

HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN



**Mathematisch Naturwissenschaftliche Fakultät I
Institut für Biologie**

Diplomarbeit

zum Erwerb des akademischen Grades

Diplom-Biologin

**Entwicklung eines Kleintiermodells zur
Evaluierung von Impfstoffen gegen Retroviren**

vorgelegt von
Annekathrin Möller

angefertigt in der Arbeitsgruppe
Retrovirus-induzierte Immunsuppression
am Robert Koch-Institut

Berlin, im August 2007

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Retroviren.....	7
1.1.1 Taxonomie.....	8
1.1.2 Morphologie retroviraler Partikel.....	9
1.1.3 Genomstruktur.....	10
1.1.4 Retrovirale Proteine.....	11
1.1.4.1 Gruppenspezifische Antigene.....	11
1.1.4.2 Enzyme.....	11
1.1.4.3 Virale Hüllproteine.....	12
1.1.4.4 Akzessorische und regulatorische Proteine.....	13
1.1.5 Lebenszyklus.....	14
1.2 Humanes Immundefizienzvirus (HIV).....	15
1.3 Gammaretroviren.....	17
1.3.1 Felines Leukämievirus (FeLV).....	18
1.3.2 Porcines Endogenes Retrovirus (PERV).....	18
1.3.3 Gibbon Ape Leukemia Virus (GaLV).....	19
1.3.4 Koala-Retrovirus (KoRV).....	19
1.4 Zielstellung der Arbeit.....	21
2. Material und Methoden	23
2.1 Material.....	23
2.1.1 Chemikalien.....	23
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	24
2.1.3 Geräte.....	25
2.1.4 Kommerzielle Kits.....	26
2.1.5 Zellen.....	26
2.1.5.1 Eukaryotische Zellen.....	26
2.1.5.2 Bakterien.....	26
2.1.6 Nährmedien.....	26
2.1.7 Puffer und Lösungen.....	27
2.1.8 Antikörper.....	28
2.1.9 Primer und Sonden.....	28
2.1.10 Vektoren.....	29
2.2 Methoden.....	30
2.2.2 Mikrobiologische Methoden.....	30
2.2.2.1 Kultivierung und Aufbewahrung von Bakterien.....	30
2.2.2.2 Bestimmung der Zelldichte.....	30
2.2.2.3 Herstellung chemokompetenter Bakterien.....	31
2.2.2.4 Transformation chemokompetenter Bakterien.....	31
2.2.2.5 Expression rekombinanter Proteine.....	31
2.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	32
2.2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese.....	32
2.2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction, PCR</i>).....	32
2.2.3.3 <i>Real-time quantitative PCR</i>	33
2.2.3.4 Kolonie-PCR.....	35
2.2.3.5 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	35
2.2.3.6 Gelextraktion.....	35
2.2.3.7 Plasmid-Präparation aus Bakterien.....	36
2.2.3.8 Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentrationen.....	36
2.2.3.9 Restriktionsverdau.....	36
2.2.3.10 Ligation.....	37

2.2.3.11	Sequenzierung	37
2.2.3.12	cDNA-Synthese	37
2.2.3.13	Isolation genomischer DNA	38
2.2.4	Zellbiologische Methoden	38
2.2.4.1	Kultivierung und Passagierung	38
2.2.4.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	38
2.2.4.3	Bestimmung der Lebendzellzahl	39
2.2.4.4	Isolierung von PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation	39
2.2.4.5	Etablierung einer Tumorzelllinie	39
2.2.4.6	Aufschluss eukaryotischer Zellen (Proteinase K)	40
2.2.4.7	Aufschluss eukaryotischer Zellen (RIPA-Lyse)	40
2.2.5	Virologische Methoden	40
2.2.5.1	Ultrazentrifugation	40
2.2.5.2	Isolation viraler RNA	41
2.2.5.3	Erzeugung / Gewinnung virushaltigen Zellkulturüberstandes	41
2.2.5.4	Titration virushaltiger Zellkulturüberstände	41
2.2.5.5	Neutralisationsassay	42
2.2.6	Proteinbiochemische Methoden	42
2.2.6.1	Aufreinigung rekombinanter Proteine	42
2.2.6.2	Proteinbestimmung nach Bradford	43
2.2.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
2.2.6.4	Konzentration von Proteinlösungen	44
2.2.7	Immunologische Methoden	45
2.2.7.1	Immunisierung	45
2.2.7.2	Western Blot	45
2.2.7.3	Strippen	46
2.2.7.4	Epitopkartierung	46
2.2.7.5	Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA)	46
2.2.7.6	KoRV p27Gag Capture ELISA	47
3.	Ergebnisse	49
3.1	Untersuchung der Übertragungswege des Koala-Retrovirus	49
3.1.1	Etablierung eines KoRV-Kleintiermodells	49
3.1.2	„Rotationsversuch“	49
3.1.3	Isolation viraler RNA aus Kot, Urin und Speichel	51
3.1.4	Provirusnachweis in Blut und Organen infizierter Ratten	53
3.1.5	Charakterisierung / Optimierung bestehender Real-time PCR- Systeme	55
3.2	Wirtsspektrumanalyse in vitro	56
3.3	Einfluss des Komplementsystems auf eine KoRV-Infektion	58
3.4	Proviruslast in Koalas einer Zuchtkolonie	59
3.5	Verringerung der Virusreplikation in vitro	60
3.5.1	Inkubation mit 5-Aza-2'-desoxycytidin und 5-Brom-2'-desoxyuridin	60
3.5.2	Sequenzierung des KoRV-env	61
3.6	Etablierung eines KoRV p27Gag Capture ELISAs	62
3.6.1	Vorbereitungen	63
3.6.2	Expression und Aufreinigung der rekombinanten p27Gag-Fragmente	63
3.6.3	Aufreinigung von p27Gag-Antikörpern aus Ziegen- und Rattenserum	64
3.6.4	Test des Systems	65
3.7	Immunisierungsstudie	65
3.7.1	Vorbereitungen	65
3.7.2	Expression und Aufreinigung der rekombinanten p15E-Konstrukte	66
3.7.3	Untersuchung der Antikörperantwort in Western Blot und Neutralisationsassay	67
3.7.4	Epitopkartierung	68

4. Diskussion	70
4.1 Untersuchung der Übertragungswege des Koala-Retrovirus.....	70
4.1.1 „Rotationsversuch“ / Isolation viraler RNA aus Kot, Urin und Speichel.....	70
4.1.2 Provirusnachweis und Tumorbildung in infizierten Ratten	72
4.2 Wirtsspektrumanalyse in vitro	73
4.3 Einfluss des Komplementsystems auf eine KoRV-Infektion	75
4.4 Proviruslast in Koalas einer Zuchtkolonie.....	77
4.5 Verringerung der Virusreplikation in vitro	78
4.6 Etablierung eines KoRV p27Gag Capture ELISAs	80
4.7 Induktion neutralisierender Antikörper gegen KoRV-Hüll- proteine.....	81
4.7.1 Notwendigkeit von Impfstoffen gegen Retroviren	81
4.7.2 p15E-Immunisierungsstudien.....	82
5. Zusammenfassung.....	85
Literaturverzeichnis	86
Danksagung.....	94
Anhang.....	95
Statistik	95
ELISA Rotationsversuch	95
KoRV-Neutralisationsassay Immunisierungsstudie BfR	96
KoRV-Neutralisationsassay Immunisierungsstudie RKI	98
KoRV-Neutralisationsassay Rotationsversuch	101
Proviruslast in verwandten Koalas	103
Eigenständigkeitserklärung.....	104

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematischer Aufbau eines Retrovirus	9
Abb. 1.2: Schematische Darstellung der retroviralen Genomorganisation der in das Zellgenom integrierten Provirus-DNA	10
Abb. 1.3: Schematische Darstellung eines transmembranen Hüllproteins	13
Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Konformationsänderungen des TM-Proteins während der Fusion zellulärer und viraler Membranen	13
Abb. 1.5: Schematische Darstellung des Infektionszyklus von Retroviren	15
Abb. 1.6: Vergleich von Virusstammbäumen und Stammbäumen der Säugetierwirte	17
Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pCal-n und der integrierten <i>Multiple Cloning Site (MCS)</i>	29
Abb. 2.2: Funktionsprinzip der TaqMan- Sonden.....	34
Abb. 2.3: Schematische Darstellung eines Capture ELISAs	48
Abb. 3.1: Schematische Darstellung des „Rotationsversuches“	49
Abb. 3.2: Bestimmung von AK-Mengen in Rattenserum	50
Abb. 3.3: Western Blot zur Testung von Seren auf KoRV p15E-AK.....	50
Abb. 3.4: KoRV-Neutralisationsassay Rotationsversuch.....	51
Abb. 3.5: KoRV- <i>env</i> - und <i>pol</i> -spezifische Two-Step RT-PCR zum Nachweis der Funktionalität des Kits.....	52
Abb. 3.6: KoRV- <i>env</i> -spezifische Two-Step RT-PCR zur Bestimmung der Nachweisgrenze	52
Abb. 3.7: KoRV- <i>env</i> - und <i>pol</i> -spezifische Two-Step RT-PCR	53
Abb. 3.8, Abb. 3.9: KoRV- <i>env</i> -spezifische PCR auf genomischer DNA aus PBMCs	53
Abb. 3.10: KoRV- <i>env</i> -spezifische PCR auf genomischer DNA aus Organen der Ratte 86/3.....	54
Abb. 3.11: KoRV- <i>env</i> -spezifische PCR auf genomischer DNA aus Organen der Ratten 87/4 und 88/4	54
Abb. 3.12, Abb. 3.13: Real-time PCR auf Zelllysate KoRV-infizierter rat1-Zellen.....	55
Abb. 3.14: Vergleich zweier Real-time-PCRs	56
Abb. 3.15: Standardverdünnungsreihe des linearisierten rp15E-tragenden pCal-n-Vektors.....	56
Abb. 3.16: PERV- <i>env</i> -spezifische PCR auf Zelllysaten	57
Abb. 3.17: KoRV- <i>env</i> -spezifische PCR auf Zelllysaten	58
Abb. 3.18: KoRV- und PERV- <i>env</i> -spezifische PCR auf rat1-Zelllysaten	58
Abb. 3.19: KoRV- <i>env</i> -spezifische PCR auf Zelllysaten	59
Abb. 3.20: Alter, Geschlecht und Aufenthaltsort der untersuchten Individuen	59
Abb. 3.21: Anzahl der KoRV-Kopien pro Zelle	60
Abb. 3.22: Bestimmung der TCID ₅₀ /ml von Zellkulturüberständen nach Titration auf 293-Zellen.....	61
Abb. 3.23: Vergleich von KoRV- <i>env</i> -Sequenzen	62
Abb. 3.24: Western Blot Rotationsversuch	62
Abb. 3.25: ELISA Rotationsversuch	63
Abb. 3.26: SDS-PAGE der überexprimierten Gag-Fragmente, Coomassie-Färbung	64
Abb. 3.27: Western Blot der überexprimierten Gag-Fragmente	64
Abb. 3.28: Western Blot zur Kontrolle der Antikörperaufreinigung	65
Abb. 3.29: Schematische Darstellung der rekombinanten KoRV p15E-Konstrukte.....	66
Abb. 3.30: SDS-PAGE nach Expression bzw. vor Immunisierung	66
Abb. 3.31: Western Blot zur Testung der Immunisierungsseren auf p15E-Antikörper.....	67
Abb. 3.32: Western Blot zur Testung der Immunisierungsseren auf p15E-Antikörper.....	67
Abb. 3.33: KoRV-Neutralisationsassay Immunisierungsstudie RKI.....	68
Abb. 3.34: KoRV-Neutralisationsassay Immunisierungsstudie BfR.....	68
Abb. 3.35: Epitopkartierung	69
Abb. 3.36: Vergleichende Darstellung zweier Epitopkartierungen.....	69
Abb. 4.1: Übersicht über RaLV- und <i>c-ras</i> -Sequenzen, die an der Bildung des RaSV beteiligt sind	73
Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Komponenten und Effektormechanismen des Komplementsystems	76

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Übersicht über verwendete eukaryotische Zellen	26
Tab. 2.2: Übersicht über verwendete Primer und Sonden	28
Tab. 2.3: Gelzusammensetzung	44
Tab. 3.1: Wirtsspektrumanalyse <i>in vitro</i>	57

1. Einleitung

Während in den vergangenen Jahrhunderten vor allem bakterielle Infektionen, wie Pest (*Y. pestis*), Cholera (*V. cholerae*) und Tuberkulose (*M. tuberculosis*) Verursacher von großen Pandemien mit hoher Letalität waren, haben in den letzten Jahrzehnten Virusinfektionen einen zunehmend höheren Stellenwert eingenommen. Lenti- oder Coronaviren sowie Viren zahlreicher anderer Genera verbreiten sich durch die neugewonnene Mobilität des Menschen schnell weltweit und stellen neue Herausforderungen an die Entwicklung effektiver Therapien und präventiver Impfstoffe. Antivirale Medikamente sind oft mit starken Nebenwirkungen assoziiert, aber auch mit hohen Kosten, und häufig können sie das Leben des Patienten nur verlängern ohne ihn zu heilen. Die vielversprechendste Strategie zur Bekämpfung von Virusepidemien ist deshalb nach wie vor die präventive Vakzinierung. Die großen Erfolge von Impfkampagnen gegen das Pocken- oder Poliovirus sprechen für die Entwicklung von Impfstoffen zum Schutz gegen pathogene Viren.

1.1 Retroviren

Die Erforschung von Retroviren begann um 1910 mit den Arbeiten von Rous, Ellermann und Bang. Sie stellten zellfreie Extrakte aus Tumorzellen von Hühnern her und konnten anschließend zeigen, dass eine Injektion dieser Extrakte bei gesunden Tieren die Ausbildung von Tumoren verursachte. Die Theorie, dass ein RNA-Genom als Matrize für die DNA Synthese dienen könnte, wurde 1970 durch den Nachweis der Existenz einer viralen RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase (RT), bestätigt (Baltimore; Temin und Mizutani, 1970). Bis dahin war, dem zentralen Dogma der Molekularbiologie folgend, angenommen worden, dass ausschließlich DNA in RNA umgeschrieben werden kann, nicht aber umgekehrt. Lange Zeit waren Retroviren nur in der Tierwelt bekannt, bis 1971 das humane Spumaretrovirus (HSRV) aus menschlichem Gewebe isoliert werden konnte. R. Gallo brachte 1980 erstmals ein Retrovirus mit der Tumorgenese beim Menschen in Zusammenhang. Das von ihm beschriebene humane T-Zell Leukämie Virus (HTLV) gilt als Auslöser von T-Zell-Leukämien. 1983 identifizierten L. Montagnier und R. Gallo das humane Immundefizienzvirus HIV-1 als Retrovirus und Auslöser der Immunschwächekrankheit AIDS.

Retroviren können horizontal durch Infektion weitergegeben werden, aber auch vertikal durch Vererbung über die Keimbahn. Die Genome vieler Tierarten enthalten endogene Proviren als normale Gene, beispielsweise machen diese bis zu 8% des menschlichen Genoms aus. Die Integration der viralen DNA erfolgt an vielen Stellen des Wirtsgenoms und führt zu Wiederholungen kurzer Nukleotidfolgen an den Zielstellen, die je nach Art des retroviralen Elementes vier, fünf oder sechs Nukleotide umfassen. Während die meisten Insertionen keine offensichtliche Funktion haben und häufig als parasitäre (Doolittle & Sapienza, 1980; Orgel und Crick, 1980) oder junk-DNA bezeichnet werden, spielen einige endogene Retroviren

wichtige Rollen in der Wirtsbiologie. Unter anderem sind die Regulation von Transkriptionsvorgängen (Medstrand *et al.*, 2001 a; b), die Kontrolle von Zellfusionsprozessen während der plazentalen Entwicklung (Blond *et al.*, 2000; Rote *et al.*, 2004) und die Vermittlung von Resistenzen gegenüber exogenen retroviralen Infektionen (Ponferrada *et al.*, 2003) beschrieben worden. Endogene Retroviren sind jedoch auch mit Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht worden (Tenenbaum *et al.*, 1994), obwohl ihnen eine ursächliche Wirkung bis jetzt noch nicht nachgewiesen werden konnte.

1.1.1 Taxonomie

Historisch wurden die Retroviren zunächst nach ihrem elektronenmikroskopischen Erscheinungsbild in Typ A, B, C oder D-Retroviren eingeteilt. Später folgte eine Klassifikation, die auch biochemische Eigenschaften und den Zelltropismus berücksichtigte. Die Klassifikation unterschied *Onkornaviren*, *Spumaviren* und *Lentiviren*. Die aktuelle, zur Zeit verbindliche Taxonomie durch das *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)* unterteilt die Retroviren vor allem aufgrund ihrer genetischen Verwandtschaftsverhältnisse wie folgt in sieben Gattungen:

Familie: Retroviren (*Retroviridae*)

Unterfamilie: Orthoretroviren (*Orthoretrovirinae*)

Gattung (Genus):

α-Retrovirus (z.B. Rous-Sarkom-Virus (RSV))

β-Retrovirus (z.B. Maus-Mammatumovirus (MMTV))

γ-Retrovirus (z.B. Koala-Retrovirus (KoRV))

δ-Retrovirus (z.B. Humanes T-Zell-Leukämievirus 1 (HTLV-1))

ε-Retrovirus (z.B. Zander-Hautsarkomvirus (*walleye dermal sarcoma virus*, WDSV))

Lentivirus (z.B. Humanes Immundefizienzvirus 1 (HIV-1))

Unterfamilie: Spumaretroviren (*Spumaretrovirinae*)

Gattung (Genus):

Spumavirus (z.B. Simianes Foamyvirus (SFV))

Weiterhin wird zwischen exogenen und endogenen Retroviren unterschieden. Endogene Retroviren sind in das Genom aller Zellen des Organismus integriert und werden vertikal über die Keimbahn übertragen. Die Eliminierung endogener Retroviren durch Züchtung oder Haltung unter SPF-Bedingungen (*Specified Pathogen Free*) ist daher nicht möglich. Im Unterschied zu den endogenen Retroviren erfolgt die Übertragung der exogenen Retroviren von Organismus zu Organismus. Unter bestimmten Umständen kann es jedoch auch ausgehend von endogenen Proviren zur Produktion exogener infektiöser Partikel kommen. Retroviren sind in der Regel wirtsspezifisch, jedoch gilt die Übertragung einiger über die Artgrenze hinaus als gesichert (Koala-Retrovirus, Affen-Immundefizienzviren (SIV) oder Maus-Leukämievirus (MuLV)). Nach funktionellen Gesichtspunkten werden einfache und komplexe Retroviren unterschieden. Die einfachen Retroviren tragen lediglich Gene für die Strukturpro-

teine der Viruspartikel und die viralen Enzyme. Die komplexen Retroviren verfügen darüber hinaus über Gene, deren Produkte regulatorische und akzessorische Funktionen erfüllen. Eine weitere Unterteilung stützt sich auf Tropismen: ecotrope Viren können nur diejenige Spezies infizieren, in der sie produziert worden sind, amphotrope Viren sind in der Lage speziesübergreifend zu infizieren und xenotrope Viren können alle Spezies infizieren mit Ausnahme derjenigen, in der sie produziert worden sind.

1.1.2 Morphologie retroviraler Partikel

Retroviren haben einen Durchmesser von 80-130 nm und bestehen aus einem Kapsid sowie einer äußeren Hülle, die von der Zytoplasmamembran der Wirtszelle abgeleitet ist. Die Virusmembran ist mit viralen Glykoproteinen assoziiert, welche sich aus zwei Polypeptiden, dem Oberflächenhüllprotein (*surface glycoprotein*, SU) und dem transmembranen Hüllprotein (TM) zusammensetzen. Sie lagern sich zu trimeren Komplexen, sogenannten *Spikes*, zusammen, die mit den Rezeptoren und Korezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen interagieren und so deren Infektion initiieren. Unter der viralen Hülle befindet sich eine Schicht aus Matrixproteinen (MA), welche durch aminoterminal angefügte Myristinsäurereste mit dem inneren Teil der Hüllmembran verbunden sind. Kapside treten je nach Virusgruppe als konusförmige (Lentiviren), zylindrische (Deltaretroviren) oder sphärische Gebilde (Foamyviren) in Erscheinung. Sie enthalten neben den für den viralen Replikationszyklus wichtigen Enzymen Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR) außerdem zwei identische Moleküle einzelsträngiger RNA.

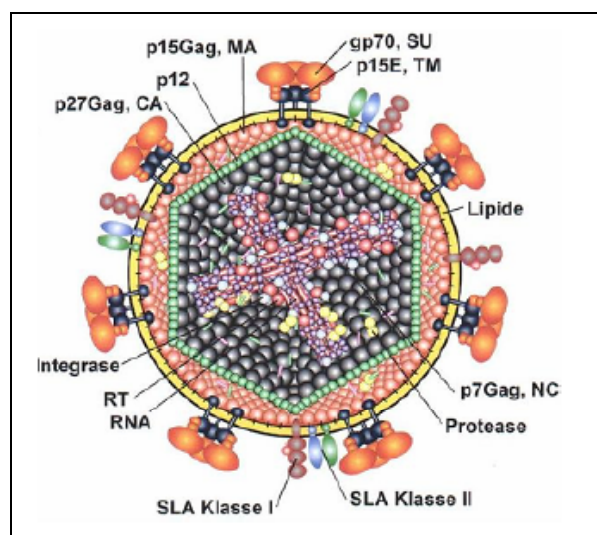


Abb. 1.1: Schematischer Aufbau eines Retrovirus (modifiziert; www.hiv.lanl.gov)

1.1.3 Genomstruktur

Das Genom von Retroviren besteht aus zwei sieben bis zwölf Kilobasen (kb) langen RNA-Strängen positiver Polarität, die wie typische eukaryotische messenger RNAs (mRNA) am 5'-Ende eine 7-Methylguaninkappe und am 3'-Ende einen poly(A)-Schwanz tragen. Einfache Retroviren wie KoRV codieren drei virale Gene, nämlich *gag* (gruppenspezifisches Antigen, Gruppe von inneren Strukturproteinen), *pol* (für enzymatische Proteine) und *env* (Bestandteile der Virushülle). Am 5'- und am 3'-Ende wird die RNA von identischen R-Regionen („redundant“) abgeschlossen, die den Transkriptionsstartpunkt und ein Signal für die Termination tragen. Auf den 5'-R-Bereich folgt die U5-Region, die invertierte Sequenzen für die Integration des Provirus in das Wirtsgenom trägt. In direkter Nachbarschaft liegt die Primerbindungsstelle (PBS), an die ein Molekül zellulärer transfer RNA (tRNA) gebunden ist. Stromabwärts der PBS befindet sich ein Spleißdonor (SD). Zwischen SD und der codierenden Region für Gag liegt das Verpackungssignal (Ψ), das eine sehr konservierte, stark gefaltete Sekundärstruktur ausbildet und unter anderem für die Dimerisierung mit einer weiteren genomischen RNA verantwortlich ist. Am Ende der codierenden Region für Pol befindet sich die Spleißakzeptorstelle (SA). Bei allen Retroviren entsteht durch Spleißen wenigstens eine kürzere subgenomische mRNA, die in das Env-Produkt übersetzt wird.

Stromabwärts der codierenden Region für Env befindet sich der Polypurintrakt (PP), der beim Umschreiben der retroviralen RNA in DNA als Primer für die Synthese des zweiten DNA-(+)-Strangs dient. Der U3-Bereich trägt mit Verstärker- (*Enhancer*) und Promotorbereichen wichtige Motive für die Regulation der viralen Transkription. U5- und U3-Sequenzen stellen auf RNA-Ebene einfach („*unique*“) auftretende Sequenzen dar. In der proviralen DNA sind sie durch den besonderen Mechanismus der reversen Transkription an beiden Enden verdoppelt und bilden zusammen mit den R-Regionen die identischen langen terminalen Wiederholungssequenzen (*long terminal repeat*, LTR). Die 5' untranslatierte Region (5'UTR) vom Transkriptionsstartpunkt der R-Region bis zum Translationsstartcodon des Gag/Pol-Fusionsproteins wird auch als Leader bezeichnet.

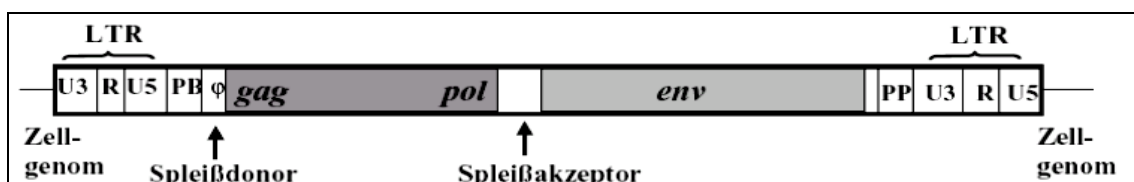


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der retroviralen Genomorganisation der in das Zellgenom integrierten Provirus-DNA (Modrow, 2003)

1.1.4 *Retrovirale Proteine*

1.1.4.1 Gruppenspezifische Antigene

Gag-Proteine erfüllen verschiedene Funktionen bei der Partikelbildung und – freisetzung und tragen zur Struktur und Infektiösität der reifen Virionen bei. Alle Gag-Proteine werden als gemeinsames Vorläuferprotein an freien Ribosomen des Zytoplasmas synthetisiert, wobei die sequentielle Abfolge der Proteine im Vorläufer bei allen Retroviren übereinstimmt. Im Anschluss an die Myristylierung aminoterminaler Glycinreste werden die modifizierten Vorläufer durch zelluläre Faktoren zur Zytoplasmamembran transportiert, wo sie an Fettsäuren binden. Im Verlauf der Virusmorphogenese erfolgt bei Gammaretroviren, vermittelt durch die virale Protease, die Spaltung in p27-Kapsidprotein, p15-Matrixprotein, p7-Nukleokapsidprotein (interagiert spezifisch mit den Ψ -Regionen der RNA und bildet so einen Ribonukleoproteinkomplex) sowie p12-Linkerprotein.

1.1.4.2 Enzyme

Integrase, Protease und reverse Transkriptase sind Produkte des *pol*-Gens. Während der Gag-Proteinsynthese entstehen sie durch Überlesen des *gag*-Stoppcodons als Vorläuferprotein. Verschiedene Viren verwenden in Abhängigkeit von der Beziehung zwischen *gag*- und *pol*-Leseraster unterschiedliche Mechanismen, um nach dem *gag*-Stoppcodon mit der Translation fortzufahren. Folgen beide lückenlos aufeinander, so kann ein einziges Protein erzeugt werden, indem eine das Stoppcodon erkennende Glutamy-tRNA dieses supprimiert. Befinden sich *gag* und *pol* in unterschiedlichen Leserastern, so entsteht ein zusammenhängendes Polyprotein durch ribosomale Leserasterverschiebung in einer uridinreichen Region. Das beschriebene Überlesen erfolgt in circa fünf Prozent aller Fälle, so dass etwa zwanzigmal mehr Gag-Protein als Gag-Pol-Protein entsteht. Auch die Gag/Pol-Fusionsproteine werden am aminoterminalen Ende myristyliert und sind über diese Modifikation mit der Zytoplasmamembran assoziiert. Die Proteolyse in die aktiven Enzyme erfolgt während der Virusreifung im bereits freigesetzten Partikel.

Die Integrase wirkt als Endonuklease sowie Ligase. Sie erzeugt um zwei Basen verkürzte 3'-Enden in den LTRs der doppelsträngigen proviralen DNA sowie versetzte Enden in der Ziel-DNA und katalysiert so die kovalente Integration in das Genom der Wirtszelle. Die Protease liegt im aktiven Zustand als Homodimer vor und trägt zwei funktionell bedeutsame Aspartatreste. Die reverse Transkriptase kann als RNA- oder DNA-abhängige DNA-Polymerase sowie als RNase wirken. Sie katalysiert die Umschreibung der viralen RNA in provirale DNA und baut nach der Synthese der DNA/RNA-Hybridstränge den RNA-Anteil ab. Das Enzym besitzt keine *proof reading*-Aktivität und baut daher mit einer Wahrscheinlichkeit von $1:10^3$ – $1:10^4$ falsche Basen in den neusynthetisierten DNA-Strang ein. Diese Fehlerrate sichert dem Virus eine hohe Sequenzvariabilität.

1.1.4.3 Virale Hüllproteine

Das virale Hüllprotein (Env) wird am rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) als gemeinsamer Vorläufer von einer gespleißten subgenomischen mRNA gebildet und gelangt, vermittelt über eine N-terminale Signalsequenz, auf dem sekretorischen Syntheseweg der Zelle in die Plasmamembran. Nach der Translation wird das Protein glykosyliert und durch eine mit dem Golgi-Apparat assoziierte zelluläre Protease gespalten, wobei die beiden Untereinheiten je nach Virusgruppe meist nonkovalent miteinander verbunden bleiben. Während die Oberflächenhüllproteine relativ stark glykosyliert werden (mit bis zu 32 Glykosylierungsstellen zählt gp120, das Oberflächenprotein von HIV-1, beispielsweise zu den am stärksten glykosylierten Proteinen), werden die transmembranen Hüllproteine relativ schwach (HIV-1-gp41) oder gar nicht (PERV-p15E) glykosyliert. Ebenfalls posttranslational findet eine Oligomerisierung von SU und TM statt, wobei unter anderem Anteile des TM-Proteins antiparallel angeordnete Strukturen, das sogenannte Sechs-Helix-Bündel, ausbilden.

Das SU-Protein lässt sich in Bereiche mit deutlicher Aminosäurevariabilität (V-Regionen) und in Bereiche mit hohem Konservierungsgrad (C-Regionen) einteilen. Die V-Bereiche befinden sich meist an exponierten Stellen, so dass auf sie der Selektionsdruck neutralisierender Antikörper wirkt. Vergleicht man zum Beispiel die variablen Regionen unterschiedlicher HIV-Patienten, so findet man neben Resten mit verschiedenen funktionellen Gruppen auch größere Deletionen und Insertionen sowie veränderte Glykosylierungsmuster. Die C-Bereiche sind meist für die Wechselwirkung mit zellulären Rezeptoren verantwortlich, wodurch sich die Konservierung innerhalb der Gruppe erklären lässt. Das über eine hydrophobe Sequenz in der Membran verankerte TM-Protein wird in einen extraviralen und einen intraviralen Bereich unterteilt. Die Ektodomäne untergliedert sich dabei in das Fusionspeptid (FP), die N-terminale Helixregion (NHR), eine über eine Disulfidbrücke stabilisierte Cysteinschleife (C-C Loop), eine C-terminale Helixregion (CHR) und einen kurzen membranproximalen Bereich. Der zytoplasmatische Teil kann je nach Virustyp unterschiedlich lang sein: etwa 30-40 Aminosäuren bei Gammaretroviren, circa 150 Aminosäuren bei Lentiviren. Es ist unklar, welche Rolle dieser während der Infektion spielt, Versuche, in denen Teile des zytoplasmatischen Bereichs deletiert wurden, zeigen jedoch einen deutlich Rückgang der Infektiosität. Transmembran- und Oberflächenhüllprotein sind die einzigen auf der Oberfläche exponierten retroviralen Proteine und damit die wichtigsten Angriffspunkte einer humoralen neutralisierenden Immunantwort. Die verschiedenen Domänen retroviraler Transmembranproteine sind in der nachfolgenden Abbildung schematisch dargestellt.

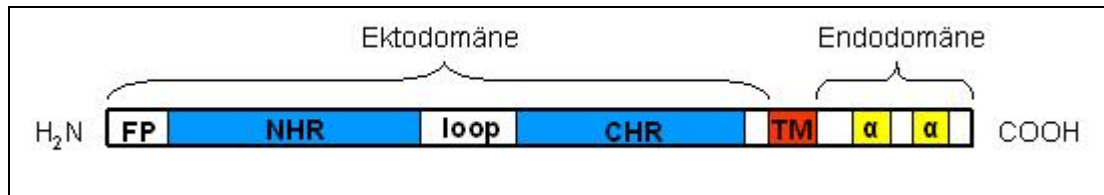


Abb. 1.3: Schematische Darstellung eines transmembranen Hüllproteins, FP: Fusionspeptid, NHR: N-terminale Helix- bzw. Heptad-Repeat-Region, CHR: C-terminale Helix- bzw. Heptad-Repeat-Region, TM: Transmembrandomäne, α : α -Helix im zytoplasmatischen Teil

Die viralen Hüllproteine vermitteln, wie unter 1.1.2 beschrieben, die Fusion von Virus und Zytoplasmamembran der Zielzelle. Die Bindung des Oberflächenhüllproteins an den bzw. die Rezeptoren bewirkt Konformationsänderungen im TM-Protein, wodurch das zunächst versteckte Fusionspeptid freigelegt wird. Letzteres dient als hydrophober Anker, der sich während der Infektion in die Lipidmembran der Zielzelle einlagert. Die einzelnen Vorgänge sind in Abb. 1.4 schematisch dargestellt, wobei der Einfachheit halber die SU-Anteile nicht gezeigt werden. Man unterscheidet Präfusions- und Fusionsstadium.

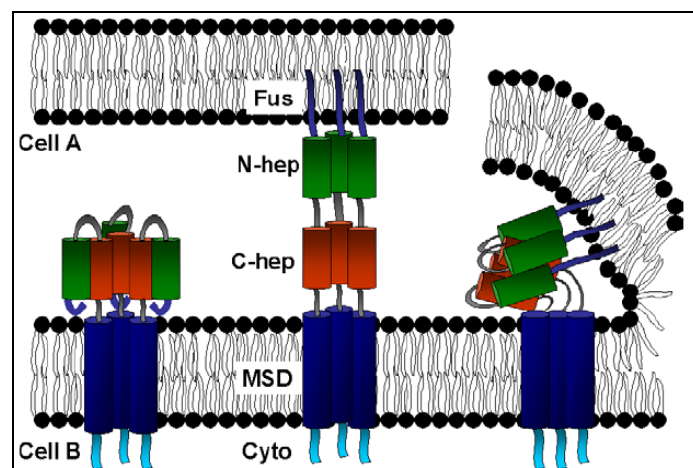


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Konformationsänderungen des TM-Proteins während der Fusion zellulärer und viraler Membranen (Rote et al., 2004), MSD: membrane-spanning domain, C-hep: C-terminale Heptad-Repeat-Region, N-hep: N-terminale Heptad-Repeat-Region

1.1.4.4 Akzessorische und regulatorische Proteine

Komplexe Retroviren, wie HIV, codieren neben den bisher beschriebenen Proteinen auch regulatorische und akzessorische Proteine. Regulatorische Proteine sind zum Beispiel die Transaktivatoren Tat (*transactivator of transcription*) und Tax (*transactivator X*; transwirkender Transkriptionsaktivator, der von der X-Region des HTLV-Genoms kodiert wird). Sie können die vom LTR-Promotor oder von zellulären Promotoren ausgehende Transkription um ein Vielfaches verstärken (erhöhte Initiationsrate), den Initiationskomplex und damit die Transkriptionselongation stabilisieren oder Signaltransduktionskaskaden anstoßen, die wiederum ein verändertes Expressionsmuster hervorrufen. Posttranskriptionell wirkende Transaktivatoren sind für die zeitliche Koordination von Genexpression und Replikation von Bedeutung. Das Rev-Protein (*regulator of gene expression of virion proteins*) beispielsweise

wird früh während der Infektion synthetisiert und ist für den bevorzugten Export bestimmter mRNA-Spezies in das Zytoplasma zuständig. Akzessorische Proteine haben unterschiedlichen Einfluss auf die Pathogenität des Virus, die virale Replikation sowie die Immunevasi-
onsmechanismen. Bekannt sind unter anderem Vif (*viral infectivity factor*), Vpr (*viral protein r*), Vpu (*viral protein u*), Vpx (*viral protein x*) und Nef (*negative factor*). Die Wirkung des letzten soll im Folgenden als Beispiel für die Vielfältigkeit genauer betrachtet werden. Das Nef-Protein von HIV-1 ist Teil von Signaltransduktionskaskaden, welche die verstärkte Bildung von Transkriptionsfaktoren, aber auch chemotaktisch wirkender sowie proapoptotischer Faktoren zur Folge haben. Es reduziert des weiteren die Menge an CD4-Molekülen in infizierten Zellen, so dass einerseits eine Sekundärinfektion mit HIV-1 verhindert und andererseits die Freisetzung von HIV-Partikeln erleichtert wird. Außerdem wird die Konzentration der MHC-Klasse-I-Antigene verringert, woraus die ungenügende Erkennung der infizierten Zellen durch zytotoxische T-Lymphozyten resultiert. *In vivo* spielt das Nef-Protein ferner eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese.

1.1.5 Lebenszyklus

Der retrovirale Lebenszyklus beginnt mit der Bindung des Oberflächenhüllproteins an geeignete Rezeptoren der Wirtszellmembran. Meist handelt es sich dabei um essentielle Transportproteine der Zelle, beispielsweise Aminosäure- oder Ionentransporter. In Abhängigkeit vom Virustyp tritt das Virion anschließend durch Endozytose oder durch direkte Fusion von viraler und Zytoplasmamembran in die Zelle ein. Bei den meisten Retroviren (eine Ausnahme bilden die Foamyviren) folgt nun die reverse Transkription, wobei Konformationsänderungen im Core die Reverse Transkriptase aktivieren. Der natürliche Primer der RT ist eine mitgeführte unbeladene tRNA des Wirtes, deren 3'-Ende komplementäre Basenpaarungen mit der Primerbindungsstelle eines der viralen RNA-Moleküle eingeht. In einer Folge verschiedener Reaktionen (Matrizenwechsel, Abbau von RNA durch den RNase H-Anteil des Enzyms, Rekombinationsereignisse) entsteht ein lineares doppelsträngiges DNA-Molekül, das zu beiden Seiten von LTRs eingerahmt wird und als Präintegrationskomplex (PIC) in den Zellkern gelangt. Der Eintritt in den Zellkern erfordert die Abwesenheit der Kernmembran und ist daher auf aktiv teilungsfähige Zellen beschränkt. Eine Ausnahme hiervon bilden Lentiviren, wie HIV, die - wenn auch weniger effektiv - ruhende Zellen infizieren können. Dabei spielen ein Kernlokalisierungssignal im MA-Protein, aber auch das Vpr-Protein eine Rolle. Die Integration des Provirus in das zelluläre Genom erfolgt durch die virale Integrase, wobei es an beiden Enden der integrierten Form zur Verkürzung um zwei Basenpaare kommt. Ursprünglich ging man davon aus, dass die Integrationsstellen von Retroviren statistisch über das Genom verteilt wären (Varmus, 1982). Später jedoch wurden rein zufällige Insertionsereignisse angezweifelt und stattdessen die Beteiligung von nukleosomalen Strukturen und

DNA-Bindungsproteinen beschrieben (Pryciak und Varmus, 1992; Pruss *et al.*, 1994; Lewinski *et al.*, 2006). Das Provirus wird als regulärer Bestandteil der genomischen DNA von der zellulären RNA-Polymerase II transkribiert, wobei Abschnitte im LTR als Promotor dienen. Im Zytoplasma werden die Genprodukte translatiert und in einem zeitlich und räumlich genau regulierten, komplexen Morphogeneseprozess zu Viruspartikeln zusammengefügt. Die Morphogenese wird durch einen Protease-vermittelten Reifungsprozess abgeschlossen, der für die Bildung infektiöser Viren unerlässlich ist.

