale alkalische Phosphatase des Kalbes (calf intestinal phosphatase)
CMV	Promotor des Cytomegalievirus
cpm	Zähler pro Minute (counts per minute)
CXR	zelluläre Abstoßungsreaktion
DAF	deccay-accelerating factor
DMEM	Dulbecco`s modifiziertes Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2`-Desoxy-Nukleosid-5`-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamin Tetraessigsäure
<i>env</i> -Gen	<i>envelope</i> -Gen, Gen das für retrovirale Oberflächenprotein kodiert
Env	retrovirales Oberflächenprotein (Envelope-Protein)
EPTS/LM-PCR	magnetic extension primer tag selection (EPTS) preceding solid-phase ligation-mediated (LM) PCR
et al.	Et alii, und andere
FKS	fötales Kälberserum
<i>gag</i> -Gen	Gen, das die retrovirale Struktur bestimmt
Gag	gruppenspezifische Antigene (Strukturproteine)
h	Stunde (hour)
HAR	hyperakute Abstoßungsreaktion (hyperacute rejection)
HERV	humanes endogenes Retrovirus
HIV	humanes Immundefizienz Virus
HTLV	humanes T-Zell Leukämie Virus
IN	Integrase
kb	Kilobasen

LB	Luria-Bertani-Medium
LINE-1	long interspersed nuclear elements Typ1
LTR	retroviraler Promoter (Long Terminal Repeat)
MAC	membrane attacking complex
MCP	membrane cofactor protein
mg	Milligramm
min	Minute
MLV (MoMLV)	murines Leukämievirus (Typ Moloney)
mM	millimolar
mRNA	messenger RNA
NEA	not essential aminoacids
NGA	Nicht-anti- α Gal-Antikörper
NK	natürliche Killerzellen
NOD/SCID	non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency
nt	Nukleotid
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
PBMC	periphere Blutlymphozyten
PBS	Primer Bindestelle
PBS	Phosphat gepufferte Saline (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PERV	porzines endogenes Retrovirus
PI	Proteaseinhibitoren
<i>pol</i> -Gen	Polymerase Gen, Gen das für die retroviralen enzymatischen Einheiten codiert
Pol	Polymerase
poly(A)	Polyadenylierungssignal
PPT	Polypurintrakt
Pro	Protease
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SA	Spliceakzeptor
Sec.	Sekunde
SD	Splicedonor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	Streptomycin/Penicillin
SSC	Natriumcitrat (saline sodium citrate)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
TB	Terrific Broth Medium
TBS	Tris gepufferte Saline (tris buffered saline)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembranprotein
TSD	Target Side Duplications
U	Einheiten (units)
VLP	virusähnliche Partikel (virus like particles)

Aminosäuren:

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

8 Literaturverzeichnis

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

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

Armbruster V, Sauter M, Krautkraemer E, Meese E, Kleiman A, Best B, Roemer K, Mueller-Lantzsch N. (2002). A novel gene from the human endogenous retrovirus K expressed in transformed cells. *Clin Cancer Res.* 8(6):1800-7.

Armbruster V, Sauter M, Roemer K, Best B, Hahn S, Nty A, Schmid A, Philipp S, Mueller A, Mueller-Lantzsch N. (2004). Np9 protein of human endogenous retrovirus K interacts with ligand of numb protein X. *J Virol.* 78(19):10310-9.

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

Bach F., Winkler H., Ferran C., Hancock W. Robson S. (1996). Delayed xenograft rejection. *Immunol. Today* 17, 379-384

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

Bittner JJ. (1936). Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science* 84(2172):162.

Blin N, Stafford DW. (1976). A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* Sep;3(9):2303-8.

Blond JL., Lavillette D., Cheynet V., Bouton O., Oriol G., Chapel-Fernandes S., Mandrand B., Mallet F. und Cosset FL. (2000). An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *J. Virol.* 74, 3321-3329.

Boeke JD. und Stoye JP. (1997). Retrotransposons, endogenous retroviruses und the evolution of retroelements. In *Retroviruses*, J.M.Coffin, S.H.Hughes und H.E.Varmus, eds. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 343-435.

