

Hemmung der Expression von HIV und porcinen endogenen Retroviren mittels RNA-Interferenz

Diplomarbeit

zur Erlangung des Grades

Diplom-Ingenieur für medizinische Biotechnologie

der Fakultät III für Prozesswissenschaften an der Technischen Universität Berlin

Angefertigt am Robert Koch-Institut im Zeitraum von November 2003 bis Juli 2004

eingereicht von

Jörg Votteler

(Matr. Nr 189252)

Berlin, im August 2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Retroviren.....	6
1.1.1	Einteilung der Retroviren.....	6
1.1.2	Aufbau der Retroviren.....	8
1.1.3	Genom der Retroviren.....	9
1.1.4	Replikation der Retroviren.....	10
1.1.5	Porcine endogene Retroviren (PERV).....	13
1.1.5.1	Bedeutung von PERV bei der Xenotransplantation.....	13
1.1.5.2	Aufbau und Klassifizierung.....	15
1.1.5.3	In vitro Infektionen von PERV.....	16
1.1.5.4	In vivo Infektiosität und Pathogenität.....	16
1.1.6	Das humane Immundefizienzvirus (HIV).....	18
1.1.6.1	Epidemiologie und Übertragung.....	18
1.1.6.2	Aufbau des Virus.....	19
1.1.6.3	Klinik und Pathogenese einer HIV-Infektion.....	21
1.1.6.4	Therapie und Prophylaxe.....	21
1.2	RNA-Interferenz.....	23
1.2.1	Molekularer Mechanismus der RNA-Interferenz.....	23
1.2.2	RNA-Interferenz in Säugetierzellen.....	24
1.2.3	Sequenzabhängige Eigenschaften für die Funktion der RNAi.....	26
1.2.4	RNA-Interferenz als genetischer Schutz vor PERV.....	27
1.2.5	RNA-Interferenz als neue Waffe gegen HIV.....	27
1.3	Lentivirus basierte Vektoren.....	28
1.4	Zielstellung.....	30
2	Material und Methoden.....	31
2.1	Molekularbiologische Methoden.....	31
2.1.1	Isolierung, Trennung und Reinigung von DNA.....	31
2.1.1.1	Isolierung genomischer DNA aus Zellen.....	31
2.1.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	31
2.1.1.3	Reinigung DNA-haltiger Lösungen.....	31
2.1.1.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	32
2.1.2	RNA-Isolierung.....	32
2.1.3	cDNA-Synthese.....	33
2.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	33

2.1.4.1	Primer-Design.....	34
2.1.4.2	Standard-PCR.....	34
2.1.4.3	High-Fidelity-PCR zur Herstellung des PERV-Klons.....	34
2.1.4.4	Mutagenese-PCR.....	36
2.1.4.5	Real-time-PCR.....	36
2.1.4.6	DNA-Sequenzierung.....	36
2.1.5	Restriktionsverdau.....	37
2.1.6	Ligation.....	37
2.1.7	Sonstige enzymatische DNA-Modifikationen.....	37
2.1.8	Vektoren zur shRNA-Expression.....	38
2.1.9	Oligos zur shRNA-Expression.....	38
2.1.10	Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....	39
2.1.11	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	40
2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	41
2.2.1	Proteinisolation aus Zellen.....	41
2.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	41
2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Zellektrophoresen (SDS-PAGE).....	41
2.2.4	Western-Blot.....	43
2.2.5	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	44
2.2.6	Reverse Transkriptase-Nachweis.....	44
2.3	Zellkulturtechnische Methoden.....	44
2.3.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	44
2.3.1.1	Verwendete primäre Zellen, Zelllinien und Medien.....	45
2.3.1.2	Passagieren der Zellen.....	46
2.3.1.3	Kryokonservierung der Zellen.....	47
2.3.2	Durchflusscytometrie (FCM).....	47
2.3.3	Transfektion eukaryotischer Zellen.....	47
2.3.3.1	Transfektion mit Lipofectamine 2000 (PERV).....	47
2.3.3.2	Transfektion mit Hilfe von Trans-Fast (PERV).....	48
2.3.3.3	Transfektion mit Hilfe des Nucleofector Kits (pNL4-3, pSUPER).....	48
2.3.3.4	Produktion der lentiviralen Partikel in 293FT Zellen.....	49
2.3.4	Infektion eukaryotischer Zellen und Virustiterbestimmung.....	52
3	Ergebnisse.....	53
3.1	Erstellung und Charakterisierung eines rekombinanten PERV-A/C-Molekularklons.....	53

3.1.1	Erstellung des Molekularklons aus 293-Zellen.....	53
3.1.2	Charakterisierung der LTR.....	55
3.1.3	Analyse der Vollängen-PERV-Sequenzen und ORFs.....	56
3.1.4	Transfektion eukaryotischer Zellen mit dem PERV-Klon.....	57
3.2	Hemmung von PERV mittels RNA-Interferenz (RNAi).....	61
3.3	Hemmung von HIV-1 mittels RNA-Interferenz.....	62
3.3.1	Hemmung der HIV-1-Expression in HeLa-P4-Zellen.....	62
3.3.2	Hemmung der HIV-1-Replikation in C8166-Zellen.....	64
3.3.2.1	Hemmung der HIV-1-Replikation mit Anti-rev- und Anti-gag-shRNAs in pSUPER.gfp/neo-Konstrukten.....	65
3.3.2.2	Hemmung der HIV-1-Replikation mit Anti-rev- und Anti-tat-shRNAs in Lentivirus-transduzierten C8166-Zellen.....	67
3.3.3	Überprüfung der siRNAs im Sfold-Programm.....	68
4	Diskussion.....	71
4.1	PERV-Molekularklon.....	71
4.2	Hemmung von PERV mittels RNA-Interferenz.....	73
4.3	Hemmung von HIV-1 mittels RNA-Interferenz.....	74
4.4	Ausblick.....	77
5	Zusammenfassung.....	78
6	Literaturverzeichnis.....	79
7	Anhang.....	

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
Ag	Antigen
bp	Basenpaar
C	Cytidin
CCR	Chemokinrezeptor für CC-Chemokine
cDNA	copy-DNA, in DNA umgeschriebene mRNA
CXCR4	Chemokinrezeptor für CXC-Chemokine
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	<i>desoxy ribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)
dsDNA/RNA	doppelsträngige DNA/RNA
Env	<i>envelope</i>
G	Guanin
Gag	<i>group specific antigen</i> (gruppenspezifisches Antigen)
HIV	<i>human immune deficiency virus</i>
IAVI	<i>international aids vaccine initiative</i>
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilo-Base
kD	Kilo-Dalton
LTR	<i>long terminal repeats</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MSL	<i>miniature swine lymphocytes</i>
Nt	Nucleotid
NF-Y	<i>nuclear factor Y</i>
NF-κB	<i>nuclear factor κB</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
PERV	porcines endogenes Retrovirus
Pol	Polymerase
RISC	<i>rna induced silencing complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonucleinsäure)
RNAi	RNA-Interferenz
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SCID	<i>severe combined immune deficiency</i>
SIV	<i>simian immune deficiency virus</i>
T	Thymin
WHO	<i>World Health Organisation</i>

1 Einleitung

1.1 Retroviren

Für Krankheiten, die wir heute als Viruserkrankungen kennen, konnten ursprünglich keine Krankheitserreger wie Bakterien oder Protozoen identifiziert werden. Daher nahm man Gifte als Auslöser der Krankheit an (Virus: lateinisch für „Gift“). Im Jahre 1892 konnte zum ersten mal gezeigt werden, dass ein ultrafiltrierbares und damit deutlich unter der Bakteriengröße liegendes Agens für die Mosaikkkrankheit bei Tabakpflanzen verantwortlich ist; das *Tabakmosaikvirus*. Im Laufe der Jahre wurden die Nachweismethoden immer weiter verbessert und mit der Zeit zeichnete sich ein immer deutlicheres Bild ab, was Viren eigentlich sind und wie sie funktionieren. Bis heute konnten viele verschiedene Viren identifiziert werden, von denen einige Krankheiten bei Menschen und Tieren verursachen.

Im Jahre 1908 wurde zum ersten Mal ein Retrovirus beschrieben. Ellermann und Bang konnten Mäuseläukämie durch Ultrafiltrate von einem Tier zum anderen übertragen. 1911 infizierte Peyton Rous gesunde Hühner mit dem Ultrafiltrat aus Geflügelsarkomen, wodurch diese Tumorerkrankung bei den Tieren ausgelöst wurde. Der Zusammenhang von retroviralen Infektionen und Tumorerkrankungen wurde auch 1936 von J. J. Bittner bei seinen Untersuchungen zur Entstehung von malignen Milchdrüsentumoren der Maus gezeigt: Er beschrieb das Maus-Mammatumor-Virus (MMTV) als Erreger dieser Erkrankung. Dieses Virus zeigte auch eine bis dahin unbekannte Eigenschaft der Retroviren: Sie können neben, der konventionellen horizontalen Übertragung, auch vertikal über die Keimbahn weitergegeben werden.

Howard M. Temin und S. Mizutani sowie David Baltimore machten 1970 die Entdeckung, dass Retroviren ihr einzelsträngiges RNA-Genom in DNA umschreiben können, also umgekehrt zu dem sonst in der Natur üblichen Schema DNA-RNA-Protein. Diese Eigenschaft schließlich gab den Retroviren ihren Namen, und das dafür verantwortliche Enzym, die *reverse Transkriptase* ist charakteristisch für diese Virusfamilie.

1.1.1 Einteilung der Retroviren

Die Familie der *Retroviridae* wird in sieben Genera eingeteilt, den sogenannten α -, β -, γ -, δ - und ϵ -Retroviren, sowie den *Lentiviren* und *Spumaviren* (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Charakteristische Vertreter der Retroviren

<i>Genus</i>	<i>Mensch</i>	<i>Tier</i>	<i>Typ</i>
α -Retroviren		aviäre Leukoseviren (ALV)	exogen
		Rous Sarkomvirus (RSV)	exogen
		Rous-assoziierte Viren (RAV)	exogen
β -Retroviren		Maus-Mammatumor-Virus (MMTV)	endo/exogen
		Mason-Pfizer-Affen-Virus (MPMV)	exogen
	humane endogene Retroviren (HERV-K Familie)		endogen
γ -Retroviren		Porcine endogene Retroviren (PERV)	endo/exogen
		felines Leukämievirus (FeLV)	exogen
		Gibbonleukämievirus (GALV)	exogen
		Moloney-Mausleukämievirus (Mo-MuLV)	exogen
		Erv-3	endogen
	S71	endogen	
δ -Retroviren	humane T-Zell-Leukämie-Viren (HTLV)	Bovines Leukosevirus (BLV)	exogen
		Simian-Lymphotropic Virus (STLV)	exogen
	HRES-1		endogen
ϵ -Retroviren		verschiedene Fischretroviren	exogen
		Walleye-Dermal-Sarcoma-Virus	exogen
Lentiviren	humane Immundefizienzviren (HIV)	simianes Immundefizienzvirus (SIV)	exogen
		felines Immundefizienzvirus (FIV)	exogen
		caprines Arthritis-Encephalitis-Virus (CAEV)	exogen
Spumaviren		feline Spumaviren	exogen
		Affenspumaviren	exogen

Die Unterteilung erfolgte anhand von Besonderheiten während der Infektionen und den dadurch verursachten Krankheitsverlauf, sowie morphologischen und genetischen Unterschieden. Retroviren infizieren vornehmlich Wirbeltiere und können Krankheiten mit verschiedensten Symptomen auslösen. Das Spektrum der Symptomatik erstreckt sich dabei von völlig harmlosen Infekten bis hin zu tödlichen Tumorerkrankungen und Immundefizienzen.

Weiterhin wird zwischen *exogenen* und *endogenen* Retroviren unterschieden. Exogene Retroviren enthalten in ihrem Genom alle notwendigen Informationen, die den Ab-

lauf eines Infektionszyklus mit der Freisetzung infektiöser Viruspartikel ermöglichen. Durch die Bildung infektiöser Partikel können sich diese Viren von Organismus zu Organismus verbreiten.

Endogene Retroviren sind in allen Zellen des Wirtes integriert und werden über die Keimbahn weitergegeben. Unter bestimmten Umständen können auch sie zur Bildung infektiöser Partikel angeregt werden, überwiegend sind sie jedoch soweit deletiert, dass sie nicht mehr übertragen werden können. Solche defekte endogene Retroviren, die nur noch Anhand von Sequenzabschnitten ihrer ins Zellgenom integrierten DNA erkannt werden können, sind weit verbreitet und konnten in allen Genomen von Säugetieren und Vögeln nachgewiesen werden. Auch das menschliche Genom besteht zu einem Teil aus diesen *Retrotransposons* [Kazazian, 2004].

1.1.2 Aufbau der Retroviren

Die infektiösen Viruspartikel der Retroviren haben einen Durchmesser von etwa 100 nm. Das Capsid ist von einer Hüllmembran umgeben, welche von der Cytoplasmamembran der Wirtszelle abgeleitet ist. Mit ihr sind die beiden viralen Glycoproteine assoziiert. Über 20 hydrophobe Aminosäuren ist dabei das transmembrane Hüllprotein in die Membran verankert, an das wiederum das externe Glycoprotein nicht-kovalent gebunden ist. Beide Proteine werden als gemeinsames Vorläuferprotein vom *env*-Gen (*envelope*) des retroviralen Genoms gebildet und später durch eine zelluläre Protease gespalten. An der Innenseite der Hüllmembran ist das virale Matrixprotein gebunden. Im Inneren der Partikel befindet sich das Viruscapsid oder Core, welches je nach Genus eine sphärisch-ikosaedrische, konische oder (selten) exzentrische Form besitzt. Es besteht aus Capsidproteinen, die wie die viralen Matrixproteine vom *gag*-Gen (gruppenspezifisches Antigen) abgelesen werden. Das Capsid enthält zwei identische Moleküle einzelsträngiger RNA als Virusgenom. Die RNA-Stränge sind nicht kovalent und nicht über Basenpaarung miteinander verbunden und mit dem Nucleocapsidproteinen (NC) komplexiert, welche ebenfalls prozessierte Bestandteile des Gag-Proteins sind. Des Weiteren befinden sich die Enzyme reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR) in einem Viruspartikel, alles Produkte des *pol*-Gens. Neben diesen genannten Proteinen, die Bestandteil aller Retroviren sind, besitzen einige komplexere Retroviren wie die Lentiviren zusätzlich regulatorische und akzessorische Proteine.

1.1.3 Genom der Retroviren

Das Genom der Retroviren besteht aus zwei identischen, einzelsträngigen RNA-Molekülen, die ähnlich eukaryotischer mRNAs eine 5'-Cap-Struktur und eine 3'-Polyadenylierung aufweisen. Die Genome aller infektiösen Retroviren besitzen die Gene *gag*, *pol* und *env*, deren Produkte bereits in Abschnitt 1.1.2 kurz beschrieben wurden. Komplexere Retroviren wie Spuma- und Lentiviren, sowie die δ -Retroviren besitzen zusätzlich regulatorische und akzessorische Gene. Dementsprechend kann die Länge des RNA-Genoms je nach Virustyp zwischen 7000 und 12000 Basen schwanken. Porcine endogene Retroviren (PERV) haben als Vertreter der relativ einfachen γ -Retroviren ein etwa 8100 Basen großes Genom [Czuderna et al., 2000], das humane Immundefizienzvirus (HIV), welches zum Genus der Lentiviren gehört, etwa 9200 Basen.

Angrenzend an die Cap-Struktur am 5'-Ende befindet sich die R-Region (R = *redundant*), welche in identischer Basenfolge und Orientierung am 3'-Ende des Genoms erneut vorliegt (Abbildung 1.1). An die R-Region schließt sich in 3'-Richtung eine als U5 (U = *unique*) bezeichnete Sequenz an welche bei den γ -Retroviren 75 Basen lang ist, bei anderen bis zu 200 Basen lang sein kann. Diese Region enthält wichtige Sequenzen für die Integration in das Wirtsgenom.

Benachbart der U5-Region findet sich die Primerbindungsstelle (PB-Stelle) mit einer Länge von 18 Basen, die mit dem 3'-Ende einer zellulären tRNA über Basenpaarung hybridisiert (Abschnitt 1.1.4). Im Falle von PERV handelt es sich um eine tRNA^{Gly}, bei HIV um eine tRNA^{Lys} [Bartosch et al., 2002].

Die zwischen der PB-Stelle und dem Beginn des *gag*-Gens befindliche Sequenz bezeichnet man als Leader-Region. Diese ist bei den verschiedenen Retroviren unterschiedlich lang und in ihr befindet sich unter anderem die Spleißdonorstelle, welche für die Produktion gespleißter mRNA-Moleküle benötigt wird. Die meisten Retroviren bilden nur eine gespleißte mRNA, von der aus die Glycoproteine abgelesen werden (Abbildung 1.1). Der Spleißakzeptor befindet sich in diesem Fall zwischen dem *pol* und dem *env*-Gen. Die gleiche Spleißdonorstelle wird aber auch oftmals zur Bildung der vielfach gespleißten mRNAs verwendet, von denen aus die regulatorischen und akzessorischen Proteine der Lenti- und Spumaviren translatiert werden. Nahe der Spleißdonorstelle ist auch die als ψ -Stelle bezeichnete Sequenzfolge lokalisiert, mit der sich die RNA-Moleküle bei der Morphogenese an die Nucleocapsidproteine anlagern.

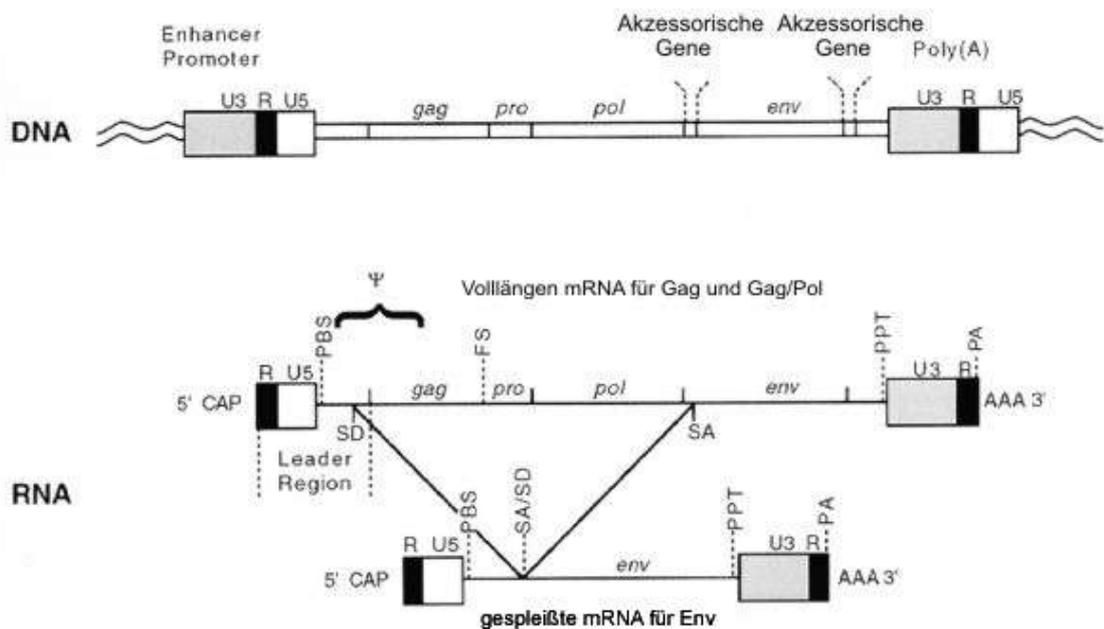


Abbildung 1.1: Genomische Organisation der Retroviren. Oben: Provirale Sequenz nach der Integration in das zelluläre Genom. Unten: Die transkribierte Vollängen-mRNA und die gespleißte *env*-mRNA. PBS: Primerbindungsstelle, SD: Spleißdonor, SA: Spleißakzeptor, PPT: Polypurintrakt, [Coffin et al., 1997]

An die ψ -Stelle schießen sich die drei für Proteine codierenden Gene *gag*, *pol* und *env* an. Auf das *env*-Gen folgt eine purinreiche Sequenz aus mindestens neun Adenosin- und Guanosinresten, die bei der Initiation der Synthese des DNA-Doppelstranges bei der reversen Transkription eine wichtige Rolle spielt.

Im weiteren Verlauf des Genoms kommt in 3'-Richtung die U3-Region, die wieder je nach Virustyp unterschiedlich lang sein kann. Sie ist, ähnlich wie die U5 Region, eine für die Integration in das Wirtsgenom wichtige Basenfolge. Des Weiteren spielt sie eine wichtige Rolle bei der Genexpression des ins Wirtsgenom integrierten Provirus, da sie *cis*-aktive Elemente enthält, an die sich *trans*-aktive zelluläre Faktoren binden, welche virale Transkription regulieren.

1.1.4 Replikation der Retroviren

Das Oberflächenhüllprotein vermittelt bei der Infektion die Adsorption der retroviralen Partikel an die Wirtszelle. Für HIV konnte als zellulärer Reaktionspartner der CD4-Rezeptor von T-Lymphozyten identifiziert werden, ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie [Dalglish et al., 1984]. Für γ -Retroviren wurden meist Aminosäuretransporter als Oberflächenrezeptoren gefunden [Sommerfelt, 1999]. Auch der Rezeptor

für PERV wurde kürzlich identifiziert, ihm konnte jedoch keine zelluläre Funktion zugeschrieben werden [Ericsson et al., 2003]. Häufig werden Corezeptoren auf der Zelloberfläche für den Viruseintritt benötigt, wie beispielsweise die Chemokin-Rezeptoren CCR5 und CXCR4 bei HIV [Alkhatib et al.; 1996; Feng et al., 1996]. Nach dem Andocken an der Oberfläche ändert sich die Konformation der viralen Hüllproteine dahingehend, dass sie die Verschmelzung der Cytoplasmamembran mit der Virushülle und somit die Aufnahme des Viruskapsid in das Zellinnere vermitteln.

Im Cytoplasma wird das RNA-Genom des Virus von der reversen Transkriptase mit mehreren Schritten in DNA umgeschrieben [Coffin et al., 1997]. Dieser Vorgang beginnt mit der Hybridisierung der tRNA an die PB-Stelle, von deren 3'-OH-Ende die reverse Transkriptase einen zu der U5- und R-Region komplementären DNA-Strang synthetisiert. Eine mit der reversen Transkriptase assoziierte RNase (RNase-H) baut nun den RNA Anteil des RNA/DNA-Hybrides ab. Das so entstandene, einzelsträngige DNA-Molekül wird an das 3'-Ende transferiert, wo es mit den identischen Sequenzen der dortigen R-Region hybridisiert und als Primer für die RT-vermittelte Synthese des zum RNA-Genom komplementären, durchgehenden DNA-Strang dient. Der RNA-Anteil dieses RNA/DNA-Hybrides wird nun größtenteils wieder von der RNase H abgebaut, mit Ausnahme eines kurzen Polypurintraktes, der offensichtlich resistent gegenüber der RNase H ist. Am 3'-OH-Ende des verbliebenen RNA-Fragments beginnt nun die Synthese des DNA-Zweitstranges bis zu PB-Region, an der immer noch die tRNA gebunden ist. Durch den Abbau dieser tRNA entsteht an dieser Stelle ein 3'-Überhang, welcher komplementär zur PB-Stelle des Erststranges ist. Wenn sie hybridisieren, liefern sie die Primerstruktur für die nachfolgende Synthese des DNA-Doppelstranges. Die einzelsträngigen Enden werden aufgefüllt und schließlich liegt das Virusgenom als doppelsträngiges DNA-Molekül vor, bei dem die codierenden Sequenzen von den U3-, R- und U5-Regionen flankiert werden, den sogenannten „*long terminal repeats*“ (LTR, Abbildung 1.1). Die reverse Transkriptase verfügt über keine Proofreading-Funktion, wodurch sie mit einer hohen Wahrscheinlichkeit von 10^{-3} bis 10^{-4} falsche Nucleotide in das Genom einbaut. Damit hat die reverse Transkriptase entscheidenden Anteil an der hohen Mutationsrate der Retroviren.

Die doppelsträngige provirale DNA bleibt bis zur Integration in das Genom der Wirtszelle als sogenannter Präintegrationskomplex mit Proteinkomponenten verbunden.

Dieser Protein/DNA-Komplex hat eine Größe von 20-30 nm und kann damit nicht ohne den Transport fördernde Faktoren durch die Kernporen gelangen und in den Zellkern eindringen. Die meisten Retroviren können daher nur in das Genom sich teilender Zellen integrieren, wenn sich während der Mitose die Kernmembran auflöst. HIV und andere Lentiviren bilden hier eine Ausnahme, da sie über das akzessorische Protein Vpr verfügen (Abschnitt 1.1.6.2), welches vermutlich mit anderen zellulären Faktoren den Eintritt des Präintegrationskomplexes durch die Kernporen in den Zellkern vermittelt und somit eine Infektion ruhender Zellen ermöglicht.

Im Zellkern kommt es schließlich zur Integration der proviralen DNA in das Wirtsgenom, ein Vorgang, der von dem Enzym Integrase vermittelt wird. Die Integrase entfernt zwei Nucleotide an den 3'-Enden der viralen DNA, wodurch 5'-Überhänge entstehen. Ebenso wird durch die Integrase die Wirts-DNA an einer willkürlichen Stelle geschnitten, so dass ebenfalls 5'-Überhänge entstehen. Die 5'-Enden der Wirts-DNA werden von zellulären Ligasen mit den 3'-Enden der viralen DNA verbunden und die einzelsträngigen Lücken werden von zellulären Reparatursystemen geschlossen. Bei diesem Vorgang werden vier bis sechs Basenpaare, die das integrierte Provirus flankieren, dupliziert. Das Virus hingegen verliert seine beiden endständigen Nucleotide.

Nach der Integration kommt es zur Expression der viralen Gene über die zelluläre RNA-Polymerase II. Die LTR dient dabei als Promotor, wobei an die U3-Region verschiedene Transkriptionsfaktoren binden, abhängig vom Virustyp. Für HIV ist NF κ B ein wichtiger Faktor, bei PERV bindet unter anderem NF-Y. Im Zellkern wird bei den γ -Retroviren über den Spleißdonor und den Spleißakzeptor ein für das *env*-Gen codierendes mRNA-Molekül gespleißt (Abbildung 1.1). Bei HIV werden verschiedene, einfach und mehrfach gespleißte mRNAs erzeugt, die anschließend für verschiedene zusätzliche Proteine wie Tat, Rev und Nef codieren (Abbildung 1.4).

Die Synthese der Env-Proteine erfolgt an der Membran des endoplasmatischen Retikulums. Direkt an der Membran wird zunächst das Vorläufer Env-Protein synthetisiert, welches während des weiteren Transports über den Golgi-Apparat glycolisiert und in den externen und den membranverankerten Teil gespalten wird.

Die Translation der anderen Proteine erfolgt an freien Ribosomen im Cytoplasma. Das Gag und das Gag/Pol-Vorläuferprotein werden noch während der Synthese am aminoterminalen Ende myristyliert und gelangen mit Hilfe zellulärer Faktoren zur Zellmem-

bran, wo sie sich anlagern. Dort findet die Morphogenese der Viruspartikel statt [Edbauer and Naso, 1984; Rhee and Hunter, 1990]. Im Gegensatz zu den gespleißten mRNAs oder zellulären mRNAs besitzt die Vollängen-mRNA der Retroviren in der Leader-Region das Ψ -Element. Dadurch lagern sich die RNA-Genome an Zinkfinger motive der Nucleocapsidproteine an und werden verpackt [Dorfman et al., 1993; Gorelick et al., 1988]. Es ist bislang noch völlig unklar, wie sichergestellt wird, dass immer zwei RNA-Moleküle verpackt werden. In den Bereichen, in denen sich die viralen Proteine an der Zelloberfläche angelagert haben, kommt es zur Ausstülpung der Zellmembran und schließlich zur Abschnürung der Vesikel (*Budding*). Die virale Protease wird im von der Zelle freigesetzten Virion autokatalytisch aus dem Gag/Pol-Vorläuferprotein abgespalten und aktiviert. Die Gag- und Gag/Pol-Precursor werden anschließend in die Matrix, Capsid, Nucleocapsid sowie die Protease, reverse Transkriptase und Integrase prozessiert. Gleichzeitig beginnen in den Virionen strukturelle Umlagerungen der Capsidproteine, wodurch infektiöse Partikel entstehen.

1.1.5 Porcine endogene Retroviren (PERV)

Porcine endogene Retroviren wurden bereits vor über 30 Jahren in Kulturüberständen einer porcinen Nierenzelllinie (PK-15) mit dem Elektronenmikroskop entdeckt [Breese, 1970]. Auch in anderen porcinen Zelllinien konnten diese Viren beobachtet werden. auf Grund ihrer Morphologie wurden sie dem Genus der γ -Retroviren zugeordnet [Armstrong et al., 1971; Woods et al., 1973]. Auch in primären PBMCs konnte eine Virusreplikation nachgewiesen werden [Tacke et al., 2003]. Je nach Schweinerasse finden sich zwischen 10 und 100 provirale Sequenzen von PERV im Genom der Tiere [Bosch et al., 2000]. Die meisten davon sind jedoch so weit deletiert, dass sie keine infektiösen Partikel mehr bilden können [Patience and Greenstein, 2001].

1.1.5.1 Bedeutung von PERV bei der Xenotransplantation

Die Transplantationsmedizin hat in den vergangenen Jahren immer weitere Fortschritte gemacht und ist mittlerweile zu einem festen Bestandteil der klinischen Behandlungsmethoden geworden. Jedoch wuchs im Zuge dessen die Anzahl an benötigten Organen derart an, dass der Bedarf nicht mehr durch Allotransplantate gedeckt werden kann. Daher wird in den letzten Jahren verstärkt nach Alternativen zur Allotransplantati-

on gesucht. Die Forschung an den viel diskutierten embryonalen Stammzellen, befindet sich noch im Anfangsstadium. Daher kann in absehbarer Zeit nur die Xenotransplantation den Mangel an Allotransplantaten entgegenwirken.

Zwei Quellen wurden als Spender für xenogene Organe favorisiert: nicht-humane Primaten und Schweine. Hinsichtlich der Anatomie und Physiologie sowie der immunologischen Akzeptanz stehen Altweltaffen dem Menschen am nächsten und sind daher eigentlich am besten als Spendertiere geeignet. Jedoch ist ihre Zucht und Haltung schwierig, zudem bereiten die geringe Zahl an Nachkommen und strenge Artenschutzauflagen Probleme. Vor allem jedoch die Möglichkeit einer Übertragung von Infektionen auf den Empfänger eines Xenotransplantats, welche zu einer Xenozoonose (kurz Xenose genannt) führen kann, hat verschiedenste Bedenken ausgelöst. Da es schon zu mehreren Übertragungen von Infektionen aus nicht-humanen Primaten auf den Menschen kam [Gao et al., 1992; Holmes et al., 1995], eingeschlossen HIV-1, welches von Schimpansen übertragen wurde, werden diese Spezies zur Zeit nicht als geeignete Spendertiere betrachtet [Chapman et al., 1995; Butler, 1999].

Daher werden momentan Schweine als potentielle Spendertiere favorisiert. Sie sind in ihrer Zucht und Haltung einfacher zu handhaben und ihre Physiologie ist der des Menschen ähnlich [Hannon et al., 1990]. Derzeit sind die immunologischen Probleme noch zu groß, als dass es in absehbarer Zeit zur Transplantation ganzer Organe vom Schwein auf den Menschen kommen wird, da diese vom menschlichen Immunsystem abgestoßen würden. Größere Fortschritte erzielte man bislang bei der Transplantation von Zellen oder Zellverbänden. Verkapselte, fetale porcine Inselzellen konnten die Insulinproduktion bei Diabetes Typ I Patienten über einen Zeitraum von bis zu zwei Jahren substituieren [Elliott et al., 2000].

Da Schweine phylogenetisch weiter vom Menschen entfernt sind als Primaten, ist die Gefahr einer Übertragung potentiell pathogener Organismen und Viren nicht so akut, jedoch auch nicht auszuschließen. Mehrere nicht-virale Erreger sind nachweislich vom Schwein auf den Menschen übertragbar und wirken humanpathogen [Fishman, 1997; Tucker et al., 2002], jedoch lässt sich dieses Problem durch spezielle Zucht und Haltung umgehen [Swindle, 1998]. Wesentlich problematischer in diesem Zusammenhang sind Viren. Neben verschiedenen exogenen Viren, die zum Teil ebenfalls durch besondere Zucht und Haltungsformen kontrolliert werden können, sind vor allem die porcinen

endogenen Retroviren (PERVs), welche integraler Bestandteil des Schweinegenoms sind und über die Keimbahn weitergegeben werden, ein Problem. Diese lassen sich nicht durch keimfreie Zucht und Haltung eliminieren [Denner, 1998; Mang et al., 2001].

1.1.5.2 Aufbau und Klassifizierung

Die Virionen der porcinen endogenen Retroviren haben einen Durchmesser von 100 nm (Abbildung 1.2) und weisen die für Retroviren typischen Proteine Gag, Pol und Env auf, jedoch keine regulatorischen oder akzessorischen Proteine wie HIV. Es gibt drei Subtypen von PERV, A, B und C. Die Subtypen PERV-A und PERV-B wurden aus humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-293), welche mit zellfreiem Überstand von PK-15-

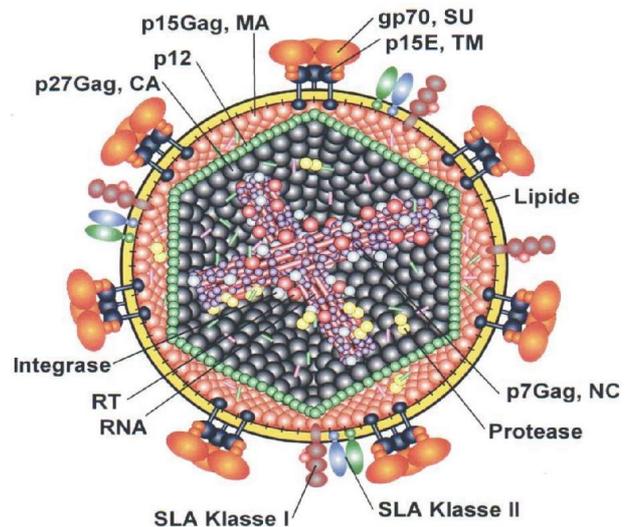


Abbildung 1.2: Schematischer Aufbau eines PERV-Partikels. Die Bezeichnung der Proteine richtet sich nach ihrer Größe in kD.

Zellen infiziert wurden, isoliert [Akiyoshi et al., 1998b]. PERV-A und -B sind polytrop und können humane Zellen und auch Zellen anderer Säugetiere zumindest *in vitro* infizieren. Im Gegensatz dazu verhält sich PERV-C vollkommen ecotrop [Oldmixon et al., 2002]. Dieser Subtyp wurde aus Lymphozyten des Miniaturschweins („*miniature swine lymphocytes*“, MSL) isoliert und kann nur porcine Zellen infizieren. Die Subtypen unterscheiden sich im Bereich der *gag*- und *pol*-Gene kaum, im *env*-Gen deutlich [Le Tissier et al., 1997]. auf Grund von Sequenzhomologien sind Rekombinationen zwischen den Subtypen möglich. So wurde kürzlich gezeigt, dass es in Schweinezellen zu Rekombinationen zwischen PERV-A und PERV-C kommt [Wood et al., 2004], wodurch A/C-rekombinante Viren entstehen, die das *env*-Gen von PERV-A, den *gag/pol*-Bereich von PERV-C besitzen. Diese exogenen Viren werden nicht über die Keimbahn der Schweine vererbt und sind in der Lage, humane Zellen zu infizieren.

Im Genom von Schweinezellen konnten noch weitere provirale Sequenzen entdeckt werden, welche zum Teil Sequenzhomologien mit β - und γ -Retroviren aufweisen. Diese sind jedoch alle stark degeneriert und bilden alleine keine intakten Viruspartikel mehr.

1.1.5.3 *In vitro* Infektionen von PERV

Die Subtypen PERV-A und PERV-B sind polytrop. In umfangreichen Studien konnten eine Vielzahl von humanen Zelllinien und Primärzellen *in vitro* produktiv infiziert werden, das heißt, die infizierten Zellen selbst produzieren wieder intakte Virionen [Takeuchi et al., 1998; Specke et al., 2002a]. Des Weiteren konnten auch Zellen verschiedener Säugetiere wie Katze, Nerz, Pavian und Rhesusaffe *in vitro* infiziert werden [Wilson et al., 2000; Specke et al., 2001].