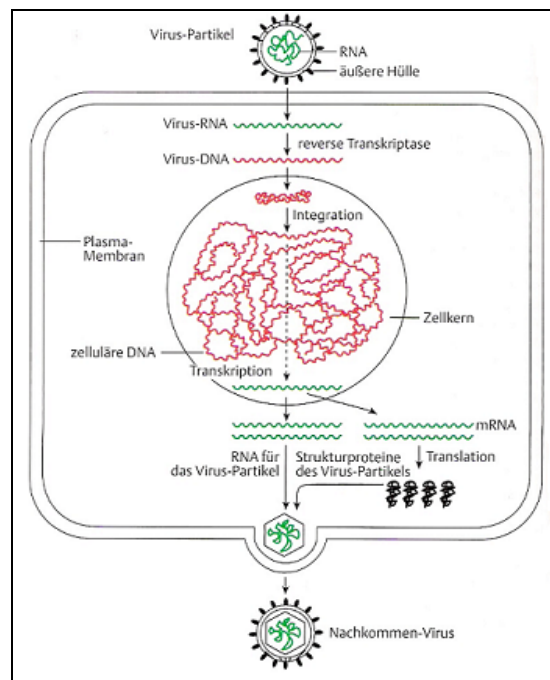


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des Infektionszyklus von Retroviren (Knippers, 2006)

1.2 *Humanes Immundefizienzvirus (HIV)*

Das humane Immundefizienzvirus verursacht die weltweit verbreitete Immunschwächekrankheit AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*), welche 1981 zum ersten Mal von Gottlieb *et al.* beschrieben wurde und vor allem durch opportunistische Erkrankungen charakterisiert wird. Nach Schätzungen von WHO und UNAIDS waren 2006 rund 40 Millionen Menschen mit HIV infiziert, davon etwa 25 Millionen im Subsahara-Raum. Circa 2.9 Millionen Betroffene starben, während ungefähr 4.3 Millionen Menschen neu infiziert wurden.

1983 gelang Montagnier erstmals die Isolation des Virus aus Lymphozyten von Patienten, woraufhin eine Reihe von Untersuchungen eingeleitet wurde. Den Ursprung der Viren konnte man in Afrika ausmachen, wobei HIV-1 vom Schimpansen und HIV-2 von der rauchgrauen Mangabe durch mehrfach unabhängige Transspeziesübertragung auf den Menschen übergegangen war. Auf Grund von Sequenzunterschieden teilt man HIV-1 heute in drei Gruppen ein: M (*major*) mit den Genotypen A bis I, O (*outlier*) und N (*new*). Man kennt außerdem

sechs Genotypen des HIV-2, nämlich A bis F. HIV-2 kommt bisher hauptsächlich in Westafrika und Indien vor.

Die Übertragung von HIV erfolgt durch direkten Kontakt mit Körperflüssigkeiten wie Blut, Sperma oder Vaginalflüssigkeit, aber auch vor oder während der Geburt und beim Stillen. Für den Eintritt in die Zielzellen nutzt das Virus den CD4-Rezeptor, der auf der Oberfläche von Makrophagen, Monozyten, 60% der T-Zellen und auf T-Vorläuferzellen im Knochenmark und im Thymus vorkommt sowie einen von zwei möglichen Chemokinrezeptoren: CCR5 (makrophagotrope Isolate; Deng *et al.*, 1996; Doranz *et al.*, 1996) oder CXCR4 ((T-zelltrope Isolate; Feng *et al.*, 1996). Die HIV-Varianten, die CXCR4 als Korezeptor verwenden, entwickeln sich erst im Verlauf der Infektion durch kontinuierliche Mutationen aus den makrophagotropen Viren. 2001 wurde von Saha *et al.* gezeigt, dass HIV auch das CD8-Molekül auf zytotoxischen T-Lymphozyten als Rezeptor nutzen kann.

Der Krankheitsverlauf lässt sich in drei Abschnitte einteilen. Die erste Phase oder Primärinfektion verläuft häufig inapparent und ist nur in wenigen Fällen mit grippeähnlichen Symptomen oder Schwellungen der Lymphknoten verbunden. Es folgt ein mehrere Jahre lang dauerndes symptomfreies Latenzstadium, das durch eine geringe Viruslast im peripheren Blut gekennzeichnet ist. Aufgrund hoher Mutationsraten und des stetigen Selektionsdrucks durch die humorale und zelluläre Immunantwort, werden permanent neue Virusvarianten gebildet. Die Replikationseigenschaften und der Zelltropismus der Viren verändern sich. Die Zahl der CD4-positiven Zellen sinkt als Folge der fortschreitenden Virusreplikation, aber auch als Folge zell- sowie zytokinvermittelter Zytolyse. Es kommt letztlich zum Zusammenbruch des Immunsystems und damit zur Ausbildung der klinischen AIDS-Symptome.

Für die Therapie der HIV-Infektion stehen heute verschiedene nukleosidische und nicht-nukleosidische RT-Hemmer, Proteaseinhibitoren sowie Fusionshemmer zur Verfügung. Mit dieser sogenannten HAAR-Therapie (*highly active antiretroviral therapy*) wird möglichst früh nach der Primärinfektion, also während der asymptomatischen Latenzphase begonnen. Sie verursacht Kosten von 13000-23000 US-\$ pro Jahr und Patient (Weinstein *et al.*, 2001), woraus folgt, dass der Mehrheit der HIV-Infizierten diese nicht zur Verfügung steht bzw. gestellt werden kann. Die optimale und kostengünstigste Strategie zur Bekämpfung von Virus-epidemien ist deshalb nach wie vor die präventive Vakzinierung.

Bisher jedoch sind alle klassischen Ansätze für die Entwicklung eines Impfstoffes gescheitert. Die Gabe von abgetöteten HI-Viren, rekombinanten Vacciniaviren, welche die HIV-spezifischen Glykoproteine synthetisieren, von gentechnologisch produzierten Oberflächenproteinen oder synthetischen Peptiden induzierte in klinischen Studien keinen Schutz vor der Infektion mit dem Virus.

1.3 Gammaretroviren

In die Gattung der Gammaretroviren fällt eine Vielzahl von Viren, die terrestrische Vertebraten als Wirte nutzt und dabei zumeist endogen ist (Herniou *et al.*, 1998). Gammaretroviren sind weniger komplex aufgebaut als Lentiviren und exprimieren keine regulatorischen oder akzessorischen Proteine. Neben den drei viralen Genen *gag*, *pol* und *env* können sie jedoch Protoonkogene (über)tragen, wie zum Beispiel das Affensarkom-Virus (SSV) oder das Ratten-Leukämie-Virus (RaLV) (Sonobe *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1998). Wie für die Lentiviren wurden auch für Gammaretroviren Transspeziesübertragungen unter natürlichen Bedingungen beschrieben, wobei im neuen Wirt oft ausgeprägte Krankheitsbilder auftreten. So ruft die Übertragung eines Mausretrovirus (MuLV) auf Gibbonaffen myeloische Leukämien und Lymphome hervor (*Gibbon ape leukemia virus*, GaLV; Lieber *et al.*, 1975). Als Krankheitserreger spielten Gammaretroviren bisher nur in der Veterinärmedizin eine Rolle, wobei alle bisher identifizierten Zielzellrezeptoren mehrfach membranspannige Phosphat- und Aminosäuretransporter sind (Overbaugh *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2003). In Abb. 1.6 sind die Verwandtschaftsverhältnisse von Gammaretroviren zusammenfassend und im Vergleich zu den Verwandtschaftsverhältnissen ihrer Wirte dargestellt.

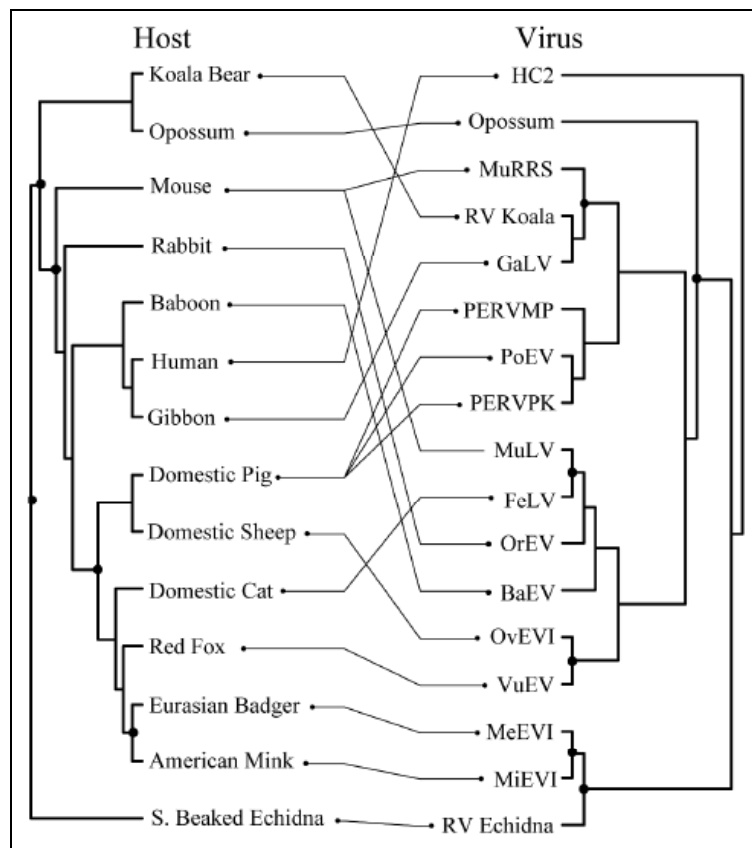


Abb. 1.6: Vergleich von Virusstammbäumen und Stammbäumen der Säugetierwirte (nach Marti, Kabat und Tristem, 2002)

1.3.1 *Felines Leukämievirus (FeLV)*

FeLV wurde 1964 von Oswald Jarrett entdeckt. Es existieren vier Subtypen, FeLV-A, B, C und T, die sich in ihrer Rezeptorspezifität und folglich in ihrem Zelltropismus unterscheiden. FeLV-A ist der einzige in reiner Form horizontal übertragbare Subtyp. Als Rezeptor dient dabei das feline Thiamintransportprotein (feTHTR1, Mendoza *et al.*, 2006). Alle anderen Subtypen leiten sich von FeLV-A ab und entwickeln sich im Laufe einer persistierenden Infektion im Wirt. FeLV-B beispielsweise entsteht durch Rekombination von FeLV-A mit endogenen FeLV-ähnlichen Sequenzen (Stewart *et al.*, 1986). Der verwendete Zielzellrezeptor ist in diesem Fall der Transporter für anorganisches Phosphat, Pit1 sowie das nahe verwandte Protein Pit2. FeLV-T (Rohn *et al.*, 1998) benötigt neben Pit1 zusätzlich den löslichen Kofaktor FeLIX (Anderson *et al.*, 2000 & 2001). FeLV-C ist nur in 1% der infizierten Katzen nachweisbar und entsteht nach Mutation des *env*-Gens von FeLV-A. Vermutlich wird dadurch die Sekundärstruktur des Oberflächenproteins verändert, so dass als Rezeptor fortan ein Häm-Transporter fungiert (Brojatsch *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 2006). Obwohl Leukämien namensgebend für das Virus waren, werden sie selten von diesem verursacht. Vorrangige Symptome der Infektion sind die Degeneration des hämatopoetischen Systems (aplastische Anämien bei 25% der Tiere), Immundefizienz (FeLV-AIDS) und damit verbunden opportunistische Erkrankungen (Lappin, 1995), Lymphosarkome (5%), Fibrosarkome (Snyder *et al.*, 1969) sowie eine verkürzte Lebensdauer.

In Europa und den Vereinigten Staaten sind bisher sieben FeLV-spezifische Vakzinen erhältlich. Drei davon enthalten inaktivierte Viruspartikel, zwei das virale Oberflächenhüllprotein gp70 und zwei weitere rekombinante Proteine, wie zum Beispiel unglykosyliertes rp45 (Sparkes, 1997). Keiner der Impfstoffe kann einen vollständigen Schutz gewährleisten, dennoch sind die gesammelten Erfahrungen bei der Entwicklung von Impfstrategien gegen AIDS von großer Bedeutung.

1.3.2 *Porcines Endogenes Retrovirus (PERV)*

Porcine endogene Retroviren sind erstmals in den frühen 70er Jahren beschrieben worden (Breese, 1970; Armstrong *et al.*, 1971 und Lieber *et al.*, 1975). Von den drei bekannten Gruppen, PERV-A, B und C, sind zwei (PERV-A und B) in der Lage, humane Zellen *in vitro* zu infizieren (Patience *et al.*, 1997). Da sie eine potenzielle Gefahr bei der Xenotransplantation darstellen, sind PERVs in den vergangenen Jahren in den Blickpunkt der Forschung gerückt. Es besteht die Möglichkeit der Adaption des Virus an den neuen Wirt und damit das Risiko einer Zoonose. Die eng verwandten Viren GaLV, MuLV, FeLV und KoRV sind unter anderem Ursache von Leukämien, so dass dem immunsupprimierten Organrezipienten Krankheiten drohen könnten. Gentechnische Veränderungen der Xenotransplantate zur Ver-

hinderung von Abstoßungsreaktionen (Entfernung von Gal α 1-3Gal-Epitopen) erhöhen die Infektionsgefahr zusätzlich durch Überwindung natürlicher Virusabwehrmechanismen (Quinn *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2003). Während alle PERV-Subklassen in ihren *gag*- und *pol*-Genen einander stark ähneln, können in den *env*-Genen größere Unterschiede festgestellt werden, insbesondere in denjenigen Regionen, die für das Oberflächenprotein kodieren. Folglich werden unterschiedliche Rezeptoren für den Zelleintritt verwendet. Die für PERV-A beschriebenen Rezeptoren sind HuPAR1 und 2 (Ericsson *et al.*, 2003), welche auf zahlreichen humanen Zelltypen, auch PBMCs, exprimiert werden. Mit ihren membrandurchspannenden Domänen sind sie den Rezeptoren anderer Gammaretroviren sehr ähnlich, ihre Funktion ist jedoch bisher unentdeckt. Für PERV-B und C sind bisher keine Rezeptoren bekannt.

1.3.3 *Gibbon Ape Leukemia Virus (GaLV)*

Das *Gibbon Ape Leukemia Virus (GaLV)* wurde erstmals aus Lymphosarkomen von Gibbons isoliert und von Kawakami *et al.* (1972) sowie Todaro *et al.* (1975) beschrieben. Heute unterscheidet man die Subtypen GALV Br (Brain), H (Hall's Island), SF (San Francisco) und SEA-TO, welche sich in ihren antigenen Eigenschaften unterscheiden. In den 90er Jahren ist ein weiterer GALV-Stamm GALV X aus einer HIV-infizierten humanen Zelllinie isoliert worden (Burtonboy *et al.*, 1993). In allen Fällen handelt es sich um exogene Gammaretroviren, die mit hämatopoetischen Neoplasien in Verbindung gebracht wurden.

1.3.4 *Koala-Retrovirus (KoRV)*

Das Koala-Retrovirus wurde erstmals im Jahr 2000 durch Hanger *et al.* isoliert und sequenziert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten typische Viruspartikel von 80-110 nm Durchmesser, aber auch knospende Formen mit charakteristischem C-förmigem Kapsid. Die provirale Transkription und Virusassemblierung wurden zudem durch die Anwesenheit retroviraler Transkripte bestätigt. Das KoRV-Genom hat eine Länge von 8431 Basenpaaren und weist typische Eigenschaften retroviraler Genome auf. Dabei handelt es sich um 5'- und 3'-LTRs, eine tRNA^{Pro} Primerbindungsstelle, cis- und transaktive Elemente, *gag*, *pol* und *env*-Sequenzen, eine Cys-His-Box mit Bedeutung für die Translation, einen Polypurinabschnitt und ein Polyadenylierungssignal, eine Spleißdonorstelle (zwischen den Basen 564 und 570) sowie eine Spleißakzeptorstelle (zwischen den Basen 5701 und 5709; Hanger *et al.*, 2000). KoRV hat sowohl Eigenschaften eines exogenen als auch eines endogenen Virus und nimmt damit einen Sonderstatus unter den Gammaretroviren ein. Charakteristika eines exogenen Virus sind beispielsweise das vollständige replikationskompetente Genom sowie die aktive Transkription und Viruspartikelbildung, wohingegen die Präsenz in Keimzellen und die Vererbung nach den Mendel'schen Regeln für ein endogenes Virus typisch sind (Tarlinton *et al.*, 2006).

Seit etwa 100 Jahren scheinen Infektion und Endogenisierung innerhalb der Koala-Population Australiens in Nord-Süd-Richtung fortzuschreiten, und bis heute existieren nicht infizierte Tiere auf den Kangaroo Islands. Da andere endogene Retroviren bereits vor wenigstens 5000 Jahren in das Genom ihrer Wirte integrierten, eignet sich das Koala-Retrovirus als Modell, um den Prozess und die Konsequenzen der retroviralen Endogenisierung zu verfolgen (Tarlinton *et al.* und Oliveira *et al.*, 2006). Es besteht unter anderem die Möglichkeit der Selbstaktivierung und Rekombination mit exogenen Viren, um neue Pathogene mit erweitertem Wirtsspektrum zu generieren (Oliveira *et al.*, 2006). Zudem könnte die Präsenz endogener Viren die Immunantwort gegenüber verwandten pathogenen exogenen Viren verringern, im Gegensatz dazu die Expression von ERV-Genen jedoch auch eine Resistenz gegenüber exogenen Viren vermitteln (zum Beispiel über Rezeptorinterferenz). Gewebs-, tier- oder populationsspezifische verkürzte Proviren könnten durch Rekombinationsereignisse oder Superinfektionen sowie Reinsertionen entstehen (Hanger *et al.*, 2006).

Das Koala-Retrovirus ist mit hohen Mortalitätsraten, hervorgerufen durch Leukämien, Lymphome, aber auch opportunistische Erkrankungen, assoziiert. Potenzielle Cofaktoren, die für den Ausbruch einer Krankheit wie Leukämie verantwortlich sein könnten, sind Superinfektionen mit exogenen KoRV-Varianten, Rekombinationen mit anderen Retroviren, Interaktionen mit Haplotypen und / oder somatischen Mutationen des Wirtes oder Coinfektionen mit Viren anderer Genera (beispielsweise Herpesviren). Neoplasien machen etwa 3-5% der Todesrate freilebender und bis zu 80% der Todesrate gefangener Koalas aus (Hanger *et al.*, 2000). In Untersuchungen von Tarlinton *et al.* (2005) variierte die provirale Kopienzahl zwischen den einzelnen Individuen einer Kolonie um bis zu Faktor 1×10^5 . Dabei konnte keine signifikante Übereinstimmung zwischen proviralen DNA-Levels und Krankheit, Alter, *Body Mass Index* (BMI), Geschlecht oder viralen RNA-Levels festgestellt werden. Virale RNA-Levels wiederum lagen zwischen 1.7×10^5 und 3.6×10^9 Kopien pro ml Plasma. In allen untersuchten Tieren war eine aktive Virämie festzustellen, jedoch erfolgte ein zusätzlicher signifikanter Anstieg der viralen RNA-Levels in Tieren mit Leukämien und Lymphomen im Vergleich zu gesunden Tieren ($P < 0.0007$). Eine Korrelation zwischen Leukozytenzahl und Viruslast konnte nicht ermittelt werden, dafür jedoch zwischen dem Alter des Tieres und dem viralen RNA-Level. Eine Erklärung war, dass Koalas mit einer bestimmten Zahl an Inserts geboren werden, mit dem Alter jedoch die Repression der Transkription abnehmen könnte. Eine Verbindung zwischen Chlamydiose und KoRV wurde noch nicht vollständig geklärt, die Viruslast könnte allerdings die Schwere der Krankheit beeinflussen. Da alle untersuchten Tiere virämisch waren, existieren womöglich weitere Effekte oder Auslöser, die über eine Krankheit entscheiden.

Der engste Verwandte des Koala-Retrovirus ist das *Gibbon Ape Leukemia Virus* (s. 1.3.3), wobei die wahrscheinlichste Erklärung für die Verwandtschaft der beiden eine Transspeziesübertragung ist. Eine direkte Übertragung ist auf Grund der biogeographischen Distanz jedoch unwahrscheinlich, zum Beispiel in Zoos oder bei gemeinsamem Transport aber grundsätzlich möglich. In der freien Natur könnten Nager, Vögel, Fledermäuse oder Arthropoden als Zwischenwirte gedient haben (Hanger *et al.*, 2000). Da GaLV und KoRV sich in etwa nur so stark voneinander unterscheiden, wie die beiden GaLV-Stämme SEATO und SF untereinander (78% Übereinstimmung), scheint die Übertragung erst kürzlich stattgefunden zu haben (Hanger *et al.*, 2000). GaLV und KoRV verwenden beide den Phosphat-Symporter PiT1, um menschliche Zellen zu infizieren. Wie von Oliveira *et al.* 2006 nachgewiesen, kommt es zu einer Rezeptorinterferenz, wobei das eine Virus die Expression desjenigen Rezeptors herunterreguliert, der auch dem konkurrierenden Virus den Eintritt in die Zielzelle ermöglicht.

KoRV ist in der Lage humane 293 Zellen und T-Lymphozyten (C8166 und CEM) sowie Rattenfibroblasten (rat 1) *in vitro* zu infizieren, wohingegen Mausfibroblasten (NIH 3T3) bisher als einzige nicht infizierbar waren. Wistar-Ratten konnten zudem *in vivo* mit KoRV infiziert werden, wodurch ein möglicher Übertragungsweg auf Koalas aufgezeigt wurde (Fiebig *et al.*, 2006).

1.4 Zielstellung der Arbeit

KoRV konnte *in vivo* auf Wistar-Ratten übertragen werden und löst dort eine humorale Immunantwort aus (Fiebig *et al.*, 2006). Wistar-Ratten wären deshalb ein kostengünstiges KoRV-Kleintiermodell zur breiten Erprobung von Impfstoffansätzen sowie zur Untersuchung der Immunmodulation nach einer retroviralen Infektion. Transmembrane Hüllproteine von Retroviren sind einander auf Grund ihrer gemeinsamen Funktion strukturell sehr ähnlich und hoch konserviert. Im Hinblick auf die HIV-Pandemie und die dringend notwendigen Vakzinen könnten Immunisierungsstudien mit gammaretroviralen TM-Proteinen wichtige Hinweise auf die Wirksamkeit eines Impfstoffes basierend auf der Induktion breit neutralisierender Antikörper geben. Eine wichtige Zielsetzung der Arbeit war daher die Herstellung verschiedener rekombinanter, N-terminal verlängerter KoRV-p15E-Konstrukte und die Charakterisierung der immunogenen Eigenschaften im Rattenmodell. Da sich in der Vergangenheit gezeigt hatte, dass KoRV ohne direkten Kontakt von Ratte zu Ratte übertragen werden kann, war ein weiteres Ziel die Untersuchung der Transmissionsmechanismen (z.B. über Kot, Urin und Speichel). Auf Grund des bis dahin inkonstanten bzw. unzureichenden (Pro)Virusnachweises war es nötig, bestehende Nachweismethoden zu charakterisieren und zu optimieren (TaqMan-

PCR und Western Blot) sowie neue zu etablieren (Capture-ELISA). Weiterhin sollten Wirtsspektrumanalysen *in vitro* durchgeführt werden (u.a. Infektion von Primatenzellen).

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid-Lösung Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aceton	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar agar	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ampicillin (Natriumsalz)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
APS (10%)	Sigma Genosys, Steinheim, Deutschland
5-Aza-2'-desoxycytidin (≥97.0%)	Fluka BioChemika, Seelzen, Deutschland
BamHI (20000 U/ml)	NEB BioLabs, F.a.M., Deutschland
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
BigDye® -Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
BSA (10 x)	NEB BioLabs, F.a.M., Deutschland
Bradford- Reagenz	BioRad, München, Deutschland
CaCl ₂ -Dihydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Calmodulin-Sepharose	Stratagene, Cedar Creek, USA
CNBr-aktivierte Sepharose	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Coomassie® Brillant Blue	Serva, Heidelberg, Deutschland
DAB (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Dihydrat)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
dNTPs (10 mM)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, St. Louis, USA
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	Amersham / GE HealthcareUK Ltd., Little Chalfont, UK
EcoRI (20000 U/ml)	NEB BioLabs, F.a.M., Deutschland
EcoRI-Puffer (10 x)	NEB BioLabs, F.a.M., Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
EGTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
EtBr (Ethidiumbromid)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
FKS (fötales Kälberserum, 10 %)	PAA, Pasching, Deutschland
Freund's Complete Adjuvant	Pierce, Rockford, USA
Gel-Dry™ Drying Solution	Invitrogen, Carlsbad, USA
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glyzerol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HCl (25%)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES-Puffer (1 M)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Imidazol	Merck, Darmstadt, Deutschland
IPTG	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isofluran	Essex Tierarzt, München, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin (200 mM, Low Endotoxin)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Lysozym (14 kDa)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mg-Acetat-Tetrahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂ -Hexahydrat	Sigma, St. Louis, USA
MnCl ₂ -Tetrahydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MOPS (3-(n-Morpholino)-Propansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Na-Acetat-Trihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland

NaCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt, Deutschland
NdeI (20000 U/ml)	NEB BioLabs, F.a.M., Deutschland
(O'GeneRuler DNA Ladder Mix, 0.1 µg/µl)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
OPD (o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid, 30 mg)	Sigma, St. Louis, USA
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
PCR-Puffer (10 x)	Roche, Mannheim, Deutschland
Penicillin / Streptomycin (10000U / 10000 µg/µl)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PHA (Phytohämagglutinin, Stocklösung: 9 mg/ml)	Murex Biotech Ltd., Dartford, England
Polybren ((Poly(1,5-dimethyl-1,5-diazaundecamethylen)bromid), 1 µg/µl)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Proteinase K (20 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PstI (20000 U/ml)	NEB Biolabs, F.a.M., Deutschland
Puffer 2 (10 x)	NEB BioLabs, F.a.M., Deutschland
Puffer 3 (10 x)	NEB BioLabs, F.a.M., Deutschland
RbCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
SDS (20%)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
T4 DNA-Ligase (5 Weiss U/µl)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
T4-Ligasepuffer (10 x)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Taq-Polymerase (AmpliTaq Gold™, 5 U/µl)	Roche, Mannheim, Deutschland
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	UBS Amersham, Cleveland, USA
Tricin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau (0.4%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Blotting-Filterpapier	peQLab, Erlangen, Deutschland
CL-XPosure™ Clear Blue X-Ray Film	Pierce, Rockford, USA
Cryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
DryEase™ Mini Cellophane	Invitrogen, Carlsbad, USA
Filtereinheit 0.45 µm bzw. 0.2 µm	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Immobilon™ Transfer Membranen, 0.45 µm Porengröße	Millipore, Eschborn, Deutschland
Impfösen	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kanülen	Braun-Melsungen AG, Melsungen, Deutschland; Henke-Sass Wolf GmbH, Tuttlingen, Deutschland
K3E & NH BD Vacutainer	Belliver Industrial Est., Plymouth, England
Leucosep®-Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Omnifix™ 50 ml Spritze (auch 10 ml- und 20 ml)	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
PepSpot™ Membran	jpt Peptide Technologies GmbH, Berlin
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Polyallomer Centrifuge Tube 14 x 89 mm (UZ-Röhrchen)	Beckman Instruments Inc., Palo Alto, USA
PP-Röhrchen für Bakterien-Flüssigkulturen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

Safety-Lok™ Blood Collection Set	Becton Dickinson Vacutainer Systems, Heidelberg, Deutschland
Spectra/Pore® Celluloseester Membran, MWCO: 8000	Spectrum, Los Angeles, USA
Vivaspin 20 tubes 10,000 MWCO	Vivascience AG, Hannover, Deutschland
96-well-Platten (Zellkultur)	Nunc A/S Roskilde, Dänemark
96-well-Platten (ELISA), Microlon	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
96 well Platte (Bradford)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
6-well- und 24-well-Platten (Zellkultur)	TPP® (Techno Plastic Products AG) Tra- sadingen, Schweiz
15 + 50 ml Zentrifugenröhrchen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz
2.1.3 Geräte	
accu-jet® (Pipettierhilfe)	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Avanti Centrifuge J-20 XP, Rotor JA 25.50, BioPhotometer	Beckman Coulter Krefeld, Deutschland
Brutschrank (Bakterien):	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Brutschrank (Zellkultur):	Heraeus, Hanau, Deutschland
Centrifuge 5415 D	Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan
Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Concentrator 530	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Duomax 1030 (Schüttler)	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
ELISA Reader Spectra Classic	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa, Köln, Deutschland
GelDoc 2000	Bio-Rad, Hercules, USA
Heraeus Megafuge 1.0 R	Kendro Laboratory Products GmbH, Lan- genseibold, Deutschland
Hybridisierungsöfen	Heraeus, Hanau; Binder, Tuttlingen, Deutschland
LKB Pump P-1 (peristaltisch)	Amersham Biosciences, Piscataway, USA
Magnetrührer IKA-combimag RCO	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Mastercycler epgradient S	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop: ID 03	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttin- gen, Deutschland
Mikrowelle	Microchef FM B930 1100 W, Moulinex, Deutschland
Mini-Protean II Multiscreen Apparatus	Bio-Rad, Hercules, USA
Mini Protean II BioRad (Gelkammer)	Bio-Rad, Hercules, USA
Multikanalpipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mx4000® Multiplex Quantitative PCR System	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000	peQLab, Erlangen, Deutschland
pH Meter MP 220	Mettler Toledo, Giessen, Deutschland
Pipetten	Gilson, Inc. Middleton, USA
Power Pac 3000	Bio-Rad, Hercules, USA
REAX top (Vortexer)	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Schüttelinkubator Innova 4330	New Brunswick Scientific, Nürtingen, Deutschland
Schüttelwasserbad	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland

Sonifier® S-250A
 Sterilbank
 Thermomixer 5436
 Trans-Blot SD®, Semi-Dry Transfer Cell
 Ultrazentrifuge L8-70, Rotor SW41
 JLA-16.250

Branson, Dietzenbach, Deutschland
 The Baker Company, Sanford, USA
 Eppendorf, Hamburg, Deutschland
 Bio-Rad, Hercules, USA
 Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland

2.1.4 Kommerzielle Kits

DNeasy Blood & Tissue Kit
 High Pure Viral RNA Kit
 Invisorb Spin DNA Extraction Kit (250)
 JETquick PCR Purification Spin Kit / 250
 JETstar Plasmid MAXI Kit 20
 QIAprep Spin Miniprep Kit
 QIA quick PCR Purification Kit
 RevertAid™ H Minus First Strand cDNA
 Synthesis Kit

Qiagen, Hilden, Deutschland
 Roche, Mannheim, Deutschland
 Invitex, Berlin, Deutschland
 Genomed, Löhne, Deutschland
 Genomed, Löhne, Deutschland
 Qiagen, Hilden, Deutschland
 Qiagen, Hilden, Deutschland
 Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

2.1.5 Zellen

2.1.5.1 Eukaryotische Zellen

Tab. 2.1: Übersicht über verwendete eukaryotische Zellen

Bezeichnung	Zelltyp	Medium
CHO	Zelllinie aus Ovarien Chinesischer Hamster	D-MEM
C6/36	Zelllinie aus <i>Aedes albopictus</i> -Larven	L15
EB176	naive lymphoide Schimpansenzelllinie	RPMI 1640
EB176/5°	PERV-infizierte lymphoide Schimpansenzelllinie	RPMI 1640
HEK 293T	humane embryonale Nierenzelllinie	D-MEM
LLCMK2	Rhesusaffen-Nierenzelllinie	D-MEM
Mv1Lu MINK	Nerz-Lungenepithelzelllinie	D-MEM
NIH 3T6	Maus-Embryofibroblasten	D-MEM
PG4	feline Astrozyten	D-MEM
PK15	porcine Nierenzelllinie	D-MEM
Schneider2	Drosophila-Epithelzelllinie	SF900/II
7341	Pavian-PBMCs	RPMI 1640

2.1.5.2 Bakterien

E. coli BL21-CodonPlus(DE3)-RP
E. coli OneShot® TOP10

Stratagene, La Jolla, USA
 Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.6 Nährmedien

D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
 Leibovitz's L15-Medium
 RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*)
 Separationsmedium LSM 1077 Lymphocyte
 Separation Medium
 SF900 II-Medium (Insektenzellmedium)

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
 Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
 Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
 PAA, Pasching, Deutschland
 GIBCO® / Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

D-MEM und RPMI 1640 wurden jeweils mit 10% (v/v) FKS, 1% (v/v) Penicillin / Streptomycin, 1% (v/v) HEPES Buffer sowie 2% (v/v) L- Glutamin versetzt. In das Insektenzellmedium L15

wurden 5% (v/v) FKS, 1% (v/v) L-Glutamin, 1% (v/v) HEPES und 1% (v/v) Penicillin / Streptomycin gegeben, das SF900 II-Medium wurde dagegen ausschließlich um 1% (v/v) Penicillin / Streptomycin ergänzt.

Bakterien wurden meist als Schüttelkultur in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) kultiviert, welches sich aus 1% (w/v) Trypton, 0.5% (w/v) Hefeextrakt sowie 1% (w/v) NaCl zusammensetzte. Um eine Kultivierung auf Festmediumplatten zu gewährleisten, wurden dem LB-Medium 0.75% (w/v) Agar-Agar beigemischt. Zur Selektion plasmidtragender Transformanten wurde Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg / ml eingesetzt.

