

**Expression von porcinen endogenen Retroviren in
metastasierenden Melanomen und Melanomzelllinien von
Troll Schweinen**

Diplomarbeit

im Studiengang Biotechnologie
der Technischen Fachhochschule Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades einer Diplom-Ingenieurin (FH)

vorgelegt von
Jenny Puhmann

Berlin, September 2005

Zusammensetzung der Prüfungskommission

Betreuerin und 1. Gutachterin: Prof. Dr. Gross

2. Gutachterin: Prof. Dr. Speer

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Kurth und Herrn Dr. Denner für die Aufnahme in der Arbeitsgruppe P13 bedanken. Weiterhin danke ich Herrn Dr. Denner für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie für die ständige Ansprechbarkeit und Diskussionsbereitschaft.

Frau Prof. Dr. Gross möchte ich ganz herzlich für die freundliche Betreuung und Unterstützung danken.

Weiterhin bedanke ich mich bei dem gesamten Arbeitsteam für die hilfreiche theoretische und praktische Unterstützung sowie für die stets nette und lustige Arbeitsatmosphäre.

Im Besonderen möchte ich mich bei Britta Kluge für ihre engagierte Betreuung bedanken, wodurch es mir ermöglicht wurde, ein vielseitiges Methodenspektrum zu erlernen und anzuwenden. Kristina Büscher und Stefan Langhammer haben mir auch bei fachlichen Problemen hilfreich zur Seite gestanden. Uwe Fiebig und Rayk Behrendt bleiben mir durch ihre schlagkräftigen Argumente bei Diskussionen sicher in guter Erinnerung.

Herrn Madela danke ich für seine Geduld bei der Anfertigung der Immunfluoreszenzbilder.

Mein größter Dank geht an meine Familie für ihre bedingungslose mentale und finanzielle Unterstützung während des gesamten Studiums.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
as/s	antisense/sense
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	complementary DNA
CBP	Calmodulin Bindungspeptid-Fusionsprotein
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleotide
ds	doppelsträngig
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
ECL	enhanced chemiluminescence
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionsassay
Env	retrovirales Hüllprotein (envelope)
<i>env</i>	Gen für die retroviralen Hüllproteine
FAM	6-Carboxy-Fluoreszein
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
for/rev	forward/reverse
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
Gag	retrovirales Strukturprotein (group specific antigen)
<i>gag</i>	Gen für die retroviralen Strukturproteine
GBE	Gesundheitsberichterstattung des Bundes
Gp	Glykoprotein
HEK 293	humane embryonale Nierenzelllinie
HERV	humanes endogenes Retrovirus
His-Taq	Histidin-Anhang
HRP	Meerrettich-Peroxidase (Horse Radish Peroxidase)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LTR	long terminal repeats
Lunge LT	Lungenmetastasenzelllinie (leicht trypsinierbar)
Lunge ST	Lungenmetastasenzelllinie (schwer trypsinierbar)
min	Minuten
mRNA	messenger RNA
NCBI	Datenbank, National Center for Biotechnology Information
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
o.g.	oben genannt

p15E	transmembranes Hüllprotein des porzinen endogenen Retrovirus
p27Gag	Matrixkapsidprotein des porzinen endogenen Retrovirus
PBMCs	periphere mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phospat gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PERV	porzines endogenes Retrovirus
PK15	porzine Nierenzelllinie
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase bzw. Reverse Transkription
SA	Spliceakzeptor
SD	Splicedonor
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunden
tRNA	transfer-RNA
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TM	Transmembranprotein
u.a.	unter anderem
U	Enzymeinheit (Unit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vis	visuell
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Retroviren	1
1.2 Porzine endogene Retroviren	2
1.2.1 Genomischer Aufbau der PERVs.....	2
1.2.2 PERV-Subtypen und deren Charakteristika.....	4
1.2.3 Aufbau eines PERV-Partikels.....	5
1.2.4 Biologische Bedeutung der PERVs.....	6
1.2.4.1 Xenotransplantation.....	6
1.2.4.2 Modellsystem für Tumorerkrankungen.....	7
1.3 Malignes Melanom	7
1.3.1 Malignes Melanom (Melanoblastom) und endogene Retroviren.....	7
1.3.2 Minischweine als Melanommodelle.....	8
1.3.3 Maligne Melanome beim Münchener Miniaturschwein (Troll).....	10
1.4 Zielsetzung	11
2. Materialien	12
2.1 Geräte.....	12
2.2 Chemikalien.....	12
2.3 Kommerzielle Kits.....	13
2.4 Puffer und Lösungen.....	14
2.5 Gelzusammensetzungen.....	15
2.6 Medien.....	16
2.7 Bakterienstamm.....	16
2.8 Vektoren.....	16
2.9 Enzyme.....	16
2.10 Antikörper/Antiseren.....	17
2.11 Größen- und Längenmarker.....	17
2.12 Zelllinien.....	17
2.13 Gewebeproben.....	18
3. Methoden	19
3.1 Mikrobiologische Methoden	19
3.1.1 Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> -BL21 (DE3)-Zellen.....	19
3.1.2 Anzucht und Induktion transformierter <i>E.coli</i> -BL 21 (DE3)-Zellen.....	19
3.1.3 Aufschluss der Bakterienzellen.....	20
3.2 Molekularbiologische Methoden	20
3.2.1 RNA-Isolierung mit Hilfe des ‚RNeasy Mini Kit‘ (Qiagen).....	20
3.2.2 DNA-Isolierung.....	21
3.2.3 Bestimmung der RNA- bzw. DNA-Konzentration.....	21
3.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	21
3.2.5 One-Step Reverse Transkriptase-PCR (One-Step RT-PCR).....	22
3.2.6 One-Step realtime Reverse Transkriptase-PCR (One-Step realtime RT-PCR).....	23

3.2.7 Design der porzinen <i>Tyrosinase</i> -Primer.....	25
3.2.8 cDNA-Synthese.....	25
3.2.9 Sybr Green realtime PCR.....	26
3.2.10 Agarose-Gelelektrophorese.....	27
3.3 Proteinchemische und immunologische Methoden.....	28
3.3.1 Protein-Isolierung.....	28
3.3.2 Aufreinigung von rekombinatem PERV p27Gag über einen 6x His-Taq im Batch-Verfahren unter nicht-denaturierenden Bedingungen... ..	28
3.3.2.1 Aufreinigung des rekombinanten p27Gag.....	28
3.3.3 Aufreinigung von rekombinatem PERV p15E über das Calmodulin- Bindungspeptid-Fusionsprotein im Batch-Verfahren.....	29
3.3.3.1 Aufreinigung des rekombinanten p15E.....	29
3.3.4 Dialyse.....	30
3.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentrationen.....	30
3.3.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page).....	30
3.3.7 Western Blot Analyse.....	31
3.3.8 Regenerieren der Membran nach einer Western Blot Analyse.....	32
3.3.9 Immunfluoreszenz.....	32
3.4 Zellbiologische Methoden.....	33
3.4.1 Homogenisierung der porzinen Gewebeproben.....	33
3.4.2 Auftauen von Zellen.....	33
3.4.3 Kultivierung von Zellen.....	34
3.4.4 Passagieren von Zellen.....	34
3.4.5 Zellernte.....	34
3.4.6 Einfrieren von Zellen.....	34
3.4.7 Viruspräparation durch Ultrazentrifugation	35
4. Ergebnisse.....	36
4.1 Nachweis der Provirus-Integration.....	36
4.2 Nachweis der PERV-Expression auf RNA-Ebene.....	37
4.2.1 Charakterisierung der isolierten RNA.....	37
4.2.2 Analyse der PERV-Expression auf RNA-Ebene.....	38
4.2.3 Relative Quantifizierung der PERV-mRNA-Expression.....	40
4.3 Etablierung eines porzinen Melanommarkers.....	43
4.4 Nachweis der PERV-Expression auf Proteinebene.....	50
4.4.1 Western Blot Analysen.....	50
4.4.1.1 Etablierung der Positivkontrollen.....	50
4.4.1.2 Bestimmung der Nachweisgrenze für p15E und p27Gag.....	54
4.4.1.3 Nachweis PERV-spezifischer Proteine in den Gewebeproben und in den Melanomzelllinien.....	55
4.4.2 Nachweis der Expression von PERV-Proteinen mittels Immun- fluoreszenz	58
4.5 Gesamtanalyse der Expression von PERV in Melanomen und Melanomzell- linien.....	60
5. Diskussion.....	62
5.1 Nachweis der Expression von PERV in den Biopsien, Zelllinien sowie PBMCs.....	62

5.1.1 Erhöhte Expressionen von PERV in den Primärtumoren und deren Ursachen.....	62
5.1.2 Erhöhte PERV-Expressionen in den Milzen und deren Ursachen.....	64
5.1.3 Keine erhöhten PERV-Expressionen in den Geweben mit Metastasen.....	65
5.1.4 Erhöhte PERV-Expressionen in den Lungenmetastasenzelllinien ST und LT.....	65
5.1.5 Erhöhte PERV-mRNA-Expression in der Milzmetastasenzelllinie.....	67
5.2 Marker zur molekularen Identifizierung der Melanome in porzinen Gewebebiopsien.....	67
6. Zusammenfassung.....	70
7. Literaturverzeichnis.....	71
8. Anhang.....	75
8.1 Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide.....	75
8.2 Proteingrößenmarker.....	76
8.3 DNA-Größenmarker.....	76
8.4 Induzierbare Expressionsvektoren.....	77

1. Einleitung

1.1 Retroviren

Retroviren zeichnen sich durch die Besonderheit der Reversen Transkriptase aus. Sie besitzen ein einzelsträngiges RNA-Genom, das im Zuge der Infektion einer Wirtszelle durch die viruseigene Reverse Transkriptase in eine doppelsträngige DNA umgeschrieben wird. Diese DNA wird anschließend durch die virale Integrase in die chromosomale DNA des Wirtes integriert. Die Familie der Retroviridae wird hinsichtlich der Besonderheiten während der Infektionen, der durch sie hervorgerufenen Erkrankungsformen sowie aufgrund morphologischer und genetischer Unterschiede in 7 Genera unterteilt. Zu diesen Genera zählen die α -, β -, γ -, δ -, ϵ -Retroviren sowie Lenti- und Spumaviren. Darüberhinaus wird zwischen exogenen und endogenen Retroviren unterschieden (Tab. 1.1). Die exogenen Retroviren werden horizontal von Organismus zu Organismus weiterverbreitet. Ihr Genom enthält alle essentiellen Informationen, die für eine Wirtsinfektion, die Produktion und die Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln notwendig sind. Die endogenen Retroviren sind dagegen als Proviren im Genom aller Zellen eines Organismus integriert, so dass diese vertikal über die Keimbahnzellen übertragen werden. Es kann auch hier unter bestimmten Umständen zur Produktion von exogenen infektiösen Partikeln kommen (Modrow & Falke, 2002; Kapitel 18.1.1). Als mögliche Faktoren für eine Freisetzung zählen Röntgenstrahlen, chemische Karzinogene, halogenierte Pyrimidine (z.B. Brom- und Joddesoxyuridin), Hormone, aber auch die Auslösung einer Immunreaktion (Denner, 1976). Defekte exogene Retroviren, denen die Fähigkeit zur Produktion vollständiger und aktiver Viruspartikel fehlt, können durch die Hilfe eines Helfervirus aktiviert werden. Unter Helferviren versteht man replikationskompetente Retroviren, die die fehlenden Funktionen defekter Viren ergänzen können. Endogene Retroviren weisen meist schwerwiegende genetische Defekte auf, so dass auch Helferviren keine Aktivierung bewirken können. Retrovirale Sequenzen sind im Genom vieler Säugetiere weit verbreitet. Auch im humanen Genom findet man endogene Retroviren (humane endogene Retroviren: HERVs) (Modrow & Falke, 2002; Kapitel 18.1.1). Diese machen zirka 8 % des menschlichen Genoms aus (Lander et al., 2001). Im Genom aller Schweinerassen lassen sich retrovirale Sequenzen z.B. für das porcine endogene Retrovirus (PERV) in einer hohen Kopienanzahl nachweisen (Le Tissier et al., 1997; Patience et al., 2001; Ericson et al., 2001).

Retrovirusinfektionen sind überwiegend bei Wirbeltieren anzutreffen, wo sie neben völlig harmlos verlaufenden Infektionen auch Tumorerkrankungen, Immundefizienzen und neurologische Defekte bewirken können (Modrow & Falke, 2002; Kapitel 18.1.1).