Boller K., König H., Sauter M., Mueller-Lantsch N., Löwer R., Löwer J. und Kurth R. (1993). Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human teratocarcinoma- derived retrovirus HTDV. *Virology* 196, 349-353.

Boller K., Schönfeld K, Lischer S, Fischer N., Hoffmann A., Kurth R., Tönjes R. (2008). Human endogenous retrovirus HERV-K113 is capable of producing intact viral particles. *Journal of General Virology* 89,

Bratthauer G., and Fanning TF. (1992). Active LINE-1 retrotransposons in human testicular cancer. *Ocogene* 7, 507-510.

Coffin JM. (1996). HIV viral dynamics. *Aids* 10 Suppl 3, 75-84.

Coffin JM. (1996). The scoop on HIV mutations. *J Int Assoc Physicians AIDS Care* 2(7), 45.

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

Covey SN. (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.

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

De Harven E. (1974) Remarks on the ultrastructure of type A, B, and C virus particles. *Adv Virus Res.* 19:221-64. Review

Dehoux J., Nizet Y, De La Parra B., Lecuivre C., Vergauwen M., Bazin H., Latinne D. Gianello P. (2003): Cell-mediated cytotoxicity to porcine aortic endothelial cells is not dependent on galactosyl residues when baboon peripheral blood lymphocytes are previously primed with pig xenoantigens. *Transplantation* 76, 1675-1680

Dewannieux M, Harper F, Richaud A, Letzelter C, Ribet D, Pierron G, Heidmann T. (2006). Identification of an infectious progenitor for the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements. *Genome Res.*(12):1548-56.

Dieckhoff B, Puhlmann J, Büscher K, Hafner-Marx A, Herbach N, Bannert N, Büttner M, Wanke R, Kurth R, Denner J. (2007). Expression of porcine endogenous retroviruses

(PERVs) in melanomas of Munich miniature swine (MMS) TROLL. *Vet Microbiol.* Jul 20;123(1-3):53-68.

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

Dombrovski BA., Mathias SL., Nanthakumar E., Scott AF., and JR., HHK. (1991). Isolation of an active human transposable element. *Science* 64, 1-30.

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

Feinberg AP, Vogelstein B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* Jul 1;132(1):6-13.

Fishman JA. (1997). Xenosis and xenotransplantation: addressing the infectious risks posed by an emerging technology. *Kidney Int. Suppl* 58, 41-S45.

Freeman JD, Goodchild NL, Mager DL. (1994). A modified indicator gene for selection of retrotransposition events in mammalian cells. *Biotechniques.* 17(1):46, 48-9, 52.

Galili U., Macher BA., Buehler J. und Shohet SB. (1985). Human natural anti-alpha-galactosyl IgG. II. The specific recognition of alpha (1-3)-linked galactose residues. *J. Exp. Med.* 162, 573-582.

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

Gao F., Bailes E., Robertson DL, Chen Y., Rodenburg CM, Michael SF., Cummins LB., Arthur LO., Peeters M., Shaw GM., Sharp PM. und Hahn BH. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397, 436-441.

Goff, SP. (2004). Retrovirus restriction factors. *Mol Cell.* Dec 22;16(6):849-59.

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

Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay JP, Thrasher AJ, Wulffraat N, Sorensen R, Dupuis-Girod S, Fischer A, Davies EG, Kuis W, Leiva L, Cavazzana-Calvo M. (2002). Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med.* 18;346(16):1185-93.

Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*; 302: 415–419.

Harrison I, Takeuchi Y, Bartosch B, Stoye JP. (2004). Determinants of high titer in recombinant porcine endogenous retroviruses. *J Virol.* Dec;78(24):13871-9.

Heidmann T, Heidmann O., Nicholas JF. (1988). An indicator gene to demonstrate intracellular transposition of defective retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 85, pp. 2219-2223, April

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

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

Holmes SE., Singer MF., and Swergold GD. (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.

