

Klonierung und Charakterisierung von endogenen Retroviren des Menschen und des Schweins

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Frank Czauderna
aus Greven

Frankfurt 2001
(D F 1)

Teile der Arbeit haben in folgenden Publikationen Eingang gefunden:

Tönjes, R. R., F. Czauderna, and R. Kurth. 1999. Genome-wide screening, cloning, chromosomal assignment, and expression of full-length human endogenous retrovirus type K. *J. Virol.* **73**: 9187-9195.

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

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

Tönjes, R. R., F. Czauderna, N. Fischer, U. Krach, K. Boller, P. Chardon, C. Rogel-Gaillard, M. Niebert, G. Scherf, A. Werner, and R. Kurth. 2000. Molecularly cloned porcine endogenous retroviruses replicate on human cells. *Transpl. Proc.* **32**: 1158-1161.

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

Krach, U., N. Fischer, G. Scherf, F. Czauderna, and R. R. Tönjes. 2001. Xenogene porcine endogene Retroviren: Genetik und Wirtszellspezifität. In: *Xenotransplantation, Grundlagen, Chancen, Risiken.* Hrsg.: H. Grimm. Schattauer Verlag. Stuttgart, New York, im Druck.

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

Acc. nr.	Accession number
AIDS	acquired immune deficiency syndrome
AS	Aminosäure
b	base
BaEV	baboon endogenous retrovirus
bp	base pair
BSA	bovine serum albumin
CA	Capsidprotein
Cap	7-Methylguanosintriphosphatmodifikation
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
CMV	Cytomegalievirus
cORF	central open reading frame
cpm	counts per minute
DAF	decay accelerating factor
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modification of Eagle's medium
DNA	desoxyribonucleic acid
DR	direct repeats
DXR	delayed xenograft rejection
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>env</i>	<i>envelope</i> Gen
ERV	endogenes Retrovirus
<i>et al.</i>	et alii, und andere
Fa.	Firma
FDA	Food and Drug Administration
FelV	Felines Leukämievirus
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
<i>gag</i>	<i>group-specific antigen</i> Gen
GaLV	gibbon ape leukemia virus
HAR	hyperacute rejection; hyperakute Abstoßung
HERV	humanes endogenes Retrovirus
HERV-K	humanes endogenes Retrovirus des Typs K
HIV	humanes Immundefizienz Virus
HLA	human leukocyte antigen
HRP	horseradish peroxidase
HTLV	humanes T-Zell Leukämie Virus
<i>Hyg^r</i>	hygromycin B phosphotransferase gene
IAP	Intrazisternales A-Partikel
IDDM	Insulin-abhängiger Diabetes mellitus
IL	Interleukin
IN	Integrase
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
JSRV	Jaagsiekte-Schaf-Retrovirus
kb	kilo base
LB	Luria Broth
LINE	Long Interspersed Element
LTR	Long Terminal Repeat
MA	Matrixprotein
MAC	membrane-attack complex
MCP	membrane-cofaktor-protein
MHC	major histocompatibility complex

MLV	murines Leukämievirus
MMTV	Maus-Mamma-Tumor-Virus
MoMLV	Moloney Maus Leukämievirus
MOPS	Morpholinoethansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonucleic acid
MRSV	Multiple Sclerosis-assoziiertes Retrovirus
MS	Multiple Sclerosis
NC	Nucleocapsidprotein
NP40	Nonidet P 40
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte, Extinktion
ORF	open reading frame
p.I.	post Infektion
p.T.	post Transfektion
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	Primer-Bindestelle
PCR	polymerase chain reaction
PERV	porcines endogenes Retrovirus
<i>pol</i>	<i>polymerase</i> Gen
PPT	Polypurintrakt
PR	Protease
RLV	Rauscher Leukämievirus
RNA	Ribonucleic acid
rpm	round per minute
RT	reverse Transkriptase
SA	Spliceakzeptor
sag	Superantigen
SD	Splicedonor
sec	Sekunde
SINE	Short interspersed elements
SL	Smartladder
SPF	specific pathogen free
SSC	sodium chloride/sodium citrate
SU	surface protein
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
THE	transposon-like human elements
TM	Transmembranprotein
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer ribonucleic acid
<i>Ty1</i>	Transposon yeast 1
T-Zellen	Thymuszellen
ü. N.	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
VLP	virus like particle; virusähnlicher Partikel
XNA	xenoreaktive natürliche Antikörper
XTx	Xenotransplantation

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten sowie chemische Formeln sind nicht aufgeführt.

1.	Einleitung	1
1.1	Retroelemente	1
1.2	Retroviren	3
1.3.	Endogene Retroviren	5
1.3.1	Klassifizierung endogener Retroviren	6
1.3.2	Funktion endogener Retroviren	7
1.4	Das humane endogene Retrovirus Typ K: HERV-K	8
1.5	Xenotransplantation	11
1.5.1	Geschichte der Xenotransplantation	12
1.5.2	Immunologische Barrieren	12
1.5.3	Überwindung immunologischer Barrieren	13
1.5.4	Transplantat-induzierte Zoonosen	14
1.6	Porcine endogene Retroviren (PERV) und Xenotransplantation	15
1.6.1	Biologie von porcinen endogenen Retroviren (PERV)	17
1.7	Zielsetzung der Arbeit	19
2.	Material und Methoden	20
2.1	Organismen	20
2.1.1	Bakterienstämme	20
2.1.2	Eukaryotische Zelllinien	20
2.2	Zellkultur	21
2.2.1	Kultivierung von Zelllinien	21
2.2.2	Transfektion von Säugerzellen mittels Lipofektion	21
2.3	Molekularbiologische Materialien und Methoden	22
2.3.1	Kulturbedingungen	22
2.3.2	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	22
2.4	Isolierung von Nukleinsäuren	22
2.4.1	DNA	22
2.4.1.1	Isolierung von genomischer DNA aus Säugerzellen	22
2.4.1.2	Isolierung von extrachromosomaler DNA aus Bakterien	23
2.4.1.2.1	Minipräparation durch alkalische Lyse	23
2.4.1.2.2	Midi- und Maxipräparation	23
2.4.1.2.3	Isolierung von Cosmid DNA	23
2.4.1.2.4	Isolierung von P1 Plasmid DNA	23
2.4.1.3	Isolation von Bakteriophagen DNA	24
2.4.2	RNA	25
2.4.2.1	Isolierung von zytoplasmatischer RNA aus eukaryotischen Zellen	25
2.4.2.2	Isolierung von Gesamt RNA aus Zellen	25
2.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	25
2.6	Agarosegelelektrophorese	26
2.6.1	RNA Agarosegelelektrophorese	26
2.7	Rückgewinnung von DNA aus Agarosegelen	26
2.8	Anlegen einer λ -Phagen Genbibliothek	27
2.8.1	Phagenplaque Lifting	28
2.9	Auffüllreaktion von Überhängen an Restriktionsschnittstellen	28
2.10	Dephosphorylierung von DNA	28
2.11	Ligation	29
2.12	Herstellung kompetenter Bakterien	29

2.13	Transformation von Bakterien	29
2.14	T/A-Klonierung von PCR-Amplifikaten	29
2.15	Inverse PCR	30
2.16	<i>In vitro</i> Transkription und Translation (Protein Truncation Test)	30
2.17	Proteingelelektrophorese	31
2.18	Indirekte Immunfluoreszenz-Analysen	31
2.19	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)	32
2.19.1	PCR zur Amplifikation langer DNA Sequenzen	32
2.19.2	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)	33
2.20	Primerextension zur Identifizierung des Transkriptionsstarts	33
2.21	DNA Sequenzierung nach Sanger und Sequenzanalyse	34
2.22	Transfer von Nukleinsäuren	34
2.22.1	Kapillarblotting nach Southern	34
2.22.2	Northern Blot	35
2.23	Markierung von DNA Sonden für Hybridisierungen	35
2.23.1	Markierung von Restriktionsfragmenten	35
2.23.2	3'-Endmarkierung von Oligonukleotiden mittels terminaler Transferase	35
2.23.3	5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden durch Kinasierung	35
2.24	Hybridisierung	36
2.24.1	DNA Fragment Sonden	36
2.24.2	DNA Oligonukleotid Sonden	36
2.25	Verwendete Oligonukleotide	38
2.25.1	HERV-K Primer	38
2.25.2	PERV Primer	39
2.25.3	Primer zur Normalisierung der RT-PCR	39
2.25.4	Standard Sequenzierprimer	39
2.26	Verwendete DNA Sonden	40
2.26.1	HERV-K Fragment Sonden	40
2.26.2	PERV Fragment Sonden	40
3.	Ergebnisse	41
3.1	Klonierung und Charakterisierung von humanen endogenen Retroviren des Typs K	41
3.1.1	Klonierung von PCR-amplifizierten proviralen Sequenzen	41
3.1.2	Klonierung eines HERV-K Expressionsplasmids	44
3.1.3	Genom-weites Screening nach HERV-K Typ 2 Proviren	45
3.1.4	Klonierung der Integrationsorte mittels inverser PCR	48
3.1.5	Chromosomale Zuordnung von proviralen HERV-K Integrationsstellen	49
3.1.6	Nachweis der Kodierungskapazität für retrovirale Proteine von HERV-K tragenden P1 Klonen	51
3.1.7	Klonierung von HERV-K10 und HERV-K18	55
3.2	Klonierung und Charakterisierung von porcinen endogenen Retroviren	59
3.2.1	Klonierung einer PERV spezifischen Sonde	59
3.2.2	Klonierung porciner endogener Retroviren mittels PCR	59
3.2.2.1	Amplifikation und Klonierung partieller PERV via inverser PCR	59
3.2.2.1	Klonierung von proviralen PERV Genen	62
3.2.3	Generierung und Durchmusterung einer λ -Phagen Bibliothek	63
3.2.3.1	Subklonierung der λ -Inserts in pBluescript KS (Stratagene)	66
3.2.4	Analyse der PERV Sequenzen	67

3.2.4.1	Vergleich der PERV long terminal repeats (LTR)	69
3.3	Klonierung eines replikationskompetenten PERV durch Kombination von pPERV-PK28/29 und pPERV-B(33)	70
3.4	Rekonstitution des Genortes PERV-B(43)	73
3.5	Charakterisierung der PERV-Genomstruktur	75
3.5.1	Identifizierung der Cap Site	75
3.5.2	Bestimmung von Splice Donor und Akzeptor	76
3.6	Nachweis von PERV-Transkripten in infizierten 293 Zellen	77
3.7	Transfektion geeigneter Zelllinien mit porcinen endogenen Retroviren	77
3.7.1	Nachweis von RT-Aktivität in zellfreien Überständen von PERV-Plasmid transfizierten 293 Zellen	79
3.8	Untersuchung der rekombinanten Plasmide pPERV-B(33)/ATG und pPERV-B(43)/LTR	79
3.8.1	Nachweis von PERV-Proteinen mittels indirekter Immunfluoreszenz	80
3.8.2	RT-Nachweis für die Plasmide pPERV-B(33)/ATG und pPERV-B(43)/LTR	83
3.8.3	Nachweis von PERV RNA in infizierten Zellen mittels Northern-Blot Analyse	83
3.9	Differentieller Nachweis subgenomischer PERV-Transkripte infizierten Zelllinien mittels RT-PCR	85
4.	Diskussion	87
4.1	Humane endogene Retroviren des Typs K	87
4.1.1	Genomweites Screening nach biologisch aktiven HERV-K Typ II Proviren	88
4.1.2	Charakterisierung der Typ I Proviren HERV-K10 und HERV-K18	91
4.2	Porcine endogene Retroviren und Xenotransplantation	92
4.2.1	Isolierung proviraler endogener Retroviren der Klassen A und B	93
4.2.2	Klonierung replikationskompetenter PERV	94
4.3	Charakterisierung der molekularen Genomorganisation und mRNA Expressionsmuster von PERV	95
4.4	Nutzung des Erkenntnisgewinns an PERV Sequenzinformation	96
4.4.1	Etablierung eines klassenspezifischen RT PCR-Nachweises zur PERV Diagnostik	96
4.4.2	Einfluß replikationskompetenter PERV auf die Durchführbarkeit von Xenotransplantationen	96
5.	Zusammenfassung	98
6.	Literaturverzeichnis	99
7.	Danksagung	
8.	Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1 Retroelemente

Das Genom aller Eukaryoten weist eine Vielzahl von DNA-Sequenzen auf, die strukturelle Ähnlichkeiten und Sequenzhomologien zu exogenen infektiösen Retroviren besitzen. Diese Elemente, die in der Keimbahn verankert sind und dementsprechend vertikal transmittiert werden, werden als endogene Retroviren bezeichnet und zusammen mit den Retroposons und Retrotransposons zu den Retroelementen gezählt (Wilkinson *et al.*, 1994, Löwer *et al.*, 1996). Es existieren Schätzungen, daß 5% des menschlichen Genoms aus Retroelementen bestehen und bis zu sechsmal mehr durch reverse Transkription anderer RNAs hervorgegangen sind (Baltimore, 1985; Smit, 1996). Es ist daher nicht überraschend, daß diese genetischen "Parasiten" eine signifikante Rolle bei der Gestaltung ihrer Wirtsgenome gespielt haben (Boeke und Stoye, 1997). Hinsichtlich der Komplexität weisen die Retroelemente beträchtliche Unterschiede auf (Abb. 1.1).

Als Retroelemente werden mobile genetische Elemente bezeichnet, deren Replikationszyklus über ein RNA-Intermediat verläuft, welches durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase, RT) in eine cDNA umgeschrieben wird, die anschließend ins Genom integriert. Die Reintegration erfolgt endonukleolytisch unter Ausbildung von kurzen Sequenzwiederholungen (direct repeats, DR), vermittelt durch die Retroelement-kodierte Integrase (IN).

Die einfachsten Retroelemente sind Pseudogene, die wahrscheinlich durch reverse Transkription zellulärer mRNAs entstanden sind (McCarrey und Thomas, 1987). Die dazu notwendigen Enzyme werden in trans, wahrscheinlich von anderen Retroelementen (Carlton *et al.*, 1995), zur Verfügung gestellt. Pseudogene, die zusätzlich einen Promoter besitzen, werden als Retrogene bezeichnet (Löwer *et al.*, 1996). Short interspersed elements (SINEs) könnten ebenfalls zu dieser Gruppe gezählt werden, besitzen aber im Gegensatz zu den Retrogenen keine Kodierungskapazität. Zu diesen hochrepetitiven Elementen, die etwa 5% des menschlichen Genoms ausmachen (Deininger, 1989), zählen die gut charakterisierten Alu-Elemente (Ullu und Tschudi, 1984; Weiner *et al.*, 1986) und die SINE-R-Elemente (Ono *et al.*, 1987a). Alu-Elemente sind annähernd 300 bp lang und besitzen einen polyadenylierten 3'-Terminus (Weiner *et al.*, 1986). Offene Leserahmen (open reading frame, ORF) sind nicht zu verzeichnen, vielmehr deuten Sequenzhomologien auf eine Abstammung von 7-SL-RNAs

hin (Ullu und Tschudi, 1984). Von den SINE-R Elementen, die eine Länge von ~630 bp aufweisen, existieren etwa 4.000 – 5.000 Kopien im menschlichen Genom. Es handelt sich um partiell deletierte HERV-K-LTRs, die 5' eine GC-reiche Sequenzwiederholung von 40 Nukleotiden aufweisen, die als RNA-Polymerase II Promoter fungieren kann (Ono *et al.*, 1987a).

Long interspersed elements (LINEs) stellen den Prototyp von Retroposons dar. Sie besitzen neben einem GC-reichen Polymerase II Promoter (Swergold, 1990) und einem polyadenylierten 3'-Terminus zwei ORFs (Martin *et al.*, 1984; Dombroski *et al.*, 1991). Während das Genprodukt von ORF1 für ein RNA-bindendes Protein von ca. 40 kDa kodiert (Leibold *et al.*, 1990; Martin, 1991), konnte für den zweiten Leserahmen die Kodierung einer enzymatisch aktiven reversen Transkriptase nachgewiesen werden (Mathias *et al.*, 1991). Das 6,5 kb lange Vollängentranskript kofraktioniert mit den beiden Genprodukten in Ribonucleoprotein-Komplexen (Deragon *et al.*, 1990; Martin, 1991), die wahrscheinlich das Reaktionszentrum für die reverse Transkription darstellen. Von der LINE-1 (L1) Familie existieren etwa 100.000 Kopien im menschlichen Genom, von denen die meisten bedingt durch Punktmutationen und Deletionen defekt vorliegen (Hutchison *et al.*, 1989). Es wird vermutet, daß im menschlichen Genom nur 30-60 aktive L1 Elemente existieren (Sassaman *et al.*, 1997). Die Mobilität von LINE-1 Elementen konnte sowohl für das murine als auch für das humane Genom nachgewiesen werden (Kazazian *et al.*, 1988; Boccaccio *et al.*, 1990). Ähnliche Elemente konnte auch in Insekten, Protozoen, Pflanzen und Pilzen gefunden werden (Eickbush, 1992).

Retrotransposons sind durch die Existenz von Long Terminal Repeats (LTR) gekennzeichnet, die als Polymerase II Promoter fungieren. Daneben besitzen diese Retroelemente zwei offene Leserahmen. Einer kodiert für ein Polyprotein, das funktionelle Homologien zum *gag* Polyprotein der Retroviren aufweist und Partikel bilden kann. Der zweite Leserahmen kodiert für die reverse Transkriptase. Die Vollängen mRNA kann aufgrund eines Verpackungssignals (Ψ , psi site) spezifisch in die zytoplasmatischen Ribonucleoprotein-Partikel verpackt werden (Shiba und Saigo, 1983; Adams *et al.*, 1987). Die Partikelbildung scheint ein Transpositionsintermediat darzustellen, in dem die reverse Transkription vonstatten geht (Garfinkel, 1992). Retrotransposons sind weit verbreitet und bei Protozoen, Pilzen, Pflanzen und Tieren zu finden (Boeke und Corces, 1989). Die Elemente in Hefen (*Ty1* Elemente) und von *Drosophila melanogaster* (*Copia* Elemente) sind sehr gut untersucht und können als Derivate bzw. Vorläufer von Retroviren angesehen werden (Löwer *et al.*, 1996).

Im menschlichen Genom existieren Retrotransposon-ähnliche Elemente, die als transposon-like human elements (THE) bezeichnet werden. Die Konsensussequenz dieser Familie ist ~2,3 kb lang, wird von ca. 350 bp langen LTRs begrenzt und weist keine erkennbaren ORFs auf. Das haploide humane Genom beinhaltet ca. 10.000 Kopien der Familie THE-1 sowie etwa gleich viele solitäre LTRs (Paulson *et al.*, 1985).

1.2 Retroviren

Die endogenen Retroviren sind die komplexesten Retroelemente. Es gibt Hinweise, daß sie evolutionär aus Retrotransposons hervorgegangen sind (Temin, 1980). Sie unterscheiden sich von ihren nächsten Verwandten durch die Existenz mindestens eines weiteren Gens, welches für das retrovirale Hüllprotein (*envelope*, *env*) kodiert. Dieses leitet durch spezifische Anbindung an zelluläre Rezeptoren den exogenen Replikationszyklus ein, der den infektiösen Retroviren neben der vertikalen Verbreitung (nach Integration in das Wirtsgenom und anschließender Zellteilung) den Übertritt in andere Zellen bzw. Individuen ermöglicht und somit horizontal verläuft.

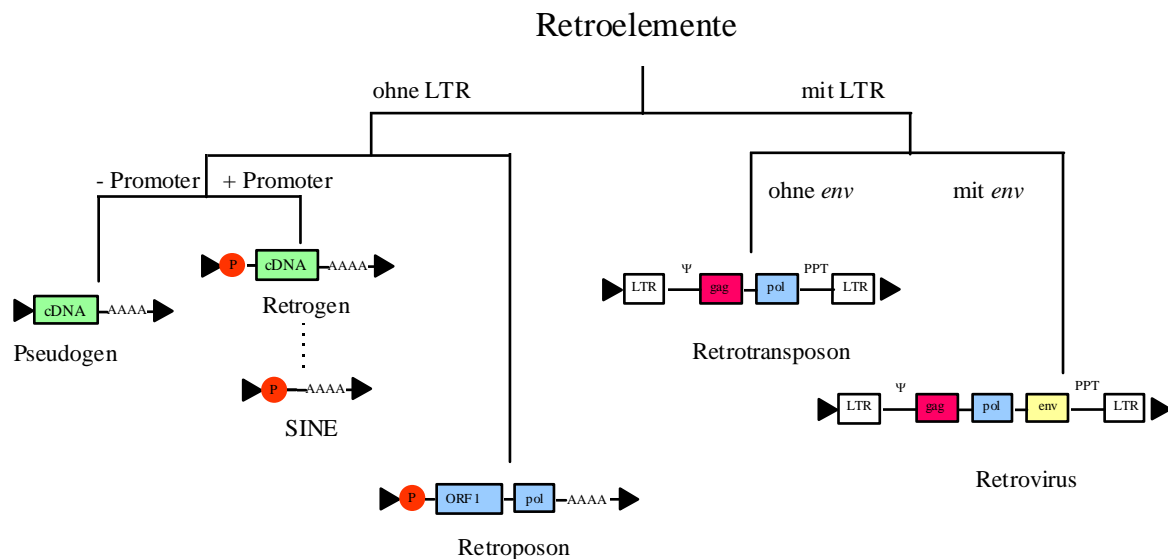


Abb. 1.1: Klassifizierung von Retroelementen.

Schematische Darstellung der wichtigsten genetischen Elemente. Nähere Erläuterungen im Text. Verändert nach Wilkinson *et al.*, 1994.

● Promoter, ► direkte Sequenzwiederholung (direct repeat, DR), PPT: Polypurintrakt

Die grundlegende retrovirale Genomorganisation 5'-LTR-*gag-pol-env*-3'-LTR ist allen Retroviren gemein und bei einfachen Retroviren wie z. B. dem murinen Leukämievirus (MLV) zu finden. Beispiele für eine komplexere Genomorganisation sind das humane T-

lymphotrope Virus (HTLV) und das humane Immundefizienzvirus (HIV); sie besitzen zusätzliche regulatorische und akzessorische Gene, deren Produkte die Genregulation kontrollieren (Rosen und Pavlakis, 1990).

Eine schematische Darstellung eines Provirus und eines Virions ist in Abb. 1.2 wiedergegeben.

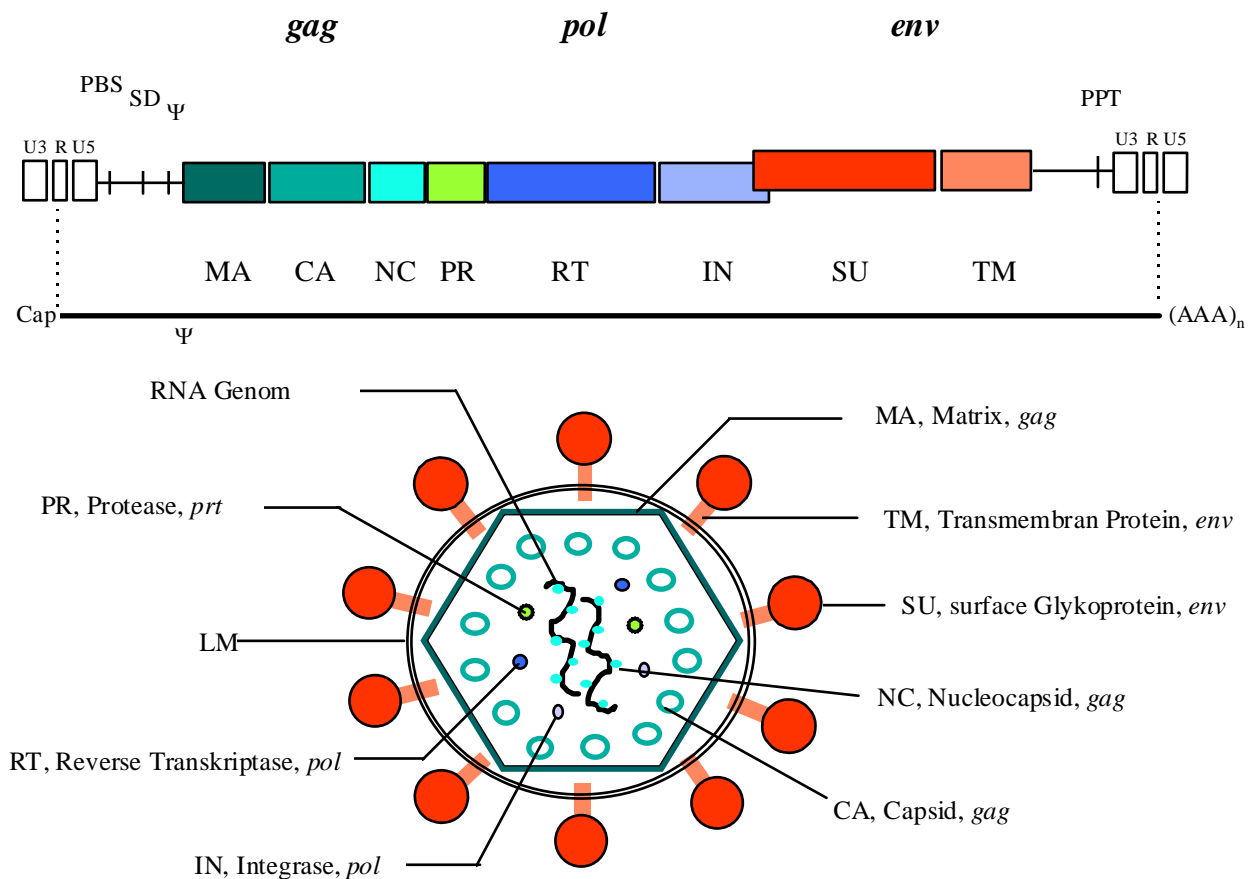


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der proviralen Genomorganisation eines Retrovirus und eines Virions.

Die Genprodukte der proviralen Leserahmen sind gleichfarbig im Virion dargestellt. An Nukleinsäuren befinden sich im Virion neben zwei Vollängen-RNA Genomen die tRNA Primer. Subgenomische mRNAs werden in Ermangelung des Verpackungssignals Ψ nicht mitverpackt. Die Lipiddoppelmembran (LM) entstammt der Zytoplasmamembran der Wirtszelle.

MA: Matrixprotein; CA: Capsidprotein; NC: Nucleocapsidprotein; PR: Protease; RT: reverse Transkriptase; IN: Integrase; SU: Oberflächen (surface)-protein; TM: Transmembranprotein; $(AAA)_n$: Poly(A)-Schwanz; Cap: 7-Methylguanositriphosphatmodifikation; PBS: Primer-Bindestelle; PPT: Polypurintrakt; SD: Splicedonor; U3-R-U5: retrovirale LTR (long terminal repeat).

Retrovirale Partikel haben einen Durchmesser von etwa 80-130 nm und besitzen eine Lipid-Doppelmembran, die der zellulären Zytoplasmamembran des Wirtes entstammt. Auf der Oberfläche befinden sich die glykosylierten Hüllproteine, die im Elektronenmikroskop als Spikes sichtbar sind. In dem konischen bis sphärischen Capsid, das aus *gag* kodierten

Proteinen gebildet wird, befinden sich zwei 7-10 kb lange RNA-Genome, die retroviralen Proteine reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR) sowie zelluläre tRNAs, die freie 3'-OH-Enden als Startpunkte (Primer) für die reverse Transkription zur Verfügung stellen. Die Vollängen-RNA wird von einer 5'-Cap-Struktur und einem polyadenylierten 3'-Ende begrenzt. Bei der Integration ins Genom rekonstituieren sich die LTRs, die regulatorisch bedeutsame Strukturen beinhalten, und das Provirus entsteht.

Es werden drei Subfamilien der Retroviridae unterschieden. Die Spumavirinae, die Lentivirinae und die Oncovirinae, die weiter anhand ihrer Partikel-Morphologie in die Typen A-D untergliedert sind (Teich, 1984, Coffin, 1992).

1.3. Endogene Retroviren

Die Existenz von endogenen retrovirusähnlichen Elementen (ERV) im humanen Genom ist seit langem bekannt (Benveniste und Todaro, 1974). Seit der erstmaligen Isolierung einer entsprechenden Sequenz (Martin *et al.*, 1981) wurden in zahlreichen Hybridisierungsexperimenten mit Proben exogener Retroviren weitere Elemente isoliert (Bonner *et al.*, 1982; Callahan *et al.*, 1982; O'Connell *et al.*, 1984). Weitere ERVs wurden mittels PCR (polymerase chain reaction) identifiziert (Bangham *et al.*, 1988; Shih *et al.*, 1989) und andere eher zufällig bei der Untersuchung zellulärer Gene entdeckt (Mager und Henthorn, 1984; Maeda, 1985). Im Gegensatz zu exogenen Retroviren stellen die endogenen Retroviren einen integralen Bestandteil des Wirtsgenoms dar. Ihnen fehlt in der Regel der exogene Lebenszyklus, der eine horizontale Verbreitung ermöglichen würde, so daß sie nur entsprechend der Mendelschen Regeln vertikal transmittiert werden. Mit dem Maus-Mammataumor-Virus (MMTV), dem Maus-Leukämie-Virus (MuLV) und dem Jaagsiekte-Schaf-Retrovirus (JSRV) seien drei der wenigen Ausnahmen, die sowohl einen endogenen als auch exogenen Lebenszyklus aufweisen, namentlich genannt. (Wilkinson *et al.*, 1994).

Mittlerweile ist die Existenz zahlreicher unterschiedlicher humaner endogener Retroviren im Genom bekannt (Löwer *et al.*, 1996; Tab. 1.1). Insgesamt machen sie etwa 1% des humanen Genoms aus. Neben singulären Integrationen wie im Falle von HRES 1 (Perl *et al.*, 1989) gibt es Familien wie HERV-H mit annähernd 1.000 Kopien pro haploidem Genom (Mager und Henthorn, 1984). Aller Voraussicht nach sind ERVs durch Keimbahninfektionen exogener Viren entstanden, die vermutlich vor über 25-30 Millionen Jahren erfolgten (Mariani-

Costantini *et al.*, 1989; Kröger und Horak, 1987; Gingerich, 1984). Alternativ könnten ERVs aber auch Vorläufer exogener Viren sein.

In der Tabelle 1.1 ist eine Zusammenstellung der wichtigsten Vertreter endogener Retroviren dargestellt.

Tab. 1.1: Auswahl endogener Retroviren unterschiedlicher Spezies
(verändert nach Boeke und Stoye, 1997)

Name	Anzahl	Größe kb	PBS	Organisation	Referenz
Maus					
MLV					
ecotrop	0-10	8,8	Pro	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	Herr, 1984
xenotrop	5-30	8,8	Pro	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	O'Neill <i>et al.</i> , 1985
polytrop	10-30	9,2	Gln	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	Stoye und Coffin, 1987
MMTV	0-10	10	Lys	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR (sag)	Moore <i>et al.</i> , 1987 (sag)
Hamster					
Syr. A-Typ	500-1000	8,0	Phe	LTR- <i>gag-pol-?-LTR</i>	Ono <i>et al.</i> , 1985
Katze					
FeLV	8-12		Pro	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	Stewart <i>et al.</i> , 1986
RD114	20			LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	R. Moehring (unpubl.)
Pavian					
BaEV	5-15	8,9	Pro	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	Kato <i>et al.</i> , 1987
SERV	135-240	8,4	Lys	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	van der Kuyl <i>et al.</i> , 1997
Mensch, Klasse I					
HERV-E	35-50	8,8	Glu	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	Repaske <i>et al.</i> , 1985
ERV-1	15	?	?	<i>gag-pol-env</i> -LTR	Bonner <i>et al.</i> , 1982
HERV-R	10	9,9	Arg	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	O'Connell <i>et al.</i> , 1984
RRHERV-I	20	?	Ile	LTR- <i>?-pol-env</i> -LTR	Kannan <i>et al.</i> , 1991
HERV-I	25	9,0	Ile	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	Maeda und Kim, 1990
S71	20	?	?	<i>gag-Δpol-env</i> -LTR	Werner <i>et al.</i> , 1990
HRES-1	1	?	His	?LTR- <i>gag-pol</i>	Perl <i>et al.</i> , 1989
HERV-P	50-100	8,2	Pro	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	Kröger und Horak; 1987
ERV-9	40	9,6	Arg	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	La Mantia <i>et al.</i> , 1991
HERV-H	900	5,8	His	LTR- <i>gag-Δpol</i> -LTR	Mager und Freeman, 1987
	100	8,7	His	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR	Hirose <i>et al.</i> , 1993
Mensch, Klasse II					
HERV-K	50	9,2	Lys	LTR- <i>gag-pol-env</i> -LTR <i>rev?</i>	Ono <i>et al.</i> , 1986 Löwer <i>et al.</i> , 1993
HERV-L	200	6,5	Leu	LTR- <i>?gag-pol?env</i> -LTR	Cordonnier <i>et al.</i> , 1995

sag: Superantigen

1.3.1 Klassifizierung endogener Retroviren

Die Taxonomie der endogenen Retroviren leitet sich von den unterschiedlichen tRNA-Spezifitäten ab, die der RT als Primer dienen. Entsprechend dem Einbuchstabencode der Aminosäuren wird ein Suffix an das Acronym HERV angehängt. Da diese Terminologie Schwierigkeiten mit sich bringt sofern die Primerbindestellen (PBS) nicht definiert sind oder entfernte Gruppen identische Primerbindestellen aufweisen, existiert eine andere Klassifizierung endogener Retroviren auf Basis von Homologien in der *pol*-Region zu

exogenen Retroviren (Callahan, 1988). Zur Klasse I gehörig sind ERVs, die C-Typ Retroviren der Säuger ähneln. Solche, die höhere Homologien zu A-, B- oder D-Retroviren aufweisen, werden zur Klasse II zusammengefaßt (Doolittle *et al.*, 1989; Xiong und Eickbush, 1990, s. Tabelle 1.1). Das Vorhandensein weiterer Gruppen mit Homologien zum Maus-Mamma-Tumor-Virus (human MMTV-like; HML), die in die Klasse II gehören und deren Charakterisierung noch aussteht, konnte mittels PCR nachgewiesen werden. Eine Untergliederung der Klasse II in insgesamt sechs Gruppen (HML 1-6) erfolgte durch Charakterisierung dieser *pol* Fragmente (Medstrand und Blomberg, 1993).

Die Transkription ist für zahlreiche HERV-Familien nachgewiesen. Da die meisten Leserahmen Defekte aufweisen, beschränken sich die beschriebenen Proteinexpressionen auf ein 577 Aminosäuren langes Env von ERV-3 (HERV-R), sowie die Genprodukte der Familie HERV-K (Löwer *et al.*, 1996).

Retrovirusähnliche Partikel sind in zahlreichen elektronenmikroskopischen Studien in normalen Geweben, insbesondere der Plazenta, sowie in Karzinomen und abgeleiteten Zelllinien nachgewiesen worden (Kalter *et al.*, 1973; Vernon *et al.*, 1974; Bronson *et al.*, 1979; Kurth *et al.*, 1980).

1.3.2 Funktion endogener Retroviren

Retroelemente wurden ursprünglich ausschließlich als genetische Parasiten angesehen (Doolittle und Sapienza, 1980, Orgel und Crick, 1980). Mittlerweile ist zumindest für einige Wirte ein offenkundiger Vorteil ersichtlich geworden.

Bei *Drosophila* wird in Ermangelung einer konventionellen Aufrechterhaltung von Telomeren (Okazaki *et al.*, 1992) diese Funktion höchstwahrscheinlich durch Retrotransposition wahrgenommen (Boeke und Stoye, 1997). Eine Involvierung von Retrotransposon-kodierten reversen Transkriptasen bei der Reparatur von Chromosombrüchen wird auch für andere Organismen diskutiert. So konnte gezeigt werden, daß *Ty1* und heterolog exprimiertes humanes L1 in der Lage sind Doppelstrangbrüche in Hefen zu reparieren (Moore und Haber, 1996; Teng *et al.*, 1996).

Bei Mäusen kann die Expression von *env*- bzw. *sag*- (superantigen) Genprodukten durch Rezeptorinterferenz bzw. klonale Deletion der Zielzellen zu einem Schutz vor Infektion mit exogenen Retroviren führen (Gardner *et al.*, 1991; Acha-Orbea und Palmer, 1991; Golovkina *et al.*, 1992). Die gesteigerte Expression von ERV-3 (HERV-R) *env* im Syncytiotrophoblasten

kann ebenfalls dahingehend diskutiert werden. Wahrscheinlicher ist aber, daß die fusogenen Eigenschaften des Hüllproteins bei der Ausbildung des Syncytiotrophoblasten von Bedeutung sind. Denkbar ist auch eine Immunsuppression zum Schutz des Fötus vor maternalen Abwehrreaktionen (Boyd *et al.*, 1993; Venables *et al.*, 1995).

Obwohl eine eindeutige ätiologische Relevanz von HERVs bei Erkrankungen des Menschen bisher nicht nachgewiesen werden konnte, wird eine Involvierung humaner endogener Retroviren bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen diskutiert (Hohenadl *et al.*, 1996; Uronovitz und Murphy, 1996, Conrad *et al.*, 1997). Die Expression eines Superantigens, kodiert von einem Mitglied der HERV-K Familie (IDDMK_{1,22}), soll ursächlich für die Ausbildung des Insulin-abhängigen Diabetes mellitus (IDDM) verantwortlich sein (Conrad *et al.*, 1997). Die Befunde, die den kausalen Zusammenhang der IDDMK_{1,22}-Expression mit der Krankheitsentstehung belegen sollen, konnten aber von anderen Arbeitsgruppen nicht reproduziert werden (Murphy *et al.*, 1998; Löwer *et al.*, 1998; Lan *et al.*, 1998; Lapatschek *et al.*, 2000). Kürzlich wurde mit HERV-W eine neue Familie humaner endogener Retroviren entdeckt, die vordem als Multiple Sclerosis-assoziiertes Retrovirus (MRSV) bezeichnet wurde, da man im Plasma von MS Patienten entsprechende Transkripte nachweisen kann (Blond *et al.*, 1999). Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Expression von HERV-W und dem Auftreten von MS konnte bisher jedoch nicht hergestellt werden.

1.4 Das humane endogene Retrovirus Typ K: HERV-K

Die Genome der meisten HERV-Familien sind bedingt durch Punktmutationen, Deletionen, Insertionen bzw. Leserasterverschiebungen defekt. Eine Ausnahme hiervon stellt die Familie HERV-K dar, für die die Existenz offener Leserahmen für alle Gene nachgewiesen wurde. In Keimzelltumoren sowie in daraus abgeleiteten Zelllinien kann die Produktion von Partikeln beobachtet werden (Löwer *et al.*, 1984; Löwer *et al.*, 1987). Diese Partikel werden als human teratocarcinoma derived viruses (HTDV) bezeichnet (Bronson *et al.*, 1979, Kurth *et al.*, 1980, Boller *et al.*, 1983). In Plazenten findet man ebenfalls Partikel, die eine ähnliche Morphologie aufweisen (Kalter *et al.*, 1973; Dalton *et al.*, 1974). Ein elektronendichter Ring zwischen dem Viruscore und der Hülle ist nicht zu verzeichnen, ebenso fehlt ein kondensierter Kern, wie er typisch für reife Retroviren ist. Zudem scheinen die Partikel häufig im Stadium des "Buddings" arretiert zu sein.

Mittels der R-U5-PCR Technik konnte der Nachweis geführt werden, daß HERV-K in den Teratokarzinomazelllinien hoch exprimiert wird (Löwer *et al.*, 1993b). Mit Hilfe eines Antiserums gegen rekombinantes Gag konnte letztendlich in Western-Blot-Analysen, der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie und mit Hilfe von Immunogold-Markierungen gezeigt werden, daß HERV-K für HTDV kodiert (Boller *et al.*, 1993).

Die ersten HERV-K Proviren sind unabhängig voneinander durch Hybridisierungen mit MMTV abgeleiteten *pol* Sonden (Callahan *et al.*, 1985; Deen and Sweet, 1986) beziehungsweise durch Hybridisierung mit einer Sonde spezifisch für Intrazysternale A-Partikel (IAP) des Syrischen Hamsters entdeckt worden (Ono, 1986). Durch solche Hybridisierungen konnte die Zahl der proviralen Integrationen auf 25-50 Kopien pro haploidem Genom geschätzt werden. Hinzukommen etwa 25.000 solitäre LTRs (Leib-Mösch *et al.*, 1993). Mit HERV-K10 wurde kurz nach der Entdeckung der Proviren die erste Vollängen-Sequenz publiziert (Ono *et al.*, 1986). Die Mitglieder der HERV-K Familie sind durch eine Primerbindestelle komplementär zu einer Lysin tRNA gekennzeichnet. Sie besitzen 968 bp lange LTRs, die Sequenzhomologien zu den B-Typ Retroviren aufweisen. Der Integraseanteil des *pol* Gens sowie das *env* Gen deuten eher auf eine Verwandtschaft zu Retroviren des D-Typs hin. Für die RT-Domäne sind Homologien sowohl zu A-, B-, C-, und D-Typ-Retroviren zu verzeichnen (Ono, 1986; Larsson *et al.*, 1989).

Für einige Teratokarzinomazelllinien wurde die Expression funktioneller Core-Proteine, die virusähnliche Partikel (virus-like particles, VLPs) bilden und in der Lage sind HERV-K RNA zu verpacken, beschrieben (Boller *et al.*, 1993). Neben dem Vollängentranskript und der subgenomischen *env* mRNA finden sich hier zwei weitere Transkripte. Ein doppelt gespleißtes Produkt von ~1,8 kb kodiert für ein 14 kD Protein, welches als cORF (central open reading frame) bezeichnet wird. Es weist funktionelle Ähnlichkeit zum Rev Protein von HIV auf (Löwer *et al.*, 1995). Die Funktion einer ~1,5 kb mRNA ist bisher ungeklärt (Abb. 1.3).

Der Nachweis für die Funktionalität prokaryotisch exprimierter Enzyme konnte sowohl für die Protease (Müller-Lantsch *et al.*, 1993; Schommer *et al.*, 1996) als auch für die Integrase (Kitamura *et al.*, 1996) erbracht werden. Mittels einer PCR-basierenden Nachweismethode konnte in Überständen von Teratokarzinomakulturen auch eine geringfügige Aktivität der reversen Transkriptase nachgewiesen werden (Lugert *et al.*, 1996; Tönjes *et al.*, 1996). Zudem konnte mit rekombinanten Baculoviren, die eine Vollängen HERV-K cDNA beinhalten, nach Infektion von Insektenzellen eine effiziente Produktion von VLPs nachgewiesen werden. Die VLPs entsprachen morphologisch dem HTDV Phänotyp und enthielten HERV-K RNA und RT (Tönjes *et al.*, 1997b).

Der Nachweis des Env Proteins in Teratokarzinomazellen gestaltet sich aufgrund der Dominanz des zweiten Spliceproduktes, welches für cORF kodiert als schwierig. In rekombinanten Expressionssystemen konnten jedoch nicht prozessierte, glykosylierte Vorläuferproteine nachgewiesen werden (Tönjes *et al.*, 1997a).

HERV-K10, das am besten charakterisierte Provirus, weist einen Leserahmenwechsel im *gag* Gen und im Vergleich zu zwei anderen Klonen (HERV-K8, HERV-K22; Ono, 1986) eine Deletion von 292 bp im N-Terminus des *env* Gens auf. Proviren, die diese 292 bp beinhalten werden als Typ II Genome bezeichnet. Sie stellen den HERV-K-Prototyp dar (Löwer *et al.*, 1996).

Typ 1: HERV-K10 (Ono *et al.*, 1986)



Typ 2: HERV-K Prototyp

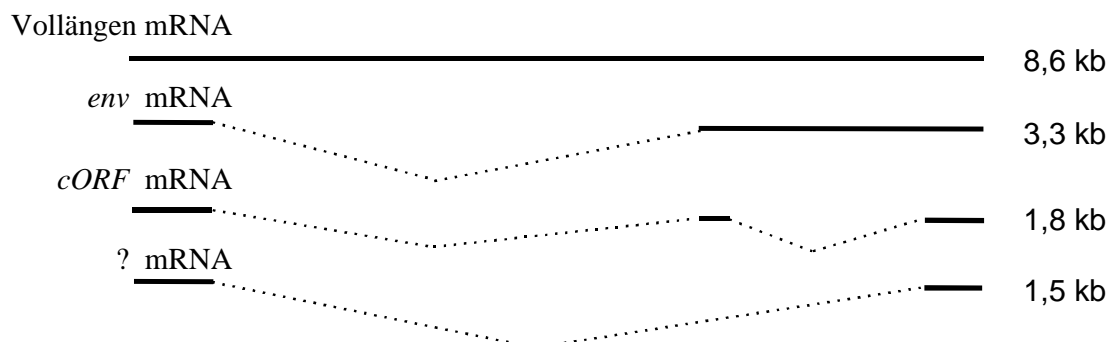
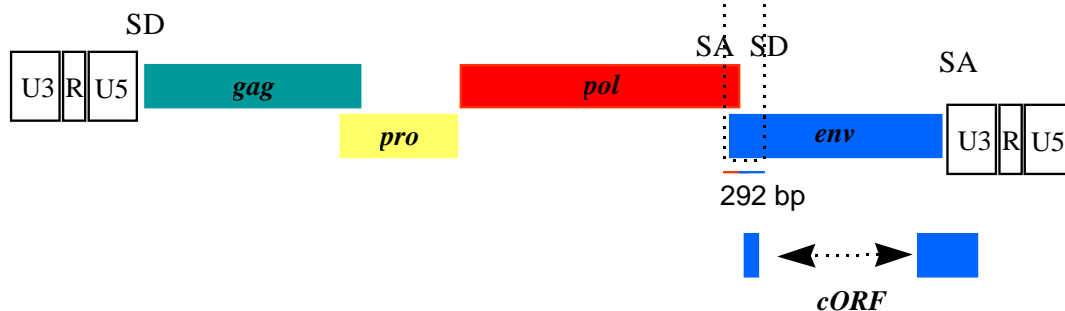


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Genomorganisation von HERV-K-Providiren

Die Deletionsmutante HERV-K10 besitzt infolge einer 1 bp Deletion zwei *gag* Leserahmen. Aufgrund der fehlenden 292 bp existiert ein fusionierter *pol-env* Leserahmen mit einem vorzeitigen Stopcodon im *env* (Pfeilspitze). Das komplexe Spleißmuster, das man in Teratokarzinomazelllinien findet (Löwer *et al.*, 1993a) kann aufgrund eines fehlenden Splicedonors (SD) im Bereich des *env* Gens nicht von Typ 1 Genomen stammen.

Die Existenz offener *gag* Leserahmen entsprechend dem Prototyp konnte in einem gekoppelten Transkriptions-/Translationsnachweis auf den Chromosomen 3, 5, 6, 7, 10, 19, 22 und Y nachgewiesen werden (Mayer *et al.*, 1997a). Hingegen konnten offene Leseraster, die für ein Typ 2 *env* Gen kodieren, nur auf den Chromosomen 7, 19 und Y identifiziert werden (Mayer *et al.*, 1997b). Die Existenz eines intakten Typ II Genoms, welches in der Lage ist für alle retroviralen Proteine zu kodieren, wurde bisher nicht beschrieben. Die Frage, ob ein Provirus allein für die in Zelllinien und Plazenten zu beobachtende Partikelproduktion verantwortlich zeichnen kann oder ob eine Komplementation durch Proteinexpression unterschiedlicher Proviren stattfindet, bleibt zu klären.

1.5 Xenotransplantation

Das Interesse an endogenen Retroviren anderer Spezies, insbesondere solcher, die als xenogene Organspender fungieren könnten, hat im Zusammenhang mit der Transplantation tierischer Gewebe und Organe auf den Menschen (Xenotransplantation, XT_x) zugenommen.