2.1.7 Puffer und Lösungen

Herstellung chemokompetenter Bakterien (s. 2.2.2.3):

TFB1-Puffer: 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerol, pH 5.8, sterilfiltriert

TFB2-Puffer: 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerol, eingestellt auf pH 6.8 mit KOH, sterilfiltriert

Gelelektrophorese (s. 2.2.3.1):

10 x DNA-Ladepuffer: 50 % (v/v) Glycerol, 1 Spatelspitze Orange G, 2% (v/v) 1 x TAE

50 x TAE-Puffer: 2 M Tris, 1 M Acetat, 50 mM EDTA

Aufreinigung rekombinanter Proteine (s. 2.2.6.1):

Calmodulin (CaCl₂)-Bindungspuffer: 150 mM NaCl, 50 mM Tris, 10 mM β-Mercaptoethanol, 2 mM CaCl₂-Dihydrat, 1 mM Mg-Acetat-Tetrahydrat, 1 mM Imidazol, pH 8.0

Elutionspuffer: 50 mM Tris, 10 mM β-Mercaptoethanol, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10 µM PMSF (1 mM Stammlösung), pH 8.0

Regenerationspuffer 1: 100 mM NaHCO₃, 2 mM EGTA, pH 8.6

Regenerationspuffer 2: 1 M NaCl, 2 mM CaCl₂

Regenerationspuffer 3: 100 mM Na-Acetat-Trihydrat, 2 mM CaCl₂, pH 4.4, eingestellt mit Essigsäure

SDS-PAGE (s. 2.2.6.3):

Gelpuffer: 3 M Tris, 0.3% (w/v) SDS, pH 8.4

Anodenpuffer: 0.2 M Tris, pH 8.9

Kathodenpuffer: 0.1 M Tris, 0.1 M Tricin, 0.1% (w/v) SDS

2 x Probenpuffer: 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 12 % (v/v) Glycerin, 4% (w/v) SDS, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, eine Spatelspitze Coomassie Brilliant Blue

Färbelösung: 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250

Entfärbelösung: 20 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure

Western Blot (s. 2.2.7.2):

Transferpuffer: 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 3.75 g/l SDS

Blockierungspuffer: 5 % (w/v) Milchpulver in PBS + 0.05% (v/v) Tween 20

Waschpuffer: PBS + 0.05% (v/v) Tween 20

Substratlösung: 0.025 M Tris-HCl + eine Spatelspitze DAB, 100 µl H₂O₂

Stripping Buffer: 62.5 mM Tris pH 6.7, 100 mM β-Mercaptoethanol, 2% SDS

Epitopkartierung (s. 2.2.7.4):

Blockierungspuffer: 10% FKS, 3% Milchpulver, 0.3% BSA in T-TBS

TBS: 50 mM Tris, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 8.0

T-TBS: TBS + 0.1% (v/v) Tween 20

Regenerationspuffer: s. *Stripping Buffer*

ELISA (s. 2.2.7.5):

Blockierungspuffer: 3% (w/v) Magermilchpulver, 10% FKS (v/v) in PBS + 0.05% (v/v) Tween

Substratlösung: 1mg/ml o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid in PBS pH 6.0, 100 µl Wasserstoffperoxid

Abbruchreagenz: 2.5 M H₂SO₄

Capture ELISA (s. 2.2.7.6)

Lysereagenz: 2% Tween 20

andere:

Lysepuffer (1): 10% (v/v) 10 x PCR-Puffer, 1% (v/v) Proteinase K

Lysepuffer (2) = RIPA-Puffer: 150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7.2), 0.1% (w/v) SDS, 1% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) Deoxycholat, 5 mM EDTA, 1 mM Phenylsulfonylfluorid, 10 mM p-Nitrophenylphosphat, 10 mM Benamidin, 2 µg/ml Leupeptin, 100 µM Natriumorthovanadat
PBS „ohne“ pH 7.2 137 mM NaCl, 8.8 mM Na₂PO₄, 2.7 mM KCl, 0.7 mM KH₂PO₄

Präzipitations-Reagenz (Methanol / Aceton-Fällung): 1:1 Methanol : Aceton (+ 1 mM HCl)

10 x Hybridisierungspuffer: 200 mM Tris-HCl pH 7.4, 20 mM MgCl₂, 10 mM DTT

10 x PCR-Puffer: 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂-Hexahydrat

2.1.8 Antikörper

Monoklonale Maus-Anti-β-Actin-Immunglobuline (A5316, Klon AC-74)	Sigma -Aldrich, Steinheim, Deutschland
Monoklonale Maus-Anti-c-Myc Immunglobuline (9E10, M5546)	Sigma -Aldrich, Steinheim, Deutschland
Polyklonale Kaninchen- Anti-Ziegen-Immunglobuline (HRP)	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Polyklonale Ziegen-Anti-Maus-Immunglobuline (HRP)	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Polyklonale Kaninchen-Anti-Ratte-Immunglobuline (HRP)	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Monoklonale Maus-Anti-FeLV p27Gag-Immunglobuline	Biodesign International®, Saco, USA
Monoklonale Ziegen-anti-FeLV p27Gag-Immunglobuline	AbD Serotec, Düsseldorf, Deutschland

2.1.9 Primer und Sonden

Die für diese Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Genosys (Steinheim, Deutschland) hergestellt und HPLC-gereinigt. Die Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden sind im Folgenden aufgeführt:

Tab. 2.2: Übersicht über verwendete Primer und Sonden

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
C2	TGAATTCCAAAATAAGCTTACCCTTACT
F3 for (PERV)	TGAATTCTGGCAACAGCGGGTACAAAAA
F3 rev (PERV)	TATGTTCGACCGGGGTTAGGAGATGGCCTCTG
GAPDH (for)	GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC
GAPDH (rev)	TGGTCCACACCCATGACGA
KF5	TGAATTCGGAAAAGGGAAGCTCACCCCTC
Ko-5-fw (p5)	CTAATAAAAGGGCCCATAGA

Ko-6-rev (p6)	GTTGAACCATCCCTCGTACC
KoRV-23rev	TACTTCAGACAGGGAGGTTAAG
KoRV p27Gag Frag1 for	TGGATCCGGCTTAGTCCCCTTGCAATAT
~ neu	AGGATCCAAATCTAATCATCCTTCTTTT
KoRV p27Gag Frag1 rev	TGAATTCTCAAGCCGTGTTGTGATCCCACT
KoRV p27Gag Frag2 for	TGGATCCGAAGGTAGGGAGCGTCTCCT
~ neu	AGGATCCAAAGGGGGAGGAAGGCGCCCCACC
KoRV p27Gag Frag2 rev	TGAATTCTCAATGATATACCTTCTCTGCCT
KoRV T for (p13), Tarlinton <i>et al.</i>	TTGGAGGAGGAATACCGATTACAC
KoRV T rev (p14), Tarlinton <i>et al.</i>	GCCAGTCCCATACCTGCCTT
Kp15E-N+6 new, p 19	TAGGATCCGGTACCGGCTCGACCGCCCTA
Kp15E-N+12 new, p 20	TAGGATCCGGGGTTCGACGAGGTATAGGT
Kp15E-N+18 new, p 21	CGGGATCCGCTGTCCTTCTCGGATTAGGG
Kp15E-N+25, p 22	CGGGATCCGAGCCTGTCTCACTCACCTG
Kp15E C+4, p18	TTGAATTCTCACCAGGGGGAACGGTTGAACCAA
p3	GCGGATCCATGCTTCTCATCTCAAACCCGCGC
p9	AAGGATCCGAATTCACCGAGCCTGGCAAACGGTTC
PERV Gag for	GCGACCCACGCAGTTGCATA
PERV Gag rev	CAGTTCCTTGCCCAGTGTGTCTCCT
PK1 (for, PERV)	TTGACTTGGGAGTGGGACGGGTAAC
PK6 (rev, PERV)	GAGGGTCACCTGAGGGTGTGGAT
rat_gapdh_fw	GGTGATGCTGGTGCTGAGTAT
rat_gapdh_rev	TGGTTCACACCCATCACAA
RaLV-P1-p15EctoFor	GGAGGAATCACCTTAGGAG
RaLV-P2-p15EctoRev	CCTTGTTGGGAATCAAACAGC
T7 prom	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 term	TTATAGCAAATCCTTTC

GAPDH-Sonde	HEX-CTTCACCACCATGGAGAAGGCTGGG- BHQ1
KoRV-Sonde (Fiebig <i>et al.</i>)	Fam-CCATGGATACAGACCTTAGGGCCC-BHQ1
KoRV-Sonde (Tarlinton <i>et al.</i>)	Fam-TCGACCCGTCATGGC-BHQ1

2.1.10 Vektoren

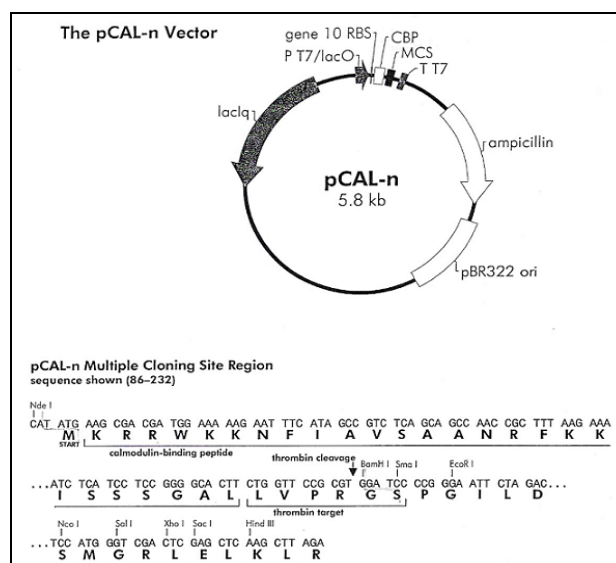


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pCal-n und der integrierten Multiple Cloning Site (MCS) (www.stratgene.com)

Die Isopropylthiogalactosid (IPTG) -induzierte Expression rekombinanter Proteine sollte mit Hilfe des Vektors pCal-n der Firma Stratagene verwirklicht werden. Zwischen dem Leserahmen für das Calmodulin-Bindeprotein (CBP) und dem T7-Terminator ist eine *Multiple Cloning Site* (MCS) enthalten, die das Einbringen fremder offener Leserahmen (*open reading frames*, ORF) ermöglicht. Ausgehend vom T7-Promotor, der den durch IPTG induzierbaren Lac-Operator enthält, findet die Expression eines Fusionspeptides statt, das später mittels Affinitätschromatographie aus dem Gemisch der *E. coli*- Proteine isoliert werden kann. Das CBP kann im Anschluss durch proteolytischen Verdau mit Thrombin vom Zielprotein abgespalten werden. Der Vektor ist zudem mit einem Markergen versehen, das eine Ampicillinresistenz (Amp^R) kodiert und so die positive Selektion von Transformanden ermöglicht.

2.2 Methoden

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung und Aufbewahrung von Bakterien

Bakterien-Flüssigkulturen wurden unter ausreichender Belüftung und Schütteln (220 rpm) sowie bei 37°C in LB-Vollmedium angezogen. Bestand eine plasmidvermittelte Ampicillin-Resistenz, wurde das Medium mit Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/µl versetzt. Die Anzucht von (Vor-)Kulturen mit Volumina unter 5 ml erfolgte in PP-Röhrchen, Kulturvolumina von 20 ml bis 500 ml wurden in Erlenmeyerkolben inkubiert. Beim Pflanz wurden die Medien durch Übertragung von Einzelkolonien von Nährbodenplatten mittels sterilen Pipettenspitzen oder durch Entnahme von 50 µl aus Glycerinkulturen. Da solche Flüssigkulturen für die langfristige Aufbewahrung nicht geeignet sind, wurden 450 µl derselben mit jeweils 900 µl Glycerin versetzt und dieses Gemisch bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Außerdem wurden Bakterien, die häufiger benötigt wurden, auf LB-Agar-Platten ausgestrichen. Dafür wurden 50-100 µl der Bakteriensuspension mit einem sterilen Glasspatel auf dem festen Medium verteilt.

2.2.2.2 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte in Bakterien-Flüssigkulturen wurde photometrisch bestimmt. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes ($E = \epsilon \cdot c \cdot d$ mit E = Extinktion, ϵ = molarer Extinktionskoeffizient, c = Konzentration und d = Schichtdicke der Küvette = 1 cm) konnte die bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessene Extinktion in die Zellkonzentration umgerechnet werden. Die Extinktion des reinen Mediums wurde vor jeder Messung bestimmt und anschließend vom Messwert abgezogen.

2.2.2.3 Herstellung chemokompetenter Bakterien

Das Prinzip aller Transformationen ist eine kurzzeitige induzierte Durchlässigkeit der bakteriellen Zellwände für freie Plasmid-DNA. Diese Permeabilität kann durch Stromfluss, chemische Substanzen (z.B. Ca^{2+} -Ionen) oder Hitzeschock verursacht werden. Da *E. coli* keine natürliche Transformationskompetenz besitzt, wurde die nachstehende Methode angewandt, um die Ausbildung der Fähigkeit zur Aufnahme fremder zirkulärer DNA zu bewirken. Den Angaben des Rubidiumchloridprotokolls von Qiagen folgend wurde am Vorabend zunächst eine Vorkultur des Bakterienstammes *E. coli OneShot*[®] TOP10 in 3 ml LB-Medium ohne Antibiotika angesetzt. Die gesamte Vorkultur wurde am Folgetag in 250 ml vorgewärmtes LB-Medium gegeben und das Wachstum bis zur OD_{600} von 0.5 abgewartet. Die Kultur wurde anschließend auf Eis abgekühlt, fünf Minuten lang bei 4000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet dagegen wurde in 75 ml 4°C kaltem TFB1-Puffer aufgenommen und für 90 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden durch erneute Zentrifugation bei 4000 x g geerntet, in 10 ml eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert, à 100 µl aliquotiert, in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.2.4 Transformation chemokompetenter Bakterien

Handelte es sich bei der zu applizierenden DNA um eine Ligation (s. 2.2.3.10), so wurde der gesamte Ansatz (meist 20 µl) zu einem auftauenden Aliquot thermokompetenter Bakterien gegeben, handelte es sich hingegen um aus Bakterien isolierte Plasmid-DNA (s. 2.2.3.7), wurden nur 1-2 µl derselben addiert. Die Suspension wurde 20 min lang auf Eis inkubiert, um die vollständige Verteilung der DNA zu gewährleisten. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 sec und eine Phase von 90 sec bei 0°C, die dem Wiederverschluss der Zellwände diene. Zur Suspension wurden anschließend 500 µl vorgewärmtes LB-Medium (ohne Antibiotika) pipettiert und der Ansatz eine Stunde bei 37°C inkubiert. Diese Zeit hatte neben der Erholung der Bakterien auch die Etablierung der später nötigen Antibiotikaresistenz zum Zweck. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 1 min bei 800 x g, woraufhin 500 µl des Überstandes abgenommen und 50-100 µl Bakteriensuspension auf LB_{Amp} -Platten ausgestrichen wurden. Die Platten wurden daraufhin über Nacht bei 37°C inkubiert und positive Transformanten durch Kolonie-PCR (s. 2.2.3.4) oder durch Restriktionsverdau der Plasmid-DNA (s. 2.2.3.9) identifiziert.

2.2.2.5 Expression rekombinanter Proteine

Die Expression rekombinanter Proteine erfolgte im *E. coli*- Stamm BL21-CodonPlus (DE3). Dazu wurden 500 ml LB_{Amp} -Medium mit einem Milliliter einer Vorkultur des transformierten Bakterienklons angeimpft, die Hauptkultur daraufhin bei 37°C und 220 rpm schüttelnd inkubiert und die OD_{600} stetig bis zu einem Wert von 0.5 kontrolliert. Nach Erreichen dieses Wertes wurde eine Vorinduktionskontrolle abgenommen und die Probe bis zur SDS-PAGE (s.

2.2.6.3) bei -20°C eingefroren. Es folgte die Induktion der Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) und die Inkubation für weitere drei Stunden. Wie unter 2.1.10 beschrieben steht das Gen des Zielproteins durch Einbringen in die MCS des pCal-n-Vektors unter der Kontrolle des Lac-Operators. IPTG, ein nichtmetabolisierbarer Induktor, bindet an den Lac-Repressor, der durch das $lacI^q$ - Gen codiert wird und durch die IPTG-Bindung seine Konformation verändert. Der Repressor verlässt den Lac-Operator und gibt so die Transkription frei.

Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgten die Entnahme einer weiteren Kontrollprobe für die SDS-PAGE sowie die Zentrifugation der Zellen für 15 min bei 4°C und $4000 \times g$. Das Bakterienpellet wurde in Abhängigkeit vom weiteren Vorgehen bei -20°C eingefroren oder in 20 ml kaltem CaCl_2 -Bindungspuffer aufgenommen und sonifiziert. Die Zellen wurden auf Eis aufgeschlossen, um eine Erwärmung zu vermeiden. Die Zelltrümmer wurden daraufhin für 20 min bei $22500 \times g$ pelletiert, der Überstand wurde für die spätere Aufreinigung (s. 2.2.6.1) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Sowohl vom Pellet als auch vom Überstand wurden Proben für eine SDS-PAGE abgenommen, um die Löslichkeit der überexprimierten Proteine zu dokumentieren.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Diese Methode dient der Auftrennung von Nukleinsäure-Fragmenten nach deren Molekulargewicht. Es wird ausgenutzt, dass DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen im DNA-Rückgrat zur Anode wandern. Die Wandergeschwindigkeit der Moleküle in der Gelmatrix hängt dabei von verschiedenen Faktoren wie Molekülgröße, Molekülkonformation, Agarosekonzentration und angelegter Gleichspannung ab. In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine solche Elektrophorese in 1% igen Agarosegelen. Die Agarose wurde zu diesem Zweck in 1 x TAE-Puffer aufgekocht und in Gelkammern gegossen. Die aufzutragenden Proben wurden mit einem Zehntel Volumen 10 x Probenpuffer vermischt und die Geltaschen beladen. Je nach Gelgröße wurde eine Spannung von 90 - 115 V angelegt. Die Gele wurden anschließend für 20 Minuten in einem Ethidiumbromidbad (5 mg/ml) belassen, die gefärbten DNA-Banden mit Hilfe von UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$) im Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert. Um Aussagen über Fragmentgrößen treffen zu können, wurden immer 9 μl eines DNA-Standards (O'GeneRuler) mitgeführt.

2.2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction, PCR*)

Die Polymerase-Kettenreaktion bietet die Möglichkeit der selektiven *in vitro*- Amplifikation eines DNA-Abschnittes. Es handelt sich dabei um eine zyklische Reaktion, die das Aufschmel-

zen der komplementären DNA-Stränge (Denaturierung), die Anlagerung kurzer Oligonukleotide (*primer annealing*) und die Neustrangsynthese / Kettenverlängerung (Elongation) umfasst. Während der Elongation verlängert die aus *T. aquaticus* gewonnene Taq-Polymerase die Primer am 3' OH-Ende durch kovalentes Anfügen von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) unter Abspaltung von Pyrophosphat. Die Menge der Ziel-DNA wird in jedem Zyklus verdoppelt und die neu synthetisierte DNA dient im nächsten Zyklus als Matrize (*template*), so dass es zu einer exponentiellen Amplifikation des DNA-Fragmentes kommt. In die nachfolgend als Standard-PCR bezeichnete Reaktion wurden aufgereinigte Plasmide und DNA-Fragmente oder Zelllysate eingesetzt. Das Reaktionsgemisch setzte sich wie folgt zusammen:

template	x μ l	x μ l
10 x PCR-Puffer	2.5 μ l	2.0 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	0.7 μ l	0.7 μ l
dNTPs (10 mM)	1.0 μ l	1.0 μ l
forward-Primer (10 pmol/ μ l)	0.5 μ l	0.5 μ l
reverse-Primer (10 pmol/ μ l)	0.5 μ l	0.5 μ l
Taq- Polymerase (5U/ μ l)	0.25 μ l	0.25 μ l
ddH ₂ O	y μ l	y μ l
	Σ 25 μ l	Σ 20 μ l

Soweit nicht anders vermerkt, erfolgte zu Beginn der Reaktion jeweils die Aktivierung der Taq-Polymerase für 7 min bei 95°C und zum Abschluss der Reaktion die finale Extension für 5 min bei 72°C. Die Annealing-Temperaturen wurden entsprechend der Primersequenzen gewählt, lagen jedoch immer zwischen 45°C und 55°C. Die Elongationszeit lag je nach Fragmentlänge zwischen 20 und 90 Sekunden, wobei eine mittlere Syntheserate der Taq-Polymerase von 40 Basen pro Sekunde angenommen wurde. Ein PCR-Zyklus wurde 25 bis 40 Mal wiederholt. Bis zur weiteren Verwendung (Gelelektrophorese, Gelextraktion oder *PCR-Purification*) wurden die Proben bei 4°C gelagert.

2.2.3.3 Real-time quantitative PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR stellt eine Weiterentwicklung Polymerase-Kettenreaktion dar. Die Grundlage wurde 1992 durch Higuchi *et al.* geschaffen. Sowohl spezifische als auch nicht-spezifische fluoreszierende Reporterfarbstoffe können zum Einsatz kommen, wobei die Fluoreszenz proportional zur Produktmenge ansteigt und so die Reaktion verfolgt werden kann. Die Quantifizierung der Amplifikate basiert bei allen Systemen auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem sogenannten Threshold Cycle oder C_T-Wert. Der C_T-Wert beschreibt denjenigen PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich spezifische TaqMan-Sonden verwendet, bei denen die Reporterfluoreszenzemission durch die Nä-

he zum Quencher unterdrückt wird (Livak *et al.* (1995)). Bei der Neustrangsynthese schneidet die Taq-Polymerase durch ihre 5'-3'-Exonucleaseaktivität die TaqMan-Probe in kleine Fragmente, wodurch die Reporterfluoreszenz freigesetzt wird. Das Prinzip der quantitativen Echtzeit-PCR ist zusammenfassend auf der nachstehenden Abbildung (Abb. 2.2) dargestellt.

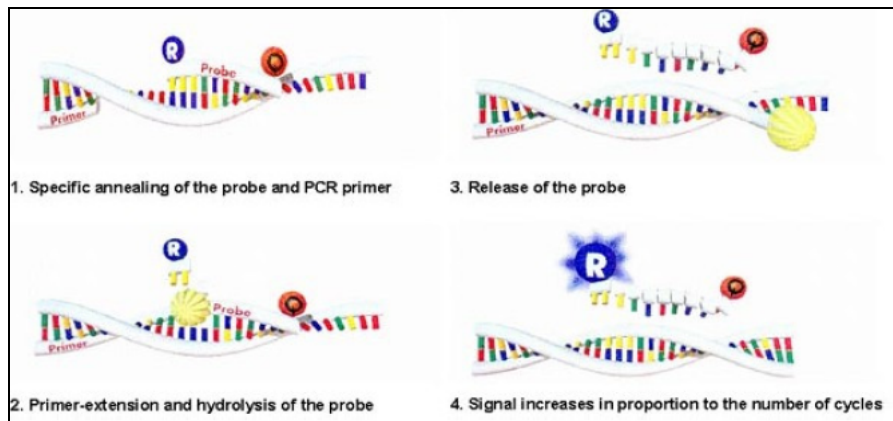


Abb. 2.2: Funktionsprinzip der TaqMan- Sonden (www.appliedbiosystems.com)

Ein typischer Reaktionsansatz ist im Folgenden aufgeführt:

template	x μ l
10 x PCR-Puffer	2.2 μ l
dNTP-Mix (10 mM)	0.63 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1.75 μ l
Primer Virus for (10 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Primer Virus rev (10 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Sonde Virus (10 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Primer GAPDH for (10 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Primer GAPDH rev (10 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Sonde GAPDH (10 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Taq- DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	0.25 μ l
ddH ₂ O	<u> y μl</u>
	Σ 25 μ l.

Die Messung der Reporterfluoreszenz erfolgte mit dem Mx4000[®] Multiplex Quantitative PCR System, die Erfassung und Auswertung der Daten mit der dazugehörigen Software. Alle Werte wurden als Duplikate oder Triplikate gemessen, Mittelwerte und Standardabweichung der Replikate wurden mit Microsoft Excel berechnet. Um die Zytotoxizität von Seren in Neutralisationsassays (s. 2.2.5.5) auszuschließen und um Replikate untereinander vergleichen zu können, wurde ein "house keeping"-Gen, die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), parallel zur Provirussequenz amplifiziert. In der Theorie wird die Produktmenge einer PCR mit jedem Zyklus verdoppelt, was einer Vervielfältigungseffizienz von 100% entspricht. In der Praxis ist diese Effizienz bei jedem eingesetzten Primerpaar verschieden und von Faktoren wie Sekundärstrukturbildung und Amplifikatlänge abhängig. Im Zuge der Ermittlung der Effizienz von Primerpaaren wurden mit Hilfe der C_T-Werte definierter Templateverdünnungen Standardkurven generiert. Die Templatemenge wurde logarithmisch

auf der Abszisse aufgetragen, der C_T -Wert auf der Ordinate und aus der Steigung (m) der Geraden die Effizienz (E) nach folgender Formel berechnet:

$$E (\%) = (10^{-1/m} - 1) \cdot 100.$$

2.2.3.4 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde nach Transformationen zur Identifizierung positiver Bakterienklone eingesetzt. Sie stellt eine schnelle und kostengünstige Nachweismethode für eingebrachte DNA-Fragmente dar, indem das Bakterienmaterial direkt, das heißt ohne vorherige Plasmidpräparation (s. Abschnitt 2.2.3.7), eingesetzt wird. Es kamen wahlweise die für den pCal-n-Vektor spezifischen Primer T7-prom (Promotor) und T7 term (Terminator), die sequenzspezifischen Primer oder T7-prom und reverser Klonierungsprimer zum Einsatz. Die gewünschte Bakterienkolonie wurde mit einer sterilen Pipettenspitze von einer Platte gepickt, auf eine leere Platte überimpft und anschließend im vorbereiteten PCR-Reaktionsansatz resuspendiert. Letzterer setzte sich wie folgt zusammen:

10 x PCR-Puffer	2.0 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	0.7 μ l
dNTPs (10 mM)	1.0 μ l
forward-Primer (10 pmol/ μ l)	0.5 μ l
reverse-Primer (10 pmol/ μ l)	0.5 μ l
Taq-Polymerase (5 U/ μ l)	0.25 μ l
ddH ₂ O	<u>15.05 μl</u>
	Σ 20 μ l.

Das PCR-Programm bestand aus 35 Wiederholungen der folgenden Schritte:

95°C: 45 sec, 48°C: 90 sec, 72°C: 30 sec.

2.2.3.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Zur Abtrennung von Salzen, Enzymen, Proteinen und dNTPs sowie zur Volumeneinengung bis auf 30 μ l wurde das *JETquick PCR Purification Spin Kit / 250* der Firma Genomed eingesetzt. Die Reinigung erfolgte, mit Ausnahme der Elution, nach Herstellerangaben. Um eine höhere DNA-Ausbeute zu erhalten, wurde auf 70°C erwärmtes Wasser eingesetzt und die Säule nach Zugabe desselben noch 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die erhaltene DNA wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis oder bei -20°C aufbewahrt.

2.2.3.6 Gelextraktion

Diese Methode diente der Aufreinigung von DNA-Fragmenten, die zuvor in einem Agarosegel aufgetrennt wurden. Das gewünschte Fragment wurde dabei zunächst mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und die enthaltene DNA unter Verwendung des *Invisorb Spin DNA Extraction Kits (250)* nach Protokoll isoliert. Handelte es sich um das Produkt eines Restrikti-

onsverdau, so wurde die DNA zum Schutz der *sticky ends* bei 4°C, ansonsten bis zur weiteren Nutzung bei -20°C gelagert.

2.2.3.7 Plasmid-Präparation aus Bakterien

Sowohl *Mini-Präp* als auch *Maxi-Präp* hatten die Gewinnung und Reinigung bakterieller Plasmide zum Zweck. Für erstere wurde das *QIAprep Spin Miniprep Kit* der Firma Qiagen, für letztere das *JETstar Plasmid MAXI Kit 20* der Firma Genomed verwendet. Während beide Methoden eine alkalische Lyse der Bakterien beinhalteten, unterschieden sie sich doch wesentlich in der maximal einzusetzenden Bakterienmenge. Für eine *Mini-Präp* wurden 3 ml einer Vorkultur bei 16100 x g sedimentiert, der Überstand vollständig abgenommen und die Zellen nach Herstellerangaben bearbeitet. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl 70°C warmem Wasser eluiert. Im Falle einer *Maxi-Präp* wurden 100 ml Vorkultur zentrifugiert und anschließend ebenfalls nach Protokoll vorgegangen. Die durch Isopropanol-Fällung erhaltenen DNA-Flocken wurden eine Stunde lang bei 14250 x g pelletiert, danach mit Ethanol gewaschen und in 350 µl destilliertem Wasser resuspendiert. Um eine vollständige Lösung der DNA zu gewährleisten, wurde das Zentrifugenröhrchen über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.2.3.8 Photometrische Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Alle DNA-Konzentrationen wurden durch photometrische Messung bei $\lambda = 260$ nm bestimmt. Erfolgte die Bestimmung am NanoDrop, so wurde 1 µl der unverdünnten Probe eingesetzt, erfolgte sie dagegen am BioPhotometer, wurden in der Quarzküvette Vorverdünnungen von 1:25 bis 1:50 vorgenommen. Als Leerwert diente in beiden Fällen doppelt destilliertes Wasser, für die Auswertung wurde das Lambert-Beer'sche-Gesetz herangezogen. Zusätzlich zur Messung bei 260 nm wurde die Lösung auch bei einer Wellenlänge von 280 nm vermessen, um Verunreinigungen, zum Beispiel durch aromatische Aminosäuren, bestimmen zu können. Der Quotient aus OD_{260} und OD_{280} , die sogenannte Ratio, sollte dabei im Bereich zwischen 1.8 und 2 liegen.

2.2.3.9 Restriktionsverdau

Die Spaltung von Phosphodiesterbrücken in doppelsträngiger DNA erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen. Je nach Zweck wurden verschiedene Enzyme / Enzymkombinationen verwandt, aber auch unterschiedliche DNA-Mengen eingesetzt (zum Beispiel 3 µg für einen Probeverdau, 10 µg für eine Klonierung). Alle Ansätze enthielten ein Zehntel Volumen des speziell auf die Endonuclease abgestimmten Puffers (10 x), 5 - 10 U / µl Enzym und bei Beteiligung von BamHI ein Zehntel Volumen BSA (10 x). Auf das angestrebte Gesamtvolumen wurde mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Es folgte eine Inkubation für zwei Stunden beziehungsweise über Nacht bei 37°C. Nach einer solchen Inkubation wurden die Ansätze in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und das gewünschte DNA-Fragment durch Gelextrak-

tion isoliert (s. 2.2.3.6) oder im Falle von zu klonierenden Inserts ohne weitere Behandlung in die Ligation eingesetzt.

2.2.3.10 Ligation

Die kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten erfolgte unter Anwesenheit von ATP (Adenosin-Triphosphat) durch eine T4-DNA-Ligase. In den Ansatz wurden ca. 50 ng des Vektorfragmentes, ein Zehntel Volumen T4-Ligasepuffer sowie 5 Weiss U / μl Ligase pipettiert. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert wurde dabei so gewählt, dass das Insert im deutlichen Überschuss (ca. 1:3) vorlag. Die Ligation erfolgte bei 16°C über Nacht oder bei Raumtemperatur für zwei Stunden, das Reaktionsvolumen betrug 10 oder 20 μl .

2.2.3.11 Sequenzierung

Die Analyse von DNA-Sequenzen erfolgte nach der 1977 von Sanger *et al.* beschriebenen Kettenabbruchmethode. Hierbei werden fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide in die naszierende DNA-Kette eingebaut, woraufhin die Polymerisation / Elongation mangels freiem 3'OH-Ende abbricht. Ein typischer Reaktionsansatz war folgendermaßen zusammengesetzt:

DNA	4 μl
Primer (10 pmol)	0.5 μl
5 x Puffer	1.5 μl
ABI BigDye 3.1 Mastermix	1.0 μl
ddH ₂ O	<u>3 μl</u>
	Σ 10 μl

Das PCR-Programm setzte sich aus folgenden Schritten zusammen:

96°C 2 min
25 Zyklen: 96°C 10 sec, 48°C 15 sec, 60°C 4 min
4°C ∞

Die unterschiedlich langen Bruchstücke wurden anschließend mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und durch Bestrahlung mit UV-Licht detektiert. Die Auswertung der Reaktion erfolgte mit Hilfe der LaserGene 7.1.1- Software der Firma DNASTAR (Madison, USA).

2.2.3.12 cDNA-Synthese

Nach Isolation viraler RNA aus Speichel, Kot, Urin oder Zellkulturüberstand (s. 2.2.5.2) folgte stets die reverse Transkription derselben in cDNA. Die Reverse Transkriptase des *Revert Aid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kits* der Firma Fermentas zeichnete sich durch eine Punktmutation aus, welche eine vollständige Stilllegung der RNase-Aktivität (s. 1.1.4.2) zur Folge hatte. Es wurde jeweils die maximale Menge (11 μl) an RNA eingesetzt und meist mit sequenzspezifischen, aber auch mit random hexamer- sowie oligo dT-Primern umge-

schrieben. Sämtliche Vorgaben des Herstellers wurden befolgt, die erhaltene cDNA anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.3.13 Isolation genomischer DNA

Die Isolation genomischer DNA aus Zelllysate, Gewebeproben oder Vollblut erfolgte mit Hilfe des *DNeasy Blood & Tissue Kits* der Firma Qiagen. Dabei wurden die Angaben des Herstellers befolgt, jedoch wurde die Proteinase K-Behandlung von Blut auf 30 Minuten ausgedehnt.

2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.4.1 Kultivierung und Passagierung

Die langfristige Kultivierung adhärenter Zellen erforderte eine regelmäßige Versorgung derselben. Im Abstand von drei Tagen wurden nach Abnahme des alten Mediums 6 ml vorgewärmtes neues Medium in die Flasche gegeben, die Zellen vom Flaschenboden abgespült oder mit einem sterilen Zellschaber abgeschabt und anschließend durch mehrmaliges Aufziehen und Ausstoßen vereinzelt. Darauf folgte das sogenannte *Splitten* im Verhältnis 1:6, wobei 1 ml Zellsuspension in der Flasche belassen und der Rest von 5 ml verworfen beziehungsweise für die nachfolgende Lyse (s. 2.2.4.6) in ein anderes Gefäß überführt wurde. Mit frischem Medium wurde im Anschluss auf das gewünschte Volumen aufgefüllt. Suspensionszellen wurden mit Ausnahme der Schneider2-Zellen nicht gesplittet und nur einmal pro Woche versorgt. Zu diesem Zweck wurde die Zellsuspension für 5 min bei $300 \times g$ zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 8 ml neuem Medium aufgenommen. Die Zellteilung primärer PBMCs und Lymphozyten wurde durch Zugabe von 180 U/ml IL-2 gesichert. Schneider2-Zellen wurden zweimal pro Woche im Verhältnis 1:3 gesplittet, wobei ein Teil des alten Mediums mit den darin enthaltenen Zellen abgenommen und mit neuem Medium auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt wurde. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, da die Zellen Substanzen ins Medium abgeben, die ihrem Wachstum zugute kommen. Während adhärente Zellen in D-MEM kultiviert wurden, erfolgte die Inkubation von Suspensionszellen in RPMI-Medium jeweils bei 37°C und 5% CO_2 -Gehalt. Die Schneider2-Zellen wurden in einem speziell auf sie abgestimmten Medium bei Raumtemperatur und ohne zusätzliche CO_2 -Begasung gehalten.

2.2.4.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Für alle naiven, aber auch KoRV-infizierten Zellen erfolgte das Anlegen einer Reserve, welche in -196°C kaltem flüssigem Stickstoff lagerte. Die Zellen wurden fünf Minuten lang bei $300 \times g$ zentrifugiert, das alte Medium wurde abgenommen und das Pellet in 1 ml FKS + 10% (v/v) DMSO resuspendiert. Lediglich die Schneider2-Zellen wurden in 45% altem Medium, 45% neuem Medium sowie 10% DMSO aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in

Kryoröhrchen pipettiert, welche, in Papiertücher gewickelt, über Nacht bei -80°C aufbewahrt wurden. So konnte ein langsames Einfrieren ohne zellschädigende Bildung von Eiskristallen gewährleistet werden. Am darauffolgenden Tag wurden die Gefäße in flüssigen Stickstoff überführt. Im Zuge der Reaktivierung wurden eingefrorene Aliquots im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und die Zellen in 10 ml frisches Medium gegeben. Zur Entfernung des noch enthaltenen zytotoxischen DMSO wurden die Zellen wie oben beschrieben zentrifugiert, in 10 ml neuem Medium resuspendiert und in Flaschen überführt.

2.2.4.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die zu vermessende Zellsuspension wurde zunächst 1:1 mit 0.4%iger Trypanblau-Lösung vermischt und davon 10 μl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Anschließend wurde die Zahl der lebenden Zellen, die sich durch ihre Farblosigkeit auszeichneten, in den vier Zählquadraten ermittelt. Mit Hilfe der bekannten Verdünnungsstufe 2 und dem bekannten Kammerfaktor 1×10^4 Zellen / ml konnte im Anschluss die Zellzahl pro ml nach folgender Formel berechnet werden: $\text{Zellzahl / ml} = (\text{Zellen pro Zählquadrat}) * 2 * 10^4 / \text{ml}$.

Daraufhin wurde dem geplanten Versuch entsprechend eine definierte Zellzahl ausgesät.

2.2.4.4 Isolierung von PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation

Zunächst wurden 15 ml Lymphozyten-Separationsmedium in Leucosep[®]-Röhrchen pipettiert und letztere für 30 sec bei $1000 \times g$ und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Das Medium befand sich daraufhin unterhalb der porösen Trennscheibe, auf die nun 15 ml Blut gegeben wurden. Es folgte eine Zentrifugation ohne Bremse für 15 min bei $800 \times g$ und RT im Ausschwingrotor. Lymphozyten und PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) wurden auf Grund ihrer Dichte von Erythrozyten und Granulozyten separiert und in einer Interphase zwischen Plasma und Separationsmedium angereichert. Eine Rekontamination mit Erythrozyten wurde durch die Trennscheibe verhindert. Die PBMCs wurden daraufhin mit der Pipette abgesaugt, in 10 ml PBS „ohne“ gegeben und für 15 min bei $300 \times g$ zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal mit je fünf ml PBS „ohne“ wiederholt, woraufhin die Zellen in 5 ml RPMI 1640 ohne FKS aufgenommen und gezählt wurden.

2.2.4.5 Etablierung einer Tumorzelllinie

Tumorgewebe wurde zum Zwecke der Zellvereinzlung zunächst durch ein Sieb in eine Schale mit 0.25% Trypsin gemörsert, wobei die enzymatische Wirkung des letzteren die Auflösung von Zellverbänden zusätzlich förderte. Anschließend wurde die proteolytische Aktivität des Trypsins durch Zugabe von 5 ml Ca^{2+} -haltigen Mediums gehemmt. Die Suspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und für 10 min bei $300 \times g$ zentrifugiert, das Trypsin-Medium-Gemisch daraufhin abgenommen, das Pellet in 20 ml frischem D-MEM re-

suspendiert und abschließend in eine Zellkulturflasche überführt. Die Passagierung erfolgte wie unter 2.2.4.1 für adhärenente Zellen beschrieben.

2.2.4.6 Aufschluss eukaryotischer Zellen (Proteinase K)

Diese Methode diente dem Aufschluss eukaryotischer Zellen und damit der Freisetzung genomischer DNA, die im Folgenden für Amplifikationsreaktionen eingesetzt werden sollte. Handelte es sich um in Flach- oder Rundbodenplatten kultivierte Zellen, wurde zur Vorbereitung ausschließlich das Medium abgenommen. Im Falle von in Flaschen kultivierten Zellen wurden diese zunächst in Suspension gebracht, gesplittet und die gewünschte Menge in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden dann bei maximaler Umdrehungszahl eine Minute lang pelletiert und der Überstand verworfen. In beiden Fällen folgte daraufhin ein dreimaliges Auftauen und Einfrieren der Zellen zum Zwecke der Zerstörung von Zellstrukturen durch Eiskristalle sowie die Applikation eines adäquaten Volumens (100-1000 µl) Lyse-puffer (s. 2.1.7). Anschließend wurde dieser Ansatz für drei Stunden oder über Nacht bei 60°C inkubiert, um eine vollständige Wirkung der Proteinase K (zum Beispiel Verdau DNA-assoziiertes Proteine) zu gewährleisten. Letztere wurde nachfolgend für 30 min bei 90°C inaktiviert, wodurch eine Zerstörung der Polymerase im späteren PCR-Ansatz vermieden werden sollte. Das Zelllysat wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert oder direkt als *Template* für die Provirusnachweis-PCR eingesetzt.

2.2.4.7 Aufschluss eukaryotischer Zellen (RIPA-Lyse)

Die Gewinnung von Gesamtprotein aus eukaryotischen Zellen erfolgte mit Hilfe der RIPA-Lyse. Zunächst wurde die gewünschte Zahl an Zellen für 3 min bei 4000 x g pelletiert, das Medium dann abgegossen und das Pellet mit 1 ml PBS „ohne“ gewaschen. Anschließend wurde eine adäquate Menge (200 – 500 µl) eiskalten RIPA-Puffers auf die Zellen gegeben, die Suspension gevortext und nachfolgend 45 min auf Eis inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 10000 x g sedimentiert, der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung (SDS-PAGE, s. 2.2.6.3) bei -20°C oder 4°C aufbewahrt.