Tab.1.1: Taxonomie der Familie der Retroviridae mit Beispielen für Wirte und Vertreter

Genus	Wirt	Vertreter	Typ
α -Retrovirus	Vogel	aviäres Leukosevirus (ALV)	exogen
β -Retrovirus	Mensch	humanes endogenes Retrovirus der Familie K (HERV-K)	endogen
γ -Retrovirus	Schwein	porzines endogenes Retrovirus (PERV)	endogen
δ -Retrovirus	Rind	bovines Leukosevirus (BLV)	exogen
ϵ -Retrovirus	Fisch	Walleye-Dermal-Sarcoma Virus (WDSV)	exogen
Lentivirus	Mensch	humanes Immundefizienzvirus Typ 1/ 2 (HIV-1/ HIV-2)	exogen
Spumavirus	Katze	felines Spumavirus (FSV)	exogen

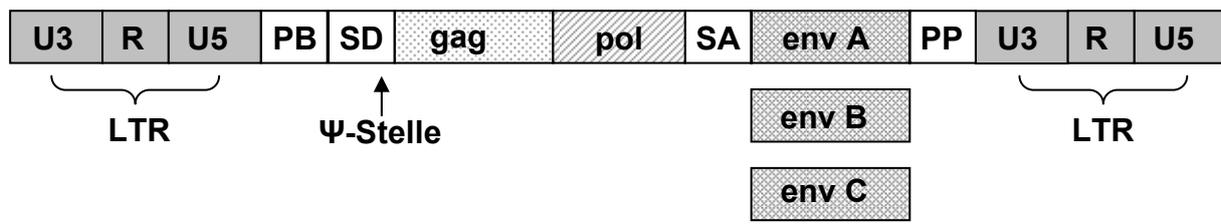
1.2 Porzine endogene Retroviren (PERVs)

PERVs wurden erstmals in den 70er Jahren in porzinen Zelllinien als Viruspartikel beschrieben (Breese, 1970). Diese endogenen Retroviren, die einen integralen Bestandteil des porzinen Genoms darstellen, werden in die Gruppe der einfachen γ -Retroviren eingeordnet. Anhand von Sequenzanalysen wurde gezeigt, dass PERVs Sequenzähnlichkeiten mit den γ -Retroviren der Primaten, Katzen oder Mäuse aufweisen. Phylogenetische Analysen zeigten eine enge Verwandtschaft mit dem Leukämievirus der Gibbonaffen, dem endogenen Koala-Retrovirus und einem induzierbaren murinen endogenen Retrovirus (Blusch et al., 2002).

1.2.1 Genomischer Aufbau der PERVs

Das Genom des infektiösen PERV-Partikels besteht aus 2 einzelsträngigen RNA-Molekülen, die am 5'-Ende eine Cap-Struktur und am 3'-Ende eine Polyadenylierungssequenz besitzen. Die in das Wirtsgenom integrierte Provirus-DNA weist eine für γ -Retroviren typische Genomstruktur auf (Abb. 1.1). Es existieren 3 offene Leserahmen, welche für die *gag*-, *pol*- und *env*-Gene kodieren. Diese sind ‚upstream‘ und ‚downstream‘ von ‚long terminal repeats‘ (LTR) flankiert, die essentielle Elemente für die reverse Transkription, die Integration sowie Transkription und Translation enthalten. Die *gag*-Region kodiert für die Matrix-, Kapsid- und Nucleokapsidproteine des Virus. Da die Homologie in dieser Region bei den genetisch verwandten γ -Retroviren am größten ist, werden die Gag-Proteine auch „gruppenspezifische

Antigene“ genannt. Die *pol*-Region kodiert für die viruseigenen Enzyme Protease, Reverse-Transkriptase und Integrase. In der *env*-Region ist die genetische Information für die Hüllproteine (Oberflächen- und Transmembranproteine) lokalisiert. Es sind 2 Spezies von mRNA nachweisbar. Eine ungespleißte genomische mRNA dient als Translationsgrundlage des Gag-Polyproteins. In 5 % der Translationsereignisse wird allerdings, bedingt durch einen ribosomalen Leserasterschub, das Stopp-Codon des Gag-Polyproteins überlesen und dadurch das Gag/Pol-Vorläuferprotein translatiert. Ursache hierfür ist eine uridinreiche Sequenzabfolge in der mRNA. Neben der Vollängen-mRNA lässt sich eine gespleißte *env*-mRNA nachweisen, die als Matrize für die Translation der viralen Hüllproteine dient (Modrow & Falke, 2002; Kapitel 18.1.3). Aufgrund von Sequenzabweichungen in der *env*-Region leiten sich die 3 Subfamilien der replikationsfähigen PERVs ab. Hierzu zählen PERV-A, PERV-B und PERV-C (Takeuchi et al., 1998).



Legende:

- LTR: long terminal repeats; enthält Informationen für die reverse Transkription und Integration des viralen Genoms ins Wirtsgenom sowie Promotor-, Enhancer- und Repressorsequenzen
- U3/U5: einzigartige (unique) Regionen
- R: wiederholende Region (redundant); schließt an Cap-Struktur an
- PB: primer binding site; ist mit dem 3'-Ende eines tRNA-Moleküls über Basenpaarung verbunden
- SD/SA: Spleißdonor und Spleißakzeptorstellen
- Ψ-Stelle: Sequenzabfolge, die die Anlagerung des RNA-Genoms an die Nucleokapsidproteine ermöglicht
- Gag/pol/env*: kodierende Sequenzen für die Kapsidproteine, viralen Enzyme und Hüllproteine
- PP: Polypurintrakt, essentiell für die Initiation der Synthese des DNA-Doppelstranges bei der Reversen Transkription

Abb.1.1: Aufbau des PERV-Genoms als Provirus in der Zelle

1.2.2 PERV-Subtypen und deren Charakteristika

Die Sequenzunterschiede der 3 Subtypen sind in den variablen Regionen des viralen Oberflächen-Hüllproteins gp70, die für die Rezeptorspezifität und somit für die Wirtsspezifität verantwortlich sind (Le Tissier et al., 1997; Akiyoshi et al., 1998), lokalisiert. In der Transmembranregion weisen PERV-A und PERV-B eine 92 %-ige Übereinstimmung auf Aminosäureebene auf (Tissier et al., 1997). PERV-A und PERV-B werden von den porzinen Nierenzellen PK15 und einer Reihe von anderen porzinen Geweben freigesetzt (Patience et al., 1997). Das PERV-C Virus lässt sich *in vitro* nach Mitogen-Stimulation von PBMCs des Minischweins isolieren (Akiyoshi et al., 1998). Die PERV-A und PERV-B Subtypen sind im Genom aller Schweine vorhanden, wohingegen aber PERV-C freie Schweine (z.B. Deutsche Landrasse) identifiziert werden konnten (Blusch et al., 2002; Denner et al. 2002).

Alle PERV-Subtypen können porzine Zellen infizieren. PERV-A und PERV-B zeigen aber ein breiteres Wirtsspektrum als PERV-C auf. Es handelt sich bei PERV-A und PERV-B um polytrope Viren, die in der Lage sind, Zellen verschiedener Spezies einschließlich humaner (Patience et al., 1997; Takeuchi et al., 1998, Specke et al., 2001a) und nicht-humaner Primaten (Blusch et al., 2000; Denner, 2001) *in vitro* zu infizieren. PERV-C ist ein ecotropes Virus, das nur porzine Zellen effizient infizieren kann (Takeuchi et al., 1998). Die Sequenzunterschiede in der variablen Region der Oberflächenhüllproteine der PERV-Subtypen deuten auf unterschiedliche Rezeptorspezifitäten hin. Beim PERV-A Rezeptor handelt es sich wahrscheinlich um Transmembranproteine mit multiplen Transmembrandomänen. Die Expression dieser Proteine, deren biologische Funktion unbekannt ist, konnte in menschlichen Geweben und PBMCs nachgewiesen werden. Neben 2 sequenzverwandten humanen Proteinen wurden auch bei Pavian- und Schweinezellen sequenzhomologe Proteine identifiziert, die als PERV-A Rezeptoren dienen (Ericsson et al., 2003). PERV-B und PERV-C Rezeptoren wurden noch nicht beschrieben.

Neben den 3 replikationsfähigen PERV-Subtypen wurden bisher noch verschiedenste γ - und β -retrovirale Sequenzen in den Genomen der Schweine detektiert. Diese weisen jedoch alle Defekte in ihrem Genom auf, die sie replikationsunfähig machen (Patience et al., 2001). Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass neue replikationsfähige, infektiöse Partikel durch den Vorgang der Rekombination aus vormals replikationsunfähigen Proviren entstehen. Darüberhinaus konnte für PERV gezeigt werden, dass aus nicht humantropen Viren durch Rekombination humantropen Viren gebildet werden können. Die Hüllproteinsequenz dieser

PERV A/C Rekombinante ist der PERV-A Hüllproteinsequenz sehr ähnlich. Sie unterscheidet sich nur in 90 Aminosäureresten des C-terminal lokalisierten TM-Hüllproteins. Diese abweichende Sequenz entspricht der PERV-C Hüllproteinsequenz (Wilson et al., 2000). Zudem besitzt diese Rekombinante die Fähigkeit, an humane Zellen zu adaptieren. Untersuchungen zeigten, dass bei serieller Passagierung durch multiple Insertionen von Enhancersequenzen in den LTR-U3-Regionen eine verstärkte Promoteraktivität bewirkt wird, die zu einer Erhöhung des Virustiters führt (Denner et al., 2001; Denner et al., 2003). Diese Adaption an humane Zellen wurde auch für PERV-A und PERV-B nachgewiesen (Denner et al., 2002).

1.2.3 Aufbau eines PERV-Partikels

Das Virion hat einen ungefähren Durchmesser von 110 nm (Denner et al., 1998). Auf dessen Oberfläche, der Hüllmembran, die von der Zytoplasmamembran der Wirtszelle nach der Knospung abgeleitet ist, befindet sich das als Trimer angeordnete Glycoprotein gp70 (Abb. 1.2). Dieses Oberflächen-Hüllprotein (SU), welches die Adsorption an Zellen ermöglicht, ist über Disulfidbrücken mit der Ektodomäne des Transmembranproteins (TM) p15E assoziiert. Das Transmembranprotein ist für die Verankerung und Fusion mit der Wirtsmembran verantwortlich (Ragheb et al., 1994). Beide Hüllproteintypen werden durch die *env*-Region kodiert, als gemeinsames Vorläuferprotein (gp85) translatiert und später durch die viruseigene Protease prozessiert. Unter der Hüllmembran befindet sich die amorphe Matrix (MA), welche die Verbindung zwischen der Hüllmembran und dem Kapsid (CA) herstellt. Im Inneren des Viruspartikels befinden sich die durch die *pol*-Region kodierten viralen Enzyme Integrase, Protease und Reverse Transkriptase sowie das virale RNA-Genom umgebende Nucleokapsid (NC). Die Proteine der Matrix (p15), des Kapsids (p27 und p12) und des Nucleokapsids (p7) werden durch die *gag*-Region kodiert und durch die virale Protease aus dem gemeinsamen Gag-Vorläuferprotein (pr60) prozessiert. Das Gag/Pol-Vorläuferprotein dient als Grundlage für die Prozessierung der viruseigenen Enzyme. Dabei spaltet sich die virale Protease nach der Dimerisierung autokatalytisch aus dem Polyprotein heraus und prozessiert das Vorläuferprotein in dessen einzelne Komponenten (Modrow & Falke, 2002; Kapitel 18.1.3).

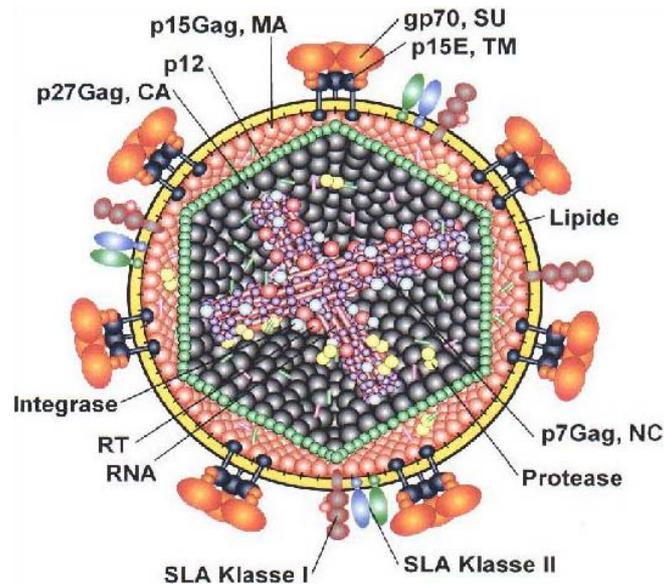


Abb.1.2: Schematische Darstellung eines PERV-Partikels (Specke et al., 2003)

MA, CA, NC: Matrix-, Kapsid- und Nucleokapsidproteine; SU, TM: Oberflächen (surface)-Hüllprotein, transmembranes Hüllprotein; p, gp: Protein, Glycoprotein; RT: Reverse Transkriptase; SLA: Schweineleukozyten-Antigen

1.2.4 Biologische Bedeutung der PERVs

Ein wissenschaftliches Interesse an der Biologie von PERVs besteht insbesondere im Hinblick auf die Virussicherheit bei Xenotransplantationen und die Entwicklung von Modellsystemen für retroviral induzierte Tumore *in vivo*.