Der Grund für das unterschiedliche Wirtsspektrum der PERV-Subtypen liegt an den Unterschieden in den Sequenzen des Env-Proteins und damit die unterschiedlichen Bindungsmöglichkeiten an zelluläre Rezeptoren. Für PERV-A konnten vor kurzem zwei Rezeptoren identifiziert werden („human PERV-A receptor“, huPAR-1/ -2). Ihre Funktion ist allerdings bislang unbekannt [Ericsson et al., 2003]. Der A/C-rekombinante Subtyp, der das *env*-Gen und damit die Rezeptorbindungsstelle von PERV-A besitzt, kann somit auch humane Zellen infizieren, im Gegensatz zum reinen Subtyp PERV-C, der nur porcine Zellen infiziert.

Ähnlich wie bereits bei anderen Retroviren konnte auch bei PERV gezeigt werden, dass die Expression der viralen RNA durch den Einbau bestimmter Enhancer-Elemente in die LTR gesteigert werden kann. Für PERV-A/C konnte eine Verlängerung der LTR nach mehrfachem Passagieren auf humanen 293 Zellen beobachtet werden, bedingt durch die Vervielfältigung eines 37 bp Abschnitts [Denner et al., 2002]. Diese Repeats enthalten Bindungsstellen für den *Nuclear Factor Y* (NF-Y), einem Transkriptionsfaktor, was ein Ansteigen des Virustiters zur Folge hat.

1.1.5.4 *In vivo* Infektiösität und Pathogenität

Die replikationskompetenten PERV-A, PERV-B und PERV-C sind γ -Retroviren, die nahe verwandt sind mit den Läkämieviren der Maus (*murines Leukämievirus*, MLV), der Katze (*felines Leukämievirus*, FeLV) und dem Gibbon (GALV), alles Viren, welche bei einer Infektion Tumore und Immundefizienzen verursachen [Le Tissier et al., 1997; Patience et al., 1997; Akiyoshi et al., 1998a]. Daher muss befürchtet werden, dass PERVs bei einer Übertragung auf den Menschen durch ein Xenotransplantat ebenfalls derartige Erkrankungen hervorrufen können. Wie in Abschnitt 1.1.5.3 beschrieben können PERVs ihre Replikation dem humanen Transkriptionsapparat anpassen und so

den Virustiter und damit eine eventuell verbundene Pathogenität erhöhen.

Um die pathogenen Eigenschaften der PERVs untersuchen zu können, wäre ein Tiermodell hilfreich. Obwohl sich Zellen verschiedenster Tierarten mit PERV *in vitro* infizieren lassen, wurde in umfangreichen *in vivo* Studien im Zusammenhang mit experimentellen oder klinischen Xenotransplantationen keine Übertragungen festgestellt [Denner et al., 2001b; Specke et al., 2001; Specke et al., 2002b; Specke et al., 2002c]. Zwar gibt es Berichte einer PERV-Übertragung im Zusammenhang einer Transplantation in SCID-Mäusen [van der Laan et al., 2000; Deng et al., 2000], jedoch ist dies wahrscheinlich auf Mikrochimärismus oder die Bildung von Pseudotypen mit MLV zurückzuführen, da Mäuse nachweislich keinen PERV-A Rezeptor besitzen. Derzeit ist man bestrebt, transgene Mäuse zu erstellen, die den PERV-Rezeptor auf der Zelloberfläche tragen. Damit könnte man im Kleintiermodell eventuelle pathogene Eigenschaften der PERVs analysieren und darüberhinaus gegebenenfalls therapeutische Maßnahmen testen. Da sich jedoch Mäusezellen auch in Kultur nicht mit PERV infizieren lassen, ist auch noch nicht klar, ob diese infektiöse PERV-Partikel bilden können.

Eine Übertragung auf den Menschen bei zukünftigen Xenotransplantationen kann trotz der bisherigen Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden. Die Gefahr einer Xenose erhöht sich noch durch den Einsatz transgener Schweine, deren Zellen an der Membranoberfläche derartig modifiziert wurden, damit sie vom menschlichen Immunsystem besser akzeptiert werden [Phelps et al., 2003; sowie Miyagawa et al., 1994; Byrne et al., 1997]. Dies senkt zwar die Wahrscheinlichkeit einer Abstoßungsreaktion, da jedoch diese Veränderungen auch in die Hüllmembran der Retroviren eingebaut werden, wirken diese ebenfalls nicht mehr so immunogen wie zuvor. Derzeit laufen die ersten Versuche mit den transgenen Schweineorganen an Pavianen.

Um im klinischen Einsatz von Xenotransplantaten Patienten auf PERV-Infektion zu testen wurden bereits verschiedene immunologische (ELISA) und molekularbiologische Testverfahren entwickelt [Stephan et al., 2001; Tacke et al., 2001; Argaw et al., 2002].

Als therapeutischer Ansatz, falls es zu einer Übertragung von PERV auf den Menschen kommen sollte, stünden die bei der antiretroviralen HIV-Therapie eingesetzten Mittel zur Verfügung. Es konnte gezeigt werden, dass das Nucleosidanalogon AZT auch die Replikation von PERV *in vitro* hemmen kann [Qari et al., 2001; Stephan et al., 2001]. Es gelang auch die Induktion eines neutralisierenden Antikörpers gegen das

transmembrane Hüllprotein p15E, auf dessen Basis ein Impfstoff möglich wäre [Fiebig et al., 2003]. Ohne entsprechendes Tiermodell kann über den Nutzen jedoch nur spekuliert werden.

1.1.6 Das humane Immundefizienzvirus (HIV)

Im Jahre 1981 wurde bei einer Gruppe homosexueller Männer, die an schweren opportunistischen Infektionen litten, erstmals die Immunschwäche AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) beschrieben [Gottlieb et al., 1981]. Zwei Jahre später gelang in den Arbeitsgruppen von Luc Montagnier am Pasteur-Institut in Paris und von Robert Gallo am National Cancer Institut in Bethesda die Isolierung eines bis dahin unbekanntes Retrovirus aus den Lymphocyten von AIDS-Patienten. Seit 1986 verwendet man die heute gängige Bezeichnung HIV (*human immune deficiency virus*). Die Herkunft von HIV ist bis heute nicht endgültig geklärt. Die Viren haben ihren Ursprung in Afrika, wo verschiedene Affenarten mit den ähnlichen Immundefizienzviren SIV (*simian immune deficiency virus*) infiziert sind, jedoch keine Krankheitssymptome entwickeln. Aus Schimpansen wurde ein dem HIV sehr ähnliches Virus, SIVcpz, isoliert. Möglicherweise ist das Virus vor Jahren vom Affen auf den Menschen übertragen worden und hat sich zum humanpathogenen HIV entwickelt. Es wurden bislang zwei HIV-Typen entdeckt, HIV-1 und HIV-2, wobei sich nur HIV-1 weltweit ausgebreitet hat. HIV-2 blieb bislang endemisch in Westafrika und stammt vom SIVgm der Rauchgrauen Mangabe. Jedoch werden jüngst auch hier von vermehrt Fälle in Indien und anderen Ländern beschrieben.

1.1.6.1 Epidemiologie und Übertragung

Die HIV-1-Epidemie begann Anfang der achtziger Jahre etwa zeitgleich in den Großstädten Zentralafrikas und den USA. Seitdem hat sich die Infektion zu einer globalen Pandemie entwickelt, vor allem in den Ländern der dritten Welt. Im Jahr 2003 infizierten sich weltweit 5,3 Millionen Menschen mit HIV, darunter über 800000 Kinder und Jugendliche unter 15 Jahren. Heute sind über 40 Millionen Menschen infiziert, 20 Millionen sind bereits an den Folgen der Infektion gestorben. In Folge der HIV-Epidemie sank die durchschnittliche Lebenserwartung im südlichen Afrika auf 42 Jahre (WHO/UNAIDS *Epidemic update* 2003, www.unaids.org). In Westeuropa war die Si-

tuation verglichen mit dem Rest der Welt nicht ganz so schlimm, jedoch ist die Neuinfektionsrate in Osteuropa und den GUS-Staaten in den letzten Jahren dramatisch angestiegen. Im Zuge der EU-Osterweiterung und der Öffnung des Westens gegenüber Russland wird sich das Problem wahrscheinlich auch verstärkt nach Westeuropa ausbreiten.

Beim Menschen werden die HI-Viren durch kontaminiertes Blut oder Blutprodukte sowie durch Samen- oder Vaginalflüssigkeit bei homo- oder heterosexuellen Geschlechtsverkehr übertragen. Außerdem kann das Virus vor oder bei der Geburt sowie beim Stillen von infizierten Müttern auf ihre Kinder übertragen werden.

1.1.6.2 Aufbau des Virus

Die Virionen von HIV haben den typischen Aufbau eines Retrovirus (Abbildung 1.3). Im Gegensatz zu PERV sind im Genom von HIV nicht nur die Gag, Pol und Env-Proteine codiert, sondern noch zusätzliche akzessorische und regulatorische Proteine (Abbildung 1.4). Die Exons dieser Gene werden in verschiedenen Spleißreaktionen zusammengesetzt. Im Folgenden werden nun die Funktion der, für diese Arbeit, wichtigsten zusätzlichen Proteine kurz beschrieben.

Tat-Protein

Tat-Proteine (*transactivator of transcription*) sind Transaktivatoren und wurden bislang nur bei Lentiviren gefunden. Sie werden von zwei Exons codiert. Während des Infektionszyklus werden sie als erste Proteine synthetisiert und entfalten ihre Funktion im Zellkern. Die transaktivierende Wirkung der Tat-Proteine wird durch Bindung an das TAR-Element (*trans-activation response*) in der LTR vermittelt, wodurch die Transkription der viralen mRNAs vom LTR-Promotor mehr als hundertfach verstärkt wird.

Rev-Protein

Rev-Proteine (*regulation of virion expression*) sind ebenfalls Transaktivatoren, wirken aber im Gegensatz zu Tat-Proteinen post-transkriptionell. Durch die sehr kompakte Organisation des Genoms der komplexen Lentiviren, mit nur einem Promotor in der LTR, sind diese Viren auf Mechanismen angewiesen, die es ermöglichen, die Synthese der Genprodukte nach der Transkription zu kontrollieren. Rev-Proteine nehmen in diesem Zusammenhang, neben den alternativen Spleißvorgängen und der Verschiebung des ribosomalen Leseraster bei der Translation der Gag/Pol-Proteine, eine wichtige Stel-

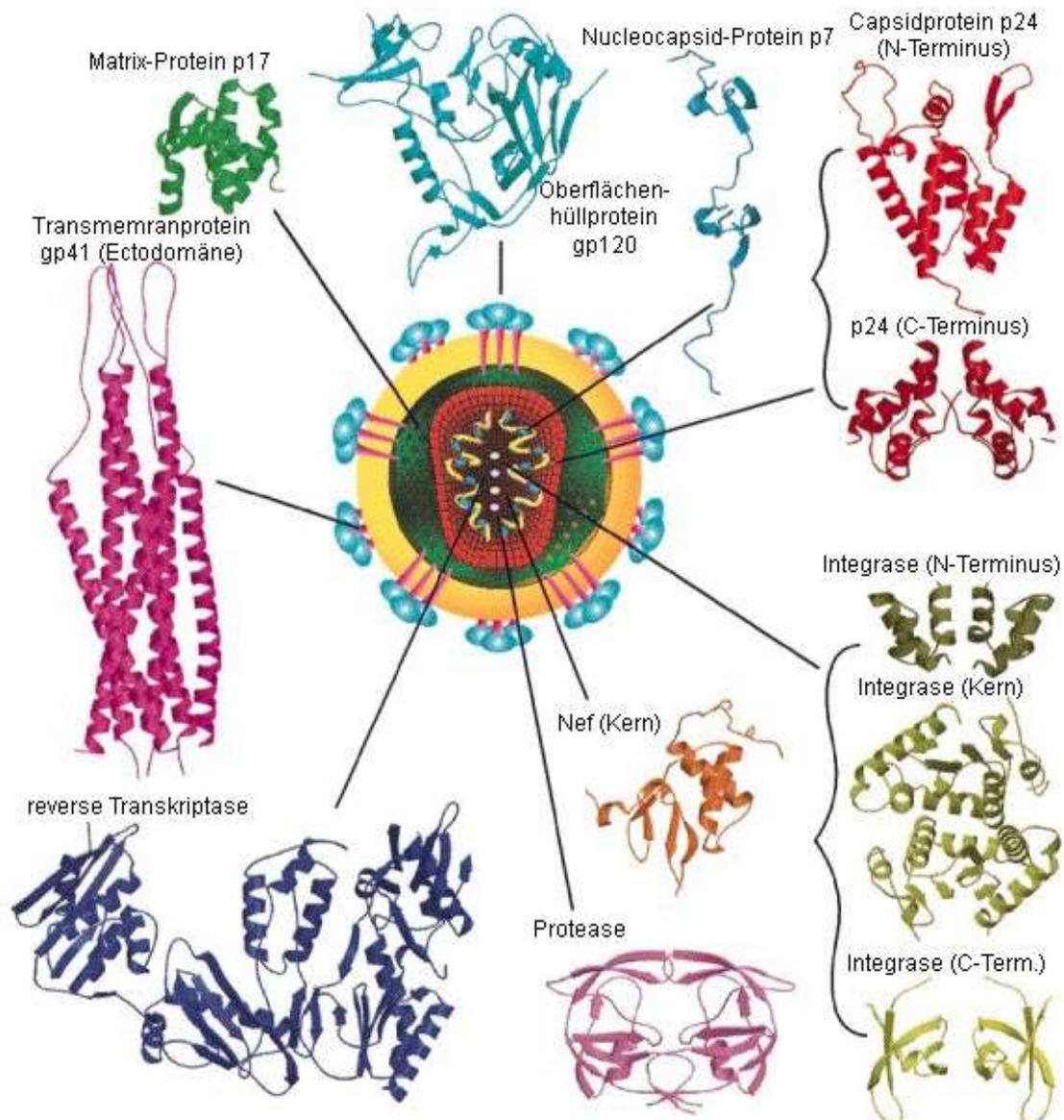


Abbildung 1.3: Schema eines HIV-Partikels mit maßstabgerechter Darstellung der viralen Proteine. Die Bezeichnungen der Proteine orientieren sich wie bei PERV an ihrem Molekulargewicht in kD [Turner and Summers, 1999].

lung ein. Sie sind für die zeitliche Regulation der Genexpression während des Replikationszyklus essentiell, indem sie den Export der verschiedenen mRNAs ins Cytoplasma vermitteln.

Vpr-Protein

Das Vpr-Protein (*viral protein rapid*) ist, wie schon in Abschnitt 1.1.4 erwähnt, dafür verantwortlich, dass das in dsDNA umgeschriebene Virusgenom zusammen mit der Integrase, der reversen Transkriptase, sowie einiger Strukturproteine durch die Kernporen in den Zellkern gelangt. Dadurch können sich die Lentiviren auch in das Genom ruhender Zellen integrieren. Diese Eigenschaft unterscheidet sie von allen anderen Retro-

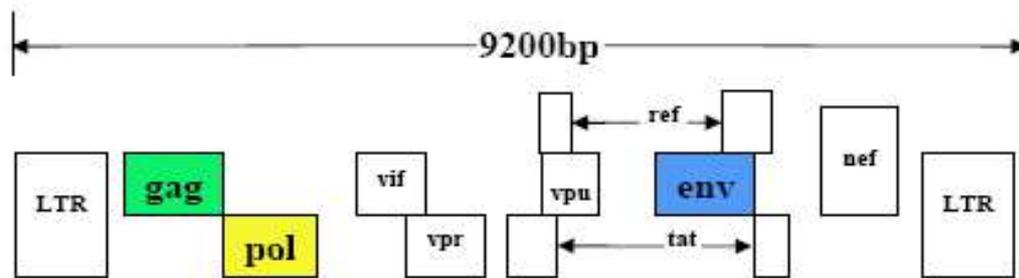


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des HIV-1-Genoms. Die beiden LTR flankieren das Genom, in dem sich die typischen retroviralen Gene *gag* (grün), *pol* (gelb) und *env* (blau) befinden. HIV-1 verfügt zusätzlich über die regulatorischen und akzessorischen Gene *vif*, *vpr*, *tat*, *vpu*, *rev* und *nef* (weiß).

viren und macht sie zum einen zu so gefährlichen Krankheitserregern, zum anderen aber auch zu interessanten Vektoren in der Genetik und Gentherapie (Abschnitt 1.3).

1.1.6.3 Klinik und Pathogenese einer HIV-Infektion

Der Verlauf einer HIV-Infektion lässt sich in drei Phasen einteilen. Die erste Phase oder Primärinfektion verläuft meistens inapparent, in 20 bis 30 Prozent der Fälle treten Grippe- oder Mononucleose-ähnliche Symptome auf. Danach schließt sich ein symptomfreies Latenzstadium an, das mehrere Jahre andauern kann. In der letzten Phase treten dann die typischen Symptome des AIDS auf. Es kommt zu opportunistischen Infektionen (AIDS-definierte Markerinfektionen) wie ösophagale Candidiasis, Cytomegalovirus-assoziierte Retinitis, Herpes Zoster oder das mit dem humanen Herpesvirus Typ 8 assoziierte Karposi Sarkom. Die Patienten erliegen am Ende meist einer lebensbedrohlichen, opportunistischen Infektion.

Kennzeichnend für eine HIV-Infektion ist ein Abfall der CD4⁺-T-Zell-Konzentration, wobei es in den meisten Patienten unterhalb eines Schwellenwertes von 200 Zellen pro Mikroliter Blut zu Immundefizienzen und den genannten AIDS-definierten Markerinfektionen kommt. Neben CD4⁺-T-Lymphozyten infiziert HIV auch andere Zellen des hämatopoietischen Systems, Zellen des zentralen Nervensystems, sowie einige weitere Zellen [Levy, 1993].

1.1.6.4 Therapie und Prophylaxe

Für die Therapie einer HIV-Infektion stehen derzeit verschiedene antiretrovirale Therapeutika zur Verfügung, die sich nach ihrem Wirkungsmechanismus in drei Gruppen einteilen lassen:

1. Nucleosidische und nicht-nucleosidische Inhibitoren der reversen Transkriptase
2. Protease-Inhibitoren
3. Fusionshemmer (z.B. T20)

Zumeist werden Kombinationen von Substanzen der beiden ersten Gruppen eingesetzt, wodurch die Sterberate der HIV-Patienten in den letzten Jahren deutlich zurückging [Dore et al., 1998; Mocroft et al., 2000]. Der Nachteil dieser hoch aktivem antiretroviralen Therapie (HAART) sind zum Teil sehr starke Nebenwirkungen. Für alle zugelassenen Therapeutika sind bereits Resistenzen beschrieben worden, wodurch langfristig bislang jede Therapie versagt [Richman, 1996; Wong et al., 1997; Gunthard et al., 1998; Hanna, 2002]. Trotz aller Bemühungen gelang noch kein therapeutischer Ansatz, der zur vollständigen Eliminierung des Virus aus dem Patienten führte.

Bisher sind alle klassischen Versuche, einen Impfstoff zu entwickeln, gescheitert. Trotz einiger vielversprechender Ansätze, bei denen in Tierversuchen gute Ergebnisse erzielt werden konnte, wurde bis letztes Jahr erst eine klinische Phase III Großstudie abgeschlossen, die jedoch negativ verlief. Derzeit laufen weitere Studien in verschiedenen Ländern (<http://www.iavireport.org/trialsdb/>).

1.2 RNA-Interferenz

Das Phänomen der RNA-Interferenz (RNAi) wurde als erstes im Nematoden *Caenorhabditis elegans* beschrieben [Fire et al., 1998]. Dabei handelt es sich um ein Sequenz-spezifisches Blockieren von Genen als Antwort auf doppelsträngige RNA (dsRNA), wie sie häufig als Zwischenprodukt bei viralen Infektionen entsteht. Man geht heute davon aus, dass RNAi als Abwehrmechanismus gegen solche Infektionen im Laufe der Evolution entstanden ist. Die dsRNA wird dabei mit Hilfe eines Enzymkomplexes in kleine 21-23 Basenpaar lange Fragmente degradiert, welche Sequenz-spezifisch an die mRNA binden und diese daraufhin enzymatisch abgebaut wird. Die kleinen dsRNAs werden als interferierende RNAs (*short interfering RNAs*, siRNAs) bezeichnet [Hammond et al., 2001; Matzke et al., 2001; Sharp, 2001; Hutvagner and Zamore, 2002].

Von dieser Entdeckungen ausgehend konnten rückwirkend einige schon beschriebene, Homologie-abhängige *gene-silencing* Mechanismen aufgeklärt werden. Schon zu Beginn der 90er Jahre beobachtete man bei einem Versuch, die Blütenblätter von Petunien durch Transfektion eines chimären Chalcon-Synthase-Gens besonders violett zu färben, dass die Blütenfarbe nicht stärker, sondern im Gegenteil, schwächer wurde und zum Teil ganz verschwand [Jorgensen, 1990]. Verschiedene Labore stellten ebenfalls fest, dass Pflanzen Infektionen durch RNA-Viren mit dem spezifischen Abbau der viralen RNA begegnen [Ruiz et al., 1998; Angell and Baulcombe, 1997; Dougherty et al., 1994].

Durch den Einsatz der RNA-Interferenz gelang es, die Funktion verschiedener bislang unbekannter Gene bei *C. elegans* zu entschlüsseln [Hope, 2001; Kim, 2001]. Die Methode wurde weiter verfeinert, um eine effektive Hemmung zu erreichen [Parrish et al., 2000]. Mittlerweile konnte RNAi auch bei anderen Invertebraten zur Funktionsanalyse verschiedener Gene genutzt werden [Ngo et al., 1998; Brown et al., 1999].

1.2.1 Molekularer Mechanismus der RNA-Interferenz

Der Mechanismus, der dem Blockieren von Genen mittels RNA-Interferenz zugrunde liegt, wurde in den letzten Jahren anhand genetischer und biochemischer Studien an *C. elegans* und Zell-Extrakten aus *Drosophila melanogaster* in vielen Punkten aufgeklärt.

Zu Beginn wird die lange dsRNA von dem mit der Ribonuclease III (RNase III) verwandten Enzym Dicer in kurze RNA-Fragmente zerlegt. Dabei entstehen die 21-23 bp langen siRNAs, die 2-3 Nucleotide Überhang am 3'-Ende besitzen [Zamore et al., 2000; Elbashir et al., 2001a; Elbashir et al., 2001b; Elbashir et al., 2001c].

Dicer ist auch bei der Prozessierung der sogenannten microRNAs (miRNAs) beteiligt, einer vor kurzem entdeckten Klasse von kleinen, regulatorisch wirkenden RNAs. Diese wurden zunächst ebenfalls bei *C. elegans* und *D. melanogaster* isoliert, inzwischen aber auch in murinen und humanen Zellen detektiert [Lau et al., 2001; Lagos-Quintana et al., 2001; Aravin et al., 2003; Lagos-Quintana et al., 2003]. Derzeit nimmt man an, dass diese miRNAs eine regulatorische Rolle bei der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung und der Apoptose spielen [Ambros, 2001; Eddy, 2001; Bartel and Chen, 2004].

Die RNAi selbst wird schließlich vom RISC (*RNA-induced silencing complex*) durchgeführt. Die siRNA bindet an diesen Komplex und vermittelt somit die Sequenzspezifische Degradation der Target-mRNA durch die nucleolytische Aktivität des RISC [Elbashir et al., 2001a; Elbashir et al., 2001c]. Die bis zu diesem Zeitpunkt noch doppelsträngige siRNA muss vorher noch von einer im RISC befindlichen Helikase unter ATP-Verbrauch entwunden werden. Im Anschluss daran baut die ebenfalls im RISC vorhandene Nuclease die Target-mRNA ab (Abbildung 1.5).

1.2.2 RNA-Interferenz in Säugetierzellen

Im Gegensatz zu Zellen aus Pflanzen, Insekten und Invertebraten induziert dsRNA mit einer Länge von 38 bp bis 1662 bp in Säugetierzellen eine Interferonreaktion, in Folge derer es zur unspezifischen Hemmung aller Genprodukte kommt [Ui-Tei et al., 2000; Paddison et al., 2002]. Daher ist der Einsatz solcher RNAs zur Identifizierung bestimmter Gene oder als RNA-basiertes Therapeutikum ungeeignet. Die Interferonreaktion ist schon seit einiger Zeit bekannt [Hunter et al., 1975] und dient, wie die RNAi, zur Abwehr von Viren oder anderen beweglichen genetischen Elementen [Marcus, 1983].

Um die Interferonreaktion zu umgehen, setzt man bei der Funktionsanalyse von Genen in Säugetierzellen seit ein paar Jahren erfolgreich siRNAs direkt ein. Diese synthetisch hergestellten, 21-23 bp langen dsRNA-Moleküle entsprechen den Produkten der Dicer-Reaktion und sind in der Lage, Sequenz-spezifisch die Expression eines Gens her-

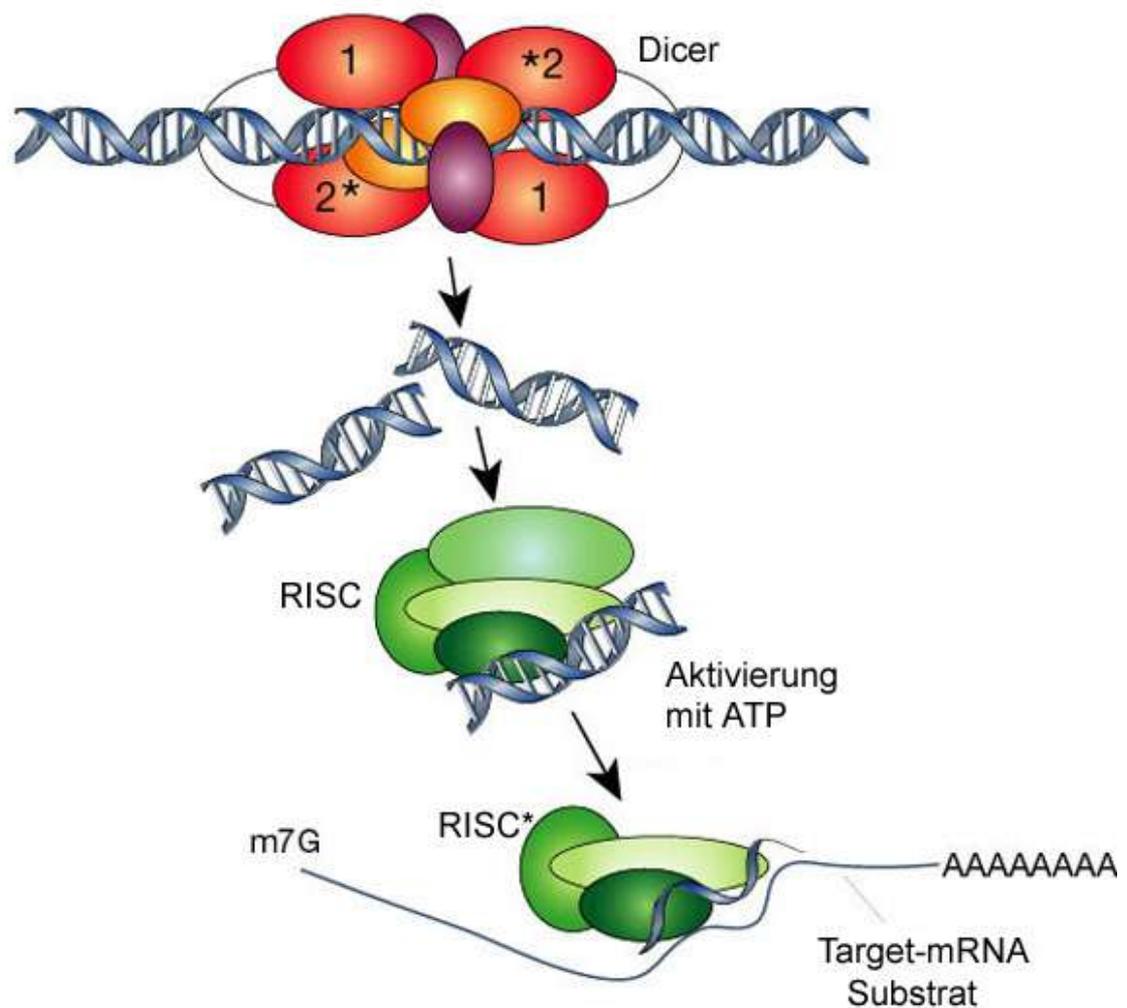


Abbildung 1.5: Dicer und RISC: Die dsRNA wird von Dicer in kleine siRNAs zerschnitten, welche an den RISC binden. Die doppelsträngigen siRNAs werden unter ATP-Verbrauch entwunden und der dadurch aktivierte RISC* bindet an die Target-mRNA, welche daraufhin abgebaut wird [Hannon, 2002].

unter zu regulieren [Elbashir et al., 2001a].

Diese siRNAs lassen sich in der Zellkultur auf Grund ihres geringen Molekulargewichts mit hoher Effizienz transfizieren. Jedoch ist ihre Wirkung zeitlich begrenzt, da sie durch die Zellteilung ausverdünnt und durch RNasen abgebaut werden. Um die Expression eines Gens stabil über einen längeren Zeitraum mittels RNAi zu hemmen, werden sogenannte shRNAs (*small hairpin RNAs*) eingesetzt. Bei den shRNAs werden der Sense- und der Antisense-Strang durch einen Loop miteinander verbunden und hinter einen Polymerase III-Promotor kloniert [Brummelkamp et al., 2002]. Die transkribierten RNA-Moleküle bilden eine Sekundärstruktur aus, wodurch sie den synthetischen siRNAs ähneln und in den RISC eingebaut werden. Die Basenzusammensetzung und Länge des Loops hat einen gewissen Einfluss darauf, wie gut die shRNA sich entwinden

kann [Brummelkamp et al., 2002; Boden et al., 2004]. Polymerase III-Promotoren wie der Promotor der snRNA U6 (*small nuclear RNA*) oder der Promotor der RNase P RNA H1 eignen sich zur Expression der shRNAs, da sie abrupt die Transkription beenden, wenn sie auf eine Ansammlung von vier bis fünf Thyminen treffen [Myslinski et al., 2001].

1.2.3 Sequenzabhängige Eigenschaften für die Funktion der RNAi

Damit eine siRNA ihre Funktion erfüllen kann, müssen einige Kriterien erfüllt sein. Eines davon ist die Zugänglichkeit der Target-Sequenz. Da mRNAs im Cytosol bestimmte Sekundärstrukturen einnehmen, liegen große Bereiche als doppelsträngige RNA vor. Damit der RISC mit der eingebauten siRNA daran binden und diese degradieren kann, muss die Target-Sequenz für die siRNA zugänglich sein. In Bereichen, in denen die mRNA doppelsträngig vorliegt, ist eine basenpaarspezifische Bindung nicht so einfach möglich, daher scheiden diese Bereiche bei der Auswahl aus. Gut geeignet für RNAi sind hingegen die Loops, in denen die RNA einzelsträngig vorliegt und so ein gutes Ziel für die siRNA abgibt.

Ein weiterer Schüsselschritt in der RNAi ist der Zusammenbau des RISC selbst. Die beiden Stränge des siRNA-Duplexes werden nicht gleichermaßen in den RISC eingebaut. Vielmehr bestimmen die absoluten sowie die relativen Stabilitäten der Basenpaare am 5'-Ende, welcher der beiden Stränge in den RISC eingebaut wird. Die im RISC befindliche Helikase entwindet die dsRNA bevorzugt von der Seite mit der geringeren Stabilität der Basenpaarungen. Nur der Antisense-Strang ist Basenpaar-komplementär zur jeweiligen mRNA und dadurch für die hemmende Wirkung verantwortlich. Der Einbau dieses Stranges in den RISC kann durch Einfügen von Fehlpaarungen an dessen 5'-Ende gefördert werden [Schwarz et al., 2003].

Mittlerweile stehen im Internet Programme zur Verfügung (<http://sfold.wadsworth.org/sirna.pl>), die aus einer gegebenen mRNA Sequenz die besten Targets isolieren [Ding and Lawrence, 2001; Ding and Lawrence, 2003]

1.2.4 RNA-Interferenz als genetischer Schutz vor PERV

Die Gefahr einer Xenose von PERV im Zuge der möglichen Xenotransplantation von porcinen Organen und Zellen wurde bereits beschrieben (Abschnitt 1.1.5.1). In vorangegangenen Studien wurde das Übertragungspotential von PERV auf andere Organismen und insbesondere auf den Menschen evaluiert [Irgang et al., 2002; Irgang et al., 2003]. Auch wenn die bisherigen Ergebnisse nicht auf eine Übertragung *in vitro* schließen lassen, so bleibt ein Restrisiko bestehen. Die vollständige Eliminierung der proviralen Sequenzen von PERV durch konventionellen Gen-„knock-out“ ist auf Grund der hohen Anzahl an Kopien im porcinen Genom nahezu unmöglich. Auch die Zucht von sogenannten „low-producer“-Schweinen bringt keinen endgültigen Schutz, da es zu Rekombinationen der defekten viralen Kopien kommen kann und dadurch funktionelle, humanotrope Viren entstehen können. Der Einsatz der RNA-Interferenz könnte in diesem Zusammenhang einen weiteren Schutz bieten. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Virusreplikation mittels RNAi um bis zu 90% reduzieren lässt [Karlás et al., 2004]. Der Einsatz transgener Tiere, in deren Zellen die Virusreplikation durch RNAi unterdrückt ist, würde einen weiteren Sicherheitsfaktor bei der Xenotransplantation ergeben.

1.2.5 RNA-Interferenz als neue Waffe gegen HIV

In den letzten Jahren wird Gentherapie als mögliche Behandlung des AIDS erwogen. Verschiedene Arten der RNA-basierten Gentherapie, darunter antisense-RNA, katalytische-RNA (Ribozyme) und hoch affine RNA-Liganden (Aptamere oder RNA-Decoys), wurden entwickelt und zeigten, dass sie in der Lage sind, die HIV-1-Replikation zu hemmen. Obwohl einige Ansätze bis zur klinischen Phase I getestet wurden, gibt es bis heute keinen Ansatz der auf Effektivität getestet wurde. Zumeist konnte die Wirksamkeit dieser Systeme durch eine Erhöhung der Anzahl an viralen Partikel überwunden werden [Lee and Rossi, 2004].

Durch diese Limitierung der bisherigen Methoden wird die RNAi als Alternative angesehen. In verschiedenen Versuchen wurden siRNA direkt gegen das HIV-1-Genom konstruiert. Es wurde berichtet, dass die eintretende HIV-1-RNA durch siRNAs abgebaut werden kann [Jacque et al., 2002], obwohl andere Studien den Verdacht nahe legen, dass eintretende genomische RNA nicht für RNAi zugänglich ist [Hu et al., 2002; Waterhouse et al., 2001]. Wenn das virale Genom bereits integriert ist, sind die virale

mRNA sowie die verschiedenen Spleiß-Produkte mögliche Ziele für RNAi. Die frühen Transkripte *rev* und *tat* haben sich dabei als gute Ziele in verschiedenen Studien bewährt, da die Rev- und Tat-Proteine für die folgende Expression der Proteine Gag, Pol und Env essentiell sind.

Zusätzlich zu den viralen Genen bieten die zellulären Chemokin-Rezeptoren CCR5 und CXCR4 Angriffsmöglichkeiten für RNAi. CCR5 ist ein Corezeptor für makrophagotropes HIV-1 und gibt ein gutes Ziel für RNAi ab, da homozygote Deletionen von CCR5 einen Schutz vor HIV-1 bieten und keine schwerwiegenden Schäden im Immunsystem zur Folge haben [Samson et al., 1996]. Das Blockieren dieses Rezeptors konnte *in vitro* Zellen vor einer Infektion mit makrophagotropen HIV-1 schützen [Martinez et al., 2002]. Der Vorteil dieser Ansätze liegt darin, dass zelluläre Gene weniger mutieren als virale, wodurch sich nicht so schnell Fluchtmutanten gegen die eingesetzte siRNA ausbilden.