2.2.5 Virologische Methoden

2.2.5.1 Ultrazentrifugation

Um Viren aus Zellkulturüberständen, Urin oder Kotproben zu konzentrieren, wurden Ultrazentrifugationsschritte durchgeführt. Während die Urinproben ohne weitere Vorbehandlung eingesetzt wurden, erfolgte im Falle von Zellkulturüberständen zunächst die Abtrennung von Zellbestandteilen durch einen Filter mit 0.2 µm Porengröße. Kotproben wurden dagegen vorab in PBS resuspendiert und bei 7500 x g und 4°C für 15 min pelletiert, der Überstand wurde anschließend steriltrifert (s.o.). Die Flüssigkeiten wurden dann in spezielle Zentrifugenröhr-

chen (Polyallomer Centrifuge Tube 14 x 89 mm) überführt, letztere mit PBS bis zum oberen Rand aufgefüllt und für drei Stunden bei 100000 x g in der Ultrazentrifuge belassen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand bis auf ein Volumen von 200 µl vorsichtig abgenommen, das Viruspellet in der Restflüssigkeit resuspendiert und die Lösung anschließend für die RNA-Isolation verwendet.

2.2.5.2 Isolation viraler RNA

Die Isolation viraler RNA erfolgte mit Hilfe des *High Pure Viral RNA Kits* der Firma Roche. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der Bindung von RNA an eine Glasfasermatrix in Anwesenheit eines chaotropen Salzes (Guanidinhydrochlorid). Die RNA kann anschließend durch Waschschriffe von Verunreinigungen befreit und unter Niedrigsalzbedingungen eluiert werden. Jeweils 200 µl einer sterilfiltrierten, ultrazentrifugierten oder anderweitig vorbereiteten Probe wurden mit 400 µl der sogenannten Arbeitslösung versetzt. Anders als im Protokoll gefordert wurde dabei die Arbeitslösung aus 12.5 µl Poly-(A)-Träger-RNA (in Nuklease-freiem Wasser) und 1.25 ml Bindungspuffer hergestellt und reichte folglich nur für drei Proben. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, da nie acht Proben gleichzeitig bearbeitet wurden und ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Poly-(A)-RNA vermieden werden sollte. Alle anderen Schritte wurden nach Herstellerangaben ausgeführt. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

2.2.5.3 Erzeugung / Gewinnung virushaltigen Zellkulturüberstandes

Die Verwendung von einheitlichen Virusstocks für verschiedene Infektionsversuche sichert die Vergleichbarkeit derselben. Von KoRV-infizierten 293-Zellen wurden Überstände abgenommen, diese sterilfiltriert (Porengröße 0.2 µm), anschließend auf naive 293-Zellen gegeben und dort vier Tage belassen. Der Zellkulturüberstand der neu infizierten Zellen wurde dann wiederum auf naive 293 Zellen pipettiert und der Vorgang so oft in kurzen Abständen wiederholt (maximal fünf Mal) bis eine Selektion schnell replizierender Viren sichergestellt war (Nachweis durch Titration, s.u.). Die infizierten 293-Zellen des letzten Durchgangs wurden daraufhin in T175 Zellkulturflaschen expandiert, die Zellkulturüberstände sterilfiltriert, à 2 oder 8 ml aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Das ursprüngliche Virus (Primärisolat) war aus Mitogen-stimulierten PBMCs eines männlichen Koalas des Duisburger Zoos gewonnen worden (Fiebig *et al.*, 2006), GenBank *accession number* DQ174742).

2.2.5.4 Titration virushaltiger Zellkulturüberstände

Die Titration virushaltiger Zellkulturüberstände dient der Bestimmung derjenigen Verdünnungsstufe, bei der gerade noch eine Infektion naiver Zellen möglich ist. Zunächst wurden am Vortag des eigentlichen Experimentes 5×10^3 uninfizierte 293-Zellen pro well in eine 96-

well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden in einer separaten 96-well-Platte Virusverdünnungen in Schritten von 1:2 vorbereitet und die Verdünnungen im Anschluss auf die Zellen pipettiert, so dass das Gesamtvolumen pro well 200 µl betrug. Die Platte wurde drei Tage lang bei 37°C inkubiert und die Proviruslast nach Zellyse mittels Real-time PCR quantifiziert. Alle Virusstocks und Verdünnungsstufen wurden als Triplikate gemessen. Die Resultate wurden dann für die Berechnung der TCID₅₀/ml (*Tissue Culture Infectious Dose*), also derjenigen Verdünnung, bei der die Hälfte der Zellen im well infiziert ist, verwendet. Folgende Formel kam dabei zum Einsatz: $TCID_{50}/ml = ((Ds^{(X/Reps)+0.5}) / ((1/D0 * Ds * (V/1000))))$

mit Ds = *dilution steps* = Verdünnungsstufen, X = Zahl der infizierten wells, Reps = Zahl der Replikate, D0 = erste Verdünnung und V = Volumen in µl / well.

2.2.5.5 Neutralisationsassay

In der vorliegenden Arbeit wurden Neutralisationsassays durchgeführt, um die Neutralisationskapazität eines Serums nach Immunisierung zu bestimmen. Bei Anwesenheit neutralisierender Antikörper sind Viren nicht in der Lage, naive Zellen zu infizieren und somit auch nicht in der Lage, virale cDNA als Provirus zu integrieren. Zunächst wurden am Vortag des Assays 5×10^3 unbehandelte 293-Zellen pro Vertiefung in 80 µl Medium ausgesät (96-well-Format). Am Folgetag wurden in einer zweiten Platte 20 µl der zu testenden, dekomplementierten Seren vorgelegt und diese mit 100 µl definiertem Virusüberstand überschichtet. Das gesamte Volumen wurde dann auf die Zellen in der ersten Platte übertragen, so dass die Verdünnung des Serums im well 1:10 betrug. Als Positivkontrolle wurden 20 µl FKS und 100 µl Virusüberstand auf die Zellen gegeben, alle Serumverdünnungen als Triplikate angesetzt. Die Platte wurde für 72 Stunden bei 37°C inkubiert, woraufhin die Quantifizierung der Provirusintegration mit Hilfe der Real-time PCR erfolgte (3 µl Zellysat). Im Zuge der Auswertung wurden zunächst die Differenzen der C_T-Werte zwischen Immunseren und Positivkontrolle berechnet (Subtraktion aller Einzelwerte). Mit Hilfe dieser Werte (ΔC_T) ergab sich die Berechnung der Provirusintegration wie folgt: $Provirusintegration [\%] = MW (2^{-\Delta C_T}) \times 100$

und dementsprechend die Berechnung der Provirusintegrationshemmung (Neutralisation):
Hemmung der Provirusintegration [%] = 100 - Provirusintegration [%].

2.2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.2.6.1 Aufreinigung rekombinanter Proteine

Die Isolation löslicher, rekombinant exprimierter CBP-Fusionsproteine aus dem *E.coli*-Zellysat erfolgte mittels Calmodulin-Affinitätschromatographie. Diese Methode basiert auf der spezifischen Bindung des Calmodulinbindeproteins an eine Calmodulin-Affinitätsmatrix (*Calmodulin Affinity Resin*) unter Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen. Das Lysat einer IPTG- indu-

zierten 500 ml-Flüssigkultur (s. 2.2.2.5) wurde über Nacht bei 4°C und unter ständiger Zirkulation auf 3 ml des Säulenmaterials gegeben. Dabei betrug die Flussrate 2 ml / min. Am darauffolgenden Morgen wurde die Säule mit zehn Bettvolumen CaCl₂-Bindungspuffer gewaschen, wobei ungebundene Proteine entfernt wurden. Durch den im Elutionspuffer enthaltenen Chelatbildner EGTA konnte anschließend die CBP-Calmodulinbindung gelöst und das Zielprotein eluiert werden. Es wurden 15 Fraktionen à 2 ml gesammelt, die Proteinkonzentrationen der einzelnen Fraktionen, wie unter 2.2.6.2 beschrieben, bestimmt und die proteinreichsten Eluate vereint. Die Regeneration der Säule erfolgte nach Herstellerangaben. Konnte ein rekombinantes Protein nicht im Überstand nachgewiesen werden (besonders Transmembranproteine der Retroviren sind stark hydrophob und liegen im bakteriellen Zytoplasma oft als sogenannte *Inclusion Bodies* vor), musste statt der Aufreinigung mittels CBP-Affinitätschromatographie ein Auswaschen des Pellets erfolgen. Dazu wurde das nach der Lyse unlösliche Sediment in 20 ml PBS resuspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur in einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Suspension pelletiert (22500 x g für 15 min), der proteinhaltige Überstand verworfen und das Pellet erneut in PBS aufgenommen. Dieser Vorgang wurde bis zu sechs Mal wiederholt. Alternativ dazu wurde, um das Protein in Lösung zu bringen, das Pellet über Nacht bei Raumtemperatur in 0.3% SDS geschüttelt, anschließend wie oben zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand in eine kalte Methanol/Aceton-Fällung (s. 2.2.6.4.1) eingesetzt.

2.2.6.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue R-250 bindet an basische Seitenketten von Proteinen, wodurch sich im sauren Milieu das Absorptionsmaximum der Lösung von 465 nach 595 nm verschiebt (Bradford *et al.*, 1976). Vor Beginn der Messung wurde konzentriertes Bradford-Reagenz nach Herstellerangaben verdünnt und sterilfiltriert sowie eine Standard-BSA-Reihe im Bereich von 200-1000 µg/ml erstellt. Anschließend wurde ein Gemisch aus 196 µl Reagenz und 4 µl proteinhaltiger Probe hergestellt und die oben beschriebene Absorptionsänderung photometrisch bei 560 nm erfasst. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt, die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte unter Verwendung der Geradengleichung.

2.2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*SDS-PAGE*)

Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese; Schägger und Jagow, 1988) ermöglicht eine Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Natriumdodecylsulfat ist ein anionisches Detergenz, welches durch Anlagerung an Proteine deren Eigenladung überdeckt und so die Wanderung derselben im elektrischen Feld ermöglicht. Die Proben wurden zunächst 1:1 mit 2 x Probenpuffer vermischt, fünf bis zehn Minuten bei 95°C denaturiert sowie reduziert und daraufhin bei maximaler Umdrehungszahl kurz zentri-

fugiert. In jedem Fall wurden 12%ige Polyacrylamidtrenngele (eigentliche Auftrennung) in Verbindung mit 4%igen Sammelgelen (Fokussierung der Lauffront) verwendet. Die Dicke der Gele betrug einen Millimeter, die Zusammensetzung der Gele ist im Folgenden aufgeführt.

Tab. 2.3: Gelzusammensetzung

Acrylamid	4%	12%
Gelpuffer	1.0 ml	2.5 ml
Acrylamid-Lösung (30%)	0.4 ml	3.0 ml
ddH ₂ O	1.6 ml	2.0 ml
APS (10%)	35 µl	35 µl
TEMED	3.5 µl	3.5 µl

Zur Abschätzung des Molekulargewichtes wurden in eine freie Tasche 5 µl eines Markers (PageRuler) geladen. Je nach Taschengröße wurden 15 bis 25 µl, bei präparativen Gelen 200 µl (10 µg) der Probe aufgetragen, die Auftrennung erfolgte bei 100 V.

2.2.6.4 Konzentration von Proteinlösungen

2.2.6.4.1. Kalte Aceton/Methanol Fällung

Eine Möglichkeit, um Proteine zu konzentrieren und Aceton- bzw. Methanol-lösliche Substanzen wie SDS zu entfernen, ist die kalte Aceton/Methanol-Fällung. Das zu fällende Protein wurde mit vier Volumen Präzipitations-Reagenz (s. 2.1.7) versetzt und über Nacht bei 4°C sowie unter Rühren inkubiert. Das Gemisch wurde dann für 20 min bei 12000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Proteinpellet in PBS „ohne“ resuspendiert.

2.2.6.4.2. Eindampfen

Hierbei wurde der wässrige Anteil der Proteinlösung im Hybridisierungssofen oder im Eppendorf Concentrator so lange verdampft bis das gewünschte Volumen erreicht war. Um die Proteinstruktur nicht zu verändern, wurde eine Temperatur von 30°C gewählt.

2.2.6.4.3. Viva Spin 20

Bei dieser Methode wurden maximal 20 ml der Proteinlösung in ein Gefäß überführt, welches aus einem oberen Reservoir, einer Membran mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 10000 Da sowie einem unteren Reservoir bestand. Durch Zentrifugation bei 3200 x g im Ausschwingrotor wurde der wässrige Anteil in das untere Reservoir gepresst, während die Proteine, bedingt durch ihr Molekulargewicht im oberen Reservoir zurückgehalten wurden. Von Vorteil war hier, dass auch Salze des Elutionspuffers abgeschieden werden konnten.

2.2.7 Immunologische Methoden

2.2.7.1 Immunisierung

Für Immunisierungsversuche wurden pro Gruppe vier acht bis zwölf Wochen alte, weibliche Wistar-Ratten des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR, Berlin, Deutschland) eingesetzt. Das Antigen wurde zunächst in PBS „ohne“ aufgenommen und 1:1 mit Freund's Adjuvans vermischt. Durch mehrmaliges Aufziehen durch eine 0.6 mm Kanüle konnte eine Emulsion erzeugt werden, von der je 250 µl in die Muskulatur der Hinterläufe und 500 µl subcutan unter das Nackenfell injiziert wurden. Die pro Tier applizierte Antigen-Menge betrug etwa 250 µg. Drei Wochen nach der Grundimmunisierung erfolgte die sogenannte Boostimmunisierung und weitere drei Wochen später die erste Blutabnahme. Weitere Blutungen erfolgten je nach Bedarf, aber maximal in 14-tägigem Abstand. Dabei wurden jeweils etwa 1.5 ml Blut gewonnen, die anschließend 15 min lang bei 7500 x g und 4°C zentrifugiert wurden. Das Serum wurde abgenommen, 40 min bei 56°C dekomplementiert, gegebenenfalls aliquotiert und bei 4°C oder -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Seren wurden später für Western Blot (s. 2.2.7.2), Neutralisationsassay (s. 2.2.5.5) oder Epitopkartierung (s. 2.2.7.4) eingesetzt.

2.2.7.2 Western Blot

Der immunologische Nachweis der durch SDS-PAGE (s. 2.2.6.3) aufgetrennten Proteine erfolgte mittels Western Blot (Towbin *et al.*, 1989), wobei die durch Natriumdodecylsulfat markierten Proteine bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld auf einer Nylonmembran immobilisiert wurden. In dieser Arbeit wurde das *Semidry-Blotting*-Verfahren angewandt. Zunächst wurden Nylonmembran und Blotting-Filterpapier passgenau zurechtgeschnitten, um die Gleichmäßigkeit des elektrischen Feldes zu gewährleisten. Nachdem die Membran kurz in Methanol geschwenkt worden war, wurden Polyacrylamidgel, Filterpapier und Membran in Transferpuffer äquilibriert und luftblasenfrei übereinander geschichtet. Der Transfer erfolgte für 25 min bei 20 V. Um unspezifische Bindungen zu minimieren, das heißt, freie Bindungsstellen abzusättigen, wurde die geblottete Membran daraufhin eine Stunde lang bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in 30 ml Blockpuffer schüttelnd inkubiert. Anschließend erfolgten die Zugabe des Primärantikörpers (primäres Antiserum bzw. Präimmunserum) in einer Verdünnung von 1:500 oder 1:750 in Blockpuffer sowie die Inkubation für eine Stunde bei 25°C. Monoklonale Antikörper wurden in Verdünnungen von 1:2000 (Anti-c-Myc) oder 1:5000 (Anti-β-Actin) eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen mit je 30 ml PBS / 0,05% Tween20 wurde die Membran für anderthalb Stunden in Blockpuffer mit einem Zweitantikörper (primärantikörperspezifisch, Meerrettichperoxidase-konjugiert) in 1:3000 – Verdünnung geschwenkt. Ungebundene Antikörper wurden durch erneutes Waschen (wie oben) entfernt. Für die nachfolgende DAB-Färbung des Blots wurde eine 25 mM Tris-HCl- Lösung mit einer Spatelspitze Diaminobenzidin sowie 100 µl Wasserstoffperoxid versetzt. Die Membran wurde

daraufhin so lange in diesem Gemisch belassen, bis deutliche Banden zu erkennen waren. Die Reaktion wurde durch destilliertes Wasser gestoppt, die Membran anschließend getrocknet und lichtgeschützt aufbewahrt. Im Falle einer ECL-Detektion wurden zunächst 2 ml der Lösung 1 mit 2 ml der Lösung 2 (s. 2.1.1) vermischt. Die Membran wurde dann zwei Minuten lang in diesem Gemisch geschwenkt und die entstehende Chemilumineszenz durch Belichtung eines Röntgenfilms nachgewiesen. Der Zweitantikörper wurde auf Grund der höheren Sensitivität der Methode stärker verdünnt, nämlich 1:10000, eingesetzt.

2.2.7.3 Strippen

War nach der Detektion eines bestimmten Proteins im Western Blot der Nachweis eines weiteren Proteins gewünscht, konnten alle zuvor gebundenen Antikörper durch das sogenannte *Strippen* entfernt und so die Membran für eine erneute Inkubation mit proteinspezifischen Antikörpern oder allgemein Seren vorbereitet werden. Dazu wurde die Membran für 30 min in 50 ml Regenerationspuffer und bei 50°C im Hybridisierungssofen inkubiert, anschließend zweimal zehn Minuten lang in 30 ml T-TBS geschwenkt und geblockt. Danach wurde wie unter 2.2.7.2 beschrieben vorgegangen.

2.2.7.4 Epitopkartierung

Die Methode der Epitopkartierung wurde angewandt, um Epitope von Antikörpern verschiedener Seren zu ermitteln. Durch die jpt Peptide Technologies GmbH, Berlin wurde zu diesem Zweck eine sogenannte PepSpotTM-Membran hergestellt, welche die Aminosäuresequenz der KoRV p15E-Ektodomäne umfasste. Dabei wurden 15mere mit überlappenden Bereichen von jeweils 12 Aminosäuren an eine Nitrocellulosemembran gekoppelt.

Inkubations-, Wasch- und Regenerationsschritte (Regenerationsprotokoll I) sowie die Lagerung erfolgten nach Herstellerangaben. Seren von Immunisierungsratten wurden 1:750, Seren von Infektionsratten dagegen 1:500 in Blockpuffer verdünnt, der Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:10000 in Blockpuffer auf die Membran gegeben. Letzterer wurde mittels ECL-Detektion nachgewiesen, wobei die Belichtungszeiten je nach Stärke des Signals zwischen 15 und 90 Sekunden lagen. Für die Sekundärantikörperkontrolle (Untersuchung von unspezifischem Bindungsverhalten) wurde eine maximale Belichtungszeit von fünf Minuten gewählt. Im Zuge der Auswertung wurden die Sequenzen der positiven Spots übereinander gelegt und als Epitope diejenigen Aminosäuren gewertet, die in allen 15meren gleichermaßen enthalten waren.

2.2.7.5 *Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA)*

Der ELISA diente der spezifischen Detektion von Antikörpern in Seren nach Antigenkontakt. Wie beim Western Blot auch, handelte es sich um eine Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Hilfe eines HRP-gekoppelten Zweitantikörpers nachgewiesen werden konnte. Zunächst wur-

de das Antigen in einer Konzentration von 150 oder 200 ng auf spezielle 96-well ELISA-Platten aufgebracht. Zu diesem Zweck wurden entsprechende Verdünnungen in Wasser angesetzt, in jede Vertiefung 50 µl der Proteinlösung pipettiert und die Platten über Nacht bei 37°C oder übers Wochenende bei Raumtemperatur belassen. Freie Bindungsstellen des Plattenbodens wurden am darauffolgenden Tag durch einstündige Inkubation bei 37°C mit 3% Magermilchpulver sowie 10% FKS oder mit 5% BSA in PBS / 0.05% Tween gesättigt (100 µl Blockpuffer pro well). Anschließend wurde die Platte ausgeklopft und 50 µl der Primärseren in geeigneter Verdünnung (1:250 oder 1:500 in Blockpuffer) wurden in die wells gegeben. Es folgten eine erneute Inkubation für eine Stunde bei 37°C, das fünfmalige Waschen der wells mit 300 µl PBS / 0.05% Tween, die Applikation des POD-gekoppelten Sekundärantikörpers in einer Verdünnung von 1:5000 in Blockpuffer und ein weiterer Inkubationsschritt. Ungebundene Sekundärantikörperkonjugate wurden durch sieben Waschzyklen entfernt und daraufhin in jede Vertiefung 50 µl Substratlösung pipettiert. Es wurde eine deutliche Färbung abgewartet und die Reaktion nach maximal 15 Minuten durch Zugabe von 50 µl 2.5M H₂SO₄ gestoppt. Der enzymvermittelte Substratumsatz wurde bei 492 sowie 620 nm verfolgt und durch das Computerprogramm Magellan der Quotient berechnet. Alle Ansätze wurden dreifach gemessen, Mittelwerte und Standardabweichungen der Replikate mit Microsoft-Excel bestimmt.

2.2.7.6 KoRV p27Gag *Capture* ELISA

Anders als Western Blot (s. 2.2.7.2) und ELISA (s. 2.2.7.5), die der Detektion von Antikörpern dienen, ist der *Capture* ELISA entwickelt worden, um die Anwesenheit eines Antigens in Seren oder Zelllysaten aufzuzeigen. Dabei wird zunächst ein gegen das Antigen gerichteter, monoklonaler oder aufgereinigter Antikörper auf einer geeigneten Oberfläche immobilisiert. Das in der Probe enthaltene Antigen bindet dann an den *Capture*-Antikörper und kann nachfolgend über einen weiteren Primärantikörper nachgewiesen werden. Dieser zweite gegen das Antigen gerichtete Antikörper kann entweder selbst markiert sein oder wiederum durch einen enzymgekoppelten Sekundärantikörper detektiert werden. Im ersten Fall kann der Antikörper aus der gleichen Spezies stammen, im zweiten Fall jedoch muss der Antikörper aus einer fremden Spezies isoliert worden sein. Das Prinzip des *Capture* ELISAs ist in Abb. 2.3 schematisch dargestellt.

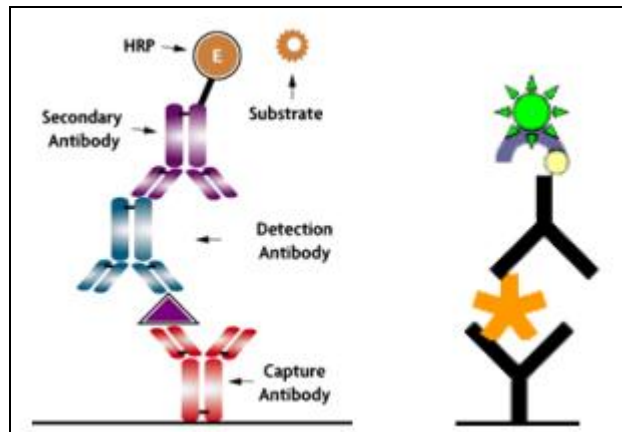


Abb. 2.3: Schematische Darstellung eines Capture ELISAs (www.activemotif.com, www.endogen.com)

Der aufgereinigte Antikörper wurde in doppelt destilliertem Wasser verdünnt (1:25 – 1:12800), diese Verdünnung à 50 µl in die entsprechenden wells pipettiert und die Flüssigkeit über Nacht bei 30°C im Hybridisierungssofen verdampft. Die Platte wurde dann entweder bei 4°C gelagert oder am nächsten Tag mit 100 µl Blockpuffer (s. 2.1.7, 2.2.7.5) pro Vertiefung befüllt. Es folgten die Absättigung unspezifischer Bindungen für 45 min bei 37°C sowie das dreimalige Waschen mit je 300 µl PBS / 0.05% Tween 20. Anschließend wurden 25 µl Blockpuffer und 25 µl Viruslysate im well vermisch, wobei das Viruslysate wie folgt hergestellt wurde: Die zu untersuchenden Proben (Zellsuspension, sterilfiltrierter Zellkulturüberstand oder Serum) wurden zunächst 15 min lang auf 75°C erhitzt, dann im Verhältnis 1:10 mit 2% Tween 20 in Wasser versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Auf eine zwei-stündige Einwirkzeit bei 37°C folgten das dreimalige Waschen der wells, die Zugabe des Immunisierungsserums mit den enthaltenen antigenspezifischen Primärantikörpern in geeigneter Verdünnung (1:625 in Blockpuffer) und ein weiterer Inkubationsschritt für 45 min bei 37°C. Überschüssige Primärantikörper wurden durch drei Waschzyklen entfernt, woraufhin 50 µl einer 1:5000 Verdünnung des Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers appliziert wurden. Die weitere Vorgehensweise entsprach der unter 2.2.7.5 beschriebenen.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Übertragungswege des Koala-Retrovirus

3.1.1 Etablierung eines KoRV-Kleintiermodells

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass KoRV *in vivo* auf Wistar-Ratten übertragen werden kann und dort eine humorale Immunantwort auslöst (Fiebig *et al.*, 2006). Dieser Befund stützt die Hypothese, dass Nager als Intermediärwirt für die Übertragung des Virus in Frage kommen (Hanger *et al.*, 2000). Wie das Virus von Wirt zu Wirt übertragen wird, ist allerdings unklar.

Auf Grund dieser Vorarbeiten und der kostengünstigen Verfügbarkeit der Tiere wurden Wistar-Ratten für die Etablierung eines KoRV-Kleintiermodells gewählt. Dieses Modell soll in Zukunft die Möglichkeit bieten, Übertragungswege von Retroviren zu untersuchen, Impfstoffansätze zu erproben sowie Immunmodulationen nach retroviralen Infektionen zu studieren.

3.1.2 „Rotationsversuch“

Untersuchungen naiver Ratten, die mit infizierten Tieren im gleichen Raum gehalten wurden, ergaben Hinweise darauf, dass KoRV innerhalb eines Raumes ohne direkten Kontakt der Tiere übertragen werden kann. Um KoRV-Übertragungswege genauer zu charakterisieren, wurde folgender Versuch durchgeführt: Durch Inokulation infizierte Ratten (Tiere 5-8) wurden in einem Käfigständer mit uninfizierten Tieren zusammengebracht, wobei das in Abb. 3.1 dargestellte Muster eingehalten wurde.

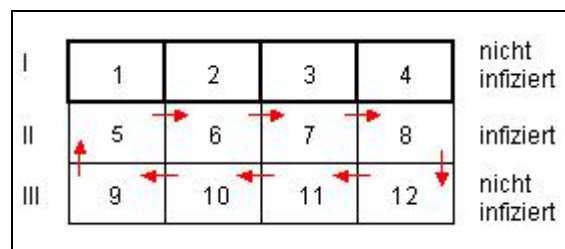


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des „Rotationsversuches“

In der obersten Reihe saßen uninfizierte Tiere, die über den gesamten Zeitraum in denselben Käfigen verblieben, in der mittleren und untersten Reihe saßen infizierte beziehungsweise nicht infizierte Tiere, die täglich im Uhrzeigersinn in einen benachbarten Käfig umgesetzt wurden. Stoffüberzüge sollten eine Kontamination mit Kot und Streu aus anderen Käfigen verhindern, eine Reinigung der Käfige fand einmal pro Woche statt. In Abständen von zwei bis drei Wochen wurden allen Tieren Blutproben entnommen und die Seren im ELISA auf p15E-spezifische Antikörper untersucht. Abb. 3.2 zeigt die Ergebnisse des Experimentes im Zeitverlauf. Die Tiere 9-12 der Rotationsgruppe zeigten bereits früh eine Infektion, was für eine Übertragung der Infektion auf nicht infizierte Ratten durch Kot und Urin spricht. Aller-

dings entwickelten auch die isolierten Tiere der Kontrollgruppe über einen Zeitraum von drei Monaten eine Antikörperantwort gegen KoRV p15E.

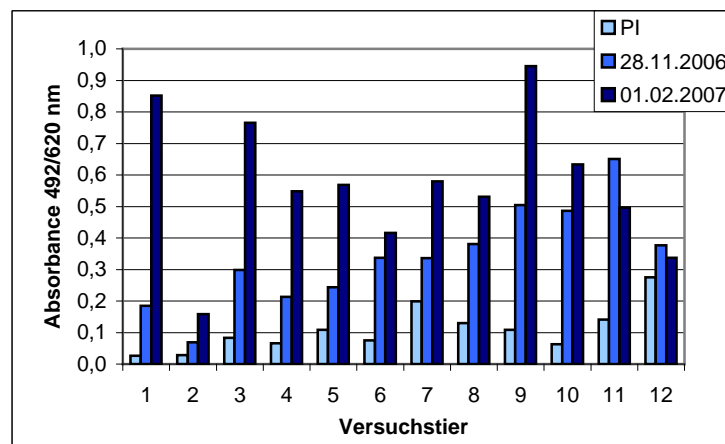


Abb. 3.2: Bestimmung von AK-Mengen in Rattenserum, Seren 1:500 verdünnt, 200 ng KoRV p15E ge-coated, PI = Präimmunserum

Die statistische Auswertung des Versuches erfolgte durch eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung (Bortz ,1989). Der F-Wert lag mit 28,88 weit über den kritischen F-Werten für Irrtumswahrscheinlichkeiten von 1% (7,21) und 5% (3,98) mit 2 und 11 Freiheitsgraden. Dadurch und durch die post-hoc-Mittelwertvergleiche nach Pillais, Hotellings und Wilks (SPSS, Version 6.0) konnte bestätigt werden, dass im Verlauf des Versuches eine hochsignifikante Zunahme der Antikörpertiter gegen KoRV p15E eintrat. Wegen der relativ geringen Stichprobengrößen wurde zur Absicherung eine Friedman Two-Way ANOVA (das parameterfreie Gegenstück zur Varianzanalyse mit Messwiederholung) berechnet, die ein χ^2 von 20.67 ergab, was ebenfalls eine hochsignifikante Zunahme der Antikörpertiter signalisiert. Die Resultate der ELISAs konnten durch Western Blots verifiziert werden (Abb. 3.3). Auffällig sind die Tiere 1 und 3 der Kontrollgruppe, die eine starke Immunantwort gegen p15E zeigten.

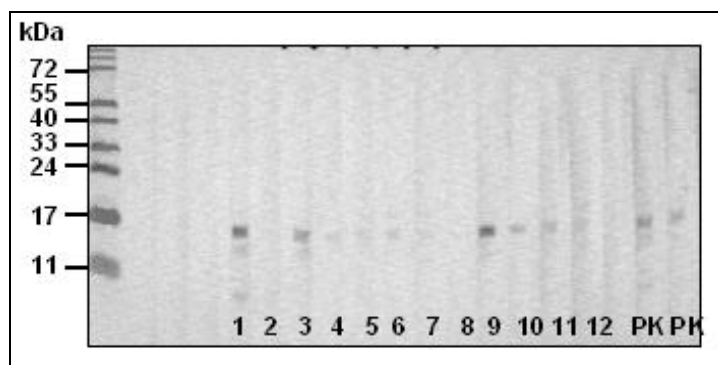


Abb. 3.3: Western Blot zur Testung von Seren auf KoRV p15E-AK, 1-12 bezeichnen die Versuchstiere des Rotationsversuches, Seren 1:500 verdünnt, PK: Positivkontrolle = experimentell infizierte Ratten 83/2 (links) und 86/3 (rechts)

Die Tiere 2 und 12 zeigen im Vergleich zu ihren Gruppenmitgliedern zunächst eine verringerte Reaktion, bei Betrachtung des anschließenden Neutralisationsassays (Abb. 3.4) wird jedoch deutlich, dass sämtliche Tiere neutralisierende Antikörper gegen das Koala-Retrovirus gebildet haben. Mit Hilfe einer univariaten Varianzanalyse wurde überprüft, ob sich die Gruppenmittelwerte (91.3%; 91.9%; 93.8%) signifikant voneinander unterscheiden (Clauß und Ebener, 1970). Da der erhaltene F-Wert mit 1.39 unter dem $f_{(5\%, 2/9)}$ von 4.26 liegt, kann angenommen werden, dass zwischen den drei Gruppen keine Unterschiede bestehen. Auch die multiplen Mittelwertvergleiche nach Duncan, Student-Newman-Keuls sowie Scheffé zeigten, dass sich keiner der oben genannten Mittelwerte von einem anderen unterscheidet (ermittelt mit SPSS, Version 6.0). Wegen der geringen Stichprobengrößen wurde wiederum das parameterfreie Pendant zur univariaten Varianzanalyse berechnet, nämlich eine Kruskal-Wallis One-Way ANOVA (Rangvarianzanalyse; Bortz *et al.*, 2000). Diese ergab ein χ^2 von 4.15, was als nicht signifikant zu bewerten ist.

Daraus folgt, dass die neutralisierenden Antikörper bei den oben genannten Ratten 2 und 12 gegen andere KoRV-Antigene als p15E gerichtet sein müssen.

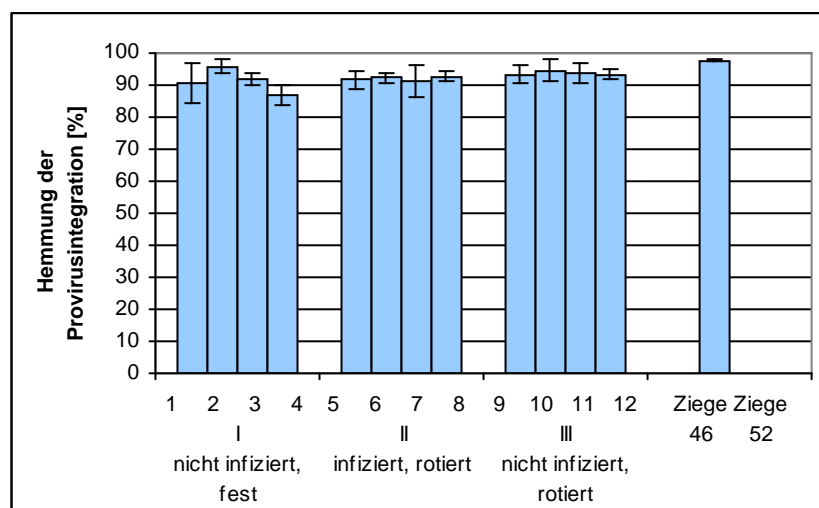


Abb. 3.4: KoRV-Neutralisationsassay Rotationsversuch, Seren 1:10 verdünnt, Positivkontrolle = Ziege 46 (KoRV p15E), Negativkontrolle = Ziege 52 (PERV gp70 Fragmente)

3.1.3 Isolation viraler RNA aus Kot, Urin und Speichel

Da die Übertragung einer retroviralen Infektion ohne direkten Kontakt ungewöhnlich ist, sollten im Folgenden Kot, Urin und Speichel infizierter Ratten analysiert werden, welche sich im „Rotationsversuch“ als potenzielle Agenzien der KoRV-Infektion gezeigt hatten. Zunächst wurden einige Voruntersuchungen durchgeführt, welche die Funktionalität des *High Pure Viral RNA Kits* (s. 2.2.5.2) belegen und die Nachweisgrenze ermitteln sollten. Zellkulturüberstände infizierter und nicht infizierter Zellen wurden gleichermaßen nach Protokoll behandelt, die isolierte RNA wurde mit sequenzspezifischen Primern umgeschrieben und die cDNA in

eine Standard-PCR (s. 2.2.3.2) eingesetzt. In den Abb. 3.5 und Abb. 3.6 ist deutlich zu erkennen, dass sowohl die RNA-Isolation aus infektiösen Zellkulturüberständen als auch die reverse Transkription erfolgreich war und dass virale RNA aus einer Positivkontrolle bis zu einer Verdünnung von 1:10000 nachgewiesen werden kann.

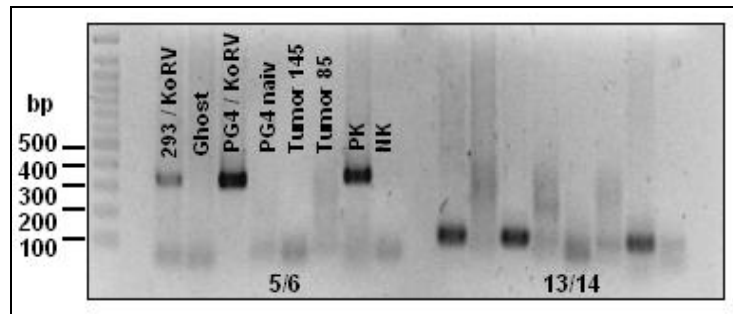


Abb. 3.5: KoRV-*env*- (links) und *pol*-spezifische Two-Step RT-PCR (rechts) zum Nachweis der Funktionalität des Kits, Tumoren 85 und 145 sind aus Ratten des Infektionsversuches (Fiebig *et al.*, 2006) isoliert worden, Positivkontrolle = unverdünnte genomische Koala-DNA, Negativkontrolle = Wasser, 5/6 und 13/14 bezeichnen die verwendeten Primerpaare

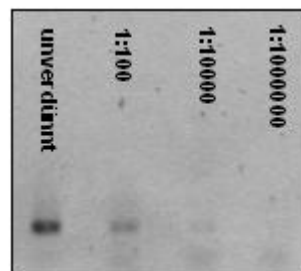


Abb. 3.6: KoRV-*env*-spezifische Two-Step RT-PCR zur Bestimmung der Nachweisgrenze (Verdünnung von 293-KoRV-Überstand in Nuklease-freiem Wasser)

Nach Klärung von Funktionalität und Nachweisgrenze der Methodik wurden Exkremente infizierter Tiere gesammelt. Aus diesen wurde, wie unter 2.2.5.1 und 2.2.5.2 beschrieben, RNA isoliert. Letztere wurde sequenzspezifisch in cDNA umgeschrieben und in eine Standard-PCR eingesetzt. Wie in Abb. 3.7 zu sehen, wird virales Erbgut mit dem Kot ausgeschieden. Da die RT-minus-Kontrolle jedoch positiv war, muss man davon ausgehen, dass dies in Form von Provirus-DNA geschieht, die beispielweise in das Genom von Darmepithelzellen integriert sein könnte.