1.2.4.1 Xenotransplantation

Im Zusammenhang mit der Xenotransplantation, der Transplantation von tierischen Zellen, Geweben und Organen auf den Menschen, wird das Schwein als Organspender favorisiert. Mit der Verwendung porziner Xenotransplantate ist aber auch die Gefahr einer Übertragung von Mikroorganismen auf den Rezipienten verbunden. Das größte Infektionsrisiko könnte dabei von den porzinen endogenen Retroviren ausgehen. Durch Infektionsstudien ist gezeigt worden, dass neben permanenten Zelllinien auch primäre humane Zellen durch PERVs infiziert werden können (Specke et al., 2001 b). Allerdings gibt es derzeit noch keine Indizien für eine PERV-Infektion *in vivo* (Specke et al., 2003).

1.2.4.2 Modellsystem für Tumorerkrankungen

Derzeit wird nach einem geeigneten *in vivo* Modellsystem zur Erforschung der Ätiologie und der Mechanismen bei einer durch endogene Retroviren induzierten Tumorentstehung gesucht. Im Hinblick auf die Tumorinduktion beim Schwein wird die Rolle der PERVs näher untersucht.

1.3 Malignes Melanom

Maligne Melanome sind Hauttumore, die durch eine neoplastische Umformung der Melanozyten in der Epidermis entstehen. Die Häufigkeit der auftretenden malignen Melanome beim Menschen hat sich in den letzten Jahren drastisch erhöht. Circa 3 % aller bösartigen Neubildungen und etwa 1 % aller Krebstodesfälle in Deutschland werden durch das maligne Melanom verursacht. Zu den Risikofaktoren zählen eine große Anzahl an Nevi, ein heller Hauttyp sowie eine genetische Disposition. Durch starke Sonnenexposition scheint die Krankheit begünstigt zu werden (Hautkrebs GBE-Heft 22, 2004, Seite 7 - 9). Die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei Frauen mit malignem Melanom der Haut ohne Metastasierung beträgt 89 % und bei Männern 77 %. Die Überlebensrate bei bereits eingetretener Metastasierung ist wesentlich schlechter (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004).

1.3.1 Malignes Melanom (Melanoblastom) und endogene Retroviren

In humanen malignen Melanomen wurde erst kürzlich eine verstärkte Expression der humanen endogenen Retrovirusfamilie K (HERV-K) auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen (Muster et al., 2003; Büscher et al., 2005). Eine erhöhte mRNA-Expression von HERV-K wurde bis dahin nur bei humanen Mammakarzinomen sowie eine verstärkte RNA- und Proteinexpression auch bei Teratokarzinomen detektiert (Löwer et al., 1984 und 1993; Ono et al., 1987; Wang-Johanning et al., 2003).

Es werden mehrere mögliche Ursachen für eine retrovirale Proteinexpression in Tumoren in Erwägung gezogen. Dazu zählt erstens die im Zuge der Tumorentstehung und Entwicklung auftretende höhere Aktivität von Transkriptionsfaktoren oder anderen Faktoren, die ebenso die Expression von endogenen Retroviren beeinflussen können. Eine zweite Möglichkeit ist die durch endogene Retroviren induzierte Insertionsmutagenese, die die Mutation von

zellulären Protoonkogenen zu Onkogenen bzw. die Mutation von Tumorsuppressorgenen verursachen kann (Büscher et al., 2005). Für ein murines Retrovirus, das in Melanozyten eine maligne Transformation hervorrufen kann, wurde unter anderem als möglicher Insertionsort das Protoonkogen *c-maf* nachgewiesen (Li et al., 1999). Darüberhinaus könnten die Tumorzellen durch die Expression der retroviralen transmembranen Hüllproteine, die immunsuppressive Eigenschaften aufweisen können, einen Selektionsvorteil durch den Schutz vor dem Komplementsystem haben. Bisher wurde dies für die transmembranen Hüllproteine des murinen Leukämievirus (Manganey et al., 1998), des Mason-Pfizer Affenvirus (Blaise et al., 2001) sowie für einen HERV-H Retrovirus (Manganey et al., 2001) nachgewiesen.

In Bezug auf die HERV-K Expression und das Auftreten von malignen Melanomen konnte allerdings bisher keine Korrelation nachgewiesen werden (Büscher et al., 2005).

Aus Tumoren des Schweins konnten ebenfalls retrovirale Partikel isoliert werden. Auch hier ist ungeklärt, ob sie an der Entstehung der Tumore beteiligt sind. Frazier et al. berichteten im Jahre 1985 von einer PERV-Isolierung aus Minischweinen, bei denen zuvor durch Strontium-90 Strahlung Leukämie oder Metaplasie ausgelöst wurde. Ebenfalls im Jahre 1985 wurden von Suzuka et al. PERVs aus einer porzinen malignen Lymphom-Zelllinie (Shimozuma-1) isoliert. Eine Isolierung aus porzinen malignen Melanomen wurde bis dato nicht beschrieben. Bisher existieren auch keine Untersuchungen über eine PERV-bedingte onkogene Transformation von Zellen *in vitro*. Sequenzierungen der Genome einiger PERVs (Patience et al., 2001; Ericson et al., 2001; Specke et al., 2001a) ergaben zudem keinen Hinweis auf Onkogene.

1.3.2 Minischweine als Melanommodelle

Um die Ursachenforschung für die Hautkrebsentstehung, Entwicklung und Metastasierung weiter vorantreiben zu können, ist ein geeignetes Tiermodell notwendig. Bei domestizierten Tieren wie z.B. Hunden, Pferden und einigen Schweinerassen ist das Auftreten von kutanen Melanomen relativ häufig. Allerdings treten Melanome bei Hunden und Pferden meist erst im fortgeschrittenen Lebensalter auf und die pathologischen Charakteristika weichen von denen humaner Melanome ab. In einigen Schweinerassen wie z.B. beim Sinclair Miniaturschwein, beim Münchener Miniaturschwein (Troll) oder bei dem melanoblastom-tragenden Libechov Minischwein (MeLiM) sind Melanome dagegen genetisch prädispositioniert und vererbbar.

Durch selektives Kreuzen konnten dadurch Rassen mit einer hohen Melanoblastominzidenz vor dem 3. Lebensmonat erzeugt werden (Vincent-Naulleau et al., 2003).

Die Haut der Schweine weist morphologische und funktionelle Übereinstimmungen mit der menschlichen Haut auf. Zu diesen Ähnlichkeiten zählen die Dicke der Epidermis, die Ultrastruktur des Überganges von Epidermis zur Dermis, das Enzymmuster, die keratinoiden Proteine und die Regenerationszeit des epidermalen Gewebes. Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten und dem Umstand, dass viele Pigmentzellanomalien des Schweins den menschlichen sehr ähnlich sind, wird das Schwein als geeignetes Modell für die dermatologische Forschung favorisiert (Müller et al., 1995; Vincent-Naulleau et al., 2004). Im Gegensatz zur meist letalen Tumorentwicklung beim Menschen, kommt es beim Schwein nach einer gewissen Zeit zu einer spontanen Ulzeration der Melanome und der anschließenden oft vollständigen Rückbildung der Tumormasse. Der betroffene Hautbezirk fibrosiert und depigmentiert (Abb. 1.3). Die Depigmentierung kann sich auch auf andere Bereiche des Körpers ausweiten bzw. sich über den gesamten Körper erstrecken. Zusätzlich kommt es auch bei Lymphknoten- und Organmetastasen zu einer vollständigen Rückbildung.

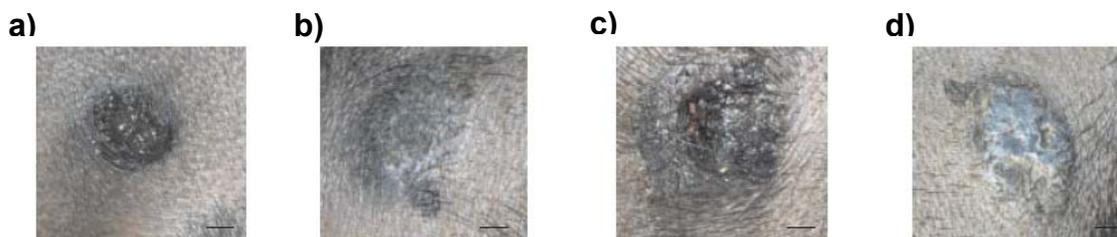


Abb.1.3: Entwicklungsstadien eines malignen Melanoms beim Schwein (Vincent-Naulleau et al., 2004)

a) Wachstum und Ulzeration, b) Abflachung der Oberfläche, c) Rückbildung und Ulzeration, d) Trocknung, Glättung der Oberfläche, Ausbleichen sowie Haar und Haut Depigmentierung (Längenbalken: 0,83 cm)

Eine Regression von Tumoren oder Depigmentierungserscheinungen sind auch beim Menschen bekannt. Allerdings erfolgt die Tumorrückbildung meist unvollständig und die bis zu diesem Zeitpunkt schon eingesetzte Metastasierung verhindert einen Heilungsprozess (Weidner, 1991; Müller et al. 1995). Der Mechanismus der Tumorrückbildung durch Devitalization beim Schwein ist bisher noch ungeklärt. Untersuchungen am MeLiM deuten allerdings darauf hin, dass die Rückbildung durch eine erhöhte Freisetzung von Hitzeschockproteinen gefolgt von einer Tumordinfiltration durch T-Lymphozyten die Ursache dafür ist (Horak et al., 2003). Beim Sinclair Miniaturschwein wird das Auftreten der Tumordinfiltration durch die T-Lymphozyten sowie Anti-Melanom Antikörper als Ursache diskutiert (Cui et al., 1995).

1.3.3 Maligne Melanome beim Münchener Miniaturschwein (Troll)

Beim Troll Schwein handelt es sich um ein weißhäutiges Zwergschwein, das unterschiedliche Haarfärbungen aufweisen kann. Diese Rasse wurde speziell für experimentelle Versuchsreihen in der Landwirtschaft aus der Kreuzungslinie Hanford-Miniaturschwein und dem Columbianischen Portionsschwein gekreuzt.

Zusätzlich diente das Troll Schwein in der Vergangenheit auch für humanäquivalente Versuche an der Haut und anderen Organen.

Bei dieser Rasse sind kutane Melanome schon von Geburt an vorhanden, entstehen innerhalb der ersten Lebensmonate oder bilden sich wie beim Menschen aus nävoiden Vorstufen. Makroskopisch stellen sich die Melanome als erhabene, schwarze, häufig ulzerierende Tumoren mit einem Durchmesser von 2 - 6 cm dar (Abb. 1.4) (Müller et al., 1995). Histologisch betrachtet, erkennt man in Knoten angeordnete, polymorphe Melanomzellen, die sich überwiegend zu einer asymmetrischen Veränderung zusammenlagern und bis in die Subkutis reichen. Diese tumorösen Pigmentzellanomalien ähneln dem humanen oberflächlich spreitenden Melanom (Weidner, 1991).



Abb.1.4: malignes Melanom beim Troll Schwein

1.4 Zielsetzung

Aufgrund der weltweit steigenden Inzidenz an Tumoren und der noch offenen Frage, ob endogene Retroviren an der Tumorentstehung beteiligt sein können, wird nach geeigneten *in vivo* Modellsystemen, in denen man die Aspekte analysieren kann, gesucht.

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, die Expression von PERV in porzinen Melanomgeweben im Vergleich zu gesunder Haut und anderen Organen bzw. in Melanomzelllinien im Vergleich zu normalen PBMCs von Trolle Schweinen näher zu untersuchen.