Neben dem Problem des Targetings *in vivo*, was bei allen gentherapeutischen Ansätzen vorhanden ist, sind Fluchtmutanten bei HIV gegen RNAi ein großes Problem. Da HIV bedingt durch die sehr ungenaue reverse Transkriptase sehr schnell mutiert, bilden sich zumeist auch sehr schnell Fluchtmutanten gegen die eingesetzten siRNAs aus [Boden et al., 2003; Das et al., 2004].

1.3 Lentivirus basierte Vektoren

Viren werden schon seit einiger Zeit als Vektoren verwendet, um verschiedenste Gene in eukaryotische Zellen zu transferieren. Retroviren sind in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung, da sie im Gegensatz zu anderen Viren ihr Genom stabil in das der Wirtszelle integrieren können. Die auf HIV-1 basierenden, lentiviralen Vektoren (Lentivektoren) sind zudem in der Lage, sich teilende und nicht teilende Zellen zu infizieren [Naldini et al., 1996]. Diese Eigenschaften macht sie, trotz der Risiken, zu hervorragenden Werkzeugen zum Gentransfer in der Grundlagenforschung sowie bei der gentherapeutischen Behandlung von Krankheiten.

Lentivektoren werden durch Coexpression der Verpackungselemente für die Viren zusammen mit dem Vektorgenom in Verpackungszellen hergestellt. Als Verpackungszellen dienen zumeist 293T Zellen, welche auf den humanen, embryonalen Nierenzelllinie 293 (HEK-293) basieren, jedoch zusätzlich das große T-Antigen des

Simian Virus 40 (SV40) exprimieren, wodurch maximale Virusproduktion ermöglicht wird [Damania and Alwine, 1996]. Um zu gewährleisten, dass sich der Lentivektor nur einmal integriert und keine infektiösen Partikel aus dem Provirus produziert werden können, wird die 3'-LTR durch Deletionen in der U3-Region inaktiviert, so dass diese nach der Integration nicht als Promotor für die viralen Gene funktionieren kann [Miyoshi et al., 1998; Zufferey et al., 1998; Iwakuma et al., 1999]

Im Fall der auf HIV-1 basierenden Vektoren stammen alle Kern- und Enzym-Komponenten von HIV-1 selbst, die Virushülle wird meist vom G-Protein des Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV-G) abgeleitet, da dieses stabiler ist und einen breiten Tropismus aufweist [Reiser et al., 1996; Reiser, 2000; Iwakuma et al., 1999]. Aus Sicherheitsgründen werden die einzelnen genetischen Informationen zum Zusammenbau der Viren auf verschiedene Plasmide verteilt. Drei Generationen von HIV-1-basierten Verpackungssysteme wurden in der Vergangenheit erfolgreich zur Produktion lentiviraler Vektoren mittels transienter Transfektion von 293T-Zellen eingesetzt:

- **erste Generation:** Das Verpackungssystem stellt alle HIV-1-Gene mit Ausnahme des *env*-Gens zur Verfügung
- **zweite Generation:** Das Verpackungssystem ist in einigen Hilfsgenen wie *nef*, *vif* und *vpu* deletiert.
- **dritte Generation:** Das Verpackungssystem stellt nur *gag*, *pol* und *rev* zur Verfügung. Da kein Tat exprimiert wird, werden die zu verpackenden Gene auf dem Transfektor von chimären LTR-Promotoren, welche mit CMV- oder SV40-Promotoren kombiniert wurden, abgelesen. Dieses System bietet die höchste Sicherheit, ist jedoch sehr umständlich, da vier verschiedene Plasmide zur Transfektion nötig sind [Dull et al., 1998].

Ein Verpackungssystem der zweiten Generation ist ausreichend für die meisten Anwendungen. Die in dieser Arbeit verwendeten Lentivektoren und Verpackungsplasmide sind im Anhang S: VIII-IX dargestellt.

Lentivektoren haben sich in der Vergangenheit auch zur Herstellung transgener Tiere bewährt. Die Ausbeute an Tieren, die das Transgen exprimieren ist im Vergleich zur DNA-Mikroinjektion um ein Vielfaches höher [Hofmann et al., 2003; Hofmann et al., 2004].

1.4 Zielstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Versuche unternommen werden, die Expression von PERV und HIV mittels RNA-Interferenz zu hemmen und einen Moleklarklon einer natürlichen Rekombinante von PERV-A und PERV-C zu generieren.

PERVs stellen ein Infektionsrisiko beim Einsatz von Xenotransplantaten dar. Eine Infektion des Transplantatempfängers könnte zu Tumoren und Immunschwächen führen.

Als Ausgangsbasis für den Moleklarklon diene ein A/C-rekombinantes, auf humane Zellen adaptiertes PERV mit einer hohen Replikationskapazität. Bislang gelang es PERV-A und PERV-B als Moleklarklon darzustellen. Von PERV-C ist lediglich eine auf mRNA basierende Sequenz bekannt (PERV-MSL). Mit dem hier zu erstellenden Moleklarklon sollte zum ersten mal die Sequenz der A/C-rekombinanten PERV-Variante für weitere Analysen zugänglich gemacht werden. Zudem sollte auch die verlängerte virale LTR der auf humanen Zellen adaptierten PERVs in diesem Moleklarklon enthalten sein. Mit Hilfe des Moleklarklons sollte untersucht werden, ob Zellen von Mäusen und Ratten, die keinen funktionellen Rezeptor für PERV tragen, infektiöse PERV-Partikel bilden können.

Die RNA-Interferenz stellt eine Strategie dar, die Expression von PERV in Schweinezellen zu unterdrücken um so eine Übertragung von PERV bei Xenotransplantation zu senken. Dafür sollten shRNA-Expressionskassetten in lentivirale Vektoren kloniert werden. Mittels dieser Vektoren sollten porcine Fibroblasten transduziert und die Hemmung der PERV-Expression analysiert werden. Damit sollte zum ersten Mal die Expression von PERV in primären Schweinezellen direkt gehemmt werden.

Im einem weiteren Teil der Arbeit sollten Versuche unternommen werden, die Expression von HIV-1 durch RNAi zu unterdrücken. Dafür sollten siRNAs gegen verschiedene Zielsequenzen getestet werden. Darüberhinaus wurden diese noch mit spezifischen Fehlpaarungen am 3'-Ende des Sense-Stranges versehen, um ihre Wirksamkeit zu verstärken. Für eine dauerhafte Inhibition von HIV-1 sollten diese Sequenzen in shRNA-Expressionsvektoren kloniert werden. Ebenso sollten lentivirale Vektoren mit shRNA-Expressionskassetten versehen werden, welche möglicherweise bei einer Gentherapie zum Einsatz kommen könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Isolierung, Trennung und Reinigung von DNA

2.1.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Zellen

Genomische DNA aus eukaryotischen Zellkulturen wurde mit Hilfe des QIAmp[®] DNA Blood Mini Kit (Qiagen; Hilden, D) isoliert. Die Zellen wurden zunächst abzentrifugiert (1600 g, 6 min), anschließend wurde das Medium vorsichtig entfernt. Das Zellpellet wurde zu einem Gesamtvolumen von 200 µl in PBS resuspendiert. Im weiteren Verlauf wurde das Protokoll des Herstellers befolgt. Die DNA wurde in 100 µl Nuclease-freiem Wasser (Promega, Mannheim, D) von der Säule eluiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.1.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Kontrolle von Transformationen wurden bei der sogenannten MiniPräp kleine Mengen an Plasmid-DNA mit dem Jetquick Plasmid Mini Kit (Genomed, Löhne, D) nach Anleitung des Herstellers isoliert. Dafür wurden Zellen aus 2 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur geerntet (6000 g, 2 min). Am Ende wurde die Plasmid-DNA mit Nuclease-freiem, auf 70°C temperierten Wasser von der Silikamatrixsäule eluiert.

Zur Gewinnung von größeren Mengen an Plasmid-DNA wurde eine MaxiPräp aus 100 ml Bakterienkultur mit Hilfe des Jetstar Plasmid Maxi Kit (Genomed) oder des Endofree[®] Maxi Kit (Qiagen) nach den Empfehlungen der jeweiligen Hersteller durchgeführt. Das Endofree[®] Maxi Kit liefert qualitativ hochwertige, Endotoxin-freie DNA, welche sich zur Transfektion eukaryotischer Zellen eignet. Das zuletzt erhaltene DNA-Pellet wurde in 100 µl TE-Puffer (Genomed) bzw. Endofree[®]-TE-Puffer (Qiagen) gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

2.1.1.3 Reinigung DNA-haltiger Lösungen

Falls erforderlich, wurde die DNA nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau mit dem QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen) nach den Anweisungen des Her-

stellers gereinigt. Zur Elution wurden 30 µl Nuclease-freies Wasser verwendet.

2.1.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden, je nach Länge, auf 1-2%igen Agarose-Gelen (Roth, Karlsruhe, D) in 1x TEA-Puffer bei 80-100 V etwa 60 min getrennt (Apparatur: Biorad, Hercules, USA). Nach dem Lauf wurde das Gel in 5 mg/ml Ethidiumbromid Lösung (Sigma-Aldrich Chemicals, Deisendorf, D) etwa 20 min gefärbt und anschließend mit dem BioRad GelDoc2000 dokumentiert.

DNA-Fragmente, die aus Agarose-Gelen zurückgewonnen werden sollten, wurden aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit aufgereinigt. Zur Elution wurden hier ebenfalls 30 µl Nuclease-freies Wasser verwendet.

Die Behandlung mit Ethidiumbromid und UV-Licht birgt die Gefahr, dass in dem DNA-Fragment Mutationen entstehen, welche Funktion eines Gens beeinträchtigen oder zerstören, wenn diese noch gebraucht wird. Dies gilt insbesondere für sehr lange Fragmente. Daher wurde bei der Herstellung des Moleklarklons darauf verzichtet, Gele mit Ethidiumbromid und UV-Licht zu behandeln, um die DNA-Sequenz und deren Funktion nicht zu gefährden. In diesem Fall wurden die Fragmente mit dem S.N.A.P.TM UV Free Gel Purification Kit (Invitrogen, Karlsruhe, D) getrennt und gereinigt.

2.1.2 RNA-Isolierung

RNA wurde aus Zellen mit dem Tri-Reagent (Sigma-Aldrich) und dem RNeasy® Mini Kit (Qiagen) isoliert. Hierfür wurden die Zellen je nach Zelllinie gesplittet. Die Zellen, aus denen die RNA isoliert werden sollte, wurden abzentrifugiert (1600 rpm, 6 min, 4°C), mit kalter PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die PBS wurde vollständig entfernt, das Zellpellet in 1 ml Tri-Reagent pro etwa $1,5 \times 10^6$ Zellen aufgenommen, und die Suspension wurde homogenisiert. Diese wurde in 2 ml Eppendorfgläser zu je 1 ml aliquotiert und gegebenenfalls bei -80°C aufbewahrt.

Im Anschluss wurde die Suspension etwa 15 min bei Raumtemperatur unter dem Abzug inkubiert, insbesondere wenn sie aus -80°C aufgetaut worden war. Pro 1 ml Tri-Reagent wurden 200 µl Chloroform (Merck, Darmstadt, D) zugegeben, gut vermischt und das Ganze erneut 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der anschließenden Zentrifugation (12000g, 15 min, 4°C) bildeten sich drei Phasen, wobei sich die RNA in

der wässrigen Phase (oberste) befand. Diese wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Dazu wurde ein Volumen (etwa 400µl) 70% Ethanol (Merck) in DEPC-Wasser zugegeben und die Lösung gut gemixt (nicht gevortext).

Das Gemisch wurde auf eine Säule aus dem RNeasy® Mini Kit gegeben und zentrifugiert (10000 g, 1 min). Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule daraufhin mit 350 µl Puffer RW1 (Qiagen) gewaschen (Zentrifugation wie vorher). Restliche DNA wurde mittels RNase freier DNase (Qiagen) auf der Säule verdaut. Dazu wurden 30 U DNase in 80 µl mitgelieferten RDD Puffer gelöst, direkt auf die Säule gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Säule ein weiteres mal mit 350 µl Puffer RW1 gewaschen. Es folgten zwei Waschschrirte mit jeweils 500 µl Puffer RPE (Qiagen) wobei ebenfalls wie vorher angegeben zentrifugiert wurde. Zum Abschluss wurde nochmals 2 min bei 12000 g zentrifugiert um eventuell verbleibende Reste des Waschpuffers zu entfernen. Die gereinigte RNA wurde in 30 µl RNase-freiem Wasser (Qiagen) eluiert (Zentrifugation wie beim Waschen). Wenn die RNA nicht sofort weiter in einer cDNA-Synthese-Reaktion Verwendung fand, wurde sie bei -80°C gelagert.

2.1.3 cDNA-Synthese

Aus isolierter RNA wurde mit dem RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St.Leon-Roth, D) cDNA hergestellt, welche anschließend zur PCR verwendet werden konnte. Dabei wurde die gesamte RNA mit den Random Hexamer Primern (Fermentas) nach den Vorgaben des Herstellers umgeschrieben. Um falsch positive Ergebnisse durch DNA-Kontaminationen zu vermeiden, wurde zu jeder Probe eine Kontrolle ohne RevertAid™ M-MuLV Reverse Transkriptase hergestellt (*no-DNA-control*).

2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Alle Polymerase-Kettenreaktionen (PCRs) wurden in PTC-200-Cyclern (MJ Research, Waltham, USA) oder in einem GeneAmp PCR System 2400-Cycler (PerkinElmer/Applied Biosystems, Weiterstadt, D) durchgeführt.

2.1.4.1 Primer-Design

Die meisten in dieser Arbeit verwendeten Primer fanden bereits vorher in der Arbeitsgruppe Verwendung und wurden übernommen. Weitere Primer wurden mit dem Programm Lasergene[®]-PrimerSelect (DNAS[®]Star) oder mit dem im Internet kostenlos zur Verfügung stehenden Programm Primer3 entwickelt (Primer3: http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang, S: I-V angegeben.

2.1.4.2 Standard-PCR

Amplifikationsreaktionen zum Nachweis bestimmter Sequenzen wurden in 25 µl Gesamtvolumen durchgeführt. Als Reaktionspuffer wurde meistens GeneAmp[®] 10x PCR Gold Puffer (Applied Biosystems) eingesetzt. In einigen Reaktionen wurde ein 10x PCR Puffer mit (NH₄)₂SO₄ eingesetzt (750 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20; Fermentas). Dieser wurde noch mit 2,0±0,5 mM MgCl₂ (Fermentas) supplementiert. Des Weiteren wurden 400 µM Desoxyribonucleotide (Fermentas), 400 nM der jeweiligen Primer, sowie 0,5 U AmpliTaq Gold[®] Polymerase (Applied Biosystems) eingesetzt.

Das Temperaturprogramm richtete sich nach den Gegebenheiten der Reaktion, welche Primer Verwendung fanden und welches Template vorlag. Nach der erstmaligen Denaturierung bei 95°C für 10 min, bei der auch die Hot-Start-Polymerase aktiviert wird, folgten 25-35 Zyklen mit jeweils 30-60s bei 94°C (Denaturierung), 30-60s bei 50-60°C (Primer-Annealing), abhängig von der Primer Sequenz, und 30-60s bei 72°C (Elongation), je nach Länge des Amplifikats. Anschließend folgten noch 7 min bei 72°C, bevor die Reaktion durch Abkühlen auf 4°C beendet wurde.

2.1.4.3 High-Fidelity-PCR zur Herstellung des PERV-Klons

Der High-Fidelity-PCR-Enzyme-Mix (Fermentas) wurde benutzt, um das PERV Genom zu amplifizieren. Dieser Mix besteht aus der hoch prozessivem *Taq*-DNA-Polymerase und einer zweiten *Pfu*-DNA-Polymerase, die eine 3'→5' Exonuclease Aktivität und somit eine Proofreading Funktion besitzt. Mit dieser Mischung der beiden Enzyme lassen sich laut Angaben des Herstellers Fragmente bis zu einer Länge von 10 kb aus genomischer DNA amplifizieren. Die Fehlerrate liegt laut den Angaben bei 5,2x10⁻⁶

Fehler pro Nucleotid (Nt) und Zyklus und damit weit unter der Fehlerrate der *Taq*-Polymerase (2.2×10^{-5} Fehler pro Nt und Zyklus). Da zur Herstellung des Molekularklons lange Fragmente und möglichst wenig Fehler nötig waren, eignete sich die High Fidelity PCR sehr gut zu deren Amplifikation.

Für beide Klone wurden der *gag-pol*-Bereich mit dem selben Reaktionsgemisch und Programm amplifiziert, lediglich der 5'-Primer war verschieden, da beim Klon PERV-XL2 die gesamte 5'-LTR amplifiziert werden sollte, beim Klon PERV-CMV sollte erst ab der R-Region amplifiziert werden. Für den PERV-XL2-Klon wurden die Primer PERV-LTR34 und PERV-gp70-blunt-down verwendet, für den PERV-CMV-Klon PERV-LTR-R-*SpeI*-up und ebenfalls PERV-gp70-blunt-down. Die Reaktionen wurden in 50 μ l Gesamtvolumen durchgeführt. Als Reaktionspuffer diente 10x High Fidelity PCR Puffer (Fermentas) der zusätzlich mit 2 mM $MgCl_2$ (Fermentas) und 4% DMSO (Sigma-Aldrich) supplementiert wurde. Dazu wurden 200 μ M dNTPs (Fermentas), 400 nM Primer und 0,5 U High-Fidelity-PCR-Enzyme-Mix gegeben. Es wurden etwa 600 ng genomischer DNA aus 293/5° Zellen eingesetzt. Die Reaktion fand in einem PTC-200-Cycler (MJ-Research) unter folgenden Temperaturbedingungen statt:

Die DNA wurde zunächst 2 min bei 94°C denaturiert. Darauf folgten 10 Zyklen mit jeweils 1 min bei 94°C, 1 min bei 58°C und 8 min bei 68°C. Im Anschluss daran folgten wiederum 25 Zyklen zu den gleichen Bedingungen bei der Denaturierung und beim Primer Annealing, bei der Elongation wurde, ausgehend von 8 min, mit jedem weiteren Zyklus die Dauer um 10 s erhöht. Zum Abschluss wurde noch eine finale Elongation für 10 min bei 68°C durchgeführt, bevor die Reaktion durch Abkühlen auf 4°C beendet wurde.

Zur Amplifikation des *env*-Fragments wurden für beide Klone die Primer PERV-gp70-mid-sac-up und PERV-3-LTR-*KpnI*-down. Die Reaktionsbedingungen waren die selben wie zur bei der Amplifikation des *gag-pol*-Fragments, lediglich das Temperaturprogramm wurde entsprechend den neuen Bedingungen angepasst. Die Elongationszeit wurde auf 2 min reduziert und über die gesamten 35 Zyklen konstant gehalten wobei auch die Temperatur in diesem Teilabschnitt auf 72°C erhöht wurde. Darüberhinaus wurde die Annealing Temperatur auf 56°C festgelegt.

2.1.4.4 Mutagenese-PCR

Die Mutagenese-PCR diente der gezielten Korrektur von Punktmutationen in der Sequenz des Moleklarklons. Dazu wurden Primer verwendet, die direkt auf dem auszutauschenden Nucleotid komplementär zum Template binden und in der Mitte das auszutauschende Nucleotid trugen. Je einer dieser Primer reagierte getrennt auf der Template-DNA mit einem terminal bindenden Außenprimer. Die so entstehenden PCR-Produkte wurden in einer zweiten PCR gemeinsam als Template eingesetzt, wobei Primer verwendet wurden, die innerhalb der, von den Außenprimern amplifizierten, Sequenz binden. Über die komplementären Sequenzen lagerten sich die beiden PCR-Produkte aus der ersten Reaktion aneinander und wurden über die Außenprimer verlängert. Das so entstandene PCR-Produkt trug den sequenzspezifischen Austausch und wurde in das Plasmid ligiert.

2.1.4.5 Real-time-PCR

Die Real-time-PCR mit Sybr-GreenTM (Stratagene, Amsterdam, NL) wurde zum quantitativen Nachweis der Expression der viralen mRNA verwendet. Es wurden 500-1000 ng der aus den Zellen gewonnenen cDNA (Abschnitt 2.1.3) in jeder Reaktion eingesetzt. Dazu wurden 6 µl 2x Sybr-Green Puffer (Stratagene), 0,25 µl 100 mM Rox-Lösung (Stratagene) sowie 0,5 µl einer 100 µM Lösung der jeweiligen Primer zugegeben und mit Nuclease-freiem Wasser auf 12 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Reaktion fand in einem Real-time-Cycler MX-4000 (Stratagene) statt. Zur Normalisierung der eingesetzten mRNA-Menge wurde der Level an GAPDH quantifiziert, wobei man davon ausgeht, dass GAPDH in allen Zellen gleich stark exprimiert wird. Ausgewertet wurde die Reaktion nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode [Winer et al., 1999].

2.1.4.6 DNA-Sequenzierung

Sämtliche Sequenzierungen wurden vom Sequenzierlabor des Robert Koch-Instituts bei Dr. Emmel durchgeführt. Sequenziert wurde nach der Sanger-Methode mit dem ABI-PRISM[®]-BigDyeTM 3.1 Terminator (Applied Biosystems, Weiterstadt, D). Reaktionsansätze waren 10 µl im Volumen, wobei etwa 200 ng Plasmid DNA eingesetzt wurde, 2 µl 5xPuffer, 2 µl BigDye 3.1 und 5 nM Primer. Die Cycler Bedingungen wurden wie folgt gewählt: Denaturierung bei 96°C für 2 min, anschließend 25 Zyklen

mit jeweils 96°C für 10 s, 55°C für 5 s 60°C für 4 min. Die Reaktion wurde durch abkühlen auf 4°C beendet und die Proben bis zur Analyse im Sequenzierlabor bei -20°C eingefroren.

2.1.5 Restriktionsverdau

Die verwendeten Restriktionsendonucleasen stammten von der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt/Main, D). Beim Verdau kamen die vom Hersteller mitgelieferten Puffer und das BSA zum Einsatz. Verdaut wurde im Allgemeinen etwa 1 h bei der für das jeweilige Enzym empfohlenen Temperatur. Die Reaktionen fanden im 20-40 µl Ansatz statt, wobei etwa 1 µg zu verdauende DNA, 5-10 U Enzym sowie die dem Volumen entsprechende Menge Puffer und BSA zugegeben wurde.

2.1.6 Ligation

Sämtliche Ligationsreaktionen wurden entweder mit der T4-DNA-Ligase (NEB) oder mit dem Quick Ligation™ Kit (NEB) durchgeführt. In beiden Fällen wurde in einem 20 µl Ansatz etwa 20-100 ng Vektor, 2-6 facher molarer Überschuss an Insert nach den Empfehlungen von NEB ligiert. Bei der T4 Ligase wurde 1 h bei 16°C inkubiert, beim Quick Ligation™ Kit 5 min bei Raumtemperatur.

2.1.7 Sonstige enzymatische DNA-Modifikationen

Vor einer Ligation wurden die Vektoren in den meisten Fällen dephosphoryliert, um Religationen mit sich selbst zu vermeiden. Dazu wurde der Vektor mit der Antarctic Phosphatase (NEB) wie empfohlen inkubiert. Gegebenenfalls wurde das Enzym anschließend 5 min bei 65°C inaktiviert.

Die synthetischen 64 nt Oligos mussten vor einer Ligation in den dephosphorylierten Vektor mit der T4 Polynucleotid-Kinase (NEB) phosphoryliert werden.

Bei der Verkürzung des Vektors pcDNA3.1(+) (Invitogen) wurde die nicht benötigte Neomycin Resistenz mit den Restriktionsendonucleasen *Not* I und *Bst*Z17 I herausgeschnitten. Da die Überhänge, die von den beiden Enzymen produziert werden, nicht miteinander kompatibel sind, wurden sie mit Hilfe der Mung-Bean Nuclease (NEB) abverdaut und der Vektor durch eine blunt-end-Ligation wieder geschlossen.

Alle Reaktionen sind nach den Vorgaben der Hersteller von den jeweiligen Enzymen durchgeführt worden.

2.1.8 Vektoren zur shRNA-Expression

Der Plasmidvektor pSUPER.gfp/neo, der zur stabilen Transfektion eukaryotischer Zellen mit shRNAs benutzt wurde, stammte von der Firma Oligoengine™ (Keystone, USA; Vektorkarte im Anhang, S: IX).

Der verwendete lentivirale Vektor pLVTHM zur shRNA-Expression ist von Prof. Dr. Didier Trono (Tronolab, Universität Genf, CH) zur Verfügung gestellt worden. Die Plasmide, die zur Verpackung der Viruspartikel in den 293FT Zellen benötigt wurden, stammten ebenfalls von Prof. Trono (Vektorkarten im Anhang, S: VIII-IX).

2.1.9 Oligos zur shRNA-Expression

Die Sequenz, die in den Zellen als shRNA exprimiert werden sollte, musste, um in die verwendeten Vektoren pSUPER.gfp/neo und pLVTHM ligiert werden zu können, von den Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *Bgl*III und *Hind*III (pSUPER) oder *Mlu*I und *Cla*I (pLVTHM) flankiert werden. Der Loop wurde nach Erkenntnissen zur bestmöglichen Wirkung der shRNA gebildet [Brummelkamp et al., 2002]. Die genauen Sequenzen, die in die jeweiligen Vektoren kloniert wurden, können im Anhang, S: VI, eingesehen werden.

Die verwendeten 64-mere wurden im 0,05 μ M Maßstab ohne HPLC Aufreinigung von der Firma Sigma-Genosys (Steinheim, D) bezogen.

Vorbereitung der Oligos

Annealing Puffer (pH 7,4)

100 mM	NaCl (Fluka, Buchs, CH)
50 mM	HEPES (Sigma)

Die erhaltenen einzelsträngigen Oligos wurden zu einer Konzentration von 3 mg/ml in Nuclease-freiem Wasser gelöst. Die Annealing-Reaktion bestand aus je 1 μ l der beiden Oligos (*forward* und *reverse*) und 48 μ l Annealing Puffer. In einem PCR-Cycler wurde die Mischung auf 90°C für 4 min erhitzt, danach für 10 min auf 70°C. Die annealten Oligos wurden dann langsam mit 1°C pro Minute auf 10°C abgekühlt und an-

schließend in den Vektor ligiert oder bei -20°C eingefroren.

Nach der Ligation wurden alle Sequenzen in den Vektoren durch eine Sequenzierung mit dem H1-Primer überprüft (Sequenz im Anhang, S: V). Durch die ausgeprägte Sekundärstruktur sind diese Sequenzen anfällig für Mutationen.

2.1.10 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Bei der Transformation von *E.coli* OneShot® Top10 oder *E. coli* XL10 Gold® (beide Invitrogen) wurde die Hitze-Kühl-Schock Methode angewandt.

Verwendete Medien und Antibiotika:

LB-Medium (pH 7,0)

10 g/l	NaCl (Fluka)
10 g/l	Trypton
5 g/l	Hefextrakt

LB-Agar (pH 7,0)

LB Medium plus 20 g/l Agar (Sigma)

Die Medien wurden autoklaviert und bei 4°C gelagert. Vor der Verwendung wurde gegebenenfalls das gewünschte Antibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin; Serva, Heidelberg, D) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben.

Durchführung:

Ein Röhrchen mit 100 µl kompetenter Bakterien wurde auf Eis aufgetaut. Zu den Zellen wurde 5-10 µl Ligationsansatz gegeben (etwa 50 ng Plasmid), vorsichtig gemischt und das Ganze 30 min auf Eis inkubiert. Für den Hitzeschock kam der Transformationsansatz für 30 s in einen 42°C warmen Heizblock (Thermomixer, Eppendorf, Hamburg, D) und anschließend wieder für 2 min auf Eis. Dazu wurde 1 ml vorgewärmtes LB-Medium ohne Antibiotikum gegeben und die Zellsuspension bei 37°C im Schüttler für 1 h inkubiert. Währenddessen wurden LB-Platten bei Raumtemperatur angewärmt. Etwa 100 µl Transformationsansatz wurden auf einer LB-Platte, mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion, ausgestrichen. Im Falle von Transformationen sehr großer Plasmide wurden die Zellen zunächst sedimentiert (6000 g, 2 min, RT), in 100 µl Medium resuspendiert und ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.1.11 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Zur Klonierung der Plasmide wurden chemisch kompetente Bakterienstämme vom Typ *E. coli* OneShot® Top10 und *E. coli* XL10 Gold® (Invitrogen) verwendet. Diese wurden in unserem Labor mit der Rubidiumchlorid-Methode chemisch kompetent gemacht.

Lösungen:

TFB-1 (pH 5,8)

100 mM	RbCl (Merck)
50 mM	MnCl ₂ (Merck)
30 mM	Kaliumacetat (Merck)
10 mM	CaCl ₂ (Merck)
15% (v/v)	Glyzerin (Merck)

TFB-2 (pH 6,8)

10 mM	MOPS (Sigma-Aldrich)
10 mM	RbCl (Merck)
75 mM	CaCl ₂ (Merck)
15% (v/v)	Glyzerin (Sigma-Aldrich)

Beide Lösungen wurden sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

Durchführung:

Aus einer über Nacht angewachsenen Kultur wurden 100 ml vorgewärmtes LB-Medium ohne Antibiotikum 1:1000 angeimpft und schüttelnd bei 37°C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht war. Die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindliche Bakterienkultur wurde für 5 min auf Eis abgekühlt, bevor die Zellen für 5 min bei 4000 rpm und 4°C sedimentiert wurden (Zentrifuge: Megafuge 1.0R, Haereus, Langenselbold, D). Der Überstand wurde abgenommen und das Bakterienpellet in 30 ml 4°C kaltem TFB-1 aufgenommen. Die Suspension lag danach für weitere 90 min auf Eis. Die Zellen wurden wieder zentrifugiert (5 min, 4000 rpm, 4°C), der Überstand abgenommen und das Pellet wurde in 4 ml eiskaltem TFB-2 resuspendiert. Aliquote zu 100 µl wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich bei -80°C gelagert.

2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1 Proteinisolation aus Zellen

Protein wurde mittels RIPA- Puffer aus eukaryotischen Zellen isoliert.

RIPA-Puffer (pH 8,0)

1% (v/v)	Nonidet P-40 (Sigma)
0,5% (v/v)	Natriumdesoxycholat (Sigma)
0,1% (v/v)	Na-SDS (Merck)
5 mM	EDTA (Sigma)
10 mM	Natriumfluorid (Sigma)
10 mM	Natriumpyrophosphat (Sigma)
0,2 mM	PMSF (Roth)
1 mg/ml	Pepstatin A (ICN Biomedicals, Eschwege, D)
150 mM	NaCl (Sigma)
50 mM	Tris-HCl (Merck)

Die Zellen wurden abzentrifugiert und das Medium abgenommen. Daraufhin wurden sie in 500 µl kaltem RIPA- Puffer aufgenommen und die Suspension 15 min auf Eis inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation (10000 rpm, 15 min, 4°C) wurden die im Überstand gelösten Proteine in ein neues Röhrchen überführt und bei -20°C gelagert.

2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt wurde entweder nach Bradford (BioRad) oder mittels BCA-Protein-Assay (Pierce, Rockford, USA) bestimmt. Beide Bestimmungen wurden im Mikrotiter-Maßstab nach den Vorgaben der Hersteller durchgeführt.

2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Zellelektrophoresen (SDS-PAGE)

Protein-Isolate wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen in einer Hofer-Kammer (Hofer, San Francisco, USA) aufgetrennt.

Lösungen:**Gelpuffer (pH 8,4)**

3,0 M	Tris-HCl (Merck)
0,3% (w/v)	Na-SDS (Merck)

Der Puffer wurde bei 4°C aufbewahrt.

Kathodenpuffer (pH 8,25)

0,1 M	Tris-Base (Sigma-Aldrich)
0,1 M	Tricin (Sigma-Aldrich)
0,1% (w/v)	Na-SDS

Anodenpuffer (pH 8,9)

0,2 M	Tris-HCl
-------	----------

10% Ammoniumperoxodisulfat**Probenpuffer**

50 mM	Tris-HCl
12% (v/v)	Glycerin
4% (w/v)	Na-SDS
0,01% (v/v)	Coomassie Blue G-250 (Sigma)
5% (v/v)	2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)

Der Puffer wurde ohne Mercaptoethanol zu je 1 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert. Mercaptoethanol wurde erst kurz vor der Verwendung zugegeben.

Durchführung:

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde in Kammern der Firma Hoefer Pharmacia Biotech (San Francisco, USA) bei 0,03-0,06 mA Stromfluss gefahren. Als Trenngel wurde ein 10%iges, als Sammelgel ein 4%iges Polyacrylamidgel verwendet. Zur Abschätzung der Molekulargewichte wurde als Massenstandard 10 µl des Markers SeeBlue Plus2 (Invitrogen) eingesetzt. Die Proben wurden vor der Beladung 1:1 mit Probenpuffer vermischt und 10 min bei 95°C denaturiert. Die Gele wurden anschließend auf eine Membran geblottet (vgl. Abschnitt 2.2.4). Die aufgetragene Menge Protein lag zwischen 10 und 50 µg.

2.2.4 Western-Blot

Zum Nachweis der exprimierten Virusproteine wurden diese nach der SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran Immobilon-P^{SQ} (Porengröße 0,2 µm, Millipore, Schwalbach, D) geblottet.

Lösungen:

Transferpuffer (pH 9,2)

48 mM	Tris-Base (Sigma-Aldrich)
39 mM	Glycin (Sigma-Aldrich)
20% (v/v)	Methanol (Roth)
0,0375% (w/v)	Na-SDS (Merck)

Waschpuffer (pH 7,3)

0,05% (v/v) Tween80 (Sigma) in PBS

Blockierungspuffer

3% BSA in PBS

Puffer zum Lösen der Antikörper

1% BSA in PBS

0,025 M Tris-HCl (pH 8,0)

Substratlösung (pH 8,0)

0,025 M	Tris-HCl
1,5 mM	3-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (Fluka)
0,03% (v/v)	Wasserstoffperoxid (Sigma)

Durchführung:

Das Gel wurde nach dem Lauf etwa 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Die Membran kam zur Aktivierung zunächst in Methanol, bevor sie ebenfalls zu dem Gel in den Transferpuffer gegeben wurde. In einer Trans Blot Semi-Dry Transfer Cell (Biorad) wurde dann das Sandwich bestehend aus einem mit Transferpuffer angefeuchtetem Blotpapier (CriterionTM, BioRad), der PVDF-Membran, dem PAA-Gel und zum oberen Abschluss ein weiteres mit Transferpuffer angefeuchtetes Blotpapier zusammengebaut. Nach dem Auflegen der Kathode erfolgte das Blotten bei 20 V für 30 min. Anschließend wurde die Membran für mindestens 1 h bei Raumtemperatur, gegebenenfalls über Nacht bei 4°C schüttelnd in Blockierungspuffer inkubiert.

Der Primärantikörper aus polyklonalem Antiserum der mit PERV-Gag im-

munisierten Ziege¹⁴ und Ratte³ wurde 1:100 in PBS-BSA-Puffer verdünnt und die Membran darin 1 h bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach dem Waschen in Waschpuffer für 6 mal 5 min wurde der Zweitantikörper zugegeben.

Die verwendeten Zweitantikörper waren monoklonale Antikörper gegen Ziegen- oder Ratten-IgG und kamen 1:1000 verdünnt in PBS-BSA-Puffer für 1 h auf die Membran. Anschließend wurde erneut gewaschen. Vor der Farbreaktion wurde die Membran 10 min in 25 mM Tris-HCl äquilibriert und daraufhin die Substratlösung zugegeben. Die Färbung wurde durch Waschen der Membran mit Wasser abgebrochen, sobald die Banden zu erkennen waren. Die Membranen konnten getrocknet und aufbewahrt werden.

2.2.5 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der p24-Capture-ELISA zum Nachweis von HIV-Gag in zellfreien Zellkulturüberständen wurde von Dr. Steve Norley (P22, Robert Koch-Institut) durchgeführt.

2.2.6 Reverse Transkriptase-Nachweis

Zum Nachweis von reverser Transkriptase in zellfreien Überständen wurde der Zellkulturüberstand von den Zellen abgenommen, zentrifugiert (2500 rpm, 10 min, 4°C) und sterilfiltriert über einen 0,45 µm Filter (Schleicher&Schuell, Dassel-Relliehausen, D). Anschließend wurde die Aktivität der reversen Transkriptase mit dem Cavid-HS-Kit Mn²⁺ (Cavidi, Uppsala, S) bestimmt.