In den 90iger Jahren hat die Anzahl der realisierten Transplantationen um etwa 30% zugenommen, jedoch hat sich die Anzahl potentieller Transplantatempfänger auf der Warteliste im gleichen Zeitraum verdoppelt. 1997 wurden in Deutschland 3839 Organverpflanzungen durchgeführt, 12% mehr als im Jahr davor. Diese Zahl stieg 1998 um 2,1% auf 3918 Transplantationen. Dennoch warten allein in Deutschland etwa 12.000 Patienten auf ein passendes Organ (Schildhauer, 1998; Deutsche Stiftung Organtransplantation, <http://www.organspende.de>). Dieser Mangel an Spenderorganen führte in den letzten Jahren zu einer intensiven Suche nach Alternativlösungen. Hierunter wird insbesondere die Verpflanzung von tierischen Zellen oder Organen, die als XT_x bezeichnet wird, als möglicher Ausweg diskutiert. Im Mittelpunkt des Interesses stehen insbesondere Tiere, die man gezielt als Organdonoren züchten kann. Die Verwendung von Primaten läge aufgrund des Verwandtschaftsgrades nahe und hat in der Vergangenheit auch Anwendung gefunden (Reemstma *et al.*, 1964, Starzl *et al.*, 1993), jedoch sprechen neben ethischen Beweggründen vor allem die langen Generationszeiten und eine Vielzahl mikrobiologischer Risiken/Erreger gegen die Verpflanzung von Affenorganen. Aufgrund von physiologischen Gegebenheiten werden seit einigen Jahren Schweine favorisiert (Ye *et al.*, 1994, Fishman, 1994).

1.5.1 Geschichte der Xenotransplantation

Die ersten Berichte von Übertragungen tierischer Gewebe auf Menschen liegen einige hundert Jahre zurück, so soll 1682 einem russischen Adligen ein Knochenstück eines Hundes in den Schädel gesetzt worden sein. 1902 verpflanzte Emerich Ullmann in Wien eine Hundeniere auf eine Ziege. Nachdem sein Versuch der Transplantation einer Schweineniere auf eine nierenkranke Frau scheiterte, stellte er seine Forschungen auf diesem Gebiet ein (Nagy, 1999). 1905 pflanzte Princeteau einem an Urämie leidenden Mädchen Teile von Kaninchen Nieren ein. 1910 übertrug Unger in Berlin die Niere eines Rhesusaffen (<http://www.organspende.de/xenotransplantation.htm>). Die erfolgreiche Verpflanzung solider Organe wurde erstmals 1964 in New Orleans durchgeführt; insgesamt wurden 13 Schimpansennieren transplantiert. Bemerkenswerterweise überlebte eine Patientin neun Monate mit normaler Nierenfunktion, bevor sie an den Nebenwirkungen der Immunsuppression verstarb (Reemstma *et al.*, 1964). Besonderes Aufsehen erregte 1984 die Transplantation eines Pavianherzens auf einen Säugling, der mit schwersten Fehlbildungen auf die Welt kam. Das Kind, das als „Baby Fae“ berühmt wurde, verstarb nach 20 Tagen (Bailey *et al.*, 1985). Die vorerst letzte XTx eines Primatenorgans überlebte ein Patient 26 Tage, bevor er an Leberversagen starb (Starzl *et al.*, 1993). Seitdem wurden in zahlreichen Experimenten animale Zellen (neurales Gewebe bei Morbus Parkinson Patienten (Jakoby *et al.*, 1997), verkapselte Inselzellen bei Diabetikern (Anderson *et al.*, 1992), und Haut bei Brandverletzten (Still *et al.*, 1998)) auf Menschen übertragen. Kurzzeitige extrakorporale Versorgungen von Patienten mit akutem Organversagen, sogenanntes "Bridging", wurde ebenfalls häufiger beschrieben (Breimer *et al.*, 1996, Rydberg *et al.*, 1996, Makowa *et al.*, 1995).

1.5.2 Immunologische Barrieren

Bei allen Transplantationen besteht das Problem der Abstoßung des Fremdgewebes (allogen oder xenogen) durch den Empfänger. Mit Ausnahme von eineiigen Zwillingen unterscheiden sich die Individuen in ihren MHC-Typen bzw. ihren Nebenhistokompatibilitätsantigenen. Handelt es sich bei dem Transplantat um ein mit Blutgefäßen durchzogenes Organ (vaskularisiert), so erfolgt eine sehr rasche Abstoßung (hyperacute rejection, HAR), die auf einer Reaktion von Antikörpern gegen das fremde Gefäßendothel beruht. Infolge dieser Reaktion wird die Komplement- bzw. Gerinnungskaskade aktiviert, die den Gefäßverschluß nach sich zieht und zum Absterben des vaskularisierten Transplantats führt. Dieses Problem

ist bei xenogenen Transplantationen besonders stark ausgeprägt, da komplement-regulatorische Proteine artspezifisch sind (Kissmeyer-Nielsen *et al.*, 1966; Williams *et al.*, 1968). Der hyperakuten Abstoßung folgt eine verzögerte Abstoßung des Xenotransplantats, die als delayed xenograft rejection (DXR) bezeichnet wird, an die schließlich eine T-Zell vermittelte chronische Abstoßung des Transplantates anschließt (Sayegh und Turka, 1998).

1.5.3 Überwindung immunologischer Barrieren

Bei Allotransplantationen werden Organspender und Empfänger so ausgewählt, daß eine größtmögliche Übereinstimmung in den HLA-Typen besteht. Nichtsdestotrotz ist eine immunologische Reaktion auf das fremde Gewebe zu verzeichnen, die unterdrückt werden muß, damit Transplantat und Empfänger überleben. Ursprünglich wurde die notwendige Immunsuppression durch cytotoxische Substanzen herbeigeführt, die aber schwerwiegende Nebenwirkungen mit sich brachten. Der Einsatz von Immunsuppressiva wie z. B. Cyclosporin A, FK506 oder Rapamycin ermöglichte erst die routinemäßige Durchführung von Allotransplantationen. Cyclosporin A und FK506 unterdrücken die IL-2 Synthese und dadurch die klonale Expansion von T-Zellen (Bierer *et al.*, 1993). Rapamycin ist ein Inhibitor von Proteinkinasen und blockiert dadurch eine IL-2 induzierte Signalkaskade über den IL-2 Rezeptor (Chang *et al.*, 1992; Flanagan *et al.*, 1993). Obwohl die Toxizität dieser Immunsuppressiva als vergleichsweise gering anzusehen ist, bleibt die generalisierte Immunsuppression und das damit verbundene Risiko opportunistischer Infektionen sowie das Risiko von Krebs bestehen. Hinzukommen nierentoxische (Cyclosporin A) und diabetogene (FK 506) Nebenwirkungen (Sayegh und Turka, 1998).

Mit Hilfe der Gentechnik wird ein alternativer Weg beschritten um Schweineorgane für die XTx zu gewinnen. Durch Erzeugung transgener Schweine, die humane Regulatoren der Komplementaktivierung auf ihrer Zelloberfläche tragen, sollen deren Organe "humanisiert" werden. Der decay accelerating factor (DAF, CD55), das membrane-Cofaktor-protein (MCP, CD46) sowie der Inhibitor des membrane-attack complex (MAC-Inhibitor, CD59) wurden für diesen Ansatz ausgewählt. Mittlerweile konnte gezeigt werden, daß Organe von transgenen Schweinen (DAF, MCP oder DAF+MAC) im Schwein-Affen-Modell bis zu acht Tagen ohne erkennliche Anzeichen einer HAR überlebten (Platt und White, in Rogers *et al.*, 1998).

Eine bei diesen Versuchen verzeichnete DXR unterscheidet sich mechanistisch von der Allotransplantatabstoßung (Blakely *et al.*, 1994). In weiteren Studien wurde gezeigt, daß eine

zusätzlich durchgeführte Immunsuppression des Rezipienten ein Überleben für drei Monate ermöglicht (Bhatti *et al.*, 1999).

Die Galactosyl- α (1-3)-Galactosyl- β (1-4)-Glucosamid-Zuckerketten auf der Zelloberfläche von Schweinezellen stellen die Epitope für xenoreaktive natürliche Antikörper (XNA) dar (Bracy *et al.*, 1998). In Ermangelung von geeigneten Stammzellen ist ein genetischer knock-out des Epitop-synthetisierenden Enzymes Glucosyltransferase-Uridin-5'-Diphosphat-Galactosyl-1,4-N-Acetyl-D-Glucosamid- α (1-3)-Galactosyltransferase (E.C. 2.4.1.151) z. Z. für Schweine nicht durchführbar, so daß alternative Techniken herangezogen werden (Vanhove *et al.*, 1998b). Mit Hilfe von single-chain Antikörpern gegen das Enzym sollen "funktionelle knock-outs" erzeugt werden, die eine Reduktion des Epitopes auf der Zelloberfläche zur Folge hätten. (Vanhove *et al.*, 1998a). Ein alternativer Weg besteht in der Induktion von B-Zell-Immuntoleranz durch Knochenmarks-Chimärismus. So konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, daß die Produktion von XNAs in genetisch modifizierten autologen Knochenmarkszellen eingestellt wird (Bracy *et al.*, 1998).

Sofern das Xenotransplantat die HAR und die DXR überdauern sollte, wird die T-Zell-vermittelte Immunantwort entscheidend dafür sein, ob das Organ längerfristig angenommen oder abgestoßen wird. Die molekularen Grundlagen dieser sogenannten chronischen Abstoßung sind zwar nicht gänzlich verstanden, jedoch von der Anwesenheit CD4⁺ T-Zellen abhängig (Krieger *et al.*, 1996). Klinisch manifestiert sich die chronische Abstoßung in einer graduell zunehmenden Dysfunktion des Transplantats, was letztendlich zum Organversagen führt (Paul und Tilney, 1996). Unterschiedliche Strategien, die dem Empfänger eine notwendige systemische immunsuppressive Therapie ersparen würden, befassen sich mit der Erzeugung einer T-Zell Toleranz durch Blockierung von Kostimulatoren (Lin *et al.*, 1993; Pearson *et al.*, 1997; Perez *et al.*, 1997).

1.5.4 Transplantat-induzierte Zoonosen

Für den Fall, daß die immunologischen Barrieren, die z. Z. eine XTx verhindern, überwunden sind, bestehen weitere Risiken, die bedacht werden müssen. Die Übertragung solider xenogener Organe oder Zellen stellt eine neue Form der Überschreitung von Speziesbarrieren dar. Natürliche Infektionsbarrieren wie Haut, Schleimhäute oder das saure Milieu des Magens werden umgangen. Die Wirtsspezifität einiger Pathogene, die auf diesen Barrieren beruht, könnte verloren gehen. Es sind zahlreiche Parasiten und Krankheitserreger des Schweines

bekannt, von denen einige Verwandte besitzen, die ebenfalls den Menschen infizieren könnten (*Mycobacterium ssp.*, *Toxoplasma gondii*, *Leptospira interrogans*, siehe auch Tönjes, 1999). Die Übertragung unbekannter, bisher nur bei Tieren vorkommende Pathogene, die im natürlichen Wirt symptomlos und daher unentdeckt bleiben, gehört zu den schwer kalkulierbaren infektiologischen Aspekten der XTx (Bachmann *et al.*, 1999).

Gerade der Kontakt von unterschiedlichen Spezies birgt die Gefahr, daß sich neuartige pathogene Keime bilden. So haben die regelmäßig auftretenden Grippeepidemien ihren Ursprung im engen Kontakt von Mensch, Schwein und Geflügel. Die Haltung der Spendertiere erfolgt aus diesen Gründen unter speziellen pathogen-freien (SPF) Bedingungen und wird durch Impfungen und Antibiotika-Behandlungen unterstützt. Weltweit existieren derzeit mehrere Herden solcher z. T. transgener SPF-Tiere (Persidis, 1999).

1.6 Porcine endogene Retroviren (PERV) und Xenotransplantation

Eine Gefahrenquelle, die auf diesem Weg nicht zu beseitigen ist, stellen endogene Retroviren des Schweines dar. Erstmals beschrieben wurden retrovirale Partikel Anfang der 70iger Jahre in porcinen Zelllinien (Breese, 1970; Armstrong *et al.*, 1971). Im Zusammenhang mit der XTx und deren Risikoabschätzung wurde das Potential dieser Retroviren eingehender untersucht. 1997 konnte erstmals gezeigt werden, daß PERV in der Lage sind menschliche Zellen *in vitro* zu infizieren (Patience *et al.*, 1997, Übersicht in Tönjes, 1997). Die beiden Schweinenierenzelllinien PK15 und MPK produzieren spontan retrovirale Partikel des C-Typs. Zellfreie PK15 Kulturüberstände erwiesen sich als infektiös für Schweine-, Nerz- und menschliche Zelllinien (xenotrop). Mit Überständen der Zelllinie MPK konnte nur die porcine Zelllinie ST-IOWA infiziert werden (ecotrop). Um zu überprüfen, ob weitere menschliche Zellen nach Kontakt mit porcinen Zellen infizierbar sind, führten die Autoren Kokultivierungsstudien durch. Hierbei erwiesen sich zusätzlich zu der embryonalen Nierenzelllinie (293) eine fetale Fibroblastenzelllinie (MRC-5), eine Rhabdomyosarcomazelllinie (RD), eine B-Zelllinie (Raji) sowie zwei T-Zelllinien (SupT1, Molt4) als suszeptibel für PERV. Obwohl die Titer, die auf der menschlichen Zelllinie (293) erzielt wurden, mit weniger als 500 infektiösen Einheiten/ml relativ gering waren, ließen sich die Zellen seriell mit zellfreien Kulturüberständen infizieren (Patience *et al.*, 1997).

Diese Befunde hatten zur Folge, daß die Risiko-Nutzen-Abwägung der XTx kontrovers diskutiert wurde. Befürchtungen einiger Virologen, daß das Einbringen eines Schweineorgans in einen immunsupprimierten Rezipienten einer Injektion mit C-Typ Retroviren gleichkäme,

erscheinen begründet (Stoye und Coffin, 1995). Es ist momentan allerdings nicht abzusehen, ob die porcinen Retroviren *in vivo* nach erfolgter XTx in ausreichender Menge gebildet werden und den Empfänger infizieren können. Normalerweise würden Retroviren porcinen Ursprungs aufgrund der α -1,3-Galactosyl-Epitope von humanem Serum lysiert werden. Entstammen die Partikel aber aus Geweben genetisch modifizierter Schweine, entgehen sie der humoralen Immunantwort (Rother *et al.*, 1995, Takeuchi *et al.*, 1996). Als Folge einer solchen Infektion könnten neue Krankheiten entstehen. Die Tatsache, daß PERV in Schweinen bisher nicht mit einer Erkrankung assoziiert werden konnten, läßt keine Rückschlüsse auf eine Pathogenität im Menschen zu. Die AIDS-Erreger HIV-1 und HIV-2 stammen ebenfalls aus Trans-Spezies-Übertragungen aus Affenarten, bei denen sie kein Krankheitsbild hervorrufen (Gao *et al.*, 1992, Gao *et al.*, 1999). Für den Fall, daß PERV per se nicht pathogen für den Menschen sind, besteht theoretisch die Möglichkeit zur Rekombination mit anderen exogenen oder endogenen Retroviren im Menschen, wodurch neuartige Krankheitserreger entstehen könnten.

Die *in vitro* Daten deuten zwar auf eine geringe Replikationsfähigkeit sowie eine eingeschränkte Infektiosität der porcinen Retroviren hin, fraglich ist jedoch, ob diese im immunsupprimierten Transplantatempfänger nicht hinreichend ist für eine dauerhafte Persistenz. Ein weiteres Problem besteht darin, daß Retroviren, die transgenen Schweinen entstammen, durch die molekularen "Tarnkappen" auf ihrer Virushülle (CD46, CD55, CD59), sich einem Zugriff durch das menschliche Komplementsystem entziehen würden (Tönjes, 1997). Über das pathogene Potential von solchen "humanisierten" PERV läßt sich nur spekulieren. Als gesichert gilt aber, daß alle tierischen Retroviren das Potential besitzen immunsuppressiv zu wirken und dadurch Erkrankungen auslösen können (Denner, 1998).

Die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) rief daher eine Kommission ins Leben, die sich mit den Risiken der XTx befassen sollte. Die britische Regierung handelte 1997 entsprechend und gründete die UK Xenotransplantation Interim Regulatory Authority (UKXIRA) (Weiss, 1999). Im folgenden forderten namhafte Wissenschaftler ein Moratorium für alle XTx, einschließlich temporärer Überbrückungen bei Organversagen. Die Autoren sahen die ethische Notwendigkeit darüber zu diskutieren, ob der Nutzen, den die XTx dem Einzelnen bringen kann, eine mögliche Gefährdung der Allgemeinheit rechtfertigt (Bach *et al.*, 1998; Bach und Fineberg, 1998).

Bisher wurden keine porcinen Organe in Menschen transplantiert, jedoch sind einige Patienten mit akutem Organversagen temporär extrakorporal an Schweinenieren bzw. Lebern angeschlossen worden (Breimer *et al.*, 1996; Rydberg *et al.*, 1996; Chari *et al.*, 1994;

Makowa *et al.*, 1995). Desweiteren haben Übertragungen von neuronalen Zellen bei Parkinsonpatienten (Deacon *et al.*, 1997), pankreatische Inselzellen bei Diabetikern (Groth *et al.*, 1994) und Haut bei Brandverletzten (Still *et al.*, 1998) stattgefunden. Diese Patienten wurden im nachhinein auf eine PERV-Infektion mit serologischen und PCR-basierenden Methoden hin untersucht. Es konnten weder PERV-Nukleinsäuren detektiert noch eine serologische Reaktivität von Patientenserum gegen PERV-Partikel verzeichnet werden (Heneine *et al.*, 1998; Patience *et al.*, 1998, Übersicht bei Persidis *et al.*, 1999). Diese beruhigenden Befunde dürfen jedoch nicht überbewertet werden, da nur sehr wenige Zellen über einen begrenzten Zeitraum im Empfänger nachweisbar waren. Das generelle Risiko eines Rezipienten bei einer XT_x mit PERV infiziert zu werden, hängt von unterschiedlichen Faktoren wie der Quelle des Donortieres, der Transplantationstechnik und der individuellen Empfängercharakteristik ab (Heneine *et al.*, 1998).

Die Hoffnungen einiger Transplantationschirurgen, daß in Zukunft Schweine, gentechnisch oder durch Züchtungserfolge, frei von endogenen Retroviren hervorgebracht werden könnten, sind kaum berechtigt. Die fehlenden knock-out Technologien sowie die geschätzten 15-30 proviralen PERV-Kopien pro haploidem Genom (Patience *et al.*, 1997) sprechen gegen eine schnelle Verfügbarkeit solcher Schweine. Ein weiteres Problem besteht in dem Fehlen eines geeigneten Modells für die Risikoabschätzung. Das Schwein-zum-Affen-Modell, in dem erfolgversprechende Fortschritte bei der Überwindung immunologischer Barrieren erzielt wurden, eignet sich möglicherweise nicht für Untersuchungen hinsichtlich eines PERV-Infektionsrisikos. Eine Studie zur Wirtsspezifität ergab, daß Affenzelllinien selbst in einem artifiziellen *in vitro* System unter Verwendung pseudotypisierter MLV-Vektoren nicht mit PERV infizierbar sind (Takeuchi *et al.*, 1998). Neuere Befunde deuten jedoch darauf hin, daß zumindest Zellen bestimmter Affenarten wie z.B. Paviane suszeptibel sind (Blusch *et al.*, 2000).

1.6.1 Biologie von porcinen endogenen Retroviren (PERV)

Es konnte gezeigt werden, daß die Expression porciner Retroviren nicht nur in Zelllinien zu verzeichnen, sondern auch in normalen Geweben des Schweines (Leber, Milz, Niere, Thymus, Lymphknoten, Lunge) nachweisbar ist (Patience *et al.*, 1997, Akiyoshi *et al.*, 1998).

Aus einer Lymphozyten cDNA Bibliothek eines Miniaturschweins wurde das erste annähernd komplette Provirus kloniert (PERV-MSL, Akiyoshi *et al.*, 1998).

Der Nachweis, daß auch in primären peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMC) PERV exprimiert werden, ist im Hinblick auf die Übertragung vaskularisierter Organe von immenser Bedeutung (Wilson *et al.*, 1998). Ausgehend von dem Wissen, daß eine graft-versus-host bedingte Immunreaktion zu einer Aktivierung muriner endogener Retroviren führen kann (Hirsch *et al.*, 1972, Levy *et al.*, 1977, Sherr *et al.*, 1977), wurden Untersuchungen durchgeführt, die klären sollten, ob ein vergleichbarer Stimulus zu einer Aktivierung von porcinen endogenen Retroviren führen kann. Es zeigte sich, daß mitogen stimulierte PBMCs von Miniatur- und Yucatan-Schweinen C-Typ Retroviren freisetzen, die *in vitro* Infektiosität sowohl für porcine als auch für humane Zelllinien besaßen (Wilson *et al.*, 1998).

Mittlerweile sind drei Klassen von porcinen C-Typ Retroviren bekannt. Neben dem cDNA Klon PERV-MSL (PERV-C) wurden zwei weitere *env* cDNAs aus der Nierenzelllinie PK15 isoliert, die als PERV-A und PERV-B bezeichnet wurden (Le Tissier *et al.*, 1997). Die Hüllproteine der drei Klassen unterscheiden sich insbesondere in den Bereichen, die als variable Regionen A und B bezeichnet werden, und für die Rezeptorerkennung verantwortlich sind (Battini *et al.*, 1992, Battini *et al.*, 1995). Die Vermutung, daß die Unterschiede in den Hüllproteinen unterschiedliche Wirtsspezifitäten der drei Klassen bedingen, konnte in einer "host range" und Interferenz-Studie belegt werden (Takeuchi *et al.*, 1998). PERV-A und PERV-B erwiesen sich hierbei als polytrop, d. h. mit einem breiten Wirtsbereich ausgestattet. PERV-MSL hingegen infiziert vornehmlich porcine Zelllinien und kann daher als weitestgehend ecotrop angesehen werden.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das Spektrum der vorliegenden Arbeit umfaßte zwei Schwerpunkte. Im Rahmen eines Projektes sollten HERV-K Proviren identifiziert werden, die für die in Teratokarzinoma-Zellen elektronenmikroskopisch nachweisbaren HTDV-Partikel kodieren können. Durch ein umfassendes Screening des humanen Genoms sollte die Frage geklärt werden, ob einer der geschätzten 25-50 HERV-K Integrationsorte allein für die Partikelproduktion verantwortlich ist oder ob sich mehrere Proviren komplementieren. Sofern ein singuläres Provirus für diese biologische Aktivität kodieren kann, sollte es dem HERV-K Prototyp entsprechen. Dementsprechend zielte das Screening auf die Klonierung und Charakterisierung eines HERV-K Typ 2 Genoms ab, welches prinzipiell kodierende Kapazität für alle retroviralen Proteine besitzt.

Die Intention des zweiten Projektes war die Klonierung und Charakterisierung von porcinen endogenen Retroviren, die *in vitro* für humane Zellen infektiös sind. Anhand von isolierten Moleklarklonen sollte das Replikationsverhalten dieser humanotropen PERV studiert werden. Desweiteren wurde die Etablierung von Nachweisverfahren für PERV in Form von PCR-Diagnostik und immunologischer Detektion, abgeleitet von den erhaltenen Sequenzinformationen, angestrebt. Solche Verfahren könnten bei XT_x sowohl bei der Auswahl der Spendertiere als auch postoperativ beim Monitoring der Transplantatempfänger diagnostische Anwendung finden.

2. Material und Methoden

2.1 Organismen

2.1.1 Bakterienstämme

TOP10F' : (One Shot™Invitrogen)	F{ <i>lacI</i> ^q <i>Tn10</i> (Tet ^R)} <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> <i>endA1</i> <i>nupG</i> .
TOP10 : (Invitrogen)	F- { <i>lacI</i> ^q <i>Tn10</i> (Tet ^R)} <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> <i>endA1</i> <i>nupG</i> .
DH5α : (Life Technologies)	F- Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>hsdR17</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>supE44</i> λ- <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>
DH10B : (Life Technologies)	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>X74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>araD139</i> <i>galU</i> <i>galK</i> <i>nupG</i> <i>rpsL</i> λ-
XL1-Blue MRA : (Stratagene)	Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1</i> <i>sup</i> E44 <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac</i>
XL1-Blue MRA (P2) : (Stratagene)	Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1</i> <i>sup</i> E44 <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> (P2 lysogen)
NS3529 : (Genome Systems)	[<i>recA</i> -, <i>mcrA</i> -, Δ(<i>hsdR, hsdM, mcrB, mrr</i>) (λ <i>imm</i> λLPI) (λ <i>imm434-P1:Cre</i> ⁺)]

2.1.2 Eukaryotische Zelllinien

PK15 :	ATCC Nr.: CCL-33, normale epitheliale Nierenzelllinie eines adulten Schweines (<i>Sus scrofa</i>)
293 :	ATCC Nr.: CRL-1573, Adenovirus-5 transformierte epitheliale Nierenzelllinie eines menschlichen Embryos (<i>Homo sapiens</i>)
293 PERV-PK :	Adenovirus-5 transformierte epitheliale Nierenzelllinie eines menschlichen Embryos (<i>Homo sapiens</i>) mit PERV-haltigen PK15-Überstand infiziert (Patience <i>et al.</i> , 1997)
D17 :	ATCC Nr.: CRL-6248, Osteosarcoma-Zelllinie eines adulten Hundes (<i>Canis familiaris</i>)
COS-7 :	ATCC Nr.: CRL-1651, SV40-transformierte fibroblastäre Nierenzelllinie der afrikanischen grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>)

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Zelllinie COS-7 wurde in CMRL-Medium kultiviert und einmal wöchentlich trypsiniert, im Verhältnis 1:10 verdünnt und neu ausplattiert. Die humane embryonale Nierenzelllinie 293 und die daraus abgeleitete Zelllinie 293 PERV-PK sowie die porcine Nierenzelllinie PK15 wurden freundlicherweise von Dr. Clive Patience zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte in DMEM, das mit 10% fetalem Kälberserum, 1,25% L-Glutamin, nicht-essentiellen Aminosäuren (1x) und 0,4% NSP (je 10.000 Einheiten/ml Neomycin, Streptomycin und Penicillin) supplementiert war. Je nach Bedarf wurden die Kulturen 1-2 mal wöchentlich durch Trypsinierung abgelöst und nach Verdünnung neu ausplattiert. Die Verdünnungsverhältnisse variierten in Abhängigkeit von der jeweiligen Zelllinie (PK15 1:8, 293 PERV-PK 1:4, 293 und daraus abgeleitete Klone 1:10 bis 1:20). Die Kultivierung erfolgte in einem Zellinkubator (Cytoperm, Heraeus) bei 37°C und 5% CO₂.

2.2.2 Transfektion von Säugerzellen mittels Lipofektion

Zur Transfektion der Säugerzelllinien COS-7, D17 und 293 wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamin (Life Technologies) verwendet. Es vermittelt durch die Ausbildung stabiler kationischer DNA-Liposomen-Komplexe den Gentransfer in eukaryotische Zellen.

In Sechsllochplatten (Greiner) wurden ca. 2×10^5 Zellen ausgesät und bis zur Semikonfluenz kultiviert. 1-2 µg der zu transfizierenden Plasmid DNA wurden in 100 µl serumfreiem Medium (Optimen 1, Life Technologies) verdünnt und mit 2-25 µl Lipofectamin, ebenfalls in 100 µl Optimen 1 verdünnt, gemischt. Während der Komplexierung (15-45 min, RT) wurden die Zellen mit PBS und anschließend mit serumfreiem Medium gewaschen. Der DNA-Liposomen-Komplex wurde mit 800 µl Optimen 1 verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach 2-24 h wurde das Transfektionsreagenz durch serumhaltiges Medium ersetzt. Nach zwei Tagen wurden die Zellen entweder für immunhistochemische Nachweisverfahren fixiert oder zur Erzeugung von Klonen expandiert.

Um eine effiziente Transfektion zu dokumentieren wurde das Plasmid pCMV-βGal, welches unter Kontrolle des CMV Promoters das Gen für die β-Galaktosidase trägt, als Positivkontrolle in den Transfektionsexperimenten mitgeführt. Die Zellen wurden mittels 2%iger Formaldehydlösung fixiert, mit PBS ohne Calcium und Magnesium gewaschen und

mit X-Gal-Färbelösung (1 mg/ml X-Gal; 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$; 5 mM $K_4[Fe(CN)_6]$; 2 mM $MgCl_2$; in PBS ohne Calcium und Magnesium) überschichtet. Die β -Galaktosidaseaktivität in transfizierten Zellen lässt sich lichtmikroskopisch durch die Freisetzung des blauen 5-Brom-4-chlor-indigo aus dem farblosen Substrat X-Gal beobachten.

2.3 Molekularbiologische Materialien und Methoden

2.3.1 Kulturbedingungen

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

2.3.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB-Medium (10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; autoklaviert) bei 37°C. Flüssigkulturen wurden bei 220 rpm geschüttelt. Zur Selektion auf plasmid-haltige Zellen wurden die Antibiotika Ampicillin (50 $\mu g/\mu l$) bzw. Kanamycin (50 $\mu g/\mu l$) zugegeben.

2.4 Isolierung von Nukleinsäuren

2.4.1 DNA

2.4.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus Säugerzellen

Hochmolekulare genomische DNA zur Generierung von Genbanken und zur Southernblot-Analyse wurde mittels Tris-äquilibriertem Phenol aus Zelllysaten in Anlehnung an ein Protokoll von Blin und Stafford (1976) isoliert. Hierzu wurde wässriges Phenol aufgetaut und mit 0,1% Hydroxyquinolin versetzt. Nach Zugabe eines Volumens Tris/HCl pH 8,0 wurde die Phasendurchmischung durch 15-minütiges Schütteln gewährleistet. Die wässrige Phase wurde verworfen und der Vorgang wiederholt bis die phenolische Phase einen pH-Wert von > 7,8 aufwies.

2.4.1.2 Isolierung von extrachromosomaler DNA aus Bakterien

2.4.1.2.1 Minipräparation durch alkalische Lyse (nach Birnboim und Doly, 1979)

Bakterien aus einer 1,5 ml Übernachtskultur wurden pelletiert (16000*g, 30 s, RT) und in 100 µl GTE-Puffer (50 mM Glucose; 25 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA) resuspendiert. Die Zugabe von 200 µl Lysispuffer (0,2 NaOH; 1% SDS) führte zum Zellaufschluß und zur Denaturierung der DNA. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurde die DNA durch Zugabe von 150 µl Neutralisationspuffer (3M Natriumacetat) renaturiert. Nach erneuter Inkubation auf Eis (5 min) wurden Zelltrümmer und chromosomale DNA durch Zentrifugation abgetrennt (16000*g, 10 min, RT). Die im Überstand befindliche Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Äthanol präzipitiert und pelletiert (16000*g, 10 min, RT), luftgetrocknet und in TE-Puffer mit RNase (0,1 mg/ml) aufgenommen.

2.4.1.2.2 Midi- und Maxipräparation

Plasmidpräparationen im Midi- bzw. Maximaßstab erfolgten mit Qiagen Plasmid-Kits nach den Angaben des Herstellers. Bakterien aus 100 ml bzw. 250 ml Übernachtskulturen wurden durch Zentrifugation geerntet (3700*g, 10 min, RT) und der Zellaufschluß durch die mitgelieferten Lösungen herbeigeführt. Die Plasmidaufreinigung erfolgte über Anionenaustauschersäulen. Die Verwendung des Endofree-Kits gewährleistet weitestgehend die Entfernung von bakteriellen Endotoxinen, die bei Transfektion eukaryotischer Zellen inhibierend wirken.

2.4.1.2.3 Isolierung von Cosmid DNA

Die Isolierung von Cosmid DNA erfolgte im Maximaßstab unter Verwendung der Qiagen Plasmid-Kits, wobei ein Protokoll zur Isolierung von Plasmiden mit geringer Kopienzahl angewandt wurde.

2.4.1.2.4 Isolierung von P1 Plasmid DNA

P1 Plasmide beinhalten 75-105 kb große Insertionen genomischer DNA und einen induzierbaren Replikationsursprung. Zur Isolation der P1 Plasmide wurden 75 ml LB Kanamycin-Kulturen mit 2,5 ml Inokulum einer Übernachtskultur angeimpft und nach 90 min

mit IPTG (Endkonz.: 0,5 mM) induziert. Die Induktion bedingt eine Erhöhung der Phagemid-Kopienzahl von einer auf bis zu 15 pro Zelle. Nach weiteren 5 h wurden die Zellen durch Zentrifugation (3700*g, 10 min, RT) geerntet. Das Pellet wurde in 2 ml GTE-Puffer aufgenommen und die Zellyse durch Zugabe von 60 µl Lysozym (50 mg/ml in TE) eingeleitet. Nach 5-minütiger Inkubation (RT) wird durch Zugabe von 2 ml Lysispuffer (0,2 N NaOH, 1% SDS) der Zellaufschluß herbeigeführt und die DNA denaturiert. Nach Inkubation auf Eis für 5 min wurde die DNA durch Zugabe von 1,5 ml 3M Natriumacetat (pH 4,3) neutralisiert. Im Anschluß an eine weitere Inkubation (5 min auf Eis) werden Zelltrümmer und genomische DNA durch Zentrifugation (16000*g, 20 min, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer 10 ml Polypropylen Pipette abgenommen und durch einen Mullfilter in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Zugabe von DNase-freier RNase A (Boehringer Mannheim) in einer Endkonzentration 50 µg/ml folgt eine 60-minütige Inkubation bei 37°C. Nach zweimaliger Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die Plasmid DNA durch Zugabe eines Volumens Isopropanol gefällt und im Anschluß pelletiert (20000*g; 20 min, 4°C). Das Präzipitat wurde mit 2 ml eiskaltem 70%igem Äthanol gewaschen, vakuumgetrocknet und in 100 µl Wasser aufgenommen. Konzentration und Reinheit der DNA wurden photometrisch bestimmt.

2.4.1.3 Isolation von Bakteriophagen DNA

Die Isolation und Aufreinigung von λ-Phagen DNA erfolgte mittels des Nucleobond® AX 100-Systems von Machery und Nagel. Hierfür wurde das Phageneluat (in 50 ml SM-Puffer; (100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄*7H₂O, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 10% Gelatine (w/v), autoklaviert)) einer großen Platte (~500 cm²) mit 50 µl Chloroform versetzt und von Agaroseresten und Zelltrümmern durch Zentrifugation (4500*g, 10 min, 4°C) befreit. Der Überstand wurde für 10 min mit einer speziellen Extraktionsmatrix, die bakterielle Nukleinsäuren bindet, geschüttelt. Durch Zentrifugation (4500*g; 5 min, RT) wurde die Matrix entfernt und die Phagenpartikel im Überstand durch eine einstündige Inkubation auf Eis mit 15 ml T2-Puffer (25%igem PEG 6000; 2,5 M NaCl) vernetzt. Die Phagen wurden pelletiert (16000*g; 15 min; 4°C), in 1,5 ml T3-Puffer (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 30 mM EDTA, pH 7,7) resuspendiert und mit 1,5 ml T4 (2% SDS) während einer 10-minütigen

Inkubation bei 65°C aufgeschlossen. Die Aufreinigung der Phagen DNA erfolgte über Nucleobond®AX 100-Anionenaustauschersäulen.

2.4.2 RNA

2.4.2.1 Isolierung von zytoplasmatischer RNA aus eukaryotischen Zellen

Der adhärente Zellmonolayer einer großen Zellkulturflasche wurde dreimal mit eiskaltem PBS (ohne Calcium und Magnesium) gewaschen, bevor die Zellen mittels eines Zellschabers in Lösung gebracht und durch Zentrifugation (500*g; 10 min; 4°C) pelletiert wurden. Der Zellaufschluß erfolgte durch Zugabe von Lysispuffer (10 mM Tris (pH 7,6); 1 mM EDTA; 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂; 0,5% NP40) und kurzem Mischen auf einem Vortexer. Die Zellkerne wurden sedimentiert (2000*g; 2 min; 4°C) und ggf. weiter verwendet. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Ansatz nach Zugabe eines Gemisches aus heißem Phenol und 0,5% SDS (65°C) 10 min geschüttelt. Nach Zentrifugation wurde die wässrige Phase einer zweimaligen Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen. Die RNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,3) und 2,5 Volumina Äthanol gefällt (-20°C, ü. N.). Nach dem Pelletieren, Waschen und Trocknen wurde die RNA in DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen. Sofern neben der zytoplasmatischen RNA die nukleäre DNA untersucht werden sollte, wurde das Pellet mit den Zellkernen in 2 ml TE Puffer resuspendiert, mit Proteinase K (100 µg/ml) für 3 h bei 37°C behandelt, Phenol/Chloroform extrahiert und gefällt.

2.4.2.2 Isolierung von Gesamt RNA aus Zellen

Die Zellernte erfolgte wie unter 2.4.2.1 beschrieben. Die Zellyse und RNA-Extraktion erfolgte durch Zugabe eines sauren Guanidinthiocynat-Phenol-Chloroform Gemisches (Trizol-Reagent, Life Technologies) nach Angaben des Herstellers. Das Protokoll basiert weitgehend auf der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987).

2.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Das Prinzip der photometrischen Bestimmung von Reinheit und Konzentration der isolierten DNA und RNA Proben beruht auf den unterschiedlichen Absorptionsmaxima von Nukleinsäuren (260 nm) und Proteinen (280 nm). Der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ reiner

Nukleinsäurelösungen liegt zwischen 1,8 und 2,0. Die Messungen erfolgten im RNA/DNA Calculator (Pharmacia).

2.6 Agarosegelelektrophorese

DNA Fragmente wurden in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurde Agarose (Life Technologies) in 1xTAE Puffer (40 mM Tris/Acetat, 1 M EDTA pH 8,0) aufgekocht und vor dem Gießen mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml, Roth) versetzt. Die Proben wurden mit 1/5 (v/v) Gelbeladepuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 30% Glycerin) versetzt und in die Probentaschen pipettiert. In Abhängigkeit von den Fragmentgrößen erfolgte die Auftrennung bei 5 bis 12 V/cm über einen Zeitraum von 2-20 Stunden in 0,7 bis 2%igen Agarosegelen.

2.6.1 RNA Agarosegelelektrophorese

Der Umgang mit RNA erfordert größte Sorgfalt zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen. Zu diesem Zweck wurden alle Gerätschaften und Puffer autoklaviert oder mit DEPC-behandeltem Wasser gereinigt.

Vor der Auftrennung wurden 20 µg Gesamt-RNA oder 2 µg mRNA durch Glyoxilierung denaturiert (Burnett, 1996). Die Proben wurden mit 5x Gelbeladepuffer (10 mM NaPO₄ [pH 6,8]; 10% Ficoll; 0,4% Bromphenolblau) versetzt.

Die Agarosegelelektrophorese erfolgte in Natriumphosphatgelen (1 % Ultrapure analytical grade Agarose (Biorad), 10 mM Na-Phosphat, pH 6,8). Während der elektrophoretischen Auftrennung wurde der Laufpuffer permanent mit Hilfe einer Pumpe (Merodos) umgewälzt. Nach Beendigung des Laufes wurde die Spur mit dem Längenstandard abgetrennt und dieser separat mittels Ethidiumbromid visualisiert.

2.7 Rückgewinnung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten nach elektrophoretischer Auftrennung aus Agarosegelen kamen Kits unterschiedlicher Hersteller (Jetsorb Gel Extraktion Kit, Genomed; Qiaex, Qiagen; Nucleotrap bzw. Nucleospin, Machery und Nagel) zur Anwendung. Allen gemeinsam ist das Prinzip, daß die Agarosegelmatrix zersetzt und die DNA während der

folgenden Waschschrte an eine Matrix gebunden wurde. Die gereinigte DNA wurde letztendlich in Wasser oder TE eluiert und die Konzentration erforderlichenfalls bestimmt.

2.8 Anlegen einer λ -Phagen Genbibliothek

Für die Generierung einer λ -Phagen Bibliothek wurde hochmolekulare genomische DNA aus Zelllinien partiell mit der Endonuklease *Sau3A* restringiert. Der partielle Verdau wurde so eingestellt, daß die Majorität der Restriktionsfragmente eine Größe von 9-23 kb aufwies, was der Insertkapazität des Lambda FIX/XhoI Partial Fill-In Vector-Systems (Stratgene) 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 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 $10^0, 10^{-1}$ und 10^{-2} Verdünnungen des Überstandes inkubiert. Das Gemisch aus Bakterien und adhärrierten Phagen wurden 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 , pH 7,5, autoklaviert) ausplattiert. Der Titer des Überstandes wurden nach Inkubation bei 37°C ü. N. durch Auszählen der Plaques im Bakterienrasen ermittelt. 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.

2.8.1 Phagenplaque Lifting

Zur Durchmusterung der Phagenbibliothek wurden sechs große Petrischalen (~500 cm²), deren Bakterienrasen nahezu durchlysiert 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 (2.24.1) 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.

2.9 Auffüllreaktion von Überhängen an Restriktionsschnittstellen

Für einige Klonierungen war es erforderlich nicht kompatible Restriktionsschnittstellen zu glatten Enden aufzufüllen, oder wie im Fall der λ -Klonierung, partiell aufzufüllen. Hierzu wurde die große Untereinheit der DNA-Polymerase I (Klenow Enzym, NEB), der die Exonukleaseaktivität fehlt, verwendet. In Gegenwart von 0,2 mM aller oder einzelner dNTPs wurden die Überhänge mit 2 Einheiten des Enzyms für 30 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluß an eine Äthanolpräzipitation konnte die DNA ligiert werden.

2.10 Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierung linearisierter Vektoren verhindert die Rezirkularisierung während der Ligation. Hierzu wurde die restringierte Vektor-DNA für 20 min bei 37°C mit einer alkalischen Phosphatase des Kalbs (0,5 Einheiten, Pharmacia) und im Anschluß nochmals 20 min bei 65°C mit einer bakteriellen alkalischen Phosphatase (1 Einheit, Life Technologies) inkubiert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion und Äthanolpräzipitation stand die Vektor-DNA für Ligationen zur Verfügung.

2.11 Ligation

Zur kovalenten Verknüpfung äquimolarer Mengen von Insert- und Vektor-DNA wurde die T4-DNA-Ligase (Life Technologies) verwendet. In einem 20 µl Reaktionsvolumen werden 10-50 ng Vektor-DNA, 4 µl 5x Puffer, 1 µl Enzym (2 Weiss Einheiten) mit der Insert-DNA bei 15°C für einige Stunden oder bei 4°C ü. N. inkubiert. Für die Transformation kompetenter *E. coli* Stämme (DH5α, DH10B, TOP10F') wurden 4 µl des Ligationsansatzes eingesetzt.

2.12 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur effizienten Aufnahme von Plasmid-DNA müssen Bakterien in einen Zustand der Kompetenz versetzt werden. 100 ml der Bakterienstämme DH5α, DH10B und TOP10F' wurden bis zu einer OD₆₀₀ 0,5-0,6 kultiviert, für 20 min auf Eis inkubiert und pelletiert (3700*g, 10 min, 4°C). Dem Resuspendieren in TFB1 (30 mM KAc; 100 mM RbCl₂; 10 mM CaCl₂; 50 mM MnCl₂; 15% Glycerin (v/v); pH 5,8) folgte eine weitere Inkubation auf Eis für 15 min. Die Bakterien wurden wie oben pelletiert und in 4 ml TFB2 (10 mM MOPS; 75 mM CaCl₂; 10 mM RbCl₂; 15% Glycerin (v/v); pH 6,5) aufgenommen. Nach weiteren 15 min auf Eis wurden 100 µl Aliquots der Bakteriensuspension auf Trockeneis schockgefroren und bei -70°C dauerhaft gelagert.

2.13 Transformation von Bakterien

Aliquots kompetenter Bakterien wurden aufgetaut und mit 1-10 ng Plasmid DNA oder 4 µl Ligationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Einem Hitzeschock (45 s, 42°C) folgte eine einstündige Kultivierung in SOC-Medium (2% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 0,05% NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 20 mM Glucose; pH 7,0) bei 37°C. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf Selektivnährböden in Gegenwart von Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.14 T/A-Klonierung von PCR-Amplifikaten

Bei der Klonierung von PCR-Produkten macht man sich eine Eigenschaft der Taq DNA-Polymerase zu Nutze. Das Enzym erzeugt Template-unabhängig einen Desoxyadenosin-Überhang an den 3'-Enden der Amplifikate. Vektorsysteme, die einen Desoxythymidin-

Überhang besitzen, erlauben eine direkte Klonierung der PCR-Produkte ohne vorherige Aufreinigung. Bei dem Plasmid pGEM-T-Easy (Promega) erfolgt die kovalente Verknüpfung von Vektor und Amplifikat durch Ligation, beim pCRII-TOPO Klonierungssystem (Invitrogen) ist der T-Vektor an eine Topoisomerase gekoppelt, die die Verknüpfung während einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur katalysiert. In beiden Fällen schließt sich eine Transformation an (2.13). Bei Verwendung des pCRII-TOPO Systems erfolgte die Transformation von TOP10F' One shot™ cells (Invitrogen).

2.15 Inverse PCR

Die inverse PCR wurde genutzt, um ausgehend von einer bekannten Sequenz flankierende Genomabschnitte zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurde 3-5 µg genomische DNA bzw. 1 µg P1 oder Cosmid DNA restringiert. Die Restriktionsfragmente wurden präzipitiert (1/10 Vol 3M Natriumacetat (pH 4,3); 3 Vol Äthanol (96 %); ü.N. -20°C) und anschließend in einem 300 µl Ligationsansatz ü. N. bei 15°C inkubiert. Die große Verdünnung erlaubt bevorzugt die Selbstligation einzelner Restriktionsfragmente. Die Ligationsansätze wurden äthanolpräzipitiert und die DNA in 50 µl Wasser aufgenommen. Zur Amplifikation wurden 2,5 µl der zirkularisierten Templates in 50 µl PCR Ansätzen eingesetzt.

2.16 In vitro Transkription und Translation (Protein Truncation Test)

Das *in vitro* Transkriptions- und Translations-System TNT®T7 (Promega) wurde zur Identifizierung offener Leserahmen angewendet. Der erste Schritt dieses sogenannten Protein Truncation Tests besteht in der Amplifikation der zu untersuchenden Gene. Der "Vorwärts" PCR-Primer besteht aus einer T7 Promotersequenz, die durch einen Spacer (3-6 Nukleotide) von einem eukaryotischen Translationsinitiationssignal (Kozak, 1986) getrennt ist. Der 3'-Anteil besteht aus 17-24 genspezifischen Nukleotiden, die im gleichen Leserahmen wie das Startcodon liegen. Der "Gegen" PCR-Primer beinhaltet das native Stopcodon. Sofern die Konsensussequenz nach Kozak und das rekombinante Initiationscodon nicht als intrinsischer Anteil des "Vorwärts" PCR-Primers gewählt werden, beginnt die Translation an dem jeweiligen ersten AUG eines Leserahmens. Beide Variationen kamen erfolgreich in dieser Arbeit zur Anwendung.

Ein Aliquot der PCR Reaktion wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, um Fragmentgröße und Konzentration abzuschätzen. Der Rest wurde äthanolpräzipitiert, pelletiert und in 10 µl (Nuklease-freiem) Wasser aufgenommen.

20 µl eines Kaninchen-Reticulocytenlysats wurden mit 10–40 ng des PCR-Produktes in Gegenwart von 10 µCi ³⁵S-Methionin bei 30°C für 90 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Einfrieren bei –20°C abgestoppt. Die Analyse der Produkte aus der gekoppelten *in vitro* Transkription/Translation erfolgte durch Auftrennung in SDS-Polyacrylamidgelen und durch anschließende Autoradiographie.

2.17 Proteingelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinlösungen wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet, in dem die Auftrennung der Proteine nach ihren Molekulargewichten erfolgt (Sambrook *et al.* 1989; Laemmli, 1970). Vor dem Auftragen wurden die Proben mit einem Gelbeladepuffer (4x Probenpuffer: 0,25 M Tris/HCl, pH 6,8; 4% SDS; 10 % Mercaptoäthanol; 20% Glycerin; 20 mg/ml Bromphenolblau) versetzt und durch 5-minütiges Erhitzen auf 95°C denaturiert. Nach der Elektrophorese wurden die Gele auf Whatman-3MM-Filterpapier überführt und für zwei Stunden im Vakuumblyotter bei 80°C getrocknet. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Autoradiographie; das Mitführen eines ¹⁴C-markierten Größenstandards (Amersham) ermöglicht eine Abschätzung der Molekulargewichte.