Zunächst soll mittels PCR der Provirusnachweis im Genom der Spendertiere, die durch eine erhöhte Inzidenz an Melanomen charakterisiert sind, erfolgen. Mit Hilfe von PERV-spezifischen Primern lässt sich dabei auch eine Aussage über die integrierten Provirus-Subtypen machen. Als nächstes soll die PERV-Expression auf mRNA-Ebene mittels One-Step RT-PCR geklärt werden. Hierbei erlauben speziell entwickelte Primerpaare auch die Detektion von Vollängen-mRNA und gespleißter *env*-mRNA. Der Nachweis der gespleißten *env*-mRNA ist eine wesentliche Voraussetzung für die mögliche Expression intakter Viruspartikel. Im Falle eines Nachweises von exprimierter PERV-mRNA wird die Expression durch den Einsatz einer One-Step realtime RT-PCR mit einer PERV-*gag*-Sonde relativ quantifiziert. Anschließend soll der Versuch unternommen werden, durch Western Blot Analysen die Expression der Proteine p15E und p27Gag von PERV nachzuweisen. Zusätzlich soll für beide PERV-spezifischen Proteine die Nachweisgrenze bei der Western Blot Analyse mittels ECL-Detektion bestimmt werden. Für einige ausgewählte Melanomzelllinien soll außerdem ein p15E-Nachweis mittels Immunfluoreszenz durchgeführt werden. Diese Proteine wurden gewählt, da p27Gag das Hauptstrukturprotein des Virus darstellt und das transmembrane Hüllprotein p15E aufgrund seiner immunsuppressiven Eigenschaften zur Progression der Tumore beitragen könnte.

Um den Melanomcharakter der in dieser Arbeit verwendeten porzinen Melanombiopsien bestätigen zu können, soll zusätzlich nach einem geeigneten Tumormarker auf mRNA-Ebene gesucht werden. Für einen oder mehrere potenzielle Kandidaten sollen Primer entwickelt werden, die dann in einer Sybr Green realtime PCR auf ihre Eignung als Tumormarker getestet werden sollen.

2. Materialien

2.1 Geräte

Tab.2.1: verwendete Geräte

Geräte und Materialien	Firma
Abzug	Hohenloher
Agarosegelelektrophoresekammer	Bio-RAD
Blotkammer (Semi-dry transfer cell, Trans blot sd)	Bio-RAD
Brutschrank (BBD 6220)	Heraeus
Dialyseschlauch (Servapor), cut off 12-14 kDa	Serva
Durchlichtmikroskop (ID 03)	Zeiss
ELISA-Reader (Spectra classic)	Tecan
Entwickler (Curix 60)	Agfa
Eppendorf-Gefäß-Thermostat (ThermoStat plus)	Eppendorf
Filmkassette (X-Omatic)	Kodak
Folienschweißgerät	Severin
Geldokumentationsgerät (Gel Doc 2000)	Bio-RAD
Homogenisator	B.Braun
Inkubationsschüttler (innova 4330)	New Brunswick scientific
Kühlzentrifuge 5403	Eppendorf
Laser Scanning Mikroskop (LSM 510)	Zeiss
Ofen mit Rotor	Heraeus Instruments
PCR Thermocycler (Mastercycler, egradientS)	Eppendorf
Plastikküvette UV-VIS	Eppendorf
Realtime Cycler (MX-4000)	Stratagene
Röntgenfilme (CL-Xposure Film, 5 x 7 inches)	Pierce
SDS-Gelelektrophoresekammer (Mini Protean 2)	Bio-RAD
Spannungsgerät (Power Pac 300)	Bio-RAD
Spektralphotometer (Biophotometer)	Eppendorf
Sterilbank	Baker
Ultrazentrifuge L8-70, Rotor SW28	Beckmann

2.2 Chemikalien

Tab.2.2: verwendete Chemikalien

Chemikalien/Reagenzien	Firma
Agar	Sigma
Agarose	Roth
Acrylamid 30 %	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Ampicillin	Merck
β-Mercaptoethanol	Roth
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth
Brillant Blau R 250	Roth
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich
Chloroform	Roth
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva

Ethylenglycolbis (β -aminoethylether) N,N,N',N'-	
Tetraessigsäure (EGTA)	Sigma
Essigsäure	Roth
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Formaldehyd	Merck
Glycerin	Sigma
Glycin	Sigma
Guanindinhydrochlorid	Pierce
Imidazol	Merck
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Magermilchpulver	TSI GmbH & Co. Kg
Magnesiumazetat	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
Methanol	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumcitrat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom KG
Salzsäure	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
flüssiger Stickstoff	Lindemann
Sucrose	Sigma
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED)	USB
Tricine	Roth
Tris Base	Roth
Triton X-100	Roth
TRI Reagent	Sigma
Tween 20	Aldrich

2.3 Kommerzielle Kits

Tab.2.3: verwendete Kits

Bezeichnung	Firma
Brilliant Sybr Green QPCR MasterMix	Stratagene
BCA TM Assay	Pierce
Calmodulin affinity Resin	Stragene
ECL Western Blotting Analysis System	Amersham Biosciences
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
Rnase-Free Dnase Set	Qiagen
Rneasy Mini Kit	Qiagen
ProBond Resin (His-Taq)	Qiagen
ProLong Antifade Kit	Molecular Probes
SuperScript III One-Step RT-PCR with Platinum Taq	Invitrogen
SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR	Invitrogen

2.4 Puffer und Lösungen

Tab.2.4: verwendete Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung	pH-Wert
10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS)	10 % APS (w/v)	
10 x Anodenpuffer	2 M Tris Base	8,9
Blockierungspuffer (Western blot)	5 % Magermilchpulver in PBS 0,05 % Tween 20	7,2
Blockierungspuffer (Immunfluoreszenz)	5 % Trockenmilchpulver in PBS	
CaCl ₂ -Bindungspuffer	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 10 mM β-Mercaptoethanol 1 mM Magnesiumazetat 1 mM Imidazol 2 mM CaCl ₂	8
DEPC-H ₂ O	1 % DEPC (v/v)	
DEPC-Ethanol	70 % Ethanol in DEPC-H ₂ O	
10 x DNA Gelladepuffer	50 % (w/v) Glycerol 3,5 % gesättigte Bromphenolblaulsg. 0,25 % (w/v) Xylencyanol 2 % (v/v) 50 x TAE	
Einfriermedium	10 % DMSO in FKS	
Elutionspuffer (CBP)	50 mM Tris-HCl 10 mM β-Mercaptoethanol 2 mM EGTA 150 mM NaCl	8
Elutionspuffer (His-Taq)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 250 mM Imidazol	8
Ethidiumbromidlösung	0,05 % Ethidiumbromid	
Fixierlösung (Immunfluoreszenz)	3,7 % Formaldehyd in PBS	
Gelpuffer	3,0 M Tris-HCl 0,3 % SDS	8,4
10 x Kathodenpuffer	1 M Tris Base 1 M Tricin 1 % SDS	8,25
Lysepuffer (His-Taq)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol	8

PBS	8 g/l NaCl 0,2 g/l KCl 1,15 g/l Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ 0,1 g/l CaCl ₂ * 2 H ₂ O MgCl ₂ * 6 H ₂ O	7,2
Permeabilisierungslösung (Immunfluoreszenz)	1 % Triton X-100 in PBS	
22 % Saccharoselösung	22 % Sucrose (w/v) in PBS	
SDS-Probenpuffer	50 mM Tris-HCl 12 % Glycerin 4 % SDS 5 % β-Mercaptoethanol 0,01 % Coomassie Blue G-250	6,8
Regenerationspuffer	2 % SDS 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 bei RT 100 mM β-Mercaptoethanol	
50 x TAE-Puffer	2 M Tris Base 5,71 % (v/v) Eisessig 0,05 M EDTA ph 8	
Transferpuffer	48 mM Tris Base 39 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol 0,0375 % SDS	9,2
Waschpuffer (His-Taq)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 20 mM Imidazol	8
Waschpuffer (Western Blot Analyse)	1 x PBS 0,05 % Tween 20	7,2

2.5 Gelzusammensetzungen

Tab.2.5: Gelzusammensetzungen

Gel	Zusammensetzung
4 % Sammelgel	1 ml Gelpuffer 1,6 ml dH ₂ O 0,4 ml Acrylamid-Lösung (30 %) 50 µl APS (10 %) 5 µl TEMED
10 % Trenngel	2,5 ml Gelpuffer 2,5 ml dH ₂ O 2,5 ml Acrylamid-Lösung (30 %) 50 µl APS (10 %) 5 µl TEMED

1 % Agarosegel	0,7 g Agarose 70 ml 1 x TAE-Puffer
1,5 % Agarosegel	1,05 g Agarose 70 ml 1 x TAE-Puffer

2.6 Medien

Tab.2.6: verwendete Medien

Name	Zusammensetzung
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	DMEM+ 4,5 g/l Glucose 10 % FKS 4 mM L-Glutamin 15 mM Hepes Puffer 100 mg/ml Penicillin/Streptomycin
RPMI-Medium 1640	RPMI-Medium 10 % FKS 2 mM L-Glutamin 15 mM Hepes Puffer 100 mg/ml Penicillin/Streptomycin
LB-Medium	10 g/l Bacto Pepton 11 g/l NaCl 5 g/l Hefeextrakt
LB-Agar mit Ampicillin	LB-Medium 1,5 % Bacto Agar 100 µg/ml Ampicillin

2.7 Bakterienstamm

BL21 (DE3) von Stratagene: E.coli B F⁻dcm ompT hsdS (rB⁻mB⁻) gal λ (DE3)

2.8 Vektoren

Tab.2.7: verwendete Vektoren

Vektorbezeichnung	Größe	Bezugsquelle
pCAL-n	5,8 kb	Stratagene
pQE-30	3,4 kb	Qiagen

2.9 Enzyme

Tab.2.8: verwendete Enzyme

Enzym	Firma
AmpliAq Gold (250 U, 5 U/µl)	Applied Biosystems
Dnase I (1500 Kunitz units)	Qiagen
Lysozym	Sigma

2.10 Antikörper/ Antiseren

Tab.2.9: verwendete Antikörper/ Antiseren

Name	Firma/Institution
Immuns Serum Ziege 16 (PERV p15E)	RKI
Immuns Serum Ziege 14 (PERV p27Gag)	RKI
Rabbit anti-goat-HRP	Sigma, LOT 6532
Anti-goat IgG-FITC-conjugate	Sigma, LOT 022K9210

2.11 Größen- und Längenmarker

Tab.2.10: verwendete Standards

Geltyp	Standard	Firma
Agarosegel	1 kb ⁺ DNA Ladder	Invitrogen
SDS-Gel	SeeBlue Plus 2	Invitrogen

2.12 Zelllinien

Tab.2.11: verwendete Zelllinien

Zelllinie	sezerniertes Virus	Spezies	Gewebe	Morphologie	Zellbank
HEK 293		Mensch	embryonale Niere	epitheloid	ATCC
HEK 293/5 ⁰	PERV A/C	Mensch	embryonale Niere	epitheloid	RKI
PK15	PERV A und B	Schwein	Niere	epitheloid	ATCC

Die im Folgenden aufgelisteten Zellen bzw. Melanomzelllinien stammen vom Troll Schwein # 7 und wurden von der Bundesanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Kultur genommen. Die 45. und 87. Passage der Zelllinie Lunge ST stammen von der Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin am Friedrich Löffler-Institut.

Tab.2.12: untersuchte porcine Zellen/ Melanomzelllinien (P entspricht der Passagenanzahl)

Zellen/ Zelllinie	Morphologie
Lunge ST, -P21, -P40; Milz, -P5; Nävus P8	fibroblastoid
Lunge ST P45, -P47	fibroblastoid/epitheloid
Lunge ST P60, -P87; Lunge LT, -P21	epitheloid
PBMCs	

2.13 Gewebeproben

Die Gewebeproben verschiedener Trolle Schweine stammten vom Institut für Tierpathologie, Universität München.

Tab.2.13: untersuchte porcine Gewebeproben

Tier Nr.	Gewebe
371	regionärer Lymphknoten <i>axial</i> mit Metastase, kutanes Melanom, Milz, normale Haut
372	regionärer Lymphknoten <i>inguinal</i> mit Metastase, kutanes Melanom, kutanes Melanom aus dem Rücken, kutanes Melanom von der Schnauze, Milz, normale Haut
472	kutanes Melanom, Milz, normale Haut
499	kutanes Melanom, Milz, normale Haut

3. Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Transformation kompetenter *Escherichia coli*-BL21 (DE3)-Zellen

Bei dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3) handelt es sich um Zellen, die für die IPTG-induzierte Expression von rekombinanten Proteinen geeignet sind.