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

Hutchinson CA., Hardies SC., Dloeb D., Shehee, WR., and Edgell MH. (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.

Ivanov VA., Melnikov AA., Siunov AV., Fodor JJ., and Ilyin YV. (1991). Authentic reverse transcriptase is encoded by jockey, a mobile *Drosophila* element related to mammalian LINES. *EMBO J.* 149, 1099-1116.

Janeway, C., Travers P.(1997): *Aus:Immunologie.* 2.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford

Katzir N., Rechavi G., Cohen JB., Unger T., Simoni F., Segal D., Cohen D., and Givol D. (1985). Retroposon insertion into the cellular oncogen c-myc in canine transmissible veneral tumor. PNAS 82, 1054-1058.

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

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

Kohrman DC., 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

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

Krach U, Fischer N, Czauderna F, Tönjes RR.. (2001). Comparison of replication-competent molecular clones of porcine endogenous retrovirus class A and class B derived from pig and human cells. J Virol. Jun;75(12):5465-72.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissole SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ,

Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blöcker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ; International Human Genome Sequencing Consortium. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. Feb 15;409(6822):860-921.

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

Lee YN, Bieniasz PD. (2007). Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus. *PLoS Pathog.* 2007 Jan;3(1):e10.

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

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

Lewinski MK, Yamashita M, Emerman M, Ciuffi A, Marshall H, Crawford G, Collins F, Shinn P, Leipzig J, Hannenhalli S, Berry CC, Ecker JR, Bushman FD. (2006). Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection. *PLoS Pathog.* 2006 Jun;2(6):e60. Jun 23.

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

Linial ML. (1999). Foamy viruses are unconventional retroviruses. *J Virol.* Mar;73(3):1747-55.

Löwer R., Löwer J., Frank H., Harzmann R. und Kurth R. (1984). Human teratocarcinomas cultured in vitro produce unique retrovirus-like viruses. *J. Gen. Virol.* 65, 887-898.

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

Löwer R., Tönjes R.R., Korbmacher C., Kurth R. und Löwer J. (1995). Identification of a Rev-related protein by analysis of spliced transcripts of the human endogenous retroviruses HTDV/HERV-K. *J. Virol.* 69, 141-149.

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

Lu S, Arthos J, Montefiori DC, Yasutomi Y, Manson K, Mustafa F, Johnson E, Santoro JC, Wissink J, Mullins JI, Haynes JR, Letvin NL, Wyand M, Robinson HL. (1996). Simian immunodeficiency virus DNA vaccine trial in macaques. *J Virol.* Jun;70(6):3978-91.

Maestre J, Tchénio T, Dhellin O, Heidmann T. (1995). mRNA retroposition in human cells: processed pseudogene formation. *EMBO J.* Dec 15;14(24):6333-8.

Magin C., Hesse J., Löwer J. und Löwer R. (2000). Corf, the Rev/Rex homologue of HTDV/HERV-K, encodes an arginine-rich nuclear localization signal that exerts a transdominant phenotype when mutated. *Virology* 274, 11-16.

Magin-Lachmann C., Hahn S., Strobel H., Held U., Löwer J. und Löwer R. (2001). Rec (formerly Corf) function requires interaction with a complex, folded RNA structure within its responsive element rather than binding to a discrete specific binding site. *J. Virol.* 75, 10359-10371.

Martin U, Winkler ME, Id M, Radeke H, Arseniev L, Takeuchi Y, Simon AR, Patience C, Haverich A, Steinhoff G. (2000). Productive infection of primary human endothelial cells by pig endogenous retrovirus (PERV). *Xenotransplantation.* May;7(2):138-42.

Martin SI, Wilkinson R, Fishman JA. (2006). Genomic presence of recombinant porcine endogenous retrovirus in transmitting miniature swine. *Virol J.* Nov 2;3:91.

Martina Y, Kurian S, Cherqui S, Evanoff G, Wilson C, Salomon DR. (2005). Pseudotyping of porcine endogenous retrovirus by xenotropic murine leukemia virus in a pig islet xenotransplantation model. *Am J Transplant.* Aug;5(8):1837-47.