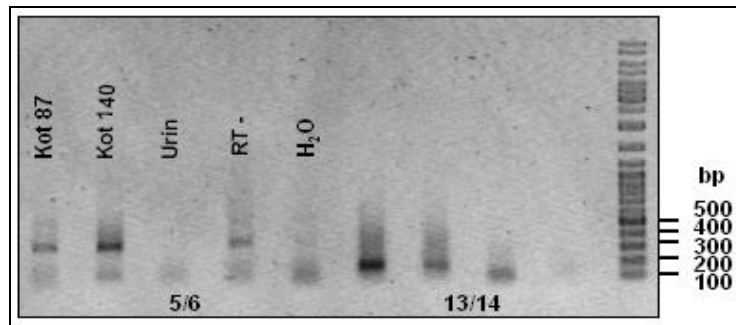


Abb. 3.7: KoRV-*env*- (links) und *pol*-spezifische Two-Step RT-PCR (rechts) nach Isolation viraler RNA aus Kot- und Urinproben von Ratten der Gruppe 87 und 140, die Urinprobe wurde einem Tier der Gruppe 87 entnommen, Negativkontrolle = Wasser, 5/6 und 13/14 stehen für die verwendeten Primerpaare

Im Falle von Urin und Speichel konnte zu keiner Zeit ein KoRV-spezifisches Signal erhalten werden, und auch in anderen Kotproben war kein Virusnachweis möglich. Als weiterer Ansatz wurde die Resuspension von Kot in Zellkulturmedium (D-MEM) gewählt. Die Suspension wurde daraufhin zentrifugiert, der Überstand sterilfiltriert und auf naive 293-Zellen gegeben. Auch diese Vorgehensweise gab jedoch keinen Aufschluss über die Anwesenheit von Viruspartikeln im Kot infizierter Ratten.

3.1.4 Provirusnachweis in Blut und Organen infizierter Ratten

Nachdem der Nachweis freier Viruspartikel nicht gelungen war, stellte sich die Frage, ob in Blut und Organen betroffener Ratten Provirussequenzen nachgewiesen werden können. Aus Ratten-PBMCs sowie Herz, Leber, Lunge, Ovar, Niere, Milz und zum Teil auch Gehirn wurde deshalb, wie unter 2.2.3.13 geschildert, genomische DNA isoliert und diese in eine PCR eingesetzt. Die Abb. 3.8 und Abb. 3.9 zeigen deutlich, dass ein konstanter Provirusnachweis im Blut infizierter Tiere (Rotationsversuch) nicht möglich ist. Zu erwähnen ist dabei, dass die Proben im Abstand von etwa zwei Monaten entnommen und analysiert worden sind.

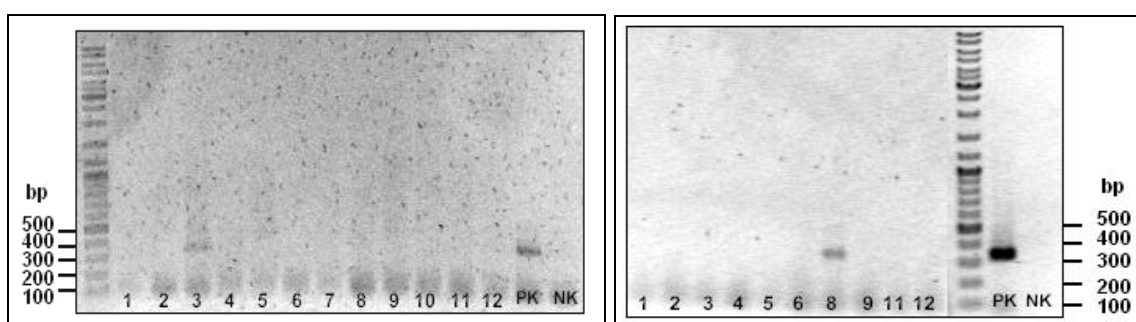


Abb. 3.8, Abb. 3.9: KoRV-*env*-spezifische PCR auf genomischer DNA aus PBMCs, 1-12 bezeichnen die Tiere des Rotationsversuches, links: Abnahme vom 28.11.06, rechts: Abnahme vom 01.02.07; Positivkontrolle = unv. genom. Koala-DNA, Negativkontrolle = Wasser

In früheren Experimenten hatte sich gezeigt, dass KoRV nach Stimulation mit Phytohämagglutinin (PHA) in infizierten PBMCs exprimiert wird und durch Infektion naiver 293-Zellen nachgewiesen werden kann (Fiebig *et al.*, 2006). Aus diesem Grund wurde eine Kokultivie-

rung von PBMCs und naiven 293-Zellen in Anwesenheit von PHA angesetzt, wobei jedoch kein infektiöses Virus isoliert werden konnte. Das Koala-Retrovirus konnte demnach im Blut infizierter Ratten nur selten in Provirusform und nie in Form von Partikeln gezeigt werden. Auch der Provirusnachweis in Organen infizierter Tiere war inkonstant. Wie die Gruppennummern zeigen, handelte es sich bei den untersuchten Tieren um Ratten gleichen Alters. Während jedoch fast alle Organe der Ratte 86/3 ein positives KoRV-Signal zeigten, waren die Organe der Tiere 87/4 und 88/4 negativ. In allen Fällen war zudem, wie schon zuvor für die Tiere des Rotationsversuches gezeigt, kein Provirus im Blut zu finden (Abb. 3.10, Abb. 3.11).

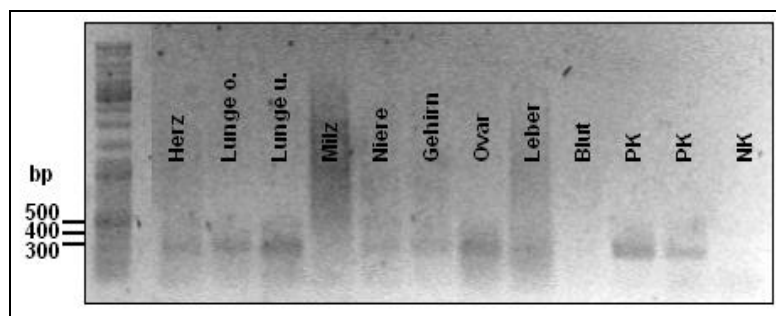


Abb. 3.10: KoRV-*env*-spezifische PCR auf genomischer DNA aus Organen der Ratte 86/3, Positivkontrolle = unv. genom. Koala-DNA, Negativkontrolle = Wasser

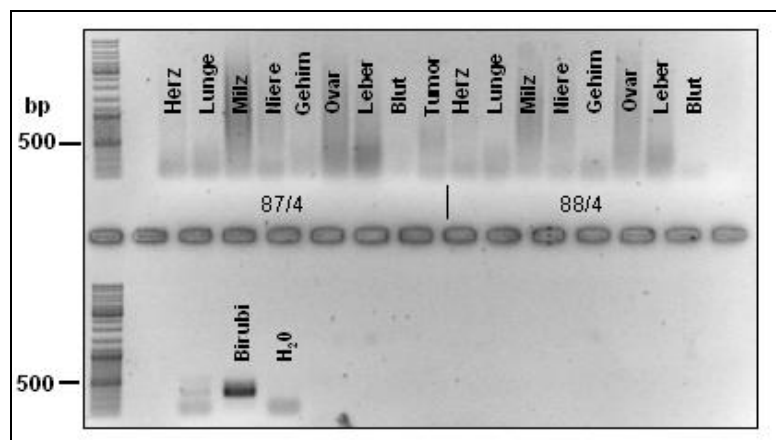


Abb. 3.11: KoRV-*env*-spezifische PCR auf genomischer DNA aus Organen der Ratten 87/4 (links oben) und 88/4 (rechts oben), Positivkontrolle = unv. genom. DNA des Koalas Birubi, Negativkontrolle = Wasser

Da der Provirusnachweis unsicher war, sollte zur Absicherung der Ergebnisse sowie zur besseren Einschätzung der eingesetzten DNA-Mengen eine KoRV-GAPDH-Duplex-PCR auf genomischer Ratten-DNA etabliert werden. Dazu wurden Ratten-GAPDH-spezifische Primer sowie eine Verdünnungsreihe KoRV-infizierter rat1-Zellen (Zelllysat) hergestellt. Während beide Einzelsignale (HEX und FAM bzw. GAPDH und KoRV *env*) mit hoher Linearität aufgenommen werden konnten, kam es zur Unterdrückung der KoRV-Reaktion, sobald beide PCRs in einem Ansatz stattfinden sollten (Abb. 3.12, Abb. 3.13; man beachte die unterschiedliche Skalierung der Ordinate). Zusammenfassend kann man also sagen, dass die E-

tablierung einer Duplex-PCR zwar nicht möglich war, die bestehende (humane) GAPDH-PCR jedoch erfolgreich an die Rattensequenzen adaptiert werden konnte. Bei Bedarf wurde die GAPDH-PCR im Anschluss an die KoRV-*env*-spezifische PCR durchgeführt.

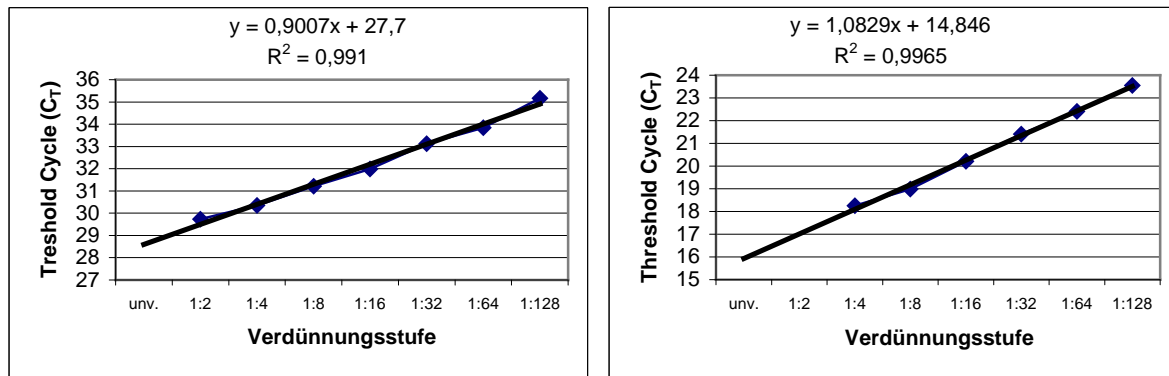


Abb. 3.12, Abb. 3.13: Real-time PCR auf Zelllysate KoRV-infizierter rat1-Zellen, links: KoRV-*env*-spezifische PCR, rechts: GAPDH-spezifische PCR

Die Real-time PCR auf DNA aus den Rotationsratten sowie den Ratten 86/3, 87/4 und 88/4 hatte das gleiche Ergebnis, wie die Standard-PCR (Abb. 3.8 - Abb. 3.11). Nur die PBMCs der Ratte 8 sowie die Organe der Ratte 86/3 (Niere, Lunge, Ovar) waren positiv, wobei die Banden nach Gelextraktion und Sequenzierung eindeutig als KoRV *env* identifiziert werden konnten. Generell ist zu sagen, dass der Provirusnachweis nur in solchen Tieren gelang, die bereits sehr lange, also seit etwa zwei Jahren, mit dem Koala-Retrovirus infiziert waren. Das positive Ergebnis der Ratte 3 konnte in der Real-time PCR nicht reproduziert werden.

3.1.5 Charakterisierung / Optimierung bestehender Real-time PCR- Systeme

Um die Quantifizierung der Provirusintegration zu verbessern, wurden verschiedene Real-time-PCR-Systeme (Fiebig *et al.*, nicht veröffentlicht; Tarlinton *et al.*, 2006) charakterisiert und optimiert. Dabei wurden verschiedene Annealing-Temperaturen und Reaktionsgemische, speziell unterschiedliche MgCl₂-Konzentrationen, ausprobiert. Die PCRs wurden jeweils auf Verdünnungsreihen genomischer Koala-DNA (Coolongalook, s. 3.4) durchgeführt, wobei zunächst die Ausgangskonzentration photometrisch bestimmt und anschließend 1:2 Verdünnungen angesetzt wurden. Trotz unterschiedlicher Fragmentlängen (330 bp (Fiebig *et al.*) vs. 110 bp (Tarlinton *et al.*, 2006)) lagen die Effizienzen der beiden PCRs dicht beieinander, nämlich bei 79.8% für das Primerpaar p5/p6 (Ko-5-fw / Ko-6-rev) und bei 76.5% für das Primerpaar p13/p14 (KoRV T for / KoRV T rev) (Abb. 3.14). Bei Einsatz größerer MgCl₂-Mengen stieg zwar die Effizienz beider PCRs durch Stabilisierung der Sondenbindung, unspezifische Signale nahmen jedoch zu.

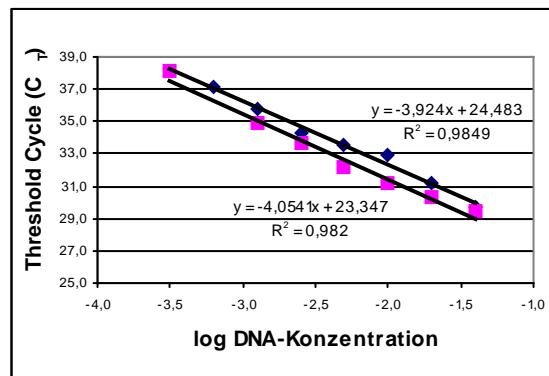


Abb. 3.14: Vergleich zweier Real-time-PCRs, blaue Vierecke: KoRV-*env*-spezifische PCR (Fiebig *et al.*, nicht veröffentlicht), rosa Vierecke: KoRV-*pol*-spezifische PCR (Tarlinton *et al.*, 2006)

Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen sowie der zellassoziierten Viruslast wurde ein Standardplasmid kloniert und durch die Restriktionsendonuclease PstI linearisiert (pCal-n mit KoRV-rp15E). Anschließend wurde die DNA-Konzentration photometrisch, die Kopienzahl dagegen rechnerisch bestimmt und eine Verdünnungsreihe in Zweierschritten hergestellt, die einen Bereich von 50000 bis 0.01 Kopien pro Ansatz umfasste. Diese wurde wiederum in die KoRV-*env*-spezifische Real-time-PCR eingesetzt (Abb. 3.15). Unter Zuhilfenahme der unter 2.2.3.3 aufgeführten Formel konnte für die Reaktion eine Effizienz von 82.3% ermittelt werden, was sehr gut mit der oben berechneten Effizienz von 79.8% übereinstimmt. Die Nachweisgrenze konnte auf 195 Kopien pro Ansatz festgelegt werden.

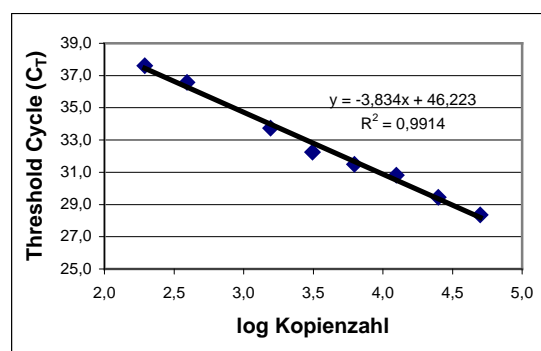


Abb. 3.15: Standardverdünnungsreihe des linearisierten rp15E-tragenden pCal-n-Vektors

3.2 Wirtsspektrumanalyse *in vitro*

Bisher war bekannt, dass KoRV humane Nierenzellen (HEK 293) und T-Lymphozyten (CEM, C8166) sowie Rattenfibroblasten (rat1) *in vitro* infizieren kann (Fiebig *et al.*, 2006). Um das Wirtsspektrum *in vitro* zu erweitern und so potenzielle Intermediärwirte für die Übertragung des Virus zu identifizieren, wurden verschiedene Zelllinien mit KoRV-haltigen Zellkulturüberständen inkubiert. Um eine produktive Infektion aufzuzeigen, wurden wiederum die Überstände der jeweiligen Zellen sterilfiltriert und auf naive 293-Zellen gegeben. Nach etwa drei Wochen wurden aus allen Zellen Zelllysate hergestellt und letztere in eine KoRV-*env*-spezifische PCR eingesetzt. Zusätzlich zu den oben genannten, auch Rhesusaffen-, Nerz-,

Katzen-, Schweine- und Drosophilazelllinien sowie Ratten- und humane PBMCs *in vitro* infiziert werden, wobei die Mehrheit sogar infektiöse Viruspartikel produziert. Hamster-, Moskitto-, Maus- und Schimpansenzelllinien sowie Pavian-PBMCs können dagegen nicht infiziert werden (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Wirtsspektrumanalyse *in vitro*

Zelltyp	Infektion	produktive Infektion
CHO (Hamster)	-	-
C6/36 (Moskito)	-	-
3T6 (Maus)	-	-
EB176 (Schimpanse)	-	-
EB176/5°	-	-
GHOST (Mensch)	+	+
LLCMK2 (Rhesusaffe)	+	+
Mv1LuMINK (Nerz)	+	+
Pavian-PBMCs	-	-
PG4 (Katze)	+	+
PK15 (Schwein)	+	-
primäre humane PBMCs	+	nicht getestet
primäre Ratten-PBMCs	+	nicht getestet
S2 (Drosophila)	+	+

Da sich gezeigt hatte, dass porcine Nierenzellen, welche naturgemäß mit PERV infiziert, auch mit KoRV infizierbar sind, sollte im Folgenden untersucht werden, ob umgekehrt auch KoRV-infizierte Zellen mit PERV infiziert werden können. Ziel des Versuches war es, herauszufinden, ob Rezeptorinterferenzmechanismen bei der Koinfektion eine Rolle spielen. Aus diesem Grund wurden KoRV- beziehungsweise PERV-A/C-infizierte 293-Zellen mit dem jeweils anderen Virus inkubiert und nach etwa einer Woche mittels Lyse-PCR ermittelt, ob eine Infektion stattgefunden hat. Diese Vorgehensweise wurde auch für naive 293-Zellen gewählt, um die Infektiosität des Virus sicherzustellen. Es zeigte sich, dass KoRV-infizierte Zellen mit PERV infiziert werden können und umgekehrt (Abb. 3.16, Abb. 3.17).

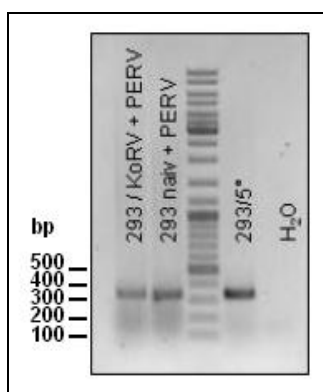


Abb. 3.16: PERV-*env*-spezifische PCR auf Zelllysaten zur Untersuchung möglicher Rezeptorinterferenzmechanismen bei Koinfektion mit KoRV und PERV, Positivkontrolle = 293/5°, Negativkontrolle= Wasser

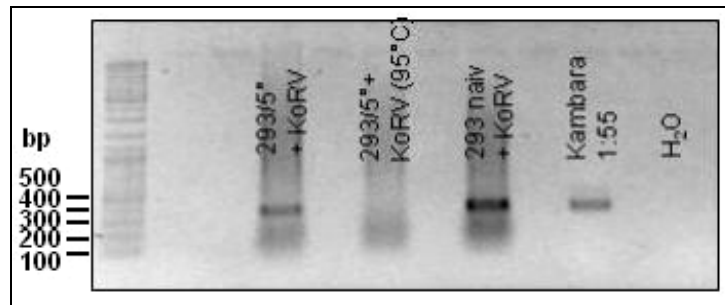


Abb. 3.17: KoRV-*env*-spezifische PCR auf Zelllysaten zur Untersuchung möglicher Rezeptorinterferenzmechanismen bei Koinfektion mit KoRV und PERV, Positivkontrolle = verdünnte genom. DNA des Koalas Kambara, Negativkontrolle = Wasser sowie hitzeinaktiviertes Virus (KoRV (95°C))

Im Anschluss wurde geprüft, ob nach gelungener Koinfektion rekombinante Viren gebildet werden bzw. Koverpackung der unterschiedlichen viralen Genome stattfindet. Zu diesem Zweck wurden die Überstände sterilfiltriert und auf naive rat1-Zellen gegeben, welche dafür bekannt sind, nicht mit PERV infizierbar zu sein. Die entsprechenden Zelllysate wurden daraufhin unabhängig voneinander in KoRV- und PERV-spezifische PCRs eingesetzt (Abb. 3.18). Es wird deutlich, dass die rat1-Zellen ausschließlich mit KoRV infiziert werden, sich also offensichtlich kein *Co-Packaging* und keine Rekombination ereignet. Neben der PERV-*env*-spezifischen PCR wurde zur Absicherung eine PERV-*pol*-spezifische PCR durchgeführt, die das gleiche Ergebnis zeigte.

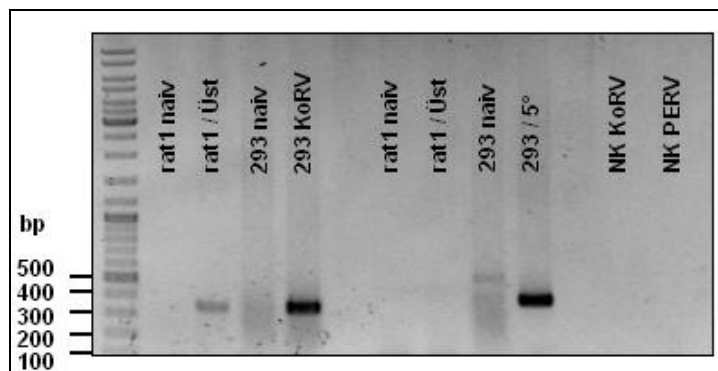


Abb. 3.18: KoRV- (links) und PERV-*env*-spezifische PCR (rechts) auf rat1-Zelllysaten, Positivkontrollen = 293 KoRV bzw. 293/5°, Negativkontrolle = Wasser sowie naive 293- und rat1-Zellen

3.3 Einfluss des Komplementsystems auf eine KoRV-Infektion

Fujita *et al.*, 2002 und Quinn *et al.*, 2004 konnten nachweisen, dass das humane Komplementsystem in der Lage ist, PERV zu inaktivieren. Als Auslöser der klassischen Komplementaktivierungskaskade gelten dabei die im Serum enthaltenen Gal α 1-3Gal-Antikörper. Es stellte sich deshalb die Frage, ob das Komplementsystem auch eine KoRV-Infektion verhindern kann. Aus diesem Grund wurden humane und Ratten-PBMCs jeweils als Duplikate mit verschiedenen Überständen inkubiert: Ein Ansatz enthielt 10% fetales Kälberserum (FKS) und intaktes Virus (Positivkontrolle), ein anderer 33% autologes unbehandeltes Serum sowie intaktes Virus, ein weiterer 33% autologes dekomplementiertes Serum und intaktes Virus

und ein letzter 10% FKS sowie hitzeinaktiviertes Virus (Negativkontrolle). Nach einer Woche wurde der Versuch ausgewertet, wobei sich herausstellte, dass dekomplementiertes im Vergleich zu unbehandeltem Serum nicht in der Lage ist, KoRV zu inaktivieren. Das Serum mit intaktem Komplementsystem dagegen kann den Zelleintritt im Falle von Ratten-PBMCs vollständig, im humanen System nur teilweise inhibieren (Abb. 3.19). Dabei ist von Bedeutung, dass das verwendete Virus aus 293-Zellen isoliert wurde und damit keine Gal α 1-3Gal-Epitope auf der Oberfläche trug.

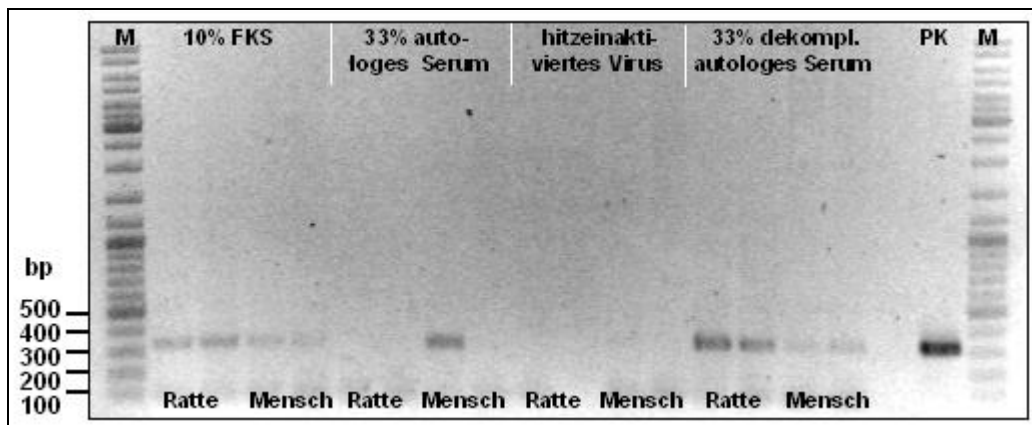


Abb. 3.19: KoRV-*env*-spezifische PCR auf Zelllysaten zur Untersuchung der Komplementbeteiligung an der KoRV-Inaktivierung, Positivkontrolle = unv. genom. Koala-DNA

3.4 Proviruslast in Koalas einer Zuchtkolonie

Ziel dieses Versuches war die Ermittlung der Proviruslast in PBMCs aus Koalas einer gemeinsamen Zuchtkolonie in San Diego, Kalifornien. Dabei wurden die Blutproben größtenteils aus dem Zoo Duisburg, aber auch aus dem Antwerpener Zoo bezogen (Abb. 3.20).

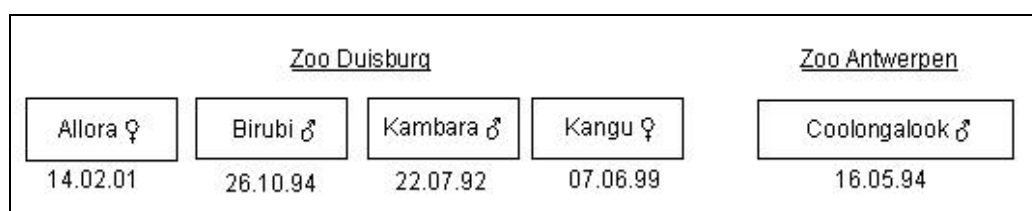


Abb. 3.20: Alter, Geschlecht und Aufenthaltsort der untersuchten Individuen, unter den Tieren sind jeweils die Daten der Geburt aufgeführt

Die aus antikoaguliertem Blut isolierten DNA-Proben wurden zunächst auf eine einheitliche Konzentration von 0.5 ng/ μ l eingestellt und anschließend 1 μ l in eine Real-time-PCR eingesetzt. Letztere wurde mit den unter 3.1.5 benannten Primerpaaren durchgeführt, um eine Tendenz unter den Tieren aufzuzeigen. Da jedoch ausschließlich für das Primerpaar p5/p6 eine Standardverdünnungsreihe zur Verfügung stand, konnte nur diese für die Berechnung der Kopienzahl genutzt werden. Dabei wurde wie folgt vorgegangen: In der Annahme, dass pro Genom 3×10^9 Basenpaare vorliegen und ein Basenpaar ein Molekulargewicht von 660

g/mol aufweist, wurde zunächst das Gewicht des Genoms mit 3.29×10^{-12} g ermittelt, woraus folgte, dass die eingesetzten 0.5 ng 152 Genomen entsprachen. Der für die jeweilige Probe ermittelte C_T -Wert wurde mit dem C_T -Wert der Standardverdünnungsreihe verglichen und die entsprechende Kopienzahl durch 152 dividiert. Für Allora konnte die Zahl der Proviren auf 140 pro Genom festgelegt werden, für Birubi auf 370, für Coolongalook auf 125, für Kambara auf 230 und für Kangu auf 45 (Abb. 3.21).

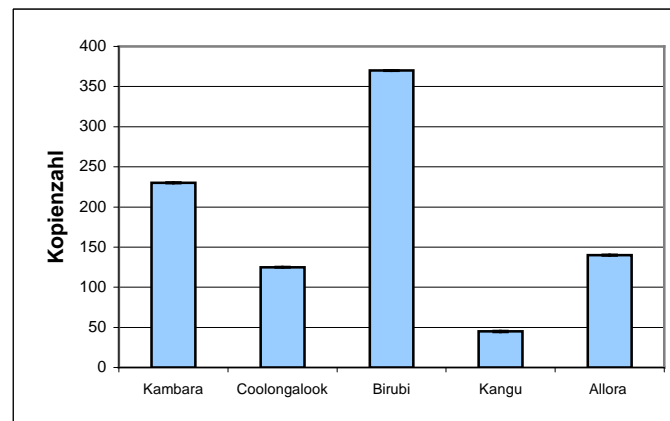


Abb. 3.21: Anzahl der KoRV-Kopien pro Zelle, die Tiere sind nach ihrem Alter sortiert

Um die Korrelation zwischen Alter und Proviruslast der untersuchten Tiere zu prüfen, wurden der Korrelationskoeffizient r nach Pearson sowie, wegen der geringen Stichprobengröße, der Rangkorrelationskoeffizient R nach Spearman und Kendalls Tau berechnet. Im ersten Fall erhält man eine Korrelation von $r = 0.428$. Die Signifikanzprüfung mittels t-Test (Bortz, 1989) ergibt $t = 0.82 < t_{(5\%, 3 \text{ FG})} = 2.35$ und somit keinen signifikanten Zusammenhang zwischen beiden Variablen. Auch für die Rangkorrelationskoeffizienten bestätigt sich dieses Ergebnis: $R = 0.3$; für einen Stichprobenumfang von 5 hätte R mindestens 0.9 betragen müssen, um signifikant zu sein; $\tau = 0.20$; für Signifikanz wäre ein Wert von > 0.70 erforderlich gewesen (Krause und Metzler, 1988). Eine Altersabhängigkeit der Proviruslast ist also nicht zu erkennen.

3.5 Verringerung der Virusreplikation *in vitro*

In der Zellkultur hatte sich bei Titrationsversuchen gezeigt, dass KoRV-infizierte 293 Zellen nach etwa einem Monat die Virusreplikation stark verringern, genauer die TCID₅₀/ml von 1140 auf 113 infektiöse Partikel abfiel. Ziel der nachfolgenden Experimente war deshalb die Erforschung der Ursache dieses plötzlichen Abfalls.

3.5.1 Inkubation mit 5-Aza-2'-desoxycytidin und 5-Brom-2'-desoxyuridin

Da zunächst vermutet wurde, dass die Verringerung der Virusreplikation mit einer durch DNA-Methylierung und / oder Histon-Deacetylierung verursachten Verringerung der

Transkription zusammenhängen könnte, wurden die betroffenen 293-Zellen drei Tage lang mit den Basenanaloga 5-Aza-2'-desoxycytidin (Aza; 5 μ M, 10 μ M) zwecks DNA-Demethylierung sowie 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU; 5 μ M) zwecks Histon H3-Acetylierung inkubiert. Anschließend wurde die TCID₅₀/ml des Überstandes durch Titration ermittelt. Es zeigte sich, dass die Behandlung der Zellen mit Aza und BrdU nur eine unwesentliche Erhöhung der Virusreplikation zur Folge hatte und sämtliche TCID₅₀s weit unter dem Ausgangswert von 1140 blieben (Abb. 3.22). Damit liegt die Vermutung nahe, dass weder eine DNA-Methylierung noch eine Histon-Deacetylierung als eindeutige Ursache für die Verringerung der Virusreplikation in Frage kommen. Dennoch muss festgestellt werden, dass 5 μ M BrdU im Vergleich zu 5 μ M Aza eine noch geringere Wirkung auf die Virusreplikation haben.

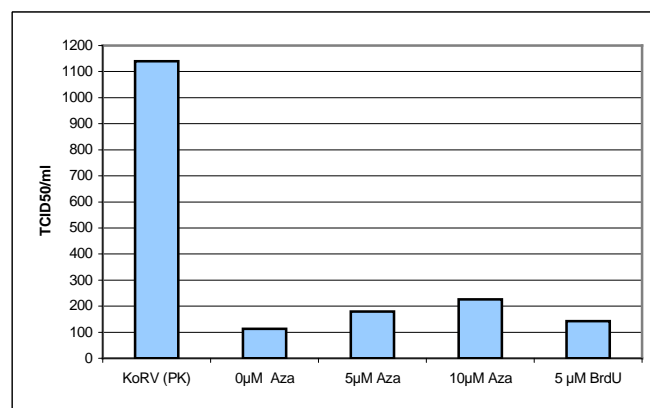


Abb. 3.22: Bestimmung der TCID₅₀/ml von Zellkulturüberständen nach Titration auf 293-Zellen, Negativkontrolle = 0 μ M Aza; Positivkontrolle = Virus nach einer Woche Kultivierung

3.5.2 Sequenzierung des KoRV-env

Bei der Sequenzierung des KoRV-env nach etwa vier Wochen in Kultur hatte sich beim Vergleich mit der von Hanger *et al.*, 2000 veröffentlichten Sequenz eine Mutation im Bereich der Schnittstelle zwischen SU und TM gezeigt. Während an der besagten Stelle in der Hanger-Sequenz ein Serin vorkommt, ist dieses in der aktuellen Sequenzierung durch ein Prolin ersetzt. Bei Prolin handelt es sich um eine zyklische Iminosäure, der, anders als dem Serin, nach Bildung der Peptidbindung, kein H-Atom für eine Wasserstoffbrücke zur Verfügung steht. Zudem sind für die Peptidbindung cis- und trans-Konformation möglich. Deshalb wurde vermutet, dass die Prozessierung des Vorläuferproteins auf Grund sterischer Veränderungen nicht stattfindet und die Viruspartikel folglich nicht mit den korrekten Oberflächenproteinen ausgestattet werden. Beim Vergleich mit der Sequenz von Fiebig *et al.*, 2006, die auf der DNA eines schnell replizierenden Virus angefertigt wurde, zeigte sich allerdings, dass das Prolin vor der Schnittstelle keinen Einfluss auf die Prozessierung und Virusreplikation haben kann (Abb. 3.23).

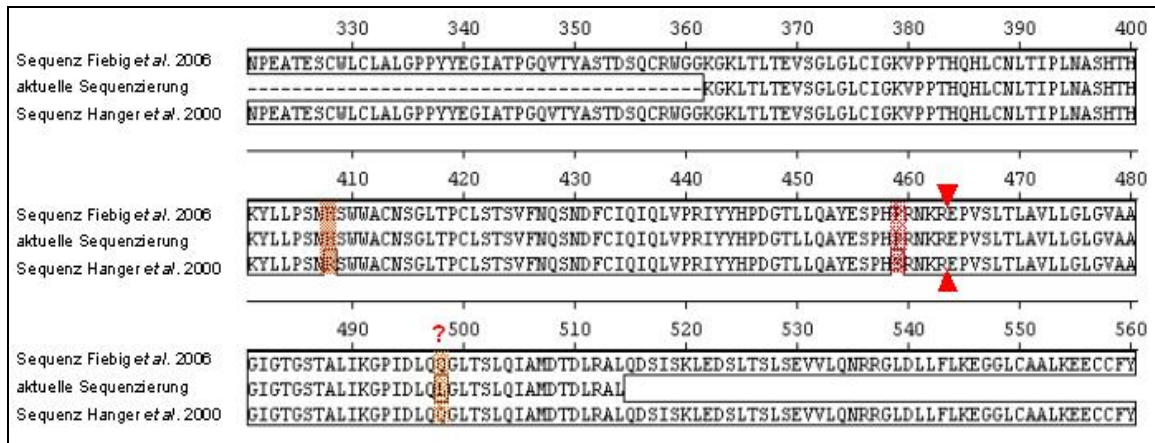


Abb. 3.23: Vergleich von KoRV-env-Sequenzen, rote Pfeile markieren die Schnittstelle der zellulären Protease zwischen SU und TM, an Position 459 befindet sich der Austausch Serin-Prolin

3.6 Etablierung eines KoRV p27Gag Capture ELISAs

Sowohl im Western Blot (Abb. 3.24) als auch im ELISA (Abb. 3.25) hatte sich gezeigt, dass während einer KoRV-Infektion im Vergleich zu p15E nur geringe Immunantworten gegen gp70 entwickelt werden.

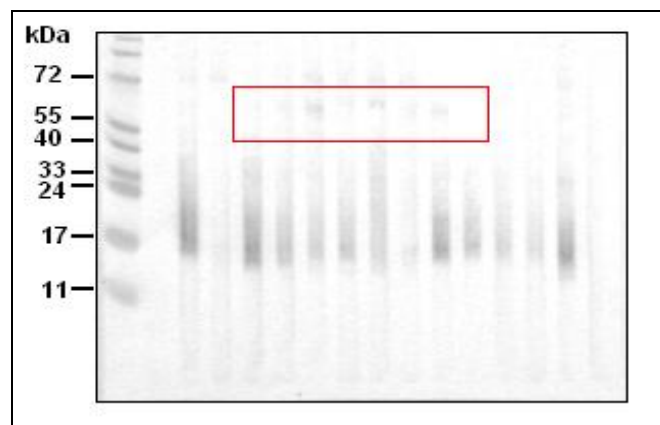


Abb. 3.24: Western Blot Rotationsversuch, der rote Rahmen markiert die geringe Immunantwort KoRV-infizierter Rotationsratten gegen rgp70, 7.5 µg KoRV rp15E sowie 10 µg KoRV rgp70 aufgetragen, Seren 1:250 verdünnt

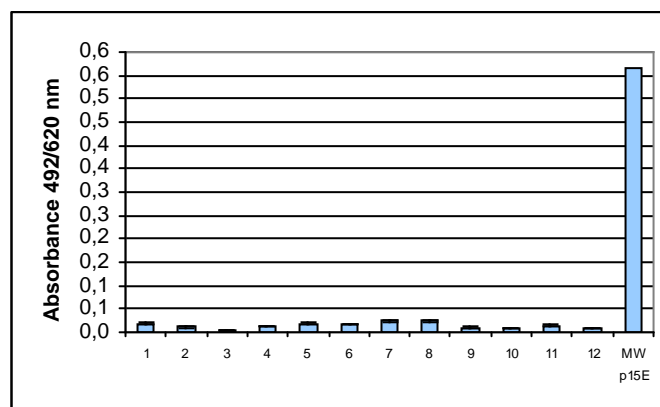


Abb. 3.25: ELISA Rotationsversuch zum Vergleich von Immunantworten gegen gp70 und p15E in KoRV-infizierten Rotationsratten, Seren 1:250 verdünnt, 150 ng KoRV rgp70 gecoated

Bei der Diagnose retrovirologischer Infektionen ist es jedoch üblich, ein Ergebnis abzusi-
chern, also wenigstens zwei Antigene beziehungsweise Reaktionen des Immunsystems ge-
gen diese nachzuweisen. Um die immunologischen Nachweissysteme zu vervollständigen
und um eine Bestimmung der Viruslast in Seren zu ermöglichen, wurde mit der Etablierung
eines Gag *Capture* ELISAs begonnen.