Die Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA erfolgte nach der Hitzeschock-Methode. 100 µl der leicht angetauten kompetenten Zellen wurden mit jeweils 100 pg pCALn(*p15E*)-Plasmid-DNA bzw. pQ-30(*p27gag*)-Plasmid-DNA versetzt und anschließend für 30 min auf Eis präinkubiert. Der nachfolgende Hitzeschock erstreckte sich über 90 sec bei 42 °C und endete mit einer zweiminütigen Inkubation der Zellen auf Eis. Im Anschluss wurden die Zellen mit 500 µl LB-Medium ohne Antibiotikum versetzt und 45 bis 60 min bei 37 °C bebrütet. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde das Zellpellet in 70 µl LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) aufgenommen und auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht bebrütet. Als Negativkontrolle wurde ein Transformationsansatz ohne Plasmid-DNA mitgeführt.

3.1.2 Anzucht und Induktion transformierter *E. coli*-BL 21 (DE3)-Zellen

Zur Proteinexpression durch *E. coli* BL21-Zellen wurden zunächst 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) mit einer Bakterienkolonie der zuvor mit pCALn(*p15E*) bzw. pQ-30(*p27gag*) transformierten Zellen inokuliert. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Übernachtskultur als Inokulat für 100 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) verwendet, welche bei 37 °C schüttelnd bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ inkubiert wurde. Nun wurde eine 1 ml Probe (nicht-induzierte Kontrolle) entnommen, die später zusammen mit weiteren Kontrollproben für eine SDS-PAGE Analyse verwendet wurden. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch die Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM. Die Kulturen wurden für weitere 4 h inkubiert. Vor der Pelletierung der Bakterien durch Zentrifugation bei 4000 x g für 20 min erfolgte eine zweite Probenahme von 1 ml als Induktionskontrolle. Zum Aufschluss der Zellwände wurde das Bakterienpellet über Nacht bei -20 °C eingefroren.

3.1.3 Aufschluss der Bakterienzellen

Zur Lyse der Bakterienzellen wurde das Zellpellet für 15 min auf Eis aufgetaut, in 1,35 ml Lysepuffer (2 – 5 ml/g Nassgewicht) für die His-Taq-Aufreinigung bzw. in 3 ml CaCl₂-Bindungspuffer für die CBP-Aufreinigung resuspendiert und mit Lysozym (Endkonzentration: 1 mg/ml) versetzt. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 30 min. Anschließend fand eine 6-malige Ultraschallbehandlung im Ultraschallbad (Bandelin Sonorex) für 10 sec statt. Dazwischen wurde das Lysat jeweils für 10 sec auf Eis abgekühlt. Um die Pelletierung der Zelltrümmer zu erreichen, wurde das Lysat bei 10.000 x g für 20 – 30 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde für die Aufreinigung im Batch-Verfahren eingesetzt. Das Pellet wurde bis zur SDS-PAGE Analyse aufbewahrt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 RNA-Isolierung mit Hilfe des ‚RNeasy Mini Kit‘ (Qiagen)

Die in TRI Reagent aufgenommenen Gewebe- bzw. Zellkulturproben wurden nach dem Auftauen zunächst für 5 – 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform/ml TRI Reagent wurden die Proben für 15 sec geschüttelt und anschließend bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Im Anschluss erfolgte zur Phasentrennung eine Zentrifugation für 15 min bei 12.000 x g und 4 °C.

Die RNA-haltige wässrige obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Interphase und die organische Phase wurden bei Bedarf bei 4 °C für eine spätere DNA- bzw. Proteinisolierung aufbewahrt. Zur wässrigen Phase wurde das gleiche Volumen an kaltem 70 %-igen Ethanol in DEPC-Wasser pipettiert und homogenisiert. Die Probe wurde dann auf eine im ‚RNeasy Mini Kit‘ bereitgestellte Silicamembran-Säule überführt. Die weiteren Schritte zur RNA-Isolierung einschließlich des DNase I Verdau auf der Säule erfolgten nun nach dem im RNeasy Mini Kit Handbuch aufgeführten Protokoll. Abweichend zum Protokoll erfolgte die Trocknung der Säule vor der Elution bei 10.000 x g für 1 min. Die RNA wurde in 30 µl DEPC-Wasser eluiert und bei -80 °C gelagert.

3.2.2 DNA-Isolierung

Die Isolierung der DNA mittels TRI Reagent erfolgte nach dem dazugehörigen Protokoll der Firma Sigma. Das DNA-Pellet wurde in 50 µl 8 mM NaOH/1 mM EDTA (pH 7 - 8) aufgenommen und zur Lösung schwer löslicher Bestandteile für 10 min bei 60 °C unter Schütteln inkubiert. Abschließend wurde die Proteinlösung zum Entfernen unlöslicher Bestandteile bei 12.000 x g für 10 min abzentrifugiert und der Überstand bei -20 °C gelagert.

3.2.3 Bestimmung der RNA- bzw. DNA-Konzentration

Die Quantifizierung von isolierter RNA bzw. DNA erfolgte spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer UV-VIS Plastikkuvette mit 1 cm Durchmesser. Eine DNA-Lösung mit einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA weist in einer Küvette mit 1 cm Durchmesser eine Absorption von 1,0 auf, eine RNA-Lösung eine Konzentration von 40 µg/ml. Dementsprechend lautet die Berechnungsformel zur Konzentrationsbestimmung:

$$c_{dsDNA}[\text{ng}/\mu\text{l}] = E_{260} * 50 \text{ ng}/\mu\text{l} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$c_{dsRNA}[\text{ng}/\mu\text{l}] = E_{260} * 40 \text{ ng}/\mu\text{l} * \text{Verdünnungsfaktor.}$$

Um den Reinheitsgrad der Lösung zu bestimmen, wurde zusätzlich bei einer Wellenlänge von 280 nm die Proteinkontamination ermittelt. Eine proteinfreie Nukleinsäurelösung weist ein E_{260}/E_{280} -Verhältnis von 1,8 - 2 auf (Mülhardt, 2000; Kapitel 2.4). Bei Verunreinigungen der DNA-Probe verringert sich dieser Wert.

3.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCRs zur DNA-Amplifikation bzw. zur Überprüfung der RNA-Isolate auf eventuelle DNA-Kontaminationen (Kontroll-PCR) wurden in Eppendorf-Mastercylern durchgeführt. Der verwendete Standard-Reaktionsansatz sowie die verwendeten Temperaturbedingungen sind in den Tabellen 3.1 und 3.2 aufgeführt.

Tab.3.1: Standard-Reaktionsansatz für die PCR

Komponenten	Konzentrationen der Stocklösungen	µl/Ansatz
DNA	50 ng (bzw. 100 ng bei Kontroll-PCR)	1
PCR-Puffer	10 x, mit 15 mM MgCl ₂	2
MgCl ₂	25 mM	1,25
dNTPs	10 mM	1
Forward-Primer	10 pmol/µl	1
Reverse-Primer	10 pmol/µl	1
AmpliTaq Gold Polymerase	5 U/µl	0,35
nukleasefreies ddH ₂ O		<u>12,4</u>
<i>Gesamtvolumen</i>		<i>20</i>

Tab.3.2: Temperaturbedingungen für die PCR; x entspricht der jeweiligen optimalen Annealingtemperatur der verwendeten Primer (siehe Tab.8.1 im Anhang)

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklusanzahl
Aktivierung der Taq DNA-Polymerase, Denaturierung der Matrize	94 °C	15 min	1 x
Denaturierung	94 °C	30 sec	} 34 x
Annealing	x	30 sec	
Elongation	72 °C	1 min	
Abschließende Elongation	72 °C	5 min	1 x
	4 °C	∞	

3.2.5 One-Step Reverse Transkriptase-PCR (One-Step RT-PCR)

Die One-Step RT-PCR stellt ein Verfahren dar, bei dem in einem Ansatz sowohl die Reverse Transkription von mRNA in cDNA als auch die Vervielfältigung der Transkripte mittels genspezifischer Primer stattfindet. Hierfür wurde das ‚SuperScript III One-Step RT-PCR with Platinum Taq Kit‘ (Qiagen) eingesetzt. Die PCR wurde in Eppendorf-Mastercyclern durchgeführt. Der verwendete Reaktionsansatz sowie die verwendeten Temperaturbedingungen sind in den Tabellen 3.3 und 3.4 aufgeführt.

Tab. 3.3: Reaktionsansatz für die One-Step RT-PCR

Komponenten	Konzentrationen der Stocklösungen	µl/Ansatz
RNA	100 ng/µl	1
Reaction-Mix	2 x	10
Forward-Primer	10 pmol/µl	1
Reverse-Primer	10 pmol/µl	1
RT/Platinum Taq Mix		0,5
nukleasefreies ddH ₂ O		<u>6,5</u>
<i>Gesamtvolumen</i>		<i>20</i>

Tab.3.4: Temperaturbedingungen für die One-Step RT-PCR; x entspricht der jeweiligen optimalen Annealingtemperatur der verwendeten Primer (siehe Tab.8.1 im Anhang)

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklusanzahl
cDNA-Synthese	50 °C	30 min	1 x
Inaktivierung d. Reversen Transkriptase, Aktivierung der Taq DNA-Polymerase und Denaturierung der Matrize	94 °C	2 min	1 x
Denaturierung	94 °C	45 sec	} 30 x
Annealing	x	45 sec	
Elongation	72 °C	1 min	
Abschließende Elongation	72 °C	7 min	1 x
	4 °C	∞	

3.2.6 One-Step realtime Reverse Transkriptase -PCR (One-Step realtime RT-PCR)

Hierbei handelt es sich um eine Methode, bei der die Umschreibung von RNA in cDNA und die spezifische Amplifikation sowie die Detektion der Transkripte in einem Ansatz kombiniert ablaufen. Es wurde hierfür das ‚SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System Kit‘ (Invitrogen) verwendet. In den durchgeführten Versuchen fand die Quantifizierung nach der TaqMan Methode mit dem MX-4000-Cycler (Stratagene) statt.

Zur Detektion der Amplifikate wurde eine FAM-markierte PERV-*gag*-spezifische Sonde eingesetzt. Als Referenzfluorophor diente ROX. Jeder Probenansatz wurde in Triplikaten gemessen. Die Daten einer PCR wurden bei jedem Zyklus während des Annealingschrittes aufgenommen.

Um zunächst die Primereffizienz bei dieser Methode zu testen, wurde ein PK15-Standard mit Gesamt-RNA Konzentrationen von 0 bis 40 ng hergestellt und in die One-Step realtime RT-PCR eingesetzt. Die Effizienz der Reaktion bei optimalen Bedingungen kann über die Steigung der Geraden der CT-Werte bei definierten Verdünnungen bestimmt werden (Stratagene Application Note # 10). Eine Primereffizienz von nahezu 100 % ist erforderlich, um akkurate und reproduzierbare Daten zu erhalten. Unter diesen Bedingungen ist gewährleistet, dass die eingesetzte cDNA in jedem Zyklus verdoppelt wird. Die Berechnungsformel für die Ermittlung der Primereffizienz lautet:

$$\text{Effizienz (E)} = [10^{(-1/\text{Steigung})}]^{-1}$$

Die Bestimmung der Primereffizienz für diese Reaktion wurde mit Hilfe der MX-4000 Software durchgeführt.

Als Negativkontrollen wurde in die One-Step realtime RT-PCR HEK 293-RNA und ddH₂O eingesetzt. Als Positivkontrolle diente PK15-RNA. Die Bestimmung der relativen Expression erfolgte nach einer Modifikation der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode [Livak,1997]. Es erfolgte keine Abgleichung der Proben anhand eines Haushaltgens. Stattdessen wurde die Expression der Proben relativ zu der Positivkontrolle als Kalibrator bestimmt. Die Berechnung der relativen Expression erfolgte nach folgender Formel:

$$\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{Probe}} - \text{CT}_{\text{PK15}}$$

$$\text{relative Expression} = (1+E)^{-\Delta\text{CT}}$$

Legende:

CT : Zyklenanzahl, bei der ein vorgegebener Schwellenwert überschritten wurde

E: Effizienz

Die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Triplikate sowie die Bestimmung der relativen Expression von PERV-*gag*-mRNA wurden mit dem Tabellenkalkulations-Programm Microsoft Excel durchgeführt.

Um DNA-Kontaminationen der RNA-Proben ausschließen zu können, wurde parallel zu jedem One-Step realtime RT-PCR Ansatz eine Kontroll-realtime PCR ohne RT-Schritt mitgeführt.

Die verwendeten Reaktionsansätze sowie die verwendeten Temperaturbedingungen sind in den Tabellen 3.5, 3.6 und 3.7 aufgeführt.