2.18 Indirekte Immunfluoreszenz-Analysen

Eukaryotische Zellen, die mit HERV-K Expressions- bzw. PERV Plasmiden transfiziert worden waren, wurden in Sechsllochplatten auf Deckgläschen kultiviert. Ein bis zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS (ohne Calcium und Magnesium) gewaschen und durch eine 10-minütige Inkubation in 2%iger Formaldehydlösung fixiert. Durch dreimaliges Waschen mit PBS (ohne Calcium und Magnesium) wurde überschüssiges Formaldehyd entfernt. Zur Permeabilisierung der Zellmembranen wurden die fixierten Zellen mit einer 0,5%igen Triton X-100 Lösung in PBS (ohne Calcium und Magnesium) überschichtet. Nach erneutem Waschen folgte eine 30-minütige Inkubation in Blockierungspuffer (2% BSA in PBS (ohne Calcium und Magnesium)), die der Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen diente. Die HERV-K cORF-Expression wurde mit einer 1:250

Verdünnung (in PBS Dulbecco) eines anti-cORF Kaninchenserums (Löwer *et al.*, 1995) nachgewiesen. Ein HERV-K anti-Gag Ziegenserum (Boller *et al.*, 1997) wurde ebenfalls in einer 1:250 Verdünnung (in PBS Dulbecco) eingesetzt. Für den Nachweis von PERV Proteinen wurden kreuzreaktive Kaninchen-Antisera gerichtet gegen das p27 Protein des feline Leukämievirus (FeLV) sowie eines gegen das gesamte Rauscher-Leukämievirus (RLV) eingesetzt. Überschüssiger Erstantikörper wurde durch dreimaliges Waschen in PBS Dulbecco entfernt bevor der Zweitantikörper hinzugegeben wurde (anti-Kaninchen Cy3, 1:1000; anti-Ziege Cy3 1:1000). Die Inkubation des Indocarbocyaninrot-markierten Antikörpers erfolgte für 1 h im Dunkeln. Nach weiterem dreimaligen Waschen mit PBS Dulbecco wurden die Präparate in Mowiol-Lösung (Hoechst) eingedeckt und bei 4°C auf Objektträgern fixiert. Die Dokumentation der detektierten Proteinexpression erfolgte an einem konfokalem Laserscan-Mikroskop (MRC 600, Bio-Rad, angeschlossen an ein Zeiss Axiovert Fluoreszenz-Mikroskop).

2.19 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Die Amplifizierung von DNA Sequenzen erfolgte mittels PCR unter Verwendung einer rekombinanten thermostabilen DNA-abhängigen DNA Polymerase, der AmpliTaq (Perkin Elmer). Die Verwendung der AmpliTaq Gold (Perkin Elmer) machte eine Verlängerung der initialen Denaturierung von 2 auf 10 min nötig, innerhalb der die Polymerase aktiviert wurde. Die 25-35 Wiederholungen von Denaturierung, Primerbindung (Annealing) und Verlängerung (Extension) wiesen hinsichtlich Annealingtemperatur und Extensionszeit mannigfaltige Variationen auf, die auf die unterschiedlichen Qualitäten und Größen der zu amplifizierenden DNA Sequenzen zurückzuführen waren. Eine terminale Extension fand bei 72°C für 7-30 min statt. Folgende Thermocycler kamen zur Anwendung: Mastercycler Gradient, Eppendorf; Genius, Techne; Trio-Block, Biometra.

2.19.1 PCR zur Amplifikation langer DNA Sequenzen

Für die Amplifizierung größerer DNA Fragmente (5-15 kb) wurde das Expand™Long PCR System (Boehringer Mannheim) genutzt. Hierbei wird ein Gemisch zweier DNA Polymerasen eingesetzt, das neben der DNA Polymerase aus *Thermus aquaticus*, die keine Korrekturleseaktivität aufweist, eine Polymerase aus *Pyrococcus woesei* mit 3'-Exonukleaseaktivität beinhaltet. Die Vorteile der Mischung liegen in der erhöhten Prozessivität und der verringerten Fehlerfrequenz (Barnes, 1994, Cheng *et al.*, 1994).

Ein 50 µl Reaktionsansatz beinhaltet 5-100 ng Template DNA; je 300 nM Primer; je 350 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 50 mM Tris/HCl pH 9,2; 16 mM (NH₄)₂SO₄; 1,75 mM MgCl₂; 2,5 Einheiten des Enzymgemisches. Die Reaktionsbedingungen unterschieden sich von der herkömmlichen PCR insofern, daß die Elongation bei 68°C stattfand und ab dem 11. Zyklus mit einem zehnssekündigen Zeitinkrement versehen war. Lange PCR Produkte wurden zur Klonierung in T/A-Vektoren über Agarosegele aufgereinigt.

2.19.2 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Die indirekte Amplifizierung von RNA Molekülen erfolgte mit dem Superscript II Preamplification Kit (Life Technologies) nach den Angaben des Herstellers. Zunächst wurde mittels der reversen Transkriptase des Moloney Maus-Leukämie Virus (Life Technologies), eine zur RNA komplementäre DNA (cDNA) erzeugt. Hierfür wurde entweder ein Oligo(dT)-Primer, komplementär zu polyadenylierten mRNAs oder ein Gemisch aus zufällig hybridisierenden ("random") Hexanukleotiden (Life Technologies) verwendet. Der RNA Anteil aus diesem DNA-RNA Hybrid wurde durch die *E. coli* RNaseH entfernt. Die cDNA wird anschließend in einer PCR mit genspezifischen Primern vervielfältigt.

2.20 Primerextension zur Identifizierung des Transkriptionsstarts

Eine Abwandlung der RT-PCR wurde genutzt um den Transkriptionsstart der porcinen endogenen Retroviren zu ermitteln. Das am 5'-Ende radioaktiv markierte Oligonukleotid PERV-PK-PE wurde als Primer für die Erststrangsynthese mit PERV mRNA als Template eingesetzt (2.23.3). Unmarkiertes PERV-PK-PE wurde in einer Sequenzierungsreaktion (2.21) mit einer klonierten PERV-LTR als Template eingesetzt. Nach der Behandlung mit RNaseH wurden die cDNA und die Sequenzierungsreaktionen nebeneinander auf einem 6%igem TBE- Polyacrylamidgel unter denaturierenden aufgetrennt.

2.21 DNA Sequenzierung nach Sanger und Sequenzanalyse (Sanger *et al.*, 1977)

Die Sequenzierung der PERV-LTR erfolgte nach der Didesoxy-Methode nach Sanger *et al.*, 1977 mit dem T7-Sequencing Kit (Pharmacia) und ^{32}P α -dCTP als Radionukleotid (Amersham). 3 μg Plasmid DNA wurde in 0,4 M NaOH-Lösung alkalisch denaturiert, durch Zugabe von Natriumacetat (pH 4,3; Endkonzentration: 0,5 M) neutralisiert und anschließend äthanolpräzipitiert. Die Auftrennung erfolgte in einem 6%igem TBE-Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen. Die Proben wurden mit einem 4x Gelbeladepuffer (0,1 M Tris, 768 mM Glycin, 0,4% SDS, 10% Mercaptoäthanol) versetzt, thermisch denaturiert (5 min; 95°C) und bei einer Spannung von 2000 V aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel 20 min in einem Methanol-Essigsäure-Gemisch (je 5%) inkubiert, auf 3MM-Papier (Whatman) überführt und für 1 h bei 80°C vakuumgetrocknet. Die Autoradiographie (X-OMAT AR, Kodak) erfolgte bei -70°C über unterschiedlich lange Zeiträume.

Automatische Sequenzierungen wurden von M. Selbert (Paul-Ehrlich-Institut) mit den automatischen DNA-Sequenzern Modellen 373 bzw. 377 (Applied Biosystems, Weiterstadt) oder als Auftragsarbeit durch die Fa. Agowa AG, Berlin, durchgeführt. Die computergestützte Analyse der Sequenzen erfolgte mit den Programmen Sequence-Navigator, AutoAssembler (beide ABI) und DNASIS (Hitachi). Datenbankabgleiche wurden mit dem Programm BLASTN über Internet Verbindungen bei NCBI, Washington, vorgenommen.

2.22 Transfer von Nukleinsäuren

2.22.1 Kapillarblotting nach Southern (Southern, 1975)

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.

2.22.2 Northern Blot

Der Transfer von RNA aus Agarosegelen auf Nylonmembranen erfolgte ebenfalls durch Kapillartransfer, jedoch wurde hier auf eine Denaturierung und anschließende Neutralisation verzichtet. Nach der UV-Fixierung der RNA an die Membran schloß sich eine zweistündige Inkubation bei 80°C an, während der das Glyoxal verdampfte.

2.23 Markierung von DNA Sonden für Hybridisierungen

2.23.1 Markierung von Restriktionsfragmenten

Die radioaktive Markierung von Restriktionsfragmenten erfolgte mit dem Multiprime DNA Labelling System (Amersham) nach Fineberg und Vogelstein (1983). Hierzu wurden 5-50 ng des durch Isolation aus einem Agarosegel aufgereinigten Restriktionsfragmentes 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 wurden im Szintillationszähler durch Čerenkov-Messung quantifiziert.

2.23.2 3'-Endmarkierung von Oligonukleotiden mittels terminaler Transferase

Um strangspezifische Oligonukleotide als Sonden einzusetzen wurden diese mit dem ECLTM3'-Oligolabelling and Detection System (Amersham) endmarkiert. Hierfür wurden 100 pmol Primer mittels der terminalen Transferase nach den Angaben des Hersteller Fluorescein-

markierte dUTPs angehängt. Die Oligonukleotidsonden wurden ohne weitere Aufreinigung für die Hybridisierung eingesetzt.

2.23.3 5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden durch Kinasierung

Die T4 Polynukleotid Kinase *FPLCpure* (Pharmacia) wurde zur 5'-Markierung Oligonukleotiden verwendet. 50 pmol des Oligonukleotids wurden in Gegenwart von 1x One-Phor-All-Puffer (Pharmacia) und 100 μ Ci des Radionukleotids 32 P γ -dATP mit 20 Einheiten der Kinase für 30 min bei 37°C inkubiert.

2.24 Hybridisierung

2.24.1 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 μ g/ml Hefe-tRNA (Life Technologies)) unterzogen. Die doppelsträngigen Sonden wurden durch zehnminütiges 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 Hybridisierungsofen 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 Waschschritte 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.

2.24.2 DNA Oligonukleotid Sonden

Die Prähybridisierung fand hierfür bei 42°C statt. Die einzelsträngigen, 3'-endmarkierten Oligonukleotide (5-10 ng/ml) wurden in frischer Hybridisierungslösung (5x SSC; 0,1 (w/v) Hybridisierungskomponente (Amersham); 0,02% (w/v) SDS; 1:20 verdünnter Liquidblock (Amersham)) auf prähybridisierte Membranen gegeben und für 1-17 h bei 42-50°C im Rollofen hybridisiert. Es folgten zwei 5-minütige Inkubationen in Waschpuffer A (5x SSC;

0,1 % (w/v) SDS). Die Stringenz der Waschschritte wurde sowohl durch die Temperatur (50-62°C) in Abhängigkeit von der Oligonukleotidlänge als auch durch die SSC-Konzentration des Waschpuffers B (0,4x-1x SSC; 0,1% SDS) bestimmt.

Anschließend wurden die Membranen für 1 min in Puffer 1 (0,15 M NaCl; 0,1 M Tris/HCl pH 7,5) inkubiert, bevor sie für 30 min in einer Liquidblockverdünnung (1:20 in Puffer 1) geschwenkt wurden. Einem Waschschritt mit Puffer 1 folgte eine einstündige Inkubation in einer anti-Fluorescein-HRP Konjugat-Verdünnung (1:1000 in Puffer 2 mit 0,5% (w/v) BSA Fraktion V). Ungebundenes Konjugat wurde durch viermaliges Waschen in Puffer 2 (0,4 M NaOH; 0,1 M Tris/HCl pH 7,5) von den Membranen entfernt.

Die Membranen konnten in diesem Zustand in Plastikfolien eingeschweißt bei -20°C gelagert oder direkt der enzymvermittelten Detektion zugeführt werden. Die an den anti-Fluorescein-Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase setzt bei der Spaltung ihres Substrats (1:1 ECL-

Solution 1 und 2, Amersham) Energie in Form von Chemilumineszenz frei, die mit sensitiven Filmen autoradiographisch detektiert werden kann.

2.25 Verwendete Oligonukleotide

2.25.1 HERV-K Primer

HERV-K/5' SD	GCTTGCGCGCTCGGAAGAAGCTAGGGTGA	1081 - 1109
HERV-K/SD-inv	TCACCCTAGCTTCTTCCGAGCGCGCAAGC	1109 - 1081
HERV-K/SD-invnest	CTAGCTTCTTCCGAGCGCGCAAGC	1104 - 1081
HERV-K/5' PBS	CTGGTGCCCAACGTGGAGGCTTTTCTCTAG	970 - 999
HERV-K/5' LTR	GAGGCTGGCGGGATCCTCCATATGCTGAAC	814-843/9318 - 9347
HERV-K/3' LTR	AGAGAAAGAAAGAAGGGGACCCGGGGAACCAGC	9380 - 9348
5'HERV-K10	AGTGGCATGATCTCAACTCACTGCTG	
3'HERV-K10	GAATCTAGGAGGCGGAGGTTGCAGTTG	
5'HERV-K18	TAAGCGGAATCTGAGACTGTGGGG	
3'HERV-K18	AAATATTGTCTCATGAAGGGGTGG	
YB 23.1	CATCTTACTGGTAAAAAGAAC	6272- 6292
YB 23.3	GTTGCCATCCACCAAG	6564 - 6576
23S10/Ins	CGTTTACGGCGTTTACTGCCCTTA	4158-4144 (9 bp Insertion zwischen 4149+4150, <i>kursiv</i>)
5'Fl-51C12/69L1	ATTTAGATTCAGGGGGTTCATGTGTAGTG	-324 - -295
3'Fl-51C12/69L1	GAATTAGGCTTTCGGGACTTGAACATTGGA	+130 - +101
3'Fl-214M19/221L7/359N6 /367M9	ATTATGCAACCTGGGGCTGGTCAG	+47 - +24
INV1	TCTGAAATATGGCCTCGTGG	361-380/8865- 8884
INV2	TATCACATGGGGAGAAACCT	359-340/8863- 8844
INV3	GAAGGGAAAGACCTGACCGT	380-399/8884- 8903
INV4	TTGGACAATACCTGGCTTTC	339-320/8843- 8824
INV5	GTATAGAGGAAAGAAATAAGGGGAC	880-867/9394- 9371
INV6	TCCAAATCTCTCGTCCCACCTTAC	904-927/9408- 9431
T7-HERV-K <i>gag</i> -for	<i>GGATCCTAATACGACTCACTATAGGAACAGACCATAATG GGGCAAACATAAAAGT*</i>	1109-1129
HERV-K <i>gag</i> -rev	AGGCAGTGGGCCATATACCCCTG	3194-3172
T7-HERV-K <i>pol</i> -for	<i>TAATACGACTCACTATAGGAACAGAGGCTGTAAACGCCG TAATC*</i>	4148-4166
HERV-K <i>pol</i> -rev	GACTGCCCCGAATTAAGGGCGG	6797-6776
T7-HERV-K <i>env</i> for	<i>TAATACGACTCACTATAGGAACAGACCACCATGAACCCA TCAGAGATGCA*</i>	6448-6469
HERV-K <i>env</i> rev	AACAGAATCTCAAGGCAGAAGA	8620-8598

- T7 Promoter- und Spacersequenzen sind kursiv dargestellt
- Nukleotidpositionen beziehen sich auf die HERV-K10 "Plus" Sequenz (Ono *et al.*, 1986; Löwer *et al.*, 1995)
- * T7 Promoter- und Spacersequenzen sind kursiv dargestellt

2.25.2 PERV Primer

T7-pol-for	TAATACGACTCACTATAGGGCTACAACCATTAGGAAAAC*	2833 - 2852
AG24	CCCTTCCACCGAGTCTCGAGG	6123 - 6103
envA for	ATCCTACCAGTTATAATCAAT	6640 – 6660#
envA rev	GATTAAAGGCTTCAGTGTGG	7313 – 7332#
envB for	GGATAAATGGTATGAGCTGG	6790 - 6809
envB rev	GCTCATAAACCACAGTACTAT	7342 - 7362
env-R	GAGTAAGGAACCACGCGATGGAG	6291 - 6269
PERV-LTR	TGAAAGGATGAAAATGCAAC	1 - 20
PERV-PBS I	GTTGGCCGGGAAATCCTGCG	716 - 735
PERV-PBS II	GAAATCCTGCGACCACCCCTTAC	725 - 747
PK1	TTGACTTGGGAGTGGGACGGGTAAC	2927 -2949
PK2	GGTAACCCACTCGTTTTCTGGTCA	2944 - 2966
PK3	CATCTTTGACGAAGCCCTACACAG	3673 - 3696
PK5	CTGTGTAGGGCTTCGTCAAAGATG	3696 - 3673
PK6	TTGACTTGGGAGTGGGACGGGTAAC	3739 - 3716
PK7	CCCACCCATCACCCAGGATTTTTT	2884 – 2861
PK8	TTCCTAATGGTTGTAGCAGCACTG	2849 - 2826
PK9	AGGGTTCAAGAACTCCCCGACCAT	3651 – 3657
PK10	AGGCGCTCACTGGGAAGTGGACTT	5444 - 5457
PK12	GGTGGCTTCCCCTTAGTCTCTTTC	5432 - 5409
PK17	GCTAATCTTCCAGAATACCTCCAG	5384 - 5408
PK19	CCCTAATCCGAGCATTACAGCTAG	7607 _ 7584
PK20	TGGTCGGTTATACCGATAGTCATA	7559 - 7536
PK22	AAAGAGAACCCGTATCCCTTACCC	7561 - 7584
PK26	ACGCACAAGACAAGACACACGAA	1134 -1111
PK28	CCACGCAGGGGTAGAGACTGGGG	8781 - 8758
PK29	ATCAGCAGACGTCTAGGAGGATC	895 - 918
PK34	AAAGGATGAAAATGCAACCTAACC	3 - 26
PK-PERV-PE	GCAAACAGCAAGAGGATTTTTATTCCAAGCGCGCTG	623 – 588
U5-for	GTGACGCACAGGCTTTGTTG	489 – 508
U5-rev	GTAAAAGAACAATCCCCCTCGTC	697 – 675

- Nukleotidpositionen beziehen sich auf die Sequenz PERV-B(33) (Acc. Nr.: AJ133816)
- # Nukleotidpositionen beziehen sich auf die Sequenz PERV-A(42) (Acc. Nr.: AJ133817)
- * T7 Promoter- und Spacersequenzen sind kursiv dargestellt

2.25.3 Primer zur Normalisierung der RT-PCR

GAPDH for	CAACGACCCCTTCATTGACCTC	139 – 160*
GAPDH rev	GTGGTGAAGACACCAGTAGACT	351 – 329*

- * Position bezogen auf cDNA Sequenz der murinen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Acc. Nr.: M32599)

2.25.4 Standard Sequenzierprimer

T7 Primer	TAATACGACTCACTATAGGGC
T3 Primer	ATTAACCCTCACTAAAG
SP6	ATTTAGGTGACACTATAAGAAT
M13-Primer-20	GTAAAACGACGGCCAGT
M13-Primer	AACAGCTATGACGATG

2.26 Verwendete DNA Sonden**2.26.1 HERV-K Fragment Sonden**

HERV-K *gag* *EcoRV/PstI*-Fragment (813 bp) pcG3*gag* (Acc. Nr. Y10390; Tönjes *et al.*, 1997a)

2.26.2 PERV Fragment Sonden

PERV <i>pro/pol</i>	<i>EcoRI</i> Fragment (783 bp)	pGEM [®] -T Easy(PK2/PK5) (diese Arbeit)
U5-Sonde	<i>EcoRI</i> Fragment (221 bp)	pGEM [®] -T Easy(U5for/U5 rev) (freundlicherweise von N. Fischer zur Verfügung gestellt)
<i>envA</i>	<i>EcoRI</i> Fragment (710 bp)	pGEM [®] -T Easy(<i>envA</i> for/ <i>envA</i> rev) (freundlicherweise von U. Krach zur Verfügung gestellt)
<i>envB</i>	<i>EcoRI</i> Fragment (571 bp)	pGEM [®] -T Easy(<i>envB</i> for/ <i>envB</i> rev) (freundlicherweise von U. Krach zur Verfügung gestellt)

3. Ergebnisse

3.1 Klonierung und Charakterisierung von humanen endogenen Retroviren des Typs K

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klonierung von biologisch aktiven humanen endogenen Proviren der Familie HERV-K. Das vollständig sequenzierte Provirus HERV-K10 (Ono *et al.*, 1986) kann aufgrund der fehlenden 292 bp in der N-terminalen Region des *env* Gens nicht für das komplexe Spleißmuster, welches man in Teratokarzinomazellen findet (Löwer *et al.*, 1993a, Löwer *et al.*, 1993b), verantwortlich sein. Aufgrund des Spleißmusters kann davon ausgegangen werden, daß nur provirale Genome des Typs 2 in der Lage sind für biologisch aktive Proviren zu kodieren (s. Abb. 1.3). Ein vollständig charakterisiertes HERV-K Typ 2 Genom lag zu Beginn dieser Arbeit nicht vor. In der Literatur wird die HERV-K10 Sequenz, ergänzt durch die 292 bp, als die Prototypsequenz angesehen und als HERV-K10 "Plus" bezeichnet. Im Folgenden beziehen sich alle Angaben zu Nukleotidpositionen von HERV-K auf diese Sequenz.

3.1.1 Klonierung von PCR-amplifizierten proviralen Sequenzen

Zunächst sollte überprüft werden, ob mittels PCR eine Amplifizierung der kodierenden Bereiche proviraler Genome möglich ist. Hierzu wurden unterschiedliche Primerpaarungen ausgewählt (Abb. 3.1), um auf genomischer DNA als Template die proviralen Gene mittels des Expand™ Long Template PCR Systems zu generieren.

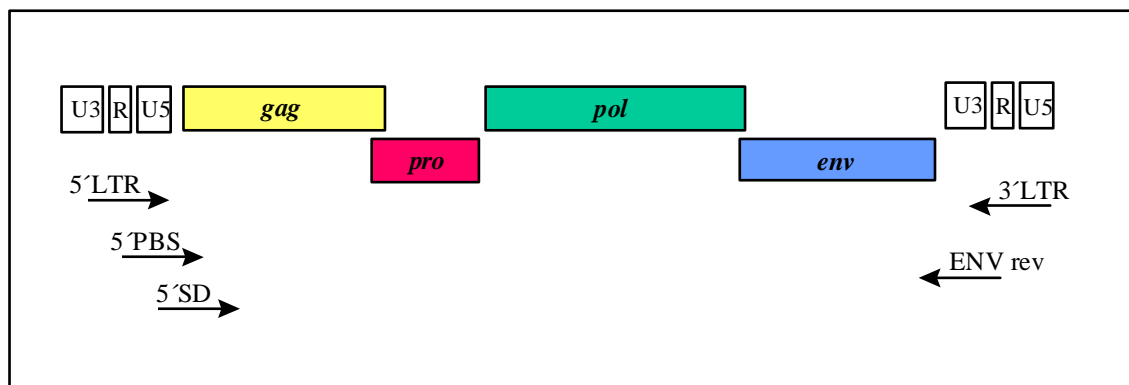


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der PCR-Primerpaarungen, die zur Amplifikation der kodierenden Bereiche von HERV-K genutzt wurden.

Durch Verwendung der Kombination zweier LTR-Primer (HERV-K 5'-LTR, HERV-K 3'-LTR) konnten keine Vollängen-Amplifikate generiert werden, was darauf zurückgeführt werden kann, daß sich die Primer aufgrund der Existenz von etwa 25.000 solitären LTRs im humanen Genom (Leib-Mösch *et al.*, 1993) "verlieren". Andere Kombinationen HERV-K spezifischer Primer führten zu distinkten Amplifikaten (Abb. 3.2). Distinkte PCR-Produkte werden bei der Verwendung eines spezifischen 5'-Primers in Kombination mit dem 3'-LTR-Primer im Verhältnis (1:10) generiert, so daß nachfolgend hauptsächlich die Primerpaarungen 5'SD/3'-LTR und 5'-PBS/3'-LTR (s. Abb. 3.1) zur Anwendung kamen.

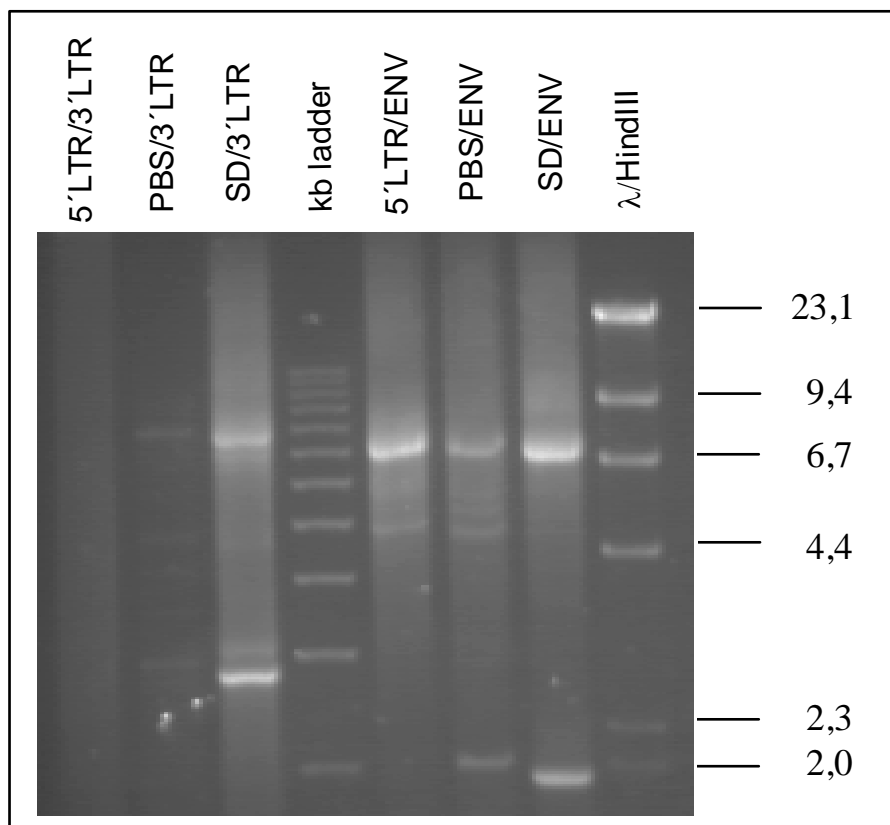


Abb. 3.2: Agarosegelelektrophorese von HERV-K Amplifikaten mittels Long PCR.

Mit dem Expand™ Long Template PCR System wurden unter Verwendung unterschiedlicher Primerkombinationen auf genomischer DNA als Template Vollängenamplifikate generiert.

Durch die Verwendung monochromosomaler Templates aus Mensch/Nager-Zelllinien, mit jeweils einem einzelnen humanen Chromosom je Nagetierzelllinie (NIGMS Human/Rodent Somatic Cell Hybrid Mapping Panel 2, Coriell Institute, NJ, USA; Drwinga *et al.*, 1993; Dubois und Naylor, 1993) kann die Anzahl der proviralen Templates im Vergleich zur Gesamt-DNA deutlich verringert werden. Zudem ermöglicht diese Methode die Zuordnung der Amplifikate zu einem menschlichen Chromosom.

Durch Untersuchungen von Mayer *et al.*, (1997a, 1997b) konnte die Lokalisation intakter HERV-K Typ 2 Genome auf die Chromosomen 7, 19 und Y begrenzt werden. Hierfür haben die Autoren die offenen Leserahmen für *gag* und *env* chromosomenspezifisch amplifiziert und in einem "Protein Truncation Test" auf vorzeitige Terminierungen hin untersucht. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden im Folgenden die Bemühungen zur Klonierung von HERV-K Proviren auf diese Chromosomen beschränkt.

Mit den Primerpaarungen 5'-PBS/3'-LTR sowie 5'-SD/3'-LTR konnte reproduzierbar ein Amplifikat der berechneten Größe auf Chromosom 7 erzeugt werden. Die Verwendung von Chromosom 19 als Template führt zu drei distinkten Signalen, wovon eines der erwarteten Größe von ~ 8,6 kb entsprach, ein weiteres wahrscheinlich von einer trunkierten proviralen Variante (~ 5 kb) und das dritte Amplifikat von einem größerem Template abstammte. Vom Chromosom Y konnten mit den eingesetzten Primerpaarungen keine Vollängen-Amplifikate generiert werden. Die Abb. 3.3 zeigt die Ergebnisse mit der Primerpaarung 5'-PBS/3'-LTR.

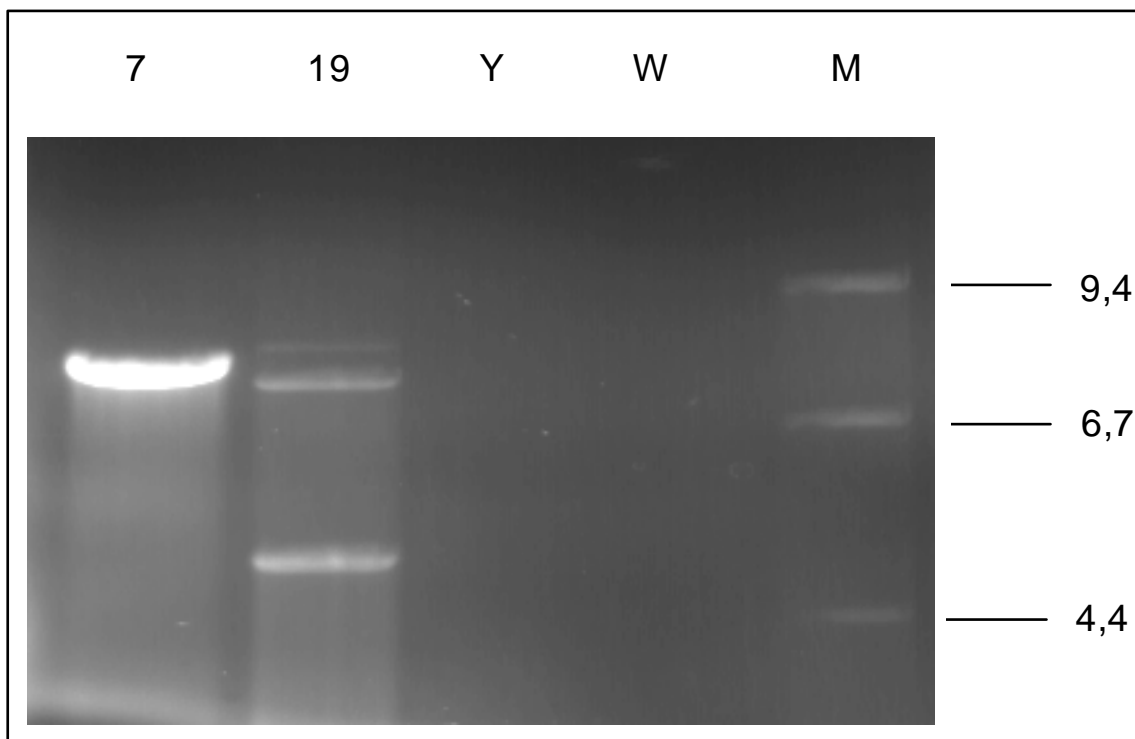


Abb. 3.3: Gelelektrophoretische Auftrennung der 5'-PBS/3'-LTR Long PCR Amplifikate generiert von den Chromosomen 7, 19 und Y.

Als Längenstandard wurde λ /HindIII eingesetzt (M). W = Wasserkontrolle.

Das Amplifikat vom Chromosom 7 konnte nach Aufreinigung durch ein Agarosegel in den T/A-Vektor pGEM[®]-T Easy kloniert werden. Die Sequenzierung des Klons pHERV-K(SD-C7-3'-LTR) ergab, daß offene Leserahmen für *gag*, *pro*, *pol* und *env* existieren. Die Sequenz

wies auf Nukleotidebene zu der Prototypsequenz HERV-K10"Plus" für die einzelnen Leserahmen Homologien von 98.7% (*gag*), 98.2% (*pro*), 98.9% (*pol*) und 98.9% (*env*) auf. Eine Punktmutation im *pol* Gen (A zu G, nt 4462) führt zu einer Veränderung des Sequenzmotivs YIDD zu CIDD. Das Tetrapeptid YXDD ist in allen als funktionell charakterisierten retroviralen Polymerasen zu finden (Xiong und Eickbush, 1988, Poch *et al.*, 1989, Larder *et al.*, 1987). Die Homologie des *env* Leserahmens zu der cDNA Sequenz pcK30*env* (Tönjes *et al.*, 1997a) lag bei 99,9%. Es ist nur ein Nukleotidaustausch (nt 7298) zu verzeichnen.

Die HERV-K Sequenz des Klons pHERV-K(SD-C7-3'-LTR) wurde in der Datenbank unter der Zugangsnummer (Acc. Nr.) Y17834 abgelegt.

Die Klonierung der Chromosom 19 spezifischen PCR Amplifikate von HERV-K Sequenzen in einen T/A-Vektor gelang trotz mehrmaliger Versuche nicht.

3.1.2 Klonierung eines HERV-K Expressionsplasmids

Um zunächst im Ansatz zu überprüfen, ob der Klon pHERV-K(SD-C7-3'-LTR) für ein biologisch aktives Virus bzw. für retrovirale Proteine kodiert, erfolgte eine Subklonierung in das Expressionsplasmid pJW4303 Hyg^r (Lu *et al.*, 1996; Nan, 1998), welches die Expression der viralen Gene nach Transfektion in Säugerzellen getrieben durch den heterologen Promoter CMV intronA gewährleistet (Abb. 3.4).

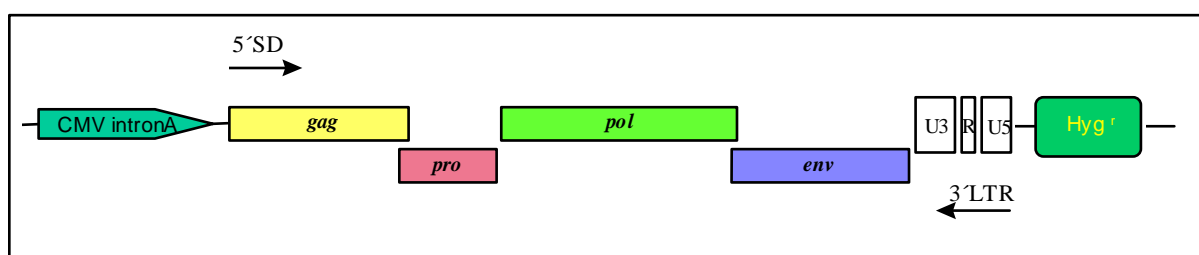


Abb. 3.4: Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pJW4303-(5'-SD-C7-3'-LTR)-Hyg^r.

Der heterologe Promoter erlaubt die Expression von HERV-K-Proteinen in Säugerzellen. Die Hygromycinresistenz kann zur Selektion stabiler Transfektanten genutzt werden. Weitere Erläuterungen im Text.

Hierfür wurde das Insert mit *NotI* aus dem Plasmid pHERV-K(SD-C7-3'-LTR) herausgeschnitten und die Enden vor der Ligation durch die T4-DNA-Polymerase zu glatten Enden aufgefüllt. Zuvor wurde aus dem Vektor pJW4303-Hyg^r durch Restriktion mit den Endonucleasen *HindIII* und *NheI* die TPA-Leadersequenz entfernt. Der konstruierte

Expressionsvektor pJW4303-(5'-SD-C7-3'-LTR)-Hyg^r (s. Abb. 3.4) wurde durch Lipofektion in COS-7 Zellen eingebracht.

Die transiente Expression viraler Proteine wurde mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie detektiert. Mit HERV-K spezifischen Antiseren konnte die Expression des Gag Proteins sowie die des cORF-Proteins nachgewiesen werden (Abb. 3.5). Die Gag Lokalisation ist membranassoziiert. Die cORF Lokalisation ist typischerweise auf die Nukleoli beschränkt.

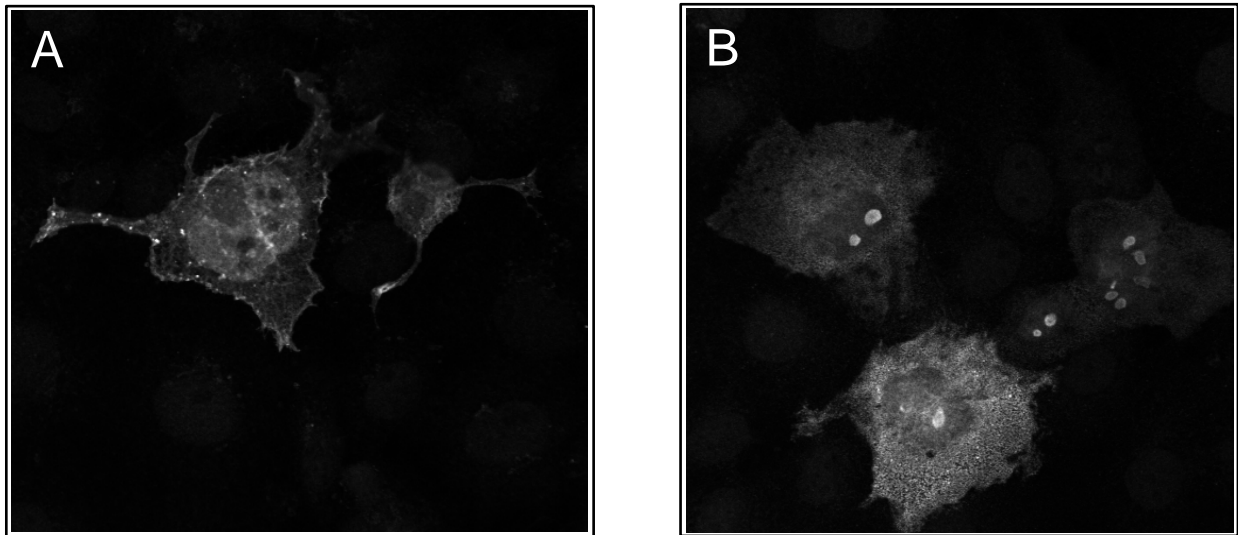


Abb. 3.5: Nachweis der Gag und cORF-Expression durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie.

COS-7 Zellen wurden 48 h p.t. fixiert und mit anti-Gag (Boller, *et al.*, 1997) (A) bzw. mit anti-cORF-Seren (Löwer *et al.*, 1995) (B) inkubiert. Die jeweiligen Zweitantikörper sind mit Cy3-Fluorochrom gekoppelt.

Mit der Charakterisierung des Klons pHERV-K(SD-C7-3'-LTR) konnte erstmals die Existenz eines HERV-K Typ 2 Genoms nachgewiesen werden, welches kolinear offene Leserahmen für alle viralen Proteine enthält. Ob es sich hierbei aber um ein biologisch aktives Provirus handelt ist unklar, da ein hoch konserviertes Aminosäuresequenzmotiv innerhalb des Polymerase ORFs mutiert ist. Bisher ist keine funktionelle reverse Transkriptase beschrieben, die Abweichungen von der Konsensussequenz YXDD besitzt.

3.1.3 Genom-weites Screening nach HERV-K Typ 2 Proviren

Die Klonierung eines kompletten HERV-K Provirus einschließlich beider LTRs via PCR vom Chromosom 7 kann nur erfolgen, wenn Primer komplementär zu den flankierenden DNA-Bereichen eingesetzt werden.

Für die Klonierung und anschließende Charakterisierung solcher HERV-K spezifischen Integrationsorte wurde auf eine humane P1 Genbibliothek (Genome Systems, Inc.) zurückgegriffen.

P1 Bibliotheken weisen gegenüber λ - oder Cosmid- Genbanken mit 75 – 105 kb deutlich größere Insertkapazitäten auf. Hieraus resultiert eine verringerte Wahrscheinlichkeit, durch die Herstellung der Genbank Proviren zu disruptieren. Ein weiterer Vorteil liegt in der reduzierten Anzahl unabhängiger Klone. Als Nachteile stellten sich im Nachhinein die schlechtere Handhabbarkeit der Klone sowie die erschwerte Subklonierung heraus.

Das initiale Screening der humanen P1 Genbank erfolgte mit einer *gag*-spezifischen Sonde. Hierfür wurde das 813 bp großes *EcoRV/PstI*-Fragment des Plasmids pcG3*gag* (Acc. Nr. Y10390; Tönjes *et al.*, 1997b) radioaktiv markiert. Die Genbibliothek beinhaltet insgesamt 144.000 unabhängige P1 Klone, die das menschliche Genom zweimal abdecken. Jeweils acht Klone sind in einem 16-er Array doppelt auf Nylonmembranen gespottet. Die Anordnung der Spots zueinander erlaubt die Identifizierung und Klonadressierung. In Abb. 3.6 ist beispielhaft ein Autoradiogramm eines von insgesamt acht Filtern dargestellt.

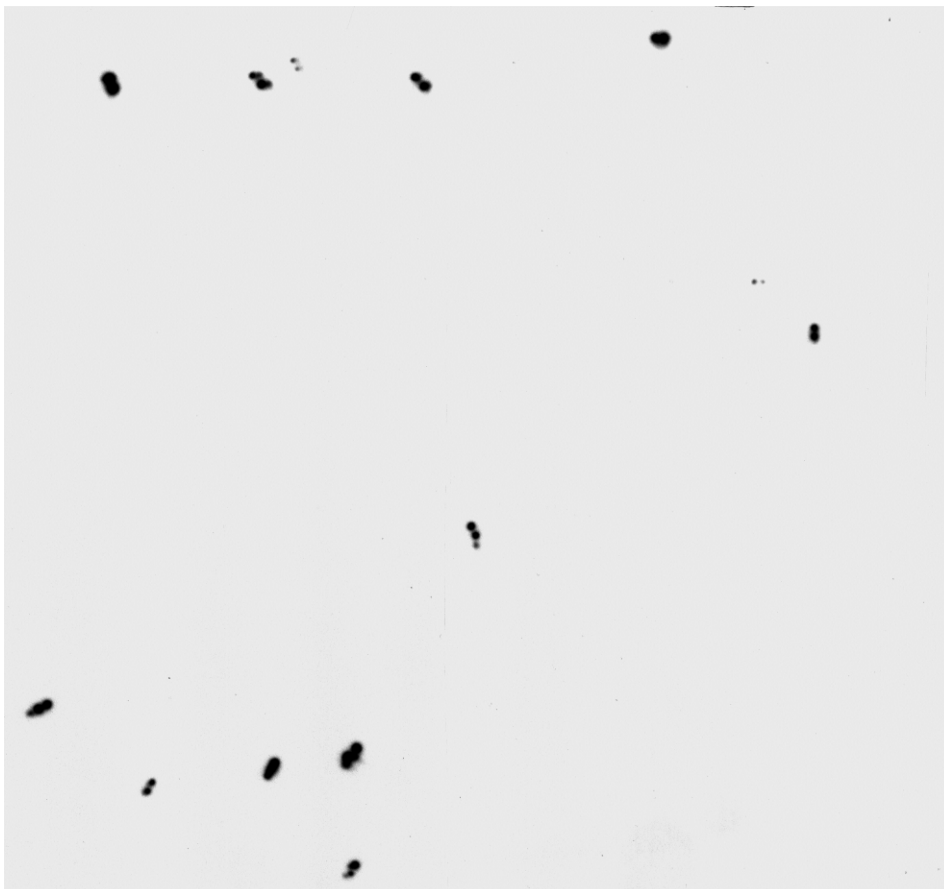


Abb. 3.6: Autoradiogramm eines P1 Filters nach Hybridisierung mit einer HERV-K *gag* Sonde. Die doppelt-gespotteten Klone erlauben eine zweifelsfreie Adressierung von Hybridisierungssignalen durch Zuordnung zueinander. Weitere Erläuterungen im Text.

Insgesamt konnten 77 Klone zugeordnet werden. Die P1 Phagemid DNA wurde isoliert, mit *EcoRI* restringiert und in Southern-Blot Analysen reidentifiziert. Von den 77 Klonen erwiesen sich in diesem Rescreening 62 als eindeutig *gag* positiv (Ergebnisse nicht gezeigt).

Um unter den HERV-K *gag* positiven Klonen solche zu identifizieren, die potentiell biologisch aktive Proviren beherbergen, erfolgte ein zweites Screening mit dem Oligonukleotid YB23.3, welches komplementär innerhalb der 292 bp des *pol/env* Segments bindet, welches charakteristisch für Typ 2 Genome ist. In Abb. 3.7 ist das Ergebnis einer Southern-Blot Analyse mit dieser Sonde dargestellt.

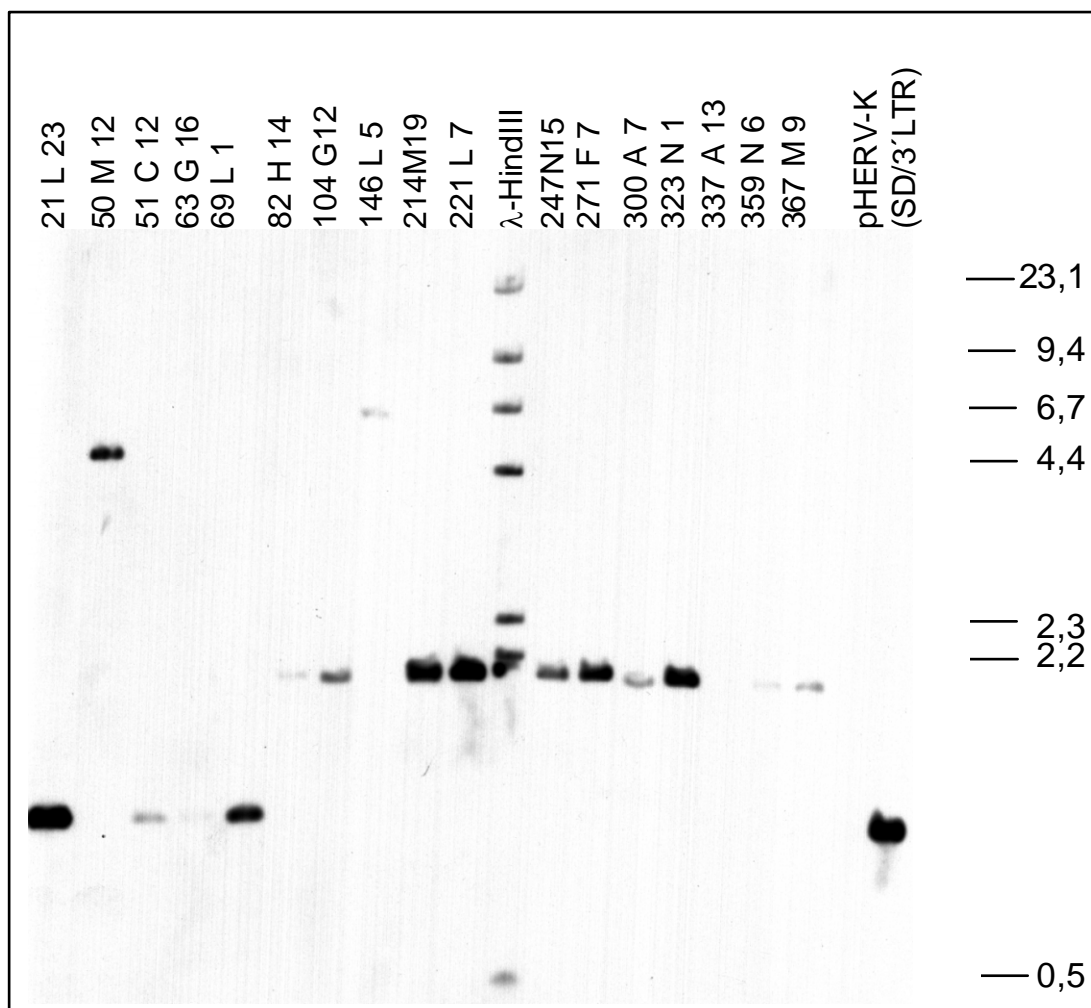


Abb. 3.7: Southern-Blot Analyse zur Identifizierung von HERV-K Proviren des Typs 2.