McGregor CS., Teotia J., Schirmer R., Frantz H., Tazelaar R., Walker G., Byrne u. J. Logan (2003): Cardiac Xenotransplantation: 4-1/2 Month Survival in the Laboratory. *Xenotransplantation* 10, 480

McPherson JD., et al. (2001). A physical map of the human genome. *Nature* 409(6822), 934-941.

Michaels MG., McMichael JP., Brasky K., Kalter S., Peters RL., Starzl TE und Simmons RL. (1994). Screening donors for xenotransplantation. The potential for xenozoonoses. *Transplantation* 57, 1462-1465.

Miki Y., Nishisho, I., Horii A., Miyoshi Y., Utsunomiya J., Kinzler KW., 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.

Moalic Y, Blanchard Y, Félix H, Jestin A. (2006). Porcine endogenous retrovirus integration sites in the human genome: features in common with those of murine leukemia virus. *J Virol.* 80(22):10980-8.

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

Modrow S. und Falke D. (1997). *Molekulare Virologie*. (Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag).

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

Mühlebach MD., Wolfrum N., Schüle S., Tschulena U., Sanzenbacher R., Flory E., Cichutek K., Schweizer M. (2005). Stable transduction of primary human monocytes by simian lentiviral vector PBj. *Mol Ther.* Dec;12(6):1206-16. Epub 2005 Sep 16.

Muotri AR, Chu VT, Marchetto MC, Deng W, Moran JV, Gage FH. (2005). Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature.* 435(7044):903-10.

Nan XL. (1998). Retrotransposition von rekombinanten endogenen und exogenen Retroviren in kultivierten Säugerzellen. Dissertation am Paul-Ehrlich-Institut.

Narita N., Nishio H., Kitoh 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. Ono, M., Kawakami, M., and Takezawa, T. (1987). A novel human nonviral retroposon derived from an endogenous retrovirus. *Nucleic Acid Res* 15, 8725- 8737.

Nermut MV. und Hockley DJ. (1996). Comparative morphology and structural classification of retroviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 214:1-24.

Nie J., McGill MA., Dermer M., Dho SE., Wolting CD and McGlade CJ. (2002). LNX functions as a RING type E3 ubiquitin ligase that targets the cell fate determinant Numb for ubiquitin-dependent degradation. *EMBO J.* 21:93–102.

Niebert M., Rogel-Gaillard C., Chardon P. und Tönjes R.R. (2002). Characterization of chromosomally assigned replication-competent gamma porcine endogenous retroviruses derived from a large white pig and expression in human cells. *J. Virol.* 76, 2714-2720.

Niebert M, Tönjes RR. (2003). Analyses of prevalence and polymorphisms of six replication-competent and chromosomally assigned porcine endogenous retroviruses in individual pigs and pig subspecies. *Virology. Sep 1;313(2):427-34.*

Niebert M, Tönjes RR. (2005). Evolutionary spread and recombination of porcine endogenous retroviruses in the suiformes. *J Virol. Jan;79(1):649-54.*

Okegawa T., R. Pong C., Li Y., Bergelson JM., Sagalowsky AI., and Hsieh JT. (2001). The mechanism of the growth-inhibitory effect of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) on human bladder cancer: a functional analysis of car protein structure. *Cancer Res.* 61:6592–6600.

Oldmixon BA, Wood JC, Ericsson TA, Wilson CA, White-Scharf ME, Andersson G, Greenstein JL, Schuurman HJ, Patience C. (2002). Porcine endogenous retrovirus transmission characteristics of an inbred herd of miniature swine. *J Virol.* Mar;76(6):3045-8.

Ono M. (1986). Molecular cloning and long terminal repeat sequences of human endogenous retrovirus genes related to types A and B retrovirus genes. *J. Virol.* Jun;58(3):937-44.

Ono M., Yasunaga T., Miyata T. und Ushikubo H. (1986). Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. *J. Virol.* 60, 589-598.