Tab.3.5: Reaktionsansatz für die One-Step realtime RT-PCR

Komponenten	Konzentrationen der Stocklösungen	µl/Ansatz
RNA	10 ng/µl	5
ReactionMix	2 x	12,5
PERV_real s	10 pmol/µl	0,5
PERV_real as	10 pmol/µl	0,5
SuperScript III RT/Platinum Taq Mix		0,5
ROX Reference Dye		0,5
PERV- <i>gag</i> -Sonde	10 pmol/µl	0,5
nukleasefreies ddH ₂ O		<u>5</u>
<i>Gesamtvolumen</i>		25

Tab.3.6: Reaktionsansatz für die Kontroll-realtme PCR ohne Reverse Transkriptase

Komponenten	Konzentrationen der Stocklösungen	µl/Ansatz
RNA	10 ng/µl	5
PCR-Puffer	10 x, mit 15 mM MgCl ₂	2,5
MgCl ₂	25 mM	1,25
dNTPs	10 mM	1
PERV_real s	10 pmol/µl	1
PERV_real as	10 pmol/µl	1
PERV-gag-Sonde	10 pmol/µl	0,5
AmpliTaq Gold Polymerase	5 U/µl	0,35
nukleasefreies ddH ₂ O		<u>12,4</u>
<i>Gesamtansatz</i>		25

Tab.3.7: Temperaturbedingungen für die One-Step realtime RT-PCR und die Kontroll-realtme PCR ohne Reverse Transkriptase

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklusanzahl
cDNA-Synthese	50 °C	15 min	1 x
Inaktivierung d. Reversen Transkriptase, Aktivierung der Taq DNA-Polymerase und Denaturierung der Matrize	95 °C	2 min	1 x
Denaturierung	95 °C	15 sec	} 45 x
Annealing	54 °C	30 sec	
	4 °C	∞	

3.2.7 Design der porzinen *Tyrosinase*-Primer

Die *Tyrosinase*-Primer mit der Bezeichnung ssTyr1 for und ssTyr1 rev wurden mit Hilfe des PrimerSelect Programmes (DNASTAR) entwickelt. Als Grundlage diente die in der Datenbank NCBI gespeicherte mRNA-Sequenz der *Sus scrofa Tyrosinase* mit der Accession-Nr. NM_001025212. Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma Sigma.

3.2.8 cDNA-Synthese

Die Umschreibung von RNA in cDNA durch Reverse Transkription erfolgte mit Hilfe des ‚RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kits‘ (Fermentas) und wurde nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Zur cDNA-Synthese wurden jeweils 2 µg RNA eingesetzt, so dass in den 20 µl Endvolumen des Reaktionsansatzes eine cDNA-Konzentration von 100 ng/µl vorlag. Die Umschreibung erfolgte mit je 20 pmol der jeweiligen genspezifischen Primer für porzine *Tyrosinase* (ssTyr1 rev) und porzine *GAPDH* (porz. GAP-DH rev) in einem Ansatz.

3.2.9 Sybr Green realtime PCR

Bei dieser DNA-Quantifizierungsmethode wird ein Fluoreszenzfarbstoff (Sybr Green) eingesetzt, der sich unspezifisch an doppelsträngige DNA-Moleküle anlagert. Es ist hierbei notwendig, dass nur spezifische PCR Produkte entstehen, da ansonsten auch unspezifische PCR Produkte und Primer-Dimere zum Fluoreszenzsignal beitragen. Das Anregungsmaximum von Sybr Green liegt bei 494 nm und das Emissionsmaximum bei 521 nm. Die Anlagerung des Farbstoffes führt zu einer starken Erhöhung der Fluoreszenz in dem Molekül, wohingegen ungebundenes Sybr Green nur sehr schwach fluoresziert. Die Signalstärke nimmt mit zunehmender Anzahl von Zyklen aufgrund der Anhäufung der PCR Produkte zu.

Für die Sybr Green realtime PCR wurde der ‚Brilliant Sybr Green QPCR MasterMix‘ (Stratagene) eingesetzt. Als Referenzfluorophor wurde ROX verwendet. Die Durchführung der PCR erfolgte mit einem MX-4000-Cycler (Stratagene). Jeder Probenansatz wurde in Triplikaten gemessen. Die Daten einer PCR wurden bei jedem Zyklus während des Elongationsschrittes aufgenommen. Am Ende der PCR schloß sich ein zusätzliches Temperaturprogramm zur Ermittlung der Dissoziationskurven an.

Die cDNA, die aus der parallelen Umschreibung der RNA aus den porzinen Gewebeproben mit den genspezifischen Primern für porzine *Tyrosinase* und porzine *GAPDH* resultierte, wurde als Matize eingesetzt. Die Sybr Green realtime PCRs für *Tyrosinase* und *GAPDH* wurden in getrennten Ansätzen durchgeführt. Die Bestimmung der relativen Expression erfolgte nach der $\Delta\Delta CT$ -Methode [Livak, 1997]. Dabei wurde das Haushaltsgen *GAPDH* zum Abgleich der Proben verwendet. Als Kalibrator wurde die cDNA der normalen Haut des jeweiligen Tieres eingesetzt. Zur Bestimmung der Effizienz der ssTyr1-Primer wurde die cDNA der normalen Haut des Tieres # 371 in einer Konzentration von 0 bis 30 ng in die Sybr Green realtime PCR eingesetzt. Die Ermittlung der Primereffizienz wurde mit Hilfe der MX-4000 Software durchgeführt. Die relative *Tyrosinase*-Expression errechnete sich folgendermaßen:

$$\Delta\Delta CT = (CT_{\text{Probe_Tyr}} - CT_{\text{Probe_GAPDH}}) - (CT_{\text{Kalibrator_Tyr}} - CT_{\text{Kalibrator_GAPDH}})$$

$$\text{relative } Tyrosinase\text{-Expression} = (1+E)^{-\Delta\Delta CT}$$

Legende:

Kalibrator = cDNA normaler Haut des jeweiligen Tieres

$CT_{\text{Probe/Kalibrator_Tyr}}$ = CT-Wert der Probe/des Kalibrators bei der Sybr Green realtime PCR für porzine *Tyrosinase*

$CT_{\text{Probe/Kalibrator_GAPDH}}$ = CT-Wert der Probe/des Kalibrators bei der Sybr Green realtime PCR für porzine *GAPDH*

Die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Triplikate sowie die Bestimmung der relativen Expression von porziner *Tyrosinase* wurden mit dem Tabellenkalkulations-Programm Microsoft Excel durchgeführt.

Der verwendete Reaktionsansatz sowie das verwendete Temperaturprogramm sind in den Tabellen 3.8 und 3.9 aufgeführt.

Tab.3.8: Reaktionsansatz für die Sybr Green realtime PCR

Komponenten	Konzentrationen der Stocklösungen	µl/Ansatz
cDNA	6,25 ng/µl	4
Brilliant Sybr Green QPCR Mastermix	2 x	6
ssTyr1 for bzw. porz. GAP-DH for	10 pmol/µl	0,5
ssTyr1 rev bzw. porz. GAP-DH rev	10 pmol/µl	0,5
ROX-Lösung	100 µM	0,25
nukleasefreies ddH ₂ O		<u>0,75</u>
<i>Gesamtvolumen</i>		<i>12</i>

Tab.3.9: Temperaturbedingungen für die Sybr Green realtime PCR

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklusanzahl
Aktivierung der Taq DNA-Polymerase, Denaturierung der Matrize	95 °C	10 min	1 x
Denaturierung	95 °C	30 sec	} 40 x Messpkt.
Annealing	54 °C	20 sec	
Elongation	72 °C	40 sec	
Denaturierung	95 °C	1 min	1 x
Temperaturgradient für die Dissoziationskurve	55 °C↑	30 sec	41 x Messpkt.

3.2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung unterschiedlich großer DNA-Fragmente eingesetzt. Die PCR-Proben wurden mit einem Zehntel Volumen an 10 x Probenpuffer versetzt und je nach zu erwartender Fragmentgrößen in einem 1 - 1,5 %-igen Gel in 1 x TAE-Puffer bei 100 V (Gelgröße: 6 x 10 cm) bzw. 120 V (Gelgröße: 15 x 10 cm) aufgetrennt. Zur Größenabschätzung wurde der 1 kb⁺ DNA Marker (Invitrogen) mitgeführt. Nach dem Gellauf wurde das Gel für ca. 30 min in einer 0,05 %-igen Ethidiumbromidlösung angefärbt und anschließend mittels einer Geldokumentationsapparatur GelDoc 2000 (BIO RAD) fotografiert.

3.3 Proteinchemische und immunologische Methoden

3.3.1 Protein-Isolierung

Die Isolierung der Proteine aus den porzinen Gewebeproben bzw. aus den Melanomzelllinien mittels TRI Reagent erfolgte ebenfalls nach dem dazugehörigen Protokoll der Firma Sigma. Das schwer lösliche Protein-Pellet wurde in 250 μ l 1 % SDS aufgenommen und für 10 min bei 70 °C schüttelnd inkubiert. Um das unlösliche Material zu entfernen, wurde abschließend bei Raumtemperatur und 10.000 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand bei -20 °C gelagert.

3.3.2 Aufreinigung von rekombinantem PERV p27Gag über einen 6x His-Taq im Batch-Verfahren unter nicht-denaturierenden Bedingungen

Das rekombinante p27Gag wurde mit dem Proteinexpressionsvektor pQE-30 (Qiagen) in *E.coli* (BL21) exprimiert. Eine Aufreinigung des Proteins war durch einen N-terminalen 6x His-Taq möglich. Als Aufreinigungsmatrix diente Ni-NTA Agarose. NTA (Nitrilotriacetic acid) ist in der Lage, Nickelionen zu binden und dabei 4 der 6 Ligandenbindungsstellen des Metallions zu besetzen. Der 6x His-Taq interagiert mit den 2 verbleibenden freien Ligandenbindungsstellen des Nickelions.

Die Bindung unter nicht-denaturierenden Bedingungen erfolgte bei einem pH-Wert von 8. Das im Lyse- bzw. Waschpuffer in geringen Konzentrationen enthaltene Imidazol sowie eine hohe Ionenstärke bewirkte die Reduzierung von unspezifischen Bindungen und somit eine Verringerung an Fremdproteinen im Eluat. Durch eine hohe Imidazolkonzentration im Elutionspuffer wurde die Bindung des rekombinanten Proteins an die Matrix aufgehoben und das Protein konnte somit eluiert werden.

3.3.2.1 Aufreinigung des rekombinanten p27Gag

Zunächst wurden 500 μ l des Ni-NTA-Säulenmaterials bei 515 x g in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert und der Überstand (Ethanol) verworfen. Alle folgenden Zentrifugationsschritte wurden ebenfalls bei 515 x g durchgeführt. Zum Äquilibrieren wurde 2 x mit je 5 ml Lysepuffer gewaschen, indem das Säulenmaterial abwechselnd in dem Puffer resuspendiert bzw. abzentrifugiert wurde. Anschließend wurde das Bakterienlysat zum

Säulenmaterial hinzupipettiert und für 1 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand in einem Reaktionsgefäß gesammelt und bei -20 °C bis zur SDS-PAGE Analyse aufbewahrt. Es folgten 2 Waschdurchgänge mit Waschpuffer (ca. 1,5 ml), wobei die Waschfraktionen für die spätere SDS-PAGE Analyse aufbewahrt wurden. Mit Hilfe des Elutionspuffers wurde 4 x mit ca. 350 µl eluiert und die Fraktionen in Reaktionsgefäßen aufbewahrt und später in der SDS-PAGE Analyse getestet.

3.3.3 Aufreinigung von rekombinantem PERV p15E über das Calmodulin-Bindungspeptid-Fusionsprotein im Batch-Verfahren

Die Ektodomäne des rekombinanten p15E wurde mit dem Proteinexpressionsvektor pCAL-n (Invitrogen) in *E.coli* (BL21) exprimiert. Die Aufreinigung wurde durch das Calmodulin-Bindungspeptid-Fusionsprotein (CBP) ermöglicht. Das 4 kDa große CBP bindet in Anwesenheit von geringen Calciumkonzentrationen und bei neutralem pH-Wert an das Protein Calmodulin. Die Elution des Fusionsproteins von dessen Liganden kann bei neutralem pH-Wert und einer EGTA-Konzentration von 2 mM erreicht werden.

3.3.3.1 Aufreinigung des rekombinanten p15E

Für die Aufreinigung wurden 1 ml Calmodulin Affinity Resin (Stratagene) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 200 x g für 2 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Um das Säulenmaterial zu äquilibrieren, wurde es mit jeweils 4 ml CaCl₂-Bindungspuffer 4 x resuspendiert und abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das äquilibrierte Säulenmaterial wurde mit dem Proteinlysat resuspendiert, mit Hilfe des Bindungspuffers auf ein Volumen von 6 ml aufgefüllt und für 2 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Anschließend wurde das Säulenmaterial pelletiert und das ungebundene Material in einem Zentrifugenröhrchen für die spätere SDS-PAGE Analyse aufbewahrt. Es folgten 6 Waschschrte mit jeweils 6 ml Bindungspuffer. Die einzelnen Waschfraktionen wurden für die spätere SDS-PAGE Analyse aufbewahrt. Die Elution des Proteins erfolgte durch 6-maliges Waschen mit 1 ml Elutionspuffer. Die Fraktionen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt und nach der Analyse durch SDS-PAGE vereint.