EcoRI Restriktionskartierung von 17 P1 Klonen sowie der Positivkontrolle pHERV-K(SD-C7-3'-LTR). Der Klon 337A13 beinhaltet ein Typ I Provirus und diente als Negativkontrolle. Die Hybridisierung erfolgte mit dem 3'-endmarkierten Oligonukleotid YB23.3. Als Längenstandard wurde ECL-markierter λ /*HindIII* verwendet.

Die Southern-Blot Analyse der 16 P1 Klone, die Integrationen potentiell biologisch aktiver Proviren aufweisen, ergab, daß nur die P1 Klone 21L23, 51C12, 63G16 und 69L1 ein Hybridisierungssignal von 1143 bp (*EcoRI*-Fragment nt 6079-7222) aufweisen, wie es für

pHERV-K(SD-C7-3'-LTR) zu verzeichnen ist. Daher wurde zunächst versucht, die proviralen Anteile dieser Klone durch Subklonierung einer Sequenzanalyse zugänglich zu machen. Hierbei erwies sich die Größe der Klone von ~120 kb als hinderlich, da bei Restriktions- und Southern-Blot Analysen durch die Vielzahl der Restriktionsfragmente eine Zuordnung bzw. selektive Aufreinigung von solchen, die mit HERV-K spezifischen Sonden hybridisierten, nahezu unmöglich war, so daß auf die Subklonierung verzichtet wurde.

3.1.4 Klonierung der Integrationsorte mittels inverser PCR

Eine Möglichkeit, die Subklonierung von Restriktionsfragmenten zu umgehen, bestand in der Klonierung der Integrationsorte mit Hilfe der inversen PCR. Diese Methode erlaubt die Klonierung flankierender DNA Bereiche ohne vorhergehende Charakterisierung ausgehend von einer bekannten Sequenz. Die Abb. 3.8 stellt schematisch die Vorgehensweise dar, die dieser Klonierungsstrategie zugrunde liegt.

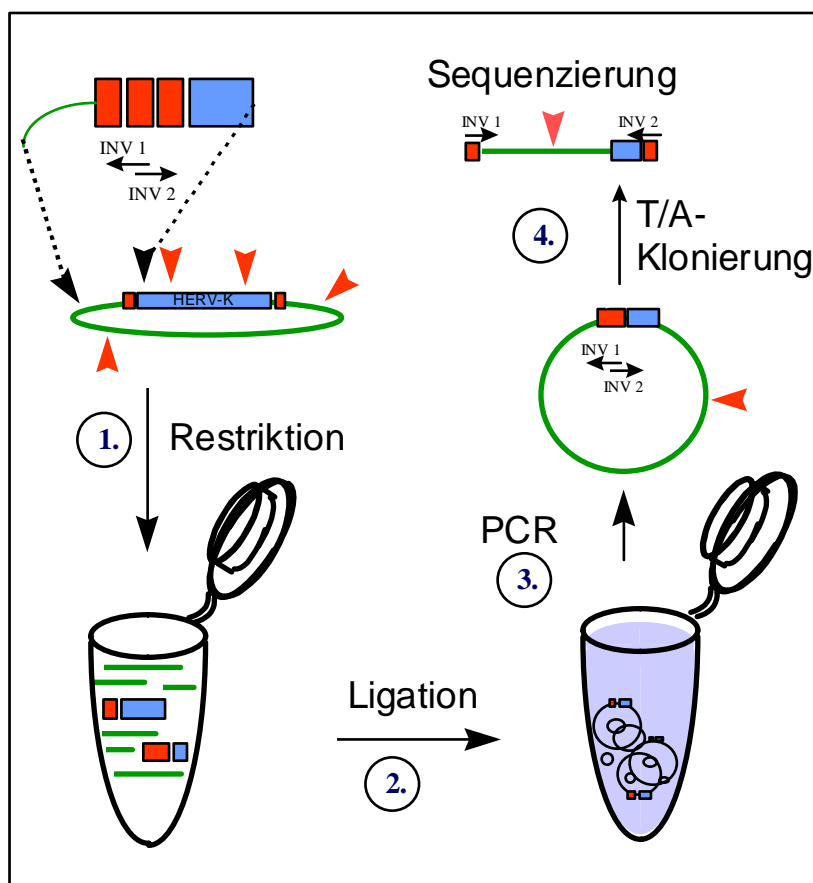


Abb. 3.8: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie proviraler Integrationsorte durch inverse PCR.

P1 Klone, für die eine Integration eines HERV-K Provirus nachgewiesen wurde, wurden mit "blunt-end" erzeugenden Restriktionsendonukleasen verdaut (1, rote Pfeilspitzen). Die Ligation in einem großen Volumen (300 µl) begünstigt die Zirkularisierung einzelner Fragmente (2). Die invers

orientierten Primer INV1 und INV2 sind komplementär zu der HERV-K LTR und ermöglichen die Amplifikation des Integrationsortes (1+3), der nach T/A-Klonierung durch Sequenzierung charakterisiert werden kann (4).

Die Verwendung von *DraI*-Religationsprodukten der P1 Klone 21L23 und 63G16 als Template für die invers orientierten LTR Primer INV1 und INV2 führte zu zwei Amplifikaten, die nachträglich durch Sequenzierung als Integrationsorte charakterisiert werden konnten. Für die P1 Klone 51C12 und 69L1 konnte ein ~1,4 kb großes Amplifikat auf *DraI* Religaten generiert werden. Das *DraI*- Amplifikat stellte sich als 5'-LTR mit angrenzender chromosomaler DNA heraus. Ein ~2,5 kb großes Amplifikat, welches mit den Primern INV1/INV2 auf einem *StuI*-Religat erzeugt werden konnte, erwies sich nach Klonierung und Sequenzierung als die 3'-Integrationsstelle von HERV-K in den Klonen 51C12 und 69L1.

Für diese vier Klone, die ein entsprechendes Restriktionsmuster wie der Klon pHERV-K(SD-C7-3'-LTR) besitzen (s. Abb. 3.7), zeigte sich, daß jeweils zwei von ihnen identische Integrationsorte aufwiesen (21L23 und 63G16; 51C12 und 69L1). Es kann sich hierbei entweder um identische Klone oder Allele handeln. Für beide Paare ergab die Sequenzierung, daß die Integration des Provirus zu einer Disruption eines Alu-Elementes geführt hat.

3.1.5 Chromosomale Zuordnung von proviralen HERV-K Integrationsstellen

Anhand der Sequenzinformationen wurden Primer in der chromosomal flankierenden Region außerhalb der Alu-Sequenzen ausgewählt. In Kombination mit HERV-K spezifischen Primern konnten mittels PCR auf dem monochromosomalen Mapping Panel die P1 Klone 51C12 und 69L1 auf dem Chromosom 7 lokalisiert werden. Abb. 3.9 A zeigt die PCR-Produkte, die mit dem flankierenden Primer 5'-Fl-51C12/69L1 in Kombination mit dem HERV-K spezifischen Primer SDinv-nest auf den 24 Chromosomen und den beiden P1 Klonen generiert werden konnten. Ein distinktes Signal von Chromosom 7, das der erwarteten Größe (~1,1 kb) entspricht, wurde kloniert und sequenziert. Das Amplifikat auf Chromosom 11 entsprach nicht der berechneten Größe und wurde daher nicht charakterisiert. Die analoge Vorgehensweise führte für die Primerpaarung 3'-Fl-51C12/69L1 und HERV-K/Env-for ebenfalls zu einem Amplifikat auf Chromosom 7 (nicht gezeigt).

Die Verwendung der flankierenden Primer in einer langen PCR führte zu Vollängen-Amplifikaten (Abb. 3.9 B), deren Klonierung in T/A-Vektoren jedoch nicht gelang. Aus diesem Grund wurden die kodierenden und regulatorischen Bereiche der P1 Klone in

mehreren PCR-Experimenten generiert, kloniert und sequenziert. Die Sequenzen erwiesen sich als identisch mit der des Plasmids pHERV-K(SD-C7-3'-LTR). Die Abb. 3.9 C zeigt skizzenhaft den proviralen Integrationsort, der im Folgenden als HERV-K(C7) bezeichnet wird. Die Sequenz des Provirus HERV-K(C7) wurde in der EBI-Datenbank unter der Acc. Nr. Y17832 abgelegt.

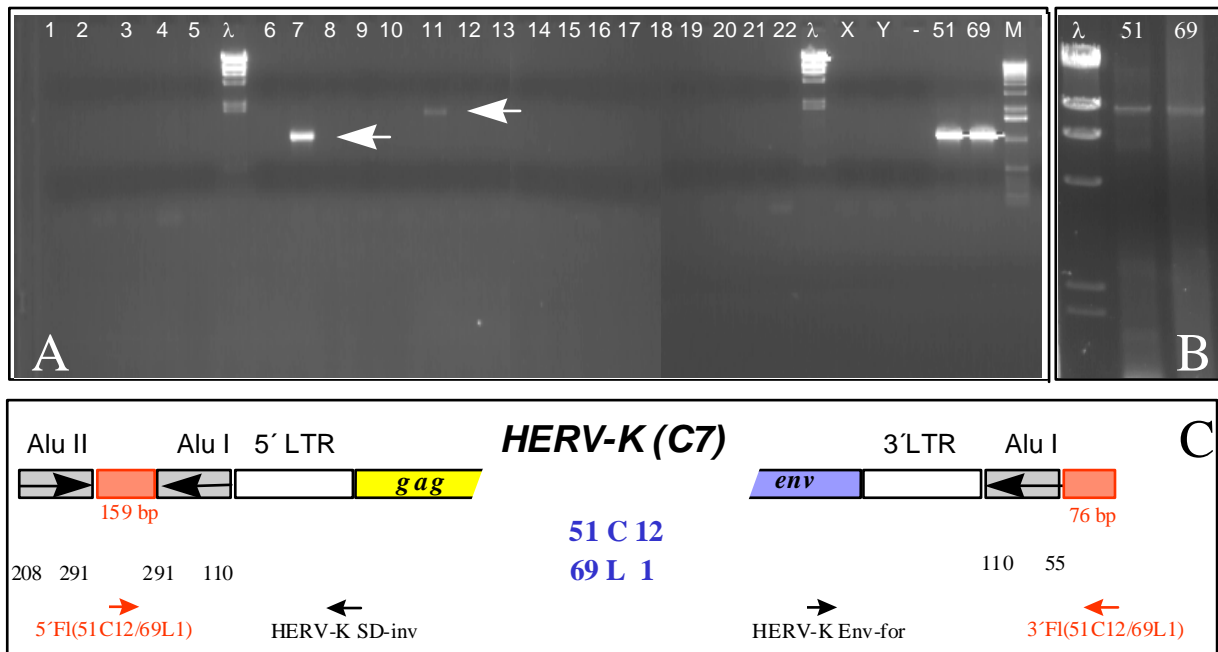


Abb. 3.9 A: Chromosomale Zuordnung der proviralen Integrate in den P1 Klonen 51C12 und 69L1.

Als Templates für die Primerpaarung 5'-FI-51C12/69L1//HERV-K SDinv-nest wurden die 24 Chromosome (1-22, X, Y) sowie die P1 Klone 51C12 und 69L1 eingesetzt. Als Längenstandard dienten λ /HindIII und die 1 kb Leiter (K); (- = Negativkontrolle). Die P1 Klone 51C12 und 69L1 dienten als Positivkontrollen. Mit DNA der Chromosomen 7 bzw. 11 konnten Amplifikate generiert werden (Pfeile).

Abb. 3.9 B: Vollängenamplifikation der proviralen Integrationen auf den P1 Klonen 51C12 und 69L1 mit flankierenden Primern [5'-FI-51C12/69L1//3'-FI-51C12/69L1]. Als Längenstandard diente λ /HindIII.

Abb. 3.9 C: Schematische Darstellung des durch Sequenzierung charakterisierten Integrationsortes HERV-K(C7). Der Genort wird beiderseits von einem AluI Element flankiert (schraffiert). Stromaufwärts befindet sich ein weiteres Alu-Element (AluII; die Pfeile indizieren die Orientierung der Alu Elemente, die Zahlen kennzeichnen die Nukleotidpositionen entsprechend der Datenbankeinträge zu denen die höchste Sequenzhomologie zu verzeichnen war (AluI, *AluSx* [U14574], AluII, *AluSp* [14572]). Die flankierenden Primer [5'-FI-51C12/69L1, 3'-FI-51C12/69L1], die zu den Vollängenamplifikaten (Abb. 3.9 B) geführt haben, wurden so gewählt, daß sie innerhalb spezifischer Sequenzabschnitte binden (rot).

Eine Zuordnung der P1 Klone 21L23 und 63G16 mit den Primerpaarungen 5'-FI21L23/63G16//HERV-K SDinv-nest und 3'-FI21L23/63G16//HERV-K/Env-for führte zu keinem auswertbarem Ergebnis.

3.1.6 Nachweis der Kodierungskapazität für retrovirale Proteine von HERV-K tragenden P1 Klonen

Mit der Klonierung eines proviralen Typ 2 Genoms, das offene Leserahmen für alle retroviralen Gene aufweist, wurde ein vorrangiges Ziel der vorliegenden Arbeit erreicht. Der Genort HERV-K(C7) war jedoch nur in zwei der 16 P1 Klone, die aus der P1 Genbank isoliert und als potentiell biologisch aktiv charakterisiert worden waren, repräsentiert. Um in einem einfachen Assay unter den verbliebenen 14 Klonen solche zu identifizieren, die ebenfalls offene Leserahmen für alle Gene besitzen, wurde ein *in vitro* Transkription/Translation Assay durchgeführt.

Hierzu wurden Primer benutzt, die die Amplifikation der Gene *gag*, *pol* und *env* erlauben. Die "Vorwärts"-Primer beinhalten eine T7-Promotersequenz, die durch einen "Spacer" von der HERV-K spezifischen Nukleotidsequenz getrennt ist. Äquimolare Mengen der Amplifikate, die auf diese Weise für die 16 P1 Klone generiert wurden, wurden anschließend in einem Reticulozytenlysat in Gegenwart von ³⁵S-Methionin *in vitro* unter der Kontrolle des T7-Promoters transkribiert und translatiert. Im Anschluß an die *in vitro* Transkription/Translation wurden Aliquots der Translationsprodukte in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. Als Positivkontrolle dienten in allen Fällen Amplifikate, generiert von den Plasmiden pHERV-K(SD-C7-3'-LTR) und pcHERV-K (Tönjes *et al.*, 1999). In der Abbildung 3.10 sind die Ergebnisse dieses Assays zusammenfassend dargestellt.

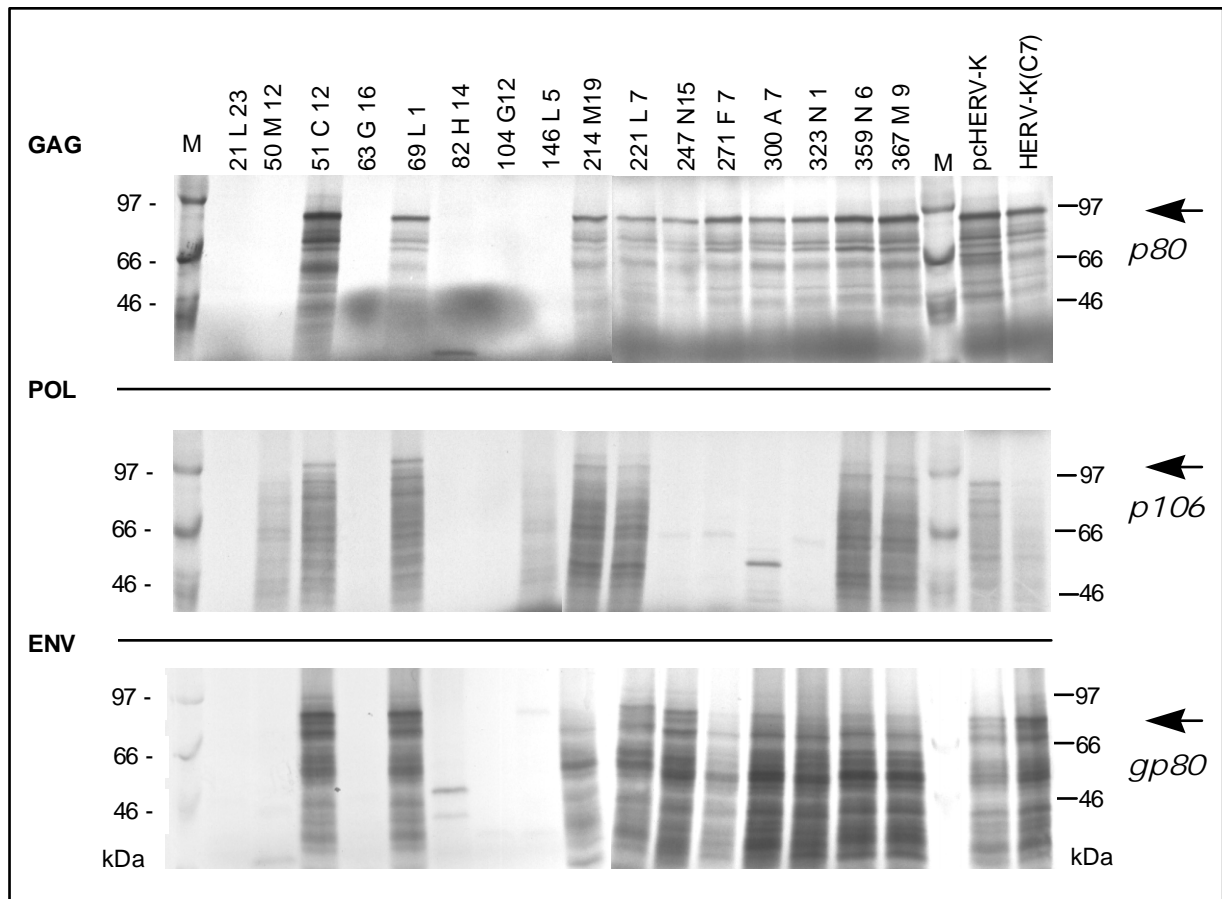


Abb. 3.10: *In vitro* Transkription/Translation Assay proviraler HERV-K Genome des Typs 2.

Neben den 16 P1 Klonen, die als Typ 2 Genom charakterisiert wurden, dienen als Positivkontrollen pHERV-K(SD-C7-3'-LTR) und pcHERV-K als Templates für die Amplifikation der Gene *gag*, *pol* und *env* mit den Primerpaarungen T7 HERV-K *gag*-for/HERV-K *gag*-rev; T7-HERV-K *pol*-for/HERV-K *pol*-rev und T7-HERV-K *env*-for/HERV-K *env*-rev.

Die Translationsprodukte wurden nach Auftrennung in SDS-Polyacrylamidgelen mittels inkorporiertem ^{35}S -Methionin autoradiographisch detektiert. Die Pfeile markieren die Vollängentranslationsprodukte; die Zahlen unterhalb der Pfeile stehen für die theoretischen Molekulargewichte. Das Präfix *gp* deutet an, daß das native *env* als Glycoprotein vorliegt. Als Längenstandard diente ^{14}C markierter Molekulargewichtsmarker.

Unter den verbliebenen 14 P1 Klonen sind vier Isolate, die wie die P1 Klone 51C12 und 69L1 offene Leserahmen für die retroviralen Gene *gag*, *pol* und *env* aufweisen. Die Klone 214M19, 221L7, 359N6 und 367M9 könnten daher ebenfalls biologisch aktive Proviren beinhalten. Für die beiden P1 Klone 21L23 und 63G16, die ein entsprechendes Hybridisierungssignal wie pHERV-K(SD-C7-3'-LTR) aufweisen (Abb. 3.7), waren keine *in vitro* Translationsprodukte ersichtlich (Abb. 3.10), was gegen das Vorhandensein größerer ORFs spricht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein λ -Bakteriophage, der ursprünglich von Dr. Tönjes isoliert worden war und ein HERV-K Provirus enthält, charakterisiert. Wie die Sequenzierung des proviralen Anteils des λ -Subklons pgP23S10 ergab, handelt es sich bei diesem Klon um ein

Typ 2 Genom. Bevor mit der Charakterisierung weiterer P1 Klone begonnen wurde, sollte überprüft werden, ob sich unter den 16 P1 Klonen auch der Genort befindet, der durch den Subklon pgP23S10 repräsentiert wird.

Die Sequenzierung ergab offene Leseraster für *gag*, *pol* und *env*. Die Deletion eines Nukleotids (nt 3377) im Proteasegen, die zu einer vorzeitigen Termination dieses Leserahmens führt, sowie die unvollständige 5'-LTR (nt 1-945 deletiert), die eine Inaktivierung dieses Klons auf transkriptioneller Ebene zur Folge hat, kennzeichnen diesen Genort. In der 3'-LTR ist ein 26 bp Element, welches ein Glucocorticoid-responsives Element (Scheidereit *et al.*, 1983, Ono *et al.*, 1987) beinhaltet, dupliziert.

Ein weiteres Charakteristikum dieses Klons ist eine 9 bp "in frame" Insertion im Polymerasegen. Das Oligonukleotid 23S10/Ins, komplementär zu dieser Insertion, wurde als Sonde eingesetzt, um unter den 16 P1 Klonen identische Proviren zu finden.

Eine Dot Blot Analyse ergab, daß genau die vier P1 Klone, 214M19, 221L7, 359N6 und 367M9, für die im PTT die Existenz offener Leserahmen nachgewiesen werden konnte, mit dem Oligonukleotid 23S10/Ins hybridisieren (Abb. 3.11).

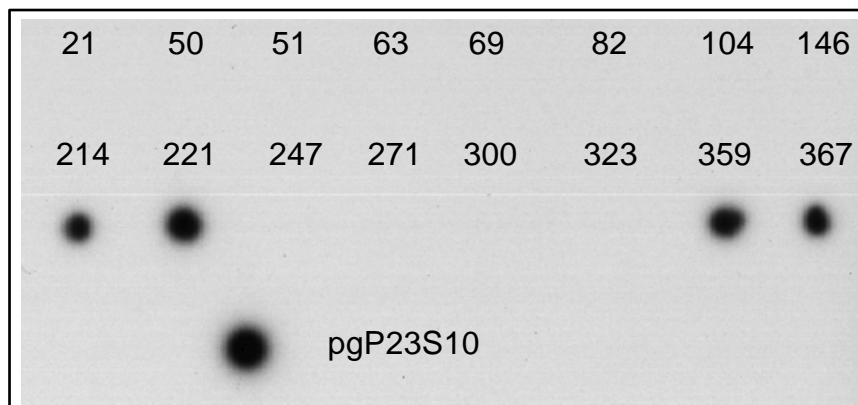


Abb. 3.11: Dot Blot Analyse von 16 P1 Klonen mit einer pgP23S10 spezifischen Sonde.

Je 2 µg Pagemid-DNA wurden mit dem 5'-endmarkierten Oligonukleotid 23S10/Ins hybridisiert.

Der provirale Anteil von pgP23S10 beginnt mit der Nukleotidposition 945 und endet klonierungsbedingt an der *SphI*-Schnittstelle (nt 8737). Zur Vervollständigung der Sequenzinformation für diesen Genort wurden mittels inverser PCR die 3'-LTRs der P1 Klone 214M19 und 359N6 kloniert.

Die Primerpaarung INV5/INV6 ergab auf einem *SmaI*-Religat ein ~1,5 kb großes Amplifikat. Durch Klonierung und Sequenzierung konnte so der Integrationsort und Teile der 3'-flankierenden Region charakterisiert werden. Das Oligonukleotid 3'-Fl-21419/221L7/359N6/367M9, welches in der flankierenden DNA hybridisiert, wurde in Kombination mit

dem Primer HERV-K/Env-for verwendet, um die 3'-LTR einschließlich der flankierenden chromosomalen Sequenz aus den P1 Klonen zu klonieren. Ein Amplifikat entsprechender Größe wurde von Chromosom 19 durch PCR erzeugt. Die Sequenzierung des hieraus hervorgegangenen Plasmids pGTE(HERV-K/Env-for//3'-Fl-21419/221L7/359N6/367M9) belegte die Identität dieses Integrationsortes mit denen der P1 Klone.

Die Sequenz des proviralen Anteils des λ Subklons pgP23S10, ergänzt um die LTR-Sequenz stromabwärts der *Sph*I-Schnittstelle im Plasmid pGTE(HERV-K/Env-for//3'-Fl-214M19/221L7/359N6/367M9), ist unter der Acc. Nr. Y17833 in der EBI Datenbank hinterlegt.

Die Abb. 3.12 stellt schematisch den proviralen Integrationsort dar, wie er auf Chromosom 19 zu finden ist und der im Folgenden als HERV-K(C19) bezeichnet wird.

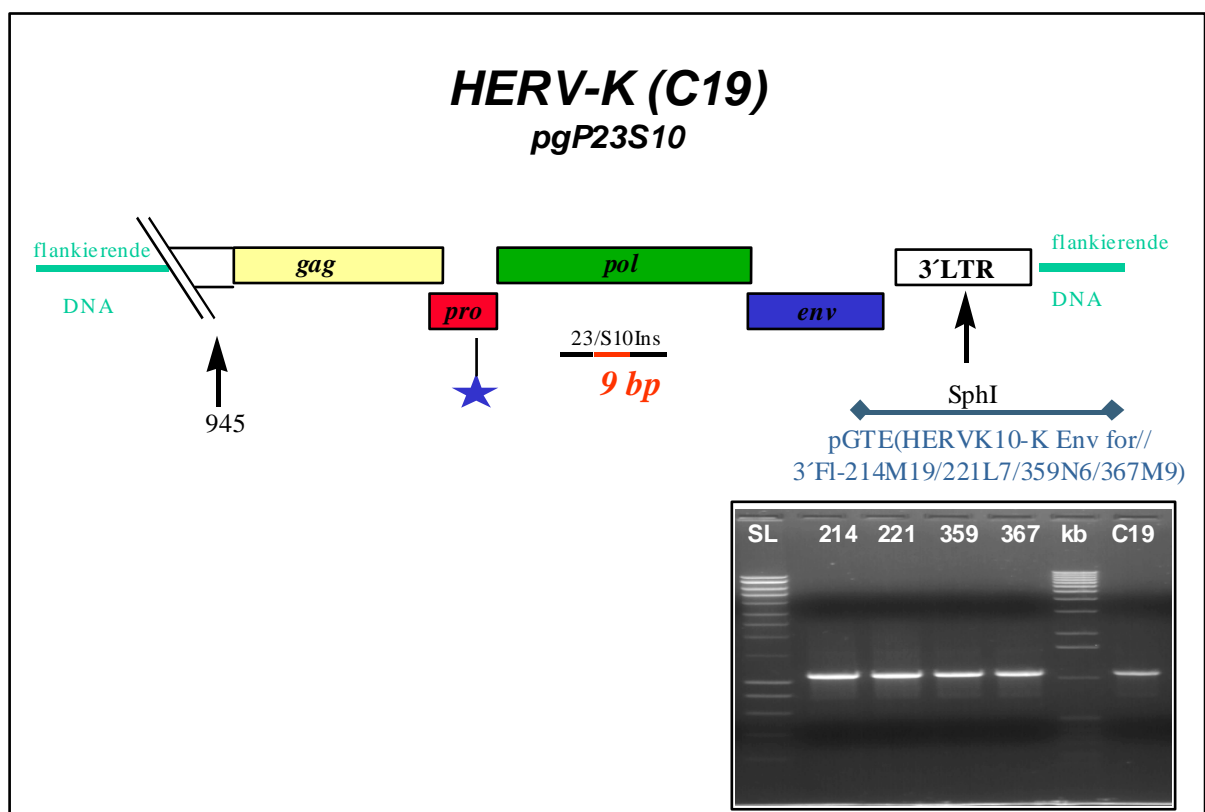


Abb. 3.12: Darstellung des Genortes HERV-K(C19).

Die Sequenz von HERV-K(C19) setzt sich aus der pgP23S10 Sequenz sowie der Sequenz pGTE(HERV-K/Env-for//3'-Fl-21419/221L7/359N6/367M9) zusammen (Acc. Nr.: Y17833). Die 5'-LTR ist stromaufwärts des Nukleotids 945 der HERV-K10"Plus"-Sequenz trunziert. Der Stern soll die vorzeitige Termination des Protease Leserahmens andeuten. Das Oligonukleotid 23S10/Ins umspannt die 9 bp Insertion des pgP23S10, anhand derer die Homologie zu den P1 Klonen 214M19, 221L7, 359N6 und 367M9 gefunden wurde. Das Gelphoto zeigt die PCR-Produkte, die mit der Primerpaarung HERV-K/Env-for//3'-Fl-21419/221L7/359N6/367M9 auf den P1 Klonen (214M19, 221L7, 359N6, 367M9) und dem Chromosom 19 (C19) erhalten wurden. Als Längenstandards wurden die Smartladder (SL) und die 1 kb ladder (kb) verwendet (weitere Erläuterungen im Text).

Eine Suche der Sequenz in der Datenbank ergab für die chromosomal flankierende Sequenz eine 100% Übereinstimmung im Überlappungsbereich mit dem Cosmid R26450, Acc. Nr. AC004164. Die ersten 104 bp der Sequenz Y17833 (nt 946-1049) in inverser Orientierung entsprechen dem 5'-Terminus des Cosmids, das einer Chromosom 19 spezifischen Genbibliothek entstammt und nahe dem Centromer an der Position 19q12 kartiert.

3.1.7 Klonierung von HERV-K10 und HERV-K18

In weiteren Experimenten, anhand derer die Möglichkeit der chromosomalen Zuordnung von Proviren durch PCR auf dem monochromosomalen Mapping-Panel überprüft werden sollte, konnten die Proviren HERV-K10 und HERV-K18 (Ono *et al.*, 1986) chromosomenspezifisch isoliert werden. Neben der Vollängensequenz von HERV-K10 und den LTRs von HERV-K18 wurden von Ono (1986) kurze flankierende chromosomale Sequenzabschnitte publiziert. Mit Primern, die komplementär zu den chromosomalen Sequenzen dieser Proviren sind, konnte die Lokalisation von HERV-K18 auf dem Chromosom 1 und die von HERV-K10 auf dem Chromosom 5 nachgewiesen werden (Abb. 3.13 A-D). Durch die Verwendung des 5'-flankierenden Primers 5'-HERV-K10 in Kombination mit dem Primer SDinv-nest konnten PCR Amplifikate sowohl auf dem Chromosom 5 als auch auf dem Chromosom 6 nachgewiesen werden (Abb. 3.13 A). Die Generierung des spezifischen HERV-K10 Vollängenamplifikates durch die Kombination beider flankierender Primer (5'-HERV-K10/3'-HERV-K10) gelang jedoch nur mit Chromosom 5 DNA (Abb. 3.13 B).

Die amplifizierten Proviren HERV-K10 und HERV-K18 wurden in T/A-Vektoren kloniert und partiell (HERV-K10) bzw. vollständig (HERV-K18) charakterisiert.

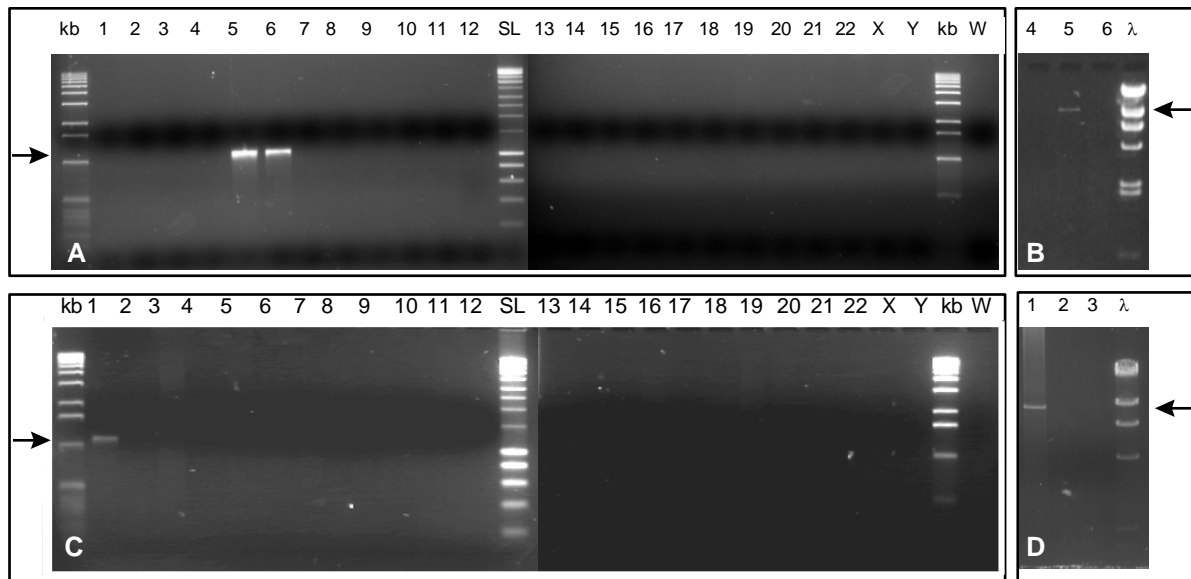


Abb. 3.13: Chromosomale Zuordnung der Genorte HERV-K10 und HERV-K18.

A: Die Verwendung des chromosomenspezifischen Primers 5'-HERV-K10 in Kombination mit dem zum Splice Donor komplementären Primer HERV-K SDinv-nest identifizierte Integrationsorte auf den Chromosomen 5 und 6. Als Längenstandards wurden die Smartladder (SL) und die 1 kb ladder (kb) verwendet. W = Wasserkontrolle.

B: Das Vollängenamplifikat (9220 bp) konnte durch Verwendung beider flankierender Primer 5'-HERV-K10/3'-HERV-K10 nur auf dem Chromosom 5 generiert werden. Als Längenstandard diente λ /HindIII.

C: Die Primerpaarung 5'-HERV-K18/HERV-K SDinv-nest lokalisiert den HERV-K18-Genort auf Chromosom 1. Als Längenstandards wurden die Smartladder (SL) und die 1 kb ladder (kb) verwendet. W = Wasserkontrolle.

D: Die Verwendung beider chromosomenspezifischer Primer 5'-HERV-K18 und 3'-HERV-K18 führte zu einem 9254 bp Amplifikat. Als Längenstandard diente λ /HindIII.

Für HERV-K18 konnten durch Sequenzierung gezeigt werden, daß der *gag*-ORF durch zahlreiche Stopcodone vorzeitig terminiert wird. Hingegen existieren offene Leserahmen für die Protease, die Polymerase und das Hüllprotein (Abb. 3.14). Die gesamte provirale Sequenz ist 9234 bp lang.

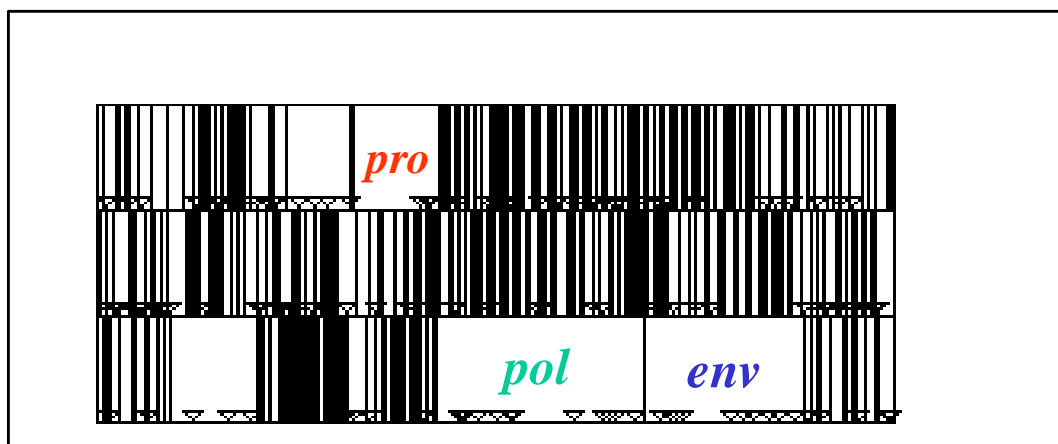


Abb. 3.14. Analyse der Leserahmen von HERV-K18

Dreiecke repräsentieren Startcodone, Balken Stopcodone. Mit Ausnahme des *gag* Gens existieren ausgedehnte offene Leserahmen. Ergebnis einer Analyse mit dem Programm DNASIS (Hitachi).

Ein Sequenzdatenabgleich für HERV-K18 ergab die höchsten Homologien zu IDDMK_{1,2}22, einem Provirus, dem zugeschrieben wird, daß ein von diesem kodiertes Superantigen zur Destruktion der β -Zellen der Langerhans'schen Inseln und somit zur Ausbildung des juvenilen Diabetes mellitus (IDDM) führt (Conrad *et al.*, 1997). Das kleinste Protein, welches hiernach noch Superantigeneffekte vermittelt, ist 153 Aminosäuren lang. Die HERV-K18 Sequenz kodiert für ein annähernd identisches Protein (nt 6543-7047; ein Aminosäureaustausch an Pos. 97, Tyrosin zu Cystein), welches aber aufgrund eines fehlenden Stopcodons (Position: 154) um 406 Aminosäuren länger ist. Zu den weiteren Sequenzdaten, die zu IDDMK_{1,2}22 vorliegen, weist HERV-K18 weniger ausgeprägte Homologien auf.

Das PCR Amplifikat von Chromosom 5 wurde ebenfalls in einen T/A-Vektor kloniert und das Plasmid pGTE(HERV-K10) partiell sequenziert um die Identität zu HERV-K10 nachzuweisen. Während die Übereinstimmungen in den LTRs dieses Klons zu der HERV-K10"Plus" Sequenz (Ono *et al.*, 1986) als Nachweis der Identität angesehen werden können, wurde an der Nukleotidposition 1750 die Insertion eines Nukleotids (G) verzeichnet, die zu einem offenen *gag* Leserahmen führt (Abb 3.15 A). Der experimentelle Nachweis, daß das Plasmid pGTE(HERV-K10) für Coreproteine kodiert, konnte sowohl durch eine *in vitro*-Transkription/Translation (Abb 3.15 B) als auch durch die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie nach Transfektion eines geeigneten Expressionsplasmids erbracht werden (Abb. 3.15 C). Hierfür wurde das *Bam*HI-Restriktionsfragment (nt 824-7751) nach einer Auffüllreaktion in die entsprechend behandelten Restriktionsschnittstellen des Expressionsvektors pJW4303 Hyg^r (Nan, 1998) kloniert und das Konstrukt pJW4303-(*Bam*HI-HERV-K10)-Hyg^r durch Lipofektion in COS7 Zellen eingebracht. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion fixiert und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie auf Expression von Gag überprüft (Abb. 3.15 C).

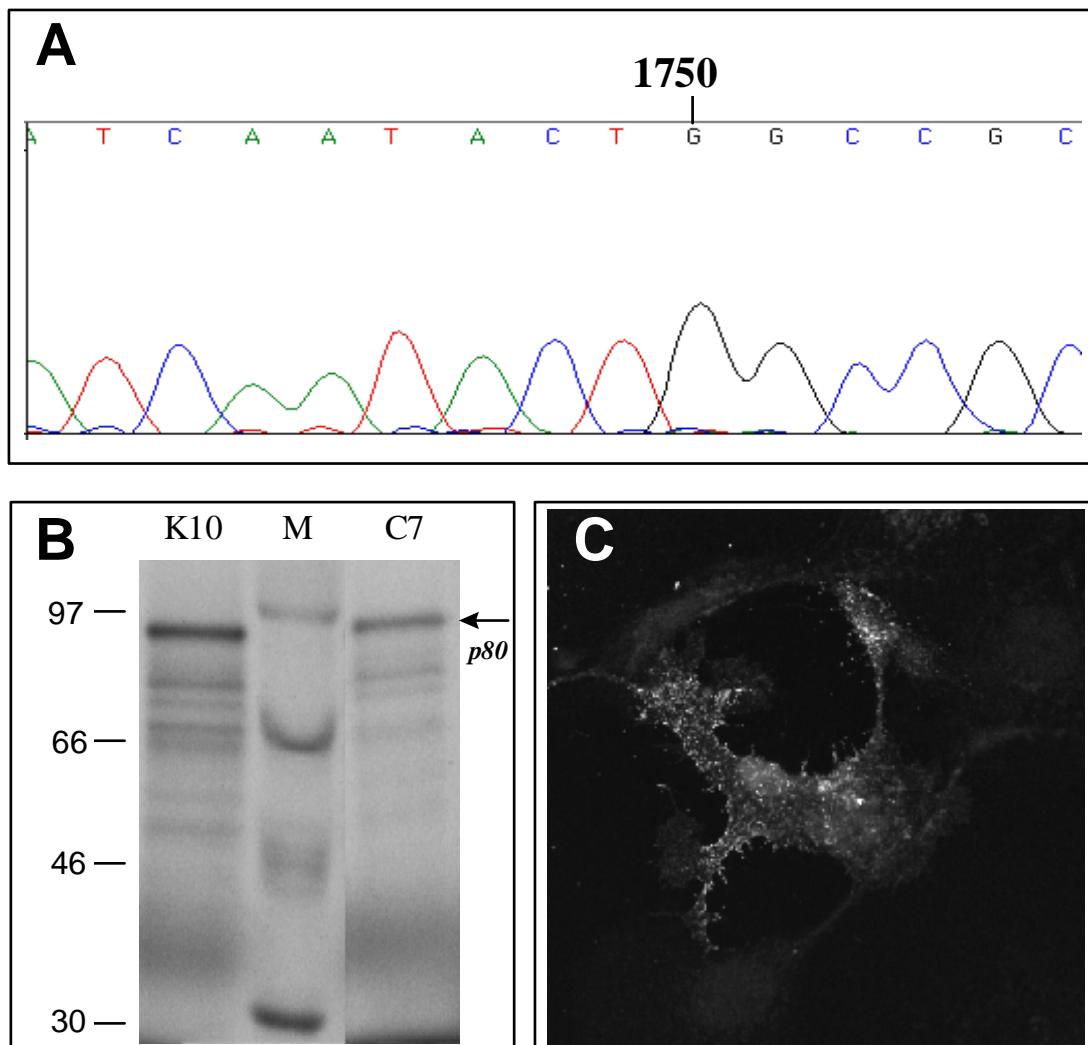


Abb. 3.15: Nachweis eines offenen gag Leserahmens des Klons HERV-K10.

A: Nachweis einer 1 bp Insertion gegenüber der HERV-K10 Sequenz (Ono *et al.*, 1986) durch Sequenzierung (G an der Position nt 1750).

B: Detektion eines Vollängentranslationsproduktes im *in vitro* Transkriptions-/Translationsassays.

Die Primer T7 HERV-K *gag*-for (nt 1109-1129) und HERV-K *gag*-rev (nt 3194-3172) wurden zur Amplifikation der *gag* Inserts der Plasmide pGTE(HERV-K10) (K10) und pHERV-K(SD-C7-3'-LTR) (C7) eingesetzt. Diese Templates wurden in einem Reticulocytenlysat in Gegenwart von ^{35}S -Methionin transkribiert und translatiert. Die radioaktiv markierten Translationsprodukte wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch detektiert. Der Pfeil markiert das ~80 kDa große Gag Protein.

C: Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie von HERV-K10 Gag exprimierenden COS-7 Zellen. Die Zellen wurden 48 h p.t. fixiert und mit einem Ziegen anti-Gag Serum (Boller, *et al.*, 1997) inkubiert. Als Zweitantikörper wurde ein Cy3 gekoppelter Anti-Ziegenantikörper eingesetzt.

Die Experimente belegen für das Provirus, das mit den HERV-K10 flankierenden Oligonukleotiden vom Chromosom 5 generiert wurde, die Existenz eines offenen Leserahmens für das *gag* Gen.

3.2 Klonierung und Charakterisierung von porcinen endogenen Retroviren

Die Zielsetzung des zweiten Projektes war die Klonierung und Charakterisierung vollständiger und intakter porciner endogener Retroviren, die anschließend auf Infektiosität für menschliche Zellen hin untersucht werden sollten. Die aus den Studien von Patience *et al.* (1997) hervorgegangene Zelllinie 293 PERV-PK produziert Viren, die an die humane Zelllinie 293 adaptiert sind und sich seriell passagieren lassen. Als Ausgangsmaterial für die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen dienten die Zelllinien 293, PK15 und die aus den eingangs erwähnten Infektionsstudien hervorgegangene Zelllinie 293 PERV-PK, die uns freundlicherweise von Dr. Clive Patience (London) überlassen worden sind.

3.2.1 Klonierung einer PERV spezifischen Sonde

Zu Beginn der Untersuchungen stand die Notwendigkeit der Generierung einer PERV-spezifischen DNA-Sonde für weitere Analysen. Zu diesem Zweck wurde mRNA aus 293 PERV-PK Zellen isoliert und mit Hilfe eines Oligo-dT Primers in eine cDNA umgeschrieben. Ausgehend von der publizierten 927 bp Sequenz der Protease-Polymerase Region von PERV (Acc. Nr. U77599) wurden PERV-spezifische Primer synthetisiert. Mit diesen wurde in einer nested PCR (PK1 und PK6; PK2 und PK5) ein 752 bp großes Amplifikat auf der cDNA erzeugt, welches nach Klonierung in den T/A-Vektor pGEM[®]-T Easy sequenziert wurde. Die Sequenz erwies sich als identisch zu den Nukleotiden 126-878 der publizierten Sequenz (Acc. Nr. U77599). Das *EcoRI* Fragment aus dem Plasmid pGEM[®]-T Easy (PK2/PK5) wurde im Folgenden als PERV-spezifische Sonde verwendet und wird nachfolgend als *pro/pol* Sonde bezeichnet.

3.2.2 Klonierung porciner endogener Retroviren mittels PCR

Um an weitere Sequenzdaten zu gelangen, wurden zwei alternative Klonierungsstrategien verfolgt.

3.2.2.1 Amplifikation und Klonierung partieller PERV via inverser PCR

Zunächst wurde versucht mittels der Methode der inversen PCR, ausgehend von der *pro/pol*-Region, angrenzende Leserahmen zu amplifizieren. Die Abbildung 3.16 zeigt eine Southern-

Blot Restriktionsanalyse genomischer DNA aus 293 PERV-PK Zellen, die mit einer Auswahl von "blunt-ends" erzeugenden Endonucleasen restringiert wurde. Die Hybridisierungen mit hochmolekularer DNA, die in einigen Bahnen des Southern-Blots (Abb. 3.16A) zu erkennen sind, identifiziert die entsprechenden Restriktionsendonucleasen (*EcoRV*, *HpaI* und *ScaI*) als ungeeignet für diese Klonierungsstrategie. Die distinkten Banden werden durch Enzyme freigesetzt, die mindestens zweimal in der proviralen Sequenz schneiden. Solche Restriktionsfragmente eignen sich nach Religation als Template für eine inverse PCR.