Palmarini M., Datta S., Omid R., Murgia C. und Fan H. (2000). The long terminal repeat of Jaagsiekte sheep retrovirus is preferentially active in differentiated epithelial cells of the lungs. *J. Virol.* 74, 5776-5787.

Paradis K., Langford G., Long Z., Heneine W., Sandstrom P., Switzer WM., Chapman LE., Lockey C., Onions D. und Otto E. (1999). Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. *Science* 285, 1236-1241.

Patience C., Takeuchi Y. und Weiss RA. (1997). Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat. Med.* 3, 282-286.

Patience C., Patton GS., Takeuchi Y., Weiss RA., McClure MO., Rydberg L. und Breimer ME. (1998). No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys. *Lancet* 352, 699-701.

Patience C., Switzer WM., Takeuchi Y., Griffiths DJ., Goward ME., Heneine W., Stoye JP. und Weiss RA. (2001). Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species. *J. Virol.* 75, 2771-2775.

Pavlíček A, Paces J, Zíka R, Hejnar J. (2002). Length distribution of long interspersed nucleotide elements (LINEs) and processed pseudogenes of human endogenous retroviruses: implications for retrotransposition and pseudogene detection. *Gene*. 2002 Oct 30;300(1-2):189-94.

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.

Platt J., Lindman B., Geller R., Noreen H., Swanson J., Dalmaso A. u. Bach FH. (1991): The role of natural antibodies in the activation of xenogenic endothelial cells. *Transplantation* 52, 1037-1043

Poiesz B., Ruscetti F., Gazdar A., Bunn P., Minna J., and Gallo RC. (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.

Prak ET, Kazazian HH Jr. (2000). Mobile elements and the human genome. *Nat Rev Genet.* Nov;1(2):134-44. Review. Erratum in: *Nat Rev Genet* 2001 Jan;2(1):78.

Preuss T, Fischer N, Boller K, Tonjes RR. (2006). Isolation and characterization of an infectious replication-competent molecular clone of ecotropic porcine endogenous retrovirus class C. *J Virol.* 80(20):10258-61.

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

Ritzhaupt A, Van Der Laan LJ, Salomon DR, Wilson CA. (2002). Porcine endogenous retrovirus infects but does not replicate in nonhuman primate primary cells and cell lines. *J Virol.* Nov;76(22):11312-20.

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

Sachs DH. (1994). The pig as a potential xenograft donor. *Vet Immunol Immunopathol.* Oct;43(1-3):185-91. Review.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230(4732):1350-4.

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

Sassman D., Dombroski BA., Moran J., Kimberland T., Naas T., Deberardinis A., Gabriel A., Swergold G., and Kazazian HH. (1997). Many human L1 elements are capable of retrotransposition. *Nature Genetics* 16, 37-43.

Scheef G., Fischer F., Krach U., Toenjes RR. (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. *Journal of Virology* Vol. 75, No. 15, p. 6933–6940

Schmidt M, Hoffmann G, Wissler M, Lemke N, Müssig A, Glimm H, Williams DA, Ragg S, Hesemann CU, von Kalle C. (2001) Detection and direct genomic sequencing of multiple rare unknown flanking DNA in highly complex samples. *Hum Gene Ther.* 12(7):743-9.

Schurman H., Cheng J. u. Lam T. (2003): Pathology of xenograft rejection: a commentary. *Xenotransplantation* 10, 293-299

Skov H, Andersen KB. (1993) Mutational analysis of Moloney murine leukaemia virus surface protein gp70. *J Gen Virol.* Apr;74 (Pt 4):707-14.

Sollerbrant K., Raschperger E., Mirza M., Engström U., Philipson L., Ljungdahl PO., and Pettersson RF. (2003). The Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) forms a complex with the PDZ domain-containing protein ligand-of-numb protein-X (LNX). *J. Biol. Chem.* 278:7439–7444.

Stoye JP. und Coffin JM. (1995). The dangers of xenotransplantation. *Nat. Med.* 1, 1100.