3.3.4 Dialyse

Die Dialyse stellt eine Möglichkeit dar, Makromoleküle wie z.B. Proteine zu entsalzen oder umzupuffern.

Die vereinten Eluate der rekombinanten PERV-Proteine p27Gag und p15E wurden gegen das 1000-fache Volumen von 1 x PBS jeweils 2 x für 24 h unter Rühren dialysiert. Die Dialysemembran aus regenerierter Zellulose (Serva) hatte eine Molekulargewichtsausschlußgrenze von 12 - 14 kDa.

3.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde die BCA-Methode eingesetzt. Dafür wurden jeweils 10 µl der Probe mit 200 µl Reagenzlösung (Pierce) in einer Mikrotiterplatte versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 560 nm mit einem ELISA-Reader (Tecan) bestimmt. Neben den Proben wurde stets eine BSA-Verdünnungsreihe von 0 bis 1200 µg/ml zur Erstellung einer Standardgeraden mitgeführt. Die jeweilige Probenkonzentration wurde anhand von Triplikaten und dem Tabellenkalkulations-Programm Microsoft Excel anhand der Geradengleichung errechnet.

3.3.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Durchführung der denaturierenden SDS-PAGE, wobei Proteingemische nur nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden, wurden die Proteinproben zunächst mit dem gleichen Volumen an 1 x Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 10 min denaturiert. Für die SDS-PAGE wurde ein Tricine-Puffersystem eingesetzt. Zur späteren Molekulargewichtsabschätzung der Proben wurden jeweils 10 µl des vorgefärbten Proteinstandards SeeBlue Plus 2 mitgeführt. Im 4 %-igen Sammelgel wurden die Proben bei einer angelegten Spannung von 60 V und im 10 %-igen Trenngel bei einer Spannung von 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Der Gellauf wurde beim Herauslaufen der Bromphenolblaulauffront beendet.

3.3.7 Western Blot Analyse

Um Proteine bzw. Peptide immunologisch zu detektieren und zu quantifizieren, wurden sie nach der Auftrennung im SDS-Gel zunächst auf eine PVDF-Membran (Millipore) geblottet. Dazu wurde das SDS-Gel für 10 min in Transferpuffer geschwenkt, die Membran mittels Methanol befeuchtet und dann ebenfalls in den Transferpuffer überführt. Das Blotpapier wurde kurz mit Transferpuffer durchtränkt. Mit Hilfe einer ‚semi-dry‘ Blotkammer (BIO-RAD) wurden die durch das SDS negativ geladenen Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine 0,2 µm PVDF-Membran geblottet. Das Elektrobloiting erfolgte bei einer Spannung von 20 V für 20 min. Beim gleichzeitigen Blotten von 2 Gelen wurde die Blotzeit auf 30 min verlängert. Anschließend wurde die Membran in 5 %-igen Blockierungspuffer für mindestens 1 h schüttelnd inkubiert. Das aus dem Blut immunisierter Ziegen gewonnene Antiserum gegen die PERV-spezifischen Proteine p15E oder p27Gag wurde in einer Verdünnung von 1:200 zu 5 ml Blockierungspuffer gegeben, mit der Membran in einer Folie eingeschweißt und rotierend für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert bzw. über Nacht bei 4 °C. Danach erfolgten 3 Waschschrte von jeweils 10 min mit Waschpuffer, bevor die Membran mit dem Sekundärantikörper (rabbit anti goat-IgG/HRP, Dako) mit einer Verdünnung von 1:2000 in 5 ml Blockierungspuffer für 1 h rotierend inkubiert wurde. Daran schlossen sich wiederum 3 Waschschrte für jeweils 15 min an.

Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines ‚enhanced chemoluminescence‘ (ECL)-Systems. Das Substrat Luminol wird hierbei durch die Meerrettich-Peroxidase in Anwesenheit eines chemischen Verstärkers wie Phenol unter alkalischen Bedingungen oxidiert. Das oxidierte Luminol chemiluminesziert. Die maximale Lichtemission bei einer Wellenlänge von 428 nm kann mit einem für blaues Licht empfindlichen Röntgenfilm detektiert werden. Um eine ECL-Detektion der Proteine bzw. Peptide durchzuführen, wurde die im ‚ECLTM Western Blotting Detection Reagents Kit‘ (Amersham Biosciences) bereitgestellten Reagenzien im gleichen Volumenverhältnis gemischt und für 1 min auf der Membran inkubiert. Abschließend wurde die Membran unter eine Folie in eine lichtdichte Entwicklungskassette gelegt. Die Exposition des Films (CL-XPosureTM, Pierce) variierte je nach Stärke der Signale zwischen 2 und 5 sec. Der Film wurde dann in einem Entwicklungsgerät (Curix 60, Agfa) entwickelt und fotografiert.

3.3.8 Regenerieren der Membran nach einer Western Blot Analyse

Um auf einer PVDF-Membran nach einer erfolgten Detektion auch noch weitere Proteine nachweisen zu können, kann diese regeneriert werden. Dazu erfolgte eine rotierende Inkubation für 1 h in 50 ml Regenerationspuffer bei ca. 60 °C in einem Ofen. Um die Entfernung des Sekundär- bzw. Primärantikörpers sicher zu stellen, wurde die Membran nach dem Regenerieren und einem Waschgang erneut für 1 h im Blockierungspuffer blockiert. Der Sekundärantikörper wurde anschließend unter den gleichen Bedingungen wie beim Western Blot hinzugegeben und 1 h inkubiert. Die ECL-Detektion erfolgte hier für ca. 2 – 3 min. Im Falle einer vollständigen Regeneration konnte durch den Sekundärantikörper (rabbit anti goat-IgG/HRP, Dako) nichts mehr auf der Membran detektiert werden. Nach einem Waschschrift erfolgte eine erneute Inkubation mit einem PERV-spezifischen Antiserum. Die nachfolgenden Schritte entsprachen den oben beschriebenen Schritten der Western Blot Analyse.

3.3.9 Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz lassen sich Proteine in Geweben oder Zellen immunologisch detektieren (Lottspeich & Zorbas, 1998; Kapitel 5.3.4). In Vorbereitung auf die Immunfluoreszenz wurden Zellen von porzinen Melanomzelllinien sowie PK15-Zellen als Positivkontrolle und HEK 293-Zellen als Negativkontrolle in Zellkulturplatten auf sterilen Deckgläschen in 3 ml Medium ausgesät und bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % inkubiert. Nach dem Erreichen einer optimalen Konfluenz von 30 – 40 %, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 1 x für 5 min mit 2 ml PBS gewaschen. Danach erfolgte die Fixierung der Zellen mit 2 ml einer 3,7 %-igen Formaldehydlösung für 30 min bei Raumtemperatur. Nach der Fixierung wurde erneut für 5 min mit 2 ml PBS gewaschen. Um die Zellen zu permeabilisieren, wurden die Zellen mit jeweils 2 ml einer 1 %-igen Triton X-100-Lösung in PBS für 15 min bei Raumtemperatur behandelt. Nach der Permeabilisierung erfolgten 3 Waschschriffe für jeweils 5 min mit 2 ml PBS. Das anschließende Blockieren durch eine 20 minütige Inkubation wurde mit jeweils 2 ml 5 %-igem Trockenmilchpulver in PBS durchgeführt. Daran schloss sich ein einmaliger Waschschrift mit PBS an. Der Puffer wurde anschließend vollständig abgesaugt. Die Inkubation mit dem Ziegenantiserum gegen PERV p27Gag bzw. p15E mit einer Verdünnung von 1:200 in 2,5 %-igem Trockenmilchpulver in PBS erfolgte für 1 h bei 37 °C im Brutschrank (Heraeus). Anschließend wurde 5 x mit PBS für je 5 min bei Raumtemperatur gewaschen. Die

Inkubation mit dem Sekundärantikörper (anti-goat-Fitc-Conjugate, Sigma) wurde mit einer Verdünnung von 1:160 unter den gleichen Bedingungen wie beim Primärantikörper durchgeführt. Nach 3-maligem Waschen mit PBS für jeweils 5 min konnten die Deckgläschen mit dem ‚ProLong Anti Fade Kit‘ (Molecular Probes) eingedeckt werden. Das Eindecken erfolgte nach Herstellerangaben. Das eingedeckte Präparat wurde im Dunkeln über Nacht getrocknet und anschließend mit Hilfe eines Laser Scanning Mikroskops (Zeiss LSM 510) betrachtet. Die Exzitationswellenlänge von FITC beträgt 488 nm und die Emissionswellenlänge 530 nm.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Homogenisierung der porzinen Gewebeproben

Die Aufarbeitung der porzinen Gewebeproben erfolgte mit Hilfe steriler Mörser und Homogenisatoren. Hierzu wurden die bei -80 °C gelagerten Gewebeproben in flüssigen Stickstoff überführt. Alle weiteren Schritte fanden unter dem Abzug statt. In den Homogenisator wurde 1 ml TRI Reagent vorgelegt. Bei der Aufarbeitung der Gewebeproben war darauf zu achten, dass diese nie auftauten, um die vorhandenen RNAsen inaktiv zu halten. Zum Zermahlen der Gewebeprobe wurde der Mörser daher mit etwas flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Eventuell vorhandene Borsten, z.B. an kutanem Gewebe, wurden zuvor mit Hilfe einer sterilen Schere entfernt. Die fein zermahlene Probe wurde anschließend in den Homogenisator überführt. Je nach Probenvolumen wurden noch zusätzlich 2 – 3 ml TRI Reagent hinzugegeben. Nach ausreichender Homogenisierung wurde die Suspension bis zur Aufarbeitung in 1 ml Aliquots bei -80 °C aufbewahrt.

3.4.2 Auftauen von Zellen

Die Kryoröhrchen mit den gefrorenen Zellen wurden bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und anschließend sofort unter sterilen Bedingungen in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit vorgewärmten Medium überführt, da das im Einfriermedium enthaltene DMSO (FKS, 10 % (v/v) DMSO) für eukaryontische Zellen bei Temperaturen über 0 °C toxisch wirkt. Die Zellen wurden dann bei 209 x g für 10 min abzentrifugiert und das Zellpellet in 6 ml vorgewärmtem Medium aufgenommen und in einer 25 cm² Zellkulturflasche ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

3.4.3 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Gehalt im Brutschrank (Heraeus). Als Kultivierungsmedium für die Melanomzelllinien wurde RPMI-1640 eingesetzt. Die HEK 293-Zellen, PK15-Zellen und als Ausnahme zu den anderen Melanomzelllinien auch Lunge ST P45- und P87-Zellen wurden in DMEM mit 4,5 g/l Glucose kultiviert.

3.4.4 Passagieren von Zellen

Nach Erreichen eines 90 %-igen Konfluenzgrades der Zellen wurden diese mit Hilfe eines Zellschabers vom Zellkulturflaschenboden abgelöst und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Je nach erforderlicher Zelldichte wurden die Zellen in einem bestimmten Verhältnis gesplittet und auf eine weitere 25 cm² oder 75 cm² Zellkulturflasche überführt.

3.4.5 Zellernte

Zunächst wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die adhärenenten Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die Ablösung der Zellen vom Kulturflaschenboden erfolgte nach der Zugabe von 1 – 2 ml TRI Reagent mit Hilfe eines Zellschabers. Die in TRI Reagent aufgenommenen Zellen wurden bis zur Verwendung in 1 ml Aliquots bei -80 °C eingefroren.

3.4.6 Einfrieren von Zellen

Die Zellen einer 25 cm² Zellkulturflasche wurden mit einem Zellschaber vom Kulturflaschenboden abgelöst und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Das Pelletieren der Zellen erfolgte bei 209 x g für 10 min. Das Zellpellet wurde anschließend mit 6 ml Medium gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 1 ml Einfriermedium aufgenommen. Die Zellen wurden in einem Kryoröhrchen sofort auf Eis gestellt und über Nacht im -80 °C Tiefkühler aufbewahrt. Am nächsten Tag erfolgte die Überführung in flüssigen Stickstoff zur Langzeitlagerung.