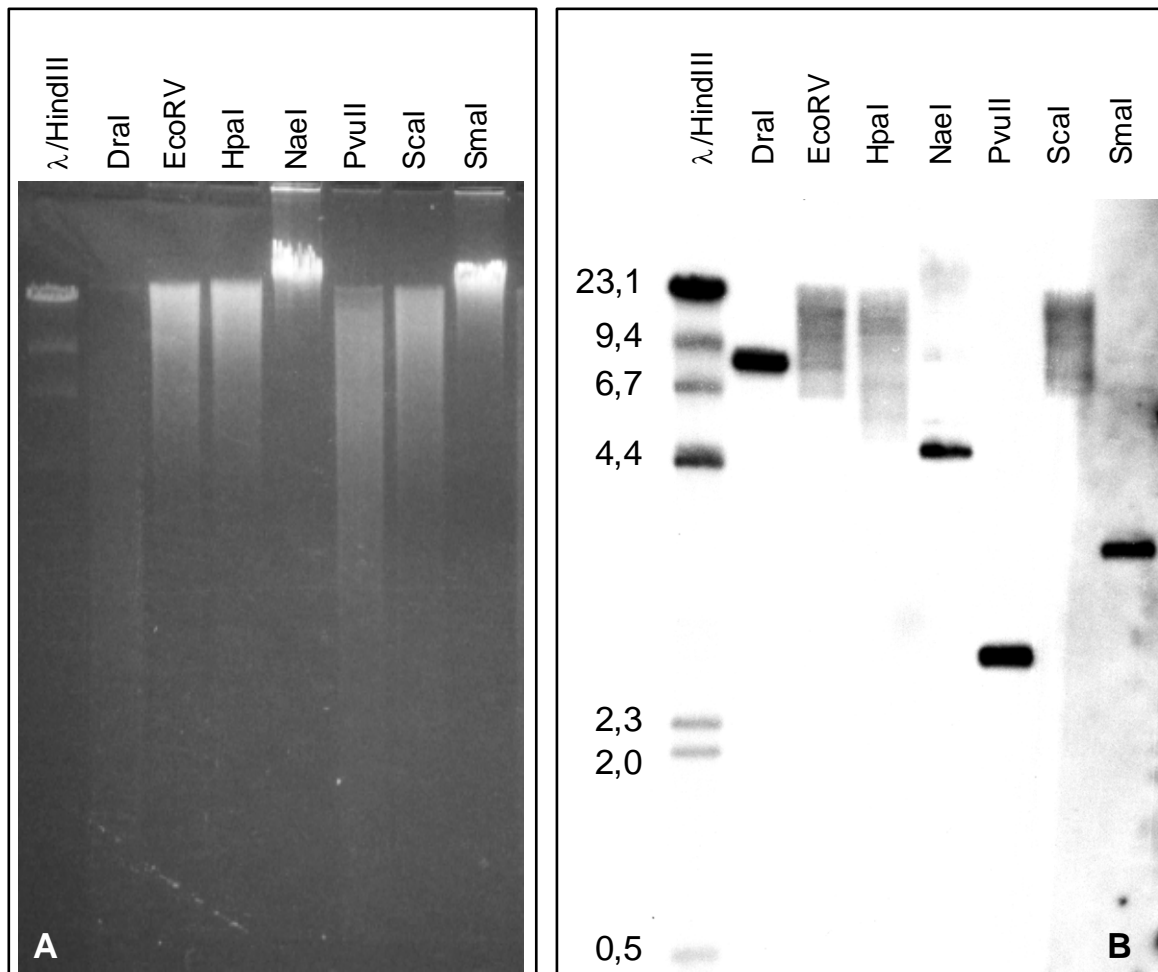


Abb. 3. 16: Restriktionsanalyse genomischer 293 PERV-PK DNA mit "blunt-ends" erzeugenden Restriktionsendonucleasen.

A: Agarosegelelektrophorese der unterschiedlichen Restriktionsansätze.

B: Korrespondierender Southern-Blot nach Hybridisierung mit der radioaktiv markierten *pro/pol*-Probe. Distinkte Hybridisierungssignale repräsentieren geeignete Fragmente für eine Darstellung via inverser PCR. Als Längstandard diente radioaktiv markierter Lambda/*HindIII*.

Auf diese Weise konnte mit den invers orientierten Primern PK7 und PK9 ein ~1,2 kb großes Amplifikat auf rezirkularisierten *PvuII*-Restriktionsfragmenten erzeugt werden. Dieses und ein ~2,3 kb großes Amplifikat, erzeugt auf einem *SmaI*-Religat, wurden in pGEM[®]-T Easy kloniert und partiell sequenziert. Ein ~3,7 kb großes Amplifikat konnte in einem nested PCR-

Ansatz mit den Primern PK3 und PK8 auf rezirkularisierten *NaeI*-Fragmenten erzeugt und in pGEM[®]-T Easy kloniert werden. Der Klon pGEM[®]-T Easy(*NaeI*-3,7) wurde mit den Endonucleasen *NotI* und *NaeI* restringiert. Neben den *NaeI/NotI* Restriktionsfragmenten des Vektors bei 2,703 kb und 0,351 kb sind in der Abb. 3.17 zwei weitere Restriktionsfragmente von ~1,7 kb bzw. ~2,0 kb zu erkennen. Diese wurden nach Aufreinigung über Agarosegele in einen *NotI/SmaI*-restringierten pBluescript subkloniert und sequenziert.

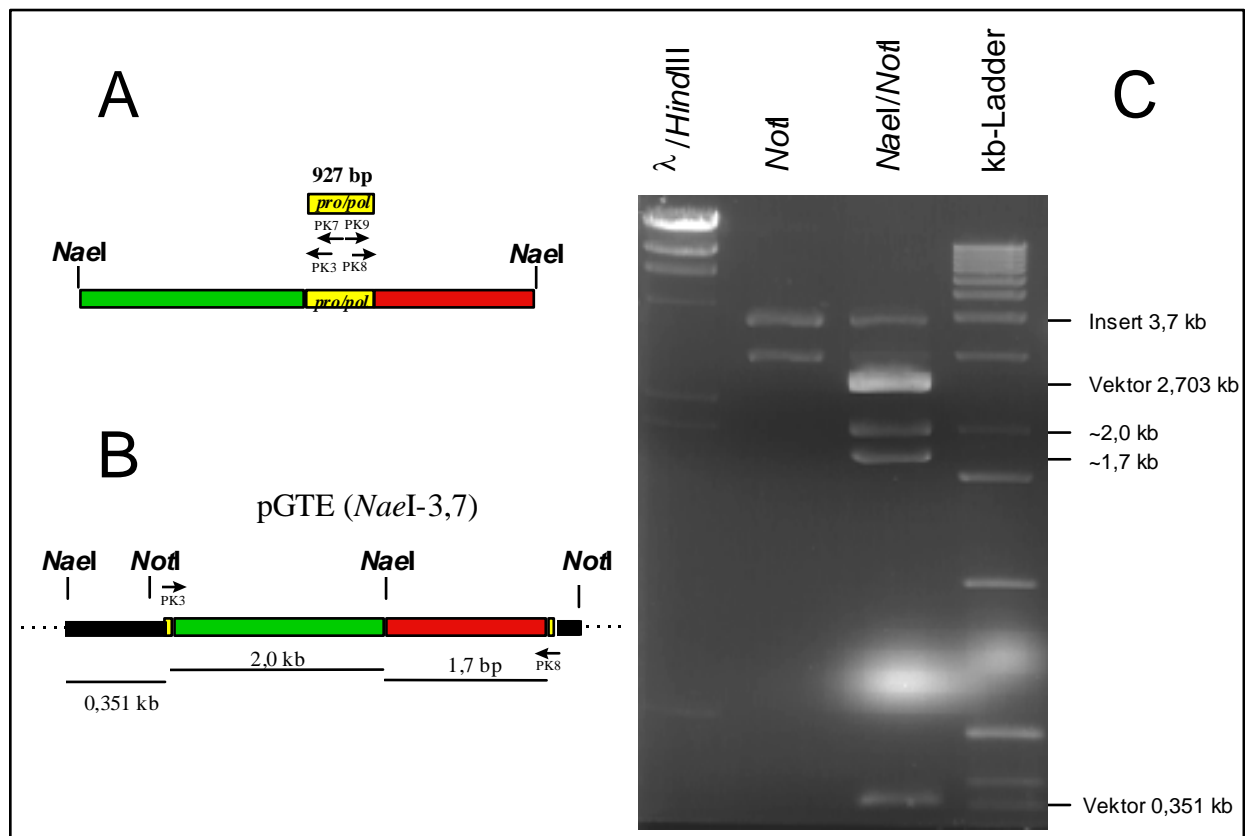


Abb. 3. 17: Subklonierung des pGTE(*NaeI*-3,7).

Das ~3,7 kb große Amplifikat, das mit den Primern PK3 und PK8 auf einem *NaeI*-Religat erzeugt wurde (A), wurde in den Vektor pGEM[®]-T Easy kloniert (B). Bei der *NaeI/NotI* Restriktion des Plasmids pGTE(*NaeI*-3,7) werden die stromaufwärts (2,0 bp, grün) bzw. abwärts (1,7 bp, rot) der *pro/pol* Sequenz (Acc. Nr. U77599, gelb dargestellt) gelegenen Anteile des Plasmids pGTE(*NaeI*-3,7) freigesetzt und für die Sequenzierung in pBS(*NotI/SmaI*) subkloniert.

(C) Agarosegelelektrophorese der *NotI* bzw. *NaeI/NotI* Restriktionen des Plasmids pGTE(*NaeI*-3,7).

Ein Datenbankabgleich wies für das ~2,0 kb große Fragment, welches nach Sequenzierung eine Länge von 2045 bp ergab, eine 62,1%ige Homologie zum *gag* Gen des Gibbon Ape Leukemia Virus (GALV) auf. Eine 63,3% Homologie zum *pol* Gen der GALV-Sequenz war für das ~1,7 kb große Fragment (nach Sequenzierung 1797 bp) zu verzeichnen. Die fusionierte Sequenz aus dem 5' bzw. 3' gelegenen Anteil und der partiellen *pro/pol* Sequenz (Acc. Nr. U77599) war zu 57,4% homolog zur GALV-Sequenz.

Mit weiteren Primerpaaren (PK12/PK10 sowie PK20/PK22) konnten noch zwei weitere Amplifikate auf einem ~2,2 kb großen *PvuII*- bzw. einem ~0,6 kb großen *RsaI*-Religat erzeugt und kloniert werden. Datenbankabgleiche dieser Sequenzen wiesen mit 52,7% die höchsten Homologien zu dem Hüllprotein des Baboon Endogenous Retrovirus (BaEV) auf.

3.2.2.1 Klonierung von proviralen PERV Genen

Mit dem Primerpaar PK28/PK29, das komplementär zu den Enden der Sequenz ist, die sich aus mehreren teilweise überlappende Amplifikaten (siehe Abb. 3.18) zusammensetzt, konnte ein ~8 kb großes Amplifikat auf genomischer DNA von 293 PERV-PK erzeugt werden. Dieses wurde nach Klonierung in pGEM[®]-T Easy sequenziert und als PERV-PK28/29 unter der Acc. Nr. Y17013 in der EBI-Sequenzdatenbank hinterlegt.

Der Klon PERV-PK28/29 besitzt drei größere offene Leserahmen, die aufgrund von Sequenzhomologien als *gag*, *pol* und *env* identifiziert werden konnten. Die Sequenz wies zudem einen kleineren ORF auf, der in einem anderen Leserahmen zwischen dem *pol* und dem *env* Gen liegt. Dieser ORF wurde als das C-terminale Ende des Gag-Pol-Polyproteins identifiziert. Eine 1 bp Deletion (A, nt 5573) und der daraus resultierenden Leserahmenwechsel bedingen eine vorzeitige Termination des *pol* Leserahmens. Auch die Wiederholung der doppelsträngigen Sequenzierung belegte eindeutig die Deletion. Offen bleibt die Frage, ob die Deletion auf einen Synthesefehler während der PCR zurückzuführen ist oder schon im proviralen Template in der zellulären 293 PERV-PK DNA vorgelegen hat.

Mit den Primern PK26 und PK34 konnte auf genomischer DNA der Zelllinie 293 PERV-PK ein 1042 bp großes Amplifikat generiert werden, welches nach Sequenzierung unter der Acc. Nr. Y17012 in der EBI-Sequenzdatenbank abgelegt wurde. Das Plasmid pPERV-PK26/34 umfaßt eine nahezu komplette 5'-LTR, weist jedoch in der 5'-UTR zwei Deletionen von vier bzw. acht Nukleotiden auf.

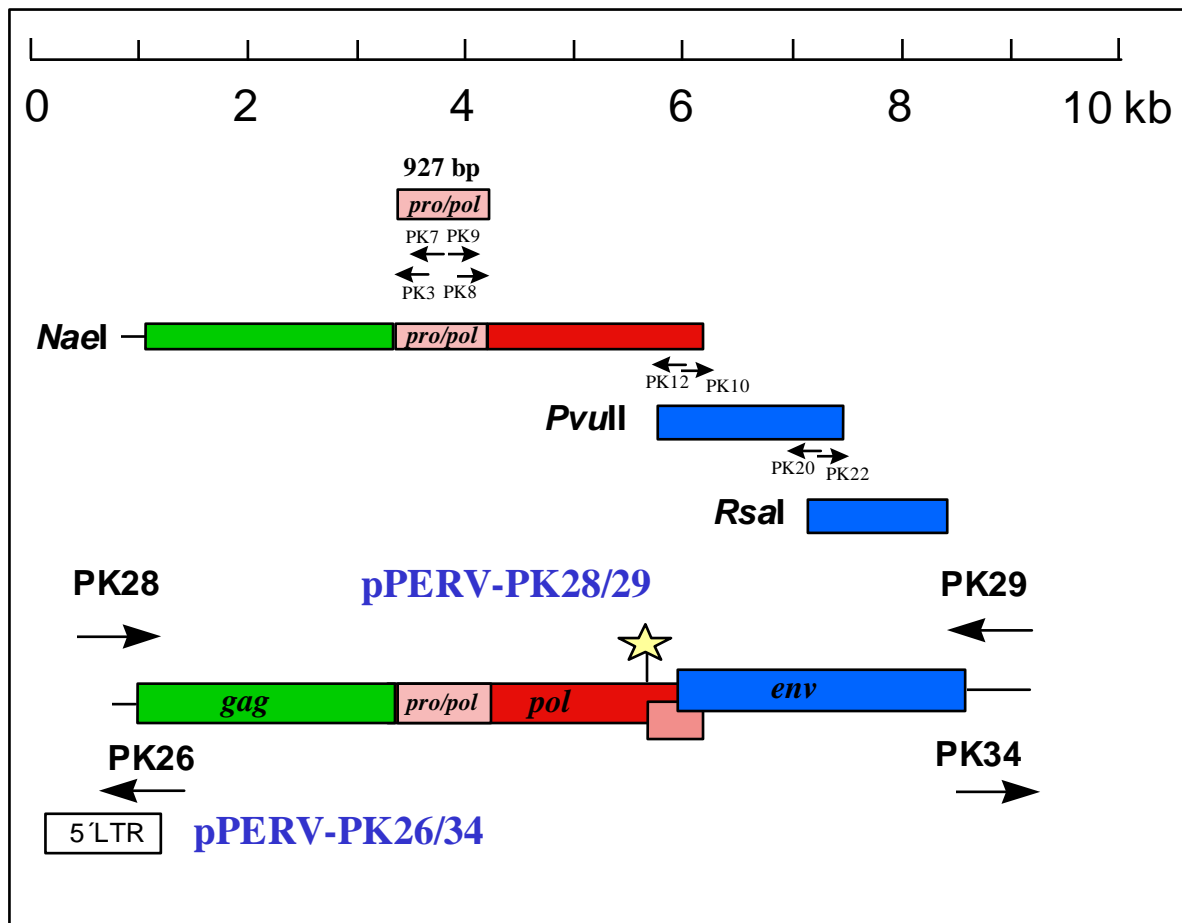


Abb. 3.18: Schematische Zusammenfassung der PCR-Klonierungen.

Ausgehend von der publizierten 927 bp Sequenz (Acc. Nr. U77599) wurden in drei aufeinanderfolgenden inversen PCRs weite Bereiche der proviralen PERV Sequenz kloniert. Die gewonnenen Sequenzinformationen wurden genutzt um die Klone PERV-PK28/29 und PERV-PK26/34 in direkten PCRs auf genomischer DNA der Zelllinie 293 PERV-PK darzustellen. Der Stern repräsentiert das vorzeitige Stopcodon des *pol* Leserahmens, welches zu einem weiteren kurzen ORF führt (rot schraffiert).

Wie in Abb. 3.18 ersichtlich konnte mit den PCR basierenden Klonierungstechniken zwar etwa 9 kb eines porcinen Retrovirusgenoms generiert und charakterisiert werden, jedoch setzt sich die Sequenz aus Teilsequenzen, die nicht unbedingt einem Genort entsprechen, zusammen.

3.2.3 Generierung und Durchmusterung einer λ -Phagen Bibliothek

Zur Klonierung intakter proviraler Genome einschließlich der LTRs wurde eine Lambda-Genbibliothek der Zelllinie 293 PERV-PK angelegt. Die Restriktionsbedingungen eines Partialverdau hochmolekularer genomischer DNA der Zelllinie 293 PERV-PK wurden so gewählt, daß die Majorität der Restriktionsfragmente zwischen 9 und 23 kb bandiert (Abb.

3.19), was der Insertkapazität des Lambda-FIX II/XhoI Partial Fill-In Vector Systems (Stratagene), entspricht. Im Anschluß an die Auffüllreaktion und die Ligation erfolgte die Titrierung.

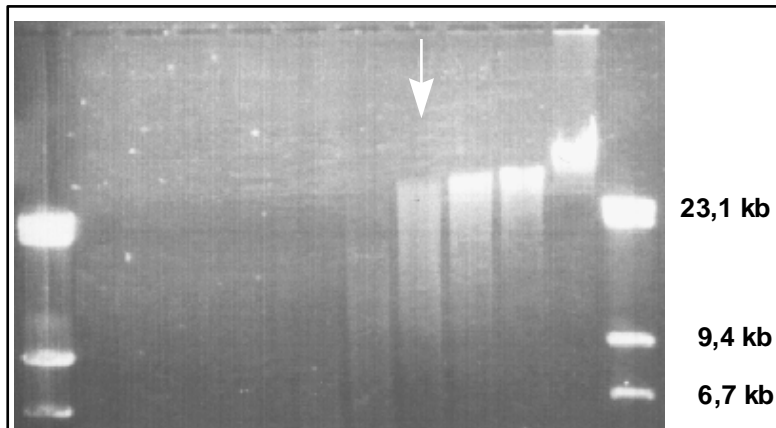


Abb. 3.19: Partielle Restriktion von zellulärer 293 PERV-PK DNA.

Gleiche Mengen hochmolekularer DNA (30 µg) der Zelllinie 293 PERV-PK wurde mit einer seriellen Verdünnung der Restriktionsendonuclease *Sau3AI* für 2,5 h bei 37°C partiell restringiert. Ein Aliquot der geeigneten und für die Klonierung verwendeten Verdünnung ist in der mit dem Pfeil gekennzeichneten Spur zu erkennen.

Der erzielte Titer lag bei etwa 1.4×10^6 unabhängigen Klonen. Bei einer durchschnittlichen Insertgröße von 15 kb sind folglich 2.1×10^{10} bp verpackt worden. Das menschliche, diploide Genom besitzt ca. $6,6 \times 10^9$ bp, so daß es in der Phagenbibliothek ungefähr dreimal repräsentiert ist. Im Anschluß an das Plaquelifting und die Hybridisierung mit der *pro/pol* Sonde wurden auf den insgesamt 6 Autoradiogrammen 80 Klone identifiziert, was auf 20-30 Integrationen/Zelle rückschließen läßt. Es wurden insgesamt 60 Plaques ausgestochen und nach dem zweiten Rescreening waren 6 Klone bis zur Homogenität aufgereinigt. Die Isolierung der λ-DNA erfolgte wie unter 2.4.1.3 beschrieben.

Mit einer Restriktionsanalyse der λ-Klone 33, 34, 41, 42, 43 und 46 sollte verifiziert werden, daß sie PERV-spezifische provirale Integrate beherbergen. Die Abb. 3.20 zeigt die elektrophoretische Auftrennung der *NotI/EcoRI*-restringierten λ-Klone und den korrespondierenden Southern-Blot mit der *pro/pol* Sonde. Das gleichförmige Restriktionsmuster der Klone 34 und 41 deutet daraufhin, daß es sich um identische provirale Integrationsorte bzw. zwei identische λ-Klone handelt. Das gegenüber den anderen Klonen und der Positivkontrolle PERV-PK28/29 verkürzte *EcoRI*-Fragment des Klons λ46 kann durch eine zusätzliche *EcoRI*-Erkennungsstelle oder eine Deletion erklärt werden. Um den letzteren Fall auszuschließen, wurde mit den Primern T7-*pol*-for und AG24 eine PCR auf den λ-Klonen durchgeführt (s. Abb. 3.21).

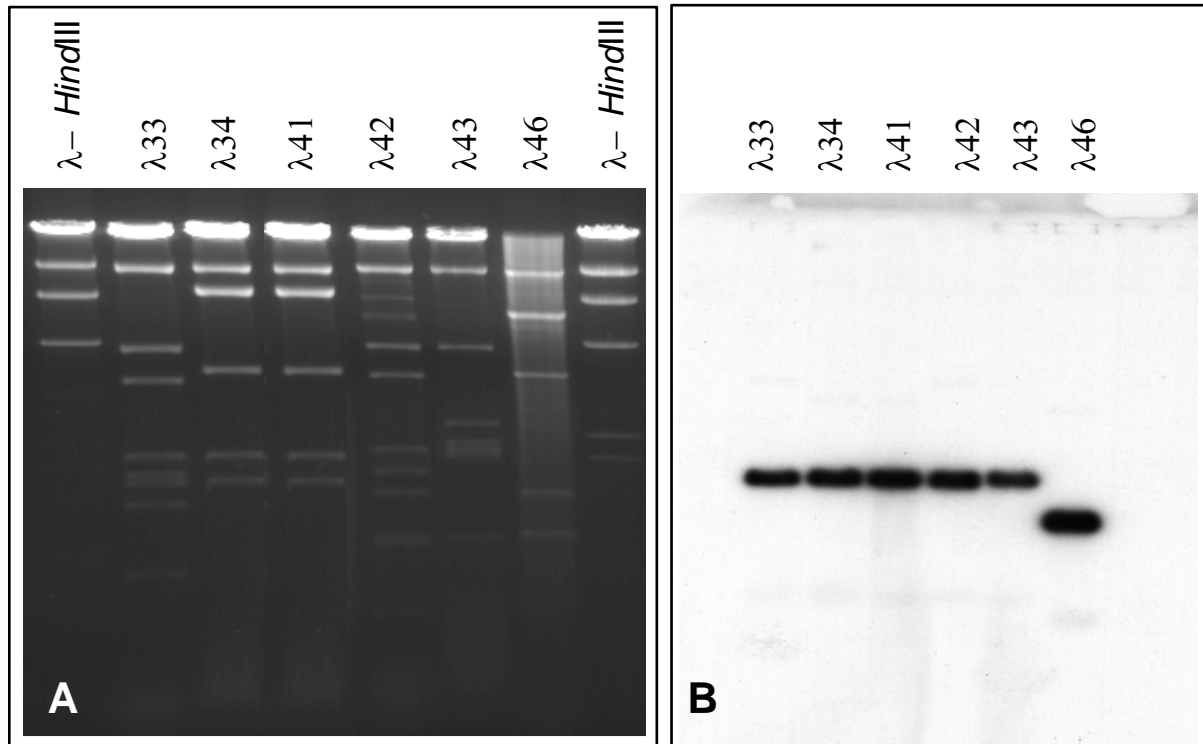


Abb. 3.20: Restriktionsanalyse PERV-rekombinanter λ -Klone

A: *NotI/EcoRI* Restriktionsanalyse der sechs PERV-rekombinanten λ -Klone.

B: Korrespondierender Southern-Blot nach Hybridisierung mit der *pro/pol* Sonde.

Abb. 3.21 zeigt das Resultat der PCR mit der Primern T7-*pol*-for und AG24. Der λ -Klon 46 besitzt demnach eine ~0,5 kb große Deletion im Polymerasegen.

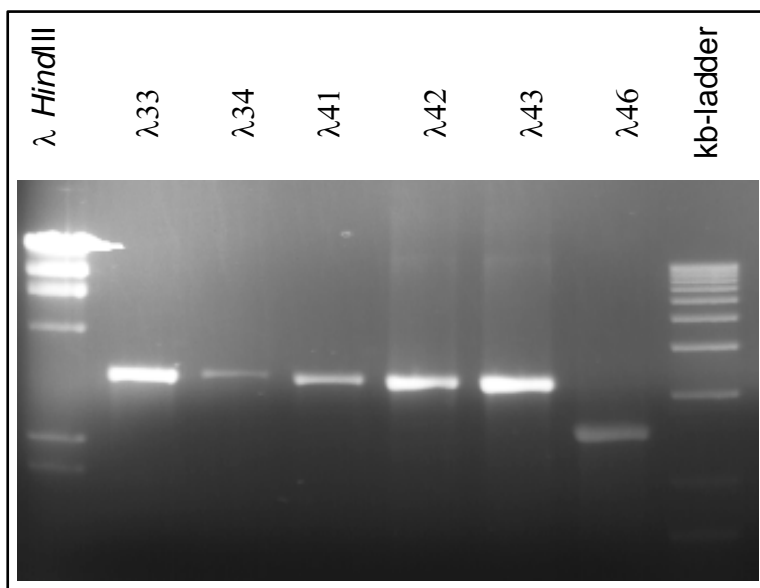


Abb. 3.21: Elektrophoretische Auftrennung der *pol*-Amplifikate (T7-*pol*-for/AG24).

Mit Ausnahmen des Klons λ 46 bandieren die PCR-Produkte entsprechend der erwarteten Größe (3109 bp). Das verkürzte Amplifikat von λ 46 deutet auf eine etwa 0,5 kb große Deletion hin.

3.2.3.1 Subklonierung der λ -Inserts in pBluescript KS (Stratagene)

Um DNA in ausreichenden Mengen zur Charakterisierung bzw. Sequenzierung zu präparieren wurden die Inserts der λ -Klone in den Vektor pBluescript subkloniert. Hierfür wurden je 2 μg der λ -DNA mit *NotI* restringiert, in einem 0,7% TAE-Agarosegel aufgetrennt (Abb. 3.22) und die Inserts aufgereinigt.

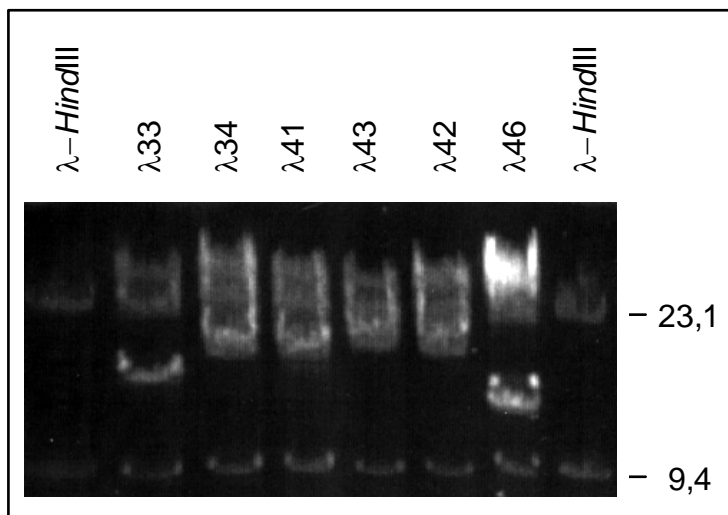


Abb. 3.22: Auftrennung und Aufreinigung der λ -Inserts.

Die Inserts der sechs PERV-rekombinanten λ -Klone wurden mit *NotI* freigesetzt und zur Subklonierung in den Vektor pBlueScript KS aus dem Gel isoliert. Die rekombinanten Inserts bandieren zwischen dem langen Arm (~23 kb) und dem kurzen Arm (~9 kb).

Die Klonierung der Inserts der λ -Klone 33, 34, 42 und 43 wurde erfolgreich durchgeführt. Die Subklonierung des Klons 41, dessen Restriktionsmuster identisch mit dem des Klons 34 war, und die des Klons 46, der eine Deletion im Polymerasegen aufweist, gelang nicht. Die vier verbliebenen Subklone wurden zunächst einer Restriktionsanalyse unterzogen. Die Hybridisierung mit dem Oligonukleotid PK43, welches nach der Sequenzanalyse des Plasmids pPERV-PK26/34 für LTR Sequenzen spezifisch ist, sollte zeigen, ob beide LTRs vorhanden sind oder ob die partielle Restriktion innerhalb der proviralen Sequenz stattgefunden hat. Dieses schien anhand des Southern-Blotanalyse für die Klone 34 und 43 zuzutreffen (Abb. 3.23). Da die Sequenzierung mit dem vektor-spezifischen M13-Primer bestätigte, daß bedingt durch die Klonierung das *env* Gen des Klons λ 34 disruptiert war, wurde dieser Klon nicht weiter charakterisiert. Die Sequenzierung des Klons λ 43 ergab, daß die 5'-LTR fehlt. Der Klon λ 43 besaß die gleichen Deletionen in der 5'-UTR wie das Plasmid pPERV-PK26/34 (Abb. 3.28).

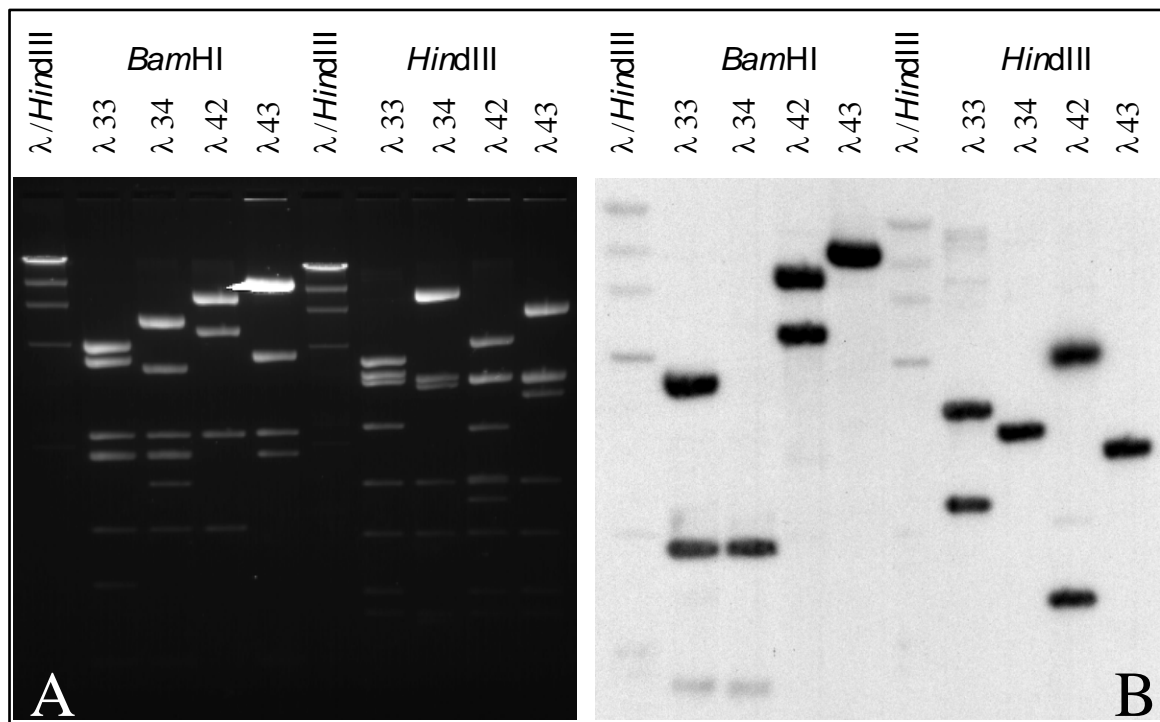


Abb. 3.23: Nachweis der Klonintegrität durch LTR-Hybridisierung

A: *Bam*HI bzw. *Hind*III-Restriktionen der Klone pBS(λ33), pBS(λ34), pBS(λ42) und pBS(λ43).

B: Der korrespondierende Southern-Blot wurde mit dem LTR-spezifischen Oligonukleotid PK43 hybridisiert. Die singulären Hybridisierungssignale der Klone pBS(λ34) und pBS(λ43) deuten auf eine Disruptierung im Provirus hin. Als Längenstandard dienten ECL markierten λ/*Hind*III.

3.2.4 Analyse der PERV Sequenzen

Die proviralen PERV Bestandteile der Subklone pBS(λ33), pBS(λ42) und pBS(λ43) wurden doppelsträngig sequenziert. Alle folgenden Nukleotidangaben beziehen sich auf die längste Sequenz pBS(λ33).

Für alle drei Proviren konnten offene Leserahmen in einer für C-Typ Viren typischen Anordnung nachgewiesen werden (Abb. 3.24). Während in den *gag* und *pol* Leserahmen Homologien von über 98% auf Aminosäureebene für alle drei Proviren untereinander feststellbar sind, findet sich eine hohe Homologie im jeweiligen *env* Gen nur für die Klone λ33 und λ43. Die Homologie für das Hüllprotein des Klons λ42 liegt bei 63,3% bezogen auf den Klon λ33. Sequenzabgleiche mit den publizierten PERV *env* Sequenzen der Klassen A, B und C (Le Tissier *et al.*, 1997) ergab, daß es sich bei den Klonen pBS(λ33) und pBS(λ43) um Mitglieder der Klasse B und bei dem Klon pBS(λ42) um einen Vertreter der Klasse A handelt. Hiernach wurden die die drei isolierten proviralen PERV Klone als pPERV-B(33), pPERV-A(42) und pPERV-B(43) bezeichnet.

In einer detaillierten Analyse erweisen sich die Transmembran-Domänen (TM) des *env* Gens als konserviert (93,9 %), während die Oberflächen-Domänen (SU=surface) größere Variabilität offenbaren (54,7%). Die deutlichsten Unterschiede sind in den als variable Region VR-A und VR-B bezeichneten Abschnitten zu finden. Von MLV weiss man, daß diese Regionen für Peptiddomänen kodieren, die die Rezeptorerkennung determinieren (Battini *et al.*, 1992, Battini *et al.*, 1995).

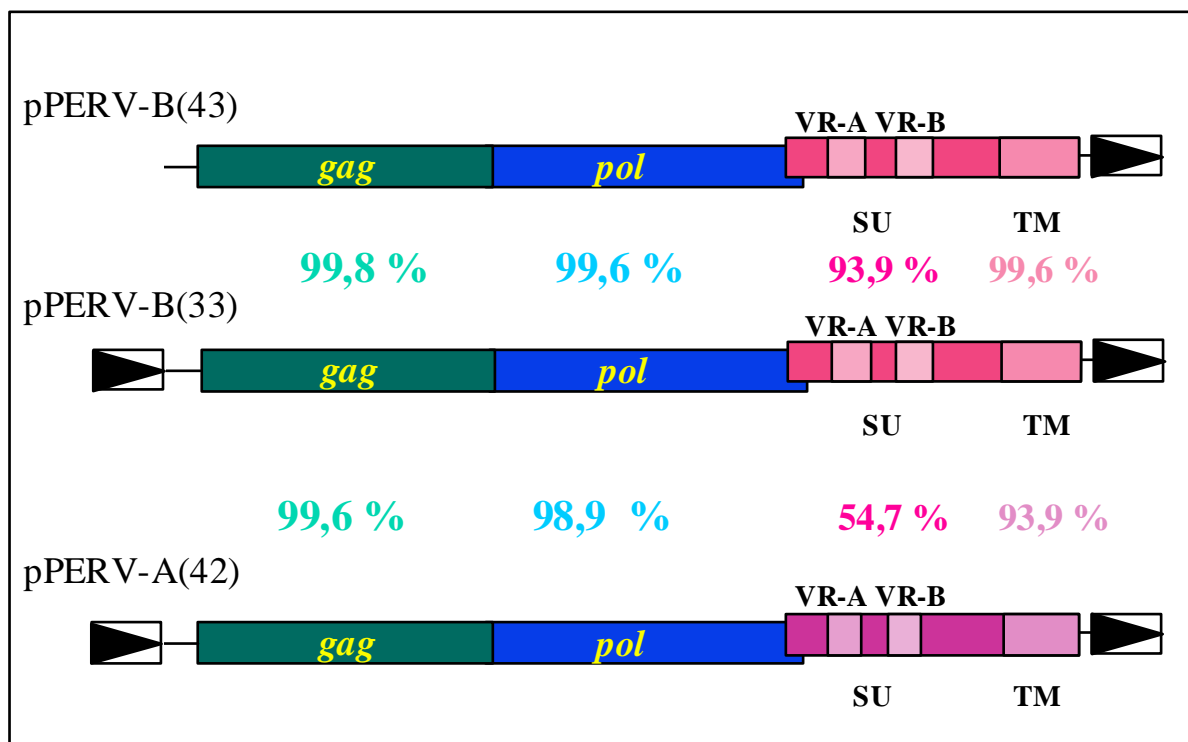


Abb. 3.24: Homologievergleich der PERV-Klone pPERV-B(33), pPERV-A(42) und pPERV-B(43).

Die prozentualen Angaben geben die Aminosäurehomologien der einzelnen ORFs bezogen auf pPERV-B(33) an. Die Oberflächen- (SU) bzw. Transmembrananteile (TM) des Envelope Proteins wurden separat verglichen. Die putativen Rezeptorerkennungsdomänen VR-A und VR-B sind gemustert dargestellt (schematische Darstellung).

Die Existenz eines kurzen offenen Leserahmens (839-895) stromaufwärts des eigentlichen *gag* Gens, wie sie bei allen 3 Proviren zu verzeichnen ist, ist auch von anderen Retroviren bekannt (Coffin, 1996).

Innerhalb des Gag-Pol Polyproteins sind einige hochkonservierte Aminosäuremotive auszumachen. Die Konsensussequenz des Capsidproteins p30 beginnt an Position nt 1775 und endet an der Position nt 2512. Ein Zinkfinger Motiv (Cys-Xaa2-Cys-Xaa4-His-Xaa4-Cys, nt 2513-2728) (Green and Berg, 1989) ist kennzeichnend für das DNA bindende Nucleocapsidprotein (NC, p10) (Meric und Goff, 1989).

Die für die Prozessierung des Gag-Pol Polyproteins verantwortliche Protease (PR) wird durch das *pro* Gen kodiert. Das Stopcodon, welches den *gag-pro-pol* Vorläufer an der Position 2728 trennt, wird durch eine Glutamin-tragende tRNA "ignoriert" (Harada *et al.*, 1979). Eine 75%ige Übereinstimmung zu einem weiteren hochkonservierten Octapeptid Leu^{Leu}/_{Val}-Asp-Thr-Gly-Ala-Glu-His, welches charakteristisch für Aspartylproteasen ist, befindet sich an der Position 2801-2824 (Coffin, 1996). Bei den Proviren PERV-B(33), PERV-A(42) und PERV-B(43) sind nur jeweils zwei Austausche zu verzeichnen.

Das Tetrapeptid YXDD (YVDD an Position nt 3746-3757) ist bei nahezu allen Retroviren zu finden. Die beiden Aspartylreste sind in allen funktionellen RNA-abhängigen DNA und RNA Polymerasen invariant (Xiong und Eickbush, 1990).

Das 3'-Ende des Leserahmens für die reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN) an Position nt 6316 überlappt mit dem Beginn des *env* Leserahmens an Position nt 6189.

Die von Le Tessier *et al.*, 1997 beschriebene Spaltstelle zwischen dem Oberflächenprotein gp70 (SU) und dem Transmembranprotein p15E (TM) befindet sich stromabwärts der Sequenz Arg-Pro-Lys-Arg an der Position nt 7565. Dem *env* Gen schließt sich ein Polypurintrakt (nt 8199-8211) an. Ein putatives Polyadenylierungssignal AATAAA befindet sich an der Position nt 8811-8816.

Eine MatInspector Analyse (Genomatix, München) identifizierte eine PBS komplementär zu den letzten 18 Nukleotiden des 3'-Terminus einer tRNA_{Gly4} an der Position nt 710-727.

3.2.4.1 Vergleich der PERV long terminal repeats (LTR)

Neben den retroviralen Hüllproteinen ist die Wirtszellspezifität durch die LTRs determiniert. Die drei in dieser Arbeit vorgestellten porcinen Proviren unterscheiden sich in den LTRs nur hinsichtlich der Anzahl einer 39 bp Wiederholung innerhalb des U3 Elements (Abb. 3.25). Mit vier Wiederholungen ist die LTR des Klons pPERV-B(33) die längste. Der Klon pPERV-B(43), der wie der Klon pPERV-B(33) zur Subklasse B gehört, weist innerhalb der 3'-LTR nur zwei dieser repetitiven Elemente auf. Mit drei Wiederholungen nimmt der Klon pPERV-B(42) als Vertreter der Klasse A eine Mittelstellung ein. Ein Teil der Sequenzwiederholung (die terminalen 18 bp) ist den Wiederholungen vorgelagert, so daß dieser Bereich insgesamt 2,5-4,5 mal in den jeweiligen LTRs zu finden ist. Ein Vergleich mit den LTRs anderer C-Typ Retroviren offenbart für die Nukleotidabfolge ATTGGTCCA (nt 325-333, 364-372, 403-411, 442-450) eine signifikante Homologie zu einem als "viral core" bezeichneten Sequenzmotiv, welches als Bestandteil eines viralen Enhancers typischerweise als Sequenzwiederholung vorliegt (Golemis *et al.*, 1990). Ob die Variabilität, die in den LTRs

dieser drei Proviren zu verzeichnen ist, einen Einfluß auf die Aktivität des Promotors hat, soll in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Die LTRs werden begrenzt durch die terminalen inversen Sequenzwiederholungen TGAAAGG/CCTTTCA, die für die virale Integration von Bedeutung sind (Panganiban und Temin, 1983). Eine TATA-Box als Teil des retroviralen Promoters befindet sich an Position nt 517-522 (Ostrowski *et al.*, 1981).

LTR- λ 33	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
LTR- λ 42	TGAAAGGATG	AAAATGC AAC	CTAACCCCTCC	CAGAACCACG	GAAGTTAATA	AAAAGCTCTA	AATGCCCCCG	AATTCCAGAC	CCTGCTGGCT	GCCAGTAAAT
LTR- λ 43	TGAAAGGATG	AAAATGC AAC	CTAACCCCTCC	CAGAACCACG	GAAGTTAATA	AAAAGCTCTA	AATGCCCCCG	AATTCCAGAC	CCTGCTGGCT	GCCAGTAAAT
<u>IR</u>										
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
	AGGTAGAAGG	TCACACTTCC	TATTGTTCCA	GGGCCTGCTA	TCCTGGCCTA	AGTAAGATAA	CAGGAAATGA	GTTGACTAAT	CGCTTATCTG	GATTCTGTAA
	AGGTAGAAGG	TCACACTTCC	TATTGTTCCA	GGGCCTGCTA	TCCTGGCCTA	AGTAAGATAA	CAGGAAATGA	GTTGACTAAT	CGCTTATCTG	GATTCTGTAA
	AGGTAGAAGG	TCACACTTCC	TATTGTTCCA	GGGCCTGCTA	TCCTGGCCTA	AGTAAGATAA	CAGGAAATGA	GTTGACTAAT	CGCTTATCTG	GATTCTGTAA
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
	AACTGACTGG	CACCATAGAA	GAATTGATTA	CACATTGACA	GCCCTAGTGA	CCTATCTCAA	CTGCAATCTG	TCACTCTGCC	CAGGAGCCCA	CGCAGATGCG
	AACTGACTGG	CACCATAGAA	GAATTGATTA	CACATTGACA	GCCCTAGTGA	CCTATCTCAA	CTGCAATCTG	TCACTCTGCC	CAGGAGCCCA	CGCAGATGCG
	AACTGACTGG	CACCATAGAA	GAATTGATTA	CACATTGACA	GCCCTAGTGA	CCTATCTCAA	CTGCAATCTG	TCACTCTGCC	CAGGAGCCCA	CGCAGATGCG
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
	GACCTCCGGA	GCTATTTTAA	AATGATTGGT	CCACGGAGCG	CGGGCTCTCG	ATATTTTAAA	ATGATTGGTC	CACGGAGCGC	GGGCTCTCGA	TATTTTAAAA
	GACCTCCGGA	GCTATTTTAA	AATGATTGGT	CCACGGAGCG	CGGGCTCTCG	ATATTTTAAA	ATGATTGGTC	CACGGAGCGC	GGGCTCTCGA	TATTTTAAAA
	GACCTCCGGA	GCTATTTTAA	AATGATTGGT	CCACGGAGCG	CGGGCTCTCG	ATATTTTAAA	ATGATTGGTC	CACGGAGCGC	GGGCTCTCGA	TATTTTAAAA
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
	TGATTGGTCC	ACGGAGCCCG	GGCTCTCGAT	ATTTTAAAA	GATTGGTCCA	CGGAGCGCGG	GCTCTCGATA	TTTTAAAAATG	ATTGGTTTGT	GACGCACAGG
	TGATTGGTCC	ACGGAGCCCG	GGCTCTCGAT	ATTTTAAAA	GATTGGT---	-----	-----	-----	-----TTGT	GACGCACAGG
	TGATTGGT---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----TTGT	GACGCACAGG
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
	CTTTGTTGTG	AACCCCATAA	AAGCTGTCCC	GATTCGCGAC	TCGGGGCCGC	AGTCCTCTAC	CCCTGCGTGG	TGTACGACTG	TGGGCCCCAG	CGCGCTTGGA
	CTTTGTTGTG	AACCCCATAA	AAGCTGTCCC	GATTCGCGAC	TCGGGGCCGC	AGTCCTCTAC	CCCTGCGTGG	TGTACGACTG	TGGGCCCCAG	CGCGCTTGGA
	CTTTGTTGTG	AACCCCATAA	AAGCTGTCCC	GATTCGCGAC	TCGGGGCCGC	AGTCCTCTAC	CCCTGCGTGG	TGTACGACTG	TGGGCCCCAG	CGCGCTTGGA
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
	ATAAAAAATCC	TCTTGCTGTT	TGCATCAAGA	CCGCTTCTCG	TGAGTGATTT	GGGGTGTGCG	CTCTTCCGAG	CCCGGACGAG	GGGGATTGTT	CTTTTACTGG
	ATAAAAAATCC	TCTTGCTGTT	TGCATCAAGA	CCGCTTCTCG	TGAGTGATTT	GGGGTGTGCG	CTCTTCCGAG	CCCGGACGAG	GGGGATTGTT	CTTTTACTGG
	ATAAAAAATCC	TCTTGCTGTT	TGCATCAAGA	CCGCTTCTCG	TGAGTGATTT	GGGGTGTGCG	CTCTTCCGAG	CCCGGACGAG	GGGGATTGTT	CTTTTACTGG
	710									
	CCTTTCA									
	CCTTTCA									
	CCTTTCA									
<u>IR</u>										

Abb. 3.25: Sequenzvergleich der PERV LTRs.

Die Klone differieren in der Anzahl der Wiederholungen eines 39 bp Motivs (farbig hervorgehoben). Eine retrovirale TATA-Box an Nukleotidposition 517-522 ist durch Fettdruck hervorgehoben. Die terminalen inversen Sequenzwiederholungen (IR, inverted repeats) sind unterstrichen dargestellt. Weitere Erläuterungen im Text.

3.3 Klonierung eines replikationskompetenten PERV durch Kombination von pPERV-PK28/29 und pPERV-B(33)

Die Sequenz des Klons pPERV-B(33) besitzt zwar offene Leserahmen für alle retroviralen Gene, doch zeigt der Vergleich mit der PERV-B *env* Sequenz nach Takeuchi *et al.* (1997), daß eine Punktmutation (G zu A, nt 6191) das erste Startcodon des *env* Gens mutiert. Das nächste im Leserahmen gelegene ATG des *env* Gens ist 504 bp stromabwärts (nt 6693-6695) lokalisiert. Der Klon pPERV-B(33) sollte daher in Ermangelung eines funktionellen Hüllproteins seine Infektiosität einbüßen. Um diese Hypothese experimentell zu untersuchen, wurde der Bereich, der das defekte Startcodon (ATA, nt 6189-6191) beinhaltet, durch den entsprechenden Bereich des Plasmids pPERV-PK28/29 substituiert (Abb. 3.27). Hierfür bot sich das *Bst*GI-Restriktionsfragment (nt 5920-7245) an, da es das deletierte Nukleotid (nt

5573) des Plasmids pPERV-PK28/29 ausspart und das ATG (nt 6189-6191) enthält. Innerhalb der 1325 bp differieren die beiden Klone an insgesamt vier Nukleotidpositionen (99,7% Homologie). Neben der gewünschten Reversion des Startcodons (Isoleucin zu Methionin, nt 6189-6191) hat die Rekombination der beiden Klone drei weitere Aminosäureaustausche zur Folge (Asparaginsäure zu Glycin, nt 6561-6563; Glycin zu Glutaminsäure, nt 6567-6569; Serin zu Prolin, nt 7004-7006).