3.6.1 Vorbereitungen

Beim *Capture* ELISA werden die gegen das Antigen gerichteten Primärantikörper entweder
aus zwei verschiedenen Spezies gewonnen oder aus einer Spezies, wobei einer der beiden
Antikörper direkt POD-gekoppelt sein muss (s. 2.2.7.6). Da bereits ein Ziegen-
Immunisierungsserum gegen KoRV p27Gag vorhanden war, auf die Platten allerdings ein
monoklonaler (oder wenigstens aufgereinigter) Antikörper gecoated werden sollte, musste
vor Beginn der Experimente zunächst untersucht werden, ob die verfügbaren Antikörper ge-
gen Gag möglicherweise Kreuzreaktivität zeigen. Für die monoklonalen Antikörper gegen
FeLV p27Gag von Serotec und Biodesign (s. 2.1.8) konnte keine Reaktion nachgewiesen
werden. Die mitgetesteten polyklonalen anti-FeLV p27Gag Antikörper von Biodesign und das
aus einer Ziege gewonnene gegen PERV p27Gag gerichtete Immunisierungsserum erkann-
ten zwar das Antigen, waren auf Grund der Diversität der enthaltenen Antikörperpopulatio-
nen zum *Coaten* aber ebenso wenig geeignet, wie das anti-KoRV p27Gag-Serum.

Deshalb wurden KoRV-p27Gag-Fragmente (Fragment 1: 311 bp, Fragment 2: 323 bp) mit
BamHI und EcoRI in pCal-n kloniert und exprimiert. Im Anschluss sollte eine Kopplung der-
selben an Sepharose sowie die affinitätschromatographische Aufreinigung des anti-KoRV
p27Gag-Serums stattfinden. Es war außerdem geplant, die Antikörper des Serums in zwei
Gruppen zu unterteilen, wovon eine Gruppe POD-gekoppelt werden sollte.

3.6.2 Expression und Aufreinigung der rekombinanten p27Gag-Fragmente

Nachdem die Klonierung der beiden p27Gag-Fragmente erfolgreich abgeschlossen war,
folgte die Expression der rekombinanten Proteine in *E. coli* BL21. Der Nachweis der Überex-
pression gelang mittels SDS-PAGE (Abb. 3.26) und Western Blot (Abb. 3.27), wobei jedoch
auch deutlich wurde, dass die beiden Fragmente unlöslich waren (s. Überstände).

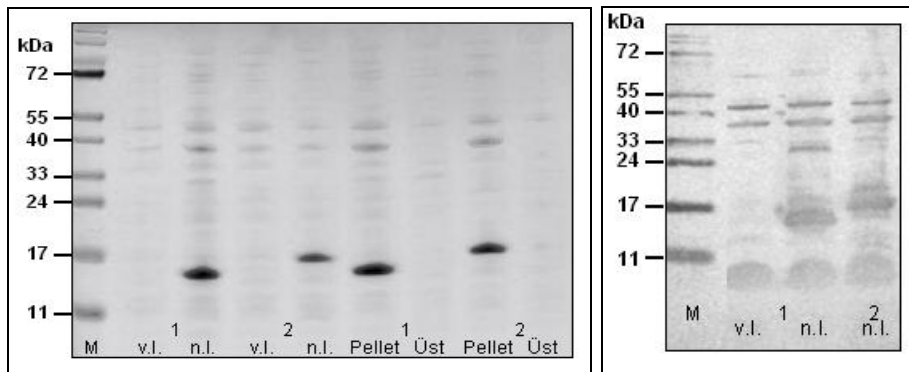


Abb. 3.26: SDS-PAGE der überexprimierten Gag-Fragmente, Coomassie-Färbung

Abb. 3.27: Western Blot der überexprimierten Gag-Fragmente, Serum Ziege 33 (KoRV p27 Gag)

1:500 verdünnt, DAB-Entwicklung; beide Abbildungen dienen der Kontrolle der korrekten Gag-Fragment-Überexpression, v.l. und n.l. stehen für vor bzw. nach Induktion, 1 und 2 bezeichnen die verschiedenen Fragmente, Üst steht für Überstand nach Sonifikation

Da eine Kopplung an aktivierte Sepharose nun nicht mehr möglich war, wurde die ursprüngliche Strategie im Folgenden derart verändert, dass die rekombinanten Proteine mit 0.3% SDS aus dem Bakterienpellet ausgewaschen, mit Methanol / Aceton gefällt und in Ratten appliziert wurden.

3.6.3 Aufreinigung von p27Gag-Antikörpern aus Ziegen- und Rattenserum

Um die vorhandenen Immunisierungsseren in einen *Capture* ELISA einsetzen beziehungsweise an eine Peroxidase koppeln zu können, musste zunächst eine Aufreinigung der p27Gag-Antikörper stattfinden. Da eine Affinitätschromatographie über Sepharose nicht in Frage kam, wurden die Gag-Fragment-haltigen Bakterienpellets auf Polyacrylamidgele aufgetragen, die Proteine auf Nylonmembranen transferiert, die entsprechenden Banden mit dem Skalpell ausgeschnitten und die Blotschnipsel mit den p27Gag-Immunisierungsseren aus Ziege (s. 3.6.1) und Ratte (s. 3.6.2) inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden mit Hilfe eines niedrigen pH-Wertes eluiert und der Erfolg der Elution wiederum durch einen Western Blot überprüft. Trotz des Ausschneidens der Gag-Fragment-Bande wurden auch Antikörper gegen bakterielle Proteine aus dem Serum isoliert (Nebenbanden, Abb. 3.28). Dennoch kann man davon ausgehen, dass zumindest eine Aufreinigung des Serums erreicht wurde. Da sich das gleiche Bild für die Rattenserum bot, ist nur der Ziegen-Kontrollblot dargestellt.

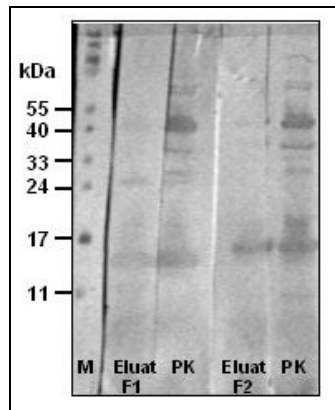


Abb. 3.28: Western Blot zur Kontrolle der Antikörperaufreinigung, die Proteine von Interesse laufen in etwa auf Höhe der 17 kDa-Bande, Eluate 1:100 verdünnt, Positivkontrolle = Ziege 33 (KoRV p27 Gag) 1:500 verdünnt, F1 und F2 stehen für die Fragmente, DAB-Entwicklung

3.6.4 Test des Systems

Die eluierten Antikörper wurden im Folgenden auf ELISA-Platten gecoated, als Antigenhaltige Probe wurde 293 / KoRV-Zelllysate eingesetzt. Als Kontrollen wurden Zelllysate naiver 293-Zellen, PBS und FKS mitgeführt, das Eluat der jeweils anderen Spezies wurde als zweiter Primärantikörper verwendet. In allen Fällen und für jedwede Kombination fiel das Signal gleichermaßen positiv aus, es waren also keine Unterschiede zwischen Positiv- und Negativkontrollen festzustellen. Da jedoch die Sekundärantikörperkontrolle kein solches Signal lieferte, muss davon ausgegangen werden, dass der zweite Primärantikörper gecoatede Serumbestandteile und nicht spezifisch das Antigen erkannt hat.

3.7 Immunisierungsstudie

3.7.1 Vorbereitungen

In früheren Experimenten hatten sich mit rekombinantem p15E neutralisierende Antikörper gegen Gammaretroviren induzieren lassen (Fiebig *et al.*, 2003; Langhammer *et al.*, 2005). Dabei und auch bei Experimenten mit den HIV-neutralisierenden Antikörpern 2F5 und 4E10 hatte sich herausgestellt, dass ein Konformationsepitop an der Induktion neutralisierender Antikörper beteiligt ist. Von Lorizate *et al.*, 2006 und Hager-Braun *et al.*, 2006 waren Interaktionen zwischen Fusionspeptid und membrannahen Sequenzen postuliert worden, während Fiebig *et al.*, 2005 eine Interaktion membranproximaler Sequenzen mit einem Bereich kurz vor der N-terminalen Helix beschrieben.

In Anlehnung an Versuche mit FeLV und PERV (s.o.) konnten neutralisierende AK gegen KoRV induziert werden, deren Wirkung jedoch nur bei einer Serumverdünnung von 1:8 nachzuweisen war (Fiebig *et al.*, 2006). Es stellte sich im Folgenden also die Frage, ob eine N-terminale Verlängerung des rekombinanten KoRV p15Es stärkere Immunantworten hervorrufen kann. Aus diesem Grund wurden Vorwärtsprimer entworfen, die zu einer Verlängerung des Ausgangskonstruktes um sechs beziehungsweise sieben Aminosäuren führten. Die

Konstrukte wurden daraufhin über BamHI und EcoRI in den Expressionsvektor pCal-n kloniert und in *E. coli* BL21 transformiert. In Abb. 3.29 sind die verschiedenen Proteine schematisch dargestellt.

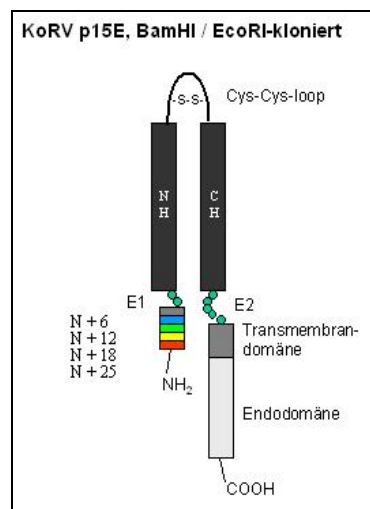


Abb. 3.29: Schematische Darstellung der rekombinanten KoRV p15E-Konstrukte

3.7.2 Expression und Aufreinigung der rekombinanten p15E-Konstrukte

Nachdem die rekombinanten Konstrukte durch Sequenzierung überprüft worden waren, erfolgte die Expression in *E. coli* BL21. Vorinduktions- und Nachinduktionskontrolle sowie Pellet und Überstand nach Sonifizierung wurden auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen, wodurch sich zeigte, dass die Expression zwar erfolgreich gewesen war, die Löslichkeit der Proteine jedoch mit zunehmender Länge abnahm (s. Überstände, Abb. 3.30 links). Die vier Proteine p15E ohne Extension, p15E N+6, N+12 und N+18 wurden im Anschluss affinitätschromatographisch über Calmodulin-Sepharose aufgereinigt, das N+25 haltige Pellet dagegen nur ausgewaschen. Reinheit und Ausbeute der Proteine wurden mittels SDS-PAGE charakterisiert und mit einem Lysozymstandard von 6-1 µg verglichen (Abb. 3.30 rechts). Die Proteinmengen betragen durchschnittlich 300 µg/ml.

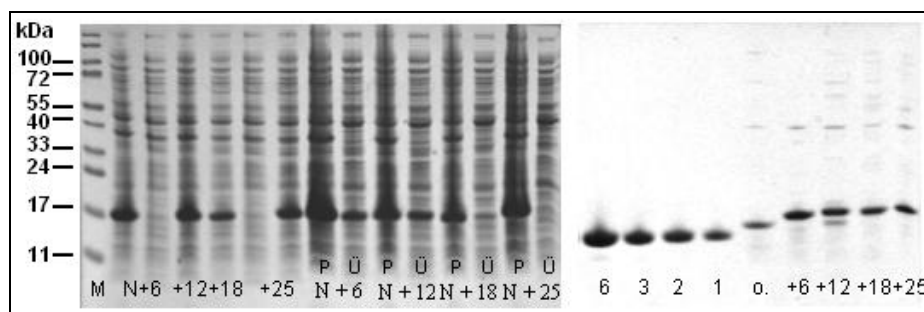


Abb. 3.30: SDS-PAGE nach Expression (links) bzw. vor Immunisierung (rechts), Kontrolle von Überexpression, Löslichkeit und Reinheit der fünf N-terminal verlängerten Konstrukte; P = Pellet, Ü = Überstand nach Sonifikation, +6 bis +25 stehen für die Anzahl der angehängten Aminosäuren, 6-1 bezeichnen die Konzentrationen des Lysozymstandards in µg, 0 = p15E ohne Extension, Coomassie-Färbung

3.7.3 Untersuchung der Antikörperantwort in Western Blot und Neutralisationssassay

Die rekombinanten Proteine wurden daraufhin in Ratten appliziert (s. 2.2.7.1) und die Immunisierungsseren in Western Blot und Neutralisationsassay auf ihre Reaktivität hin untersucht. Der Versuch wurde zur Absicherung der Resultate parallel an zwei verschiedenen Standorten durchgeführt: am RKI sowie am BfR. Für alle Tiere der unterschiedlichen Gruppen konnten p15E-Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 3.31, Abb. 3.32). Dieses Bild zeigte sich in beiden Fällen, so dass nur die Blots der RKI-Studie dargestellt sind.

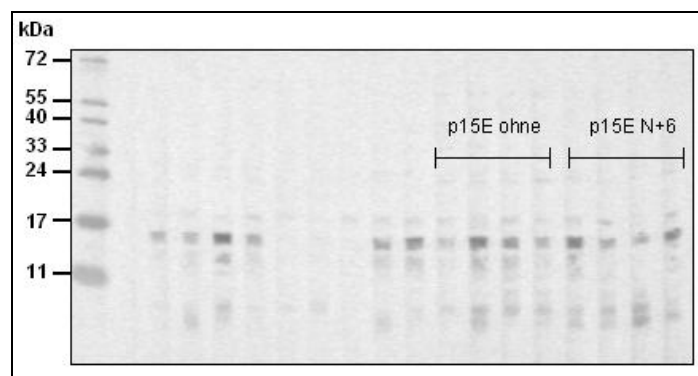


Abb. 3.31: Western Blot zur Testung der Immunisierungsseren auf p15E-Antikörper, Seren 1:500 verdünnt, 7.5 µg rp15E aufgetragen, DAB-Entwicklung

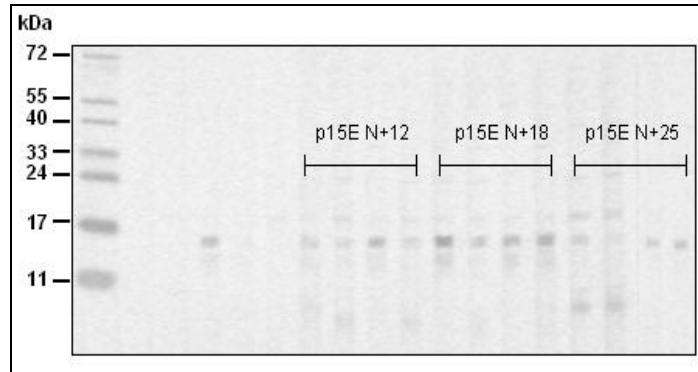


Abb. 3.32: Western Blot zur Testung der Immunisierungsseren auf p15E-Antikörper, Seren 1:500 verdünnt, 7.5 µg rp15E aufgetragen, DAB-Entwicklung

Um im Folgenden mögliche Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen feststellen zu können, wurden die Seren auf ihre Neutralisationsfähigkeit getestet. Bereits eine erste optische Prüfung der erstellten Diagramme (Abb. 3.33, Abb. 3.34) ließ darauf schließen, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen. Um diesen Eindruck zu untermauern, wurden beide Neutralisationsassays einer unifaktoriellen Varianzanalyse unterzogen. Für die Immunisierungsstudie am RKI ergab sich ein F-Wert von 1.29, für die Studie am BfR ein F-Wert von 1.37. Da beide Werte unter dem kritischen Wert $f_{(5\%, 4/15)} = 3.24$ liegen, muss angenommen werden, dass zwischen den Mittelwerten der fünf Gruppen keine signifi-

kanten Unterschiede vorliegen. Ein Einfluss des Fusionspeptides konnte demnach in keiner der beiden Studien beobachtet werden.

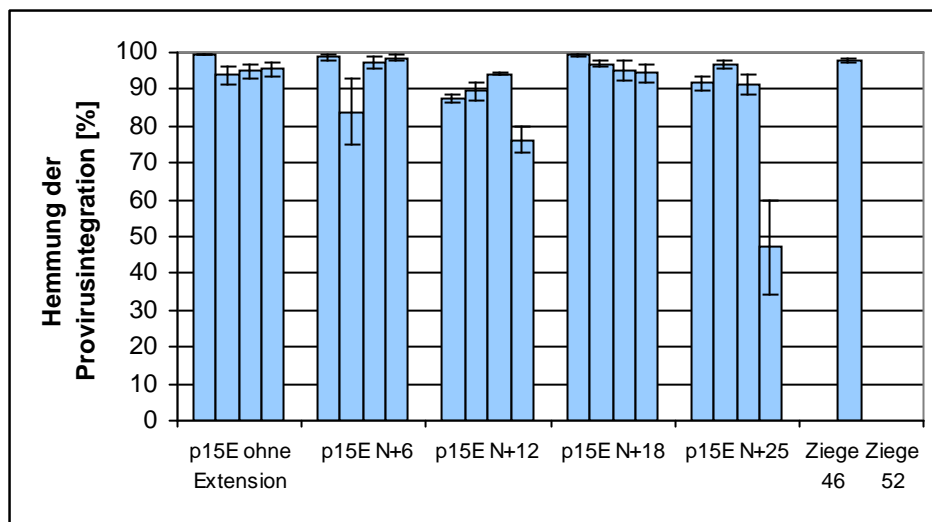


Abb. 3.33: KoRV-Neutralisationsassay Immunisierungsstudie RKI, Positivkontrolle = Ziege 46 (KoRV p15E), Negativkontrolle = Ziege 52 (PERV gp70-Fragmente), Seren 1:10 verdünnt

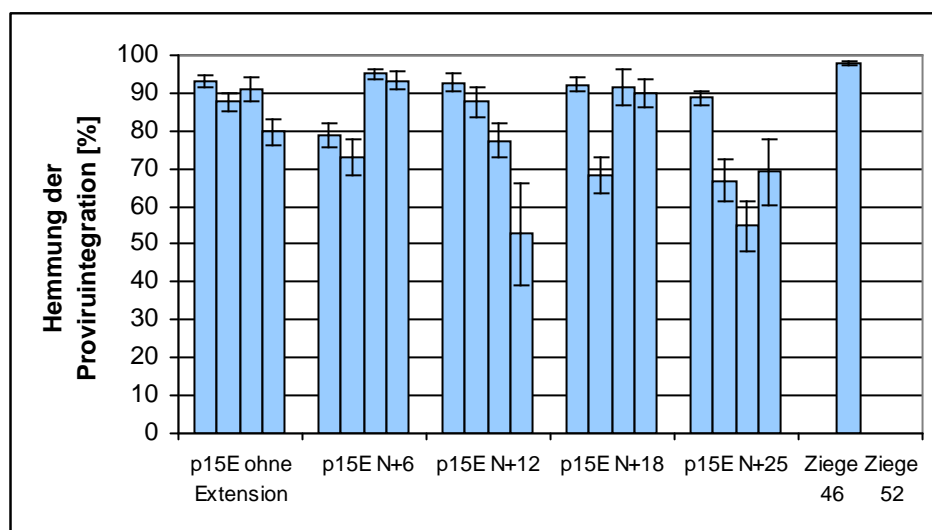


Abb. 3.34: KoRV-Neutralisationsassay Immunisierungsstudie BfR, Positivkontrolle = Ziege 46 (KoRV p15E), Negativkontrolle = Ziege 52 (PERV gp70-Fragmente), Seren 1:10 verdünnt

3.7.4 Epitopkartierung

Von den abgenommenen Seren wurde jeweils eins pro Gruppe in eine Epitopkartierung (s. 2.2.7.4) eingesetzt und die Ergebnisse in schematischer Form zusammengefasst (Abb. 3.35). Zu sehen ist, dass die Mehrzahl der Proteine Antikörper gegen die Epitope E1 (GPIDLQQG) und E2 (SWYEGWFN) induziert hat, dass aber zum Teil auch Antikörper gegen die immunsuppressive Domäne (LQNRRLDLLLFLKEGGL) des transmembranen Hüllproteins gebildet werden.

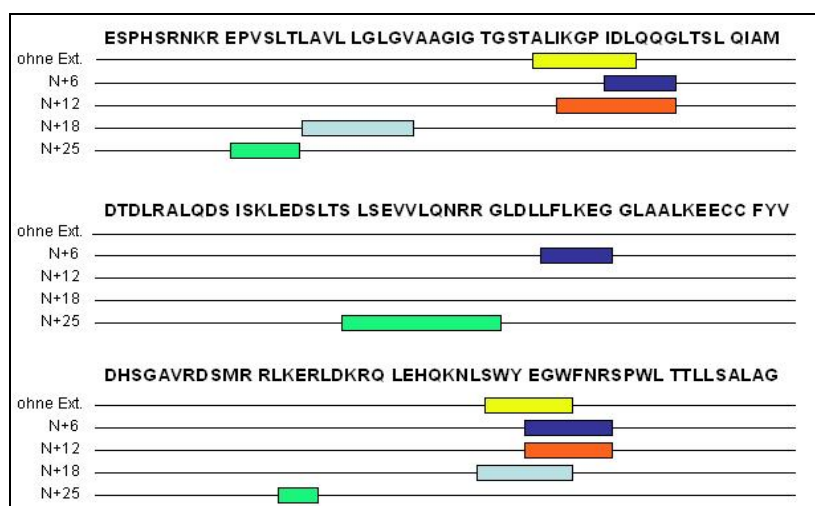


Abb. 3.35: Epitopkartierung, Abgleich mit der Sequenz der Ektodomäne des KoRV p15E, Seren 1:750 verdünnt

Beim Vergleich der Epitopkartierungen von Immunisierungs- und Infektionsseren fällt auf, dass bei ersteren meist nur die beiden oben genannten Epitope erkannt werden, während letztere viele verschiedene Abschnitte des p15Es erkennen, die Antikörperpopulation dort also wesentlich heterogener ist (Abb. 3.36).

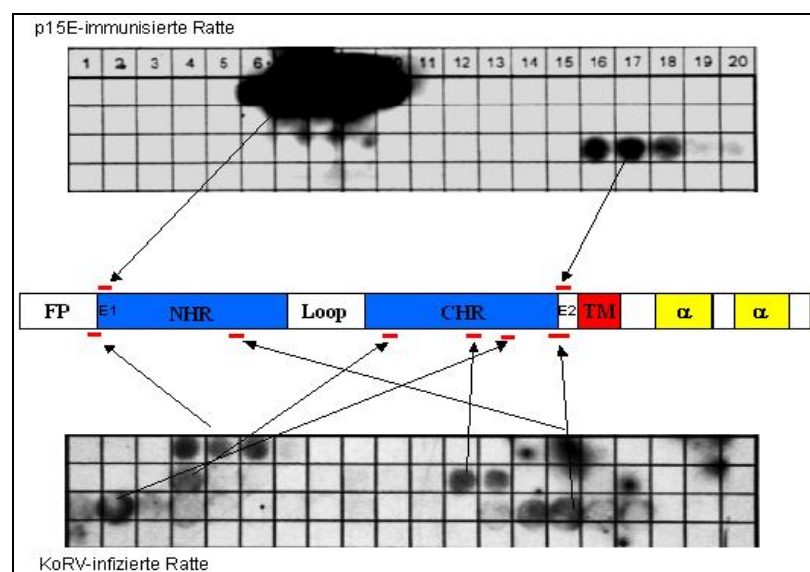


Abb. 3.36: Vergleichende Darstellung zweier Epitopkartierungen, Immunisierungsserum (oben) 1:750, Infektionsserum (unten) 1:500, in der Mitte ist die Ektodomäne des KoRV p15E mit den entsprechenden Antikörper-Bindungsstellen (rote Balken) schematisch dargestellt

4. Diskussion

4.1 Untersuchung der Übertragungswege des Koala-Retrovirus

4.1.1 „Rotationsversuch“ / Isolation viraler RNA aus Kot, Urin und Speichel

Bei allen Ratten trat im Verlauf des Versuches eine Zunahme der Antikörpertiter gegen p15E ein. Da die uninfizierten Tiere der Rotationsgruppe (III) bereits früh, also nach etwa drei Wochen, eine Reaktion zeigten, konnte man von einer Übertragung des Koala-Retrovirus durch Kot und Urin infizierter Ratten ausgehen. Es ist bekannt, dass zu Beginn retroviraler Infektionen eine Virämie auftritt und eine starke Immunantwort induziert wird, die sich im weiteren Verlauf auf einem mittleren Niveau einpendelt (s. Tiere 10, 11, 12). Ungewöhnlich ist, dass die Tiere 1, 3 und 4 der Kontrollgruppe I eine sehr starke Immunantwort gegen p15E ausprägten, obwohl sie nicht mit Kot, Urin oder Speichel infizierter Tiere in Kontakt kamen. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass beim Reinigen der Tiere Streu und Staub aufgewirbelt wurden, denen Kot- und Urinreste anhafteten und dass die Ratten der Kontrollgruppe diesen Feinstaub und damit das Virus einatmeten.

Die Gesundheitszeugnisse der Versuchstiere und PCR-Analysen hatten gezeigt, dass die Tiere mit *Pasteurella pneumotropica*, einem opportunistischen, Gram-negativen Bakterium (Jawetz, 1948), infiziert waren. Daraus folgte die Vermutung, dass die bakterielle Infektion zur Aktivierung eines endogenen Rattenvirus (RaLV = Ratten-Leukämievirus, Teitz *et al.*, 1971; Oroszlan *et al.*, 1972; Tsuchida *et al.*, 1974) führen könnte, welches die p15E-Antikörperantworten induziert. Gerade im Bereich des transmembranen Hüllproteins besteht eine weitgehende Homologie zum KoRV (GenBank accession number M77194 (Lee *et al.*, 1998) bzw. AF151794 (Hanger *et al.*, 2000)). Veränderte transkriptionelle Aktivitäten nach Pathogenbefall sind beispielsweise auch für humane endogene Retroviren (HERVs) im Zusammenhang mit *Toxoplasma gondii* (Frank *et al.*, 2006) und Herpes Simplex Virus Typ I (Ruprecht *et al.*, 2006) beobachtet worden. Die RaLV-Aktivierung wäre zum einen über ein bakterielles Toxin (zur Familie der Pasteurellaceae gehört z.B. auch *Pasteurella multocida*, welches das potente Mitogen PMT ausscheidet), aber auch über die für Gram-negative Bakterien üblichen Lipopolysaccharide (LPS) möglich, wobei es zur Induktion von Signaltransduktionskaskaden und zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren kommt (Orth *et al.*, 2005 und 2007; Björkbacka *et al.*, 2004). So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass PMT (2 µg/ml, Sigma-Aldrich) die RaLV-Expression in rat1-Zellen verstärkt (Fiebig *et al.*, nicht veröffentlicht). Alternativ dazu könnte eine gegen Pasteurellen gerichtete Immunantwort zur Aktivierung des Ratten-Leukämievirus geführt haben. So ist von Stoye und Moroni 1983 die verstärkte Expression eines endogenen Maus-Retrovirus nach Stimulation von Lymphozyten mit B-Zell-Mitogenen beschrieben worden, von Stauffer *et al.*, 2001 dagegen die Transkription einer HERV-K18-Sequenz (humanes endogenes Retrovirus) nach IFN α -Stimulation von T-Zellen

und von Tacke *et al.*, 2003 die PERV-Expression (porzines endogenes Retrovirus) nach Stimulation porziner PBMCs mit PHA. Der zuletzt genannte Versuch simuliert die Aktivierung des Immunsystems, wie sie zum Beispiel nach einer Xenotransplantation stattfinden könnte. Weiterhin ist auch möglich, dass durch Rekombinationen, Superinfektionen oder Reinsertionen verkürzte KoRV-Varianten mit dem endogenen Retrovirus replikationskompetente Viren gebildet haben, wie dies von Villanueva *et al.* 2003 für Mo-MuLV und RaLV festgestellt wurde. Es ist ebenfalls vorstellbar, dass für die Tiere durch die tägliche Rotation beziehungsweise Anwesenheit der Tierpfleger eine Stresssituation entstanden ist, die zu einer verstärkten Virusaktivität (KoRV und / oder RaLV) geführt und entsprechend eine verstärkte Immunreaktion nach sich gezogen haben könnte (Albrecht *et al.*, 1990). Um die Aussage, KoRV würde über Kot und Urin infizierter Tiere auf nicht infizierte Ratten übertragen werden, abzusichern, müssten in Zukunft definierte Infektionen über den Nasen-Rachenraum oder Schlundsonden durchgeführt werden. Außerdem müsste die Überlebensdauer freier Viruspartikel ermittelt werden, um die Hypothese der Übertragung via Streu und Staub stützen zu können. Zum Zwecke der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Pasteurelleninfektion und p15E-spezifischen Antikörpern, müsste der Versuch in pasteurellenfreien Ratten wiederholt werden.

Bisher ist es nur einmal gelungen, das Koala-Retrovirus in Kotproben nachzuweisen. Da die RT-minus-Kontrolle jedoch positiv war, muss man davon ausgehen, dass provirale DNA, die beispielweise in das Genom von Darmepithelzellen integriert sein könnte, ausgeschieden wird. Aus Urin- und Speichelproben war keine Virusisolation möglich, was höchstwahrscheinlich auf die geringe Probengröße zurückzuführen ist. Die Entnahme von Urinproben gestaltete sich auf Grund des schreckhaften Verhaltens der Tiere äußerst schwierig, so dass die Möglichkeit größere Urinmengen zu sammeln und diese etwa in der Ultrazentrifuge aufzukonzentrieren nicht bestand. Im Falle der Speichelproben wäre es womöglich vonnöten gewesen, die Wattetupfer zunächst in einer Zellsuspension (z.B. naive 293-Zellen) zu inkubieren um eine Virusvermehrung zu ermöglichen.

Da sich beim „Rotationsversuch“ die Frage nach RaLV gestellt hatte, wurden RaLV-*env*-spezifische Primer entworfen, und diese auf den mit oligo dT-Primern umgeschriebenen cDNA-Proben getestet. Das Ergebnis war durchaus überraschend, weil sich zeigte, dass alle exemplarisch aus einer Gruppe (I-III) genommenen Kotproben in mehr oder weniger großen Mengen RaLV-RNA enthielten. Dieses Resultat spricht für eine induzierte RaLV-Expression, wobei nicht klar ist, ob diese durch die Pasteurellen-Infektion (ausgeschiedene Toxine oder Immunreaktion der Tiere) oder die KoRV-Infektion hervorgerufen wurde.

Es lässt sich auf Grund des momentanen Kenntnisstandes, keine sichere Aussage über den Einfluss von RaLV auf die Immunreaktion der untersuchten Ratten treffen. Sicher ist zumindest, dass die KoRV-*env*-PCR spezifisch ist und keine RaLV-*env*-Sequenzen erkennt, da in solch einem Fall zum Beispiel die aus Rattentumoren etablierten Zelllinien T85 und T145 (s. Abb. 3.5), in denen RaLV naturgemäß endogen ist, ein Signal hätten liefern müssen. Der KoRV-Nachweis in den Kotproben der Ratten aus Gruppe 87 und 140 kann demnach als zuverlässig angesehen werden.

4.1.2 *Provirusnachweis und Tumorbildung in infizierten Ratten*

Der Provirusnachweis in Blut und Organen infizierter Tiere vergleichbaren Alters und vergleichbarer Behandlung mittels Standard- und Real-time-PCR war nicht einheitlich. Es muss festgestellt werden, dass die positiv getesteten Ratten mit hochinfektiösen Zellkulturüberständen beziehungsweise produktiv infizierten Zellen inokuliert wurden, während die (nicht infizierten) Tiere im Rotationsversuch geringeren infektiösen Dosen ausgesetzt waren. Zudem waren die ersteren etwa zwei Jahre alt, so dass bei diesen die Übertragung innerhalb der Gruppe eher möglich und die Infektion (z.B. auch in Organen) wahrscheinlich weiter fortgeschritten war. Weshalb in den Organen der Tiere 87/4 und 88/4 kein Provirus nachgewiesen werden konnte, ist unklar. Dass im Blut der neu infizierten Tiere des Rotationsversuches kein Provirus entdeckt werden konnte, ist nicht weiter verwunderlich, da schon Fiebig *et al.*, 2006 der Nachweis 21 Tage post infektionem nur in 33% der Fälle gelungen und nach insgesamt 63 Tagen überhaupt nicht mehr möglich war. Ein Grund dafür könnte der schnelle Umsatz von Blutzellen sein: Wenn das Knochenmark nicht infiziert ist, so sind bei abklingender Virämie auch die neugebildeten Blutzellen nicht infiziert.

Retroviren im Allgemeinen, aber auch Gammaretroviren im Speziellen, sind in der Lage, Tumorstadium zu induzieren. So konnte beispielsweise schon 1970 von Abelson und Rabstein gezeigt werden, dass durch Insertion des zellulären Gens *c-abl* in das Genom von Moloney-Maus-Leukämie-Viren die akut transformierenden Abelson-Maus-Leukämie-Viren entstehen. Bei Menschen wurde beispielsweise die Beteiligung eines murinen Retrovirus bei der Entstehung von Prostatakarzinomen vermutet (XMRV; Urisman *et al.*, 2006).

Nach Beginn der Infektionsversuche mit KoRV traten gehäuft Tumoren auf. Von zehn experimentell mit KoRV infizierten Ratten entwickelten acht Tiere Geschwüre, welche als Fibrosarkome und Fibroadenome identifiziert wurden. Größe und Gewicht der veränderten Gewebe variierten dabei beträchtlich. Das Koala-Retrovirus führt in Koalas zu Neoplasien, die hauptsächlich auf der Integration des Provirus in das Wirtsgenom beruhen, aber durch Rekombinationen mit anderen Retroviren, Interaktionen mit somatischen Mutationen des Wirtes oder Koinfektionen mit Viren anderer Genera begünstigt werden könnten. Des weiteren

scheint KoRV im Vergleich zu anderen endogenen Retroviren nicht stabil zu sein, da in Koalas außergewöhnlich große Mengen an defekten Proviren gefunden wurden (Hanger *et al.*, 2000). Theoretisch besteht demnach die Möglichkeit, dass zelluläre Protoonkogene zusammen mit dem viralen Genom in Viruspartikel verpackt wurden und es so zur Entstehung transformierender Viren gekommen ist. Weiterhin ist möglich, dass durch die geringe Stabilität der proviralen KoRV-Sequenzen und Rekombinationsprozesse eine Genominstabilität verursacht wurde oder dass (Re)insertionen die Aktivität von Onkogenen bzw. Tumorsuppressorgenen beeinflusst haben (Klein, 2002).

Bei der verstärkten Tumorentstehung könnte wiederum die Pasteurellen-Infektion eine Rolle spielen. Wenn die Expression des endogenen Retrovirus RaLV durch *Pasteurella pneumotropica* aktiviert würde, wäre denkbar, dass, wie von Lee *et al.* 1998 beschrieben, das zelluläre Gen *c-ras* in das RaLV-Genom integriert und das transformierende Virus RaSV (Rasheed Rat Sarcoma Virus) entsteht (Abb. 4.1). Natürlich wären in diesem Fall auch Rekombinationen zwischen RaLV / RaSV und KoRV möglich. Durch den erhöhten RaLV-Titer könnte sich auch die Wahrscheinlichkeit der Virusintegration vor / in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen erhöhen.

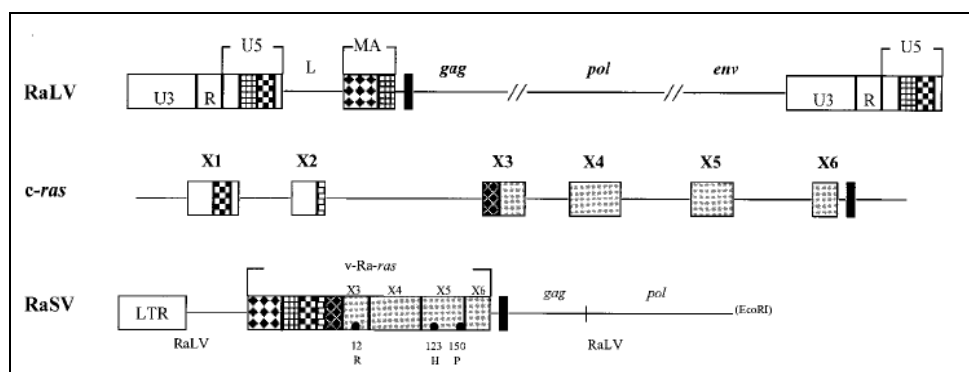


Abb. 4.1: Übersicht über RaLV- und *c-ras*-Sequenzen, die an der Bildung des RaSV beteiligt sind (Lee *et al.*, 1998), X1-X6 stehen für die vorhandenen Exons, wobei nur X3-X6 codierend sind; das v-Ra-ras Onkogen besteht aus drei Domänen, zwei sind vom RaLV abgeleitet, eine vom *c-ras*-Protoonkogen

Es ist klar, dass man letztendlich auch eine spontane Entstehung der Tumoren ohne Virus einfluss nicht ausschließen kann (Poteracki und Walsh, 1998). Diese Variable ist jedoch äußerst unwahrscheinlich, wenn man sich vor Augen führt, dass 98.5% aller Tiere im Untersuchungszeitraum von Anfang 2001 bis Anfang 2006 tumorfrei blieben (insgesamt 658 Ratten) und das gehäufte Auftreten erst nach Beginn der KoRV-Experimente zu beobachten war.