Suling K, Quinn G, Wood J, Patience C. (2003) Packaging of human endogenous retrovirus sequences is undetectable in porcine endogenous retrovirus particles produced from human cells. *Virology.* 312(2):330-6.

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

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.

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

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

Tchenio T, Heidmann T. (1991). Defective retroviruses can disperse in the human genome by intracellular transposition. *J Virol.* 65(4):2113-8.

Tchenio T, Heidmann T. (1992). High-frequency intracellular transposition of a defective mammalian provirus detected by an in situ colorimetric assay. *J Virol.* 66(3):1571-8.

Tchenio T, Segal-Bendirdjian E, Heidmann T. (1993). Generation of processed pseudogenes in murine cells. *EMBO J.* 12(4):1487-97.

Teich N. (1984). Taxonomy of retroviruses. In *RNA tumor viruses*, R.A.Weiss, N.Teich, H.E.Varmus und J.M.Coffin, eds. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 25-207.

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

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

Tönjes RR, Niebert M. (2003). Relative age of proviral porcine endogenous retrovirus sequences in *Sus scrofa* based on the molecular clock hypothesis. *J Virol.* Nov;77(22):12363-8.

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.

Turner G., Barbulescu M., Su M., Jensen-Seaman MI., Kidd KK., and Lenz J. (2001). Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. *Curr Biol* 11(19), 1531-1535.

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

van der Laan LJ, Lockey C., Griffeth BC., Frasier FS., Wilson CA., Onions DE., Hering BJ., Long Z., Otto E., Torbett BE. und Salomon DR. (2000). Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* 407, 90-94.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferreira S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigó R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague

A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. (2001). The sequence of the human genome. *Science*. Feb 16;291(5507):1304-51.

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

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

Wilson CA, Wong S, Muller J, Davidson CE, Rose TM, Burd P. (1998). Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *J Virol*. Apr;72(4):3082-7.

Wilson CA, Wong S, VanBrocklin M, Federspiel MJ. (2000). Extended analysis of the in vitro tropism of porcine endogenous retrovirus. *J Virol*. Jan;74(1):49-56.

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

Xie L, Shi W, Guo P. (2003). Roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in corneal transplantation. *Transplantation*. Dec 15;76(11):1556-9.

Yang YG., Wood J.C., Lan P., Wilkinson RA., Sykes M., Fishman JA. and Patience C. (2004). Mouse retrovirus mediates porcine endogenous retrovirus transmission into human cells in long-term human-porcine chimeric mice. *J. Clin. Invest.* 114:695-700.

Zhu A., u. Hurst R. (2002): Anti-N-glycolylneuraminic acid antibodies indentified in healthy human serum. *Xenotransplantation*. 9, 376-381

Lebenslauf

Andreas Jungmann

Geburtsdatum: 18 September 1976
Geburtsort: 66540 Neunkirchen
Nationalität: deutsch

Ausbildung

- 2004-2007** **Dissertation** am Paul-Ehrlich-Institute in 63225 Langen in der Abteilung "Medizinische Biotechnologie" in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf R. Tönjes
Projekte:
"Retrotranspositionspotential endogener und exogener Retroviren"
"Durchmusterung verschiedener transgener Schweine auf Anwesenheit replikationskompetenter PERV-A und PERV-B sowie ekotroper PERV-C "
- 2002-2003** **Diplomarbeit** an der "Universität des Saarlandes" in der Abteilung "Medizinische Mikrobiologie" im "Institut für Virologie" in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Müller-Lantzsch
Projekt:
"Charakterisierung eines HERV-K cORF interagierenden Proteins"
- 1998-2003** **Studium der Biologie** ; Abschluß "Diplom Biologe"
- 1997-1998** **Wehrdienst**
- 1997** **Abitur**
- 1994-1997** **Gymnasium** am Steinwald in 66538 Neunkirchen
- 1987-1993** **Realschule** Neunkirchen Stadtmitte in 66538 Neunkirchen
- 1987-1983** **Grundschule** Friedrich von Schiller in 66540 Neunkirchen