Da in dem chromosomalen Anteil (humane Sequenz) der Insert-DNA von pPERV-B(33) eine weitere *BsrGI*-Schnittstelle vorhanden ist (Abb. 3.26, Spur 2), konnte der Austausch der Restriktionsfragmente nur nach Umklonierung erfolgen. Hierfür wurde das 5089 bp *EcoRV/SphI* Fragment (nt 2321-7410; Abb. 3.26, Spur 7) des Plasmids pPERV-B(33) in den Vektor pGEM5 kloniert. Nach Substitution der *BsrGI* Fragmente wurde aus dem Klon pGEM5(*EcoRV*-pBS(λ 33)ATG-*SphI*) das 2211 bp große *NdeI/SphI*-Fragment (nt 5199-7410; Abb. 3.26, Spur 8) isoliert und in das entsprechend restringierte Plasmid pPERV-B(33) kloniert.

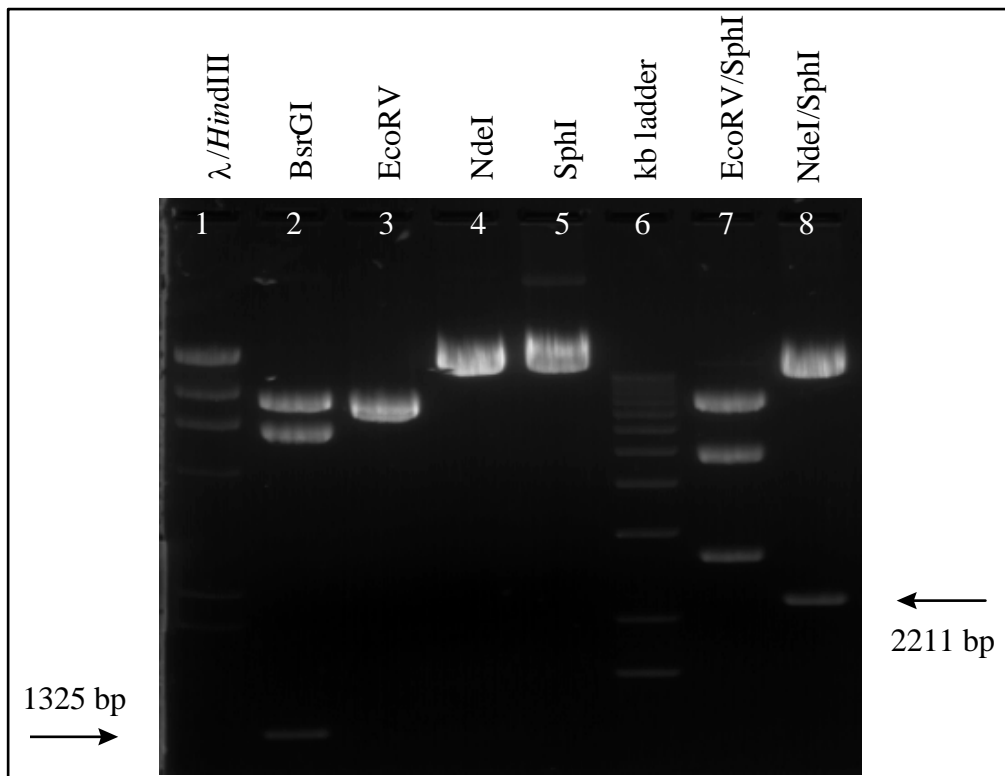


Abb. 3.26: Restriktionskartierung des Klons pPERV-B(33)

Neben den beiden Erkennungsstellen, die das gewünschte *BsrGI*-Fragment von 1,325 kb (Spur 2, Pfeil) freisetzen, existiert eine dritte Schnittstelle innerhalb des Plasmids pPERV-B(33) (Spur 2). *EcoRV* schneidet zweimal im Plasmid pPERV-B(33) (Spur 3). *NdeI* und *SphI* konnten als "Single-Cutter" identifiziert werden (Spuren 4 und 5). Nach Austausch der *BsrGI* Fragmente wurde das 2211 bp große *NdeI/SphI* Fragment (Spur 8, Pfeil) des Plasmids pGEM5(*EcoRV*-pBS(λ 33)ATG-*SphI*) in das Plasmid pPERV-B(33) umkloniert. Weitere Erläuterungen im Text.

Die vollständige Klonierungsstrategie zur Restaurierung des *env* ATG in pPERV-B(33) ist in Abb. 3.27 zusammengefaßt. Das Resultat dieser Rekombination war das Plasmid pPERV-B(33)/ATG, welches sich von dem Klon pPERV-B(33) dadurch unterscheidet, daß es für ein intaktes Hüllprotein mit adäquatem Startcodon kodiert.

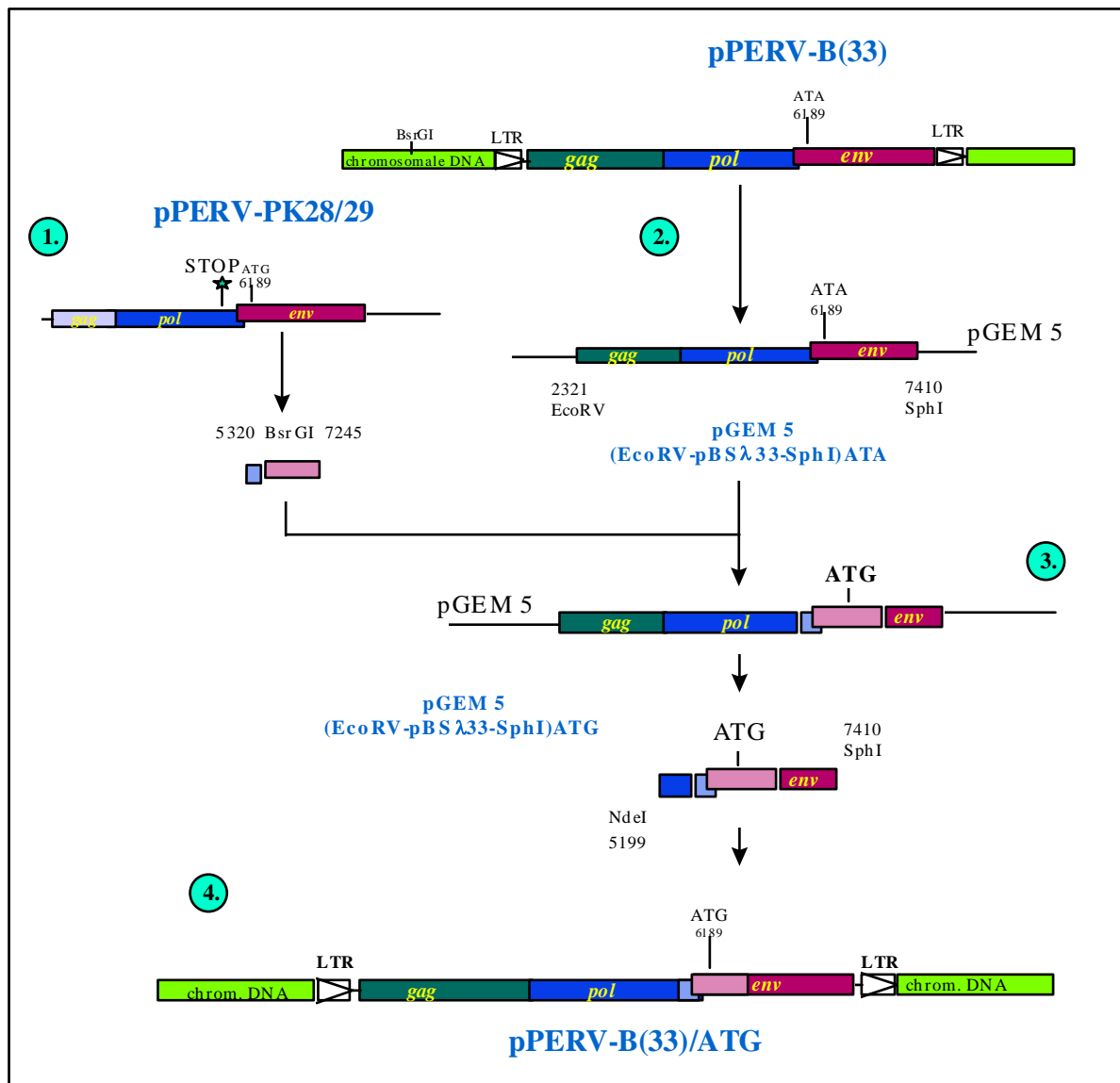


Abb. 3.27: Schema der Klonierung der *env* Sequenz von pPERV-PK28/29 in pPERV-B(33).

Durch den Austausch des BsrGI-Fragmentes (gemustert dargestellt) aus dem Klon pPERV-PK28/29 (1.) in den Klon pPERV-B(33) erhält dieser ein *env* Startcodon (3.). Die Zwischenklonierung in den Vektor pGEM5 war aufgrund einer weiteren BsrGI-Erkennungsstelle in dem chromosomalen Anteil des Plasmids pPERV-B(33) erforderlich (2.). Das Resultat dieser Klonierung Plasmid pPERV-B(33)/ATG (4.), unterscheidet sich von pPERV-B(33) an vier Nukleotidpositionen, die jeweils zu Aminosäureaustauschen führen. Weitere Erläuterungen im Text.

Die Replikationsfähigkeiten und die Infektiosität von exprimierten PERV sollten im Folgenden nach Einschleußen dieser Plasmide in suszeptible Zellen durch Transfektion untersucht werden.

3.4 Rekonstitution des Genortes PERV-B(43)

Die Sequenzierung des Klon pPERV-B(43) offenbarte, daß der *Sau3AI*-Partialverdau beim Anlegen der Phagenbibliothek die 5'-LTR und Teile der 5'-UTR an der Position nt 775 disruptiert hat. Die Abb. 3.28 zeigt, daß im Überlappungsbereich der Klone PERV-PK26/34 und pPERV-B(43) zwei identische Deletionen im Bezug auf die Sequenz pPERV-B(33) vorliegen. Diese Tatsache und die Identität der durch PCR generierten 5'-LTR des Klon PERV-PK26/34 zu der 3'-LTR des Klon pPERV-B(43) läßt den Schluß zu, daß die PCR, die zum Klon PERV-PK26/34 führte, auf dem Genort des Klon λ 43 stattgefunden hat. Eine Rekombination der beiden Plasmide sollte somit das Provirus wiederherstellen, wie es in der Zelllinie 293 PERV-PK vorliegt.

	780	790	800	810	820	830	840
pPERV-B(33)	GATCCC	CTTTGGAACG	TGTGTGTGTG	TCGGCCGGCG	TCTCTGTTCT	GAGTGTCTGT	TTTCGGTGAT
PERV-PK26/34	GATCCC	CTTTGGAACG	TGTGTGTGTG	TCGGCCGGCG	TCTCTGTTCT	GAGTGTC...	TTC.....
pPERV-B(43)	GATCCC	CTTTGGAACG	TGTGTGTGTG	TCGGCCGGCG	TCTCTGTTCT	GAGTGTC...	TTC.....
	850	860	870	880	890	900	910
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CC	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC	CT	CG	GG	GC	CG
	TC	AG	CT	TA	AG	GC	TA
	CA	C	C	A	G	C	A
	GC	GG	TG	GAC	ACT	TGT	AG
	CG	TT	TC	CG	TG	GAT	AC
	CT	GC					

*Sac*II-Restriktionsstelle an der Nukleotidposition nt 1034, die sowohl innerhalb des Amplifikates als auch in der pPERV-B(43) Sequenz durch Sequenzierung bestimmt werden konnte. Durch die Endonuclease *Sac*II wird ein ~18 kb großes Fragment aus dem Plasmid pPERV-B(43) freigesetzt, welches in das entsprechend restringierte Plasmid pCRII-TOPO(PERV-LTR/PK26) ligiert wurde. Das Plasmid pPERV-B(43)/LTR beherbergt damit ein intaktes Provirus mit Ausnahme der stromaufwärts der 5'-LTR gelegenen direkten Sequenzwiederholung, wie es auch in der Zelllinie 293 PERV-PK zu finden sein muß.

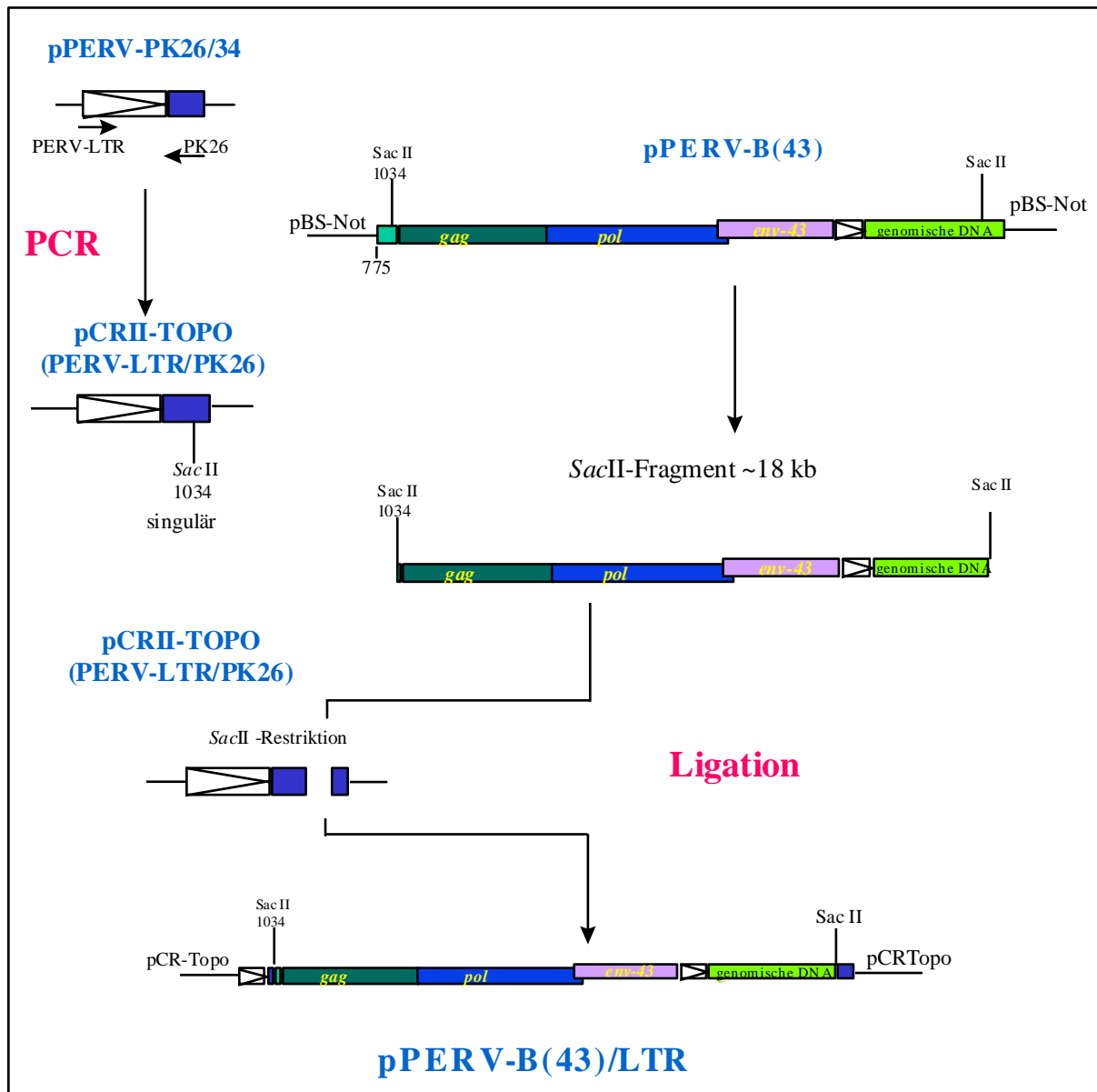


Abb. 3.29: Klonierungsschema zur Rekonstitution des PERV-B(43) Genortes.

Das Plasmid pPERV-PK26/34 diente als Template für die Generierung der 5'-LTR/UTR-Region, in die nach Klonierung in den T/A-Vektor pCRII-TOPO das *Sac*II-Fragment des Plasmids pPERV-B(43) ligiert wurde.

3.5 Charakterisierung der PERV-Genomstruktur

Parallel zu der Sequenzierung der PERV-Klone wurde mit der Analyse der retroviralen mRNA Expressionscharakteristika begonnen. Hierfür wurde RNA aus der Zelllinie 293 PERV-PK isoliert und für RT-PCR und Northern-Blot Analysen eingesetzt.

3.5.1 Identifizierung der Cap Site

Die Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes erfolgte durch eine Primer Extension (Abb. 3.30). Hierfür wurde das 5'-Ende des Primers PERV-PK-PE durch Kinasierung radioaktiv markiert und für eine cDNA Synthese auf 293 PERV-PK mRNA eingesetzt. Im Anschluß an eine RNaseH Behandlung wurde das endmarkierte Transkript in einem 6%igem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Parallel hierzu erfolgte die Auftrennung einer Didesoxy-Sequenzierung des Plasmids pPERV-PK26/34 mit unmarkiertem Primer PK-REV-PE, um den Transkriptionsstart lokalisieren zu können. In der Spur der mit dem endmarkierten Primer hergestellten cDNA sind 2 bis 3 Signale zu erkennen. Anhand eines Basenpaarabgleiches konnte die Cap Site an Nukleotidposition 545 lokalisiert werden.

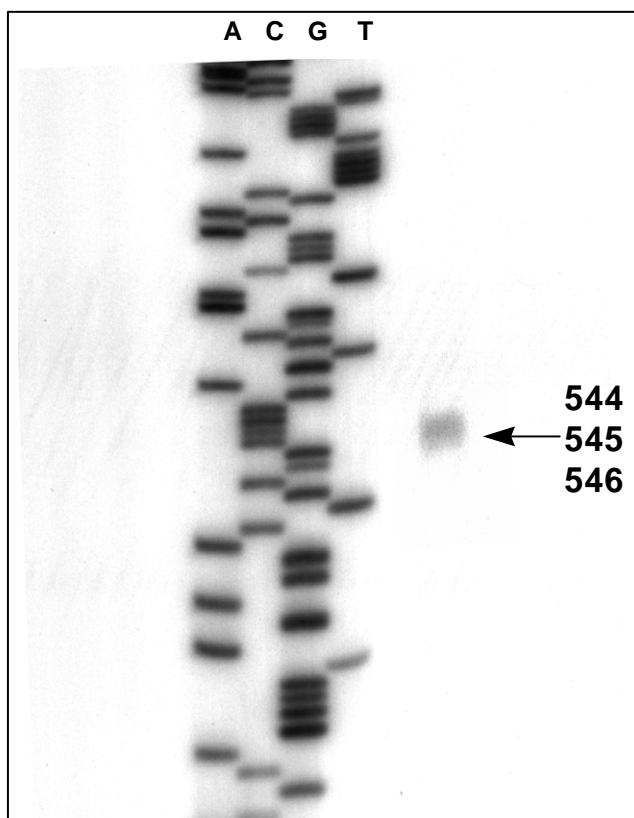


Abb. 3.30: Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes durch Primer Extension.

Der ^{32}P -endmarkierte Primer PERV-PK-PE wurde in einer reversen Transkription auf mRNA aus 293 PERV-PK elongiert und parallel mit einer Vierspur-Sangersequenzierung des Plasmids pPERV-PK26/34 auf einem 6% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Autoradiogramm zeigt den Transkriptionsstart um die Nukleotidposition nt 545.

3.5.2 Bestimmung von Splice Donor und Akzeptor

Die experimentelle Bestimmung der Spleißstellen erfolgte durch eine PCR mit der Primerpaarung PERV-PBS/*env*-R auf einer 293 PERV-PK cDNA. Der Vorwärtsprimer hybridisiert in der PBS und der reverse Primer in der SU-Domäne des *env* Gens (Abb. 3.31).

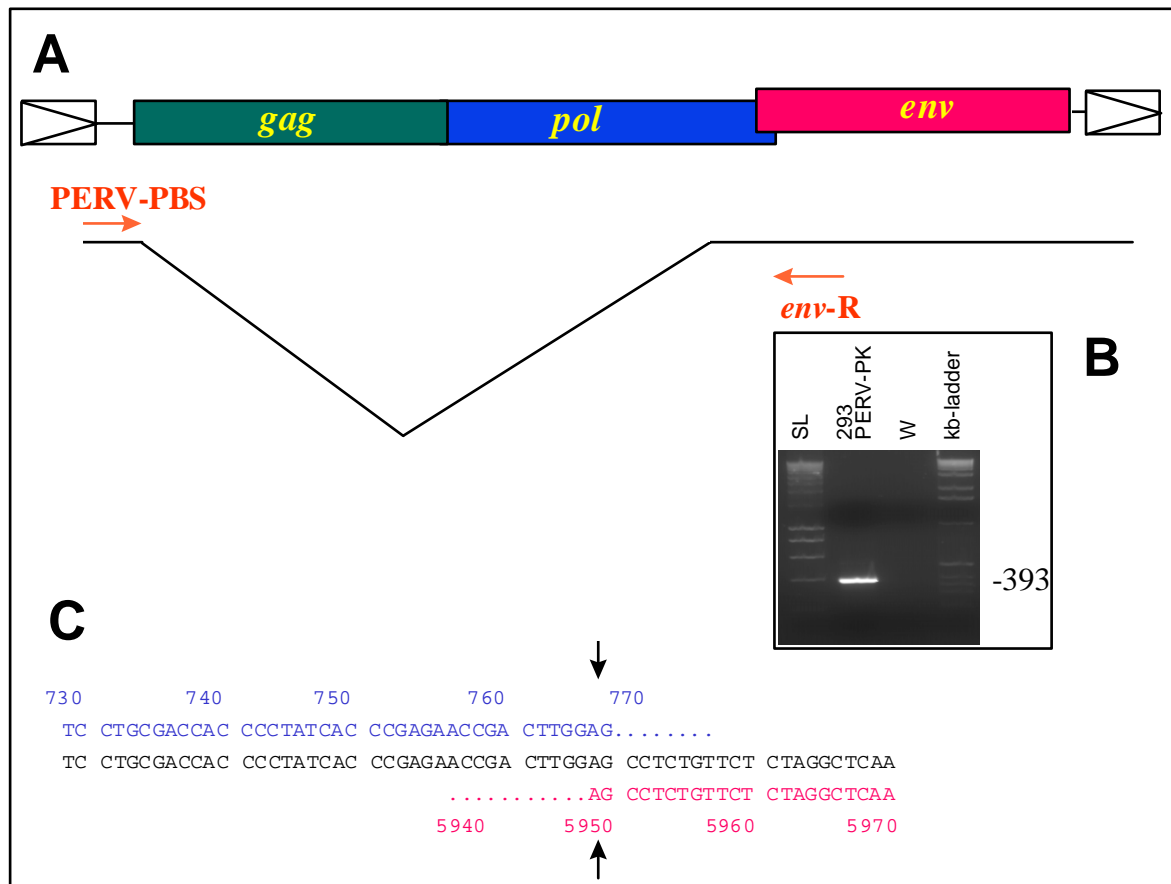


Abb. 3.31: Bestimmung der Splicestellen durch Sequenzierung einer subgenomischen cDNA nach PCR Amplifikation.

A: Schematische Darstellung der Lokalisation der verwendeten Primer PERV-PBS und *env*-R.

B: Das 393 bp PCR-Produkt, das auf einer 293 PERV-PK cDNA generiert wurde (Spur 2), wurde in einen T/A-Vektor kloniert. Als Längenstandards wurden die Smartladder und die kb ladder mitgeführt.

C: Der Vergleich der RT-PCR Sequenz (schwarz) mit der proviralen UTR Sequenz (blau) und der *env* Sequenz (rot) identifiziert den Splice Donor und den korrespondierenden Splice Akzeptor an den Positionen nt 766 und nt 5949 (Pfeile).

Das Profil für die PCR wurde so gewählt, daß in einer kurzen Elongationsphase von 45 sec kein Amplifikat von einer Vollängen cDNA mit diesen Primern generiert werden konnte. Das entstehende Amplifikat kann daher nur von einer subgenomischen cDNA stammen. Das PCR-Produkt wurde kloniert und sequenziert. Der Splice Donor wurde so an der Position nt 766 und der korrespondierende Splice Akzeptor an der Nukleotidposition 5949 kartiert.

3.6 Nachweis von PERV-Transkripten in infizierten 293 Zellen

In Northern-Blot Analysen wurde gesamt-cytoplasmatische RNA der Zelllinien 293 PERV-PK und 293 aufgetragen und mit der *pro/pol* Sonde sowie mit einer U5 Sonde hybridisiert (Abb. 3.32 B, 3.32 C). Während die *pro/pol* Sonde nur mit einem ~8 kb großen Vollängentranskript in der mit PERV infizierten Zelllinie 293 PERV-PK hybridisiert, wurde die U5 Probe eingesetzt um subgenomische Transkripte zu identifizieren. Neben dem Vollängentranskript konnte nur ein weiteres subgenomisches Transkript von ~3 kb Größe nachgewiesen werden, das nach Rehybridisierung mit *env-A* (Abb. 3.32 D) und *env-B* (Abb. 3.32 E) Sonden als *env* mRNA identifiziert werden konnte.

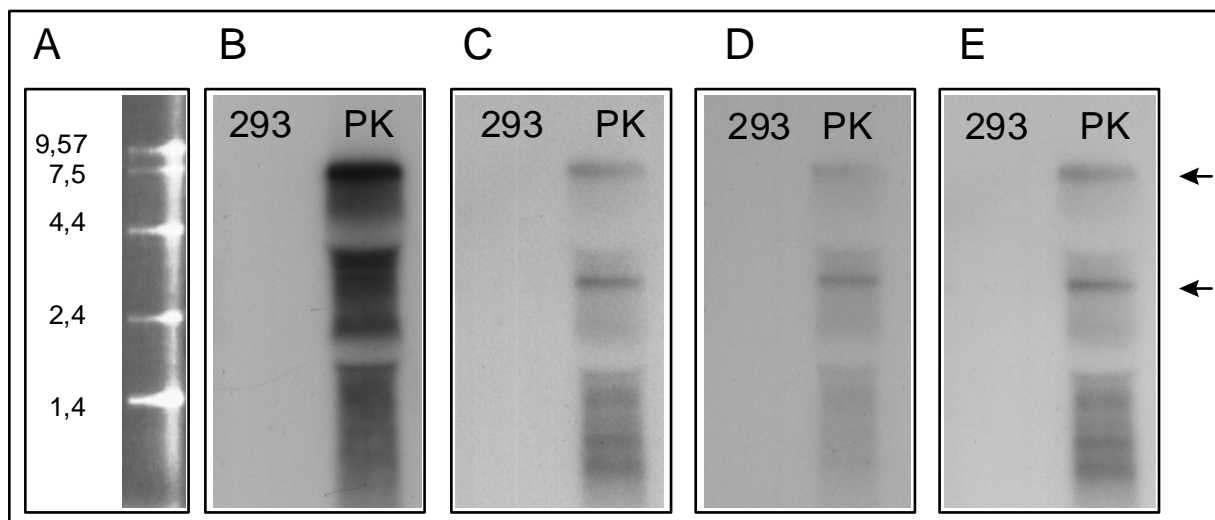


Abb. 3.32: Northern-Blot Analysen der Zelllinien 293 und 293 PERV-PK.

Cytoplasmatische RNA, isoliert aus den Zelllinien 293 und 293 PERV-PK (PK), wurde mit der *pro/pol* Sonde (B), mit einer U5-Sonde (C) sowie mit *envA*- (D) und *envB*-spezifischen Sonden (E) hybridisiert. Der RNA Längenstandard (Life Technologies) wurde vor dem Transfer abgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt (A). Die Pfeile deuten auf das etwa 8 kb große Vollängentranskript sowie die ca. 3 kb große subgenomische RNA hin.

3.7 Transfektion geeigneter Zelllinien mit porcinen endogenen Retroviren

Nach der Subklonierung wurden 1-10 µg endotoxinfreie DNA der Plasmide pPERV-B(33), pPERV-A(42) und pPERV-B(43) durch Lipofektion in die suszeptible Zelllinie 293 eingebracht. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden unter identischen Bedingungen parallel 5 µg des Plasmids pCMV(β-Gal) transfiziert. Die lichtmikroskopische Auswertung

eines X-Gal-Test ergab eine Transfektionseffizienz von 15 bis 20%. Die Zellen wurden für eine fortdauernde Kultivierung expandiert.

Der Nachweis der Integration in die genomische DNA der transfizierten Zellen wurde einige Wochen p.T. mittels PCR erbracht (Abb. 3.33). Durch Verwendung differentieller Primer konnte auch zwischen den Klassen A und B unterschieden werden (1. Amplifikation mit PK17/PK19; nested PCR mit *envA* for/*envA* rev bzw. *envB* for/*envB* rev) (Abb. 3.33).

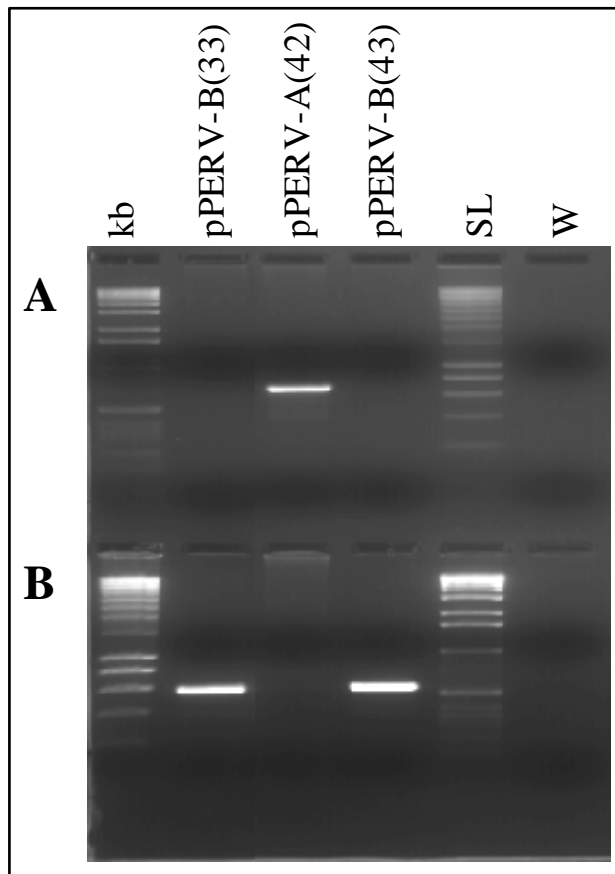


Abb. 3.33: Differentielle *envA*/*envB* PCR Diagnostik auf genomischer DNA.

Nested PCR mit differentiellen Primern (1. PCR mit den Primern PK17/PK19).

A: Elektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte *envA* for/*envA* rev. Ein PCR Produkt der erwarteten Größe ist nur auf genomischer DNA von Zellen, die mit pPERV-A(42) transfiziert worden sind, nachweisbar.

B: Elektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte *envB* for/*envB* rev. Der Erwartung entsprechend, sind Amplifikate nur auf DNA von Zellen nachweisbar, die mit den Plasmiden pPERV-B(33) und pPERV-B(43) transfiziert wurden.

3.7.1 Nachweis von RT-Aktivität in zellfreien Überständen von PERV-Plasmid transfizierten 293 Zellen

Das Replikationsverhalten von Virionen in Zelllinien wurde durch einen Assay, der die Aktivität der retroviralen Transkriptasen nachweist, verfolgt. Auch 12 Wochen p.T. war in den zellfreien Überständen der mit den Plasmiden pPERV-B(33), pPERV-A(42) und pPERV-B(43) transfizierten 293 Zellen keine Aktivität viraler reverser Transkriptasen nachweisbar (Abb. 3.34). Nachdem die Sequenzierungen abgeschlossen waren, konnten diese Befunde zumindest für die Klone pPERV-B(33) und pPERV-B(43) nachvollzogen werden. Unklar blieb die Replikationsinkompetenz des Vertreters der A-Klasse pPERV-A(42). Ein offensichtlicher Defekt, wie ein mutiertes *env* Startcodon oder das Fehlen der 5'-LTR, wie er für die Klone pPERV-B(33) und pPERV-B(43) nachgewiesen wurde, konnte nicht gefunden werden.

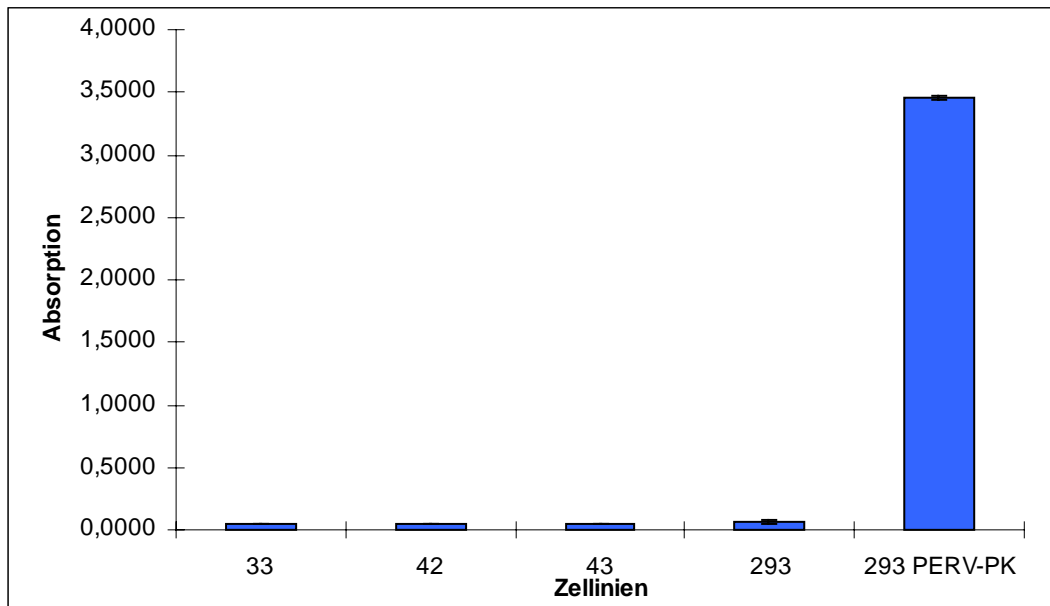


Abb. 3.34: Bestimmung der RT-Aktivität der mit den Plasmiden pPERV-B(33), pPERV-A(42) und pPERV-B(43) transfizierten 293 Zellen.

Zellfreie Kulturüberstände (filtriert durch 0,45 µm -Sartorius Minisart®) wurden als Substrat für den Lenti- RT™ Activity Test (Cavidi Tech AB Uppsala, Schweden) eingesetzt. (Die Durchführung und Auswertung des RT-Assays erfolgte durch Nicole Fischer).

3.8 Untersuchung der rekombinanten Plasmide pPERV-B(33)/ATG und pPERV-B(43)/LTR

Im Anschluß sollte geklärt werden, ob die rekombinanten Klone pPERV-B(33)ATG und pPERV-B(43)/LTR sich analog zu den Ursprungsplasmiden verhalten, oder ob die Defekte in jenen ursächlich für die Replikationsinkompetenz der Klone pPERV-B(33) und pPERV-B(43)

waren. Zu diesem Zweck wurde die Zelllinie 293 mit den rekombinanten Konstrukten pPERV-B(33)/ATG und pPERV-B(43)/LTR transfiziert. Zusätzlich wurde ein Gemisch (1:1) aus den Plasmiden pPERV-B(33)/ATG und pPERV-A(42) transfiziert. Diese Koftransfektion sollte die Situation, wie sie in der Zelllinie 293 PERV-PK vorzufinden ist, also eine Koexistenz von Proviren der Klasse A und B, partiell simulieren, um zu überprüfen, ob eine Komplementation erforderlich ist.

3.8.1 Nachweis von PERV-Proteinen mittels indirekter Immunfluoreszenz

Die Produktion von viralen Proteinen sollte in diesem Experiment zusätzlich durch die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie mit Hilfe kreuzreaktiver Antiseren nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurde eine Verwandtschaftsanalyse der Gag Proteine zu anderen C-Typ Retroviren vorgenommen. Abb. 3.35 zeigt das Ergebnis, das für einige ausgewählte animale Retroviren erzielt wurde.

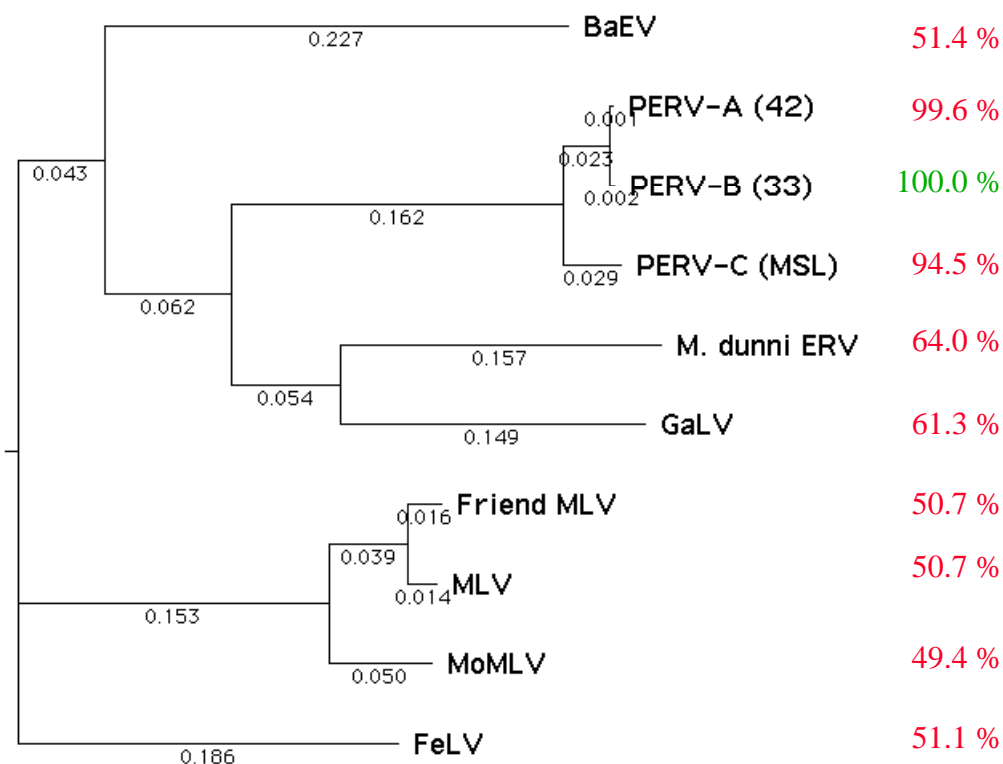


Abb. 3.35: Vergleich der Aminosäurehomologien unterschiedlicher C-Typ Gag Proteine.

Mit Ausnahme der Sequenzen PERV-A(42) und PERV-B(33) entstammen die verwendeten Sequenzen aus der EBI-Datenbank: Die relativen Verwandtschaftsgrade wurden mit Hilfe des Programms MacVector unter Verwendung von ClustalW ermittelt, wobei die Sequenz des PERV-B(33) Gag Proteins als Anker (100%) gesetzt wurde.

Experimentell wurden Kaninchen-Antiseren, die gegen das p27 Protein des felines Leukämievirus (FeLV) bzw. gegen das gesamte Rauscher-Leukämievirus (RLV) gerichtet sind, eingesetzt.

293 Zellen, die mit den Plasmiden pPERV-B(33)ATG, pPERV-A(42) und pPERV-B(43)/LTR transfiziert wurden sowie 293 Zellen als Negativkontrolle und 293 PERV-PK Zellen als Positivkontrolle wurden in Sechslöchplatten ausgesät und fixiert. Abb. 3.36 stellt zusammenfassend die Ergebnisse dar. Die kreuzreaktiven Antiseren sind prinzipiell geeignet, um die Expression von PERV Gag Proteinen mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie zu detektieren, wie es anhand der Positivkontrolle und der mit pPERV-B(33)ATG transfizierten 293 Zellen zu sehen ist. Für mit pPERV-A(42) und pPERV-B(43) transfizierten Zellen lassen sich ebenfalls vereinzelt Zellen finden, die PERV Gag produzieren. Die Präimmunsere ergaben vergleichbare Bilder wie sie für die Negativkontrolle (293 Zellen) verzeichnet werden konnten (nicht gezeigt).

Der immunologische Nachweis von PERV Proteinen in den transfizierten Zellpopulationen erfolgte 2 Wochen (für 293 pPERV-B(33)/ATG, 293 pPERV-B(43)/LTR sowie die Kotransfektion der Plasmide pPERV-B(33)/ATG + pPERV-A(42)) bzw. 8 Wochen p.T. (im Fall von 293 pPERV-A(42)). Es ließen sich deutliche Unterschiede hinsichtlich der prozentualen Anteile PERV-positiver Zellen für die einzelnen Klone ausmachen. Innerhalb der mit pPERV-B(33)ATG transfizierten 293 Zellen sind kaum noch Zellen auszumachen, die keine PERV Proteine produzieren. Der Anteil PERV-positiver Zellen nach Transfektion mit pPERV-B(43)/LTR lag bei etwa 20-40% (Abb. 3.36). Obwohl der Klon pPERV-A(42) die längste Kultivierungsdauer aufwies, war eine Expression von PERV-Proteinen nur in vereinzelt 293 Zellen nachweisbar (Abb. 3.36). pPERV-A(42) unterscheidet sich von den anderen beiden Proviren im *env* Gen, da er ein Vertreter der A-Klasse ist. Hinsichtlich der identischen Sequenzwiederholungen innerhalb der LTR nimmt der Klon eine Mittelstellung ein (s. Abb. 3.25). In späteren Experimenten wurden auch HeLa Zellen mit den Plasmiden transfiziert. Hier zeigte PERV-A(42) eine effiziente Expression mit nachfolgender Replikation (nicht gezeigt).

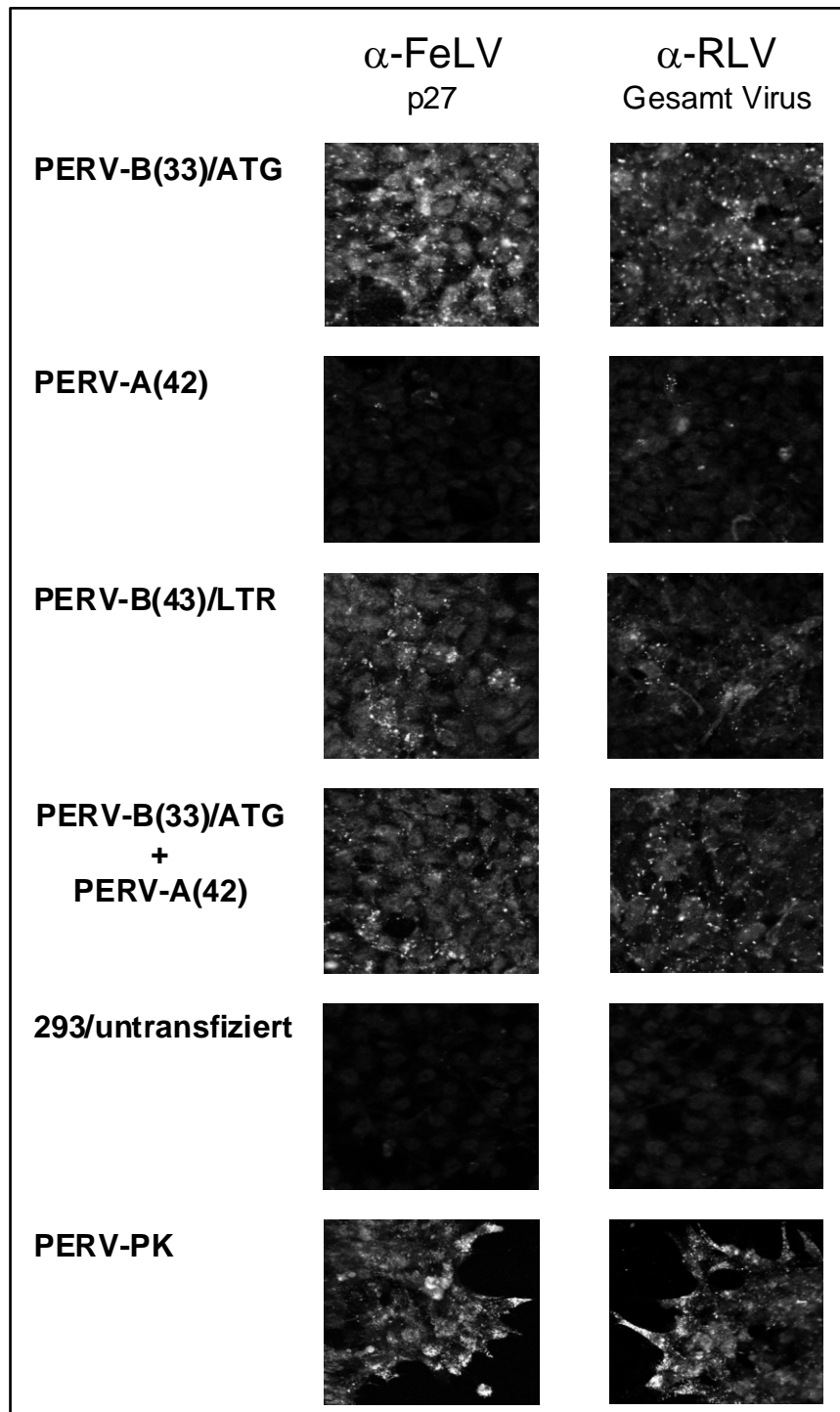


Abb. 3.36: Nachweis der PERV Protein Expression durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie.

Die Expression retroviraler Proteine in 293 Zellen nach Transfektion mit den Plasmiden pPERV-B(33)ATG, pPERV-A(42) und pPERV-B(43)/LTR wurde mit Hilfe kreuzreaktiver Antiseren nachgewiesen. Die Kotransfektion der Plasmide pPERV-B(33)/ATG und pPERV-A(42) sollte die Situation wie sie in der Zelllinie 293/PERV-PK vorzufinden ist - Koexistenz von PERV-A und PERV-B - nachahmen. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte 293 Zellen, als Positivkontrolle 293 PERV-PK Zellen. Die Zellen wurden fixiert und mit einem α -FeLV p27-, (linke Spalte) bzw. mit einem α -RLV-Serum (rechte Spalte) inkubiert. Die Inkubation mit den jeweiligen Präimmunsere ergab das gleiche Bild wie bei untransfizierten 293 Zellen (nicht dargestellt). Weitere Erläuterungen im Text.

3.8.2 RT-Nachweis für die Plasmide pPERV-B(33)/ATG und pPERV-B(43)/LTR

Die Zellkulturüberstände der mit den Plasmiden pPERV-B(33)/ATG und pPERV-B(43)/LTR transfizierten Zellen wurden auf die Anwesenheit aktiver RT, als Voraussetzung für die Existenz replikationskompetenter Virionen, untersucht.

Abb. 3.37 zeigt, daß sich in den Überständen von 293 Zellen, die mit pPERV-B(33)/ATG und pPERV-B(43)/LTR worden sind, RT-Aktivität im gleichen Ausmaß wie bei der Positivkontrolle 293 PERV-PK nachweisen läßt.