2.3 Zellkulturtechnische Methoden

2.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Humane Zellen und Zellen anderer Säugetiere wurden in Zellkulturflaschen (TPP, Trasadingen, CH) im Brutschrank (BBD 6220, Heraeus) bei 37°C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Alle Zellkulturexperimente fanden unter sterilen Bedingungen in einem L2**-Labor statt.

2.3.1.1 Verwendete primäre Zellen, Zelllinien und Medien

Nachfolgend sind die in den Versuchen verwendeten Zelllinien und die jeweils verwendeten Medien beschrieben.

HEK293 FDA (ATCC-Nr.: CRL-1573)

- humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie (293).
- Semi-adhärenz wachsende Zellen
- Medium: Dulbeccos modified Eagle Medium (D-MEM)+ 10% Fetales Kälber Serum (FKS, Biochrom, Berlin, D) + 2 mM Glutamin (Biochrom) + 15 mM HEPES pH 7,3 (Biochrom) + 1% Streptomycin (Biochrom)

293FT (Invitogen)

- 293FT Zellen sind abgeleitet von 293 Zellen (ATCC Nr. CRL-1573)
- Expressieren das SV40 large T Antigen vom Plasmid pCMVSPORT6TAg.neo, wodurch sie zur Generierung lentiviraler Konstrukte bestens geeignet sind [Damania and Alwine, 1996].
- Medium wie 293 mit zusätzlich 0,5 mg/ml G418 (Geneticin, Gibco, Crewe, UK)

HeLa-P4 (basieren auf HeLa-Zellen, ATCC-Nr: CCL-2)

- Zelllinie aus humanem Cervix-Karzinom
- Transformiert, um HIV-Rezeptoren CD4 und CCR-5 auf der Oberfläche zu exprimieren
- Adhärenz als Monolayer wachsende Zellen
- Medium wie 293 mit zusätzlich 0,5 mg/ml G418 und 3 mg/ml Puromycin (Gibco)

C8166 (ECACC-Nr. 88051601)

- HTLV-transformierte, humane lymphoide T-Zelllinie
- Suspensionszellen, Wachstum als Zellhaufen
- Medium: RPMI 1640 + 10% FKS + 2 mM Glutamin + 15 mM HEPES pH 7,3 + 1% Streptomycin

RAT-2 (ECACC Nr. 94050409)

- Fibroblasten-Zelllinie aus Ratten-Embryo
- Adhärenz, als Monolayer wachsende Zellen
- Medium wie HEK293-Zellen

NIH/3T3 (ATCC-Nr. CRL-1658)

- Zelllinie aus Maus Embryo
- adhärent wachsende Zellen
- Medium wie 293/FDA

Porcine Fibroblasten (SE105)

- Primärzellen aus porcinen Embryonen der deutschen Landrasse
- Medium: D-MEM + 10% FKS + 2 mM Glutamin + 0,1 mM Mercaptoethanol + 1% nicht-essentielle Aminosäuren (Sigma) + 1% Vitamin-Lösung (Sigma) + 1% Streptomycin

2.3.1.2 Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden, je nach Wachstumsgeschwindigkeit, alle 48-72 h gesplittet.

Adhärente Zellen (mittlere Flasche, 75 cm²):

Zum Splitten adhärent wachsender Zellen wurde zunächst das alte Medium abgenommen und mit 10 ml steriler PBS ohne Mg²⁺ oder Ca²⁺ gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden 2 ml Trypsin zugegeben und etwa 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 8 ml Medium in die Flasche gegeben und die Zellen mit der Pipette von der Flasche abgelöst. 8 ml der Zellsuspension wurden verworfen oder zu anderen Zwecken verwendet, die verbliebenen 2 ml wurden mit 18 ml frischem Medium versetzt und weiter kultiviert.

Suspensionszellen C8166 (mittlere Flasche):

C8166-Zellen wachsen als Zellhaufen in Suspension. Um die einzelnen toten Zellen von den lebenden Zellhaufen zu trennen, wurde die Zellkulturflasche in einem Winkel von etwa 45° auf eine Kante gestellt. Die Zellhaufen der lebenden Zellen sedimentierten nun schneller als die einzelnen toten Zellen. Nach etwa 10 min wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Auch hier wurden 2 ml weiter kultiviert, die restlichen 8 ml zu Versuchen verwendet oder verworfen.

2.3.1.3 Kryokonservierung der Zellen

Um Zellen längere Zeit zu lagern, wurden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden etwa 1×10^7 Zellen pelletiert (1700 rpm, 7 min, Megafuge 1.0R, Haereus), das Medium entfernt und die Zellen in 1 ml FKS mit 10% DMSO aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in einem Kryoröhrchen bei -80°C über Nacht gelagert, bevor sie in den flüssigen Stickstoff überführt wurde.

Zum Auftauen der kryokonservierten Zellen wurde angewärmtes Medium in einer Zellkulturflasche vorgelegt. Die Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend zum Medium in die Zellkulturflasche gegeben. Nach spätestens 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, um das DMSO zu entfernen.

2.3.2 Durchflusscytometrie (FCM)

Um den Anteil GFP exprimierender Zellen in einer Population zu ermitteln, etwa um die Transfektionseffizienz oder den Titer der lentiviralen Partikel zu bestimmen, wurde die Durchflusscytometrie angewendet.

Dazu wurden die Zellen geerntet (1700 rpm, 7 min, Megafuge 1.0R, Eppendorf) und in PBS resuspendiert. Zum waschen wurden sie erneut zentrifugiert und gegebenenfalls in 3,7% Formaldehyd (Merck) in PBS fixiert. Um Zellhaufen abzutrennen und die Zellen zu vereinzeln wurden diese über einen MACS Pre-Separationfilter (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D) gefiltert und in FACS-Röhrchen gegeben. Die Zellsuspension wurden nun am im FACSCalibur™ (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) analysiert und die erhaltenen Daten mit dem Programm CellQuest™ (BD Biosciences) ausgewertet.

2.3.3 Transfektion eukaryotischer Zellen

Je nach Zelllinie und zu transfizierender DNA wurden verschiedene Methoden verwendet, um die Nucleinsäuren in die Zellen zu transferieren.

2.3.3.1 Transfektion mit Lipofectamine 2000 (PERV)

Aufgereinigte Plasmid DNA wurde mit Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) in Zellen transfiziert. Dabei wurde nach dem Protokoll von Invitrogen vorgegangen. Je nach Be-

darf wurde entweder in einer 6-Well Platte oder einer 10 cm Petrischale gearbeitet. Da die verschiedenen Zelllinien unterschiedlich schnell wachsen wurden die Zellen am Tag vor der Transfektion entsprechend ausgesät, damit die Kultur zur Transfektion 90-95% konfluent war (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Ausgesäte Anzahl an adärenten Zellen

<i>Zelllinie</i>	<i>6-Well-Platte</i>	<i>10 cm Petrischale</i>
293 (Mensch)	8×10^5	5×10^6
3T3 (Maus)	$2,5 \times 10^5$	1×10^6
RAT-2 (Ratte)	4×10^5	2×10^6
HeLa-P4	$2,5 \times 10^5$	1×10^6

Alle Zellen wurden in Opti-MEM[®] I Medium (Invitrogen) mit 10% Serum ohne Antibiotika ausgesät. Zur Transfektion wurden in der 6-Well Platte 4 µg Plasmid-DNA und 10 µl Lipofectamine[™] 2000 eingesetzt, in der Petrischale 24 µg DNA und 60 µl Transfektionsreagenz. Dies entspricht einem Verhältnis der DNA zu Transfektionsreagenz von 1:2,5. Die Bildung der DNA-Lipofectamine[™] 2000 Komplexe geschah in Opti-MEM I Medium ohne Serum und Antibiotikum.

Die Zellen wurden dann über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Transfektionsmedium abgenommen und durch vollständiges Kulturmedium ersetzt.

2.3.3.2 Transfektion mit Hilfe von Trans-Fast (PERV)

Beim Versuch, RAT-2 Zellen mit Lipofectamine[™] 2000 zu transfizieren, starben diese ab. Daher wurde diese Zelllinie mit Trans-Fast[™] (Promega) transfiziert. Auch hier wurde nach den Vorgaben des Herstellers gearbeitet.

2.3.3.3 Transfektion mit Hilfe des Nucleofector Kits (pNL4-3, pSUPER)

Bei den zur Untersuchung der RNA-Interferenz verwendeten C8166-Zellen handelt es sich um Suspensionszellen, welche sich nicht oder nur sehr schlecht mit den anderen hier beschriebenen Methoden transfizieren lassen. Diese Zellen wurden mit dem Nucleofector[™] Kit (Amaxxa) transfiziert. Da noch kein Protokoll zur Transfektion dieser Zelllinie zur Verfügung stand, musste die Prozedur mit dem Optimization-Kit des Her-

stellers eingestellt werden. Dabei wurden 2×10^6 C8166-Zellen mit dem mitgelieferten Plasmid transfiziert, welches GFP als Markergen enthielt. Nach dem Protokoll des Herstellers wurden die drei mitgelieferten Puffer (R,T und V) mit bestimmten Programmen im Nucleofector™ verwendet und die Transfektionseffizienz im FACS bestimmt. Mit dem optimierten Programm wurden anschließend die Versuche zur Hemmung von HIV-1 durchgeführt.

2.3.3.4 Produktion der lentiviralen Partikel in 293FT Zellen

Die Gene zur Expression der shRNAs wurden teilweise mittels lentiviraler Vektoren in die Zielzellen transferiert. Diese Vektoren wurden in 293FT Zellen (Invitrogen) hergestellt.

Zusammensetzung und Lagerung der Lösungen:

0,5 M CaCl₂

0,5 M CaCl₂ (Sigma-Aldrich) in doppelt destilliertem Wasser. Die Lösung wurde sterilfiltriert und in Aliquotes zu 50 ml bei -80°C gelagert. Einmal aufgetaut, konnte die Lösung bis zu einigen Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

HeBS 2x (Hepes buffered saline)

0,28 M	NaCl (Sigma-Aldrich)
0,05 M	0,05 M Hepes (Sigma-Aldrich)
0,5 mM	0,5 mM Na ₂ HPO ₄ (Sigma-Aldrich)

Der pH wurde mit NaOH sehr genau auf 7,0 eingestellt. Dies war von besonderer Bedeutung, da sich bereits bei einem pH-Wert unter 6,95 kein Präzipitat ausbildet, über 7,05 ist das Präzipitat zu grob und die Transfektionseffizienz schlecht. Die Lösung wurde wie die 0,5 M CaCl₂-Lösung sterilfiltriert, zu 50 ml Aliquotes bei -80°C aufbewahrt und, wenn einmal aufgetaut, über mehrere Wochen verwendet.

Wasser zum mischen mit den Plasmiden (Spezialwasser)

2.5 mM HEPES pH 7,3 (HEPES 1M pH 7,3; Gibco-BRL) in doppelt destilliertem Wasser. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

Transfektion der 293FT Zellen

Am Tag vor der Transfektion wurden etwa 2 Millionen Zellen in einer 10 cm Petri-schale ausgesät, so dass die Kultur am nächsten Tag etwa $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{3}$ konfluent war. Am

Am Ende dieses Tages wurde für jede Platte das Präzipitat nach folgendem Rezept hergestellt (Tabelle 2.2):

Tabelle 2.2: Eingesetzte Mengen der Verpackungsplasmide

<i>Plasmid</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Eingesetzte Menge</i>
Envelope Plasmid	pMD2G	5 µg
Verpackungsplasmid	psPAX2	15 µg
Transfervektor	pLVTHM	20 µg

Die Lösungen wurden auf 250 µl mit dem Spezialwasser aufgefüllt und dazu 250 µl 0,5 M CaCl₂-Lösung gegeben. Die Mischung wurde daraufhin langsam, tropfenweise auf 500 µl HeBS 2x gegeben, während diese mit Höchstgeschwindigkeit gevortext wurde. Anschließend wurde das Ganze 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich das Präzipitat bilden konnte. Diese Zeit war kritisch für die Bildung eines optimalen Niederschlags, da, wenn man zu lange wartet, das Präzipitat zu grob wird. Wenn die Zeit zu kurz gewählt wird hat man zu wenig Niederschlag. In beiden Fällen verschlechtert sich die Transfektionseffizienz. Schließlich wurde das gewonnene Präzipitat tropfenweise auf die Zellen verteilt und die Platte vorsichtig geschüttelt. Das Ganze wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am Morgen des darauf folgenden Tages wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet. An diesem Punkt konnte man einen feinen, sandigen Niederschlag auf der Platte erkennen außer auf den Zellen selbst und in ihrer direkten Umgebung, aus der sie das CaPO₄/DNA Präzipitat aufnehmen. Auch polynucleäre Syncycien, wie sie bei Virusinfektionen vor allem im Zusammenhang mit dem VSV-G-Protein sehr oft entstehen, konnten beobachtet werden (Abbildung 2.1, linkes Bild). Das Medium wurde nach vorsichtigem Rühren entfernt, die Zellen zweimal mit 10 ml warmer PBS gewaschen um den Großteil des Niederschlags zu entfernen. Schließlich 10-15 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben.

Am zweiten Tag wurde der Überstand abgenommen und wie Tags zuvor durch frisches Medium ersetzt. Dieser Überstand wurde bei 2500 rpm bei 4°C für 10 min zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Haereus), sterilfiltriert (0,45 µm Filter, Schleicher&Schuell) und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Am dritten Tag wurde erneut der Überstand abgenommen, ebenfalls zentrifugiert und sterilfiltriert und mit dem ersten Überstand vermischt. Zur Kontrolle wurden die transfizierten Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet um die Transfektionseffizienz zu überprüfen (Abbildung

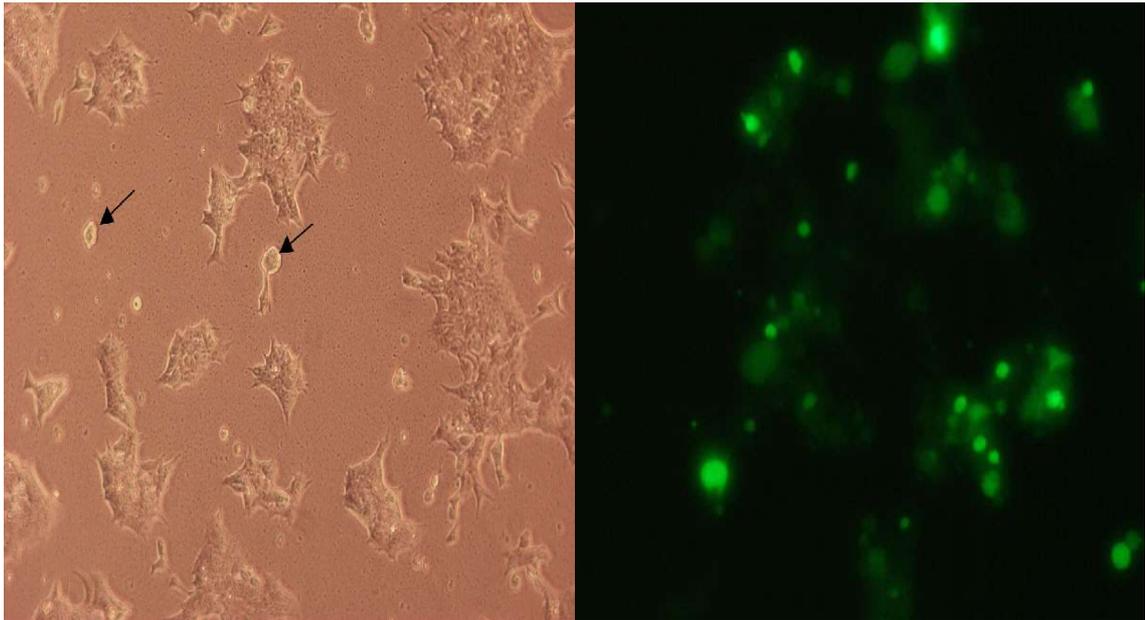


Abbildung 2.1: Transfizierte 293FT Zellen. Links: Lichtmikroskopische Aufnahme am Tag nach der Transfektion. Am Boden ist das feine, sandige Präzipitat zu erkennen. Die abgebildeten Syncycien sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Rechts: 293FT im Floureszenzmikroskop am dritten Tag nach der Transfektion. Die Transfektionsrate lag meist bei fast 100%.

2.1, rechtes Bild).

Der Virusüberstand wurde entweder direkt in 2 ml Aliquots bei -80°C eingefroren, oder die Viruspartikel aufkonzentriert.

Aufkonzentrierung der Lentivektoren

Falls eine hohe Konzentration an Lentivektoren in einem kleinem Volumen benötigt wurde, mussten die Partikel mittels Ultrazentrifugation aufkonzentriert werden.

Dazu wurden zunächst 4 ml 20% Saccharose-Lösung auf den Boden eines Zentrifugenröhrchens gegeben und mit dem gefilterten Überstand aufgefüllt. Anschließend wurde für 90 min mit 26000 rpm bei 4°C in einem SW-28 Rotor zentrifugiert (Zentrifuge: LB-70 Ultracentrifuge, Beckman Coulter Inc, Fullerton, USA). Nach der Zentrifugation wurde das Medium vorsichtig abdekantiert und das Röhrchen etwa 10 min über Kopf auf einem Wischpapier stehen gelassen, damit das Medium vollständig abtropfen konnte. Nun wurden 100 μl kaltes PBS zugegeben und das Röhrchen über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde zum resuspendieren die Flüssigkeit mit einer Pipette vorsichtig über das Pellet laufen gelassen, ohne das Pellet dabei mit der Pipettenspitze zu berühren. Schließlich wurde das Viruskonzentrat zu 10 μl Aliquots bei -80°C eingefroren.

2.3.4 Infektion eukaryotischer Zellen und Virustiterbestimmung

Virustiterbestimmung

Um die Konzentration der viralen Vektoren zu bestimmen, wurden Tags zuvor 4×10^5 293FT-Zellen pro Well in einer 6-Well-Platte ausgesät. Je nach dem, ob es sich um Zellkulturüberstand oder um aufkonzentrierte Lentivektoren handelte, wurden entweder 2 ml Überstand oder 4 μ l Konzentrat im ersten Well verwendet. Davon ausgehend, wurde eine 10fach Verdünnungsreihe bis zum fünften Well angelegt. Das sechste Well diente als Negativkontrolle. Zur Unterstützung der Infektion wurde noch Polybrene (Sigma) in einer Konzentration vom 8 μ g/ml zugegeben und das ganze über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Nach mindestens 48 h wurden die Zellen geerntet und im FACS die GFP Expression analysiert.

In einem Well, in dem zwischen 0,1 bis 10% der Zellen GFP exprimierten, wurde der Virustiter nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Anteil positiver Zellen} \times 4 \times 10^5 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Virale Partikel}/\mu\text{l}$$

Infektion eukaryotischer Zellen

Bei Versuchen, eukaryotische Zellen mit PERV zu infizieren, wurden 2×10^5 293-Zellen pro Well in einer 6-Well-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden 2 ml sterilfiltrierter Überstand infizierter Zellen in jedes Well gegeben. Zur Unterstützung der Infektion wurden 6 μ g/ml Polybrene zugegeben. Nach maximal 24 h wurde das Medium gewechselt.

3 Ergebnisse

3.1 Erstellung und Charakterisierung eines rekombinanten PERV-A/C-Molekularklons

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte ein Molekularklon eines A/C-rekombinanten Subtyps von PERV erstellt werden, um diesen anschließend genauer zu charakterisieren.

3.1.1 Erstellung des Molekularklons aus 293-Zellen

Der Molekularklon wurde aus 293-Zellen amplifiziert, welche mit einem an humane Zellen adaptierten PERV-A/C infiziert waren. Dieser Virustyp entstand durch mehrfaches Passagieren von Überständen mit PERV-NIH/3⁰ infizierten 293-Zellen [Wilson et al., 1998; Wilson et al., 2000]. In den einzelnen Passagen entstanden PERV/4⁰, PERV/5⁰ und PERV/6⁰, wobei die Adaption von PERV an humane Zellen durch eine Verlängerung der LTR mit der dadurch verbundenen Erhöhung des Virustiter beschrieben wurde [Denner et al., 2003]. Die LTR verlängerte sich dabei durch Multimerisierung einer 37 bp Nucleotidsequenz. In der dritten Passage in humanen 293-Zellen (3⁰) ist sie ein mal vorhanden, in der vierten (4⁰) zwei mal, in der fünften (5⁰) insgesamt fünf mal. In dieser Passage konnte die höchste Anzahl an Repeats festgestellt werden. Ein weiterer stabiler Einbau fand offensichtlich nicht mehr statt, da es möglicherweise zu Problemen beim Verpacken der Partikel kommt oder das gesamte Genom an Stabilität verliert.

Ziel war es, aus den mit PERV/5⁰ infizierten Zellen einen Molekularklon des rekombinanten PERV-A/C-Subtyps, welcher auf humane Zellen adaptiert ist, mittels PCR-Amplifikation zu erstellen. Dieser sollte hinsichtlich seiner Sequenz und LTR charakterisiert und mit bereits publizierten PERV-Sequenzen verglichen werden. Des Weiteren sollte ein Klon mit einem chimären Promotor bestehend aus einem CMV-Promotor und der viralen 5'-LTR hergestellt werden. Dabei wurde das PERV-Genom ab der R-Region der viralen 5'-LTR hinter einen CMV-Promotor kloniert. Der CMV-Promotor ist um ein Vielfaches stärker in der Expression als die bekannten PERV-LTRs. Somit sollte eine höhere Transkriptionsrate der viralen Proteine nach der Transfektion erzielt werden. Im Infektionszyklus der Retroviren wird beim Umschreiben des viralen RNA-Genoms in DNA die 3'-LTR über die homologen Sequenzen der R-Regionen an das 5'-Ende trans-

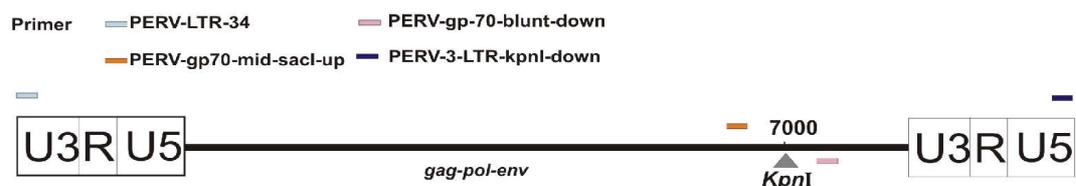
feriert. Dadurch entstehen auch bei der Verwendung des Klonen mit CMV-Promotor bei einer Infektion natürliche Viren.

PCR-Amplifizierung des PERV-Genoms

Das PERV-Genom wurde mittels High-Fidelity-PCR aus 293-Zellen amplifiziert, die frisch mit PERV/5⁰-Überstand infiziert wurden. Somit sollte erreicht werden, dass ein möglichst hoher Anteil der integrierten proviralen Sequenzen ein infektiöses Virus codieren. Eine direkte Amplifizierung des gesamten Genoms ist auf Grund der beidseitigen LTRs nicht möglich, da diese in den Sequenzen identisch sind. Daher wurde das Genom in zwei Teilen amplifiziert (Abbildung 3.1). Die beiden Fragmente wurden im Plasmid über die Schnittstelle des Restriktionsenzym *KpnI*, welches nur einmal im PERV-Genom bei etwa 7000 bp schneidet, zusammenligiert. Im ersten PCR-Schritt wurde der Bereich ausgehend von der 5'-LTR bis hinter das *pol*-Gen amplifiziert, wobei beim Klon mit der natürlichen LTR (genannt PERV-XL2) die gesamte 5'-LTR amplifiziert wurde (Abbildung 3.1A). Beim Klon mit der chimären LTR (genannt PERV-CMV) wurde, ohne die U3-Region, erst ab der R-Region amplifiziert (Abbildung 3.1B).

Die Fragmente wurden nacheinander in die jeweiligen Vektoren kloniert. Bei PERV-XL2 wurde das erste Fragment über TA-Klonierung in den pCR[®]-XL-TOPO-Vektor (Invitrogen, Vektorkarte im Anhang, S: VII) kloniert. Das zweite Fragment wurde nach der PCR mit *KpnI* verdaut, der Vektor wurde ebenfalls mit *KpnI* linearisiert und das

A



B

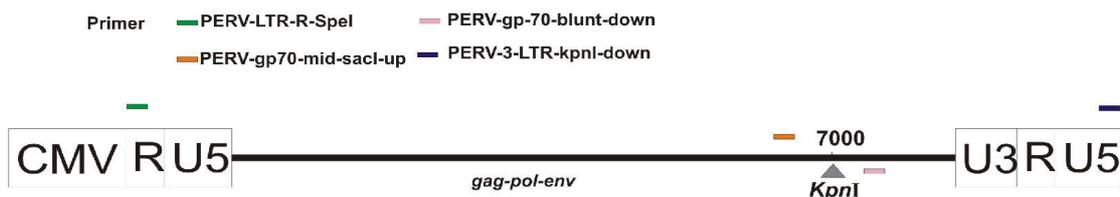


Abbildung 3.1: Schema der Primerbindungsstellen zu Amplifizierung des PERV-Genoms. A: Bei PERV-XL2 wurden beide LTRs amplifiziert. B: Bei PERV-CMV wurde die 3'-LTR im Ganzen amplifiziert, die 5'-LTR ohne die U3-Region.

Fragment hinein ligiert. Problematisch war dabei, dass die Orientierung des Fragments nicht vorgegeben war. So musste im Anschluss noch mittels Restriktionsanalyse die Orientierung bestimmt werden. Für den Klon PERV-CMV wurde das PERV-Genom hinter den CMV-Promotor im pcDNA3.1(+)-Vektor (Invitrogen, Vektorkarte Anhang S: VII) ligiert. Damit das gesamte Plasmid mit Insert nicht zu groß wird, wurde vorher aus dem Vektor die nicht benötigte Neomycin-Resistenz ausgeschnitten (Abschnitt 2.1.7).

Der Vektor wurde an der *Multiple cloning site* (MCS) mit *NheI* und *KpnI* geschnitten und das erste Fragment über die Schnittstellen von *KpnI* und *SpeI*, welches komplementäre Enden zu *NheI* produziert, hinein ligiert. Das zweite Fragment wurde wie bei PERV-XL2 eingefügt, wobei auch hier die Orientierung hinterher bestimmt werden musste.

3.1.2 Charakterisierung der LTR

Die provirale 5'-LTR funktioniert als Enhancer und Promotor zur Expression der viralen Proteine. Ein Ziel bei der Erstellung des Moleklarklons war, die LTR von PERV/5⁰ mit ihren zusätzlichen Repeats als Klon zu erstellen. Nach der Fertigstellung des Klons wurde die Länge der Repeat-Strukturen mittels PCR untersucht.

Dazu wurden Primer verwendet, die vor und nach den repetitiven Sequenzen binden, wodurch anhand der Länge des Fragments die Anzahl der Repeats erkennbar ist. Zum Vergleich wurden Plasmide verwendet, in denen die LTR-Sequenz von PERV/3⁰ und PERV/5⁰ eingebaut war (Abbildung 3.2). Die entstandenen Banden in den

Spuren der beiden Klone liegen in ihrer

Größe zwischen 3⁰ (194 bp) und 5⁰ (317 bp), bei 242 bp. Dies legte die Vermutung nahe, dass es sich dabei um eine 4⁰-LTR handelt, was nachfolgend in der Sequenzierung auch bestätigt wurde.

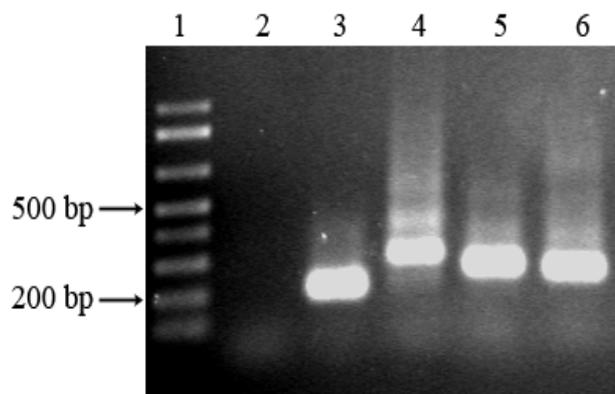


Abbildung 3.2: Bestimmung der Länge des LTR. Spur 1, Marker; Spur 2, neg. Kontr.; Spur 3, PERV-NIH/3⁰; Spur 4, PERV/5⁰; Spur 5 PERV-XL2; Spur 6, PERV-CMV. Die Amplifikate der beiden Moleklarklone liegen zwischen denen von PERV-NIH/3⁰ und PERV/5⁰, auf der erwarteten Höhe von 4⁰.

3.1.3 Analyse der Vollängen-PERV-Sequenzen und ORFs

Die Genome der beiden Moleklarklone wurde sequenziert und analysiert. Als Vergleich dienten die publizierten Sequenzen von PERV-MSL (PERV-C) für den *gag/pol*-Bereich, sowie das sequenzierte *env*-Gen des PERV-A/C Subtyps [Akiyoshi et al., 1998; Wilson et al., 2000]. Bei PERV-CMV fiel an Position 3225 im Genom ein G→T-Austausch gegenüber der PERV-MSL Sequenz auf, welcher direkt zu einem Stop-Codon (TAA) im Leseraster führte. Das Thymidin wurde mit einer Mutagenese-PCR durch ein Guanosin ersetzt. Ansonsten wurden verschiedene Nucleotidmutationen im Vergleich mit Sequenzen von PERV-MSL und PERV-A/C-*env* gefunden. Bei PERV-XL2 war eine CC-Insertion am Ende des *pol*-Gens zu sehen (Pos. 5565), wodurch es zum Kettenabbruch vor den letzten 100 Aminosäuren des *pol*-Proteins kommt.

Zusammenfassend zeigten sich ausgeprägte Homologien in den jeweiligen Bereichen sowohl auf der Nucleotid-Ebene als auch bei den Aminosäuren zwischen den beiden Klonen und den publizierten Sequenzen (Tabelle 3.1 und 3.2). Es ist auch zu sehen, dass die *env*-Gene der beiden Klone nicht identisch sind, obwohl sie aus dem selben PCR-Produkt stammen. Ein komplettes Alignment ist im Anhang, S: X-XXXVII dargestellt.

Tabelle 3.1: Vergleich der Nucleotid- und Aminosäuresequenzen von PERV-CMV mit publizierten Sequenzen. PERV-MSL ist eine Sequenz vom PERV-C Subtyp [Akiyoshi et al., 1998], das *env*-Gen wurde in PERV-NIH/3⁰ sequenziert [Wilson et al., 2000].

<i>Virus</i>	% identische Nucleotide (identische Aminosäuren) zu PERV-CMV		
	<i>gag</i>	<i>pol</i>	<i>env</i>
PERV-XL2	99,4 (99,4)	99,4 (98,4)	99,6 (99,1)
PERV-NIH/3 ⁰ <i>env</i>	-	-	99,6 (99,2)
PERV-C (MSL)	99,0 (98,1)	98,8 (98,8)	86,6 (84,5)

Tabelle 3.2: Vergleich der Nucleotid- und Aminosäuresequenzen von PERV-XL2 mit publizierten Sequenzen von PERV-MSL und dem *env*-Gen von PERV-NIH/3⁰

<i>Virus</i>	% identische Nucleotide (identische Aminosäuren) zu PERV-XL2		
	<i>gag</i>	<i>pol</i>	<i>env</i>
PERV-CMV	99,4 (99,4)	99,4 (98,4)	99,6 (99,1)
PERV-NIH/3 ⁰ <i>env</i>	-	-	99,6 (99,2)
PERV-C (MSL)	98,5 (98,1)	98,5 (97,6)	89,7 (84,4)

Auch die LTR wurde sequenziert und mit bestehenden Sequenzen verglichen. Als Vergleich dienten die bekannten LTR-Sequenzen von PERV/3⁰ und PERV/5⁰ [Denner et al., 2001a]. Das Ergebnis der PCR (Abbildung 3.2) und die Sequenzierung zeigten, dass es sich bei dabei um die LTR von PERV/4⁰ handelt, in der ein 37 bp Abschnitt dupliziert wurde im Vergleich zur LTR von PERV/3⁰.

Um die genetische Verwandtschaft des erstellten PERV-CMV-Molekularklons darzustellen, wurden, basierend auf der Aminosäuresequenz, phylogenetische Stammbäume erstellt, einmal für den *gag/pol* Bereich, zum anderen für das *env*-Gen (Abbildung 3.3).

Erwartungsgemäß war der Molekularklon im *gag-pol*-Bereich dem PERV-C Subtyp am nächsten, im *env*-Bereich dem PERV-A Subtyp.

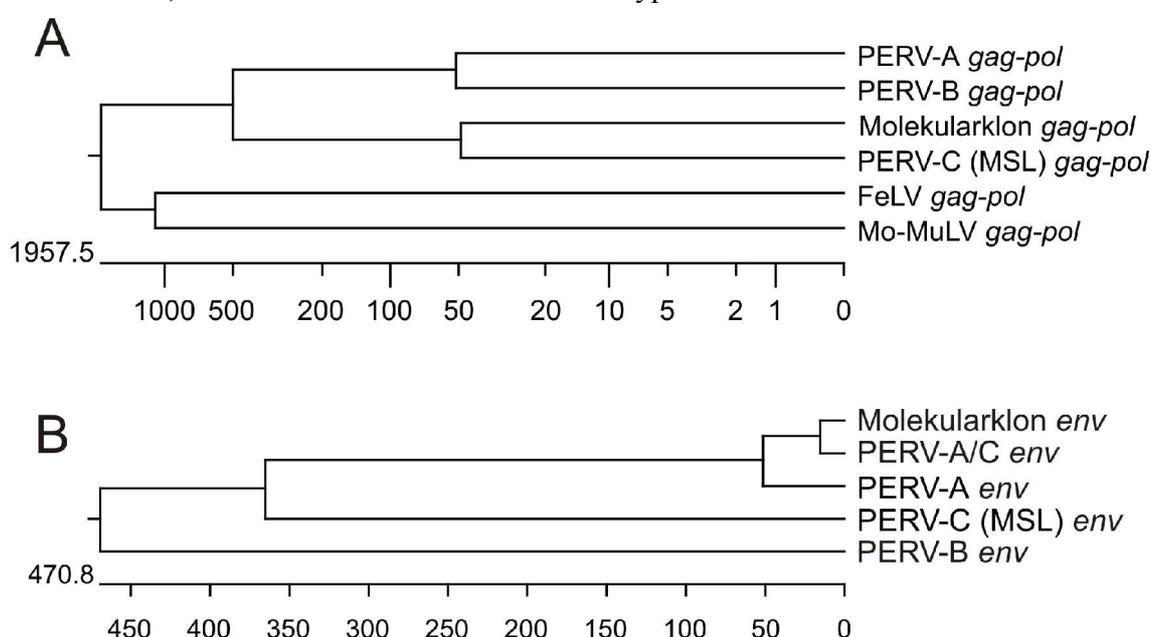


Abbildung 3.3: Phylogenetischer Stammbaum der PERVs. Für den *gag-pol*-Bereich (A) wurden noch zwei andere γ -Retroviren (FeLV und Mo-MuLV) miteinbezogen. Die Analyse wurde nur für den PERV-CMV-Klon gemacht (Molekularklon). Accession-Nummern der Sequenzen: PERV-A: AY288779, PERV B: AJ133818, PERV-C (MSL): AF038600, FeLV: NC_001940, MoMuLV: J02255

3.1.4 Transfektion eukaryotischer Zellen mit dem PERV-Klon

Zellen verschiedener Spezies, darunter humane 293-Zellen sowie Zellen von Maus und Ratte, wurden mit dem Molekularklon mit Hilfe der in Abschnitt 2.3.3 beschriebenen Methoden transfiziert. Ziel der Versuche war es, zu überprüfen, ob die jeweiligen Zelllinien in der Lage sind, virale Partikel zu bilden. Für die humanen 293-Zellen ist bekannt, dass sie PERV replizieren können. Deshalb sollte die Funktionalität des Molekularklons mit diesen Zellen nachgewiesen werden. In den Zellen von Mäusen und Ratten konnte bislang keine Virusproduktion nachgewiesen werden, da diese nicht

mit PERV infizierbar sind [Irgang et al., 2004].

Nachweis der reversen Transkriptase

Etwa 48 h nach der Transfektion der 293 Zellen wurde deren zellfreier, sterilfiltrierter Überstand auf Aktivität der reversen Transkriptase (RT) getestet. Die RT wird beim Budding in die Parikel verpackt und sollte somit im Überstand zu finden sein.