4.2 Wirtsspektrumanalyse *in vitro*

Bisher war bekannt, dass KoRV humane Nierenzellen und T-Lymphozyten (CEM, C8166) sowie Rattenfibroblasten (rat1) *in vitro* infizieren kann (Fiebig *et al.*, 2006). In der vorliegen-

den Arbeit konnte das Wirtsspektrum *in vitro* um Rhesusaffen-, Nerz-, Katzen-, Schweine- und Drosophilazelllinien sowie Ratten- und humane PBMCs erweitert werden. Die Mehrheit der positiv getesteten Zellen war zudem produktiv infiziert, was bedeutet, dass in diesen Viruspartikel gebildet wurden, die wiederum in der Lage waren, naive 293-Zellen zu infizieren. Besonders hervorgehoben werden sollte, dass auch die Drosophila-Epithelzelllinie produktiv infiziert war, grundsätzlich also eine Vermehrung des Virus in Zellen des Darmes oder der Speicheldrüsen von Insekten denkbar ist. Da Drosophila sich nicht blutsaugend ernährt, wurden auch Moskitozellen auf ihre Infizierbarkeit hin untersucht. Dabei zeigte sich jedoch, dass diese nicht als Wirtszellen geeignet waren. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass die Zelllinie C6/36 aus ganzen Larven gewonnen wurde, es sich also unter Umständen um ein Zellgemisch handelte und eine nähere Charakterisierung der Zelltypen (des Zelltyps) nötig gewesen wäre. Des Weiteren sind Moskitos holometable Insekten, was bedeutet, dass die Larven eine vom adulten Tier verschiedene Morphologie, eine andere Ernährungsweise und einen anderen Stoffwechsel haben. Daraus resultiert, dass womöglich erst während der Metamorphose Zellen entstehen, die suszeptibel für eine KoRV-Infektion sind bzw. Rezeptoren differentiell exprimiert werden, die eine Interaktion ermöglichen. Eine Insektenbeteiligung bei der Transspezies-Transmission zwischen Koalas und Gibbons, wie sie von Hanger *et al.* 2000 vermutet wurde, ist vor diesem Hintergrund nicht unwahrscheinlich. Um diese Vermutung abzusichern, wäre es im Folgenden sinnvoll, *in vitro*-Experimente mit charakterisierten Moskitozelltypen durchzuführen. Diese sind unter anderem deshalb erfolgversprechend, weil für HIV-1 (Adamson *et al.*, 2003 a), HIV-2 (Luo *et al.*, 1990) und MuLV (Adamson *et al.*, 2003 b) eine Reifung von *virus-like particles* in Insektenzelllinien beobachtet werden konnten. Auch wären *in vivo*-Versuche mit Larven oder adulten Fruchtfliegen und Moskitos auf virushaltigem Nährmedium / Blut von Bedeutung, wobei abgeklärt werden könnte, ob eine Vermehrung des KoRV in Darm- und / oder Speicheldrüsenepithelzellen sowie eine externe Übertragung des Virus durch Anhaften an Körper oder Gliedmaßen möglich ist. Weiterhin könnte man *in vivo*-Untersuchungen mit Zecken, Wanzen oder Flöhen, den Überträgern bedeutender Krankheiten, durchführen. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass FeLV im Darm von Flöhen und in deren Blutmahlzeit überleben kann und so ein potenzieller Vektor viraler RNA ist (Vobis *et al.*, 2003).

Hamster-, Maus- und Schimpansenzelllinien sowie Pavian-PBMCs konnten nicht infiziert werden. Dieses Ergebnis war im Fall der Mauszelllinie 3T6 nicht überraschend, da sich bereits in früheren Experimenten herausgestellt hatte, dass die ähnliche Mauszelllinie 3T3 (beides sind Fibroblastenzelllinien) sich nicht infizieren lässt (Fiebig *et al.*, 2006). Was die Hamsterzellen angeht, muss beachtet werden, dass die verwendete Zelllinie aus Ovarien stammt und somit keine Aussage über die Suszeptibilität somatischer Hamsterzellen möglich ist. Für

HIV ist beispielsweise bisher auch nur eine exogene Übertragung, nicht aber eine Integration in das Genom von Zellen der Keimbahn beschrieben worden. Da die Ovarien der infizierten Ratte 86/3 positiv auf provirale KoRV-Sequenzen getestet wurden, lässt sich eine Endogenisierung im Nagetiermodell nicht grundsätzlich ausschließen. Sie sollte aber zumindest kritisch betrachtet werden, wenn man bedenkt, dass der Nachweis in den Tieren 87/4 und 88/4 nicht erbracht werden konnte (s. 3.1.4 und 4.1.2). Warum sich Pavian-PBMCs und die Schimpansenzelllinie EB176 nicht infizieren ließen, ist auf Grund der phylogenetischen Nähe zum Menschen unklar. Hierbei scheint es sich nicht um ein Problem des Tropismus, sondern eher um ein Problem bei der Kultivierung der Suspensionszellen gehandelt zu haben. Das eng verwandte PERV beispielsweise ist in der Lage, Zellen verschiedener nicht-humaner Primaten, darunter auch primäre Pavian-PBMCs, *in vitro* zu infizieren (Specke *et al.*, 2001). Dabei muss jedoch bemerkt werden, dass die Infektionsversuche mit Polybren durchgeführt wurden, wodurch das Ergebnis manipuliert worden sein könnte.

Es bleibt abschließend zu erwähnen, dass bei einer KoRV / PERV-Koinfektion von 293-Zellen keine nachweisbare Rekombinantenbildung und kein *Co-Packaging* auftraten. Das für die Infektion verwendete Isolat PERV/5° ist selbst ein rekombinantes Virus, das zu großen Teilen aus PERV-C-Sequenzen besteht, aber durch den PERV-A-*env*-Abschnitt die Fähigkeit erlangt, humane Zellen zu infizieren (Wilson *et al.*, 1998 und 2000). Da beide Viren gleichermaßen in der Lage waren, 293-Zellen als Wirtszellen zu nutzen, scheint kein Selektionsdruck entstanden zu sein, der die Etablierung einer Rekombinante oder eine Koverpackung begünstigt hätte. Es besteht die Möglichkeit, dass unter den ursprünglich PERV- und KoRV-infizierten Zellen noch uninfizierte waren, dass also, anders formuliert, die Ausgangszellpopulation nicht zu 100% infiziert war. Daraus würde folgen, dass die vermeintliche Koinfektion eine Infektion mit nur einem der beiden Viren war und somit weder Rekombination noch *Co-Packaging* stattfinden konnten. Diese Möglichkeit ist zwar unwahrscheinlich, weil die entsprechenden Zellen im Vorfeld bereits sehr lange in Kultur waren, dennoch müsste man zur Sicherheit den Versuch mit einem jeweiligen *single-cell*-Klon wiederholen.

4.3 Einfluss des Komplementsystems auf eine KoRV-Infektion

Bei der klassischen Komplementaktivierung bindet zunächst Faktor C1q an einen Antigen-Antikörper-Komplex oder direkt an Komponenten der Pathogenoberfläche. Es folgen C1r und s, welche daraufhin die nachfolgende Kaskade aktivieren. C2b und C4b bilden eine dem Pathogen an haftende C3-Konvertase, die C3 in C3a und b spaltet. C3b bindet an die Pathogenoberfläche sowie Komplementrezeptoren auf Phagozyten und ermöglicht so die Phagozytose des Pathogens. C3b bildet außerdem im Verbund mit der C3-Konvertase die sogenannte C5-Konvertase. C5a, wie auch C3a, ist ein Mediator lokaler Entzündungsprozesse,

C5b hingegen löst die späte Komplementkaskade (Aktivierung von C6 bis C9) und damit die Lyse des Pathogens aus. Der MB-Lektin-Weg ist homolog zum klassischen Aktivierungsweg, wobei MASP-1 und 2 C1r und s entsprechen. Das Mannan-bindende Lektin bindet an Mannose und andere Zucker auf der Pathogenoberfläche (MASP = MBL-associated serine protease) und löst dadurch die oben beschriebene Reaktionsfolge aus. Der alternative Weg wird durch die spontane Hydrolyse einer Thioesterbindung in C3 initiiert, woraufhin C3(H₂O)Bb, eine lösliche C3-Konvertase, entsteht (Abb. 4.2).

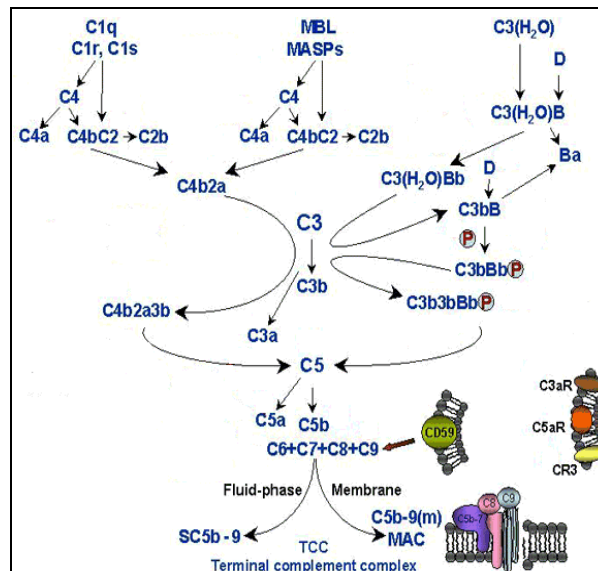


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Komponenten und Effektormechanismen des Komplementsystems (modifiziert, www.med.uio.no)

Bereits in den 70er Jahren war bekannt, dass Gammaretroviren durch das im humanen Serum enthaltene Komplementsystem lysiert werden können. Cooper *et al.* und Bartholomew *et al.* stellten 1976 bzw. 1978 fest, dass diese Lyse nach Aktivierung des klassischen Weges auftritt, wobei das p15E der Virusoberfläche direkt als Rezeptor für die Komponente C1q dient und nicht zwingend spezifische Antikörper beteiligt sind. Neben dem klassischen Aktivierungsweg wird in geringerem Ausmaß auch der alternative Weg über Faktor B begangen. Fujita *et al.* (2002) und Quinn *et al.* (2004) konnten zeigen, dass auch PERV über die klassische Komplementkaskade inaktiviert wird, allerdings unter der Beteiligung von Gal α 1-3Gal-Antikörpern, welche nur in humanen und einigen nicht-humanen Primaten vorkommen.

Ziel des Versuches war es herauszufinden, ob das Komplementsystem auch eine KoRV-Infektion verhindern kann. Tatsächlich ist deutlich geworden, dass nicht nur humanes Serum sondern auch Ratten-Serum in der Lage ist, KoRV komplement-vermittelt zu inaktivieren und die Infektion von PBMCs abzuwehren. Die Beteiligung des Komplementsystems wird dabei durch die Hitzeempfindlichkeit des Versuches belegt. Da das eingesetzte Virus auf humanen 293-Zellen kultiviert worden war, trug es keine Gal α 1-3Gal-Epitope auf der Oberfläche, so

dass die Komplementkaskade entweder durch direkten Kontakt von C1q mit der Virusoberfläche oder auf einem der anderen beiden Wege aktiviert worden sein muss. Bei Mensch und Ratte könnten unterschiedliche Wege induziert worden sein, was durch weitere Experimente, wie z.B. Depletion / Rekonstitution von Faktor B, C1q, C2 oder C4, Absättigung oder Zerstörung der viralen Oberflächenproteine sowie Immunopräzipitationsstudien näher untersucht werden müsste.

4.4 Proviruslast in Koalas einer Zuchtkolonie

Die Proviruslast in verschiedenen Koalas einer gemeinsamen Zuchtkolonie in San Diego wurde mit Hilfe des optimierten Real-time-PCR-Systems vermessen. Die meisten der untersuchten Koalas leben derzeit im Zoo Duisburg, wobei Männchen und Weibchen außerhalb der Paarungszeit getrennt gehalten werden, wie es auch ihrem natürlichen Verhalten entspricht. Wie schon von Tarlinton *et al.*, 2005 für eine Kolonie in Australien geschildert, existiert keine Korrelation zwischen Alter und Provirusintegration. Birubi beispielsweise weist eine anderthalb-fach höhere Kopienzahl auf als Kambara, der zwei Jahre jünger ist, und Allora hat dreimal mehr provirale Kopien ins Genom integriert als Kangu, welche ebenfalls zwei Jahre jünger ist. Da im Rattenmodell gezeigt wurde, dass das Virus exogen übertragen werden kann und auch für Koalas eine fortschreitende Ausbreitung beschrieben wurde, ist fraglich, inwieweit eine exogene Übertragung zwischen den untersuchten Tieren stattgefunden hat. In der Annahme, dass beide Geschlechter gleichermaßen mit exogenem Virus in Kontakt gekommen sind, bleiben als Ursache für die unterschiedlichen Proviruslasten verschiedene wirksame Abwehrmechanismen der Provirusintegration (zum Beispiel Trim1 und 5 α (tripartite motif; Sebastian und Luban, 2007) sowie APOBEC3 (apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide; Franca *et al.*, 2006)) oder unterschiedlich schwere Vorbelastungen (z.B. bakterielle Infektionen), die eine *de novo*-Integration begünstigen. Möglicherweise haben die Koalas aber auch eine bestimmte (die im Experiment ermittelte) Proviruslast von ihren Eltern geerbt und Superinfektionen mit exogenem Virus werden nun durch Rezeptorinterferenzmechanismen verhindert. Diese Hypothese wird durch Versuche von Oliveira *et al.*, 2006 gestützt, welche zeigen, dass die eng verwandten Viren GaLV und KoRV die Expression desjenigen Rezeptors herunterregulieren, der auch dem konkurrierenden Virus den Eintritt in die Zielzelle ermöglicht. Denkbar ist auch, dass während des Stillens verschieden starke Viruslasten auf die Nachkommen übertragen werden, wobei ebenfalls die oben genannten Mechanismen greifen würden. In weiteren Versuchen müssten deshalb Kopienzahlen der entsprechenden Nachkommen bestimmt werden, um zu sehen, ob sich ein Mittelwert aus den Resultaten der Eltern ergibt (Vererbung nach den Mendelschen Regeln) und eine eventuelle Erhöhung der Proviruslast im Zeitverlauf durch regelmäßige Blutabnahmen verfolgt werden.

4.5 Verringerung der Virusreplikation *in vitro*

In KoRV-infizierten 293 Zellen verringert sich nach etwa einem Monat die Virusreplikation drastisch. Als Ursache dafür wurden zwei unterschiedliche Mechanismen angenommen: zum einen die Inaktivierung der proviralen Sequenz(en) durch *gene silencing*, zum anderen die Veränderung der Proteinstruktur der viralen Hüllproteine, welche Auswirkungen auf die Bindung der Wirtszelloberfläche während des Infektionsprozesses haben könnte.

Die differentielle Genexpression dient neben der Regulation genetischer Aktivitäten (zum Beispiel während der Embryonalentwicklung) auch dem Schutz des Wirtsgenoms vor Transposons und Viren. Dabei kann es zu DNA-Methylierungen, aber auch Histonmethylierungen, -deacetylierungen und -phosphorylierungen kommen (Knippers, 2006). Im Falle einer DNA-Methylierung beispielsweise ragt die Methylgruppe am Cytosin der Dinucleotidfolge CpG in die große Rinne der DNA, was eine Verdrängung von Transkriptionsfaktoren oder die Bindung von Proteinen mit Methyl-CpG-Bindedomänen zur Folge hat. Zu den letzteren gehört unter anderem das Protein MeCP2, das wiederum zu Histondeacetylasen (HDAC) und Histonmethyltransferasen (HMT) Kontakt aufnimmt (Fuks *et al.*, 2003). Zudem können Repressoren entweder direkt oder vermittelt über Korepressoren Kontakt zu allgemeinen Transkriptionsfaktoren aufnehmen und so ebenfalls Histondeacetylasen rekrutieren. Die Deacetylierung positiv geladener Lysinseitenketten in Histonen führt zu einer stärkeren Anziehung der negativ geladenen DNA und damit zur Verdichtung der Chromatinstruktur (Knippers, 2006). Um die Beteiligung einer DNA-Methylierung im Falle der verringerten KoRV-Replikation zu prüfen, wurde eine passive Demethylierung mit Hilfe des DNA-Methyltransferase-Inhibitors 5-Aza-2'-desoxycytidin vorgenommen, bei der die normale replikationsabhängige Methylierung unterdrückt wurde. Um dagegen den Anteil einer Histon-Deacetylierung zu untersuchen, wurde BrdU eingesetzt, welches mit solchen zellulären Proteinen interferiert (also deren Funktion beeinträchtigt), die die CpG-Methylierung in Histon-Deacetylierung übersetzen (siehe oben; Fan *et al.*, 2005). Beide Basenanaloga konnten die KoRV-Transkription allerdings nicht signifikant anheben, was darauf schließen lässt, dass, falls *gene silencing* der richtige Ansatz ist, andere Mechanismen beteiligt sein müssen.

Beispielsweise könnte es sich um Histonmethylierungen handeln, die durch ChIP-Assays (*Chromatin Immunoprecipitation*) genauer untersucht werden könnten. Dabei müsste natürlich darauf geachtet werden, dass Histonmethylierungen sowohl aktivierend als auch reprimierend wirken können. Histonmodifikationen könnten ebenso durch Einsatz von Inhibitoren der entsprechenden Histonmethyltransferasen, Histonacetyltransferasen (HAT) sowie Histonkinasen in Erfahrung gebracht werden.

Ein weiterer Mechanismus, der theoretisch für die verringerte Menge viraler Transkripte verantwortlich sein könnte, ist die Zerstörung viraler mRNAs durch das System des *nonsense-mediated decay* (NMD). Gerade im Hinblick auf die große Zahl an verkürzten Proviren in Kolas (s. 4.1.2), wäre es möglich, dass die Transkription zum Beispiel von zellulären Promotoren ausgeht, woraufhin verstümmelte KoRV-Transkripte ins Cytosol gelangen und dort durch Polyadenylat-Ribonuklease beziehungsweise Exonukleasen erkannt werden würden. Ferner ist vorstellbar, dass RNA-Interferenz-Mechanismen von Bedeutung sind. Beispielsweise könnte durch intramolekulare Faltung der Transkripte von Viren oder Transposons doppelsträngige RNA entstehen, die im Anschluss prozessiert und in RITS-Komplexe (*RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing*) integriert würde, woraufhin die Rekrutierung von DNA-Methyltransferasen sowie die Stilllegung der proviralen Sequenz erfolgte. Genauso gut wäre eine posttranskriptionelle Genregulation durch RNA-Interferenz denkbar, wobei es in RISCs und miRNPs zur Spaltung der mRNA beziehungsweise zur Repression der Translation kommen könnte (Knippers, 2006).

Was die Sequenzierung angeht, ist fraglich, ob die Mutation von Glutamin zu Leucin in der N-terminalen Helixregion des p15E-Anteils (dem putativen E1-Epitop) eine Rolle spielt. Während die Amid-Seitengruppen des Glutamins an Wasserstoffbrücken teilnehmen, sind die nichtreaktiven Seitengruppen des Leucins für hydrophobe Bindungen im Protein charakteristisch. Möglicherweise kommt es durch den Aminosäureaustausch zu Konformationsänderungen / zur Störung der helikalen Struktur, welche sich negativ auf die unter 1.1.4.3 geschilderten Vorgänge bei der Fusion zellulärer und viraler Membranen auswirken könnten. So wäre ein Einfluss auf die unter 4.7.2 ausführlich diskutierte Interaktion von E1 und E2 denkbar.

Es muss festgehalten werden, dass in den infizierten 293-Zellen keine homogene Viruspopulation vorliegt und Integrationen an verschiedenen Orten des Wirtsgenoms möglich sind. Deshalb könnten gleichzeitig mehrere unterschiedliche Mechanismen bei der Verringerung der Virusreplikation wirken und weitere Sequenzierungen würden verschiedene Resultate zur Folge haben.

Eine weitere Möglichkeit könnte sein, dass es zum Verlust virusproduzierender Zellen durch einen programmierten Zelltod gekommen ist. Dabei muss zwischen einem Schutzmechanismus der Zellen zur Vorbeugung der Virusreplikation und einer Virus-induzierten Apoptose unterschieden werden. So sind beispielsweise murinen Leukämieviren (Kim *et al.*, 2002; Nana und Yoshimura, 2004), aber auch HIV-1 (Cheng *et al.*, 2007) apoptogene Eigenschaften

zugeschrieben worden. Es scheint also abschließend eine Vielzahl von Faktoren an der Verringerung der Virusreplikation beteiligt zu sein.

4.6 Etablierung eines KoRV p27Gag Capture ELISAs

Zur Vervollständigung der immunologischen Nachweissysteme und zur Bestimmung der Viruslast sollte ein KoRV p27Gag *Capture* ELISA etabliert werden. Dieses Vorhaben konnte jedoch bisher nicht umgesetzt werden, da es an ausreichend aufgereinigten beziehungsweise monoklonalen Antikörpern fehlte. Auf Grund der Unlöslichkeit der rekombinanten p27Gag-Fragmente war deren Kopplung an Sepharose und damit eine Isolation / Trennung von Antikörperpopulationen aus anti-p27Gag-Ziegenserum durch Affinitätschromatographie nicht möglich. (Die Reaktivität des Ziegensersums konnte sowohl im Western Blot als auch im ELISA (nicht gezeigt) nachgewiesen werden, so dass eine Aufreinigung theoretisch denkbar gewesen wäre) Das Problem der Hydrophobizität sollte unter anderem durch neue p27Gag-Konstrukte umgangen werden, in denen einige der hydrophoben Aminosäuren ausgetauscht oder entfernt wurden. Jedoch stellten sich auch diese rekombinant hergestellten Proteine als unlöslich und somit ungeeignet heraus (nicht gezeigt). Da sich in früheren Experimenten ergeben hatte, dass das komplette KoRV p27Gag löslich ist, muss es durch die Stückelung in zwei Fragmente und damit einhergehende Konformationsänderungen zur Exposition hydrophober Aminosäuren gekommen sein, welche im nativen Protein durch hydrophile Aminosäuren abgeschirmt werden. Um die Proteine in Lösung zu bringen, wurden sie mit 0.3% SDS (zwecks Micellenbildung) aus den entsprechenden Bakterienpellets herausgewaschen. Die anschließend geplante Aufreinigung über Calmodulin-Sepharose war jedoch unmöglich. Um überhaupt eine Aufreinigung von Ziegen- und Rattenimmunisierungsseren zu erreichen, wurden dieselben auf Blotschnipsel mit dem dazugehörigen Antigen gegeben und die Antikörper mit niedrigem pH eluiert. Es zeigte sich bald, dass in allen gecoateten Eluatn neben Antikörpern noch weitere Proteine enthalten sein mussten, die durch die Bestandteile des jeweils anderen Eluats (zweiter Primärantikörper) erkannt wurden. Hierbei scheinen in der SDS-PAGE auf Höhe der Antigenbande bakterielle Proteine komigriert zu sein, die nach dem Blotten mit aus der Membran geschnitten wurden. Da sowohl Ziegen als auch Ratten mit rekombinant in *E. coli* produzierten Proteinen immunisiert wurden, konnte eine Immunantwort gegen bakterielle Bestandteile nicht ausgeschlossen werden.

Um in Zukunft einen *Capture* ELISA etablieren und anwenden zu können, müsste zum Beispiel KoRV p27Gag als komplettes, lösliches Protein hergestellt, über Affinitätschromatographie gereinigt und dann an aktivierte Sepharose gekoppelt werden, wodurch eine Aufreinigung der vorhandenen Ziegen- und Rattenimmunisierungsseren möglich würde. Eine alternative Methode wäre weiterhin die Produktion monoklonaler Antikörper gegen KoRV

p27Gag oder die Fragmente durch Hybridomazellen, die dann als *Capture*-Antikörper eingesetzt oder an Peroxidase gekoppelt werden könnten. Auf Grund der bereits vorgenommenen Immunisierung von Ratten wäre dieses Vorgehen in Kürze möglich. Beide Alternativen bestehen auch für PERV p27Gag, welches 66% Übereinstimmung zum KoRV p27Gag aufweist (s.u.).

PERV PLRTYGPPPIPGGQLQPLQYWPFSSADLYNWKTNHPPFSEDPQRLTGLVESLMFESHQPTWDDCQQLLQ
KoRV PLRAVGPPAEPNGLVPLQYWPFSSADLYNWKSNHPSFSENPTGLTGLLESIMFESHQPTWDDCQQLLQ

PERV TLFTTEERERILLEARKNVPGADGRPTQLQNEIDMGFPLTRPGWDYNTAEGRESLKIYRQALVAGLV
KoRV VLFTTEERERILLEARKNVLGVNGAPTQLENLINEAFPLNRPQWDHNTAEGRERLLVYRRTLVAAGLK

PERV RGPSSRRPHNLGKLTDFQTQAPNAPPSVFLKAFMKPFRRFTPFDPSPQKPSVALPFIAQSALNITKK
KoRV -GAARRPTNLAKVREVLQGPTEPPSVFLERLMEAYRRYTPFDPSSEGGQAAVAMSFIGQSAPDIKKK

PERV LQRLEGLQKAQLRHLVKEPEKVYS
KoRV LQRLEGLQDHSLODLIKEAEKVYH

So konnte beispielsweise für ein PERV Gag-Immunisierungsserum, wenn auch eine im Vergleich zum KoRV Gag-Immunisierungsserum verringerte, Kreuzreaktivität gegenüber KoRV p27Gag nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Fraglich ist, ob in diesem Fall der Nachweis geringer Virusmengen erbracht und inwieweit noch von der Spezifität der Methode gesprochen werden kann.

4.7 Induktion neutralisierender Antikörper gegen KoRV-Hüllproteine

4.7.1 Notwendigkeit von Impfstoffen gegen Retroviren

Retroviren sind durch ihre Fähigkeit ins Wirtsgenom zu integrieren Ursache von Mutationen (z.T. ohne sichtbare Wirkung), von Genominstabilität durch Rekombinationen sowie Reinsertionen und Neoplasien. Bei einer Integration in die Keimbahnzellen können diese genetischen Veränderungen auch die nächste Generation betreffen, so dass im schlimmsten Fall der Fortbestand einer betroffenen Art / Population bedroht ist. Bedingt durch die hohe Fehlerrate der Reversen Transkriptase, aber auch durch verschiedene Selektionsdrücke, kommt es bald nach der Infektion zur Bildung von Fluchtmutanten, so dass neben der Veränderung des Wirtsgenoms auch die Schwächung des Immunsystems und opportunistische Erkrankungen eine Rolle spielen. Des weiteren besteht für Retroviren grundsätzlich die Möglichkeit der Transspeziesübertragung, wobei im neuen Wirt andere Krankheitsbilder auftreten können als im natürlichen Wirt. All diese potenziellen oder bekannten Gefahren sprechen für die Entwicklung von Impfstoffen gegen Retroviren, welche in der Lage sind, das Eindringen des Virus in die Zielzellen und dessen Ausbreitung im Wirtsorganismus durch Aktivierung der humoralen und zellulären Immunantwort zu verhindern. Während gegen Viren anderer Genera (Pocken-, Hepatitis B-Viren) bereits erfolgreich Impfstoffe hergestellt werden konnten (attenuierte Viren bzw. Subunitvakzinen), ist es bisher beispielsweise nicht gelungen, einen

präventiven Schutz gegen HIV zu induzieren (s. 1.2; Lau *et al.*, 2007). Als Modell für die (Weiter)entwicklung entsprechender Impfstoffe eignet sich das Koala-Retrovirus, da es typische Eigenschaften der Retroviren vereint und zudem in der Lage ist, Wistar-Ratten zu infizieren. Die gesammelten Erfahrungen könnten bei der Entwicklung von Impfstrategien gegen AIDS von Bedeutung sein.

4.7.2 p15E-Immunisierungsstudien

Die Konformationsänderungen des TM-Proteins während der Membranfusion sind entscheidend für eine erfolgreiche Infektion der Zielzelle. Nur wenige Aminosäureaustausche innerhalb der Helixregionen genügen, um den Klappmechanismus zu stören und zum Funktionsverlust zu führen. So kommt es, dass die transmembranen Hüllproteine deutlich konservierter sind als die dazugehörigen Oberflächenhüllproteine. Zudem sind erstere neben verschiedenen zellulären und den genannten viralen Oberflächenhüllproteinen die einzigen Proteine, die auf der Virusoberfläche präsentiert werden. Die hohe Sequenzstabilität sowie die Exposition während des Infektionsprozesses machen das transmembrane Hüllprotein von Retroviren zum geeigneten Angriffspunkt für die Induktion neutralisierender Antikörper.

Man ist zuversichtlich, die bei der Impfstoffentwicklung gegen Gammaretroviren gesammelten Erkenntnisse auch auf Ansätze gegen HIV anwenden zu können. Beispielsweise konnten Fiebig *et al.*, 2003 einen synergistischen Effekt der Peptide PERV E1 und E2 im Vergleich zu den Einzelpeptiden (ELISA, Neutralisationsassay) feststellen, der auf eine Interaktion der beiden hindeutete. Die Epitope der monoklonalen, HIV-neutralisierenden Antikörper 2F5 und 4E10 liegen im selben Bereich der Ektodomäne, in dem das PERV-E2-Epitop lokalisiert werden konnte. 2F5 (Purtscher *et al.*, 1994) bindet die gp41-Sequenz ELDKWA, 4E10 (Zwick *et al.*, 2001) dagegen die daran angrenzende gp41-Sequenz NWFN/DIT. Auch hier wurden Konformationsepitope beschrieben (Fiebig *et al.*, 2005; Hager-Braun *et al.*, 2006; Lorizate *et al.*, 2006), wobei jedoch bislang die exakte Lage des E1-Bereiches unklar ist. Sowohl Hager-Braun *et al.*, 2006 als auch Lorizate *et al.*, 2006 haben Interaktionen des Fusionspeptides (FP) mit der membranproximalen Region (MPR) postuliert. Während Hager-Braun *et al.* ein Konformationsepitop auch nach der Sechs-Helix-Bündel-Formation für möglich halten, nehmen Lorizate *et al.* tertiäre Interaktionen nur im nativen Zustand und im Präfusionsstadium an.

Um eine Beteiligung des Fusionspeptides an der Induktion neutralisierender Antikörper zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit fünf verschiedene N-terminal verlängerte p15E-Konstrukte rekombinant hergestellt und in einer vergleichenden Immunisierungsstudie eingesetzt. Bei allen Tieren konnten Seren mit neutralisierender Aktivität induziert werden,

wobei allerdings keine Unterschiede zwischen den Gruppenmittelwerten ausgemacht werden konnten. Durch Anwesenheit des Fusionspeptides konnten demnach keine höheren Titer an neutralisierenden Antikörpern induziert werden, was darauf schließen lässt, dass die Länge des Proteins beziehungsweise das Fusionspeptid keine wirksame Variable bei der Induktion entsprechender Antikörper ist. Dieses Ergebnis konnte durch Epitopkartierung in drei von fünf Fällen bestätigt werden. In zwei Fällen konnte zwar eine Verschiebung des Epitopes in Richtung Fusionspeptid beobachtet, eine Beteiligung des vermuteten E1-Bereiches (GPIDLQQG) an einem Konformationsepitop auf Grundlage des Epitopmappings aber dennoch nicht ausgeschlossen werden. Die weiter oben getroffene Aussage wird durch Beobachtungen von Fiebig *et al.*, 2005 und Bellamy-McIntyre *et al.*, 2007 gestützt. Diese mit HIV gp41 durchgeführten Untersuchungen sprechen für Interaktionen der membranproximalen Region mit einem Abschnitt zwischen N-terminaler Helix und Fusionspeptid, nämlich bei der Induktion neutralisierender Antikörper bzw. der Bildung des Sechs-Helix-Bündels.

Theoretisch besteht die Möglichkeit, dass eine gegen RaLV (s. 4.1.1) gerichtete Immunreaktion Unterschiede in der Neutralisationsfähigkeit der rp15E-Immunsierungen überdeckt hat. Es konnte gezeigt werden, dass FeLV-A, das zu 100% das PERV-E2 (FEGWFN) enthält, in der E1-Sequenz jedoch keine Homologien aufweist, nicht durch ein Immunsierungsserum gegen PERV rp15E neutralisiert werden konnte (Fiebig *et al.*, nicht veröffentlicht). Da RaLV im putativen E1-Bereich keine Homologie zu KoRV zeigt, für die Bildung neutralisierender Antikörper jedoch ein Konformationsepitop nötig ist, kann RaLV-p15E nicht beteiligt gewesen sein. Stattdessen könnten jedoch kreuzneutralisierende Antikörper gegen gp70 gebildet worden sein, was durch entsprechende Inhibitionsversuche abgeklärt werden könnte. Auch kann man die Möglichkeit nicht ausschließen, dass eine Hemmung der Virusreplikation im *in vitro* Neutralisationsassay andere Ursachen hat als neutralisierende Antikörper. So könnte durch das Adjuvans oder, im Fall von N+25, durch Lipopolysaccharide (besonders hydrophobe Proteine interagieren stark mit Bestandteilen der bakteriellen Zellwand, so dass letztere schwer vom gewünschten Produkt (p15E) zu trennen sind) die Bildung von Cytokinen und Chemokinen angeregt worden sein, die eine unspezifische Hemmung der Infektion vermittelt haben könnten. Hier könnte durch Inhibitionsversuche sowie eine Affinitätschromatographische Aufreinigung des Serums Klarheit geschaffen werden. Eine unvollständige Inhibition des Komplementsystems, welche die gleiche Wirkung hätte, kann mit einiger Sicherheit ausgeschlossen werden, da mit 40-50 min bei 56°C immer eine ungewöhnlich lange Inkubationszeit gewählt wurde.

Problematisch ist, dass im p15E-Western Blot nicht zwischen Antikörpern durch Immunisierung und Antikörpern durch Infektion unterschieden und damit auch keine Aussage darüber

getroffen werden konnte, ob die induzierten Antikörper einen effektiven Schutz vor der Infektion des Organismus bieten. Zusammenfassend kann man deshalb sagen, dass bei weiterem Einsatz eines KoRV-Kleintiermodells andere Strategien verfolgt werden sollten. Dabei sollte die Immunisierung mit TM-Proteinen jedoch zunächst das Hauptziel bleiben, da Experimente mit SU-Proteinen beispielsweise bei Lentiviren nicht zum gewünschten Erfolg geführt haben. Beispielsweise könnte eine Immunisierung mit glykosylierten Proteinen erfolgen, die das native Protein besser nachempfinden würden. Einen positiven Einfluss auf die Stärke der Immunantwort könnte auch die Verwendung anderer Adjuvantia haben, so ist von Wu *et al.* 1992 eine Verstärkung der Antikörperantwort gegen HIV-1 gp160 durch Saponine beschrieben worden. Weiterhin könnten Immunisierungsstudien mit unterschiedlichen Proteinmengen durchgeführt werden, um eine Toleranz zu vermeiden und die für den Zweck optimale Menge zu ermitteln. Da die Integrität der 2F5- und 4E10-Epitope membranabhängig zu sein scheint (Luo *et al.*, 2006), besteht die Möglichkeit, durch Einsatz einer einfachen Membran als Träger des Antigens größere Immunisierungserfolge zu verzeichnen. Bei Immunisierungsstudien zum Schutz vor einer Infektion mit den Gammaretroviren PERV und FeLV wurden erste positive Ergebnisse durch Kombination von SU- und TM-Proteinen erhalten (Langhammer, 2005; Wurzbacher, 2007), weshalb auch dies ein Ansatz für die (Weiter)entwicklung von Impfstoffen ist. Zusätzlich müssten weitere Nachweismethoden etabliert (z.B. SDS-PAGE / Western Blot mit Viruslysat), definierte Challengeversuche durchgeführt und verschiedene Verdünnungen des Immunisierungsserums in den Neutralisationsassay eingesetzt werden. Sinnvoll scheint auch, die Versuche in pasteurellenfreien Ratten zu wiederholen und gegebenenfalls Immunisierungsstudien in anderen Nagern anzustreben. Um weitere Einsichten in den Neutralisationsmechanismus oder die Bildung des Konformationsepitops zu erlangen, könnten Kristallisationsstudien oder spektroskopische Experimente hilfreich sein.

Es muss abschließend festgehalten werden, dass das KoRV-Rattenmodell bei der Entwicklung und Erprobung solcher Impfstoffansätze nützlich sein könnte, die eine Ausbreitung der KoRV-Infektion in Zootieren und den noch nicht infizierten Tieren Australiens eindämmen bzw. verhindern, die sich aber womöglich auch auf andere Retroviren übertragen lassen und so zur Weiterentwicklung einer Vakzine gegen das humane Immundefizienzvirus beitragen könnten. Neben der genannten Anwendung könnten zudem antiretrovirale Therapien und Mechanismen der Immunmodulation untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Eine präventive Immunisierung stellt die kostengünstigste und erfolgversprechendste Strategie zur Bekämpfung viraler Infektionen dar. Das Koala-Retrovirus ist mit Leukämien, Lymphomen und opportunistischen Infektionen assoziiert und in der Lage, Ratten *in vivo* zu infizieren. Dadurch konnte ein Kleintiermodell etabliert werden, das sich für Studien zu Transspeziesübertragungen von (Gamma)retroviren, aber auch für die Erprobung von Impfstoffansätzen eignet. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden deshalb die Eigenschaften dieses Virus genauer untersucht.

Bei der Erforschung des *in vitro*-Wirtsspektrums konnte eine Infektion von humanen und Ratten-PBMCs sowie Rhesusaffen-, Nerz-, Katzen-, Schweine- und Fruchtfliegenzelllinien nachgewiesen werden, welche im Fall von Rhesusaffe, Nerz, Katze und Drosophila sogar produktiv war. Etwa vier Wochen nach der *in vitro*-Infektion humaner Nierenzellen zeigte sich eine Verringerung der Virusreplikation, die durch Behandlung mit den Basenanaloga 5-Aza-2'-desoxycytidin und 5-Brom-2'-desoxyuridin nur geringfügig gesteigert werden konnte. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die in den Seren von Mensch und Ratte enthaltenen Komponenten des Komplementsystems - zumindest partiell - in der Lage sind, die KoRV-Infektion der entsprechenden PBMCs zu verhindern. Dabei scheint, anders als für PERV beschrieben, nicht der Aktivierungsweg über Gal α 1-3Gal-Antikörper, sondern ein weiterer Weg eine Rolle zu spielen. Im Laufe der Untersuchung möglicher Übertragungswege von KoRV auf Ratten stellte sich heraus, dass das Virus durch Kontakt zu Kot und Urin infizierter Tiere übertragen werden kann. Um die Bestimmung der zellassoziierten Viruslast in Ratten- und Koala-Proben zu verbessern, wurde das bestehende Real-time-PCR-System optimiert. Zur Vervollständigung des immunologischen Nachweissystems sowie zur Bestimmung der Viruslast wurde mit der Etablierung eines Gag *Capture* ELISAs begonnen, wozu vier KoRV p27Gag-Fragmente kloniert, exprimiert und teilweise in Ratten appliziert wurden. Um den Einfluss der Länge der Ektodomäne auf die Induktion neutralisierender Antikörper zu untersuchen, wurden fünf, N-terminal bis ins Fusionspeptid verlängerte, p15E-Konstrukte rekombinant hergestellt. In Ratten konnten mit jedem Konstrukt neutralisierende Antikörper induziert werden, Unterschiede im Titer wurden jedoch nicht beobachtet.