Hingegen verhält sich der Zellklon pPERV-A(42) in 293 Zellen wie die Negativkontrolle (293). In späteren Experimenten, konnte in pPERV-A(42) transfizierten HeLa Zellen ebenfalls RT-Aktivität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

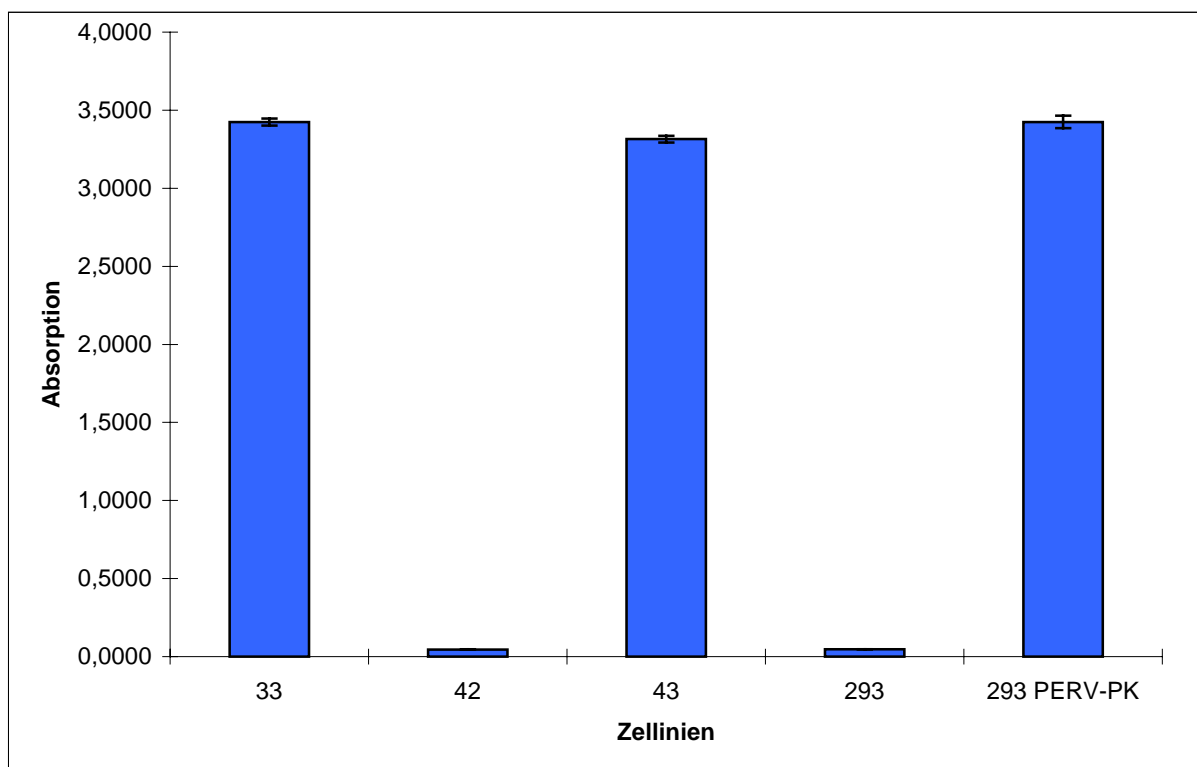


Abb. 3.37: Bestimmung der RT-Aktivität der mit den Plasmiden pPERV-B(33)ATG, pPERV-A(42) und pPERV-B(43)/LTR transfizierten 293 Zellen.

Kulturüberstände wurden durch Filtration (0,45 µm -Sartorius Minisart®) von Zellen befreit und als Substrat für den Lenti-RT™Activity Test (Cavidi Tech AB Uppsala, Schweden) eingesetzt. (Die Daten wurden von Nicole Fischer erhoben und freundlicherweise zur Verfügung gestellt).

3.8.3 Nachweis von PERV RNA in infizierten Zellen mittels Northern-Blot Analyse

Der Nachweis transkriptioneller Aktivität porciner endogener Retroviren nach Infektion von 293 mit PERV-haltigen Kulturüberständen von Zellen, die mit PERV-Plasmiden transfizierten worden waren, sollte durch Northern-Blot Analysen geführt werden (Abb.

3.38). Hierfür wurden gleiche Mengen gesamt-cytoplasmatischer RNA glyoxiliert und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Hybridisierung erfolgte mit kinasierten Oligonukleotiden, die komplementär zu den variablen Regionen des *env* Gens sind und daher differentiell die Klassen PERV-A (Abb. 3.38 A) und PERV-B (Abb. 3.38 B) erkennen. Die Präparation der RNA erfolgte 14 Tage nach Infektion. RNA aus 293 Zellen, die mit Überständen der Zellklone 293/pPERV-B(33)/ATG bzw. 293/pPERV-A(42)//pPERV-B(33)/ATG infiziert worden waren, und die Positivkontrolle 293 PERV-PK führten zu Hybridisierungssignalen im Northern-Blot (Abb. 3.38). Hingegen sind zu diesem Zeitpunkt auf RNA aus 293 Zellen, die mit Überständen der Zellklone 293/pPERV-A(42) und 293/pPERV-B(43)/LTR infiziert worden sind, keine Hybridisierungssignale zu erkennen.

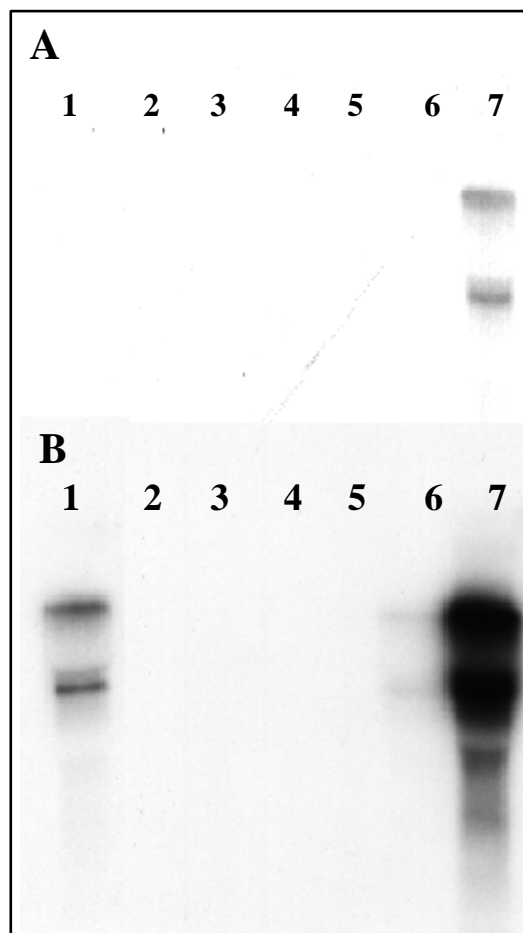


Abb. 3.38: Nachweis infektiöser Virionen in zellfreien Überständen der mit den Plasmiden pPERV-B(33)ATG, pPERV-A(42) und pPERV-B(43)/LTR transfizierten 293 Zellen mittels Northern-Blot Analyse.

Gleiche Menge gesamt-cytoplasmatischer RNAs von uninfizierten 293 Zellen als Negativkontrolle (Spur 5), sowie infiziert mit PERV-haltigen Kulturüberständen der Zellklone 293/pPERV-B(33)/ATG (Spur 1), 293/pPERV-A(42) (Spur 2), 293/pPERV-B(43)/LTR (Spur 3), 293/pPERV-A(42)//pPERV-B(33)/ATG (Spur 6) und 293-PERV-PK RNA als Positivkontrolle (Spur 7), wurden nach elektrophoretischer Auftrennung mit den ^{32}P kinasierten Oligonukleotiden PERV-A (A) und PERV-B (B) hybridisiert. Die Spur 5 ist unbeladen.

Die Tatsache, daß die Northern-Blot Analyse für RNA 293 Zellen, die mit Überständen des Zellklons 293/pPERV-B(43)/LTR transfiziert worden waren, zu keinen Hybridisierungssignalen geführt hat, obwohl dieser Klon in der Immunfluoreszenzmikroskopie (3.8.1) und beim Nachweis von RT-Aktivität (3.8.2) zu positiven Resultaten geführt hat, kann unterschiedliche Ursachen haben. Einerseits könnten die von dem Zellklon 293/pPERV-B(43)/LTR produzierten Virionen auf 293 Zellen nicht infektiös sein. Andererseits könnte eine im Vergleich zu 293/pPERV-B(33)/ATG und 293-PERV-PK geringere Expression die Sensitivität der Northern-Blot Analyse unterschreiten. Um letzteren Fall ausschliessen zu können wurde nach einer sensitiveren Nachweismethode gesucht.

3.9 Differentieller Nachweis subgenomischer PERV-Transkripte infizierten Zelllinien mittels RT-PCR

Die selbe RNA, die für die Northern-Blot Analysen (3.8.3) eingesetzt worden war, wurde mit Hilfe von zufällig hybridisierenden Oligonukleotiden revers transkribiert. Die entsprechenden cDNAs dienten als Templates für die Amplifikation subgenomischer PERV-Transkripte. In einer ersten PCR wurde als Vorwärtsprimer PERV-PBS I in Kombination mit den beiden Gegenstrangprimern *envA* I und *envB* I eingesetzt. In einem nested PCR Ansatz wurden die Primer PERV-PBS II in Kombination mit *envA* II und *envB* II eingesetzt. In beiden PCR Amplifikationen folgten auf eine initiale Hitzedenaturierung (95°C, 10 min) jeweils 35 Wiederholungen von Denaturierung (95°C, 60 sec), Primeranbindung (60°C, 60 sec) und Elongation (72°C, 60 sec). Wie in der Abb. 3.39 ersichtlich, ist die Sensitivität dieser nested PCR ausreichend, um auch die wenigen PERV-Transkripte in den Zelllinien 293/pPERV-A(42) und 293/pPERV-B(43)/LTR zu detektieren, die sich im Northern-Blot Experiment nicht nachweisen ließen. Die Intention, die der in der Abb. 3.39 dargestellten RT-PCR Analyse zugrunde liegt, ist eine hocheffiziente Nachweismethode für PERV mRNA zu entwickeln, die einfach und reproduzierbar durchführbar ist.

Dem Problem, daß bei jeder RNA-Präparation auch noch DNA-Verunreinigungen vorliegen, die in der PCR zu falsch positiven Ergebnissen führen, kann durch einen DNase-Verdau begegnet werden. Auf diesen Arbeitsschritt konnte bei dieser RT-PCR verzichtet werden, da die Primer so gewählt wurden, daß sie innerhalb einer kurzen Elongationszeit (1 min) nur auf subgenomischen Transkripten, nicht aber auf Vollängentranskripten und proviralen DNAs zu Amplifikaten führen. Die Tatsache, daß die für PERV-A und PERV-B spezifischen Amplifikate sich in der Größe unterscheiden (PERV-A 807 bp, PERV-B 925 bp; Abb. 3.39 Pfeile), erlaubt es auf separate PCR-Ansätze zu verzichten. Als interne Positivkontrolle erhielt

der nested PCR-Ansatz zusätzlich noch GAPDH-Primer, die in diesem "Multiplex" PCR-Ansatz ein 213 bp großes Amplifikat erzeugen (Abb. 3.39; Pfeil). Für die Positivkontrolle 293 PERV-PK und für die Zellen, die mit zellfreiem Überstand der durch Kotransfektion hervorgegangenen Zelllinie 293/pPERV-B(33)ATG//pPERV-A(42) infiziert wurden, sind daher jeweils 3 Amplifikate zu erkennen.

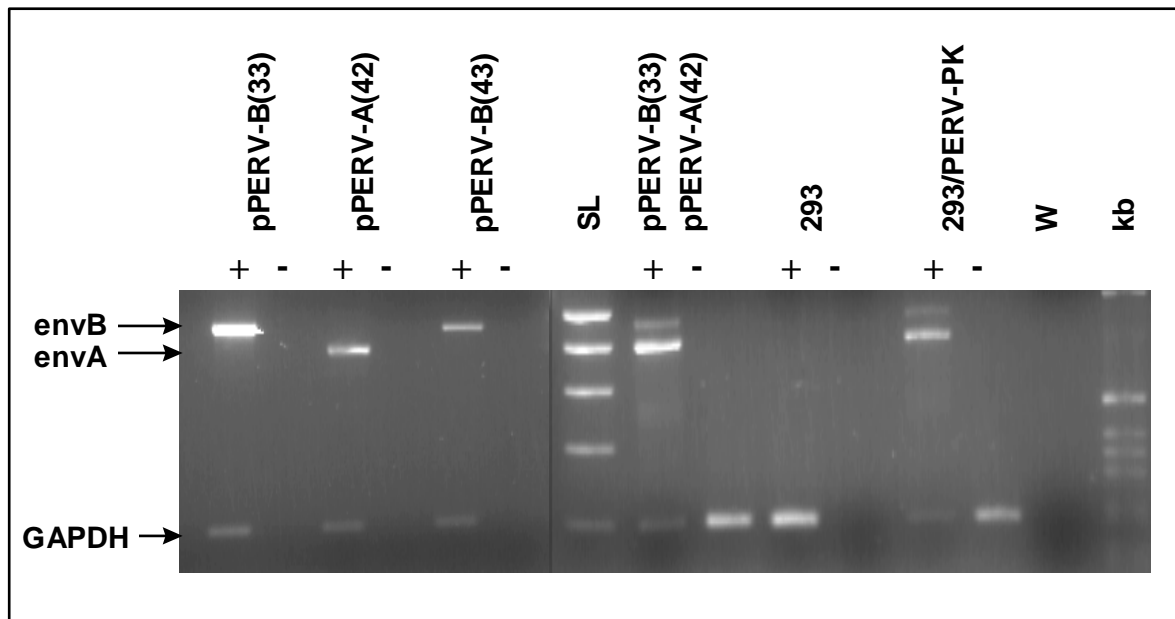


Abb. 3.39: Differentielle *envA/envB* RT-PCR auf subgenomischen PERV-Transkripten.

5µg Total-RNA wurden mittels eines Hexamergemisches revers transkribiert. 1/10 der cDNAs diente als Template. Im Gegensatz zu dem GAPDH-Amplifikat sind die *envA*- und *envB*-spezifischen Amplifikate, Produkte einer nested PCR. Kontrollen ohne Zugabe reverser Transkriptase sind mit (-) gekennzeichnet. Als Längenstandards dienten die Smartladder (SL) und die 1 kb-ladder (kb). W, Wasserkontrolle.

Infolge der produktiven Infektion von 293 Zellen mit PERV-haltigen Kulturüberständen der mit den Plasmiden pPERV-B(33)/ATG und pPERV-B(43)/LTR transfizierten Zellen wurden die Zelllinien 293/PERV-B(33)/ATG und 293/PERV-B(43)/LTR etabliert.

4. Diskussion

4.1 Humane endogene Retroviren des Typs K

Replikationskompetente HERV-K Proviren konnten bisher im humanen Genom nicht nachgewiesen werden. Allerdings wurde gezeigt, daß die HTDV-Partikelproduktion, die in Teratokarzinomzelllinien zu beobachten ist, von HERV-K kodiert wird (Kurth *et al.*, 1980, Boller *et al.*, 1993). Desweiteren konnte das komplexe Spleißmuster, daß in diesen Zelllinien nachweisbar ist (Löwer *et al.*, 1993a), als Ergebnis transkriptioneller Aktivität von HERV-K Proviren identifiziert werden (Löwer *et al.*, 1993b). Anhand rekombinanter Proteine konnte die enzymatische Aktivität sowohl der Protease als auch der Integrase nachgewiesen werden (Schommer *et al.*, 1996, Kitamura *et al.*, 1996). Zudem gibt es Hinweise auf eine dUTPase-Aktivität von HERV-K (Harris *et al.*, 1997). Kürzlich konnte auch die Funktionalität für die verbliebenen Enzymaktivitäten der reversen Transkriptase und der RNaseH *in vitro* belegt werden (Berkhout *et al.*, 1999).

Die Tatsache, daß transkriptionelle Aktivität für einige HERV-K Elemente in peripheren mononucleären Zellen des Blutes (PBMC) nachweisbar ist, unterstützt die Vermutung, daß biologisch aktive Vertreter innerhalb der Familie HERV-K existieren (Andersson *et al.*, 1996, Medstrand *et al.*, 1992). Indirekte Hinweise auf eine HERV-K Expression konnten durch Untersuchungen erzielt werden, die eine Seroreaktivität gegenüber synthetischen HERV-K Peptiden im ELISA bzw. auf HTDV-produzierenden Teratokarzinom-Zellen in der Immunfluoreszenz und im Westernblot belegen (Denner *et al.*, 1995, Sauter *et al.*, 1995, Boller *et al.*, 1997). Antikörper lassen sich insbesondere bei Hodentumor-Patienten und bei Schwangeren nachweisen. Die Korrelation wird bestärkt durch den deutlichen Rückgang der Seroreaktivität nach Tumorentfernung bzw. nach der Geburt (Boller *et al.*, 1997).

HERV-K10, das einzige Provirus, das bisher gänzlich sequenziert wurde, ergänzt um die 292 bp (Plus-Region), die charakteristisch für Typ II Genome sind, dient seit Jahren als Prototypsequenz (Ono *et al.*, 1986). Dieses Provirus kann aber aufgrund eines defekten *gag* Leserahmens und der fehlenden Plus-Region nur teilweise für die beschriebenen Transkripte und Genprodukte verantwortlich sein. Der Nachweis der Existenz eines Provirus, welches sowohl für das komplexe Spleißmuster, die HTDV-Partikelproduktion und die rekombinant exprimierbaren Enzyme verantwortlich zeichnen könnte, konnte bisher nicht erbracht werden.

Generell ist daher die Frage zu klären, ob ein intaktes Genom oder aber mehrere Genorte komplementierend für die biologischen Funktionen ursächlich sind.

4.1.1 Genomweites Screening nach biologisch aktiven HERV-K Typ II Proviren

Bei dem Screening einer human P1 Genbibliothek konnten insgesamt nur zwei Genorte identifiziert werden, die kolinear offene Leserahmen für die retroviralen Gene *gag*, *pol* und *env* aufweisen (3.1.3–3.1.6). Für den Nachweis von ORFs wurden P1 Phagemide, für die eine provirale Integration mit einer *gag* Sonde und einer Typ 2 spezifischen Sonde (YB23.3) nachgewiesen wurde, in einem *in vitro* Transkriptions- und Translationsassay auf vorzeitige Terminierungen der Leserahmen hin untersucht. Die beiden Genorte, repräsentiert durch zwei bzw. vier P1 Klone, wurden vollständig sequenziert. Die Klonierung der Integrationsorte und die Charakterisierung der chromosomal flankierenden Sequenzen mittels inverser PCR, ermöglichte die chromosomale Zuordnung dieser Proviren.

Ein HERV-K Typ 2 Genom, welches von Dr. Tönjes im Vorfeld dieser Arbeit als λ Phage aus einer humanen Placenta-Genbibliothek isoliert und partiell charakterisiert worden war, repräsentiert den identischen Genort wie die vier P1-Klone 214M19, 221L7, 359N6 und 367M9. Die Übereinstimmung wurde durch Hybridisierung mit einer Oligonukleotidsonde (23S10-Insert), die charakteristisch für den λ Subklon pgP23S10 ist, dessen Sequenzierung im Rahmen dieser Arbeit abgeschlossen wurde, entdeckt. Der Nachweis der Identität erfolgte durch Verwendung genomspezifischer PCR Primer, die auch zur Lokalisation auf dem Chromosom 19 herangezogen wurden. Die Sequenz des Genortes HERV-K(C19) setzt sich aus der Sequenz des Klons pgP23S10 sowie den Sequenzen der 3'-Integrate der Phagemide zusammen (Acc. Nr.: Y17833).

Die Sequenzierung offenbarte für das Provirus HERV-K(C19) eine 1 bp Deletion (nt 3377), die eine vorzeitige Termination des *pro* Leserahmens zur Folge hat. Zudem sind die ersten 945 bp der 5'-LTR deletiert, so daß eine transkriptionelle Aktivität für diesen Genort wohl ausgeschlossen werden kann. Als weitere Charakteristika sind für diesen Klon eine 9 bp "in frame" Insertion im Polymerasegen (zwischen nt 4149-4150) sowie eine Verdopplung eines 26 bp Motivs in der 3'-LTR, welches als Glucocorticoid-responsives Element identifiziert wurde (Scheidereit *et al.*, 1983, Ono *et al.*, 1987), zu benennen.

Ein Sequenzdatenbankabgleich ergab für die chromosomal flankierende Sequenz sowie die ersten 104 Nukleotide der Sequenz dieses Lokus (Acc. Nr. Y17833) (nt 946-1049) eine 100%

Übereinstimmung zu dem Cosmid R26450 (Acc. Nr. AC004164), so daß eine exaktere Kartierung des Genortes HERV-K(C19) nahe dem Centromer an der Position 19q12 möglich war.

Das Vorhandensein einer direkten Sequenzwiederholung des Hexanukleotides AGGTAT unmittelbar angrenzend an die trunkierte 5'-LTR sowie an die intakte 3'-LTR kann als *direct repeat* (DR) angesehen werden, was den Schluß nahelegt, daß die partielle Deletion der 5'-LTR schon während der retroviralen Integration vorgelegen haben muß. Dagegen spricht jedoch, daß das Vorhandensein eines terminalen Sequenzmotivs, welches neben den inversen Sequenzwiederholungen noch einige weitere Nukleotide umspannt, als entscheidende Voraussetzung für die Integration angesehen wird (Colicelli und Goff, 1988; Vink *et al.*, 1991). Dieses Sequenzmotiv, daß auch als *att* bezeichnet wird, stellt wahrscheinlich das einzige *cis* Signal dar, daß die virale Integrationsmaschinerie benötigt (Coffin, 1996). Insofern ist der Integrationsvorgang für HERV-K(C19) und der Prozeß, der zur Deletion der 5'-LTR führte, nicht vollständig erklärbar.

Die Zuordnung der P1-Klone 51C12 und 69L1 zum Chromosom 7 erfolgte durch PCR mit genomspezifischen Primern und durch die Sequenzübereinstimmung mit dem PCR-generierten Klon pHERV-K(SD-C7-3'-LTR). Im Gegensatz zu dem Genort HERV-K(C19) besitzen die proviralen Integrate der Phagemide zwei intakte LTRs, die eine 99%ige Homologie zueinander aufweisen. Da Mutationen in den LTRs als Maßstab evolutionären Alters angesehen werden (Dangel *et al.*, 1995), erscheint die Integration des Genortes HERV-K(C7) als phylogenetisch jung. Die für die Initiation und Termination der Transkription erforderlichen Sequenzmotive TATA-Box und Polyadenylierungssignal sind vorhanden, so daß die Voraussetzungen für eine transkriptionelle Aktivität dieses Genortes gegeben sind. Zusätzlich existiert mit dem Sequenzmotiv TGTTAT ein Glucocorticoid responsives Element, wie es auch in den LTRs des Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) zu finden ist (Scheidereit und Beato, 1984).

Die Analyse der offenen Leserahmen auf Sequenzmotive, die die Funktionalität der retroviralen Enzyme determinieren, offenbarte eine Mutation im Tetrapeptid YXDD zu CIDD. Die Existenz des Tetrapeptides YXDD ist in allen als funktionell charakterisierten reversen Polymerasen invariant (Larder *et al.*, 1987, Xiong und Eickbush, 1988, Poch *et al.*, 1989). Basierend auf der Röntgen-kristallographischen Strukturanalyse der HIV RT wird vermutet, daß die Aspartylreste für die Bindung der divalenten Kationen verantwortlich sind

(Jakobo-Molina *et al.*, 1991, Kohlstaedt *et al.*, 1992). Der experimentelle Beleg dafür, daß das vorliegende Tetrapeptid CIDD zu einem funktionellen Defekt der RT führt, wurde durch den Vergleich unterschiedlicher rekombinant-exprimierter HERV-K Polymerasen erbracht (Berkhout *et al.*, 1999).

Die Existenz dieser Mutation innerhalb des Genortes HERV-K(C7) wurde sowohl bei der Charakterisierung der P1 Klone 51C12 und 69L1 als auch bei dem PCR generierten Plasmid pHERV-K(SD-C7-3'-LTR) gefunden. Den gleichen Befund verzeichneten Mayer *et al.* (1999), die das entsprechende Allel charakterisiert haben, wie ein Datenbankabgleich offenbarte. Die Sequenzen HERV-K(C7) (Y17832) und HERV-K(HML-2.HOM) (AF074086) unterscheiden sich nur in wenigen Nukleotiden (nt 833, 1468, 1469, 2672, 6331 und 7298). Vom Integrationsort HERV-K(HML-2.HOM) sind zwar nur 54 bp stromabwärts der 3'-LTR charakterisiert, diese sind jedoch identisch zu dem als Alu Element (*AluS*; Acc. Nr. U14574) charakterisierten Integrationsort von HERV-K(C7).

Die rekombinant exprimierte Protease des Klons HERV-K(HML-2.HOM) erwies sich *in vitro* als katalytisch aktiv (Mayer *et al.*, 1999). Die Autoren bezeichnen dieses provirale HERV-K Integrat, das sie mittels einer FISH-Analyse auf dem kurzen Arm des Chromosom 7 lokalisieren konnten (7p22), als das intakteste humane endogene Provirus.

Neben dem Chromosom 7 wurde die Koexistenz von offenen Leserahmen für HERV-K *gag* und *env* nur noch auf den Chromosomen 19 und Y nachgewiesen (Mayer *et al.*, 1997a,b).

Zusätzlich zu dem Amplifikat der theoretischen Größe von 8,6 kb, welches wahrscheinlich dem pHERV-K(C19) entspricht, konnten auf DNA von Chromosom 19 noch zwei weitere Proviren dargestellt werden (Abb. 3.3). Ein ca. 5 kb großes Amplifikat rührt wahrscheinlich von einer trunkierten proviralen Variante her. Desweiteren konnte ein ~9 kb großes Amplifikat, welches auf ein vergrößertes Provirus auf dem Chromosom 19 hindeutet, in der Expand™Long PCR dargestellt werden. Da die Klonierung dieses Amplifikates nicht gelang, kann nicht ausgeschlossen werden, daß auf dem Chromosom 19 ein weiteres Provirus lokalisiert ist, daß ebenfalls offene Leserahmen für *gag*, *pol* und *env* besitzt.

Auf dem Chromosom Y konnte weder durch das genomische Screening noch mit PCR basierenden Methoden ein Vollängen HERV-K Provirus nachgewiesen werden.

Die naheliegende Fragestellung, ob ein gänzlich intaktes HERV-K Provirus im menschlichen Genom existiert, kann durch diese Arbeit nicht abschließend beantwortet werden. Es kann nicht generell ausgeschlossen werden, daß eine allelische Variante von HERV-K(C7), welche

die Mutation CIDD nicht trägt, existiert. Jedoch spricht dagegen, daß ein entsprechender Genort weder bei den Untersuchungen von Mayer *et al.*, 1999 noch bei dem hier beschriebenen genomweiten Screening gefunden werden konnte. Eine gezielte Analyse des proviralen Integrationsortes HERV-K(C7) innerhalb der Zelllinien, die HTDV-Partikel produzieren, könnte klären, ob ggf. Mutationen innerhalb dieses nahezu intakten Provirus den Phänotyp dieser Zelllinien bedingen.

Dahinter verbirgt sich die Frage, ob eine Mutation des Tetrapeptides von CIDD zu YIDD innerhalb der Proviren HERV-K(C7) bzw. HERV-K(HML-2.HOM) diese zu replikationskompetenten Proviren revertieren würde. Dagegen spricht jedoch, daß das rekombinante Plasmid pcHERV-K, welches aus unterschiedlichen cDNA Klonen fusioniert wurde und offene Leserahmen für alle retroviralen Proteine (inklusive des YIDD Tetrapeptides der RT) besitzt, nach Transfektion in D17-Zellen, für die Kompatibilität mit den HERV-K-LTRs nachgewiesen wurde, zu einem Expressionsmuster vergleichbar dem des Plasmids pHERV-K(SD-C7-3'-LTR) in COS-7 Zellen führte (Tönjes *et al.*, 1999). Eine Kolo-kalisation von Gag und Env Proteinen, wie sie bei einer Partikelproduktion zu verzeichnen wäre, konnte auch nach Kotransfektion der Env-Expressionsplasmide pJW-Ex30 oder pJW-tPA-SP/EOP (Tönjes *et al.*, 1997a) nicht beobachtet werden (Tönjes *et al.*, 1999). Ebenso ergaben sich keine Hinweise auf vermehrungsfähige Partikel in transient und stabil transfizierten Zellen (Tönjes *et al.*, 1999).

Zusammenfassend können die Ergebnisse dieser Arbeit dahingehend interpretiert werden, daß die Existenz eines funktionellen und replikationskompetenten Provirus von HERV-K im menschlichen Genom als höchst unwahrscheinlich anzusehen ist. Es ist eher davon auszugehen, daß die Partikelproduktion in einigen Tumorzelllinien auf eine Komplementation unterschiedlicher Genorte zurückzuführen ist.

4.1.2 Charakterisierung der Typ I Proviren HERV-K10 und HERV-K18

Neben den beiden Genorten auf den Chromosomen 7 und 19 sind im Rahmen dieser Arbeit die proviralen Integrationsorte der bekannten Proviren HERV-K10 und HERV-K18 (Ono *et al.*, 1986) eingehender untersucht worden. Für das Provirus HERV-K10 konnte neben der chromosomalen Zuordnung zum Chromosom 5 die Existenz eines offenen *gag* Leserahmens sowohl *in vitro* (PTT, Abb. 3.15B) als auch *in vivo* (Immunofluoreszenzmikroskopie, Abb. 3.15 C) experimentell nachgewiesen werden. Sofern die Insertion eines Nukleotides

gegenüber der von Ono publizierte Sequenz (Ono *et al.*, 1986), welche ein defektes *gag* Gen aufweist, nicht auf einem Sequenzierfehler oder der PCR Generierung beruht, kann sie dahingehend interpretiert werden, daß individuelle Variationen proviraler Integrationsorte vorliegen. Im Hinblick auf HERV-K(C7) bedeutet dies, daß gegebenenfalls doch intakte Proviren im menschlichen Genom vorzufinden sind.

Mit Ausnahme der LTRs existierten im Vorfeld dieser Arbeit keine weiteren Sequenzinformationen zu HERV-K18 (Ono, 1986). Im Rahmen dieser Arbeit konnte das intakte Provirus mit einer Expand™Long PCR vom Chromosom 1 dargestellt und kloniert werden. Nach vollständiger Sequenzierung offenbarte ein Datenbankabgleich ausgeprägte Homologien zu dem von Conrad *et al.*, 1997 publiziertem IDDM_{1,2}K22 auf. Innerhalb der 153 Aminosäuren, für die ein Superantigeneffekt nachgewiesen wurde, der von den Autoren kausal für die Ausbildung der juvenilen Diabetes verantwortlich gemacht wird, ist nur ein einziger AS-Austausch zu verzeichnen. Die Verknüpfung von IDDM_{1,2}K22 mit der Entstehung der Diabetes I ist mittlerweile von mehreren Forschergruppen in Frage gestellt worden (Lan *et al.*, 1998, Löwer *et al.*, 1998, Murphy *et al.*, 1998, Lapatschek *et al.*, 2000), jedoch bleibt die Funktion als Superantigen bisher unwiderlegt. Ob HERV-K18 ebenfalls für ein Superantigeneffekt kodieren kann ist fraglich, da im Gegensatz zu IDDM_{1,2}K22 in Ermangelung des Stopcodons (nt 7047) der Leserahmen zu einem wesentlich größeren Protein führt, welches wahrscheinlich anders prozessiert werden würde.

4.2 Porcine endogene Retroviren und Xenotransplantation

Seit der Entdeckung der Infektiosität porciner endogener Retroviren für menschliche Zelllinien (Patience *et al.*, 1997) hat das Interesse an PERV sprunghaft zugenommen. Die Risiken, die im Zusammenhang mit der Xenotransplantation von diesen Viren ausgehen, werden seitdem kontrovers diskutiert (Stoye und Coffin, 1995, Allan, 1996). Gegenwärtig existieren noch einige signifikante immunologische Barrieren, die die Transplantatabstoßung bedingen und dadurch die Realisierung einer artfremden (diskordanten) Xenotransplantation verhindern. Die zunehmenden Erfolge bei der Überwindung der immunologischen Abwehrmechanismen (Sachs *et al.*, 1995, Bach *et al.*, 1995), lassen zukünftige Organverpflanzungen vom Schwein auf den Menschen immer wahrscheinlicher werden. Die potentiellen Organspender hierfür – gentechnisch "humanisierte" Schweine unter speziellen keimfreien Bedingungen gehalten – stehen bereits für diesen Zweck bereit.

Um eine verantwortungsvolle Risiko-Nutzen-Abwägung der Xenotransplantation durchführen zu können, besteht daher die Notwendigkeit die entdeckten xenotropen PERV eingehend zu charakterisieren.

4.2.1 Isolierung proviraler endogener Retroviren der Klassen A und B

Im Rahmen dieser Arbeit sind weltweit erstmals intakte Proviren der beiden als polytrop/xenotrop identifizierten Klassen PERV-A und PERV-B *in toto* kloniert und sequenziert worden.

Die Homologien zwischen den Klassen PERV-A und PERV-B innerhalb der von *gag* und *pol* kodierten Proteine sind mit 99,6% bzw. 98,9% sehr ausgeprägt (Abb. 3.24). Auch für die dritte bekannte Klasse, PERV-C, repräsentiert durch die cDNA PERV-MSL (Akiyoshi *et al.*, 1998), sind in diesen Gene ausgeprägte Homologien auszumachen (94,3% bzw. 96,7% auf Nukleinsäureebene). Hingegen sind in den Genen, die für die viralen Hüllproteine kodieren, zwischen den Klassen deutliche Unterschiede feststellbar (Abb. 3.24). Die Variabilität der *env* Gene ist in kurzen Domänen innerhalb des glykolysierten Oberflächenproteins gp70 besonders ausgeprägt. Von MLV weist man, daß diese Regionen, VR-A, VR-B und PRO, für Peptidomänen kodieren, die die Rezeptorerkennung determinieren (Battini *et al.*, 1992, Battini *et al.*, 1995). Aufgrund dieser Unterschiede wurde für PERV die Verwendung unterschiedlicher Rezeptoren als wahrscheinlich angenommen (Takeuchi *et al.*, 1998). Der Einfluß der unterschiedlichen *env* Gene auf die Wirtszellspezifität konnte durch Pseudotypisierung von retroviralen MLV Vektoren in einer Tropismusstudie anschaulich belegt werden (Takeuchi *et al.*, 1998). Die jeweiligen Rezeptoren konnten zwar bisher nicht identifiziert werden, jedoch scheint es so, als ob sie auf vielen Zellen von Primaten nicht vorhanden sind, so daß das Schwein-zu-Affen Modell nicht unbedingt geeignet ist PERV-Zoonosen zu studieren (Stoye, 1998, Takeuchi *et al.*, 1998, Blusch *et al.*, 2000).

Die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten Proviren unterscheiden sich zudem in der Länge ihrer LTRs. Eine 39 bp Wiederholung, die eine retrovirale TATA-Box als Sequenzmotiv beinhaltet, kommt 2,5-4,5 mal vor (Abb. 3.23). Die Tatsache, daß die Klasse B Klone, pPERV-B(33) und pPERV-B(43), mit 4,5 bzw. 2,5 Wiederholungen die Extrema darstellen und der Vertreter der Klasse A, pPERV-A(42), einen Mittelwert annimmt, läßt keinen Schluß auf ein klassenspezifisches Phänomen zu. Die LTR der cDNA Sequenz PERV-

MSL, dem einzigen bekannten Vertreter der Klasse PERV-C, enthält nur eine Wiederholung der 39 bp Sequenz, die zudem 5 Nukleotidaustausche aufweist. Sie wird beiderseits von einem 18 bp Sequenzmotiv flankiert. Welchen Einfluß diese repetitiven Elemente auf die Funktionalität der LTRs haben, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr geklärt werden. Bei den Replikationsstudien erwies sich zwar der Klon mit den längsten LTRs [pPERV-B(33)] als der aktivste, wurde jedoch gefolgt von dem Klon pPERV-B(43), der die geringste Anzahl an Wiederholungen aufweist. Es wäre somit interessant, in zu etablierenden Testsystemen, in denen die LTRs isoliert charakterisiert werden könnten, den Einfluß der multimeren TATA-Boxen auf die Promoterstärke bzw. auf die Zelltypspezifität, zu untersuchen.

4.2.2 Klonierung replikationskompetenter PERV

Von den sechs aus der Zelllinie 293 PERV-PK isolierten Lambdasubklonen wurden drei aufgrund offensichtlicher Defekte von einer eingehenderen Untersuchung ausgeschlossen (3.2.3). Die Charakterisierung der drei verbliebenen Subklone identifizierte mit PERV-A(42) ein gänzlich intaktes Provirus. Der Genort PERV-B(43) war durch die partielle *Sau3AI* Restriktion am 5'-Terminus trunkiert ($\Delta 1-774$, bezogen auf pPERV-B(33)). Allerdings offenbarte der PCR Klon pGTE(PK26/34) eine zu der 3'-LTR des λ -Subklons pPERV-B(43) identische 5'-LTR und zusätzlich zwei Deletionen (bezogen auf pPERV-B(33)) innerhalb der untranslatierten Region, die auch für den λ -Klon 43 identifiziert wurden (Abb. 3.27). Aufgrund der Übereinstimmungen kann davon ausgegangen werden, daß der Klon pGTE(PK26/34) mit dem Genort PERV-B(43) identisch ist. Die Fusion der beiden Plasmide pGTE(PK26/34) und pPERV-B(43) durch Klonierung führte zu dem Plasmid pPERV-B(43)/LTR und stellt die Rekonstitution des ursprünglichen Genortes dar (Abb. 3.29).

Die Mutation des mutmaßlichen *env* Startcodons (ATA zu ATG) des λ -Subklons pPERV-B(33) konnte durch Rekombination mit dem Plasmid pPERV-PK28/29 "behoben" werden (Abb. 3.27). Das rekombinante Plasmid pPERV-B(33)/ATG entspricht anders als im Fall pPERV-B(43)/LTR nicht mehr dem nativen Genort wie er in der Zelllinie 293 PERV-PK vorliegt. Ungeklärt bleibt die Frage, ob das defekte *env* Startcodon auch schon zu Zeiten der Infektion der Zelllinie 293 mit PERV-PK Überständen vorgelegen hat, oder während der folgenden Kultivierung mutierte. Der Transfer solcher defekter proviraler Genome, die an sich

nicht infektiös sind, und deren nachfolgende Integration ins Genom, wird als "crosspackaging" bezeichnet. Eine solche Verbreitung kann zumindest für die partiell deletierten λ -Subklone 34, 41 und 46 als wahrscheinlich angenommen werden.

Die Klonierung der replikationskompetenten Proviren PERV-B(33)/ATG, PERV-A(42) und PERV-B(43)/LTR ermöglichte erst die Generation von Zelllinien, die definierte Viruspopulationen freisetzen. Die Transfektion der humanen Nierenzelllinie 293 mit den proviralen Sequenzen führte zu den Zelllinien 293-pPERV-B(33)/ATG, 293-pPERV-A(42) und 293-pPERV-B(43)/LTR. Zumindest die PERV-B Proviren, pPERV-B(33)/ATG und pPERV-B(43)/LTR erwiesen sich als replikationskompetent. Aus welchem Gründen sich der Klon pPERV-A(42) auf 293 Zellen als nicht infektiös erwies, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr geklärt werden. Die Tatsache, daß bei Transfektionen in HeLa-Zellen dieses Klons für einen kurzen Zeitraum deutlich gesteigerte Proteinexpressionen zu beobachten sind (pers. Mitteilung N. Fischer), läßt die Vermutung zu, daß die Replikationskompetenz des Klons pPERV-A(42) wirtszellspezifisch ist.

Sobald ein Vergleich zu replikationskompetenten PERV-A Proviren möglich ist, könnten Sequenzmotive oder Mutationen identifiziert werden, die die Replikationsdefizienz erklären könnten. Eine Lambdaphagenbibliothek der Schweinezelllinie PK15, die im Rahmen dieser Arbeit parallel zu der Erzeugung der 293/PERV-PK Genbank angelegt wurde, beinhaltet für 293 Zellen infektiöse Proviren (pers. Mitteilung Ulrich Krach).

4.3 Charakterisierung der molekularen Genomorganisation und mRNA Expressionsmuster von PERV

Neben der computergestützten Auswertung der Sequenzinformationen durch Vergleiche zu verwandten C-Typ Retroviren, die Rückschlüsse auf die Virusorganisation insbesondere auf Proteinebene zulassen (3.2.4), haben im Rahmen dieser Arbeit einige experimentelle Befunde zur Aufklärung der PERV Genomstruktur beigetragen.

Die Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes (3.5.1) sowie die Klonierung und Sequenzierung der subgenomischen *env* RNA, die die Lokalisation von Splicedonor und Spliceakzeptor ermöglichte (3.5.2), haben Aufschluß über die Genomorganisation auf transkriptioneller Ebene gegeben. Die hieraus abgeleitete theoretische Länge der *env* mRNA von 3087 Nukleotiden für PERV-B(33) korrespondiert mit den experimentellen Befunden (Abb. 3.32).

4.4 Nutzung des Erkenntnisgewinns an PERV Sequenzinformation

Anhand der Sequenzinformationen konnten synthetische Peptide generiert werden, mit deren Hilfe Antisera gegen PERV erzeugt worden sind. Die Spezifität dieser Seren übersteigt die kreuzhybridisierender wie sie in dieser und anderen Arbeiten (Matthews *et al.*, 1999) zur Anwendung kamen (Czauderna *et al.*, 2000; Krach *et al.*, 2000). Gleichsam dienen diese Klone als Ausgangspunkte für die Erzeugung rekombinanter Proteine, die dann ebenfalls zur Erzeugung von PERV-spezifischen Antisera herangezogen werden sollen.

Rekombinant exprimierte PERV Hüllproteine könnten auch zur Identifikation und Klonierung der spezifischen Rezeptoren herangezogen werden, indem man deren Bindungsaffinitäten beim Screening nutzt.

4.4.1 Etablierung eines klassenspezifischen RT PCR-Nachweises zur PERV Diagnostik

Die Kenntnis der Virusorganisation auf Transkriptionsebene ermöglicht eine verbesserte Diagnostik. So konnte im Rahmen dieser Arbeit ein RT PCR-Nachweis etabliert werden, der mit hoher Sensitivität die Detektion von subgenomischen Transkripten ermöglicht. Die Lokalisierung der Spleißstellen ermöglichte es, die PCR-Bedingungen so zu wählen, daß DNA Kontaminationen diskriminiert werden, was die Probenvorbereitung maßgeblich erleichtert. Die Primer wurden so ausgewählt, daß die Differenzierung zwischen den Klassen PERV-A und PERV-B anhand der Amplifikatgröße erfolgen kann. Eine Interferenz der Primer untereinander oder mit den GAPDH-Primern, die zur Normalisierung der Reaktionen herangezogen werden, war nicht zu verzeichnen, so daß in einer "Multiplex" PCR gleichzeitig die Transkription von PERV-A und PERV-B Proviren nachgewiesen werden kann.

4.4.2 Einfluß replikationskompetenter PERV auf die Durchführbarkeit von Xenotransplantationen

Der Nachweis der Infektiosität von PERV für menschlichen Zellen wurde bisher nur *in vitro* erbracht. Die bisherigen experimentellen Befunde, die in Folge von Transplantationen an ca. 160 Patienten erhoben worden sind, sprechen gegen eine Infektiosität *in vivo* (Paradis *et al.*,

1999). Hierbei ist anzumerken, daß die Übertragung von soliden Schweineorganen in einen immunsupprimierten Patienten mit den bisher untersuchten Fällen nur ansatzweise vergleichbar ist.

Die Charakterisierung von molekularen Klonen, die eine vergleichbare Infektiosität für menschliche Zellen *in vitro* aufweisen wie sie in den Kokultivierungsstudien (Patience *et al.*, 1997) bzw. in den Untersuchungen mit stimulierten Schweine PBMCs (Wilson *et al.*, 1998, Wilson *et al.*, 2000) zu verzeichnen waren, ermöglicht die definierte Analyse der unterschiedlichen Virusklassen.

Die Isolierung von unterschiedlichen Proviren, die Variabilitäten in den regulatorisch bedeutsamen LTRs aufweisen, ermöglicht ein experimentelles Studium von Faktoren, die erforderlich sind um eine spezifische transkriptionelle Aktivität von PERV hervorzurufen. Im Hinblick auf die Xenotransplantation könnte hiermit auch überprüft werden, ob ggf. Immunsuppressiva oder andere Stimuli, die in einem kausalen Zusammenhang mit dem Transfer des xenogenen Materials im Rezipienten stehen, einen Einfluß auf die Promoterstärke der LTRs haben.

Letztlich ist jedoch bedingt durch die "Omnipräsenz" von PERV in allen transplantierten Schweinezellen von einem lebenslangen Infektionsrisiko für den Patienten und möglicherweise Dritten auszugehen. Dieses sollte nach Möglichkeit in kliniknahen aussagekräftigen Tiermodellen (Schwein→Primat) evaluiert werden.

Eine Minimierung des Risikos könnte zudem erreicht werden, indem Rassen verwendet werden, die weniger oder kein PERV freisetzen. Die Kenntnis der in dieser Arbeit charakterisierten PERV bietet zahlreiche Ansatzpunkte, solche Schweinerassen molekular-genetisch und immunologisch in Hinsicht auf die Präsenz und Expression von PERV zu prüfen.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen einer genomumfassenden Suche nach biologisch aktiven Proviren des Typs HERV-K konnten insgesamt zwei Genorte den humanen Chromosomen C7 bzw. C19 zugeordnet werden. Beide Proviren weisen ORF für die retroviralen Gene *gag*, *pol* und *env* auf.

Während der Genort HERV-K(C19) infolge einer Punktmutation ein defektes Proteasegen trägt und durch eine Deletion der 5'LTR transkriptionell inaktiv ist, besitzt der Genort HERV-K(C7) zwei intakte LTRs, deren Homologiegrad auf ein phylogenetisch junges Alter hindeutet. Mit Ausnahme eines Aminosäureaustausches innerhalb eines hochkonservierten Sequenzmotivs der reversen Transkriptase, der den Verlust der enzymatischen Aktivität zur Folge hat, kann der Genort HERV-K(C7) als das derzeit intakteste Provirus der Familie HERV-K angesehen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für eine HTDV-Partikelproduktion durch Komplementation unterschiedlicher Genorte und gegen die Existenz eines funktionellen und vermehrungsfähigen HERV-K Provirus mit allen retroviralen Charakteristika im menschlichen Genom.

Desweiteren wurden mit HERV-K10 und HERV-K18 zwei bekannte Vertreter der Familie HERV-K eingehend untersucht. Zusätzlich zu der chromosomalen Zuordnung der Proviren gelang der experimentelle Nachweis eines intakten *gag* Genes für HERV-K10. Für HERV-K18 konnten ausgeprägte Homologien zu dem Superantigen-kodierenden Provirus IDDMK_{1,2,22} festgestellt werden.

Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Klonen pPERV-B(33), pPERV-A(42) und pPERV-B(43) handelt es sich um die ersten intakten Proviren der xenotropen Klassen PERV-A und PERV-B. Die vollständige Sequenzierung ermöglichte eine eingehende molekularbiologische Charakterisierung dieser C-Typ Viren. Computergestützt konnte eine PBS für eine tRNA_{Gly4} sowie das Polyadenylierungssignal identifiziert werden. Der Sequenzvergleich offenbarte ein repetitives 39 bp Motiv, welches in unterschiedlicher Anzahl in den jeweiligen LTRs vorzufinden ist. Experimentell wurden der Transkriptionsstart und die verwendeten Spleißstellen identifiziert. Durch Rekombination konnten die molekularen Klone pPERV-B(33)/ATG und pPERV-B(43)/LTR generiert werden, die nach Transfektion in 293 Zellen zur Produktion infektiöser Partikel führten, welche sich seriell passagieren liessen.

Mit Kenntnis der Genomorganisation und der RNA Expressionscharakteristika von PERV wurde eine RT PCR Virusdiagnostik etabliert mit deren Hilfe hochsensitiv differentiell PERV-A und PERV-B Transkripte detektiert werden können.