In beiden transfizierten Kulturen konnte RT-Aktivität nachgewiesen werden, bei PERV-CMV erwartungsgemäß wesentlich mehr (Abbildung 3.4). Die Werte noch deutlich unter den Werten der als Positiv-Kontrolle mitgemessenen, mit PERV-B durchinfizierten 293 Zellen (13000 U/ml).

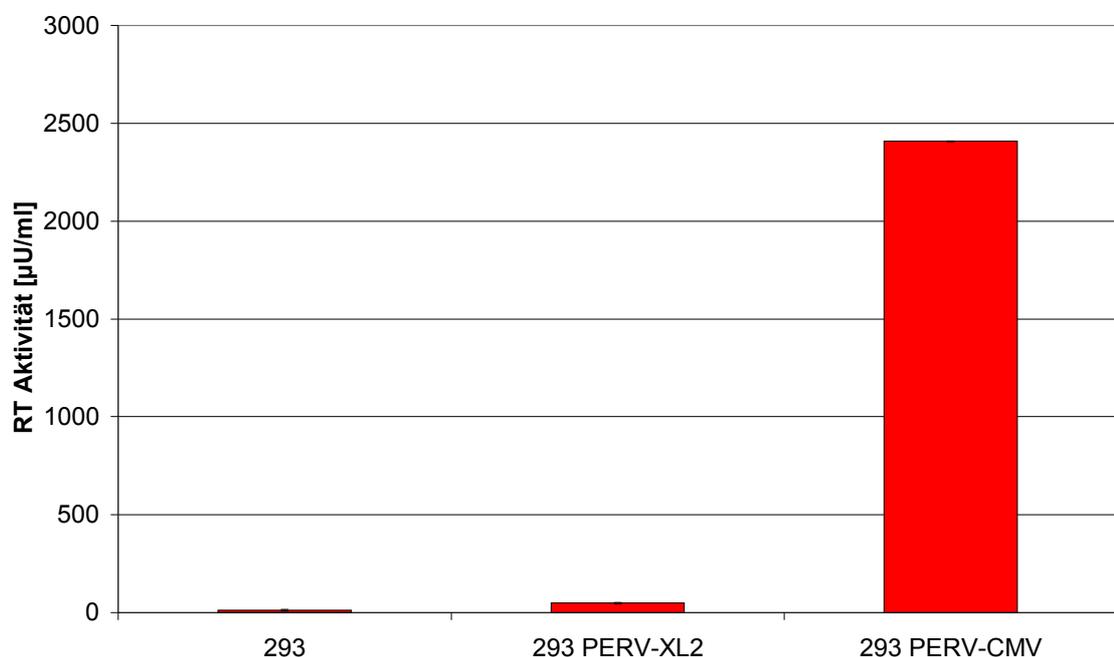


Abbildung 3.4: Ergebnis des RT-Nachweises im Überstand der transfizierten 293-Zellen. Die Aktivität der RT ist bei PERV-CMV auf Grund der stärkeren Expression mit dem CMV-Promotor deutlich höher. Die Werte liegen noch deutlich unter den Werten der durchinfizierten 293/PERV-B-Zellen (etwa 13000 $\mu\text{U/ml}$, Daten nicht dargestellt).

Nachweis von PERV-Gag im Western-Blot

Um die Funktionalität des PERV-Moleklarklons in einem weiteren Test zu überprüfen, wurde ein Western-Blot zum Nachweis des PERV-Gag-Proteins in RIPA-Zelllysate aus transfizierten 293-Zellen durchgeführt (Abbildung 3.5).

Als Kontrollen dienten Zelllysate aus 293- und 293/PERV-B-Zellen. Sowohl mit dem Serum aus Ziege14, als auch mit dem Serum aus Ratte3 ist das Gag-Protein bei der erwarteten Größe von 27 kD zu erkennen. Des Weiteren sind noch Banden bei 37 kD,

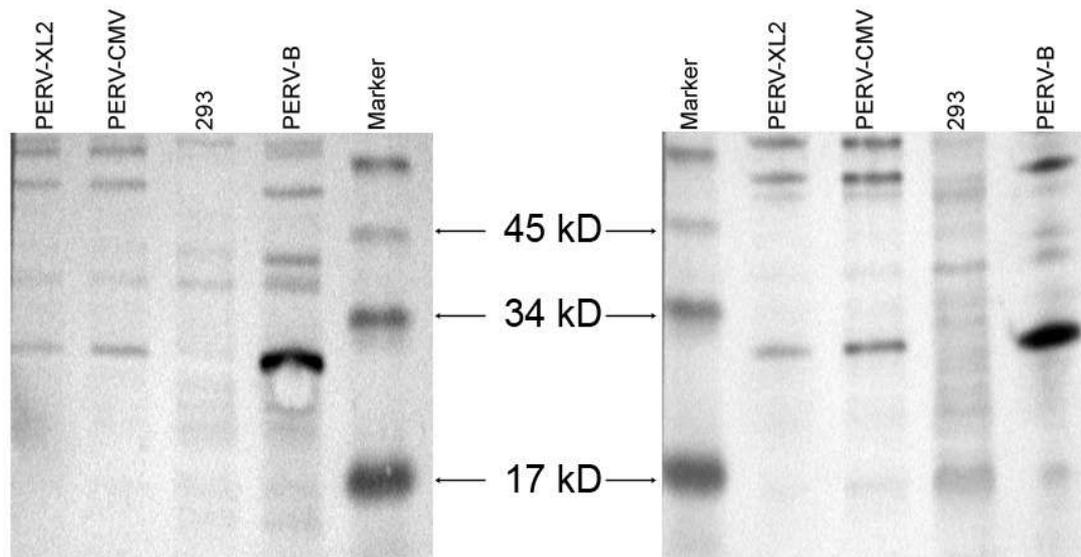


Abbildung 3.5: Western-Blot zum Nachweis des PERV-Gag Proteins mit Serum aus Ratte3 (links) und Serum aus Ziege14 (rechts) in transfizierten 293-Zellen. Die Bande des Gag-Proteins bei 27 kD ist in beiden Proben mit dem Molekularklonen zu sehen.

49 kD und 60 kD zu sehen, bei denen es sich um Precursor-Proteine von Gag handelt. Die Bande bei 37 kD ist in den transfizierten Zellen nur äußerst schwach zu sehen.

Untersuchung des mRNA Expressionsmusters

Die virale mRNA der γ -Retroviren liegt in der Zelle als Vollängen-mRNA zur Expression der Gag- und Gag/Pol-Proteine vor, sowie als gespleißte-mRNA zur Expression der Env-Proteine. Da am Spleißprozess neben der viralen mRNA auch verschiedene zelluläre Faktoren beteiligt sind, kann der Prozess nicht automatisch in allen Zellen ablaufen. Vor allem in den erwähnten Nagetier-Zellen von Maus und Ratte konnte bislang nicht gezeigt werden, ob der Spleißvorgang stattfindet oder nicht. Für diesen Versuch wurden neben humanen Zellen auch Zellen der Maus und der Ratte mit dem Molekularklon transfiziert und die Bildung des Spleißproduktes untersucht.

Zur Analyse des mRNA-Expressionsmusters wurde zunächst die mRNA aus den Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Zum Nachweis wurde ein PCR-System verwendet, mit dem zwischen den beiden mRNAs unterschieden werden kann (Abbildung 3.6).

Die Vollängen-mRNA wird dabei mit den beiden Primern PERV-vor-SD-up und PERV-hinter-SD-down, welche genau vor und nach dem Spleiß-Donor binden, nachgewiesen. Dabei entsteht ein Produkt von 212 bp, wenn die mRNA nicht gepleißt als Volllänge vorliegt. Die gespleißte *env*-mRNA wird über das Primerpaar PERV-vor-SD-up und PERV-hinter-SA-down nachgewiesen. Der Primer PERV-hinter-SA-down bindet

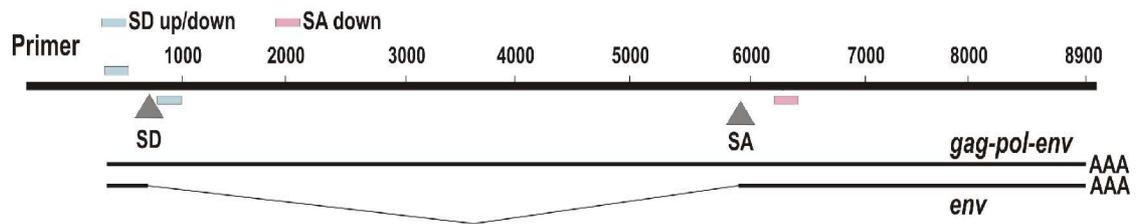


Abbildung 3.6: Bindungsstellen der Primer zum Nachweis der Volllängen- und env-mRNA. Mit dem Primerpaar PERV-SD-up und PERV-SA-down entsteht nur ein Produkt, wenn der *gag/pol* Bereich aus der mRNA gespleißt wurde.

hinter dem Spleißakzeptor, wodurch bei einer PCR nur ein Produkt von 500 bp entstehen kann, wenn der *gag/pol*-Bereich aus der mRNA ausgeschnitten wurde (Abbildung 3.6).

Das Ergebnis des Versuchs mit den verwendeten 293-, 3T3- und RAT-2-Zellen ist in Abbildung 3.7 dargestellt. In den humanen 293 Zellen, wie auch in den 3T3-Zellen der Maus, ist sowohl bei PERV-CMV als auch bei PERV-XL2 die Volllängen-mRNA und die gespleißte *env*-mRNA nachweisbar. Bei PERV-XL2 sind die Banden für die gespleißte *env*-mRNA deutlich schwächer als bei PERV-CMV. In den Ratten-Zellen konnte zwar die Volllängen mRNA nachgewiesen werden, jedoch kein Spleißprodukt.

Nachweis auf Infektiösität

Um nachzuweisen, ob die transfizierten Zellen Partikel bilden, die wiederum andere Zellen infizieren und sich in deren Genom integrieren können, wurde der sterilfiltrierte Überstand transfizierter Zellen auf uninfizierte 293 Zellen gegeben. Zum Nachweis

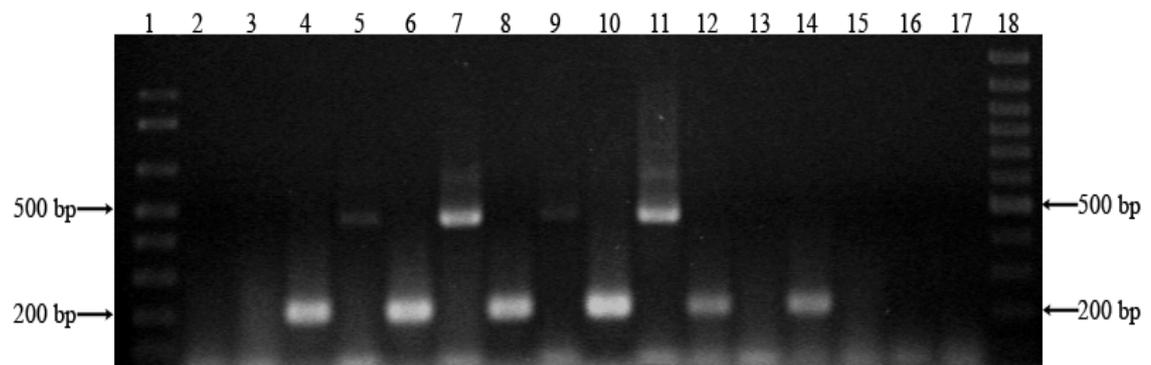


Abbildung 3.7: Nachweis der Volllängen mRNA und der gespleißten *env*-mRNA. Spur 1, Marker; 2, 293 Volllänge; 3, 293 gespleißt; 4, 293 PERV-XL2 Volllänge, 5 293 PERV-XL2 gespleißt; 6, 293 PERV-CMV Volllänge; 7, 293 PERV-CMV gespleißt; 8 3T3 PERV-XL2 Volllänge; 9, 3T3 PERV-XL2 gespleißt; 10, 3T3 PERV-CMV Volllänge; 11, 3T3 PERV-CMV gespleißt; 12 RAT-2 PERV-XL2 Volllänge; 13, RAT-2 PERV-XL2 gespleißt; 14, RAT-2 PERV-CMV Volllänge; 15 RAT-2 PERV-CMV gespleißt; 16/17 negativ Kontrolle für Volllänge und gespleißt, 18 Marker.

einer Infektion und Integration wurde die genomische DNA aus den Zellen isoliert und mittels PCR auf PERV-Sequenzen untersucht. Zusätzlich wurde eine PCR zum Nachweis des Plasmids mit den Primern LTR26 oder LTR-repeat-down (binden in PERV-Genom) und T7-forward (bindet in den Plasmiden pcDNA3.1(+) und pCR®-XL-TOPO®) durchgeführt, um falsch-positive Ergebnisse bedingt durch Plasmid-Kontaminationen zu vermeiden (vgl. Anhang, S: I)

In allen Versuchen konnte keine produktive Infektion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auch der PERV-CMV-Klon mit der spezifischen Korrektur des Stop-Codons führte nicht zu Provirusintegration und Partikelbildung.

3.2 Hemmung von PERV mittels RNA-Interferenz (RNAi)

Die Hemmung von PERV mittels RNAi wurde nicht, wie ursprünglich geplant, anhand des Moleklarklons analysiert, da dieser nicht infektiös war. Es wurden Versuche unternommen, die PERV-Expression zu ersten Mal in primären Schweinezellen zu hemmen. Dafür wurden shRNA-Expressionskassetten in lentivirale Vektoren kloniert, die eine shRNA gegen eine im *pol*-Gen von PERV befindliche Sequenz exprimieren. Diese Target Sequenz wurde bereits vorher als synthetische siRNA getestet [Karlas et al., 2004].

Porcine Fibroblasten (SE-105), wurden dabei mit aufkonzentrierten lentiviralen Partikeln behandelt. Zur Analyse wurde aus den Zellen nach zwei Tagen die mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die PERV-Expression wurde mittels Real-time-PCR quantifiziert. Die Degradation der mRNA beginnt an der Stelle, an der die siRNA bindet. Daher wurden Primer verwendet, welche die Bindungsstelle der siRNA flankierten, um die stärkste mögliche Hemmung nachzuweisen. Die PERV-Expression konnte dabei um etwa 60% reduziert werden (Abbildung 3.8). Der Leervektor ohne shRNA-Expressionskassette zeigte keine nachweisbare Wirkung.

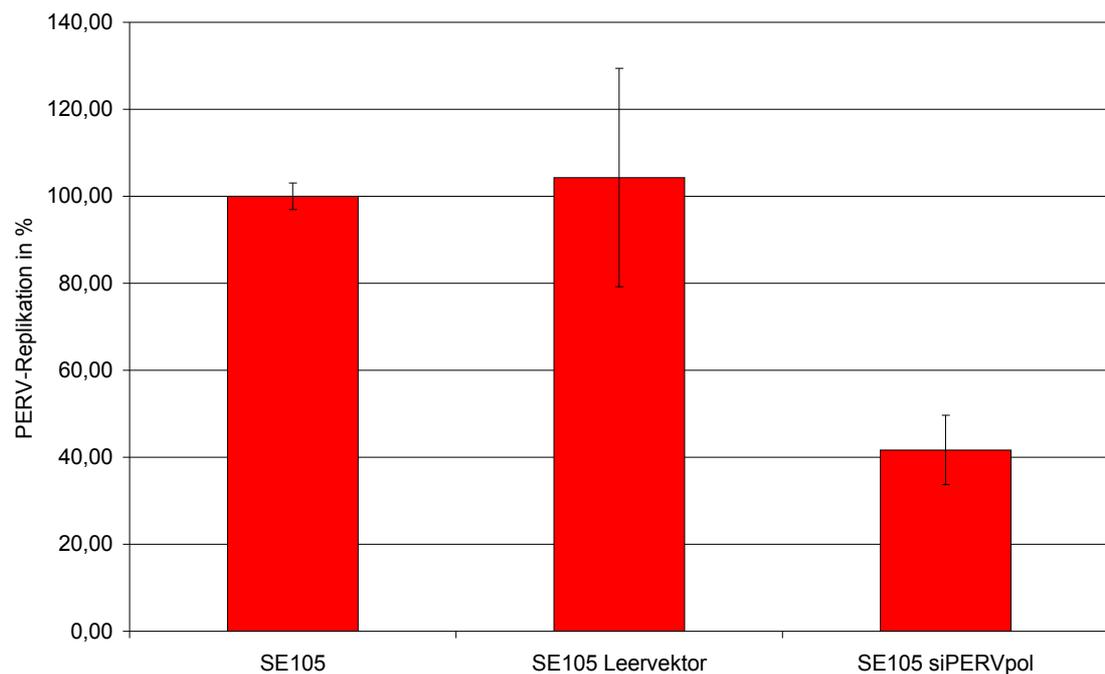


Abbildung 3.8: Hemmung der PERV-Expression in porcinen Fibroblasten mittels Anti-*pol*-shRNA. Die Expression von PERV wurde durch die shRNA um 60% im Vergleich zu unbehandelten Zellen reduziert. Die Real-time-PCR wurde in einer sechsfach-Bestimmung durchgeführt.

3.3 Hemmung von HIV-1 mittels RNA-Interferenz

Es wurden Versuche unternommen, die Expression von HIV-1 mittels RNA-Interferenz zu hemmen. Dabei wurden HeLa-P4- und C8166-Zellen mit pSUPER.gfp/neo-Vektoren transfiziert, welche shRNA-Expressionskassetten gegen die HIV-1-Gene *gag* und *rev* trugen. Für jedes der beiden Targets wurden je zwei shRNAs konstruiert, eine mit der Originalsequenz (*gag-o*, *rev-o*) und eine, in die eine Fehlpaarung am 3'-Ende des Sense-Stranges eingebaut wurde (*gag-m*, *rev-m*), mit dem Ziel, den Einbau des Antisense-Stranges in den RISC zu erhöhen und so die Wirkung der RNAi zu verstärken (vgl. Abschnitt 1.2.3).

Des Weiteren wurden lentivirale Vektoren mit shRNAs gegen HIV-1-*rev* und *-tat* hergestellt, welche in C8166-Zellen auf ihre hemmende Wirkung getestet wurden. Auch in diesem Fall wurden shRNAs mit spezifischen Fehlpaarungen generiert.

3.3.1 Hemmung der HIV-1-Expression in HeLa-P4-Zellen

In diesen Versuchen wurden HeLa-P4-Zellen zunächst mit dem HIV-1-Molekularklon pNL4-3 transfiziert. Nach einer Woche waren die Zellen vollständig infiziert.

Daraufhin wurden diese mit den pSUPER-Konstrukten transfiziert. Die Expression der HIV-1-mRNA wurde zwei und zehn Tage nach der Transfektion mittels Real-time-PCR quantifiziert. Auch hier wurden Primer verwendet, welche die Bindungsstelle der jeweiligen siRNA beidseitig flankierten.

Zusätzlich wurde die Konzentration des HIV-1-Gag-Proteins p24 im sterilfiltrierten Überstand der Zellen im ELISA bestimmt.

Die Anti-*gag*-siRNA bewirkte in den Versuchen nach den Real-time-PCR-Daten eine Suppression der HIV-1-Replikation von etwa 50%, wobei keine Verstärkung der hemmenden Wirkung durch den Einbau der Fehlpaarung (*gag-m*) am 3'-Ende des Sense-Stranges erkennbar war (Abbildung 3.9). Die Hemmung war über den gemessenen Zeitraum von zehn Tagen weitgehend konstant.

Ein ähnliches Bild zeichnete sich bei der Anti-*rev*-siRNA ab (Abbildung 3.10). In diesem Fall war die hemmende Wirkung nach zwei Tagen noch etwas stärker als bei den Anti-*gag*-Konstrukten jedoch war nach zehn Tagen schon ein Rückgang der Hemmung zu erkennen. Besonders bei der nicht modifizierten siRNA (*rev-o*) war nach zehn Tagen die HIV-1-Expression wieder auf den Ausgangswert angestiegen.

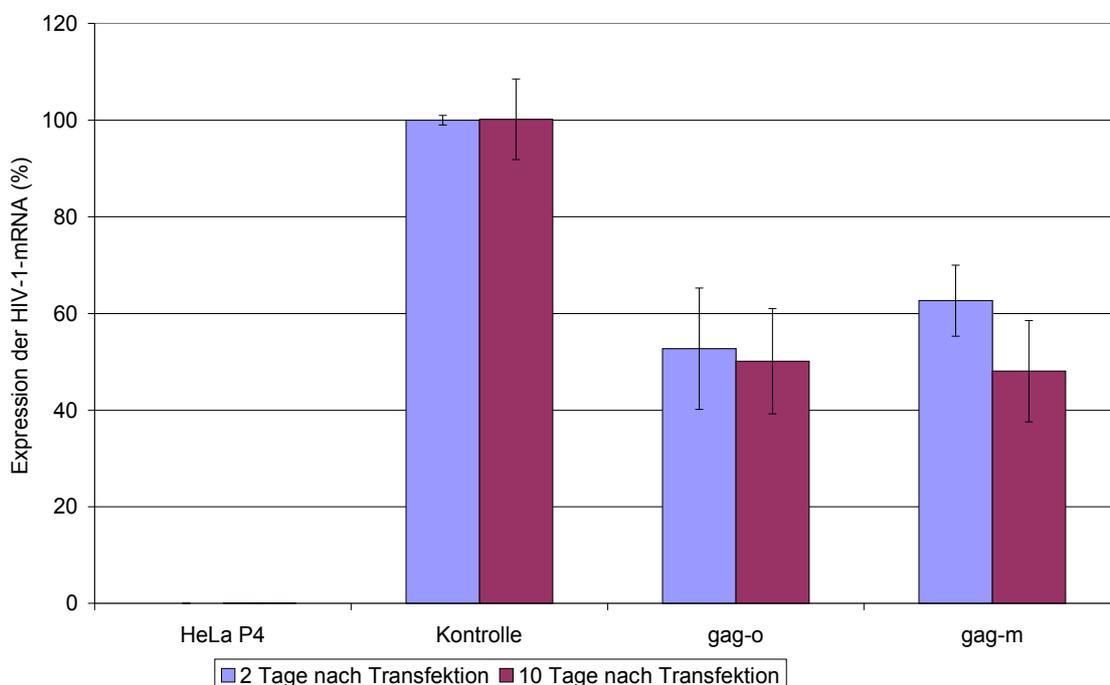


Abbildung 3.9: Hemmung der HIV-1-Replikation durch Anti-*gag*-shRNA in pSUPER.gfp/neo, Ergebnis der Real-time-PCR mit den HIV-*gag*-Primern. Die HIV-1-Expression ging in den mit dem shRNA-Expressionsvektor transfizierten Zellen um etwa 50% zurück im Vergleich zur Kontrolle, die mit dem leeren Vektor transfiziert wurden. Die Real-time-PCR wurde in einer sechsfach-Bestimmung durchgeführt.

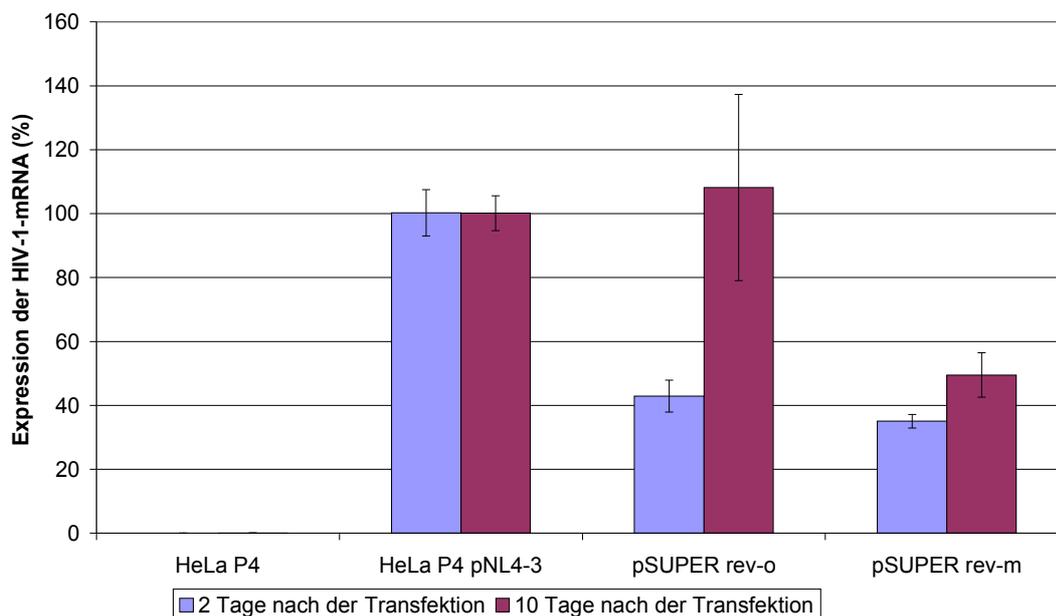


Abbildung 3.10: Hemmung der HIV-1-Replikation mit Anti-*rev*-shRNA, Ergebnis der Real-time-PCR. Nach zwei Tagen ist ein Rückgang der HIV-1-Expression auf 35-40% zu erkennen, jedoch nimmt sie nach zehn Tagen wieder deutlich zu. Die Real-time-PCR wurde in einer sechsfach-Bestimmung durchgeführt.

Zeitgleich zu den Punkten, an denen die mRNA aus den Zellen isoliert wurde, wurden Proben aus dem Überstand der Zellen genommen. Diese wurden im p24-Capture-ELISA quantitativ auf p24-Antigen analysiert. Bei dieser Messmethode macht sich die Hemmung nach zwei Tagen nicht so stark bemerkbar, nach zehn Tagen ist sie jedoch sehr deutlich in allen Proben zu erkennen (Abbildung 3.11). Die Hemmung der viralen Replikation ist, bedingt durch die längere Haltbarkeit der Proteine im Vergleich zur mRNA im ELISA nicht sofort messbar.

3.3.2 Hemmung der HIV-1-Replikation in C8166-Zellen

Es wurde im Weiteren versucht, die Expression von HIV-1 in der humanen lymphoiden T-Zelllinie C8166 zu hemmen. Diese Zellen sind, im Gegensatz zu den vorher verwendeten HeLa-P4-Zellen, natürliche Wirtszellen des HI-Virus bei einer Infektion im Menschen.

C8166-Zellen lassen sich mit gängigen Transfektionsreagenzien nicht transfizieren. Mit dem Nucleofector™ (Amaxxa) konnten schließlich Transfektionsversuche mit diesen Zellen unternommen werden. Da jedoch kein Protokoll zu Transfektion von C8166-Zellen bestand, musste zunächst eine Testreihe durchgeführt werden, um ge-

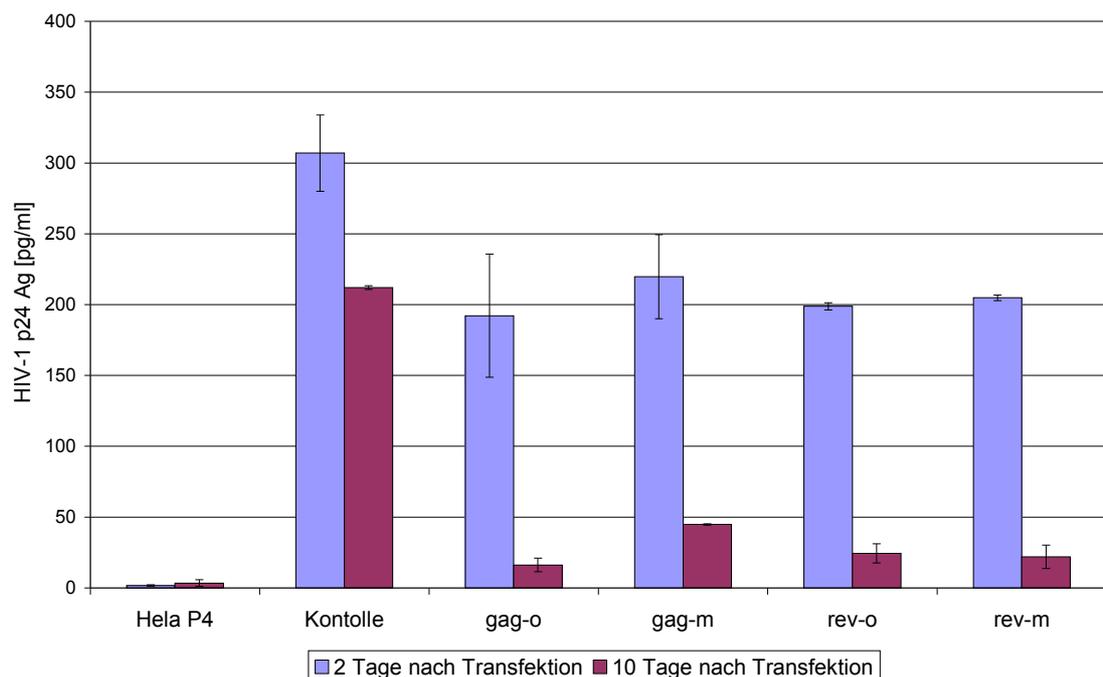


Abbildung 3.11: Hemmung der HIV-1-Replikation in HeLa-P4-Zellen, Ergebnis des p24-Capture-ELISAs. Die p24-Antigen-Konzentration geht bei allen Konstrukten zurück, jedoch erst nach 10 Tagen. Der ELISA wurde in einer vierfach-Bestimmung durchgeführt.

eignete Puffer- und Reaktionsbedingungen zu finden. Mit dem Optimization-Kit, welches für diese Zwecke vom Hersteller angeboten wird, wurde eine solche Testreihe durchgeführt und mit Puffer R (Amaya) bei Programm A23 im Nucleofector konnte eine Transfektionseffizienz von knapp 75% erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Unter diesen Bedingungen wurden anschließend alle Transfektionsversuche mit C8166-Zellen durchgeführt.

3.3.2.1 Hemmung der HIV-1-Replikation mit Anti-*rev*- und Anti-*gag*-shRNAs in pSUPER.gfp/neo-Konstrukten

Bei diesen Versuchen wurden C8166-Zellen mit pNL4-3 und den pSUPER.gfp/neo-Konstrukten gegen die HIV-Gene *gag* und *rev* cotransfiziert. Diese waren schon in den HeLa-P4-Zellen verwendet worden. Als Kontrolle wurde pNL4-3 mit dem leeren pSUPER.gfp/neo-Vektor cotransfiziert. Aus den Zellen wurde die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels Real-time-PCR die HIV-1-Expression quantifiziert. Nach zwei Tagen war bereits eine deutliche Hemmung zu erkennen (Abbildung 3.12).

Besonders die beiden Anti-*rev* Konstrukte zeigten eine stark hemmende Wirkung. Sie reduzierten die Expression der viralen mRNA um 95%, wobei kein Unterschied

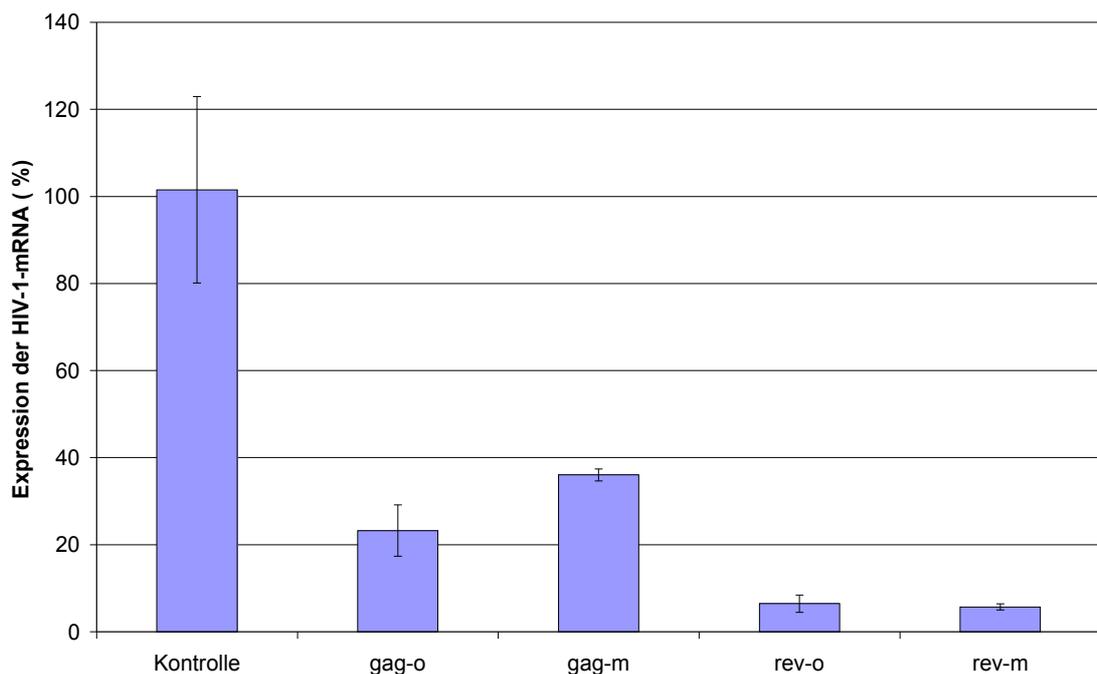


Abbildung 3.12: Hemmung der HIV-1-Expression in C8166-Zellen, Ergebnis der Real-time-PCR mit HIV-*rev*-Primern. Die Hemmung durch die Anti-*rev*-siRNAs ist in diesem Fall deutlich stärker als durch die Anti-*gag*-siRNAs. Die Real-time-PCR wurde in einer sechsfach-Bestimmung durchgeführt.

zwischen dem modifizierten Konstrukt und dem nicht-modifizierten erkennbar war.

Auch bei den Anti-*gag*-shRNAs zeigte sich eine Hemmung der Virus-Replikation, jedoch nicht so ausgeprägt. Die HIV-1-Expression wurde bei der nicht-modifizierten Sequenz *gag-o* um 75% reduziert, bei der modifizierten *gag-m* zu 65%.

Im ebenfalls durchgeführten p24-Capture-ELISA war dann ein anderes Ergebnis zu sehen. In diesem Fall ist die hemmende Wirkung der Anti-*rev*-Konstrukte nicht mehr so ausgeprägt wie bei der Messung mittels Real-time-PCR (Abbildung 3.13).

Bei der *rev-o*-shRNA konnte zwar die p24-Antigen-Konzentration um 60% reduziert werden, im Vergleich zur Kontrolle, bei *rev-m* war jedoch nur ein leichter Rückgang auf 77% zu verzeichnen. Das *gag-o*-Konstrukt zeigte die größte Hemmung, mit einer Reduktion der p24-Konzentration um 85%. Auch bei diesem Target brachte der Einbau der Fehlpaarung keine Verbesserung. Im Gegenteil, die Hemmwirkung der *gag-m*-shRNA lag nur bei etwas über 60%.

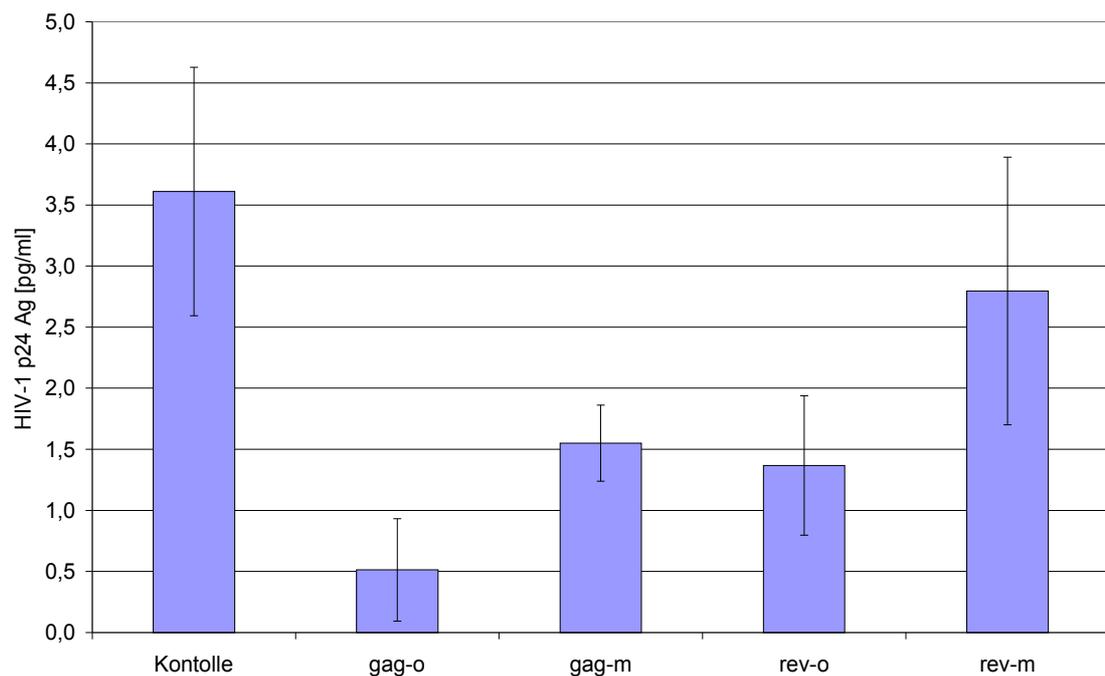


Abbildung 3.13: Hemmung der HIV-1-Expression in C8166-Zellen, Ergebnis des p24-Capture-ELISA. In diesem Fall zeigten die Anti-*gag*-Konstrukte eine bessere Wirkung als die Anti-*rev*-Konstrukte. In beiden Fällen waren die modifizierten siRNAs weniger wirksam als die Unmodifizierten. Der ELISA wurde in einer vierfach-Bestimmung durchgeführt.