Im Rahmen der Diplomarbeit wurden zusammenfassend weitere Erkenntnisse zur Übertragung des KoRV *in vitro* und *in vivo* gewonnen. Die optimierten Nachweissysteme ermöglichen in Zukunft unter anderem ein besseres Monitoring der KoRV-Infektion, das etablierte Tiermodell dagegen Untersuchungen zur Pathogenität von KoRV sowie zur Effektivität verschiedener Impfstoffansätze.

Literaturverzeichnis

Abelson HT, Rabstein LS.: Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice, *Cancer Res.* 1970 Aug;30(8):2213-22

Adamson CS, Davies A, Soneoka Y, Nermut M, Mitrophanous K, Jones IM: A block in virus-like particle maturation following assembly of murine leukaemia virus in insect cells, *Virology.* 2003 Sep 30;314(2):488-96

Adamson CS, Nermut M, Jones IM: Control of human immunodeficiency virus type-1 protease activity in insect cells expressing Gag-Pol rescues assembly of immature but not mature virus-like particles, *Virology.* 2003 Mar 30;308(1):157-65

Albrecht C, Szeinfeld D, Olivier A, Wynchank S.: Theoretical and experimental considerations linking an environmental stress to expression of endogenous retroviruses in a mammalian tumour, *Med Hypotheses.* 1990 Jun;32(2):101-5

Anderson MM, Lauring AS, Burns CC, Overbaugh J.: Identification of a cellular cofactor required for infection by feline leukemia virus, *Science.* 2000 Mar 10;287(5459):1828-30

Armstrong JA, Porterfield JS, De Madrid AT.: C-type virus particles in pig kidney cell lines, *J Gen Virol.* 1971 Feb;10(2):195-8

Baltimore D.: Viral RNA-dependent DNA polymerase. 1970, *Biotechnology.* 1992;24:3-5

Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L.: Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS), *Science.* 1983 May 20;220(4599):868-71

Bellamy-McIntyre AK, Lay CS, Bar S, Maerz AL, Talbo GH, Drummer HE, Pombourios P.: Functional links between the fusion peptide-proximal polar segment and membrane-proximal region of human immunodeficiency virus type 1 gp41 in distinct phases of membrane fusion, *J Biol Chem.* 2007 May 25

Björkbacka H, Fitzgerald KA, Huet F, Li X, Gregory JA, Lee MA, Ordija CM, Dowley NE, Golenbock DT, Freeman MW.: The induction of macrophage gene expression by LPS predominantly utilizes Myd88-independent signaling cascades, *Physiol Genomics.* 2004 Nov 17;19(3):319-30

Blond JL, Lavillette D, Cheynet V, Bouton O, Oriol G, Chapel-Fernandes S, Mandrand B, Mallet F, Cosset FL.: An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor, *J Virol.* 2000 Apr;74(7):3321-9

Bönsch D, Kammer W, Lischke A, Friedrich K: Species-specific agonist/antagonist activities of human interleukin-4 variants suggest distinct ligand binding properties of human and murine common receptor gamma chain, *J Biol Chem.* 1995 Apr 14;270(15):8452-7

Bortz J, Lienert GA, Boehnke K: Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik; 2., korrigierte und aktualisierte Auflage, Springer Verlag Berlin 2000, S. 222 ff.

Bortz J: Statistik für Sozialwissenschaftler, 3., neu bearbeitete Auflage, Springer Verlag Berlin, 1989, S. 261, 404 ff.

- Bradford MM:** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54
- Breese SS Jr.:** Virus-like particles occurring in cultures of stable pig kidney cell lines. Brief report, *Arch Gesamte Virusforsch.* 1970;30(4):401-4
- Brojatsch J, Kristal BS, Viglianti GA, Khirya R, Hoover EA, Mullins JI:** Feline leukemia virus subgroup C phenotype evolves through distinct alterations near the N terminus of the envelope surface glycoprotein, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Sep 15;89(18):8457-61
- Brown JK, Fung C, Tailor CS.:** Comprehensive mapping of receptor-functioning domains in feline leukemia virus subgroup C receptor FLVCR1, *J Virol.* 2006 Feb;80(4):1742-51
- Burtonboy G, Delferriere N, Mousset B, Heusterspreute M:** Isolation of a C-type retrovirus from an HIV infected cell line, *Arch Virol.* 1993;130(3-4):289-300
- Cheng X, Mukhtar M, Acheampong EA, Srinivasan A, Rafi M, Pomerantz RJ, Parveen Z:** HIV-1 Vpr potently induces programmed cell death in the CNS in vivo, *DNA Cell Biol.* 2007 Feb;26(2):116-31
- Clauß G, Ebener H:** Grundlagen der Statistik für Psychologen, Pädagogen und Soziologen; *Volk und Wissen Volkseigener Verlag Berlin, 1970, S. 282 ff.*
- Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR.:** Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1, *Nature.* 1996 Jun 20;381(6584):661-6
- Dimitrov AS, Jacobs A, Finnegan CM, Stiegler G, Katinger H, Blumenthal R.:** Exposure of the membrane-proximal external region of HIV-1 gp41 in the course of HIV-1 envelope glycoprotein-mediated fusion, *Biochemistry.* 2007 Feb 6;46(5):1398-401
- Doolittle WF, Sapienza C.:** Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution, *Nature.* 1980 Apr 17;284(5757):601-3
- Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms RW.:** A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors, *Cell.* 1996 Jun 28;85(7):1149-58
- Ericsson TA, Takeuchi Y, Templin C, Quinn G, Farhadian SF, Wood JC, Oldmixon BA, Suling KM, Ishii JK, Kitagawa Y, Miyazawa T, Salomon DR, Weiss RA, Patience C.:** Identification of receptors for pig endogenous retrovirus, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May 27;100(11):6759-64
- Fan J, Kodama E, Koh Y, Nakao M, Matsuoka M.:** Halogenated thymidine analogues restore the expression of silenced genes without demethylation, *Cancer Res.* 2005 Aug 1;65(15):6927-33
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA.:** HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, *Science.* 1996 May 10;272(5263):872-7
- Fiebig U., Hartmann M.G., Bannert N., Kurth R., Denner J.:** Transspecies Transmission of the Endogenous Koala Retrovirus, *Journal of Virology, June 2006, p. 5651-5654, Vol. 80, No. 11*

Fiebig, U., Schmolke, M., Karlas, A., Kurth, R., Denner, J: Induction of anti-viral neutralising antibodies in humans and animals, *World Intellectual Property Organisation patent 2005; WO 2005/021574*

Fiebig, U., Stephan, O., Kurth, R., Denner, J: Neutralizing antibodies against conserved domains of p15E of porcine endogenous retroviruses (PERVs): basis for a vaccine for xenotransplantation?, *Virology. 2003 Mar 15;307(2):406-413*

Franca R, Spadari S, Maga G: APOBEC deaminases as cellular antiviral factors: a novel natural host defense mechanism, *Med Sci Monit. 2006 May;12(5):RA92-8*

Frank O, Jones-Brando L, Leib-Mosch C, Yolken R, Seifarth W: Altered transcriptional activity of human endogenous retroviruses in neuroepithelial cells after infection with *Toxoplasma gondii*, *J Infect Dis. 2006 Nov 15;194(10):1447-9*

Fujita F, Yamashita-Futsuki I, Eguchi S, Kamohara Y, Fujioka H, Yanaga K, Furui J, Moriuchi R, Kanematsu T, Katamine S: Inactivation of porcine endogenous retrovirus by human serum as a function of complement activated through the classical pathway, *Hepato Res. 2003 Jun;26(2):106-113*

Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T: The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation, *J Biol Chem. 2003 Feb 7;278(6):4035-40*

Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, Mann D, Sidhu GD, Stahl RE, Zolla-Pazner S, Leibowitch J, Popovic M.: Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS), *Science. 1983 May 20;220(4599):865-7*

Gallo RC: History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2, *Oncogene. 2005 Sep 5;24(39):5926-30*

Hager-Braun C, Katinger H, Tomer KB.: The HIV-neutralizing monoclonal antibody 4E10 recognizes N-terminal sequences on the native antigen, *J Immunol. 2006 Jun 15;176(12):7471-81*

Hanger JJ, Bromham LD, McKee JJ, O'Brien TM, Robinson WF: The Nucleotide Sequence of Koala (*Phascolarctos cinereus*) Retrovirus: a Novel Type C Endogenous Virus Related to Gibbon Ape Leukemia Virus, *J Virol. 2000 May; 74(9):4264-72.*

Herniou E, Martin J, Miller K, Cook J, Wilkinson M, Tristem M: Retroviral diversity and distribution in vertebrates. *J Virol. 1998 Jul;72(7):5955-66*

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY). 1992 Apr;10(4):413-7*

<http://en.wikipedia.org/wiki/Retrovirus>

<http://www.activemotif.com>

<http://www.appliedbiosystems.com>

<http://www.hiv.lanl.gov>

<http://www.stratgene.com>

<http://www.unaids.org/>

<http://www.vu-wien.ac.at/i123/spezvir/retrovir1.html>

<http://www.who.int/>

Janeway CA, Travers P: Immunologie, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 1997

Jawetz E, Baker WH.: A pneumotropic pasteurilla of laboratory animals; pathological and immunological studies with the organism, *J Infect Dis.* 1950 Mar-Apr;86(2):184-96

Jawetz E.: A pneumotropic pasteurilla of laboratory animals; bacteriological and serological characteristics of the organism, *J Infect Dis.* 1950 Mar-Apr;86(2):172-83

Kawakami TG, Huff SD, Buckley PM, Dungworth DL, Synder SP, Gilden RV: C-type virus associated with gibbon lymphosarcoma, *Nat New Biol.* 1972 Feb 9;235(58):170-1

Kim HT, Tasca S, Qiang W, Wong PK, Stoica G. Induction of p53 accumulation by Moloney murine leukemia virus-ts1 infection in astrocytes via activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2, *Lab Invest.* 2002 Jun;82(6):693-702

Klein G: Perspectives in studies of human tumor viruses, *Front Biosci.* 2002 Jan 1;7:d268-74

Knippers, R: Molekulare Genetik, 9., komplett überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2006, S. 392ff., 438ff., 531ff.

Krause B, Metzler P: Angewandte Statistik; 2., überarbeitete Auflage, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin, 1988, S. 451

Landry JR, Medstrand P, Mager DL: Repetitive elements in the 5' untranslated region of a human zinc-finger gene modulate transcription and translation efficiency, *Genomics.* 2001 Aug;76(1-3):110-6

Langhammer S: Neutralisierende Antikörper gegen die transmembranen Hüllproteine von Retroviren; *Dissertation, 2005*

Lappin MR: Opportunistic infections associated with retroviral infections in cats, *Semin Vet Med Surg (Small Anim).* 1995 Nov;10(4):244-50

Lau CY, Velasco PP, Johnston MI: A new era in HIV vaccine development, *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2007 Apr;5(2):205-15

Lauring AS, Anderson MM, Overbaugh J. Specificity in receptor usage by T-cell-tropic feline leukemia viruses: implications for the in vivo tropism of immunodeficiency-inducing variants. *J Virol.* 2001 Oct;75(19):8888-98

Lee SY, Howard TM, Rasheed S: Genetic analysis of the rat leukemia virus: influence of viral sequences in transduction of the c-ras proto-oncogene and expression of its transforming activity, *J Virol.* 1998 Dec;72(12):9906-17

Lewin, B: Molekularbiologie der Gene, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2002, S. 481 - 490

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

- Lieber MM, Sherr CJ, Benveniste RE, Todaro GJ:** Biologic and immunologic properties of porcine type C viruses, *Virology*. 1975 Aug;66(2):616-9
- Lieber MM, Sherr CJ, Todaro GJ, Benveniste RE, Callahan R, Coon HG:** Isolation from the asian mouse *Mus caroli* of an endogenous type C virus related to infectious primate type C viruses, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Jun;72(6):2315-9
- Lorizate M, Gomara MJ, de la Torre BG, Andreu D, Nieva JL:** Membrane-transferring sequences of the HIV-1 Gp41 ectodomain assemble into an immunogenic complex, *J Mol Biol*. 2006 Jun 30;360(1):45-55
- Luo L, Li Y, Kang CY:** Expression of gag precursor protein and secretion of virus-like gag particles of HIV-2 from recombinant baculovirus-infected insect cells, *Virology*. 1990 Dec;179(2):874-80
- Luo M., Yuan F., Liu Y., Jiang S., Song X., Pengfei J., Xiaolei Y., Mingxiao D., Hongkui D.:** Induction of neutralizing antibody against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by immunization with gp41 membrane-proximal external region (MPER) fused with porcine endogenous retrovirus (PERV) p15E fragment, *Vaccine* 24 (2006) 435-442
- Medstrand P, Landry JR, Mager DL:** Long terminal repeats are used as alternative promoters for the endothelin B receptor and apolipoprotein C-I genes in humans, *J Biol Chem*. 2001 Jan 19;276(3):1896-903.
- Mendoza R, Anderson MM, Overbaugh J:** A putative thiamine transport protein is a receptor for feline leukemia virus subgroup A, *J Virol*. 2006 Apr;80(7):3378-85
- Modrow S, Falke D, Truyen U:** Molekulare Virologie, 2. Auflage, *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*, 2003; S. 390-435
- Nanua S, Yoshimura FK.** Differential cell killing by lymphomagenic murine leukemia viruses occurs independently of p53 activation and mitochondrial damage, *J Virol*. 2004 May;78(10):5088-96
- Oliveira N.M., Farrell K.B., Eiden M.V.:** *In Vitro* Characterization of a KoalaRetrovirus, *J Virol*. 2006 Mar;80(6):3104-3107
- Orgel LE, Crick FH, Sapienza C:** Selfish DNA, *Nature*. 1980 Dec 25;288(5792):645-6
- Orgel LE, Crick FH:** Selfish DNA: the ultimate parasite, *Nature*. 1980 Apr 17;284(5757):604-7
- Oroszlan S, Bova D, Huebner RJ, Gilden RV:** Major group-specific protein of rat type C viruses, *J Virol*. 1972 Oct;10(4):746-50
- Orth JH, Aktories K, Kubatzky KF:** Modulation of host cell gene expression through activation of STAT transcription factors by *Pasteurella multocida* toxin, *J Biol Chem*. 2007 Feb 2;282(5):3050-7
- Orth JH, Lang S, Taniguchi M, Aktories K:** *Pasteurella multocida* toxin-induced activation of RhoA is mediated via two families of G{alpha} proteins, G{alpha}q and G{alpha}12/13, *J Biol Chem*. 2005 Nov 4;280(44):36701-7
- Overbaugh J, Miller AD, Eiden MV:** Receptors and entry cofactors for retroviruses include single and multiple transmembrane-spanning proteins as well as newly described glycoposphatidylinositol-anchored and secreted proteins, *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001 Sep;65(3):371-89

- Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA:** Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs, *Nat Med.* 1997 Mar;3(3):282-6
- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC:** Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 Dec;77(12):7415-9
- Ponferrada VG, Mauck BS, Wooley DP:** The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus HERV-W induces cellular resistance to spleen necrosis virus, *Arch Virol.* 2003 Apr;148(4):659-75
- Poteracki J, Walsh KM:** Spontaneous neoplasms in control Wistar rats: a comparison of reviews, *Toxicol Sci.* 1998 Sep;45(1):1-8
- Pruss D, Reeves R, Bushman FD, Wolffe AP:** The influence of DNA and nucleosome structure on integration events directed by HIV integrase, *J Biol Chem.* 1994 Oct 7;269(40):25031-41
- Pryciak PM, Varmus HE:** Nucleosomes, DNA-binding proteins, and DNA sequence modulate retroviral integration target site selection, *Cell.* 1992 May 29;69(5):769-80
- Purtscher M, Trkola A, Gruber G, Buchacher A, Predl R, Steindl F, Tauer C, Berger R, Barrett N, Jungbauer A:** A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp41 of human immunodeficiency virus type 1, *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1994 Dec;10(12):1651-8
- Quinn G, Wood JC, Ryan DJ, Suling KM, Moran KM, Kolber-Simonds DL, Greenstein JL, Schuurman HJ, Hawley RJ, Patience C:** Porcine endogenous retrovirus transmission characteristics of galactose alpha1-3 galactose-deficient pig cells, *J Virol.* 2004 Jun;78(11):5805-11
- Rohn JL, Moser MS, Gwynn SR, Baldwin DN, Overbaugh J:** In vivo evolution of a novel, syncytium-inducing and cytopathic feline leukemia virus variant, *J Virol.* 1998 Apr;72(4):2686-96
- Rote NS, Chakrabarti S, Stetzer BP:** The role of human endogenous retroviruses in trophoblast differentiation and placental development, *Placenta.* 2004 Sep-Oct;25(8-9):673-83
- Ruprecht K, Obojes K, Wengel V, Gronen F, Kim KS, Perron H, Schneider-Schaulies J, Rieckmann P.:** Regulation of human endogenous retrovirus W protein expression by herpes simplex virus type 1: implications for multiple sclerosis, *J Neurovirol.* 2006 Feb;12(1):65-71.
- Saha K, Zhang J, Gupta A, Dave R, Yimen M, Zerhouni B:** Isolation of primary HIV-1 that target CD8+ T lymphocytes using CD8 as a receptor, *Nat Med.* 2001 Jan;7(1):65-72
- Saha K, Zhang J, Zerhouni B:** Evidence of productively infected CD8+ T cells in patients with AIDS: implications for HIV-1 pathogenesis, *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2001 Mar 1;26(3):199-207
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR:** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74(12):5463-7
- Schägger H, Aquila H, Von Jagow G:** Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis, *Anal Biochem.* 1988 Aug 15;173(1):201-5

- Sebastian S, Luban J:** The Retroviral Restriction Factor TRIM5alpha, *Curr Infect Dis Rep.* 2007 Mar;9(2):167-73
- Snyder SP, Theilen GH:** Transmissible feline fibrosarcoma, *Nature.* 1969 Mar 15;221(5185):1074-.
- Sonobe MH, Bravo R, Armelin MS:** Imbalanced expression of cellular nuclear oncogenes caused by v-sis/PDGF-2, *Oncogene.* 1991 Sep;6(9):1531-7
- Sparkes AH:** Feline leukaemia virus: a review of immunity and vaccination, *J Small Anim Pract.* 1997 May;38(5):187-94
- Specke V, Tacke SJ, Boller K, Schwendemann J, Denner J:** Porcine endogenous retroviruses: in vitro host range and attempts to establish small animal models, *J Gen Virol.* 2001 Apr;82(Pt 4):837-44
- Stauffer Y, Marguerat S, Meylan F, Ucla C, Sutkowski N, Huber B, Pelet T, Conrad B:** Interferon-alpha-induced endogenous superantigen. a model linking environment and autoimmunity, *Immunity.* 2001 Oct;15(4):591-601
- Stewart MA, Warnock M, Wheeler A, Wilkie N, Mullins JI, Onions DE, Neil JC:** 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.* 1986 Jun;58(3):825-34
- Stoye JP, Moroni C:** Endogenous retrovirus expression in stimulated murine lymphocytes. Identification of a new locus controlling mitogen induction of a defective virus, *J Exp Med.* 1983 May 1;157(5):1660-74
- Tacke SJ, Specke V, Denner J:** Differences in release and determination of subtype of porcine endogenous retroviruses produced by stimulated normal pig blood cells, *Intervirology.* 2003;46(1):17-24
- Taylor C.S., Lavillette D., Marin M., Kabat D.:** Cell surface receptors for gammaretroviruses, *Curr Top Microbiol Immunol.* 2003;281:29-106
- Tarlinton R., Meers J., Young P.R.:** Retroviral Invasion of the koala genome, *Nature Vol* 442, 6 July 2006, p.79-81
- Teitz Y, Lennette EH, Oshiro LS, Cremer NE:** Release of C-type particles from normal rat thymus cultures and those infected with Moloney leukemia virus, *J Natl Cancer Inst.* 1971 Jan;46(1):11-23
- Temin HM, Mizutani S:** RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus, *Nature.* 1970 Jun 27;226(5252):1211-3
- Tenenbaum SA, Voss TG, Garry RF, Gallaher WR:** Sequence similarities between retroviral proteins and components of the spliceosome, *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1994 May;10(5):521-2
- Todaro GJ, Lieber MM, Benveniste RE, Sherr CJ:** Infectious primate type C viruses: Three isolates belonging to a new subgroup from the brains of normal gibbons, *Virology.* 1975 Oct;67(2):335-43
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J:** Immunoblotting in the clinical laboratory, *J Clin Chem Clin Biochem.* 1989 Aug;27(8):495-501

- Tsuchida N, Gilden RV, Hatanaka M:** Sarcoma-virus-related RNA sequences in normal rat cells, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974 Nov;71(11):4503-7
- Urisman A, Molinaro RJ, Fischer N, Plummer SJ, Casey G, Klein EA, Malathi K, Magi-Galluzzi C, Tubbs RR, Ganem D, Silverman RH, Derisi JL.:** Identification of a Novel Gammaretrovirus in Prostate Tumors of Patients Homozygous for R462Q RNase L Variant, *PLoS Pathog.* 2006 Mar;2(3):e25
- Varmus HE:** Form and function of retroviral proviruses, *Science.* 1982 May 21;216(4548):812-20
- Villanueva RA, Campbell S, Roth MJ:** Molecular analysis of a recombinant M-MuLV/RaLV retrovirus, *Virology.* 2003 Oct 10;315(1):195-208
- Vobis M, D'Haese J, Mehlhorn H, Mencke N:** Evidence of horizontal transmission of feline leukemia virus by the cat flea (*Ctenocephalides felis*), *Parasitol Res.* 2003 Dec;91(6):467-70
- Weinstein MC, Goldie SJ, Losina E, Cohen CJ, Baxter JD, Zhang H, Kimmel AD, Freedberg KA:** Use of genotypic resistance testing to guide hiv therapy: clinical impact and cost-effectiveness, *Ann Intern Med.* 2001 Mar 20;134(6):440-50
- Wilson CA, Wong S, Muller J, Davidson CE, Rose TM, Burd P.** Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells, *J Virol.* 1998 Apr;72(4):3082-7
- Wilson CA, Wong S, VanBrocklin M, Federspiel MJ.** Extended analysis of the in vitro tropism of porcine endogenous retrovirus, *J Virol.* 2000 Jan;74(1):49-56
- Wu JY, Gardner BH, Murphy CI, Seals JR, Kensil CR, Recchia J, Beltz GA, Newman GW, Newman MJ:** Saponin adjuvant enhancement of antigen-specific immune responses to an experimental HIV-1 vaccine, *J Immunol.* 1992 Mar 1;148(5):1519-25
- Wurzbacher C:** Immunisierung mit den Oberflächenhüllproteinen der porzinen endogenen Retroviren (PERV) und des Koala-Retrovirus (KoRV) zur Generierung neuer Diagnostika und Impfstoffe; *Diplomarbeit, 2007*
- Zwick MB, Labrijn AF, Wang M, Spenlehauer C, Saphire EO, Binley JM, Moore JP, Stiegler G, Katinger H, Burton DR, Parren PW:** Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41, *J Virol.* 2001 Nov;75(22):10892-905
- Zwick MB, Wang M, Poignard P, Stiegler G, Katinger H, Burton DR, Parren PW:** Neutralization synergy of human immunodeficiency virus type 1 primary isolates by cocktails of broadly neutralizing antibodies, *J Virol.* 2001 Dec;75(24):12198-208

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Reinhard Kurth danke ich herzlich für die Möglichkeit, meine Diplomarbeit am Robert Koch-Institut anzufertigen, für die Übernahme der externen Begutachtung sowie für zahlreiche fachliche Anregungen.

Bei Herrn Dr. Joachim Denner möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe P13, die aufmerksame Betreuung und die stete Gesprächs- / Diskussionsbereitschaft bedanken.

Für die interne Begutachtung und das Interesse an meiner Diplomarbeit bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Richard Lucius.

Großer Dank gilt meinem Betreuer Uwe Fiebig, der mir die Mitarbeit am Thema KoRV ermöglicht, mich stets geduldig beraten und angeleitet sowie das Korrekturlesen meiner Arbeit übernommen hat. Seine vielfältigen Ideen und Anregungen haben wesentlich zur Entstehung der Diplomarbeit beigetragen und mir sehr geholfen.

Bei Rayk Behrendt möchte ich mich herzlich für seine Hilfsbereitschaft und viele nützliche Ratschläge bedanken.

Kerstin Petsch danke ich für die Einweisung in die Handhabung der vorhandenen Geräte, für die Durchführung zahlreicher Western Blots und PCRs sowie für ihre aufmunternden Worte.

Martina Lau und Christa-Maria Schmidt möchte ich für ihre Hilfe und ihre Tipps bei der Proteinaufreinigung danken.

Bei Britta Dieckhoff und Magdalena Konczal bedanke ich mich für ihre Hinweise zum Schreiben der Diplomarbeit, für ihre fachlichen Vorschläge sowie für ihre moralische Unterstützung.

Sven Stengel möchte ich dafür danken, dass er mir viele interessante experimentelle Ansätze aufgezeigt hat.

Meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Freunden danke ich herzlich für die Unterstützung, aber auch die Zerstreuung während des gesamten Studiums.

Anhang

Statistik

ELISA Rotationsversuch

***** Analysis of Variance *****

12 cases accepted.
0 cases rejected because of out-of-range factor values.
0 cases rejected because of missing data.
1 non-empty cell.

***** Analysis of Variance -- design 1 *****

Tests of Between-Subjects Effects.
Tests of Significance for T1 using UNIQUE sums of squares

Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F
WITHIN+RESIDUAL	,36	11	,03		
CONSTANT	4,15	1	4,15	126,29	,000

***** Analysis of Variance -- design 1 *****

Tests involving 'FACTOR1' Within-Subject Effect.

Mauchly sphericity test, $W =$,71228
Chi-square approx. = 3,39289 with 2 D. F.
Significance = ,183

Greenhouse-Geisser Epsilon = ,77656
Huynh-Feldt Epsilon = ,88058
Lower-bound Epsilon = ,50000

AVERAGED Tests of Significance that follow multivariate tests are equivalent to univariate or split-plot or mixed-model approach to repeated measures. Epsilons may be used to adjust d.f. for the AVERAGED results.

***** Analysis of Variance -- design 1 *****

EFFECT .. FACTOR1
ultivariate Tests of Significance (S = 1, M = 0, N = 4)

Test Name	Value	Exact F	Hypoth. DF	Error DF	Sig. of F
Pillais	,83404	25,12769	2,00	10,00	,000
Hotellings	5,02554	25,12769	2,00	10,00	,000
Wilks	,16596	25,12769	2,00	10,00	,000
Roys	,83404				

Note.. F statistics are exact.

***** Analysis of Variance -- design 1 *****

Tests involving 'FACTOR1' Within-Subject Effect.

AVERAGED Tests of Significance for VAR using UNIQUE sums of squares

Source of Variation	SS	DF	MS	F	Sig of F
WITHIN+RESIDUAL	,48	22	,02		
FACTOR1	1,27	2	,64	28,88	,000

----- Friedman Two-Way Anova

	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
VAR1	12	,108750	,071482	,026	,275
VAR2	12	,340167	,157393	,069	,651
VAR3	12	,569417	,216903	,158	,945

Mean Rank	Variable	
1,00	VAR1	Ausgangswert PI
2,17	VAR2	28.11.06
2,83	VAR3	01.02.07

Cases	Chi-Square	D.F.	Significance
12	20,6667	2	3,25E-05

----- Kendall Coefficient of Concordance

Mean Rank	Variable	
1,00	VAR1	Ausgangswert PI
2,17	VAR2	28.11.06
2,83	VAR3	01.02.07

Cases	W	Chi-Square	D.F.	Significance
12	8,611E-01	20,6667	2	3,25E-05

KoRV-Neutralisationsassay Immunisierungsstudie BfR

----- ONEWAY -----

Variable HEMMUNG
By Variable VAR00002

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	4	875,8579	218,9645	1,3736	,2898
Within Groups	15	2391,0970	159,4065		
Total	19	3266,9549			

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int for Mean
Grp 1	4	87,8968	5,8941	2,9471	78,5180 TO 97,2755
Grp 2	4	85,0730	10,8199	5,4100	67,8563 TO 102,2897
Grp 3	4	77,6370	17,7500	8,8750	49,3933 TO 105,8807
Grp 4	4	85,4855	11,6142	5,8071	67,0050 TO 103,9660
Grp 5	4	69,8838	13,9739	6,9869	47,6485 TO 92,1190
Total	20	81,1952	13,1128	2,9321	75,0582 TO 87,3322

GROUP	MINIMUM	MAXIMUM
Grp 1	79,7500	93,2380
Grp 2	73,0210	95,0900
Grp 3	52,7720	92,7360
Grp 4	68,1350	92,3150
Grp 5	54,9290	88,6600
TOTAL	52,7720	95,0900

Levene Test for Homogeneity of Variances

Statistic	df1	df2	2-tail Sig.
,7533	4	15	,571

----- O N E W A Y -----

Variable HEMMUNG
By Variable VAR00002

Multiple Range Tests: Duncan test with significance level ,05

The difference between two means is significant if
 $MEAN(J) - MEAN(I) \geq 8,9277 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
 with the following value(s) for RANGE:

Step	2	3	4	5
RANGE	3,01	3,16	3,26	3,31

- No two groups are significantly different at the ,050 level

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1					
Group	Grp 5	Grp 3	Grp 2	Grp 4	Grp 1
Mean	69,8838	77,6370	85,0730	85,4855	87,8968

----- O N E W A Y -----

Variable HEMMUNG
By Variable VAR00002

Multiple Range Tests: Student-Newman-Keuls test with significance level ,050

The difference between two means is significant if
 $MEAN(J) - MEAN(I) \geq 8,9277 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
 with the following value(s) for RANGE:

Step	2	3	4	5
RANGE	3,02	3,67	4,07	4,37

- No two groups are significantly different at the ,050 level

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1					
Group	Grp 5	Grp 3	Grp 2	Grp 4	Grp 1
Mean	69,8838	77,6370	85,0730	85,4855	87,8968

----- ONEWAY -----

Variable HEMMUNG
By Variable VAR00002

Multiple Range Tests: Scheffe test with significance level ,05

The difference between two means is significant if
 $MEAN(J)-MEAN(I) \geq 8,9277 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
with the following value(s) for RANGE: 4,94

- No two groups are significantly different at the ,050 level

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 5	Grp 3	Grp 2	Grp 4	Grp 1
Mean	69,8838	77,6370	85,0730	85,4855	87,8968
	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
HEMMUNG	20	81,195198	13,112780	52,772	95,090
VAR00002	20	3,000000	1,450953	1,000	5,000

----- Kruskal-Wallis 1-Way Anova

HEMMUNG
by VAR00002

Mean Rank	Cases	
13,00	4	VAR00002 = 1 ohne Extension
13,25	4	VAR00002 = 2 N + 6
8,75	4	VAR00002 = 3 N + 12
12,00	4	VAR00002 = 4 N + 18
5,50	4	VAR00002 = 5 N + 25
	20	Total

Corrected for ties					
Chi-Square	D.F.	Significance	Chi-Square	D.F.	Significance
5,0429	4	,2829	5,0429	4	,2829

KoRV-Neutralisationsassay Immunisierungsstudie RKI

----- ONEWAY -----

Variable HEMMUNG
By Variable VAR00002

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	4	677,9109	169,4777	1,2881	,3186
Within Groups	15	1973,6086	131,5739		
Total	19	2651,5195			

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int for Mean
Grp 1	4	95,8955	2,4839	1,2420	91,9431 TO 99,8479
Grp 2	4	94,5603	7,1189	3,5595	83,2326 TO 105,8879
Grp 3	4	86,9005	7,5967	3,7983	74,8127 TO 98,9883
Grp 4	4	96,4278	2,1194	1,0597	93,0553 TO 99,8002
Grp 5	4	81,6933	23,2125	11,6062	44,7576 TO 118,6289
Total	20	91,0955	11,8133	2,6415	85,5667 TO 96,6242

GROUP	MINIMUM	MAXIMUM
Grp 1	93,7730	99,4720
Grp 2	83,9380	98,7410
Grp 3	76,3150	94,2470
Grp 4	94,3750	99,1920
Grp 5	47,0880	96,8500
TOTAL	47,0880	99,4720

Levene Test for Homogeneity of Variances

Statistic	df1	df2	2-tail Sig.
4,6972	4	15	,012

----- O N E W A Y -----

Variable HEMMUNG
By Variable VAR00002

Multiple Range Tests: Duncan test with significance level ,05

The difference between two means is significant if
 $MEAN(J)-MEAN(I) \geq 8,1109 * RANGE * SQRT(1/N(I) + 1/N(J))$
 with the following value(s) for RANGE:

Step	2	3	4	5
RANGE	3,01	3,16	3,26	3,31

- No two groups are significantly different at the ,050 level

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1	Grp 5	Grp 3	Grp 2	Grp 1	Grp 4
Mean	81,6933	86,9005	94,5603	95,8955	96,4278

----- O N E W A Y -----

Variable HEMMUNG
By Variable VAR00002

Multiple Range Tests: Student-Newman-Keuls test with significance level ,050

The difference between two means is significant if
 $MEAN(J)-MEAN(I) \geq 8,1109 * RANGE * SQRT(1/N(I) + 1/N(J))$
 with the following value(s) for RANGE:

Step	2	3	4	5
RANGE	3,02	3,67	4,07	4,37

- No two groups are significantly different at the ,050 level

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 5	Grp 3	Grp 2	Grp 1	Grp 4
Mean	81,6933	86,9005	94,5603	95,8955	96,4278

----- O N E W A Y -----

Variable HEMMUNG
By Variable VAR00002

Multiple Range Tests: Scheffe test with significance level ,05

The difference between two means is significant if
 $MEAN(J)-MEAN(I) \geq 8,1109 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
 with the following value(s) for RANGE: 4,94

- No two groups are significantly different at the ,050 level

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 5	Grp 3	Grp 2	Grp 1	Grp 4
Mean	81,6933	86,9005	94,5603	95,8955	96,4278

	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
HEMMUNG	20	91,095451	11,813283	47,088	99,472
VAR00002	20	3,000000	1,450953	1,000	5,000

----- Kruskal-Wallis 1-Way Anova

HEMMUNG
by VAR00002

Mean Rank	Cases	
13,00	4	VAR00002 = 1 ohne Extension
13,50	4	VAR00002 = 2 N + 6
5,00	4	VAR00002 = 3 N + 12
14,00	4	VAR00002 = 4 N + 18
7,00	4	VAR00002 = 5 N + 25
	20	Total

			Corrected for ties		
Chi-Square	D.F.	Significance	Chi-Square	D.F.	Significance
8,0000	4	,0916	8,0000	4	,0916

KoRV-Neutralisationsassay Rotationsversuch

----- ONEWAY -----

Variable HEMMUNG
By Variable INFEKT

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	2	13,6688	6,8344	1,3910	,2976
Within Groups	9	44,2182	4,9131		
Total	11	57,8869			

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int for Mean
Grp 1	4	91,2958	3,7354	1,8677	85,3520 TO 97,2395
Grp 2	4	91,9023	,6347	,3173	90,8924 TO 92,9121
Grp 3	4	93,8013	,6193	,3096	92,8158 TO 94,7867
Total	12	92,3331	2,2940	,6622	90,8755 TO 93,7906

GROUP	MINIMUM	MAXIMUM
Grp 1	86,6740	95,7630
Grp 2	91,1270	92,5700
Grp 3	93,3200	94,6830
TOTAL	86,6740	95,7630

----- ONEWAY -----

Variable HEMMUNG
By Variable INFEKT

Multiple Range Tests: Duncan test with significance level ,05

The difference between two means is significant if
 $MEAN(J)-MEAN(I) \geq 1,5673 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
 with the following value(s) for RANGE:

Step	2	3
RANGE	3,19	3,34

- No two groups are significantly different at the ,050 level

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1	Grp 1	Grp 2	Grp 3
Group	Grp 1	Grp 2	Grp 3
Mean	91,2958	91,9023	93,8013

----- ONEWAY -----

Variable HEMMUNG
By Variable INFEKT

Multiple Range Tests: Student-Newman-Keuls test with significance level ,050

The difference between two means is significant if
 $MEAN(J) - MEAN(I) \geq 1,5673 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
 with the following value(s) for RANGE:

Step	2	3
RANGE	3,21	3,94

- No two groups are significantly different at the ,050 level

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1			
Group	Grp 1	Grp 2	Grp 3
Mean	91,2958	91,9023	93,8013

----- O N E W A Y -----

Variable HEMMUNG
 By Variable INFEKT

Multiple Range Tests: Scheffe test with significance level ,05

The difference between two means is significant if
 $MEAN(J) - MEAN(I) \geq 1,5673 * RANGE * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$
 with the following value(s) for RANGE: 4,13

- No two groups are significantly different at the ,050 level

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1			
Group	Grp 1	Grp 2	Grp 3
Mean	91,2958	91,9023	93,8013

----- Kruskal-Wallis 1-Way Anova

	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
HEMMUNG	12	92,333084	2,294002	86,674	95,763
INFEKT	12	2,000000	,852803	1,000	3,000

HEMMUNG
 by INFEKT

Mean Rank	Cases	
5,00	4	INFEKT = 1 nicht infiziert, fes
5,00	4	INFEKT = 2 infiziert, rotiert
9,50	4	INFEKT = 3 nicht infiziert, rotier
	12	Total

			Corrected for ties		
Chi-Square	D.F.	Significance	Chi-Square	D.F.	Significance
4,1538	2	,1253	4,1538	2	,1253

Proviruslast in verwandten Koalas

Variable	Cases	Mean	Std Dev
ALTER	5	10,0000	3,5355
KOPIEN	5	182,0000	123,9254

-- Correlation Coefficients --

	ALTER	KOPIEN
ALTER	1,0000 (5) P= ,	,4279 (5) P= ,472
KOPIEN	,4279 (5) P= ,472	1,0000 (5) P= ,

(Coefficient / (Cases) / 2-tailed Significance)

--- -KENDALL CORRELATION COEFFICIENTS ---

KOPIEN	,2000 N(5) Sig ,624 ALTER
--------	-------------------------------------

(Coefficient / (Cases) / 2-tailed Significance)

--- SPEARMAN CORRELATION COEFFICIENTS ---

KOPIEN	,3000 N(5) Sig ,624 ALTER
--------	-------------------------------------

(Coefficient / (Cases) / 2-tailed Significance)

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den