6. Literaturverzeichnis

- Acha-Orbea, H., and E. Palmer.** 1991. Mls-a retrovirus exploits the immune system. *Immunol. Today* **12**: 356-361.
- Adams, S. E., P. D. Rathjen, C. A. Stanway, S. M. Fulton, M. H. Malim, W. Wilson, J. Ogden, L. King, S. M. Kingsman, and A. J. Kingsman.** 1988. Complete nucleotide sequence of a mouse VL30 retro-element. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 2989-2998.
- Akiyoshi, D. E., M. Denaro, H. Zhu, J. L. Greenstein, P. T. Banerjee, and J. A. Fishman.** 1998. Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine. *J. Virol.* **72**: 4503-4507.
- Allan, J. S.** 1996. Xenotransplantation at a crossroads: Prevention versus progress. *Nat. Med.* **2**: 18-21.
- Andersson, A., C. G. Groth, O. Korsgren, A. Tibell, J. Tollemar, M. Kumagai, E. Moller, J. Bolinder, J. Ostman, A. Bjoersdorff; et al.** 1992. Transplantation of porcine fetal islet-like cell clusters to three diabetic patients. *Transplant. Proc.* **24**: 677-678.
- Andersson, M.-L., P. Medstrand, H. Yin, and J. Blomberg.** 1996. Differential expression of human endogenous retroviral sequences similar to mouse mammary tumor virus in normal peripheral blood mononuclear cell. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **12**: 833-840.
- Armstrong, J. A., J. S. Porterfield, and A. T. D. Madrid.** 1971. C type virus particles in pig kidney cell lines. *J. Gen. Virol.* **10**: 195-198.
- Bach F. H. and H. V. Fineberg.** 1998. Call for a moratorium on xenotransplants. *Nature* **391**: 326
- Bach, F. H., J. A. Fishman, N. Daniels, J. Proimos, B. Anderson, C. B. Carpenter, L. Farrow, S. C. Robson, and H. V. Fineberg.** 1998. Uncertainty in xenotransplantation: Individual benefit versus collective risk. *Nat. med.* **4**: 141-144
- Bach, F. H., S. C. Robson, H. Winkler, C. Ferran, K. M. Stuhlmeier, C. J. Wrighton, and W. W. Hancock.** 1995. Barriers to xenotransplantation. *Nat. Med.* **1**: 869-873.
- Bachmann, K. D., Hammer, C., Haverich, A., Knüppel, R., H. Lilie, H. Niemann, B. Reichart, J. Reiter, H. L. Schreiber, K.-F. Sewing, R. R. Tönjes, K. Ulrichs, and U. Wollersheim.** 1999. Stellungnahme des Wissenschaftlichen Beirates der Bundesärztekammer zur Xenotransplantation. *Deutsches Ärzteblatt* **96**: (Heft 28-29) A1920-A1926.
- Bailey, L. L., S. L. Nehlsen-Cannarella, W. Concepcion, and W. B. Jolley.** 1985. Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate. *JAMA* **254**: 3321-3329.
- Baltimore, D.** 1985. Retroviruses and retrotransposons: the role of reverse transcription in shaping the eukaryotic genome. *Cell* **40**: 481-482.
- Bangham, C. R., S. Daenke, R. E. Phillips, J. K. Cruickshank, and J. I. Bell.** 1988. Enzymatic amplification of exogenous and endogenous retroviral sequences from DNA of patients with tropical spastic paraparesis. *EMBO J.* **7**: 4179-4184.
- Barnes, W. M.** 1994. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **91**: 2216-2220.

- Battini, J. L., J. M. Heard, and O. Danos.** 1992. Receptor choice determinants in the envelope glycoproteins of amphotropic, xenotropic, and polytropic murine leukemia viruses. *J. Virol.* **66**: 1468-1475.
- Battini, J. L., O. Danos, and J. M. Heard.** 1995. Receptor-binding domain of murine leukemia virus envelope glycoproteins. *J. Virol.* **69**:713-719.
- Bengtsson, A., C. T. Svalander, J. Molne, L. Rydberg, and M. E. Breimer.** 1998. Extracorporeal ("ex vivo") connection of pig kidneys to humans. III. Studies of plasma complement activation and complement deposition in the kidney tissue. *Xenotransplantation* **5**: 176-183.
- Benveniste, R. E. and G. J. Todaro.** 1974. Evolution of type C viral genes. I. Nucleic acid from baboon type C virus as a measure of divergence among primate species. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **71**: 4513.
- Berkhout, B., M. Jebbink, and J. Zsiros.** 1999. Identification of an active transcriptase enzyme encoded by a human endogenous HERV-K retrovirus. *J. Virol.* **73**: 2365-2375.
- Bhatti, F. N., M. Schmoekel, A. Zaidi, E. Cozzi, G. Chavez, M. Goddard, J. J. Dunning, Wallwork, J., and D. J. White.** 1999. Three-month survival of hDAF transgenic pig hearts transplanted in primates. *Transplant. Proc.* **31**: 958.
- Bierer, B. E., G. Hollander, D. Fruman, and S. J. Burakoff.** 1993. Cyclosporin A and FK506: molecular mechanisms of immunosuppression and probes for transplantation biology. *Curr. Opin. Immunol.* **5**: 763-773.
- Birnboim, H. C., and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Blakely, M. L., W. J. van der Werf, M. C. Berndt, A. P. Dalmasso, F. H. Bach, and W. W. Hancock.** 1994. Activation of intragraft endothelial and mononuclear cells during discordant xenograft rejection. *Transplantation* **58**: 1059-1066.
- Blin, N., and D. W. Stafford.** 1976. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* **3**: 2303-2308.
- Blond, J. L., F. Beseme, L. Duret, O. Bouton, F. Bedin, H. Perron, B. Mandrand, and F. Mallet.** 1999. Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *J. Virol.* **73**: 1175-1185.
- Blusch, J. H., C. Patience, Y. Takeuchi, C. Templin, C. Roos, K. von der Helm, G. Steinhoff, and U. Martin.** 2000. Infection of nonhuman primate cells by pig endogenous retrovirus. *J. Virol.* **74**: 7687-7690.
- Boeke, J. D. and J. P. Stoye.** 1997. Retroposons, endogenous retroviruses and the evolution of retroelements. In: Retroviruses (ed. Coffin, J. M., S. H. Hughes and H. E. Varmus) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor N. Y.
- Boeke, J. D. and V. G. Corces.** 1989. Transcription and reverse transcription of retrotransposons. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**: 403-434.
- Boller, K., H. Frank, J. Löwer, R. Löwer, and R. Kurth.** 1983. Structural organization of unique retrovirus-like particles budding from human teratocarcinoma cell lines. *J. Gen. Virol.* **64**: 2549-2559.
- Boller, K., H. König, M. Sauter, N. Müller-Lantsch, R. Löwer, J. Löwer and R. Kurth.** 1993. Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for for the human teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV. *Virology* **196**: 349-353.

- Boller, K., O. Jansen, H. Schuldes, R. R. Tönjes, and R. Kurth.** 1997. Characterization of the antibody response specific for the human endogenous retrovirus HTDV/HERV-K. *J. Virol.* **71**: 4581-4588.
- Bonner, T. I., E. H. Birkenmeier, M. A. Gonda, G. E. Mark, G. H. Searfoss, and G. J. Todaro.** 1982. Molecular cloning of a family of retroviral sequences found in chimpanzee but not human DNA. *J. Virol.* **43**: 914-924.
- Bonner, T. I., S. B. Kerby, P. Sutrave. M. A. Gunnell, G. Mark, and U. R. Rapp.** 1985. Structure and biological activity of human homologs of the raf/mil oncogene. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 1400-1407.
- Boyd, M. T., C. M. Bax, B. E. Bax, D. L. Bloxam, and R. A. Weiss.** 1993. The human endogenous retrovirus ERV-3 is upregulated in differentiating placental trophoblast cells. *Virology* **196**: 905-909.
- Bracy, J. L., D. H. Sachs, and J. Iacomini.** 1998. Inhibition of xenoreactive natural antibody production by retroviral gene therapy. *Science* **281**: 1845-1847.
- Breese, S. S., jun.** 1970. Virus-like particles occurring in cultures of stable pig kidney cell lines. *Arch. gesamte Virusforsch.* **30**: 401-404.
- Breimer, M. E., E. Björck, C. T. Svalander, A. Bengtsson, L. Rydberg, K. Lie-Karisen, P. O. Attman, M. Aurell, and B. E. Samuelsson.** 1996. Extracorporeal ("ex vivo") connection of pig kidneys to humans. I. Clinical data and studies of platelet destruction. *Xenotransplantation* **3**: 328-339.
- Bronson, D. L., E. E. Fraley, J. Fogh, and S. S. Kalter.** 1979. Induction of retrovirus particles in human testicular tumor (Tera-1) cell cultures: an electron microscopic study. *J. Natl. Cancer Inst.* **63**: 337-339.
- Burnett, W. V.** 1997. Northern blotting of RNA denatured in glyoxal without buffer recirculation. *Biotechniques* **22**: 668-671.
- Butler, D.** 1998. Last chance to stop and think on risks of xenotransplants. *Nature* **391**: :320-324.
- Butler, D.** FDA warns on primate xenotransplants. *Nature* **398**: 549.
- Callahan, R.** 1988. Two families of human endogenous retroviral genomes. in *Branburry Reports* **30**: 91-100. *Eukaryotic Transposable Elements as Mutagenic Agents* (M. Lambert, J McDonald, and I. Weinstein, eds.) *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.*
- Callahan, R., I. M. Chiu, J. F. Wong, S. R. Tronick, B. A. Roe, S. A. Aaronson, and J. Schlom.** 1985. A new class of endogenous human retroviral genomes. *Science* **228**: 1208-1211.
- Callahan, R., W. Drohan, S. Tronick, and J. Schlom.** 1982. Detection and cloning of human DNA sequences related to the mouse mammary tumor virus genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 5503-5507.
- Carlton, M. B., W. H. Colledge, and M. J. Evans.** 1995. Generation of a pseudogene during retroviral infection. *Mamm. Genome* **6**: 90-95.
- Chang, J., C. J. Kuo, G. R. Crabtree, and J. Blenis.** 1992. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signalling by the 70 kd S6 protein kinase. *Cell* **69**: 1227-1236.

- Chari, R. S., B. H. Collins, J. C. Magee, J. M. DiMaio, A. D. Kirk, R. C. Harland, R. L. McCann, J. L. Platt, and W. C. Meyers.** 1994. Brief report: treatment of hepatic failure with *ex vivo* pig-liver perfusion followed by liver transplantation. *N. Engl. J. Med.* **331**: 234-237.
- Cheng, S., C. Fockler, W. M. Barnes, and R. Higuchi.** 1994. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **91**: 5694-5699.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanat-phenol-chloroform extration. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.
- Coffin, J. M.** 1992. Structure and classification of retroviruses. In: *The Retroviridae*, Vol 1 (J. A. Levy ed.) Plenum Press, N. Y. 19-49.
- Coffin, J. M.** 1996. Retroviridae: The viruses and their replication. In: B. N Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, *et al.*, (eds.) *Fields Virology* 3rd ed., Lippincott-Raven Publishers: 1767-1847.
- Colicelli, J. and S. P. Goff.** 1988. Sequence and spacing requirements of a retrovirus integration site. *J. Mol. Biol.* **199**: 47-59.
- Conrad, B., R. N. Weissmahr, J. Boni, R. Arcari, J. Schüpbach, and B. Mach.** 1997. A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes. *Cell* **90**: 303-313.
- Cordonnier, A., J. F. Casella, and T. Heidmann.** 1995. Isolation of novel human endogenous retrovirus-like elements with foamy virus-related *pol* sequence. *J. Virol.* **69**: 5890-5897.
- Dalton, A. J., A. Hellman, S. S. Kalter, and R. J. Helmke.** 1974. Ultrastructural comparison of placental virus with several type-C-oncogenic viruses. *J. Natl. Cancer Inst.* **52**: 1379-1381.
- Dangel, A. W., B. J. Baker, A. R. Mendoza, and C. Y. Yu.** 1995. Complement component C4 gene intron 9 as a phylogenetic marker for primates: long terminal repeats of the endogenous retrovirus ERV-K(C4) are a molecular clock of evolution. *Immunogenetics* **42**: 41-52.
- Deacon, T., J. Schumacher, J. Dinsmore, C. Thomas, P. Palmer, S. Kott, A. Edge, D. Penny, S. Kassissieh, P. Dempsey, and O. Isacson.** 1997. Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. *Nat. Med.* **3**: 350-353.
- Deen, K. C., and R. W. Sweet.** 1986. Murine mammary tumor virus *pol*-related sequences in human DNA: characterization and sequence comparison with the complete murine mammary tumor virus *pol* gene. *J. Virol.* **57**: 422-432.
- Deininger, P.** 1989. SINEs: Short interspersed repeated DNA elements in higher eucaryotes. In: Berg, D., and Howe, M. (eds.) *Mobile DNA*. American Society for Microbiol., Washington, D. C. 619-636.
- Denner, J.** 1998. Immunosuppression by retroviruses: Implications for xenotransplantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **30**: 75-86.
- Denner, J., R. C. Phelps, R. Löwer, J. Löwer, and R. Kurth.** 1995. Expressing of the human endogenous retrovirus HERV-K in tumor and normal tissue and antibody response in pregnant women, tumor and AIDS patients against HERV-K Gag and Env peptides. *AIDS Res.* **11**: (Suppl 1) 103.

- Deragon, J., D. Sinnett, and D. Labuda.** 1990. Reverse transcriptase activity from embryonal carcinoma cells. *EMBO J.* **9**: 3363-3370.
- Deutsche Stiftung Organtransplantation,** <http://www.organspende.de>
- Dombroski, B. A., S. L. Mathias, E. Nanthakumar, A. F. Scott, and H. H. Kazazian Jr.** 1991. Isolation of an active human transposable element. *Science* **254**:1805-1808.
- Doolittle, R. F., D. F. Feng, M. S. Johnson, and M. A. McClure.** 1989. Origins and evolutionary relationships of retroviruses. *Q. Rev. Biol.* **64**: 1-30.
- Doolittle, W. F., and C. Sapienza.** 1980. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* **284**: 601-603.
- Drwina, H. L., L. H. Toji, C. H. Kim, A. E. Greene, and R. A. Mulivor.** 1993. NIGMS human/rodent somatic cell hybrid mapping panels 1 and 2. *Genomics* **16**: 311-314.
- Dubois, B. L. and S. L. Naylor.** 1993. Characterization of NIGMS human/rodent somatic cell hybrid mapping panel 2 by PCR. *Genomics* **16**: 315-319.
- Eickbush, T. H.** 1992. Transposing without ends: the non-LTR retrotransposable elements. *New Biol.* **4**: 430-440.
- Fineberg, A. P., and B. Vogelstein.** 1983. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6-13.
- Flanagan, W. M., and G. R. Crabtree.** 1993. Rapamycin inhibits p34cdc2 expression and arrests T lymphocyte proliferation at the G1/S transition. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **30**: 31-37.
- Gao, F., E. Bailes, D. L. Robertson, Y. Chen, C. M. Rodenburg, S. F. Michael, L. B. Cummins, L. O. Arthur, M. Peters, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn.** 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* **397**: 436-441.
- Gao, F., L. Yue, A. T. White, P. G. Pappas, J. Barchue, A. P. Hanson, B. M. Greene, P. M. Sharp, G. M. Shaw, and B. H. Hahn.** 1992. Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature* **358**: 495-499.
- Gardner, M. B., J. R. Carlson, M. Jennings, A. Rosenthal, A. Langlois, B. Haynes, D. Bolognesi, and T. J. Palker.** 1991. SIV vaccine protection of rhesus monkeys. *Biotechnol. Ther.* **2**: 9-19.
- Garfinkel, D. J.** 1992. Retroelements in microorganisms. In *The Retroviridae*, Vol 1 (J. A. Levy ed.) Plenum Press, N. Y. 107-158.
- Gingerich, P. D.** 1984. Primate evolution: Evidence from the fossil record, comparative morphology, and molecular biology. *Yearb. Phys. Anthropol.* **27**: 57-72.
- Golemis, E. A., N. A. Speck, and N. Hopkins.** 1990. Alignment of U3 region sequences of mammalian type C viruses: Identification of highly conserved motifs and implication for enhancer design. *J. Virol.* **64**: 534-542.
- Golovkina, T. V., A. Chervonsky, J. P. Dudley, and S. R. Ross.** 1992. Transgenic mouse mammary tumor virus superantigen expression prevents viral infection. *Cell* **69**: 637-645.
- Green, L. M., and J. M. Berg.** 1989. A retroviral Cys-Xaa2-Cys-Xaa4-His-Xaa4-Cys peptide binds metal ions: spectroscopy studies and a proposed three dimensional structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 4047-4051.
- Groth, C. G., O. Korsgren, A. Tibell, J. Tollemar, E. Möller, J. Bolinder, J. Östman, F. P. Reinholt, C. Hellerström, and A. Anderson.** 1994. Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. *Lancet* **344**: 1402-1404.

- Harada, F., G. G. Peters, and J. E. Dahlberg.** 1979. The primer tRNA for Moloney leukemia virus DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* **254**: 10979-10985.
- Harris, J. M., R. H. Haynes, and E. M. McIntosh.** 1997. A consensus sequence for a functional human endogenous retrovirus K (HERV-K) dUTPase. *Biochem. Cell Biol.* **75**: 143-151.
- Heneine, W., A. Tibell, W. M. Switzer, P. Sandstrom, G. V. Rosales, A. Mathews, O. Korsgen, L. E. Chapman, T. M. Folks and Carl G. Groth.** 1998. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts. *Lancet* **352**: 695-699.
- Herr, W.** 1984. Nucleotide sequence of AKV murine leukemia virus. *J. Virol.* **49**: 471-478.
- Hirose, Y., M. Takamatsu, and F. Harada.** 1993. Presence of *env* genes in members of the RTVL-H family of human endogenous retrovirus-like elements. *Virology* **192**: 52-61.
- Hirsch, M. S., S. M. Phillips, C. Solnik, P. H. Black, R. S. Schwartz, and C. B. Carpenter.** 1972. Activation of leukemia viruses by graft-versus-host and mixed lymphocyte reactions *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 1069-1072.
- Hohenadl, C., C. Leib-Mösch, R. Hehlmann, and V. Erfle.** 1996. Biological significance of human endogenous retroviral sequences. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **13** (Suppl 1): 268-273.
- Hutchison, C. A., S. C. Hardies, D. D. Loeb, W. R. Shehee, and M. H. Edgell.** 1989. LINE and related retroposons: long interspersed repeated sequences in the eucaryotic genome. In: Berg, D., and Howe, M. (eds.) *Mobile DNA. American Society for Microbiol.*, Washington, D. C. 599-617.
- Jacobo-Molina, A., A. D. Clark, Jr., R. L. Williams, R. G. Nanni, P. Clark, A. L. Ferris, S. H. Hughes, and E. Arnold.** 1991. Crystals of a ternary complex of human immunodeficiency virus type I reverse transcriptase with a monoclonal antibody Fab fragment and double stranded DNA diffract X-rays to 3,5-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **88**: 10895-10899.
- Kalter, S. S., R. J. Helmke, R. L. Heberling, M. Panigel, A. K. Fowler, J. E. Strickland, and A. Hellman.** 1973. C-type particles in normal human placentas. *J. Natl. Cancer Inst.* **50**: 1081.
- Kannan, P., R. Buettner, D. R. Pratt, and M. A. Tainsky.** 1991. Identification of a retinoic acid-inducible endogenous retroviral transcript in the human teratocarcinoma-derived cell line PA-1. *J. Virol.* **65**: 6343-6348.
- Kato, N., S. Pfeifer-Ohlsson, M. Kato, E. Larsson, J. Rydnert, R. Ohlsson, and M. Cohen.** 1987. Tissue-specific expression of human provirus ERV3 mRNA in human placenta: two of the three ERV3 mRNAs contain human cellular sequences. *J. Virol.* **61**: 2182-2191
- Kissmeyer-Nielsen, F., S. Olsen, V. P. Petersen, and O. Fjeldborg.** 1966. Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet* **2**: 662-665.
- Kitamura, Y., T. Ayukawa, T. Ishikawa, T. Kanda, and K. Yoshiike.** 1996. Human endogenous retrovirus K10 encodes a functional integrase. *J. Virol.* **70**: 3302-3306.
- Kohlstaedt, L. A., J. Wang, J. M. Friedman, P. A. Rice, and T. A. Steitz.** 1992. Crystal structure at 3,5-Å resolution of HIV-reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* **256**:1783-1790.

- Kozak, M.** 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**: 283-292.
- Krach, U., N. Fischer, F. Czauderna, R. Kurth, and R. R. Tönjes.** 2000. Generation and testing of a highly specific anti-serum directed against porcine endogenous retrovirus nucleocapsid. *Xenotransplantation* **7**: 221-229.
- Krieger, N. R., D. P. Yin, and C. Garrison Fathman.** 1996. CD4+ but not CD8+ cells are essential for allojection. *J. Exp. Med.* **184**: 2013-2018.
- Kröger, B., and I. Horak.** 1987. Isolation of novel human retrovirus-related sequences by hybridization to synthetic oligonucleotides complementary to the tRNA(Pro) primer-binding site. *J. Virol.* **61**: 2071-2075.
- Kurth, R., R. Löwer, J. Löwer, R. Harzmann, R. Pfeiffer, C. G. Schmidt, J. Fogh, and H. Frank.** 1980. Oncovirus synthesis in human teratocarcinoma cultures and an increased anti-viral immune reactivity in corresponding patients. In: Essex, M., G. J. Todaro and H. zur Hausen (eds.) *Viruses in the naturally occurring cancers*, N. Y., Cold Spring Harbor Lab., 835-846.
- La Mantia, G., D. Maglione, G. Pengue, A. Di Cristofano, A. Simeone, L. Lanfrancone, and L. Lania.** 1991. Identification and characterization of novel human endogenous retroviral sequences preferentially expressed in undifferentiated embryonal carcinoma cells. *Nucl. Acids Res.* **19**: 1513-1520.
- Lan, M. S., A. Mason, R. Coutant, Q. Y. Chen, A. Vargas, J. Rao, R. Gomez, S. Chalew, R. Garry, and N. K. Maclaren.** 1998. HERV-K10s and immune-mediated (type 1) diabetes. *Cell* **95**: 14-16.
- Lapatschek, M., S. Dürr, R. Löwer, C. Magin, H. Wagner, and T. Miethke.** 2000. Functional Analysis of the *env* Open Reading Frame in Human Endogenous Retrovirus IDDMK_{1,2}22 Encoding Superantigen Activity. *J. Virol.* **74**: 6386-6393.
- Larder, B. A., D. J. M. Purifoy, K. L. Powell, and G. Darby.** 1987. Site-specific mutagenesis of AIDS virus reverse transcriptase. *Nature* **327**: 716-717.
- Larsson, E., N. Kato, and M. Cohen.** 1989. Human endogenous proviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **148**: 115-132.
- Le Tissier, P, J. P. Stoye, Y. Takeuchi, C. Patience, and R. A. Weiss.** 1997. Two sets of human-tropic pig retrovirus. *Nature* **389**: 681-682.
- Leib-Mösch, C., M. Haltmeier, T. Werner, E. M. Geigl, R. Brack-Werner, U. Franke, V. Erfle, and R. Hehlmann.** 1993. Genomic distribution and transcription of solitary HERV-K LTRs. *Genomics* **18**: 261.
- Leibold, D. M., G. D. Swergold, M. F. Singer, R. E. Thayer, B. A. Dombroski, and T. G. Fanning.** 1990. Translation of LINE-1 DNA elements *in vitro* and in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**: 6990-6994.
- Levy, J. A., S. K. Datta, and R. S. Schwartz.** 1977. Recovery of xenotropic virus but not ecotropic virus during graft-versus-host reaction in mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **7**: 262-268.
- Lin, H., S. F. Bolling, P. S. Linsley et al.,** 1993. Long-term acceptance of major histocompatibility complex mismatched cardiac allografts induced by CTLA4Ig plus donor-specific transfusion. *J. Exp. Med.* **178**: 1801-1806.
- Löwer, J., E. M. Wondrak, and R. Kurth.** 1987. Genome analysis and reverse transcriptase activity of human teratocarcinoma-derived retroviruses. *J. Gen. Virol.* **68**: 2807-2815.

- Löwer, R., J. Löwer, and R. Kurth.** 1996. The viruses in all of us: Characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **93**: 5177-5184.
- Löwer, R., J. Löwer, C. Tondera-Koch, and R. Kurth.** 1993. A general method for the identification of transcribed retrovirus sequences (R-U5 PCR) reveals the expression of the human endogenous retrovirus loci HERV-H and HERV-K in teratocarcinoma cells. *Virology* **192**: 501-511.
- Löwer, R., J. Löwer, H. Frank, R. Harzmann, and R. Kurth.** 1984. Human teratocarcinomas cultured *in vitro* produce unique retrovirus-like viruses. *J. Gen. Virol.* **65**: 887-898.
- Löwer, R., K. Boller, B. Hasenmaier, C. Korbmacher, N. Müller-Lantsch, J. Löwer, and R. Kurth.** 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., R. R. Tönjes, C. Korbmacher, R. Kurth, and J. Löwer.** 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., R. R. Tönjes, K. Boller, J. Denner, B. Kaiser, R. C. Phelps, J. Löwer, R. Kurth, K. Badenhop, H. Donner, K. H. Usadel, T. Miethke, M. Lapatschek, and H. Wagner.** 1998. Development of insulin-dependent diabetes mellitus does not depend on specific expression of the human endogenous retrovirus HERV-K. *Cell* **95**: 11-14.
- Lu, S., J. Arthos, D. C. Montefiori, Y. Yasutomi, K. Manson, F. Mustafa, E. Johnson, J. C. Santor, J. Wissink, J. I. Mullins, J. R. Haynes, N. L. Letvin, M. Wyand, and H. L. Robinson.** 1996. Simian immunodeficiency virus DNA vaccine trial in macaques. *J. Virol.* **70**: 3987-3991.
- Lugert, R., H. König, R. Kurth, and R. R. Tönjes.** 1996. Specific suppression of false-positive signals in the product-enhanced reverse transcriptase assay. *Biotechniques* **20**: 210-217.
- Maeda, N.** 1985. Nucleotide sequence of the haptoglobin and haptoglobin-related gene pair. The haptoglobin-related gene contains a retrovirus-like element. *J. Biol. Chem.* **260**: 6698-6709.
- Maeda, N., and H. S. Kim.** 1990. Three independent insertions of retrovirus-like sequences in the haptoglobin gene cluster of primates. *Genomics* **8**: 671-683.
- Mager, D. L., and J. D. Freeman.** 1987. Human endogenous retrovirus-like genome with type C *pol* sequences and *gag* sequences related to human T-cell lymphotropic viruses. *J. Virol.* **61**: 4060-4066.
- Mager, D. L., and P. S. Henthorn.** 1984. Identification of a retrovirus-like repetitive element in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 7510-7514.
- Makowa, L., D. V. Cramer, A. Hoffman, M. Breda, L. Sher, G. Eiras-Hreha, P. J. Tuso, C. Yasunaga, C. A. Consenza, G. D. Wu, F. A. Chapman, and L. Podesta.** 1995. The use of pig liver xenograft for temporary support of a patient with fulminant hepatic failure. *Transplantation* **59**: 1654-1659.
- Mariani-Costantini, R., T. M. Horn, and R. Callahan.** 1989. Ancestry of a human endogenous retrovirus family. *J. Virol.* **63**: 4982-4985.

- Martin, M. A, T. Bryan, T. F. McCutchan, and H. W. Chan.** 1981. Detection and cloning of murine leukemia virus-related sequences from African green monkey liver DNA. *J. Virol.* **39**: 835-844.
- Martin, S. L., C. F. Voliva, F. H. Burton, M. H. Edgell, and C. A. Hutchison.** 1984. A large interspersed repeat found in mouse DNA contains a long open reading frame that evolves as if it encodes a protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 2308-2312.
- Martin, S. L.** 1991. Ribonucleoprotein particles with LINE-1 RNA in mouse embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 4804-4807.
- Mathias, S. L., A. F. Scott, H. J. Kazazian, J. D. Boeke, and A. Gabriel.** 1991. Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. *Science* **254**: 1808-1810.
- Mayer, J., E. U. Meese, and N. Müller-Lantsch.** 1997a. Multiple human endogenous retrovirus K (HERV-K) loci with Gag open reading frames in the human genome. *Cytogenet. Cell Genet.* **78**: 1-5.
- Mayer, J., E. U. Meese, and N. Müller-Lantsch.** 1997b. Chromosomal assignment of human endogenous retrovirus K (HERV-K) Env open reading frames. *Cytogenet. Cell Genet.* **79**: 157-161.
- Mayer, J., M. Sauter, A. Rácz, D. Scherer, and N. Müller-Lantsch.** 1999. An almost-intact human endogenous retrovirus K on human chromosome 7. *Nat. Genet.* **21**: 257-258.
- McCarrey, J. R., and K. Thomas.** 1987. Human testis-specific PGK gene lacks introns and possesses characteristics of a processed gene. *Nature* **326**: 501-505.
- Medstrand, P. and J. Blomberg.** 1993. Characterization of novel reverse transcriptase encoding human endogenous retroviral sequences similar to type A and type B retroviruses: differential transcription in normal human tissues. *J. Virol.* **67**: 6778-6787.
- Medstrand, P., M. Linerskog, and J. Blomberg.** 1992. Expression of human endogenous retroviral sequences in peripheral blood mononuclear cells of healthy individuals. *J. Gen. Virol.* **73**: 2463-2466.
- Meric, C. and S. P. Goff.** 1989. Characterisation of Moloney murine leukemia virus mutants with single-amino-acid substitutions in the Cys-His box of the nucleocapsid protein. *J. Virol.* **63**: 1558-1568.
- Moore, J. K., and J. E. Haber.** 1996. Capture of retrotransposon DNA at the sites of chromosomal double-strand breaks. *Nature* **383**: 644-646.
- Moore, R., M. Dixon, R. Smith, G. Peters, C. Dickson.** 1987. Complete nucleotide sequence of a milk-transmitted mouse mammary tumor virus: two frameshift suppression events are required for translation of *gag* and *pol*. *J. Virol.* **61**: 480-490.
- Müller-Lantsch, N., M. Sauter, A. Weiskircher, K. Kramer, B. Best, M. Buck, and F. Grässer.** 1993. The human endogenous retroviral element K10 (HERV-K10) encodes for a full length *gag* homologous 73 kD protein and a functional protease. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **9**: 343.
- Murphy, V. J, L. C. Harrison, W. A. Rudert, P. Luppi, M. Trucco, A. Fierabracci, P. A. Biro, and G. F. Bottazzo.** 1998; Retroviral superantigens and type 1 diabetes mellitus. *Cell* **95**: 9-11.
- Nagy, J..** 1999. A note on the early history of renal transplantation: Emerich (Imre) Ullmann. *Am. J. Nephrol.* **19**: 346-349.

- Nan, X.** 1998. Retrotransposition von rekombinanten endogenen und exogenen Retroviren in kultivierten Säugerzellen. Dissertation, Universität Ulm.
- O'Neill, R. R., C. E. Buckler, T. S. Theodore, M. A. Martin, and R. Repaske.** 1985. Envelope and long terminal repeat sequences of a cloned infectious NZB xenotropic murine leukemia virus. *J. Virol.* **53**: 100-106.
- O'Connell, C. D., and M. Cohen.** 1984. The long terminal repeat sequences of a novel human endogenous retrovirus. *Science* **226**: 1204-1206.
- Okazaki, S., K. Tsuchida, H. Maekawa, H. Ishikawa and H. Fujiwara.** 1992. Identification of a pentanucleotide telomeric sequence, (TTAGG)_n, in the silkworm *Bombyx mori* and in other insects. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 1424-1432.
- Ono, M., H. Toh, T. Miyata, and T. Awaya.** 1985. Nucleotide sequence of the Syrian hamster intracisternal A-particle gene: Close evolutionary relationship of type A particle gene to types B and D oncovirus genes. *J. Virol.* **55**: 387-394.
- Ono, M., M. Kawakami, and H. Ushikubo.** 1987. Stimulation of expression of the human endogenous Retrovirus genome by female steroid hormones in human breast cancer cell line T47D. *J. Virol.* **61**: 2059-2062.
- Ono, M., T. Yasunaga, and H. Ushikubo.** 1986. Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. *J. Virol.* **60**: 589-598.
- 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.* **58**: 937-944.
- Orgel, L. E., and F. H. Crick.** 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* **284**: 604-607.
- Ostrowski, M. C., D. Berard, and G. L. Hager.** 1981. Specific transcriptional initiation *in vitro* on murine type C retrovirus promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **78**: 4485-4489.
- Panganiban, A. T., and H. M. Temin.** 1983. The terminal nucleotides of retrovirus DNA are required for integration but not for virus production. *Nature* **300**: 155-160.
- Paradis, K., G. Langford, Z. Long, W. Heneine, P. Sandstrom, W. M. Switzer, L. E. Chapman, C. Lockey, D. Onions, and E. Otto.** 1999. Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. *Science* **285**: 1236-1241.
- Patience, C. Y. Takeuchi, and R. A. Weiss.** 1997. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat. Med.* **3**: 282-286.
- Patience, C., G. S. Patton, Y. Takeuchi, R. A. Weiss, M. O. McClure, L. Rydberg, and M. E. Breimer.** 1998. No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys. *Lancet* **352**: 699-701.
- Paul, L. C., and N. L. Tilney.** 1996. Alloantigen-dependent events in chronic rejection. In Tilney N. L., T. B. Strom, L. C. Paul, (eds). *Transplantation biology: cellular and molecular aspects*. Philadelphia: Lippincott-Raven. 567-575.
- Paulson, K. E., N. Deka, C. W. Schmid, R. Misra, C. W. Schindler, M. G. Rush, L. Kadyk, and L. Leinwand.** 1985. A transposon-like element in human DNA. *Nature* **316**: 359-361.
- Pearson, T. C., D. Z. Alexander, R. Hendrix, E. T. Elwood, P. S. Linsley, K. J. Winn, and C. P. Larsen.** 1997. CTLA4-Ig plus bone marrow induces long-term allograft survival

and donor specific unresponsiveness in the murine model: evidence for hematopoietic chimerism. *Transplantation* **61**: 997-1004.

Perez, V., L. V. Parijs, A. Biukians, X. X. Zheng, T. B. Strom, and A. K. Abbas. 1997. Induction of peripheral T cell tolerance *in vivo* requires CTLA4 engagement. *Immunity* **6**: 411-417

Perl, A., J. D. Rosenblatt, I. S. Chen, J. P. DiVincenzo, R. Bever, B. J. Poiesz, and G. N. Abraham. 1989. Detection and cloning of new HTLV-related endogenous sequences in man. *Nucleic. Acids Res.* **17**: 6841-6854.

Persidis, A. 1999. Xenotransplantation. *Nat. biotech.* **17**: 205-206

Poch, O., I. Sauvaget, M. Delarue, and N. Tardo. 1989. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent encoding elements. *EMBO J.* **8**: 3867-3874.

Reemstma, K., B. H. McCracken, J. U. Schlegel et al., 1964. Renal heterotransplantation in man. *Ann. Surg.* **160**: 384-410.

Repaske, R., P. E. Steele, R. R. O'Neill, A. B. Rabson, and M. A. Martin. 1985. Nucleotide sequence of a full-length human endogenous retroviral segment. *J. Virol.* **54**: 764-772.

Rogers, N. J., A. Dorling, and M. Moore. 1998. Xenotransplantation: steps towards a clinical reality. *Immunol. Today* **19**: 206-208.

Rosen, C. A., and G. N. Pavlakis. 1990. Tat and Rev: positive regulators of HIV gene expression. *AIDS* **4**: A51

Rother, R. P., W. L. Fodor, J. P. Springhorn, C. W. Birks, E. Setter, M. S. Sandrin, S. P. Squinto, and S. A. Rollins. 1995. A novel mechanism of retrovirus inactivation in human serum mediated by anti-alpha-galactosyl antibody. *J. Exp. Med.* **182**: 1345-1355.

Sachs, D. H., M. Sykes, J. L. Greenstein, and A. B. Cosimi. 1995. Tolerance and xenograft survival. *Nat. Med.* **1**: 969.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, N. Y.

Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **74**: 5463-5467.

Sassaman, D. M., B. A. Dombroski, J. V. Moran, M. L. Kimberland, T. P. Naas, R. J. DeBerardinis, A. Gabriel, G. D. Swergold, and H. H. Kazazian. 1997. Many human L1 elements are capable of retrotransposition. *Nat. Genet.* **16**: 37-43.

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

Sayegh, M. H., and L. A. Turka. 1998. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N. Engl. J. Med* **338**: 1813-1821.

Scheidreit, C., and M. Beato. 1984. Contacts between hormone receptor and DNA double helix within in a glucocorticoid regulatory element of mouse mammary tumor virus. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **80**: 3029-3033.

Scheidreit, C., S. Geisse, H. M. Westphal, and M. Beato. 1983. The glucocorticoid receptor binds to defined nucleotide sequence near the promoter of mouse mammary tumor virus. *Nature* **304**: 749-752.

- Schildhauer, R.** 1998. Mit dem Herzen einer Sau. *Kosmos* **9**: 33-39.
- Schommer, S., M. Sauter, H. G. Kräuslich, B. Best, and N. Müller-Lantsch.** 1996. Characterization of the human endogenous retrovirus K (HERV-K) proteinase. *J. Gen. Virol.* **77**: 375-379.
- Sherr, D., M. R. Szewczuk, and G. W. Siskind.** 1977. Ontogeny of B lymphocyte function. IV. Kinetics of maturation of B lymphocytes from fetal and neonatal mice when transferred into adult irradiated hosts. *J. Immunol.* **119**:1674-1679.
- Shiba, T, and K. Saigo.** 1983. Retrovirus-like particles containing RNA homologous to the transposable element copia in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **302**: 119-24.
- Shih, A., R. Misra, and M. G. Rush.** 1989. Detection of multiple, novel reverse transcriptase coding sequences in human nucleic acids: relation to primate retroviruses. *J. Virol.* **63**: 64-75.
- Smit, A. F., and A. D. Riggs.** 1996. Tiggers and DNA transposon fossils in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **20**: 1443-1448.
- Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Starzl, T. E., J. Fung, A. Tzakis, S. Todo, A. J. Demetris, I. R. Marino, H. Doyle, A. Zeevi, V. Warty, M. Michaels. et al.,** 1993. Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet* **341**: 65-71.
- Stewart, M. A., M. Warnock, A. Wheeler, N. Wilkie, J. I. Mullins, D. E. Onions, and J. C. Neil.** 1986. Nucleotide sequences of a feline leukemia virus subgroup A envelope gene and long terminal repeat and evidence for the recombinational origin of subgroup B viruses. *J. Virol.* **58**: 825-834.
- Still, J., B. Craft-Coffman, E. Law, J. Colon-Santini, and J. Grant.** 1998. Burns of children caused by electric stoves. *J. Burn Care Rehabil.* **19**: 364-365.
- Stoye, J. P., and J. M. Coffin.** 1987. The four classes of endogenous murine leukemia virus: structural relationships and potential for recombination. *J. Virol.* **61**: 2659-2669.
- Stoye, J. P., and J. M. Coffin.** 1995. The dangers of xenotransplantation. *Nat. Med.* **1**: 1100.
- Swergold, G. D.** 1990. Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter. *Mol. Cell Biol.* **10**: 6718-6729.
- Takeuchi, Y., C. D. Porter, K. M. Strahan, A. F. Preece, K. Gustafsson, F. L. Cosset, R. A. Weiss, and M. K. Collins.** 1996. Sensitization of cells and retroviruses to human serum by (α 1-3) galactosyltransferase. *Nature* **379**: 85-88.
- Takeuchi, Y., C. Patience, S. Magre, R. A. Weiss, P. T. Banerjee, P. Le Tissier, and J. P. Stoye.** 1998. Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus. *J. Virol.* **72**: 9986-9991.
- Teich, N.** 1985. Taxonomy of retroviruses. In: R. A. Weiss, H. Varmus, J. M. Coffin (eds.). *RNA tumor viruses*. Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory. 1-16.
- Temin, H. M.** 1980. Origin of retroviruses from cellular moveable genetic elements. *Cell* **21**: 599-600.
- Teng, S. C., B. Kim, and A. Gabriel.** 1996. Retrotransposon reverse-transcriptase-mediated repair of chromosomal breaks. *Nature* **383**: 641-644.

- Tilney, N. L. and L. C. Paul.** 1996. Antigen-independent events leading to chronic graft dysfunction. In Tilney N. L., T. B. Strom, L. C. Paul, eds. *Transplantation biology: cellular and molecular aspects*. Philadelphia: Lippincott-Raven. 629-637.
- Tönjes, R. R.** 1997. Transplantation von Organen aus Schweinen- Gefahren durch endogene Retroviren. *Spektrum der Wissenschaft* **6**: 5-21.
- Tönjes, R. R., C. Limbach, R. Löwer, and R. Kurth.** 1997a. Expression of human endogenous retrovirus type K envelope glycoprotein in Insect and mammalian cells. *J. Virol.* **71**: 2747-2756.
- Tönjes, R. R., F. Czauderna, and R. Kurth.** 1999. Genome-wide screening, cloning, chromosomal assignment, and expression of full-length human endogenous retrovirus type K. *J. Virol.* **73**: 9187-9195.
- Tönjes, R. R., F. Czauderna, N. Fischer, U. Krach, K. Boller, P. Chardon, C. Rogel-Gaillard, M. Niebert, G. Scherf, A. Werner, and R. Kurth.** 2000. Molecularly cloned porcine endogenous retroviruses replicate on human cells. *Transpl. Proc.* **32**: 1158-1161.
- Tönjes, R. R., K. Boller, C. Limbach, R. Lugert, and R. Kurth.** 1997b. Characterization of human endogenous retrovirus type K virus like particles generated from recombinant baculoviruses. *Virology* **233**: 280-291.
- Tönjes, R. R., R. Löwer, K. Boller, J. Denner, B. Hasenmaier, H. Kirsch, H. König, C. Korbmacher, C. Limbach, R. Lugert, R. C. Phelps, J. Scherer, K. Thelen, J. Löwer, and R. Kurth.** 1996. HERV-K: the biologically most active human endogenous retrovirus family. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **13** (Suppl 1): 261-267.
- Tönjes, R. R.** 1999. Xenogene porcine endogene Retroviren: Genanalysen und Replikationsverhalten. *Transplantationsmedizin* **11**: 208-216.
- Ullu, E., and C. Tschudi.** 1984. Alu sequences are processed 7SL RNA genes. *Nature* **312**: 171-172.
- Urnovitz, H. B., and W. H. Murphy.** 1996. Human endogenous retroviruses: nature, occurrence, and clinical implications in human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**: 72-99.
- van der Kuyl, A. C., R. Mang, J. T. Dekker, and J. Goudsmit.** 1997. Complete nucleotide sequence of simian endogenous type D retrovirus with intact genome organization: evidence for ancestry to simian retrovirus and baboon endogenous virus. *J. Virol.* **71**: 3666-3676.
- Vanhove, B., B. Charreau, A. Cassard, C. Pourcel, and J. P. Soulillou.** 1998a. Intracellular expression in pig cells of anti-alpha1,3galactosyltransferase single-chain FV antibodies reduces Gal alpha1,3Gal expression and inhibits cytotoxicity mediated by anti-Gal xenoantibodies. *Transplantation* **66**: 1477-1485.
- Vanhove, B., J. P. Renard, and J. P. Soulillou.** 1998b. Genetic engineering in the pig. Gene knockout and alternative techniques. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **30**: 28-36.
- Venables, P. J., S. M. Brookes, D. Griffiths, R. A. Weiss, and M. T. Boyd.** 1995. Abundance of an endogenous retroviral envelope protein in placental trophoblasts suggests a biological function. *Virology* **211**: 589-592.
- Vernon, M. L., J. M. McMahon, and J. J. Hackett.** 1974. Additional evidence of type-C particles in human placentas. *J. Natl. Cancer Inst.* **52**: 987-989.
- Vink, C., D. C. van Gent, Y. Elgersma, R. H. A. Plasterk.** 1991. Human immunodeficiency virus integrase protein requires a subterminal position of its viral DNA recognition sequence for efficient cleavage. *J. Virol.* **65**: 4636-4644.

- Weiner, A. M., P. L. Deininger, and A. Efstratiadis.** 1986. Nonviral retrotransposons: Genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. *Ann. Rev. Biochem.* **55**: 631-661.
- Weiss, R. A.** Xenografts and retroviruses. 1999. *Science* 285:1221-1222.
- Werner, T., R. Brack-Werner, C. Leib-Mösch, H. Backhaus, V. Erfle, and R. Hehlmann.** 1990. S71 is a phylogenetically distinct human endogenous retroviral element with structural and sequence homology to simian sarcoma virus (SSV). *Virology* **174**: 225-238.
- Wilkinson, D. A., D. L. Mager, and J. A. Leong.** 1994. Endogenous human retroviruses. In: *The Retroviridae*, Vol 1 (J. A. Levy ed.) Plenum Press, N. Y. 465-535.
- Williams, G. M., D. M. Hume, R. P. Hudson Jr., P. J. Morris, K. Kano, and F. Milgrom.** 1968. "Hyperacute" renal-homograft rejection in man. *N. Engl. J. Med.* **279**: 611-618.
- Wilson, C. A., S. Wong, J. Muller, C. E. Davidson, T. M. Rose, and P. Burd.** 1998. Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *J. Virol.* **72**: 3082-3087.
- Wilson, C. A., S. Wong, M. VanBrocklin, and M. J. Federspiel.** 2000. Extended analysis of the in vitro tropism of porcine endogenous retrovirus. *J. Virol.* **74**: 49-56.
- Xiong, Y., and T. H. Eickbush.** 1988. Similarity of reverse transcriptase-like sequences of viruses, transposable elements, and mitochondrial introns. *Mol. Biol. Evol.* **5**: 675-690
- Xiong, Y., and T. H. Eickbush.** 1990. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J.* **9**: 3353-3362.
- Ye, Y. M. Niekrasz, S. Kosanke, R. Welsh, H. E. Jordan, J. C. Fox, W. C. Edwards, C. Maxwell, and D. K Cooper.** 1994. The pig as a potential organ donor for man. A study of potentially transferable disease from donor pig to recipient man. *Transplantation* **15**: 694-703.

Danksagung

Herrn Professor Dr. Reinhard Kurth möchte ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Paul-Ehrlich-Institut sowie die wertvollen Anregungen und die stets gewährte Unterstützung während der Durchführung meiner Arbeit danken.

Herrn Dr. Ralf R. Tönjes möchte ich für die umfassende wissenschaftliche Anleitung bei der Durchführung der Arbeit, für die stete Diskussionsbereitschaft und die ausdauernde Hilfsbereitschaft danken.

Herrn Prof. Dr. Dr. Fasold danke ich für die freundliche und fachübergreifende Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Martin Selbert danke ich für die zahlreichen Sequenzierungen.

Frau Rahmouni und Herrn Bartel danke ich für die fototechnischen Arbeiten.

Meinen lieben Kolleginnen und Kollegen Dörte Bauer, Gundula Braun, Dr. Corinna Cosma, Nicole Fischer, Dr. Peter Müller, Dr. Frank Nocken, Isabel Schmitt, Stefanie Steidl und insbesondere Dr. Ulrich Krach danke ich für die angenehme Zeit und Unterstützung während meiner Arbeit.

Folgenden Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Paul-Ehrlich-Institutes danke ich für die Anregungen, die Diskussionsbereitschaft, ihre Hilfsbereitschaft und für das freundliche Arbeitsklima: Herrn Dr. Klaus Boller, Frau Yvonne Buckendahl, Herrn Prof. Dr. Klaus Cichutek, Herrn Dr. Martin Engelstädter, Frau Renate König, Frau Dr. Roswitha Löwer, Frau Dr. Heike Merget-Millitzer, Herrn Dr. Jörn Stütz, Frau Dr. Ann-Cathrin Svensson. Sowie all` denen, die ich trotz ihrer Beiträge hier nicht namentlich erwähnt habe.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre Unterstützung und Geduld, die sie während dieser Zeit für mich aufgebracht haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Frank Czauderna
Anschrift: Naugarder Str. 39
10409 Berlin
Geburtsdatum: 13. Januar 1969
Geburtsort: Greven
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

Marien-Grundschule, Greven	1975 - 1979
Gymnasium Augustinianum, Greven <i>Abschluß:</i> Allgemeinen Hochschulreife	1979 - 1988

Hochschulausbildung

Aufnahme des Studiums der Biologie/Diplom an der Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster <i>Studienschwerpunkte:</i> Mikrobiologie, Molekularbiologie und Biochemie	10/1989
<i>Erwerb des Vordiploms</i>	09/1991
Diplomarbeit im Fachbereich Mikrobiologie zu dem Thema „Untersuchungen zur Struktur und zum Transfer linearer nukleärer Hybridplasmide in Hefen“	07/1994 - 07/1995
<i>Abschluß:</i> Diplom-Biologe, Gesamtnote: sehr gut	09/1995
Promotionsstudium am Bundesamt für Sera und Impfstoffe, Paul-Ehrlich-Institut, Langen zu dem Thema: „Klonierung und Charakterisierung von biologisch aktiven endogenen Retroviren des Menschen und des Schweins“	02/1996
Angestellt als Wissenschaftler bei der Atugen AG, Berlin	seit 07/1999