3.3.2.2 Hemmung der HIV-1-Replikation mit Anti-*rev*- und Anti-*tat*-shRNAs in Lentivirus-transduzierten C8166-Zellen

Es wurden Versuche durchgeführt, lentivirale Vektoren mit shRNA-Expressions-kassetten gegen HIV-1 zu generieren. Die beiden in pSUPER getesteten Anti-*rev*-shRNA-Kassetten wurden in den pLVTHM-Vektor umkloniert. Des Weiteren wurden neue shRNAs gegen HIV-1-*tat* entwickelt, *tat-o* und *tat-m*, wobei *tat-m* wieder eine Fehlpaarung am 3'-Ende des Sense-Stanges trug.

Da die lentiviralen Vektoren von HIV-1 abgeleitet sind, wirken die shRNAs gegen HIV-1-*rev* und -*tat* auch gegen das Verpackungssystem. Die Rev- und Tat-Proteine werden auf dem psPAX2-Plasmid während der Verpackung in den 293FT-Zellen von einem CAG-Promotor abgelesen. Damit sollte die Expression dieser regulatorischen Proteine, auch unter Einwirkung der RNAi, noch stark genug sein, um lentivirale Partikel zu erzeugen. Der CAG-Promotor besteht aus einem CMV-Enhancer und den *Chicken-beta-actin*-Promotor. Insgesamt waren die Ausbeuten an lentiviralen Partikeln jedoch trotzdem deutlich geringer, im Vergleich zu denen, die ohne RNAi gegen das Verpackungssystem erwartet werden (1×10^6 Partikel/ml nach Angaben von Tronolab).

Die lentiviralen Partikel wurden, wie in Abschnitt 2.3.3.4 beschrieben, in 293FT Zellen hergestellt. Von dem gewonnen Überständen, wurde der Titer an Lentiviren bestimmt (Tabelle 3.3). Auffällig war, dass in den beiden Verpackungssystemen, in denen die Anti-*rev*-shRNAs verpackt wurden, der Titer nochmals deutlich niedriger war im Vergleich zu den Anti-*tat*-shRNAs.

Tabelle 3.3: Konzentration der lentiviralen Partikel in den eingesetzten Überständen

<i>Verpackte shRNA</i>	<i>Titer in 293-Zellen</i>
rev-o	1080 Partikel/ml
rev-m	800 Partikel/ml
tat-o	25000 Partikel/ml
tat-m	25600 Partikel/ml

Von den Überständen wurde je 1 ml auf 2×10^5 C8166-Zellen gegeben, zusammen mit 1 ml HIV-1-Überstand, welcher aus pNL4-3 produziert wurde. Als Kontrolle wurden C8166-Zellen nur mit HIV-1-Überstand infiziert. Nach vier Tagen wurde die mRNA aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben, und in der Real-time-PCR analysiert. Da die *tat*- und *rev*-mRNAs gespleißt werden, wurde zur besseren Vergleichbarkeit nur die Volllängen-mRNA mit den *gag*-Primern nachgewiesen.

Die Anti-*tat*-Konstrukte zeigten wieder eine Hemmung von etwa 50%, wobei die *tat-m*-siRNA besser war (Abbildung 3.14). Die *rev-o*-siRNA, zeigte trotz der geringen Konzentration an Lentivektoren eine bessere Hemmung als beide *tat*-Konstrukte (etwa 60%). Bei *rev-m* ist jedoch keine hemmende Wirkung zu erkennen.

3.3.3 Überprüfung der siRNAs im Sfold-Programm

Alle gegen HIV-1 eingesetzten shRNAs wurden bereits mehrfach veröffentlicht und zeigten zumindest als synthetische shRNAs sehr gute Wirkungen [Novina et al., 2002; Song et al., 2003]. Einige konnten auch in Expressionsvektoren kloniert werden und zeigten dabei ebenfalls eine hemmende Wirkung, teilweise bis zu 90% [Lee et al., 2002; Boden et al., 2003a; Boden et al., 2003b].

In letzter Zeit wurden neue Kriterien zur Auswahl einer wirkungsvollen siRNA gefunden. Diese hängen zum einen von der Sekundärstruktur der Target-mRNA ab, zum anderen hat auch die Sequenz der siRNA einen Einfluss auf die Wirksamkeit der RNAi.

Die verwendeten shRNAs gegen HIV-1 wurden jedoch noch ohne diese jüngsten Er-

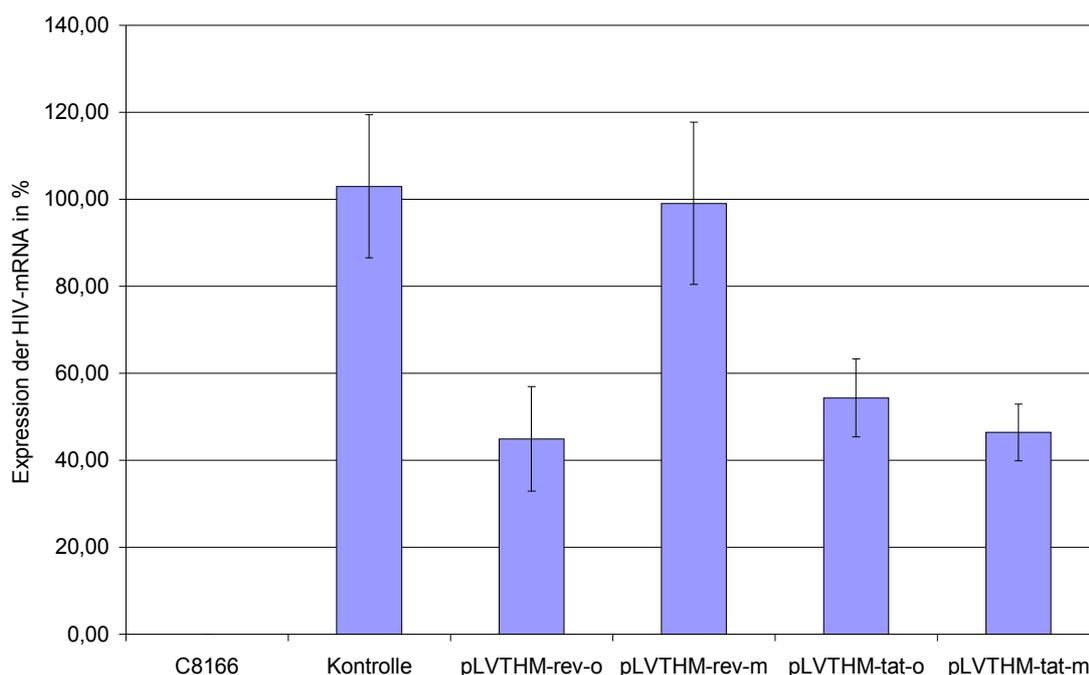


Abbildung 3.14: Expression von HIV-1 in Lentivirus-transduzierten C8166-Zellen, Ergebnis der Real-time PCR mit *gag*-Primern. Mit dem *rev-o* und den beiden Anti-*tat*-Konstrukten ist eine Hemmung zu erkennen, mit dem *rev-m* Konstrukt nicht. Die Real-time-PCR wurde in einer sechsfach-Bestimmung durchgeführt.

kenntnisse ausgewählt. Daher wurden die Target-mRNAs nochmals mit dem Sfold-Programm untersucht (<http://sfold.wadsworth.org/sirna.pl>). Sfold basiert auf einem Algorithmus zur Berechnung der Faltung der mRNA, Vorhersage der Target-Zugänglichkeit und dem rationalen Design der Nucleinsäuren der Target-Sequenz [Ding et al., 2004]. In der prognostizierten Sekundärstruktur der mRNA liegen die Target-Sequenzen in den *gag*- und *tat*-mRNA zumindest teilweise in einzelsträngigen Bereichen und sind somit zugänglich für die siRNA und den RISC (Abbildung 3.15). Im *rev*-Gen liegt die Target-Sequenz in doppelsträngigem Bereich der mRNA und sollten dementsprechend nur schlecht zugänglich sein, was sich aber in den Ergebnissen nicht widerspiegelt (Abbildung 3.16 und 3.17). Die berechneten Werte für die internen Stabilitäten und Basenpaarzusammensetzungen mit dem Programm ergab für alle drei nur durchschnittliche Werte. Die *gag*- und *rev*-shRNAs bekamen jeweils sieben Punkte bei der Gesamtpunktzahl, die *tat*-shRNA acht, bei einer maximal erreichbaren Punktzahl von 20.

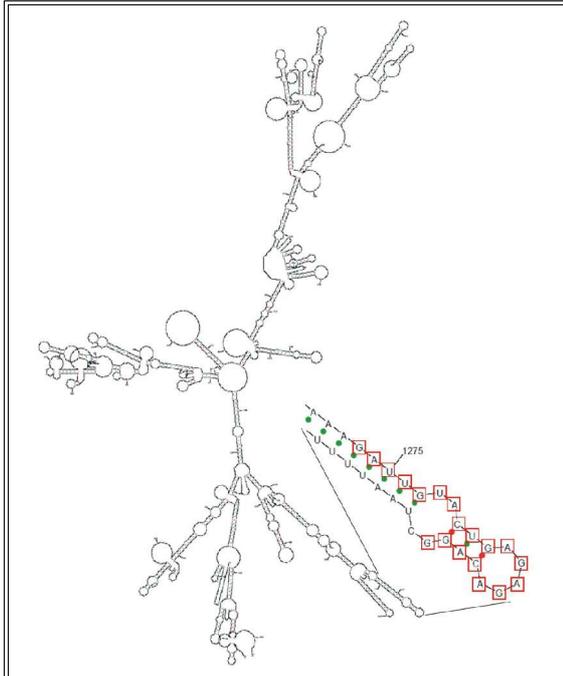


Abbildung 3.15: Berechnete Sekundärstruktur der HIV-gag-mRNA. Die Bindungsstelle der Anti-gag-siRNA ist farbig markiert.

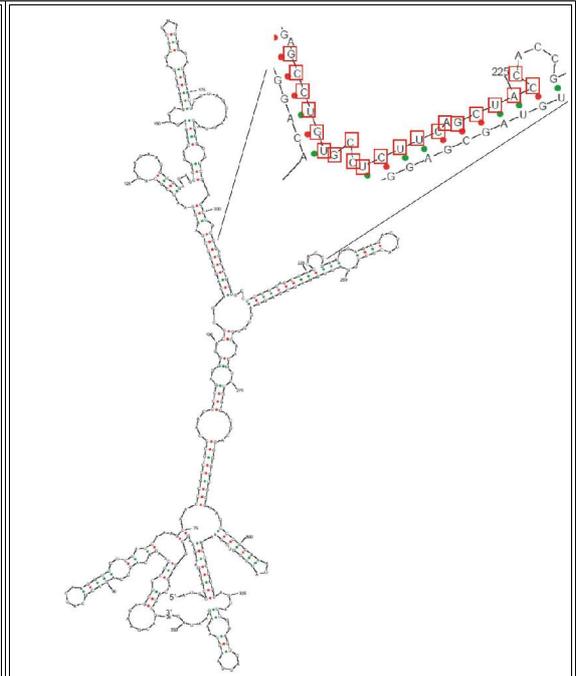


Abbildung 3.16: Berechnete Sekundärstruktur der HIV-1-rev-mRNA. Die zur Anti-rev-siRNA komplementären Nucleotide sind hervorgehoben.

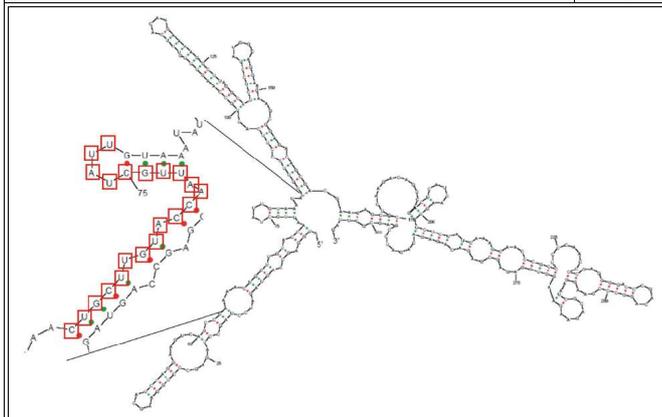


Abbildung 3.17: Berechnete Sekundärstruktur der HIV-tat-mRNA. Die Bindungsstelle der Anti-tat-siRNA ist farbig hervorgehoben.

4 Diskussion

4.1 PERV-Molekularklon

Wie schon durch die Klonierung der fast vollständigen Sequenz von PERV-C (PERV-MSL [Akiyoshi et al., 1998b]) und durch die publizierten Molekularklone von PERV-A und PERV-B [Czauderna et al., 2000] gezeigt, beherbergt das Schweinegenom provirale Sequenzen, welche Replikations-kompetente Retroviren codieren. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass PERV-A und PERV-C zu einer A/C-Variante rekombinieren [Wilson et al., 1998; Wood et al., 2004]. Dieser A/C-rekombinante Subtyp wird in letzter Zeit als derjenige mit dem höchsten Gefahrenpotential bei einer Xenotransplantation angesehen. Durch das *env*-Gen weist er den gleichen Tropismus wie PERV-A auf, eingeschlossen humane Zellen. Zudem konnte eine Adaption des Virus bei der Replikation in humanen Zellen beobachtet werden [Denner et al., 2003]. Ziel bei der Erstellung des Molekularklons war, zum ersten Mal den A/C-rekombinanten Subtyp von PERV als Molekularklon darzustellen. Dabei sollte auch die LTR von PERV/5⁰, welche beim Passagieren des Virus entstand und nachweislich zu einem höheren Virustiter führt, im Plasmid enthalten sein.

Es gelang, die Sequenz eines A/C-rekombinanten PERV zu amplifizieren und in die beiden Plasmide zu ligieren. Sowohl im Klon mit der natürlichen 5'-LTR als auch in dem Klon mit der chimären 5'-LTR, bestehend aus CMV-Promotor und der 5'-LTR von PERV ab der R-Region, konnte in der Sequenzierung die vollständige PERV-Sequenz nachgewiesen werden.

Die zu einem Stop-Codon führende Punktmutation im PERV-CMV-Klon wurde mit einer Mutagenese-PCR behoben. Alle weiteren Mutationen in diesem Klon führten zu keiner auf den ersten Blick sichtbaren Änderung, wodurch die Funktion des Virus beeinträchtigt worden wäre. Es konnte nicht geklärt werden, ob diese Mutationen natürlichen Ursprungs sind oder während der PCR-Amplifikation entstanden. Daher wurde auf eine Korrektur verzichtet, zumal auch die Funktionsfähigkeit der publizierten Sequenz von PERV-MSL nicht bewiesen ist.

Das Ziel, einen replikationskompetenten Klon mit der LTR von PERV/5⁰ zu erstellen, konnte nicht erreicht werden. Schon länger war bekannt, dass in den sogenannten 293/5⁰-Zellen nicht mehr nur PERV/5⁰ vorhanden war. Kontroll-PCRs in diesen Zellen zeigten, dass ausschließlich die LTR-Variante von PERV/4⁰ in den Zellen nach-

weisbar ist, welche auch in den Klonen detektiert wurde. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die LTR in PERV/4⁰ die stabilste ist. Zwar ist der Virustiter längst nicht so hoch wie bei PERV/5⁰, möglicherweise kommt es durch die zusätzlichen Repeats in der LTR bei PERV/5⁰ bereits zu Problemen bei der Verpackung des Genoms in die Virionen oder das gesamte Genom verliert an Stabilität.

Durch die Klonierung des PERV-Genoms hinter den CMV-Promotor im verkürzten pcDNA3.1(+)-Vektor konnte die Expression der viralen mRNA im Vergleich mit der natürlichen LTR erheblich gesteigert werden. Dies wird besonders beim Nachweis der reversen Transkriptase deutlich (Abbildung 3.4), ist aber auch im Western-Blot zum Nachweis des Gag-Proteins sowie beim Nachweis der gespleißten *env*-mRNA erkennbar (Abbildung 3.5 und 3.7). Damit sollte die Produktion von Virionen nach der Transfektion verstärkt werden, um so schneller eine vollständig infizierte Kultur zu erhalten. Die gemessenen RT-Werte nach zwei Tagen sind zwar noch deutlich unter denen einer infizierten PERV-B-Kultur, jedoch konnte bei den Klonen von PERV-A und PERV-B erst nach 12-14 Tagen RT-Aktivität nachgewiesen werden [Czauderna et al., 2000].

Bei der Untersuchung des RNA-Expressionsmusters in humanen Zellen sowie in Ratten- und Mäusezellen fällt auf, dass in den Rattenzellen keine gespleißte *env*-mRNA nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise fehlen in Rattenzellen Faktoren, die den Speißvorgang der viralen mRNA ermöglichen. In den 3T3-Zellen aus der Maus konnte das *env*-Spleißprodukt hingegen nachgewiesen werden. Dieses Erkenntnis ist wichtig für die geplante Erstellung einer transgenen Maus als Tiermodell, um PERV-Infektionen *in vivo* zu untersuchen.

Alle Versuche, eine produktive Infektion mit den Moleklarklonen nachzuweisen, waren negativ. Die Ursache dafür konnte noch nicht geklärt werden. In den transfizierten Zellen konnte das Gag-Protein, die reverse Transkriptase sowie die gespleißte mRNA des *env*-Gens nachgewiesen werden. Eine Möglichkeit ist, dass die Integrase, welche sich hinter der RT befindet, nicht aktiv ist und es somit auch bei der Transfektion nicht zu einer Intergration des viralen Genoms in die Zellen kommt. Dafür spricht, dass die zu Beginn hohe Aktivität der RT in diesen Zellen mit der Zeit abnimmt, was darauf zurückzuführen ist, dass das Plasmid ausverdünnt wird (Daten nicht gezeigt). Das bei PERV-CMV gefundene Stop-Codon bestätigte zunächst diese Vermutung, liegt es doch im Genom an Position 3225 und damit genau hinter dem aktiven Zentrum der

reversen Transkriptase, wodurch diese ihre Aktivität behalten hätte [Coffin et al., 1997]. Die im Anschluß codierte Integrase würde jedoch nicht mehr translatiert werden und somit keine Integration ermöglichen. Jedoch führte die Korrektur dieser Punktmutation nicht zu einem replikationskompetenten Klon.

Die gleichen Folgen hätte die CC-Insertion bei PERV-XL2, welche zu einer Leserasterverschiebung und nach wenigen Nucleotiden zu einem Stop-Codon führt. Dadurch kommt es zum Kettenabbruch bei der Translation des Pol-Gens vor den letzten 100 Aminosäuren.

Ebenso könnte es Probleme bei der Verpackung der Virionen geben. Bei einer fehlerhaften Ψ -Sequenz würden durchaus Partikel entstehen, in denen RT im Überstand von Zellen nachgewiesen werden kann. Jedoch enthalten diese Partikel keine oder nicht die richtige Virus-RNA, wodurch es nicht möglich ist, weitere Zellen zu infizieren.

Hauptproblem bei der Fehlersuche ist, dass über PERVs nach wie vor recht wenig bekannt ist. Weder die Verpackungssequenz noch die aktiven Zentren der Enzyme sind bislang genauer untersucht. Prinzipiell kann jede der detektierten Punktmutationen für den Funktionsverlust verantwortlich sein, wobei aber auch nicht klar ist, ob die publizierten Sequenzen replikationskompetent sind oder nicht.

4.2 Hemmung von PERV mittels RNA-Interferenz

Die Verwendung der RNAi zum Sequenz-spezifischen *Knock-down* von Genen mit einem damit verbundenen potentiellen therapeutischen Einsatz wurde in den letzten Jahren immer weiter vorangetrieben. In verschiedenen Arbeiten wurde bereits über die effektive Hemmung der Replikation verschiedenster Viren berichtet [McCaffrey et al.; Yokota et al., 2003; Wilson et al., 2003]. Im Zuge der Forschungen im Bereich der Xenotransplantation und dem dadurch aufkommenden Risiko einer Übertragung von PERV auf den Menschen wird nun auch der Einsatz der RNAi gegen diese Viren interessant. In dieser Arbeit ging es darum, die Grundlagen dafür zu legen, transgene Schweine zu erzeugen, die stabil Anti-PERV-shRNAs exprimieren wodurch die Bildung infektiöser Partikel reduziert wird. Damit würde das Risiko einer Infektion mit PERV für Empfänger eines Xenotransplantats weiter gesenkt.

Wie bereits erwähnt, ist ein konventioneller Gen-„*knock-out*“ auf Grund von etwa 100 proviralen PERV-Kopien im Schweinegenom nahezu unmöglich. Ebenso bieten so-

genannte „*low-producer*“-Schweine keinen endgültigen Schutz, da sich die defekten proviralen Sequenzen durch Rekombination ergänzen können und somit möglicherweise wieder infektiöse Partikel entstehen. Um transgene Schweine zu erzeugen, welche shRNAs gegen PERV exprimieren, wurden lentivirale Vektoren mit shRNA-Expressionskassetten versehen. Die verwendete Target-Sequenz liegt im *pol*-Bereich des viralen Genoms und wurde vorher zusammen mit anderen Sequenzen als synthetische siRNA getestet und zeigte dabei die beste Wirkung [Karlas et al., 2004].

In diesem Versuch konnte zum ersten Mal die PERV-Expression in primären Schweinezellen um 60% gesenkt werden (Abbildung 3.8). Bislang wurden Versuche zur Hemmung von PERV nur in humanen 293-Zellen durchgeführt. Leider konnte der Anteil transduzierter Zellen nicht bestimmt werden, weshalb man keine Aussage treffen kann, wie effizient die Hemmung nun tatsächlich in der Zelle war. In einem vorangegangenen Experiment wurden 293/5⁰-Zellen mit einem konventionellen Expressionsvektor (pSUPER), welcher die gleiche shRNA exprimiert, transfiziert. Aus dieser Kultur wurde ein Klon selektioniert. In diesem Fall lag die Hemmung von PERV bei 90% [Karlas et al., 2004]. Daher kann man davon ausgehen, dass nicht alle porcinen Fibroblasten in diesem Experiment transduziert wurden.

Mit diesen lentiviralen Vektoren sollen nun transgene Schweine erzeugt werden, in denen die Hemmung von PERV gemessen werden soll. Wichtig ist dabei auch die Spezifität der eingesetzten siRNA, um unerwünschte Nebeneffekte, die beispielsweise durch die Blockade eines zellulären Gens entstehen, auszuschließen.

Alles in allem könnte die RNA-Interferenz den Schutz vor einer Infektion mit PERV bei einer Xenotransplantation erhöhen.

4.3 Hemmung von HIV-1 mittels RNA-Interferenz

RNA-Interferenz zur Verminderung der HIV-1-Replikation bietet eine neue Möglichkeit der antiviralen Gentherapie. Bis heute wurden verschiedene HIV-1 spezifische RNAi-Ansätze versucht, entweder durch Einführen von synthetischen siRNAs in die Zellen oder mit DNA-Vektoren, welche eine siRNA/shRNA-Expressionskassette besitzen. Bislang gab es jedoch noch keinen Ansatz, der über die Versuche in der Zellkultur hinausging.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Target-Sequenzen im HIV-1-Genom auf ihre

Zugänglichkeit für RNAi untersucht. Als Ziele dienten die beiden frühen Transkripte *rev* und *tat* sowie eine Sequenz im *gag*-Bereich der HIV-1-mRNA. Mit dem Ziel, den Einbau des zur mRNA komplementären Stranges der doppelsträngigen siRNA in den RISC zu fördern, wurden am 3'-Ende des Sense-Stranges Fehlpaarungen eingebaut. Dadurch sollte die im RISC vorhandene Helikase die doppelsträngige RNA leichter von dieser Seite aus entwinden, wodurch der Antisense-Strang, welcher komplementär zur mRNA ist, verstärkt in den RISC eingebaut wird [Schwarz et al., 2003].

In allen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Expression von HIV-1 mittels RNAi inhibiert werden kann. Jedoch wurde keine signifikant verstärkte Wirkung der siRNAs mit den Modifizierungen (*gag-m*, *rev-m* und *tat-m*) gegenüber den Originalsequenzen (*gag-o*, *rev-o* und *tat-o*) erreicht.

Bei den Versuchen, die HIV-1-Expression in HeLa-P4-Zellen mit den pSUPER-Konstrukten gegen *gag* und *rev* zu hemmen, konnte in beiden Fällen eine Hemmung gezeigt werden. Die Hemmungen waren sowohl in der Real-time-PCR als auch im p24-Capture-ELISA messbar und für beide Targets ungefähr gleich gut (Abbildung 3.9, 3.10 und 3.11). Die zeitliche Verzögerung, mit der die Hemmung im p24-Capture-ELISA detektiert wird, kommt dadurch zustande, dass Proteine eine längere Halbwertszeit im Vergleich zur mRNA haben. Daher nimmt der Level an Protein langsamer ab als die mRNA-Konzentration, selbst wenn die Expression des Proteins blockiert ist (Abbildung 3.11).

Die starke Zunahme der HIV-1-Expression zehn Tage nach der Applikation des *rev-o* Konstrukts ist sehr wahrscheinlich auf Messfehler zurückzuführen, was sich auch im großen Fehlerbalken widerspiegelt. Die ELISA-Daten zeigten, dass die *rev-o*-shRNA auch nach zehn Tagen noch eine vergleichbar starke Hemmung der HIV-Expression wie die *rev-m*-shRNA bewirkt (Abbildung 3.11).

In den Versuchen, die beiden pSUPER-Konstrukte in den C8166-Zellen zu verwenden, zeigte sich eine noch stärkere Hemmung als bei den HeLa-P4-Zellen. Dies mag an der möglicherweise besseren Transfektionseffizienz mit dem Nucleofector™ verglichen mit Lipofectamine™ 2000 liegen. Auch wurde in diesem Fall pNL4-3 mit den pSUPER-Konstrukten cotransfiziert, weshalb nicht, wie bei den HeLa-P4-Zellen, davon ausgegangen werden kann, dass es sich um eine vollständig infizierte Kultur handelte. Die schwächere Wirkung der Anti-*gag*-Konstrukte kann anhand des Nach-

weises in der Real-time-PCR erklärt werden (Abbildung 3.12). Die Real-time-PCR wurde mit den HIV-*rev*-Primern durchgeführt, wodurch sowohl die Vollängen-mRNA als auch die *rev*-Spleißprodukte detektiert wurden. RNAi findet im Cytosol statt, in das die mRNAs nach dem Spleißen durch die Kernporen gelangen. Die Ziel-Sequenz der Anti-*gag*-siRNAs liegt nur auf der Vollängen-mRNA vor, wodurch nur diese degradiert wird, die *rev*-Spleißprodukte hingegen werden, wie alle anderen gespleißten mRNAs, nicht abgebaut. Da in der Real-time-PCR nicht nur die Vollängen-mRNA, sondern auch die gespleißte *rev*-mRNA gemessen wurde, sind die Ergebnisse für das Anti-*gag*-Konstrukt nicht mit denen für das Anti-*rev*-Konstrukt vergleichbar. Die Daten aus dem p24-Capture-ELISA zeigen eine leicht bessere Wirkung der Anti-*gag*-Konstrukte verglichen mit den Anti-*rev*-Konstrukten.

Der Umgang mit C8166-Zellen gestaltete sich schwieriger als mit den HeLa-P4-Zellen. Lymphoide T-Zellen bilden bei einer Infektion mit Retroviren Syncycien und sterben daraufhin ab. Deshalb mussten in HIV-1 infizierten Kulturen von C8166-Zellen regelmäßig frische Zellen zugegeben werden, um die Kultur weiterführen zu können. Jedoch änderte sich jedesmal die Zusammensetzung der Kultur im Hinblick auf den Anteil infizierter oder transfizierter Zellen. Versuche, die über einen Zeitraum von zehn Tagen liefen, wie bei den HeLa-P4-Zellen, waren damit nicht möglich.

Bei der SFOLD-Analyse erhielten alle verwendeten Target-Sequenzen durchschnittliche Werte, was etwas verwundert, da alle bereits publiziert sind und dabei Hemmungen der HIV-1-Replikation von teilweise über 90% erzielt werden konnten.

Das Hauptproblem beim therapeutischen Einsatz der RNAi besteht in der schlechten Bioverfügbarkeit der siRNAs im Organismus. Während es in der Zellkultur vergleichsweise einfach ist, synthetische siRNAs oder Vektoren mit shRNA-Expressionskassetten in die Zellen einzuschleusen, ist dies bei ganzen Organismen nach wie vor ein Problem. Daher ist die Suche nach geeigneten Vektoren, mit denen die siRNAs/shRNA in die Zielzellen gelangen, ein wichtiges Anliegen. Lentivirale Vektoren bieten dabei eine gute Möglichkeit. Zum einen integrieren sie stabil in das Genom der Wirtszelle, zum anderen sind sie in der Lage, sich nicht teilende Zellen zu infizieren. Die in diese Arbeit bereits zur Hemmung von PERV verwendeten, lentiviralen Vektoren wurden mit shRNA-Expressionskassetten gegen HIV-1-*rev* und *-tat* bestückt. Das Problem bei diesem Versuch war vor allem, dass sich die exprimierten shRNAs auch gegen das Verpackungssystem,

welches von HIV-1 abgeleitet ist, richten und somit die Ausbeute an lentiviralen Partikeln drastisch senken (Tabelle 3.3).

Um dies zu verhindern, könnte zum einen die RNAi durch Ausschalten eines für den RISC essentiellen Faktors in den Verpackungszellen blockiert werden. Damit würden die von den Transfervektoren exprimierten shRNAs in den Verpackungszellen keine Degradation der gebildeten mRNAs von den Verpackungsplasmiden einleiten.

Eine weitere Möglichkeit wäre, Mutationen in die Targetsequenz der RNAi auf den Verpackungsplasmiden einzubauen, um eine Bindung der siRNAs an die mRNA zu verhindern.

4.4 Ausblick

Die Methode der RNA-Interferenz hat sich in den letzten Jahren als Werkzeug in den biotechnologischen Labors etabliert und ist dort fast nicht mehr wegzudenken. Die Bemühungen, RNAi auch als genetisches Therapeutikum einzusetzen, werden seit ihrer Entdeckung vorangetrieben. Im Bereich der Bekämpfung von HIV-1 wurden verschiedenste RNA-basierte Ansätze in der Zellkultur versucht, jedoch scheitert man bislang an der schlechten Bioverfügbarkeit dieser Moleküle im Organismus. Daher wird sich die Forschung in nächster Zeit wohl in den Bereich der Konstruktion von geeigneten Vektoren für diese Substanzen konzentrieren. Des Weiteren werden wirkungsvolle siRNAs benötigt, die die retrovirale Expression unterdrücken, ohne dabei andere, zelluläre mRNAs zu beeinflussen.

Ob die RNAi auch im Bereich der Xenotransplantation als Schutz vor PERV eingesetzt wird, entscheidet sich daran, ob Infektionen mit diesen Viren in Versuchstieren nachgewiesen werden können und welche Folgen sie haben. Derzeit scheitert die Xenotransplantation vor allem an nach wie vor großen immunologischen Hürden.

5 Zusammenfassung

Im Genom von Schweinen befinden sich provirale Sequenzen von porcinen endogenen Retroviren (PERVs), welche replikationskompetente Viren codieren. Die Sequenz eines A/C-rekombinanten PERV, bestehend aus dem *gag/pol*-Bereich von PERV-C und dem *env*-Gen von PERV-A, wurde kloniert. Damit konnte zum ersten Mal das gesamte Genom dieses rekombinanten Subtyps sequenziert und analysiert werden. Zudem handelte es sich um ein auf humanen Zellen adaptiertes Virus, welches durch den Einbau zusätzlicher repetitiver Elemente in die LTR einen höheren Virustiter erreicht. In Zellen, die mit den Moleklarklonen transfiziert wurden, konnten die Vollängen-mRNA sowie die gespleißte *env*-mRNA nachgewiesen werden. Ebenfalls wurde das virale Gag-Protein und die reverse Transkriptase detektiert. Die Produktion infektiöser Partikel konnte bislang nicht nachgewiesen werden, die Ursachen werden analysiert.

Um die Expression von PERV und HIV mittels RNA-Interferenz zu hemmen, wurden shRNA-Expressionskassetten gegen Target-Sequenzen innerhalb der viralen mRNAs in Vektoren kloniert. Es konnte gezeigt werden, dass mittels RNA-Interferenz die Expression von HIV-1 unterdrückt wird. Expressionskassetten mit shRNAs gegen die HIV-1-Gene *gag* und *rev* wurden in konventionelle Expressionsvektoren kloniert. In HIV-1-infizierten HeLa-P4- und C8166-Zellen konnte mit diesen Konstrukten eine deutliche Reduktion der viralen Replikation erreicht werden. Auch mit den lentiviralen Konstrukten gegen HIV-1-*rev* und *-tat* war eine deutliche Hemmung der HIV-1-Expression messbar. Durch den Einbau von Fehlpaarungen in das 3'-Ende des Sense-Stranges konnte die Effizienz der shRNAs nicht gesteigert werden.

Zur Hemmung der PERV-Expression wurden ebenfalls lentivirale Vektoren generiert, welche eine shRNA-Expressionskassette gegen eine im *pol*-Gen von PERV befindliche Sequenz trugen. Mit diesen Konstrukten wurden porcine Fibroblasten transduziert. Zum ersten Mal konnte eine Hemmung der Expression von PERV in primären Schweinezellen gezeigt werden.

Mit diesen lentiviralen Konstrukten wäre es möglich, transgene Schweine zu erstellen, in deren Zellen die virale Expression herunterreguliert ist, wodurch diese Schweine eine erhöhte Sicherheit vor einer Infektion mit PERV bei einer Xenotransplantation bieten könnten.

6 Literaturverzeichnis

- Akiyoshi, D., Denaro, M., Zhu, H., Greenstein, J., Banerjee, P., and Fishman, J. (1998).** Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine. *J Virol* 72, 4503-4507.
- Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M., and Berger, E. A. (1996).** CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272, 1955-1958.
- Ambros, V. (2001).** microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* 107, 823-826.
- Angell, S. M., and Baulcombe, D. C. (1997).** Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. *Embo J* 16, 3675-3684.
- Aravin, A. A., Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., Meyer, J., and Tuschl, T. (2003).** The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell* 5, 337-350.
- Argaw, T., Ritzhaupt, A., and Wilson, C. (2002).** Development of a real time quantitative PCR assay for detection of porcine endogenous retrovirus. *J Virol Methods* 106, 97.
- Armstrong, J., Porterfield, J., and De Madrid, A. (1971).** C-type Virus Particles in Pig Kidney Cell Lines. *J Gen Virol* 10, 195-198.
- Bartel, D. P., and Chen, C. Z. (2004).** Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet* 5, 396-400.
- Bartosch, B., Weiss, R. A., and Takeuchi, Y. (2002).** PCR-based cloning and immunocytological titration of infectious porcine endogenous retrovirus subgroup A and B. *J Gen Virol* 83, 2231-2240.
- Boden, D., Pusch, O., Lee, F., Tucker, L., and Ramratnam, B. (2003a).** Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference. *J Virol* 77, 11531-11535.
- Boden, D., Pusch, O., Lee, F., Tucker, L., Shank, P. R., and Ramratnam, B. (2003b).** Promoter choice affects the potency of HIV-1 specific RNA interference. *Nucleic Acids Res* 31, 5033-5038
- Boden, D., Pusch, O., Silberman, R., Lee, F., Tucker, L., and Ramratnam, B. (2004).** Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins. *Nucleic Acids Res* 32, 1154-1158.
- Bosch, S., Arnauld, C., and Jestin, A. (2000).** Study of full-length porcine endogenous retrovirus genomes with envelope gene polymorphism in a specific-pathogen-free Large White swine herd. *J Virol* 74, 8575-8581.
- Breese, S. (1970).** Virus-like Particles Occurring in Cultures of Stable Pig Kidney Cell Lines. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 401-404.
- Brown, S. J., Mahaffey, J. P., Lorenzen, M. D., Denell, R. E., and Mahaffey, J. W. (1999).** Using RNAi to investigate orthologous homeotic gene function during development of distantly related insects. *Evol Dev* 1, 11-15.

- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. (2002).** A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553.
- Butler, D. (1999).** FDA warns on primate xenotransplants. *Nature* 398, 549.
- Byrne, G. W., McCurry, K. R., Martin, M. J., McClellan, S. M., Platt, J. L., and Logan, J. S. (1997).** Transgenic pigs expressing human CD59 and decay-accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement-mediated damage. *Transplantation* 63, 149-155.
- Chapman, L. E., Folks, T. M., Salomon, D. R., Patterson, A. P., Eggerman, T. E., and Noguchi, P. D. (1995).** Xenotransplantation and xenogeneic infections. *N Engl J Med* 333, 1498-1501.
- Coffin, J., Hughes, S., and Varmus, H. (1997).** Retroviruses. Cold Spring Harb Laboratory.
- Czuderna, F., Fischer, N., Boller, K., Kurth, R., and Tonjes, R. R. (2000).** Establishment and characterization of molecular clones of porcine endogenous retroviruses replicating on human cells. *J Virol* 74, 4028-4038.
- Dalglish, A. G., Beverley, P. C., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F., and Weiss, R. A. (1984).** The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312, 763-767.
- Damania, B., and Alwine, J. C. (1996).** TAF-like function of SV40 large T antigen. *Genes Dev* 10, 1369-1381.
- Das, A. T., Brummelkamp, T. R., Westerhout, E. M., Vink, M., Madiredjo, M., Bernards, R., and Berkhout, B. (2004).** Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *J Virol* 78, 2601-2605.
- Deng, Y., Tuch, B., and Rawlinson, W. (2000).** Transmission of porcine endogenous retroviruses in severe combined immunodeficient mice xenotransplanted with fetal porcine pancreatic cells. *Transplantation* 70, 1010-1016.
- Denner, J. (1998).** Immunosuppression by retroviruses: implications for xenotransplantation. *Ann N Y Acad Sci* 862, 75-86.
- Denner, J., Specke, V., Schwendemann, J., and Tacke, S. J. (2001a).** Porcine endogenous retroviruses (PERVs): adaptation to human cells and attempts to infect small animals and non-human primates. *Ann Transplant* 6, 25-33.
- Denner, J., Specke, V., Tacke, S., Schwendemann, J., Coulibaly, C., Plesker, R., Kurth, R., Langford, G., and Schuuman, H. (2001b).** PERVs: diagnostics, adaptation to human cells, but no transmission to small animals, non-human primates and man. *Xenotransplantation* 8, *Suppl. 1*, 126-127.
- Denner, J., Specke, V., Thiesen, U., Karlas, A., and Kurth, R. (2003).** Genetic alterations of the long terminal repeat of an ecotropic porcine endogenous retrovirus during passage in human cells. *Virology* 314, 125-133.
- Ding, Y., and Lawrence, C. E. (2001).** Statistical prediction of single-stranded regions in RNA secondary structure and application to predicting effective antisense target sites and beyond. *Nucleic Acids Res* 29, 1034-1046.

- Ding, Y., and Lawrence, C. E. (2003).** A statistical sampling algorithm for RNA secondary structure prediction. *Nucleic Acids Res* 31, 7280-7301.
- Ding, Y., Chan, C. Y., and Lawrence, C. E. (2004).** Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 32, W135-141.
- Dore, G. J., Brown, T., Tarantola, D., and Kaldor, J. M. (1998).** HIV and AIDS in the Asia-Pacific region: an epidemiological overview. *Aids* 12 *Suppl B*, S1-10.
- Dorfman, T., Luban, J., Goff, S. P., Haseltine, W. A., and Gottlinger, H. G. (1993).** Mapping of functionally important residues of a cysteine-histidine box in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *J Virol* 67, 6159-6169.
- Dougherty, W. G., Lindbo, J. A., Smith, H. A., Parks, T. D., Swaney, S., and Proebsting, W. M. (1994).** RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol Plant Microbe Interact* 7, 544-552.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., and Naldini, L. (1998).** A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72, 8463-8471.
- Edbauer, C. A., and Naso, R. B. (1984).** Cytoskeleton-associated Pr65gag and assembly of retrovirus temperature-sensitive mutants in chronically infected cells. *Virology* 134, 389-397.
- Eddy, S. R. (2001).** Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat Rev Genet* 2, 919-929.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001a).** Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001b).** RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200.
- Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001c).** Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* 20, 6877-6888.
- Elliott, R. B., Escobar, L., Garkavenko, O., Croxson, M. C., Schroeder, B. A., McGregor, M., Ferguson, G., Beckman, N., and Ferguson, S. (2000).** No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of encapsulated porcine islet xenografts. *Cell Transplant* 9, 895-901.
- Ericsson, T. A., Takeuchi, Y., Templin, C., Quinn, G., Farhadian, S. F., Wood, J. C., Oldmixon, B. A., Suling, K. M., Ishii, J. K., Kitagawa, Y., *et al.* (2003).** Identification of receptors for pig endogenous retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6759-6764.
- Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., and Berger, E. A. (1996).** HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-877.

- Fiebig, U., Stephan, O., Kurth, R., and Denner, J. (2003).** Neutralizing antibodies against conserved domains of p15E of porcine endogenous retroviruses: basis for a vaccine for xenotransplantation? *Virology* 307, 406-413.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998).** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Fishman, J. A. (1997).** Xenosis and xenotransplantation: addressing the infectious risks posed by an emerging technology. *Kidney Int Suppl* 58, S41-45.
- Gao, F., Yue, L., White, A., Pappas, P., Barchue, J., Hanson, A., Greene, B., Sharp, P., Shaw, G., and Hahn, B. (1992).** Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature* 358, 495-499.
- Gorelick, R. J., Henderson, L. E., Hanser, J. P., and Rein, A. (1988).** Point mutants of Moloney murine leukemia virus that fail to package viral RNA: evidence for specific RNA recognition by a "zinc finger-like" protein sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8420-8424.
- Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A., and Saxon, A. (1981).** Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 305, 1425-1431.
- Gunthard, H. F., Wong, J. K., Ignacio, C. C., Guatelli, J. C., Riggs, N. L., Havlir, D. V., and Richman, D. D. (1998).** Human immunodeficiency virus replication and genotypic resistance in blood and lymph nodes after a year of potent antiretroviral therapy. *J Virol* 72, 2422-2428.
- Hammond, S. M., Caudy, A. A., and Hannon, G. J. (2001).** Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* 2, 110-119.
- Hanna, G. J. (2002).** HIV-1 genotypic and phenotypic resistance. *Clin Lab Med* 22, 637-649.
- Hannon, G. J. (2002).** RNA interference. *Nature* 418, 244-251.
- Hannon, J. P., Bossone, C. A., and Wade, C. E. (1990).** Normal physiological values for conscious pigs used in biomedical research. *Lab Anim Sci* 40, 293-298.
- Hofmann, A., Kessler, B., Ewerling, S., Weppert, M., Vogg, B., Ludwig, H., Stojkovic, M., Boelhaue, M., Brem, G., Wolf, E., and Pfeifer, A. (2003).** Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Rep* 4, 1054-1060.
- Hofmann, A., Zakhartchenko, V., Weppert, M., Sebald, H., Wenigerkind, H., Brem, G., Wolf, E., and Pfeifer, A. (2004).** Generation of Transgenic Cattle by Lentiviral Gene Transfer into Oocytes. *Biol Reprod*.
- Holmes, G. P., Chapman, L. E., Stewart, J. A., Straus, S. E., Hilliard, J. K., and Davenport, D. S. (1995).** Guidelines for the prevention and treatment of B-virus infections in exposed persons. The B virus Working Group. *Clin Infect Dis* 20, 421-439.
- Hope, I. A. (2001).** Broadcast interference - functional genomics. *Trends Genet* 17, 297-299.

- Hu, W. Y., Myers, C. P., Kilzer, J. M., Pfaff, S. L., and Bushman, F. D. (2002).** Inhibition of retroviral pathogenesis by RNA interference. *Curr Biol* 12, 1301-1311.
- Hunter, T., Hunt, T., Jackson, R. J., and Robertson, H. D. (1975).** The characteristics of inhibition of protein synthesis by double-stranded ribonucleic acid in reticulocyte lysates. *J Biol Chem* 250, 409-417.
- Hutvagner, G., and Zamore, P. D. (2002).** RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* 12, 225-232.
- Irgang, M., Laue, C., Schrezenmeir, J., and Denner, J. (2002).** No evidence for PERV release by islet cells from German landrace pigs. in Vorbereitung.
- Irgang, M., Sauer, I. M., Karlas, A., Zeilinger, K., Gerlach, J. C., Kurth, R., Neuhaus, P., and Denner, J. (2003).** Porcine endogenous retroviruses: no infection in patients treated with a bioreactor based on porcine liver cells. *J Clin Virol* 28, 141-154.
- Irgang, M., Karlas, A., Laue, C., Specke, V., Tacke, S. J., Kurth, R., Schrezenmeir, J., Denner J., (2004).** Porcine endogenous retroviruses PERV-A and PERV-B infect neither mouse cells *in vitro* nor SCID mice *in vivo*. *Intervirology*, in press.
- Iwakuma, T., Cui, Y., and Chang, L. J. (1999).** Self-inactivating lentiviral vectors with U3 and U5 modifications. *Virology* 261, 120-132.
- Jacque, J. M., Triques, K., and Stevenson, M. (2002).** Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 418, 435-438.
- Jorgensen, R. (1990).** Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. *Trends Biotechnol* 8, 340-344.
- Karlas, A., Kurth, R., and Denner, J. (2004).** Inhibition of porcine endogenous retroviruses by RNA interference: increasing the safety of xenotransplantation. *Virology* 325, 18-23.
- Kazazian, H. H., Jr. (2004).** Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303, 1626-1632.
- Kim, S. K. (2001).** Functional genomics: the worm scores a knockout. *Curr Biol* 11, R85-87.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001).** Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853-858.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A., and Tuschl, T. (2003).** New microRNAs from mouse and human. *Rna* 9, 175-179.
- Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., and Bartel, D. P. (2001).** An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858-862.
- Le Tissier, P., Stoye, J., Takeuchi, Y., Patience, C., and Weiss, R. (1997).** Two sets of human-tropic pig retrovirus. *Nature* 389, 681-682.
- Lee, N. S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M. J., Ehsani, A., Salvaterra, P., and Rossi, J. (2002).** Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol* 20, 500-505.

- Lee, N. S., and Rossi, J. J. (2004).** Control of HIV-1 replication by RNA interference. *Virus Res* 102, 53-58.
- Levy, J. (1993).** Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev* 57, 183-289.
- Mang, R., Maas, J., Chen, X., Goudsmit, J., and van Der Kuyl, A. (2001).** Identification of a novel type C porcine endogenous retrovirus: evidence that copy number of endogenous retroviruses increases during host inbreeding. *J Gen Virol* 82(Pt8), 1829-1834.
- Marcus, P. I. (1983).** Interferon induction by viruses: one molecule of dsRNA as the threshold for interferon induction. *Interferon* 5, 115-180.
- Martinez, M. A., Gutierrez, A., Armand-Ugon, M., Blanco, J., Parera, M., Gomez, J., Clotet, B., and Este, J. A. (2002).** Suppression of chemokine receptor expression by RNA interference allows for inhibition of HIV-1 replication. *Aids* 16, 2385-2390.
- Matzke, M., Matzke, A. J., and Kooter, J. M. (2001).** RNA: guiding gene silencing. *Science* 293, 1080-1083.
- McCaffrey, A. P., Nakai, H., Pandey, K., Huang, Z., Salazar, F. H., Xu, H., Wieland, S. F., Marion, P. L., and Kay, M. A. (2003).** Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol* 21, 639-644.
- Miyagawa, S., Shirakura, R., Izutani, H., Matsumiya, G., Nakata, S., Matsuda, H., Iwata, K., Nagasawa, S., Terado, A., Matsumoto, M., and et al. (1994).** Effect of transfectant molecules, MCP, DAF, and MCP/DAF hybrid on xenogeneic vascular endothelium. *Transplant Proc* 26, 1253-1254.
- Miyoshi, H., Blomer, U., Takahashi, M., Gage, F. H., and Verma, I. M. (1998).** Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* 72, 8150-8157.
- Mocroft, A., Devereux, H., Kinloch-de-Loes, S., Wilson, D., Madge, S., Youle, M., Tyrer, M., Loveday, C., Phillips, A. N., and Johnson, M. A. (2000).** Immunological, virological and clinical response to highly active antiretroviral therapy treatment regimens in a complete clinic population. Royal Free Centre for HIV Medicine. *Aids* 14, 1545-1552.
- Myslinski, E., Ame, J. C., Krol, A., and Carbon, P. (2001).** An unusually compact external promoter for RNA polymerase III transcription of the human H1RNA gene. *Nucleic Acids Res* 29, 2502-2509.
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., and Trono, D. (1996).** In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-267.
- Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K., and Ullu, E. (1998).** Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14687-14692.
- Novina, C. D., Murray, M. F., Dykxhoorn, D. M., Beresford, P. J., Riess, J., Lee, S. K., Collman, R. G., Lieberman, J., Shankar, P., and Sharp, P. A. (2002).** siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med* 8, 681-686.

- Oldmixon, B. A., Wood, J. C., Ericsson, T. A., Wilson, C. A., White-Scharf, M. E., Andersson, G., Greenstein, J. L., Schuurman, H. J., and Patience, C. (2002).** Porcine endogenous retrovirus transmission characteristics of an inbred herd of miniature swine. *J Virol* *76*, 3045-3048.
- Paddison, P. J., Caudy, A. A., and Hannon, G. J. (2002).** Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 1443-1448.
- Parrish, S., Fleenor, J., Xu, S., Mello, C., and Fire, A. (2000).** Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol Cell* *6*, 1077-1087.
- Patience, C., and Greenstein, J. (2001).** PERV clarification. *Nat Biotechnol* *19*, 508.
- Patience, C., Takeuchi, Y., and Weiss, R. (1997).** Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med* *3*, 282-286.
- Phelps, C. J., Koike, C., Vaught, T. D., Boone, J., Wells, K. D., Chen, S. H., Ball, S., Specht, S. M., Polejaeva, I. A., Monahan, J. A., *et al.* (2003).** Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* *299*, 411-414.
- Qari, S. H., Magre, S., Garcia-Lerma, J. G., Hussain, A. I., Takeuchi, Y., Patience, C., Weiss, R. A., and Heneine, W. (2001).** Susceptibility of the porcine endogenous retrovirus to reverse transcriptase and protease inhibitors. *J Virol* *75*, 1048-1053.
- Reiser, J. (2000).** Production and concentration of pseudotyped HIV-1-based gene transfer vectors. *Gene Ther* *7*, 910-913.
- Reiser, J., Harmison, G., Kluepfel-Stahl, S., Brady, R. O., Karlsson, S., and Schubert, M. (1996).** Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 15266-15271.
- Rhee, S. S., and Hunter, E. (1990).** Structural role of the matrix protein of type D retroviruses in gag polyprotein stability and capsid assembly. *J Virol* *64*, 4383-4389.
- Richman, D. D. (1996).** New strategies to combat HIV drug resistance. *Hosp Pract (Off Ed)* *31*, 47-50, 53-48.
- Ruiz, M. T., Voinnet, O., and Baulcombe, D. C. (1998).** Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* *10*, 937-946.
- Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C. M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., *et al.* (1996).** Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* *382*, 722-725.
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P. D. (2003).** Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* *115*, 199-208.
- Sharp, P. A. (2001).** RNA interference--2001. *Genes Dev* *15*, 485-490.
- Sommerfelt, M. A. (1999).** Retrovirus receptors. *J Gen Virol* *80 (Pt 12)*, 3049-3064.

Song, E., Lee, S. K., Dykxhoorn, D. M., Novina, C., Zhang, D., Crawford, K., Cerny, J., Sharp, P. A., Lieberman, J., Manjunath, N., and Shankar, P. (2003). Sustained small interfering RNA-mediated human immunodeficiency virus type 1 inhibition in primary macrophages. *J Virol* 77, 7174-7181.

Specke, V., Plesker, R., Coulibaly, C., Boller, K., and Denner, J. (2002a). Productive infection of a mink cell line with porcine endogenous retroviruses (PERVs) but lack of transmission to minks in vivo. *Arch Virol* 147, 305-319.

Specke, V., Rubant, S., and Denner, J. (2001). Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses. *Virology* 285, 177-180.

Specke, V., Schuurman, H., Plesker, R., Coulibaly, C., Oezel, M., Kurth, R., and Denner, J. (2002b). Porcine Endogenous Retroviruses (PERVs) as a Risk in Xenotransplantation? First Exploratory in vivo Studies in Non-Human Primates. Jahres-tagung, Gesellschaft für Virologie, Erlangen 08 - 11042002, 364 (2002).

Specke, V., Schuurman, H. J., Plesker, R., Coulibaly, C., Ozel, M., Langford, G., Kurth, R., and Denner, J. (2002c). Virus safety in xenotransplantation: first exploratory in vivo studies in small laboratory animals and non-human primates. *Transpl Immunol* 9, 281-288.

Stephan, O., Schwendemann, J., Specke, V., Tacke, J., Boller, K., and Denner, J. (2001). Porcine endogenous retroviruses (PERVs): Generation of specific antibodies, development of an immunoperoxidase assay (IPA) and inhibition by AZT. *Xenotransplantation* 8, 310-316.

Swindle, M. M. (1998). Defining appropriate health status and management programs for specific-pathogen-free swine for xenotransplantation. *Ann N Y Acad Sci* 862, 111-120.

Tacke, S., Bodusch, K., Berg, A., and Denner, J. (2001). Sensitive and specific immunological detection methods for porcine endogenous retroviruses applicable to experimental and clinical xenotransplantation. *Xenotransplantation* 8, 125-135.

Tacke, S., Specke, V., and Denner, J. (2003). Differences in release and determination of subtype of porcine endogenous retroviruses (PERV) produced by stimulated normal pig blood cells. *Intervirology* 46, 17-24.

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

Tucker, A., Belcher, C., Moloo, B., Bell, J., Mazzulli, T., Humar, A., Hughes, A., McArdle, P., and Talbot, A. (2002). The production of transgenic pigs for potential use in clinical xenotransplantation: microbiological evaluation. *Xenotransplantation* 9, 191-202.

Turner, B. G., and Summers, M. F. (1999). Structural biology of HIV. *J Mol Biol* 285, 1-32.

Ui-Tei, K., Nagano, M., Sato, S., and Miyata, Y. (2000). Calmodulin-dependent and -independent apoptosis in cell of a *Drosophila* neuronal cell line. *Apoptosis* 5, 133-140.

- van der Laan, L. J., Lockey, C., Griffeth, B. C., Frasier, F. S., Wilson, C. A., Onions, D. E., Hering, B. J., Long, Z., Otto, E., Torbett, B. E., and Salomon, D. R. (2000).** Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* 407, 90-94.
- Waterhouse, P. M., Wang, M. B., and Lough, T. (2001).** Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411, 834-842.
- Wilson, C. A., Wong, S., Muller, J., Davidson, C. E., Rose, T. M., and Burd, P. (1998).** Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *J Virol* 72, 3082-3087.
- Wilson, C., Wong, S., VanBrocklin, M., and Federspiel, M. (2000).** Extended analysis of the in vitro tropism of porcine endogenous retrovirus. *J Virol* 74, 49-56.
- Wilson, J. A., Jayasena, S., Khvorova, A., Sabatinos, S., Rodrigue-Gervais, I. G., Arya, S., Sarangi, F., Harris-Brandts, M., Beaulieu, S., and Richardson, C. D. (2003).** RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2783-2788.
- Winer, J., Jung, C. K., Shackel, I., and Williams, P. M. (1999).** Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem* 270, 41-49.
- Wong, J. K., Gunthard, H. F., Havlir, D. V., Zhang, Z. Q., Haase, A. T., Ignacio, C. C., Kwok, S., Emini, E., and Richman, D. D. (1997).** Reduction of HIV-1 in blood and lymph nodes following potent antiretroviral therapy and the virologic correlates of treatment failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12574-12579.
- Wood, J. C., Quinn, G., Suling, K. M., Oldmixon, B. A., Van Tine, B. A., Cina, R., Arn, S., Huang, C. A., Scobie, L., Onions, D. E., *et al.* (2004).** Identification of exogenous forms of human-tropic porcine endogenous retrovirus in miniature Swine. *J Virol* 78, 2494-2501.
- Woods, W., Papas, T., Hirumi, H., and Chirigos, M. (1973).** Antigenic and Biochemical Characterization of the C-type Particle of the Stable Porcine Kidney Cell Line PK-15. *J of Virology* 12, 1184-1186.
- Yokota, T., Sakamoto, N., Enomoto, N., Tanabe, Y., Miyagishi, M., Maekawa, S., Yi, L., Kurosaki, M., Taira, K., Watanabe, M., and Mizusawa, H. (2003).** Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep* 4, 602-608.
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., and Bartel, D. P. (2000).** RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33.
- Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., and Trono, D. (1998).** Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 72, 9873-9880

7 Anhang

I. Primersequenzen (Sigma-Genosys, Steinheim, D)

PCR-Primer

<i>Primer</i>	<i>Primer Sequenz</i>	<i>Annealing Temperatur</i>
PERV Nachweis		60°C
envA-up	5'-tggaaagattggcaacagcg-3'	
envA-down	5'-agtgatgtaggctcagtgg-3'	
pcDNA3.1(+) Plasmid-Nachweis		58°C
T7-forward	5'-taatacgactcactataggg-3'	
LTR26	5'-acgcacaagacaaagacacacgaa-3'	
pCR®-XL-TOPO® Plasmid-Nachweis		58°C
T7-forward	5'-taatacgactcactataggg-3'	
LTR-repeat-down	5'-agtgtggagtcgggacagct-3'	
PERV-XL2 gag/pol		58°C
LTR-34	5'-aaaggatgaaaatgcaacctaacc-3'	
gp70-blunt-up	5'-aatgcatcccacgttaagcc-3'	
PERV-CMV-gag/pol		58°C
LTR-R- <i>SpeI</i> -up	5'-aattactagtgcgtggtgtacgactgtggg-3'	
gp70-blunt-down	5'-tcttttggccgattatatct-3'	
PERV-XL2/CMV-env		56°C
gp70-mid- <i>SacI</i> -up	5'-aactgagctcgatgggaattggaaatggcc-3'	
LTR-3- <i>KpnI</i> -down	5'-tctcggtagcagtgcaaacagcaaggat-3'	
LTR-repeats		60°C
LTR-repeat-up	5'-tcttggtgacaacatgtctc-3'	
LTR-repeat-down	5'-agtgtggagtcgggacagct-3'	
Volllängen mRNA		55°C
vor-SD-up	5'-tgctgtttgcatcaagaccgc-3'	
hinter-SD-down	5'-acagacactcagaacagagac-3'	
env-mRNA		55°C
vor-SD-up	5'-tgctgtttgcatcaagaccgc-3'	
hinter-SA-down	5'-atggaggcgaagcttaagggga-3'	

Primer für die Mutagenese-PCR

<i>Primer</i>	<i>Primer Sequenz</i>	<i>Annealing Temperatur</i>
1. Mutagenese-PCR		55°C
Stop-außen-up	5'-gatgcctttctgcctgag-3'	
Stop-antisense	5'-cagacaattccagcagtagtgccttcgtgccttCtaag-cagtcctgtttggaggctcccgccagaagcag-3'	
Stop-sense	5'-ctgcttctggcgggagccaccaaacaggactgct-taGaaggcacgaaggcactactgctggaattgtctg-3'	55°C
Stop-außen-down	5'-gcaggatttccttcccatct-3'	
2. Mutagenese-PCR		55°C
SEQ2	5'-cactagccaaccacttttg-3'	
Stop-innen-down	5'-gaggtatagcaggtcccttcc-3'	

Primer zum Nachweis der PERV-Expression aus cDNA in der Real-time-PCR

<i>Primer</i>	<i>Primer Sequenz</i>	<i>Annealing Temperatur</i>
PERV-mRNA		55°C
pol3-4-5-for	5'-tcaggatgggtagaggctta-3'	
pol-3-4-5-rev	5'-gtaagggtctctttaatgg-3'	
porcines-GAPDH		55°C
porGAPDH-up	5'-ctgccccttctgctgatg-3'	
porGAPDH-down	5'-tccacgatgccgaagttgctc-3'	

Primer zum Nachweis der HIV-1-Expression aus cDNA in der Real-time-PCR

<i>Primer</i>	<i>Primer Sequenz</i>	<i>Annealing Temperatur</i>
HIV-gag-mRNA		58°C
HIV-gag-for	5'-tggcaaagaagggcacatag-3'	
HIV-gag-rev	5'-tccatctcctggcaaattc-3'	
HIV-rev-mRNA		58°C
HIV-rev-for	5'-gataaatgggcaagtttgtgg-3'	
HIV-rev-rev	5'-gtctctcaagcggtagc-3'	
humanes-GAPDH		58°C
humGAPDH-up	5'-cgatgctggcgtgagta-3'	
humGAPDH-down	5'-tggtcacacccatgacga-3'	

II. Weitere Primer**Sequenzierung des PERV Genoms**

1. T7-forward
5'-taatacgactcactataggg-3'
2. vor-SD-up
5'-tctgttgcataagaccgc-3'
3. PK-29
5'-atcagcagacgtgctaggaggatc-3'
4. gag-1
5'-tcagggtcataattgtc-3'
5. SEQ1956
5'-tgaagggaaaagcaatacgg-3'
6. PK1
5'-ttgacttgggagtgaggacgggtaac-3'
7. pol-up
5'-tcaggatgggtagaggctta-3'
8. vor-SA-up
5'-atattggatagctctcctgc-3'

9. envA-for
5'-ttgaaagattggcaacagcg-3'
- 10.SEQ-2
5'-cactagccaaccacttttg-3'
- 11.SEQ-3
5'-gacagcaggtatgccttg-3'
- 12.SEQ-4
5'-ctggattaacccttggtt-3'
- 13.Stop-außen-up
5'-gatgcctttctgcctgag-3'
- 14.PERVB-pol3-up
5'-agatacatcgtctcaccac-3'
- 15.gag-real-down
5'-tgatggccatccaacatcga-3'
- 16.gag1-down
5'-taatgtcgcgatctcgtctg-3'
- 17.gag4-*Mlu*I-down
5'-ataacgcgtcaatcatccaagtaggctg-3'
- 18.gag2-*Mlu*I-down
5'-ataacgcgttacgtttctcctttcc-3'
- 19.PK6
5'-gagggtcacctgagggtgttgat-3'
- 20.pol-down
5'-gtaagggtctctttaatgg-3'
- 21.hinter-SA-down
5'-atggaggcgaagcttaagggga-3'
- 22.gp70-blunt-down
5'-tcttttggccgattatatct-3'
- 23.gp70-mid-*Pst*I-up
5'-cccaactgcagtgagttctattctgaggcg-3'
- 24.PK28-*Spe*I
5'-aaatatactagtccacgcaggggtagaggactgcgg-3'

25.LTR26

5'-acgcacaagacaaagacacacgaa-3'

26.envA-down

5'-agtgatgtaggctcagtgg-3'

27.stop-innen-down

5'-gaggtatagcaggtcccttc-3'

28.stop-außen-down

5'-gcaggatttccttccatct-3'

Sequenzierung der Oligos in den pSUPER.gfp/neo- und pLVTHM-Vektoren

• H1-Primer

5'-gtgtcactaggcggaacac-3'

III. Sequenzen zur shRNA-Expression

Sequenzen für pSUPER.gfp/neo

gag-o

gatccccGATTGTACTGAGAGACAGGttcaagagaCCTGTCTCTCAGTA-
CAATCtttttgaaat

gag-m

gatccccGATTGTACTGAGAGACAGTttcaagagaCCTGTCTCTCAGTA-
CAATCtttttgaaat

rev-o

gatccccGCCTGTGCCTCTTCAGCTACctcaagagaGGTAGCTGAAGAGGCA-
CAGGcttttgaaa

rev-m

gatccccGCCTGTGCCTCTTCAGCTACAttcaagagaGGTAGCTGAAGAGGCA-
CAGGcttttgaaa

Die Anti-*rev*-Konstrukte wurden in den pLVTHM Vektor umkloniert. Dazu wurde mit EcoRI und ClaI gesamte Expressionskassette mit dem H1 Promotor aus dem pSUPER-Vektor ausgeschnitten und in den pLVTHM ligiert. Die eingebauten Fehlpaarungen am 3'-Ende des Sense-Stranges sind **fett** markiert.

Sequenzen für pLVTHM

tat-o

cgcgtccccCTGCTTGTACCAATTGCTAttcaagagaTAGCAATTGGTACAAG-
CAGtttttgaaat

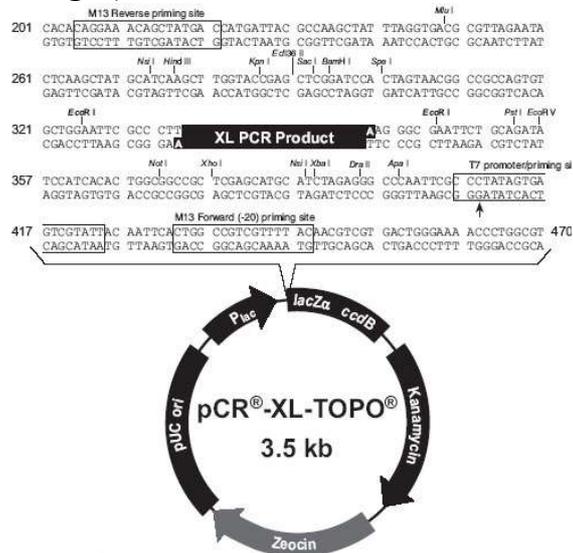
tat-m

cgcgtccccCTGCTTGTACCAATTGCTCttcaagagaTAGCAATTGGTACAAG-
CAGtttttgaaat

Zu jeder Sequenz wurde noch ein revers-komplementäres Antisense-Oligo bestellt. Die eingebaute Fehlpaarung am 3'-Ende des Sense-Stranges ist **fett** markiert.

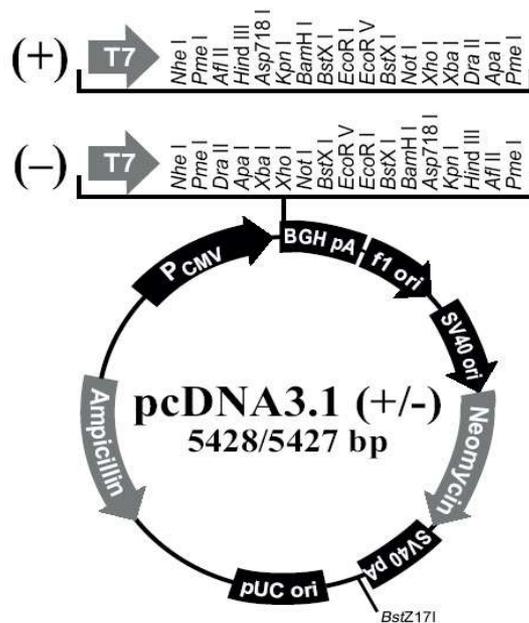
IV.Plasmide

pCR®-XL-TOPO® (Invitrogen)



Das PERV-Genom wurde gegen den Uhrzeigersinn in die TA-Cloning-Site ligiert. Das zweite Fragment wurde über die KpnI Schnittstellen im Plasmid an Position 286 sowie im PERV-Genom in den Vektor ligiert.

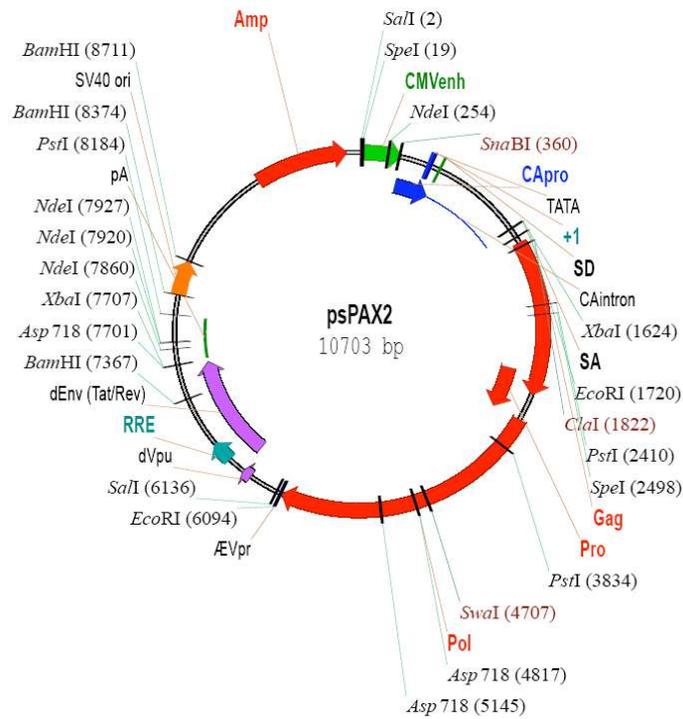
pcDNA3.1(+) (Invitrogen)



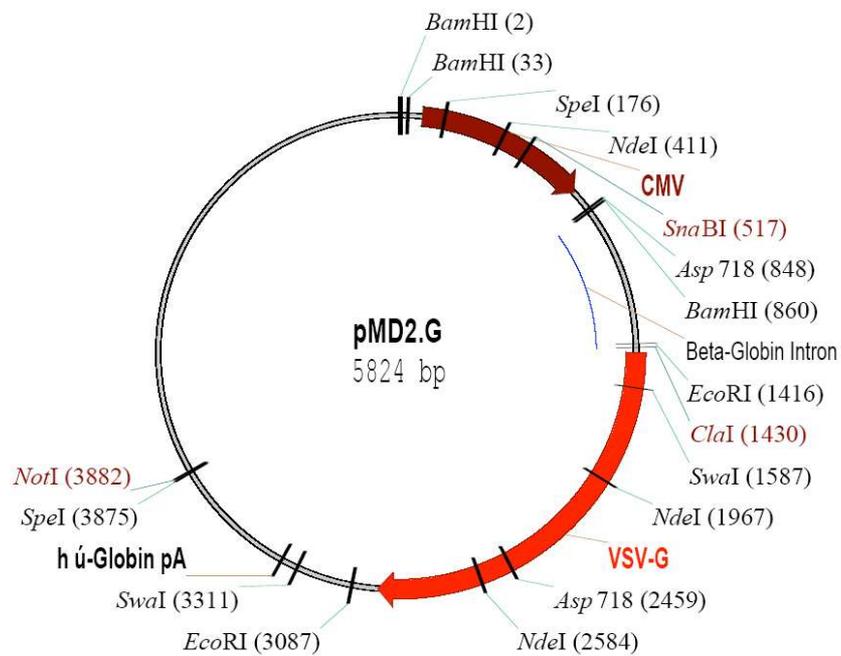
Die Neomycin-Resistenz wurde mit *NotI* und *BstZ17I* entfernt.

Verpackungsplasmide (Tronolab):

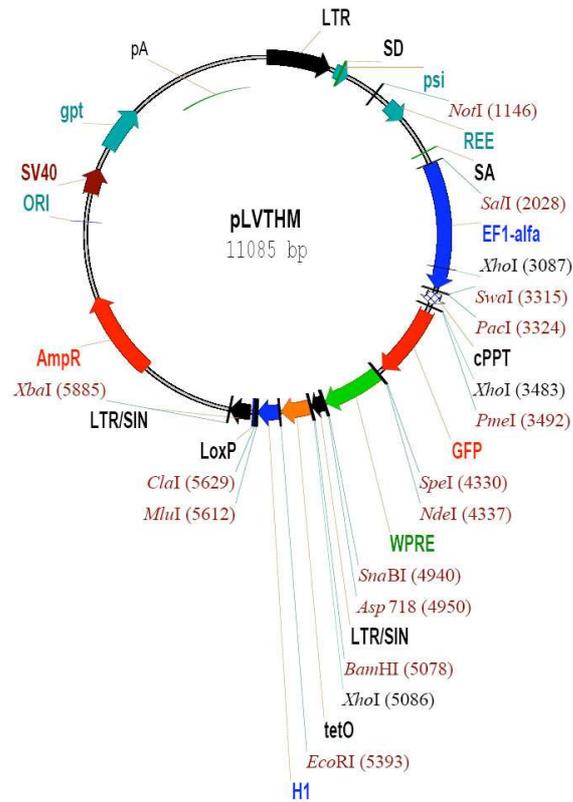
psPAX: Expression von Gag, Pol, Tat/Rev



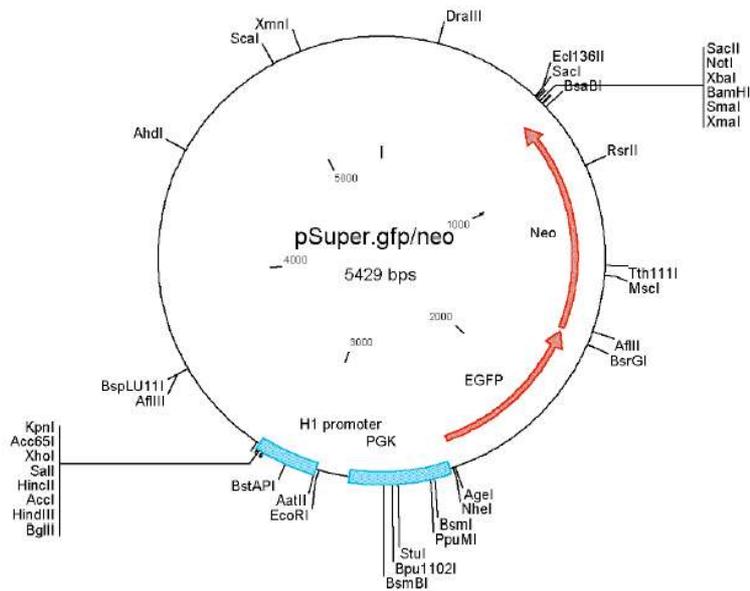
pMD2G: VSVG-Protein für die Virushülle



Transfervektor pLVTHM (Tronolab):



pSUPER.gfp/neo (Oligoengine)



	T - - - T A T T T T - A A A T G A T T G G T T T G T - A - G C - C - G G C T T T	Majority
	330 340 350 360	
321	. C G A A G . C . . A . A	PERV-A
1	-----	PERV_MSL
134	. - - G G A . A . . G . G	PERV_XL2
1	-----	PERV_CMV
	G T T G T G A A C C C C A T A A A A G C T G T C C C G A - T C C - C A C T C G G	Majority
	370 380 390 400	
361 T G	PERV-A
1	-----	PERV_MSL
172 C A	PERV_XL2
1	-----	PERV_CMV
	G G C C G C - - - A G T C C T C T A C - C C T G C G T G G T G T A C G A C T G T	Majority
	410 420 430 440	
401 C G C C	PERV-A
1	-----	PERV_MSL
212 T	PERV_XL2
1	-----	PERV_CMV
	G G G C C C C A G C G C G C T T G G A A T A A A A A T C C T C T T G C T G T T T	Majority
	450 460 470 480	
441	PERV-A
18	PERV_MSL
249	PERV_XL2
18	PERV_CMV
	G C A T C A A G A C C G C T T C T C G T G A G T G A T T A A G G G G A G T C G C	Majority
	490 500 510 520	
481 T T T	PERV-A
58	PERV_MSL
289	PERV_XL2
58	PERV_CMV
	C T T T T C C G A G C C T G G A G G T - - - - - T C T T T T T G C T G G	Majority
	530 540 550 560	
520	. . C C . . . C . A G G G G G A T T G . T C A	PERV-A
98	PERV_MSL
329 A	PERV_XL2
98 A	PERV_CMV
	T C T T A C A T T T G G G G C T C G T C C G G G A T C T G T C G C G G C C A C	Majority
	570 580 590 600	
560	C . . . T T . C A . T . G A A . C C T . . . A	PERV-A
129	PERV_MSL
360	PERV_XL2
129	PERV_CMV
	C C C T A A C A C C C G A G A A C C G A C T T G G A G G T A A A A G G A T C C	Majority
	610 620 630 640	
600 T G	PERV-A
169	PERV_MSL
400	PERV_XL2
169	PERV_CMV

	T C T T T T T A A C G T G T A T G C A T G T A C C G G C C G G C G T C T C T G T	Majority
	650 660 670 680	
639	C G G G G T	PERV-A
209	PERV_MSL
440	PERV_XL2
209	PERV_CMV
	T C T G A G T G T C T G T T T T C A G T G G T G C G C G C T T T C G G T T T G C	Majority
	690 700 710 720	
677 G A	PERV-A
249	PERV_MSL
480	PERV_XL2
249	PERV_CMV
	A G C T G T C C T C T C A G A C C G T A A G G A C T G G G G A C T G T G A T C	Majority
	730 740 750 760	
717 A	PERV-A
289 G G	PERV_MSL
520	PERV_XL2
289	PERV_CMV
	A G C A G A C G T G C T A G G A G G A T C A C A G G C T G C C A C C C T G G G G	Majority
	770 780 790 800	
757	PERV-A
329 T G	PERV_MSL
560	PERV_XL2
329	PERV_CMV
	G A C G C C C C G G G A G G T G G G A G A G C C A G G G A C G C C T G G T G G	Majority
	810 820 830 840	
797	PERV-A
369 A	PERV_MSL
600	PERV_XL2
369 A	PERV_CMV
	T C T C C T T C T G T C G G T C A G A G G A C C G A G T T C T G T T G T G A A	Majority
	850 860 870 880	
837 A	PERV-A
409 A A C	PERV_MSL
640	PERV_XL2
409	PERV_CMV
	G C G A A A G C T T C C C C T C C G C G G C C G T C C G A C T C T T T G C C	Majority
	890 900 910 920	
877	PERV-A
449 A	PERV_MSL
680	PERV_XL2
449	PERV_CMV
	T G C T T G T G G A A G A C G C G G A C G G G T C G C G T G T G T C T G G A T C	Majority
	930 940 950 960	
917	PERV-A
489 T A	PERV_MSL
720	PERV_XL2
489	PERV_CMV

	T G T T G G T T T C T G T T T T G T G T G T C T T T G T C T T G T G C G T C C T	Majority
	970 980 990 1000	
957 C	PERV-A
529 T	PERV_MSL
760	PERV_XL2
529	PERV_CMV
	T G T C T A C A G T T T T A A T A T G G G A C A G A C G G T G A C G A C C C C T	Majority
	1010 1020 1030 1040	
997 A T C	PERV-A
569	PERV_MSL
800	PERV_XL2
569	PERV_CMV
	C T T A G T T T G A C T C T C G A C C A T T G G A C T G A A G T T A A A T C C A	Majority
	1050 1060 1070 1080	
1037 G	PERV-A
609	PERV_MSL
840	PERV_XL2
609	PERV_CMV
	G G G C T C A T A A T T T G T C A G T T C A G G T T A A G A A G G G A C C T T G	Majority
	1090 1100 1110 1120	
1077	PERV-A
649	PERV_MSL
880	PERV_XL2
649	PERV_CMV
	G C A G A C T T T C T G T G T C T C T G A A T G G C C G A C A T T C G A T G T T	Majority
	1130 1140 1150 1160	
1117 C A	PERV-A
689	PERV_MSL
920	PERV_XL2
689	PERV_CMV
	G G A T G G C C A T C A G A G G G G A C C T T T A A T T C T G A G A T T A T C C	Majority
	1170 1180 1190 1200	
1157 A	PERV-A
729	PERV_MSL
960	PERV_XL2
729	PERV_CMV
	T G G C T G T T A A A G C A A T T A T T T T T C A G A C T G G A C C C G G C T C	Majority
	1210 1220 1230 1240	
1197 G C	PERV-A
769 G	PERV_MSL
1000	PERV_XL2
769	PERV_CMV
	T C A T C C C G A T C A G G A G C C C T A T A T C C T T A C G T G G C A A G A T	Majority
	1250 1260 1270 1280	
1237 T	PERV-A
809	PERV_MSL
1040 A	PERV_XL2
809 A	PERV_CMV

	G C C C C G G T T G G G A C T A C A A C A C G G C T G A A G G T A G G G A G A G	Majority
	1930 1940 1950 1960	
1917	PERV-A
1489	PERV_MSL
1720	PERV_XL2
1489	PERV_CMV
	C T T G A A A A T C T A T C G C C A G G C T C T G G T G G C G G G T C T C C G G	Majority
	1970 1980 1990 2000	
1957	PERV-A
1529	PERV_MSL
1760	PERV_XL2
1529	PERV_CMV
	G G C G C C T C A A G A C G G C C C A C T A A T T T G G C T A A G G T A A G A G	Majority
	2010 2020 2030 2040	
1997	PERV-A
1569	PERV_MSL
1800	PERV_XL2
1569	PERV_CMV
	A A G T G A T G C A G G G A C C G A A T G A A C C C C C T C T G T T T T C T	Majority
	2050 2060 2070 2080	
2037	. G C T G A	PERV-A
1609	PERV_MSL
1840	PERV_XL2
1609	PERV_CMV
	T G A G A G G C T C T T G G A A G C C T T C A G G C G G T A C A C C C C T T T T	Majority
	2090 2100 2110 2120	
2077	PERV-A
1649	PERV_MSL
1880	PERV_XL2
1649 T	PERV_CMV
	G A T C C C A C C T C A G A G G C C C A A A A G C C T C A G T G G C T T T G G	Majority
	2130 2140 2150 2160	
2117 T	PERV-A
1689	PERV_MSL
1920	PERV_XL2
1689	PERV_CMV
	C C T T T A T A G G A C A G T C A G C C T T G G A T A T T A G A A A G A A G C T	Majority
	2170 2180 2190 2200	
2157 C . . . T . . . G G T C C G A	PERV-A
1729	PERV_MSL
1960	PERV_XL2
1729	PERV_CMV
	T C A G A G A C T G G A A G G T T A C A G G A G G C T G A G T T A C G T G A T	Majority
	2210 2220 2230 2240	
2197	PERV-A
1769	PERV_MSL
2000 A	PERV_XL2
1769	PERV_CMV

	A T C C T A G T T C C T G T C C A A T C T C C C T G G A A T A C T C C C C T G C	Majority
	3210 3220 3230 3240	
3197 C T	PERV-A
2769	PERV_MSL
3000	PERV_XL2
2769	PERV_CMV
	T A C C G G T T A G A A A G C C T G G G A C T A A T G A C T A T C G A C C A G T	Majority
	3250 3260 3270 3280	
3237 G C T	PERV-A
2809	PERV_MSL
3040	PERV_XL2
2809	PERV_CMV
	A C A G G A C T T G A G A G A G G T C A A T A A A C G G G T G C A G G A T A T A	Majority
	3290 3300 3310 3320	
3277 A C	PERV-A
2849	PERV_MSL
3080 C	PERV_XL2
2849	PERV_CMV
	C A C C C A A C A G T C C C G A A C C C T T A T A A C C T C T T G T G T G C T C	Majority
	3330 3340 3350 3360	
3317 G A . C . . . C .	PERV-A
2889	PERV_MSL
3120	PERV_XL2
2889	PERV_CMV
	T C C C A C C C A A C G G A G C T G G T A T A C A G T A T T G G A C T T A A A	Majority
	3370 3380 3390 3400	
3357 G . . T G A C	PERV-A
2929	PERV_MSL
3160	PERV_XL2
2929	PERV_CMV
	G G A T G C C T T T T T C T G C C T G A G A T T A C A C C C C A C T A G C C A A	Majority
	3410 3420 3430 3440	
3397	A C	PERV-A
2969 C	PERV_MSL
3200	PERV_XL2
2969	PERV_CMV
	C C A C T T T T T G C C T T C G A A T G G A G A G A T C C A G G T A C G G G A A	Majority
	3450 3460 3470 3480	
3437	PERV-A
3009	PERV_MSL
3240	PERV_XL2
3009	PERV_CMV
	G A A C C G G G C A G C T C A C C T G G A C C C G A C T G C C C C A A G G G T T	Majority
	3490 3500 3510 3520	
3477	PERV-A
3049	PERV_MSL
3280	PERV_XL2
3049	PERV_CMV

	C A A G A A C T C C C G A C C A T C T T T G A C G A A G C C C T A C A C A G A	Majority
	3530 3540 3550 3560	
3517 G	PERV-A
3089	PERV_MSL
3320 T	PERV_XL2
3089	PERV_CMV
	G A C C T G G C C A A C T T C A G G A T C C A A C A C C C T C A G G T G A C C C	Majority
	3570 3580 3590 3600	
3557	PERV-A
3129	PERV_MSL
3360	PERV_XL2
3129	PERV_CMV
	T C C T C C A G T A C G T G G A T G A C C T G C T T C T G G C G G G A G C C A C	Majority
	3610 3620 3630 3640	
3597	PERV-A
3169	PERV_MSL
3400	PERV_XL2
3169	PERV_CMV
	C A A A C A G G A C T G C T T A G A A G G C A C G A A G G C A C T A C T G C T G	Majority
	3650 3660 3670 3680	
3637 T	PERV-A
3209	PERV_MSL
3440 T	PERV_XL2
3209 T	PERV_CMV
	G A A T T G T C T G A C C T A G G C T A C A G A G C C T C T G C T A A G A A G G	Majority
	3690 3700 3710 3720	
3677	PERV-A
3249	PERV_MSL
3480	PERV_XL2
3249	PERV_CMV
	C C C A G A T T T G C A G G A G A G G T A A C A T A C T T G G G G T A C A G	Majority
	3730 3740 3750 3760	
3717	PERV-A
3289	PERV_MSL
3520	PERV_XL2
3289	PERV_CMV
	T T T G C G G G A C G G G C A G C G A T G G C T G A C G G A G G C A C G G A A G	Majority
	3770 3780 3790 3800	
3757 G	PERV-A
3329 A	PERV_MSL
3560	PERV_XL2
3329	PERV_CMV
	A A A A C T G T A G T C C A G A T A C C G G C C C A A C C A C A G C C A A A C	Majority
	3810 3820 3830 3840	
3797	PERV-A
3369	PERV_MSL
3600	PERV_XL2
3369	PERV_CMV

	A A G T G A G A G A G T T T T T G G G A C A G C T G G A T T T T G C A G A C T	Majority
	3850 3860 3870 3880	
3837	PERV-A
3409	. . A	PERV_MSL
3640	PERV_XL2
3409	PERV_CMV
	G T G G A T C C C G G G G T T T G C G A C C T T A G C A G C C C C A C T C T A C	Majority
	3890 3900 3910 3920	
3877	PERV-A
3449	PERV_MSL
3680	PERV_XL2
3449	PERV_CMV
	C C G C T A A C C A A A G A A A A G G G A A T T C T C C T G G G C T C C T G	Majority
	3930 3940 3950 3960	
3917 G	PERV-A
3489	PERV_MSL
3720	. . A	PERV_XL2
3489	. . A	PERV_CMV
	A G C A C C A G A A G G C A T T T G A T G C T A T C A A A A G G C C C T G C T	Majority
	3970 3980 3990 4000	
3957	PERV-A
3529	PERV_MSL
3760	PERV_XL2
3529	PERV_CMV
	G A G C G C A C C T G C T C T G G C C C T C C C T G A C G T A A C T A A A C C C	Majority
	4010 4020 4030 4040	
3997	PERV-A
3569	PERV_MSL
3800	PERV_XL2
3569	PERV_CMV
	T T T A C C C T T T A T G T G G A T G A G C G T A A G G G A G T A G C C C G G G	Majority
	4050 4060 4070 4080	
4037	PERV-A
3609	PERV_MSL
3840	PERV_XL2
3609	PERV_CMV
	G A G T T T T A A C C C A A A C C C T A G G A C C A T G G A G G A G A C C T G T	Majority
	4090 4100 4110 4120	
4077	PERV-A
3649	PERV_MSL
3880 T	PERV_XL2
3649	PERV_CMV
	T G C C T A C C T G T C A A A G A A G C T C G A T C C T G T A G C C A G T G G T	Majority
	4130 4140 4150 4160	
4117 T	PERV-A
3689	C	PERV_MSL
3920	PERV_XL2
3689	PERV_CMV

	T G G C C C G T A T G C C T G A A G G C T A T C G C A G C T G T G G C C A T A C	Majority
	4170 4180 4190 4200	
4157 T	PERV-A
3729 A	PERV_MSL
3960	PERV_XL2
3729	PERV_CMV
	T G G T C A A G G A C G C T G A C A A A T T G A C T T T G G G A C A G A A T A T	Majority
	4210 4220 4230 4240	
4197	PERV-A
3769	PERV_MSL
4000	PERV_XL2
3769	PERV_CMV
	A A C T G T A A T A G C C C C C C A T G C G T T G G A G A A C A T C G T T C G G	Majority
	4250 4260 4270 4280	
4237 A	PERV-A
3809 A	PERV_MSL
4040	PERV_XL2
3809	PERV_CMV
	C A G C C C C A G A C C G A T G G A T G A C C A A C G C C C G C A T G A C C C	Majority
	4290 4300 4310 4320	
4277	PERV-A
3849	PERV_MSL
4080	PERV_XL2
3849	PERV_CMV
	A C T A T C A A A G C C T G C T T C T C A C A G A G A G G G T C A C G T T C G C	Majority
	4330 4340 4350 4360	
4317 T	PERV-A
3889	PERV_MSL
4120	PERV_XL2
3889	PERV_CMV
	T C C A C C A G C C G C T C T C A A C C C T G C C A C T C T T C T G C C T G A A	Majority
	4370 4380 4390 4400	
4357	PERV-A
3929	PERV_MSL
4160	PERV_XL2
3929	PERV_CMV
	G A G A C T G A T G A A C C A G T G A C T C A T G A T T G C C A T C A A C T A T	Majority
	4410 4420 4430 4440	
4397	PERV-A
3969	PERV_MSL
4200	PERV_XL2
3969	PERV_CMV
	T G A T T G A G G A G A C T G G G T C C G C A A G G A C C T T A C A G A C A T	Majority
	4450 4460 4470 4480	
4437	PERV-A
4009	PERV_MSL
4240	PERV_XL2
4009	PERV_CMV

	A C C G C T G A C T G G A G A A G T G T T A A C C T G G T T C A C T G A C G G A	Majority
	4490 4500 4510 4520	
4477 C	PERV-A
4049 C	PERV_MSL
4280	PERV_XL2
4049	PERV_CMV
	A G C A G C T A T G T G G T G G A A G G T A A G A G G A T G G C T G G G C G G	Majority
	4530 4540 4550 4560	
4517	PERV-A
4089	PERV_MSL
4320	PERV_XL2
4089	PERV_CMV
	C G G T G G T G G A C G G G A C C C G C A C G A T C T G G G C C A G C A G C C T	Majority
	4570 4580 4590 4600	
4557	. A	PERV-A
4129	PERV_MSL
4360	PERV_XL2
4129	PERV_CMV
	G C C G G A A G G A A C T T C A G C A C A A A A G G C T G A G C T C A T G G C C	Majority
	4610 4620 4630 4640	
4597 G	PERV-A
4169 G	PERV_MSL
4400	PERV_XL2
4169	PERV_CMV
	C T C A C G C A A G C T T T G C G G C T G G C C G A A G G G A A A T C C A T A A	Majority
	4650 4660 4670 4680	
4637	PERV-A
4209	PERV_MSL
4440	PERV_XL2
4209	PERV_CMV
	A C A T T T A T A C G G A C A G C A G G T A T G C C T T T G C G A C T G C A C A	Majority
	4690 4700 4710 4720	
4677	PERV-A
4249	PERV_MSL
4480 A	PERV_XL2
4249 A	PERV_CMV
	C G T A C A C G G G G C C A T C T A T A A G C A A A G G G G T G C T T A C C	Majority
	4730 4740 4750 4760	
4717 A	PERV-A
4289 T A	PERV_MSL
4520	PERV_XL2
4289	PERV_CMV
	T C A G C A G G G A G G G A A A T A A A G A A C A A A G A G G A A A T T C T A A	Majority
	4770 4780 4790 4800	
4757	PERV-A
4329	PERV_MSL
4560	PERV_XL2
4329	PERV_CMV

	G C C T A T T A G A A G C C T T A C A T T T G C C A A A A G G C T A G C T A T	Majority
	4810 4820 4830 4840	
4797	PERV-A
4369 G	PERV_MSL
4600	PERV_XL2
4369	PERV_CMV
	T A T A C A C T G T C C T G G A C A T C A G A A A G C C A A A G A T C T C A T A	Majority
	4850 4860 4870 4880	
4837	PERV-A
4409 T	PERV_MSL
4640	PERV_XL2
4409 C	PERV_CMV
	T C C A G A G G G A A C C A G A T G G C T G A C C G G G T T G C C A A G C A G G	Majority
	4890 4900 4910 4920	
4877	.. T	PERV-A
4449 A	PERV_MSL
4680	PERV_XL2
4449	PERV_CMV
	C A G C C C A G G G T G T T A A C C T T C T G C C T A T G A T A G A A A C G C C	Majority
	4930 4940 4950 4960	
4917 C	PERV-A
4489	PERV_MSL
4720	PERV_XL2
4489	PERV_CMV
	C A A A G C C C A G A A C C C G G A C G A C A G T A C A C C C T A G A A G A C	Majority
	4970 4980 4990 5000	
4957	PERV-A
4529 A	PERV_MSL
4760	PERV_XL2
4529	PERV_CMV
	T G G C A A G A G A T A A A A A G A T A G A C C A G T T C T C T G A G A C T C	Majority
	5010 5020 5030 5040	
4997	PERV-A
4569	PERV_MSL
4800	PERV_XL2
4569	PERV_CMV
	C G G A A G G G A C C T G C T A T A C C T C A G A T G G G A A G G A A A T C C T	Majority
	5050 5060 5070 5080	
5037 G	PERV-A
4609	PERV_MSL
4840	PERV_XL2
4609	PERV_CMV
	G C C C A C A A A G A A G G T T A G A A T A T G T C C A A C A G A T A C A T	Majority
	5090 5100 5110 5120	
5077	PERV-A
4649	PERV_MSL
4880	PERV_XL2
4649	PERV_CMV

	C G T C T A A C C C A C C T A G G A A C T A A A C A C C T G C A G C A G T T G G	Majority
	5130 5140 5150 5160	
5117	PERV-A
4689	PERV_MSL
4920	PERV_XL2
4689	PERV_CMV
	T C A G A A C A T C T C C T T A T C A T G T T C T G A G G C T A C C A G G A G T	Majority
	5170 5180 5190 5200	
5157 C	PERV-A
4729 C	PERV_MSL
4960	PERV_XL2
4729	PERV_CMV
	G G C T G A T T C G G T G G T C A A A C A T T G T G T G C C C T G C C A G C T G	Majority
	5210 5220 5230 5240	
5197 C	PERV-A
4769 C	PERV_MSL
5000 C	PERV_XL2
4769 C	PERV_CMV
	G T T A A T G C T A A T C C T T C C A G A A T A C C T C C A G G A A A G A G A C	Majority
	5250 5260 5270 5280	
5237	PERV-A
4809 G	PERV_MSL
5040	PERV_XL2
4809	PERV_CMV
	T A A G G G A A G C C A C C C A G G C G C T C A C T G G G A A G T G G A C T T	Majority
	5290 5300 5310 5320	
5277	PERV-A
4849	PERV_MSL
5080	PERV_XL2
4849	PERV_CMV
	C A C T G A G G T A A A G C C G G C T A A A T A C G G A A A C A A A T A T C T A	Majority
	5330 5340 5350 5360	
5317	PERV-A
4889 C	PERV_MSL
5120	PERV_XL2
4889	PERV_CMV
	T T G G T T T T G T A G A C A C C T T T T C A G G A T G G G T A G A G G C T T	Majority
	5370 5380 5390 5400	
5357	PERV-A
4929	PERV_MSL
5160	PERV_XL2
4929	PERV_CMV
	A T C C T A C T A A G A A A G A G A C T T C A A C C G T G G T G G C T A A G A A	Majority
	5410 5420 5430 5440	
5397	PERV-A
4969 A	PERV_MSL
5200 C	PERV_XL2
4969	PERV_CMV

	A A T A C T G G A G G A A A T T T T T C C A A G A T T T G G A A T A C C T A A G	Majority
	5450 5460 5470 5480	
5437	PERV-A
5009 A	PERV_MSL
5240 A	PERV_XL2
5009	PERV_CMV
	G T A A T A G G G T C A G A C A A T G G T C C A G C T T T C G T T G C C C A G G	Majority
	5490 5500 5510 5520	
5477	PERV-A
5049 T	PERV_MSL
5280	PERV_XL2
5049	PERV_CMV
	T A A G T C A G G G A C T G G C C A A G A T A T T G G G A T T G A T T G G A A	Majority
	5530 5540 5550 5560	
5517	PERV-A
5089	PERV_MSL
5320	PERV_XL2
5089	PERV_CMV
	A C T G C A T T G T G C A T A C A G A C C C C A A A G C T C A G G A C A G G T A	Majority
	5570 5580 5590 5600	
5557	PERV-A
5129	PERV_MSL
5360	PERV_XL2
5129	PERV_CMV
	G A G A G G A T G A A T A G A A C C A T T A A A G A G A C C C T T A C T A A A T	Majority
	5610 5620 5630 5640	
5597 C	PERV-A
5169	PERV_MSL
5400	PERV_XL2
5169	PERV_CMV
	T G A C C G C G G A G A C T G G C G T T A A T G A T T G G A T A G C T C T C C T	Majority
	5650 5660 5670 5680	
5637 A A	PERV-A
5209 A	PERV_MSL
5440 G	PERV_XL2
5209	PERV_CMV
	G C C C T T T G T G C T T T T A G G G T T A G G A A C A C C C C T G G A C A G	Majority
	5690 5700 5710 5720	
5677 G	PERV-A
5249	PERV_MSL
5480	PERV_XL2
5249	PERV_CMV
	T T T G G G C T G A C C C C T A T G A A T T A C T C T A C G G G G A C C C C	Majority
	5730 5740 5750 5760	
5717 G	PERV-A
5289	PERV_MSL
5520 T	PERV_XL2
5289 A	PERV_CMV

	C T C C C G A T T C G G G G T G G A A A G C C G A A A A G A C T G A A A A T C C	Majority
	6090 6100 6110 6120	
6072	PERV-A	
5647	PERV_MSL	
5880	PERV_XL2	
5647	PERV_CMV	
	C C T T A A G C T T C G C C T C C A T C G C G T G G T T C C T T A C T C T G T C	Majority
	6130 6140 6150 6160	
6112	PERV-A	
5687	PERV_MSL	
5920	PERV_XL2	
5687	PERV_CMV	
	A A T A A C T T C T C A A G T T A A T G G T A A A C G C C T T G T G G A C A G C	Majority
	6170 6180 6190 6200	
6152	PERV-A	
5727	PERV_MSL	
5960	PERV_XL2	
5727	PERV_CMV	
	C C G A A C T C C C A T A A A C C C T T A T C T C T C A C C T G G T T A C T T A	Majority
	6210 6220 6230 6240	
6192	PERV-A	
5767	PERV_MSL	
6000	PERV_XL2	
5767	PERV_CMV	
	C T G A C T C C G G T A C A G G T A T T A A T A T T A A C A G C A C T C A A G G	Majority
	6250 6260 6270 6280	
6232	PERV-A	
5807	PERV_MSL	
6040	PERV_XL2	
5807	PERV_CMV	
	G G A G G C T C C C T T G G G G A C C T G G T G G C C T G A A T T A T A T G T C	Majority
	6290 6300 6310 6320	
6272	PERV-A	
5847	PERV_MSL	
6080	PERV_XL2	
5847	PERV_CMV	
	T G C C T T C G A T C A G T A A T C C C T G G T C T C A A T G A C C A G G C C A	Majority
	6330 6340 6350 6360	
6312	PERV-A	
5887	PERV_MSL	
6120	PERV_XL2	
5887	PERV_CMV	
	C A C C C C C G A T G T A C T C C G T G C T T A C G G G T T T T A C G T T T G	Majority
	6370 6380 6390 6400	
6352	PERV-A	
5918	PERV_MSL	
6160	PERV_XL2	
5927	PERV_CMV	

	G T A T G T C T T G G G G A A T A G T G T A C T A T G G A G G C T C T G G G A G	Majority
	6730 6740 6750 6760	
6712 A	PERV-A
6242 G A T G T A	PERV_MSL
6520	PERV_XL2
6287	PERV_CMV
	A A A G A A A G G A T C T G T T C T G A C T A T T C G C C T C A G A A T A G A A	Majority
	6770 6780 6790 6800	
6752	PERV-A
6282 C A C C C C A A A A	PERV_MSL
6560	PERV_XL2
6327	PERV_CMV
	A C T C A G A T G G A A C C T C C G G T T G C T A T A G G A C C A A A T A A G G	Majority
	6810 6820 6830 6840	
6792	PERV-A
6321 C C G A A G C	PERV_MSL
6600	PERV_XL2
6367	PERV_CMV
	G T T T G G C C G A A C A A G G A C C T C C A A T C C A A G A A C A G A G G C C	Majority
	6850 6860 6870 6880	
6832	PERV-A
6359 T C A G G T A C C G C A G A	PERV_MSL
6640	PERV_XL2
6407	PERV_CMV
	A T C T C C T A A C C C C T C T G A T T A C A A T A C A A C C T C T G G A T C A	Majority
	6890 6900 6910 6920	
6872	PERV-A
6399 C T	PERV_MSL
6680	PERV_XL2
6447	PERV_CMV
	G T C C C C A C T G A G C C T A A C A T C A C T A T T A A A A C A G G G G C G A	Majority
	6930 6940 6950 6960	
6912	PERV-A
6424 A T G G G C T G A	PERV_MSL
6720	PERV_XL2
6487	PERV_CMV
	A A C T T T T T A G C C T C A T C C A G G G A G C T T T T C A A G C T C T T A A	Majority
	6970 6980 6990 7000	
6952	PERV-A
6464	PERV_MSL
6760	PERV_XL2
6527	PERV_CMV
	C T C C A C G A C T C C A G A G G C T A C C T C T T C T T G T T G G C T T T G C	Majority
	7010 7020 7030 7040	
6992	PERV-A
6504	PERV_MSL
6800	PERV_XL2
6567	PERV_CMV

	T T A G C T T C G G G C C C A C C T T A C T A T G A G G G A A T G G C T A G A G	Majority
	7050 7060 7070 7080	
7032	PERV-A
6544 A	PERV_MSL
6840	PERV_XL2
6607	PERV_CMV
	G A G G G A A A T T C A A T G T G A C A A A G G A A C A T A G A G A C C A A T G	Majority
	7090 7100 7110 7120	
7072 A	PERV-A
6584 A	PERV_MSL
6880	PERV_XL2
6647	PERV_CMV
	T A C A T G G G G A T C C C A A A A T A A G C T T A C C C T T A C T G A G G T T	Majority
	7130 7140 7150 7160	
7112	PERV-A
6624	C	PERV_MSL
6920	PERV_XL2
6687	PERV_CMV
	T C T G G A A A A G G C A C C T G C A T A G G G A T G G T T C C C C A T C C C	Majority
	7170 7180 7190 7200	
7152	PERV-A
6664 A A	PERV_MSL
6960	PERV_XL2
6727	PERV_CMV
	A C C A A C A C C T T T G T A A C C A C A C T G A A G C C T T T A A T C G A A C	Majority
	7210 7220 7230 7240	
7192	PERV-A
6704 A	PERV_MSL
7000	PERV_XL2
6767	PERV_CMV
	C T C T G A G A G T C A G T A T C T G G T A C C T G G T T A T G A C A G G T G G	Majority
	7250 7260 7270 7280	
7232 A	PERV-A
6744 A	PERV_MSL
7040 G	PERV_XL2
6807 G	PERV_CMV
	T G G G C A T G T A A T A C T G G A T T A A C C C C T T G T G T T T C C A C C T	Majority
	7290 7300 7310 7320	
7272	PERV-A
6784	PERV_MSL
7080	PERV_XL2
6847	PERV_CMV
	T G G T T T T C A A C C A A A C T A A A G A C T T T T G C G T T A T G G T C C A	Majority
	7330 7340 7350 7360	
7312	PERV-A
6824 T	PERV_MSL
7120 T	PERV_XL2
6887 A	PERV_CMV

	A A T T G T C C C C G G G T G T A C T A C T A T C C C G A A A A G C A G T C	Majority
	7370 7380 7390 7400	
7352	PERV-A
6864 T A T A ..	PERV_MSL
7160	PERV_XL2
6927	PERV_CMV
	C T T G A T G A A T A T G A C T A T A G A T A T A A T C G G C C A A A A G A G	Majority
	7410 7420 7430 7440	
7392	PERV-A
6904 C A C A . A G ..	PERV_MSL
7200	PERV_XL2
6967	PERV_CMV
	A G C C C A T A T C C C T G A C A C T A G C T G T A A T G C T C G G A T T G G G	Majority
	7450 7460 7470 7480	
7432	PERV-A
6944	.. A T T G C . T ..	PERV_MSL
7240	PERV_XL2
7007	PERV_CMV
	A G T G G C T G C A G G C G T G G G A A C A G G A A C G G C T G C C C T A A T C	Majority
	7490 7500 7510 7520	
7472	PERV-A
6984 A T A A G G ..	PERV_MSL
7280	PERV_XL2
7047	PERV_CMV
	A C A G G A C C G C A A C A G C T G G A G A A A G G A C T T A G T A A C C T A C	Majority
	7530 7540 7550 7560	
7512	PERV-A
7024	.. G A . G A . A . C ..	PERV_MSL
7320	PERV_XL2
7087	PERV_CMV
	A T C G A A T T G T A A C G G A A G A T C T C C A A G C C C T A G A A A A T C	Majority
	7570 7580 7590 7600	
7552 A	PERV-A
7064 A	PERV_MSL
7360 C	PERV_XL2
7127	PERV_CMV
	T G T C A G T A A C C T G G A G G A A T C C C T A A C C T C C T T A T C T G A A	Majority
	7610 7620 7630 7640	
7592	PERV-A
7104	PERV_MSL
7400	PERV_XL2
7167	PERV_CMV
	G T G G T T C T A C A G A A C A G A A G G G G T T A G A T C T G T T A T T T C	Majority
	7650 7660 7670 7680	
7632	PERV-A
7144	.. A . C T A T . A ..	PERV_MSL
7440	PERV_XL2
7207	PERV_CMV

Danksagungen

Für die Bereitstellung der Diplomarbeit und die fachliche Unterstützung danke ich Dr. Joachim Denner und Prof. Dr. Reinhardt Kurth.

Ich danke Dr. Hans von Döhren für die externe Betreuung der Diplomarbeit.

Für die Betreuung der Arbeit und seine stetige Hilfsbereitschaft, auch in schwierigen Situationen, gilt Alexander Karlas ganz besonderer Dank.

Des Weiteren danke ich der gesamten Arbeitsgruppe P23 für ihre Unterstützung und die gute Arbeitsatmosphäre.

Für die Durchführung des p24-Capture-ELISA danke ich Dr Stephen und Nicky Norley.

Für die vielen Sequenzierungen danke ich Dr. Horst Emmel und Julia Tesch.

Ich danke auch Stephanie Neitzel für ihre Unterstützung bei verschiedenen Laborarbeiten.

Besonderen Dank gilt auch meinen Eltern für ihre finanzielle und moralische Unterstützung während der gesamten Studium.

Folgende Reagenzien wurden zur Verfügung gestellt durch das NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH:

- HIV-1-Molekularklon pNL4-3 von Dr. Malcolm Martin
- C8166-Zellen von Dr. Robert Gallo

Weitere verwendete Reagenzien, die zur Verfügung gestellt wurden:

- Lentivirales Vektorsystem von Prof. Dr. Didier Trono (Universität Genf)
- Porcine Fibroblasten von Prof. Dr. Niemann (Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Neustadt)

Die selbständige und eigenhändige Anfertigung versichere ich an Eides Statt.
Berlin, den 04.08.2004

Unterschrift