3.4.7 Viruspräparation durch Ultrazentrifugation

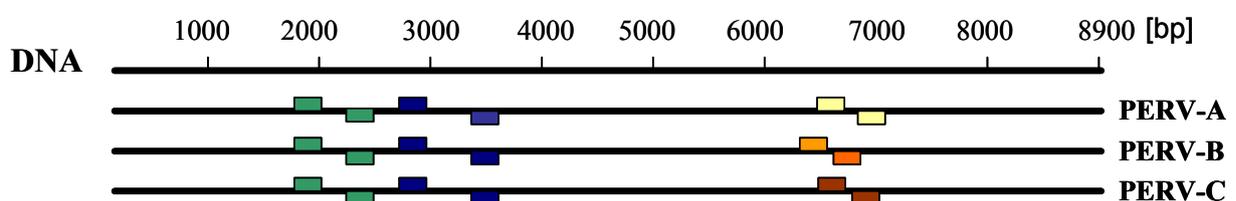
Das Pelletieren von PERV-Partikeln aus den gesammelten Überständen PERV-infizierter HEK 293-Zellen (293/5⁰) erfolgte durch eine Ultrazentrifugation mit einem Saccharose-Kissen. 15 ml einer 22 %-igen Saccharoselösung wurden in ein Beckmann-zentrifugenröhrchen gefüllt und vorsichtig mit dem Zelllysate überschichtet. Mit Hilfe von PBS wurden die Zentrifugenröhrchen gegeneinander austariert. Die Ultrazentrifugation erfolgte mit dem swing-out-Rotor (SW-28, Beckmann) bei 24.000 rpm für 2,5 h bei 4 °C in der Ultrazentrifuge Beckmann L8-70. Nach dem Zentrifugenlauf wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen. Zum vollständigen Auslaufen des Überstandes wurde das Zentrifugenröhrchen für einige Minuten auf den Kopf gestellt. Anschließend wurde das Viruspellet mit 1 ml PBS überschichtet und zur vollständigen Resuspendierung über Nacht bei 4 °C verwahrt. Am nächsten Morgen wurde die Virussuspension nach mehrmaligem Resuspendieren mit der Pipette in 20 µl Aliquots bei -20 °C eingefroren.

4. Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in 4 Bereiche. Es werden zunächst die Untersuchungen zum Vorkommen der PERV-Proviren auf DNA-Ebene beschrieben. Daran schließen sich die Untersuchung der PERV-Expression und die Etablierung eines Tumornachweissystems unter Verwendung eines porzinen Melanommarkers auf RNA-Ebene an. Der abschließende Teil befasst sich mit dem Nachweis der PERV-Expression auf Proteinebene.

4.1 Nachweis der Provirus-Integration

Als Voraussetzung für die Untersuchung der PERV-Expression in den Melanombiopsien bzw. in den Melanomzelllinien musste zunächst ein Nachweis der Provirus-Integration im Genom der Spendertiere erbracht werden. Als Matrize diente die mittels TRI Reagent aus den porzinen Gewebeproben bzw. aus den Melanomzelllinien isolierte DNA. Der Provirus-Nachweis erfolgte mit Hilfe der PCR unter dem Einsatz spezifischer Primer zur Detektion der PERV-Gene *gag* und *pol* sowie der *env*-Gene der PERV-Subtypen A, B und C (Abb. 4.1).



Primerpaare:

■ *gag* up/down ■ *pol* up/down ■ *envA* up/down ■ *envB* up/down ■ *envC* up/down

Abb.:4.1: Bindungsstellen der Primer an der PERV-DNA zum Nachweis der *gag*- und *pol*-Gene sowie der *env*-Gene der 3 Subtypen

Die nach der Auftrennung im Agarosegel erhaltenen Amplifikate sind aufgrund der gleichen Resultate bei allen 5 Tieren exemplarisch für das Troll-Tier # 7 dargestellt (Abb. 4.2). Als Positivkontrolle diente die DNA eines zuvor positiv getestetes Troll-Tieres. Als Negativkontrolle wurde ddH₂O eingesetzt.

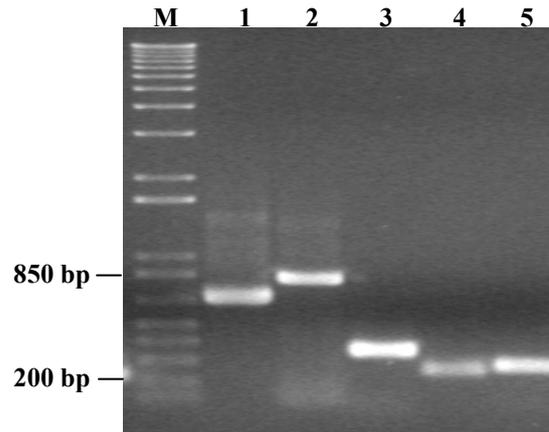


Abb.4.2: Provirus-Nachweis durch PCR für das Troll-Tier # 7; 1 %-iges Agarosegel, M: 1 kb⁺-Marker, 1: *gag* (662 bp), 2: *pol* (815 bp), 3: *envA* (360 bp), 4: *envB* (263 bp), 5: *envC* (280 bp)

Im Genom aller getesteten Tiere konnte die DNA aller PERV-Subtypen nachgewiesen werden, so dass die Voraussetzung für die Untersuchung der PERV-Expression auf RNA-Ebene gegeben war.

4.2 Nachweis der PERV-Expression auf RNA-Ebene

4.2.1 Charakterisierung der isolierten RNA

Um die PERV-Expression in den Melanomen im Vergleich zu der Expression in normaler Haut und anderen Geweben zu untersuchen, wurde zuerst die Expression auf mRNA-Ebene analysiert.

Die mittels einer Kombination aus TRI-Reagent und RNeasy Mini Kit isolierte RNA der Melanombiopsien und Melanomzelllinien musste zunächst auf ihre Intaktheit sowie auf DNA-freie Aufreinigung überprüft werden. Eine One-Step RT-PCR zum Nachweis porziner Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (*GAPDH*) wurde zur Beurteilung der RNA-Qualität durchgeführt. Da es sich bei *GAPDH* um ein Haushaltsgen handelt, kann davon ausgegangen werden, dass es in allen Geweben exprimiert wird. Die Kontrolle auf eventuelle DNA-Kontaminationen der RNA-Isolate trotz eines erfolgten DNaseverdaus auf den Mini Kit Silicasäulen erfolgte mittels PCR ohne vorgeschaltete Reverse Transkription (ohne RT). Für jedes RNA-Isolat wurden die PCR Proben mit und ohne RT-Schritt nebeneinander auf ein Agarosegel aufgetragen. Es sind die Ergebnisse exemplarisch anhand der Proben verschiedener Melanomzelllinien dargestellt (Abb. 4.3). Es wurden jeweils 100 ng RNA als

Matrize eingesetzt. Als Positivkontrollen wurden bei der One-Step RT-PCR PK15-RNA bzw. bei der Kontroll-PCR (ohne RT) PK15-DNA verwendet. Als Negativkontrolle wurde ddH₂O eingesetzt. Alle Proben zeigten bei der PCR mit RT-Schritt ein GAPDH-Amplifikat mit einer Länge von 150 bp, jedoch kein Amplifikat bei der PCR ohne RT-Schritt (Bahnen 1 – 5).

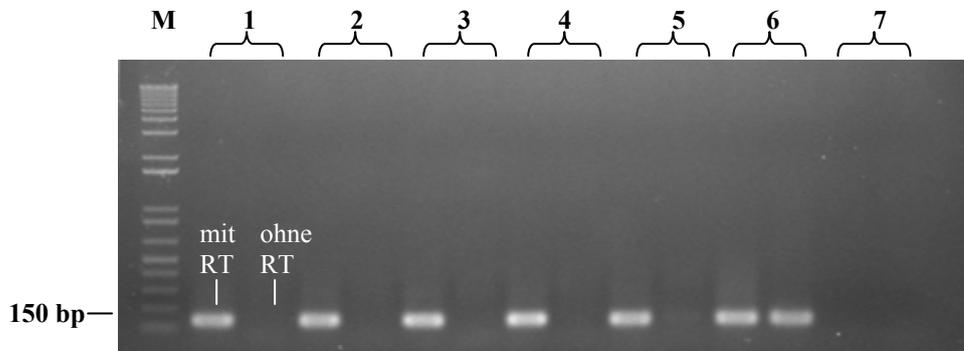


Abb.4.3: One-Step RT-PCR und Kontroll-PCR ohne RT-Schritt für porcine *GAPDH*, 1 %-iges Agarosegel, M: 1 kb⁺-Marker, 1: Lunge ST P21, 2: Lunge ST P60, 3: Lunge ST P40, 4: Milz P5, 5: Lunge ST P45, 6: PK15-RNA/ PK15-DNA; 7: ddH₂O (P entspricht der Passagenanzahl, ST bzw. LT entspricht schwer bzw. leicht trypsinierbar)

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Proben frei von DNA-Kontaminationen waren und die RNA während der Isolation nicht degradiert wurde. Die RNA-Proben konnten deshalb für eine weiterführende Analyse verwendet werden.

4.2.2 Analyse der PERV-Expression auf RNA-Ebene

Mit Hilfe der One-Step RT-PCR wurde die PERV-mRNA Expression in den RNA-Proben untersucht. Hierfür wurden Primer zur Detektion von Vollängen- und gespleißter *env*-mRNA sowie von *gag*-, *pol*- und *envA*, *-B*, *-C*-mRNA eingesetzt. Die Bindungsstellen der Primerpaare zum Nachweis der Vollängen- und gespleißten *env*-mRNA sind im Folgenden dargestellt (Abb. 4.4).

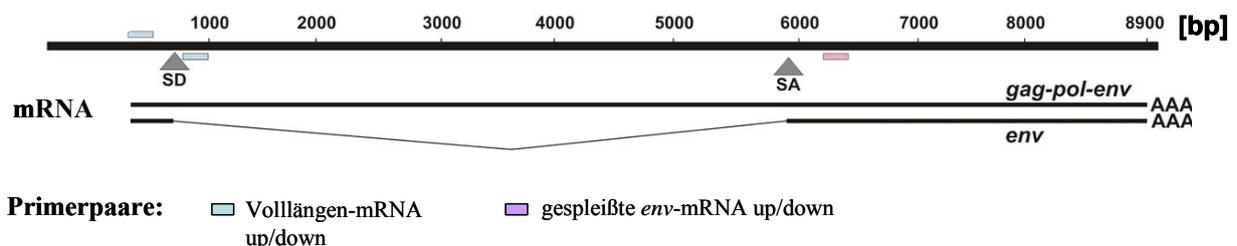


Abb.4.4: Bindungsstellen der Primer an der PERV-mRNA zum Nachweis der Vollängen- und gespleißten *env*-mRNA (SD entspricht dem Splicedonor, SA entspricht dem Spliceakzeptor)

Die Primer für *gag* und *pol* binden hierbei an die Vollängen-mRNA, die Primer für *envA*, -*B* und -*C* an die Vollängen-mRNA und an die gespleißte-*env*-mRNA. Die eingesetzte Menge an RNA betrug 100 ng. Die Ergebnisse sind exemplarisch anhand der aus der Milz des Troll-Tieres # 372 isolierten RNA dargestellt (Abb. 4.5). Die One-Step RT-PCR ergab nach der Auftrennung der PCR-Proben im Agarosegel für alle getesteten PERV-spezifischen RNAs ein Amplifikat.

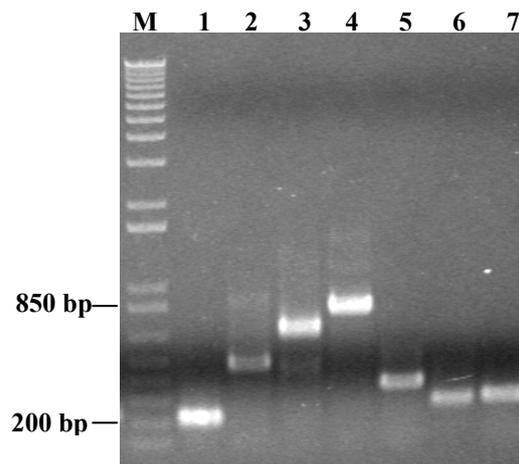


Abb.4.5: One-Step RT-PCR zum Nachweis PERV-spezifischer RNA aus der Milz des Troll-Tieres # 372, 1 %-iges Agarosegel, M: 1 kb⁺-Marker, 1: Vollängen-mRNA (200 bp), 2: gespleißte *env*-mRNA (500 bp); 3: *gag* (662 bp) , 4: *pol* (815 bp), 5: *envA* (360 bp), 6: *envB* (263 bp), 7: *envC* (280 bp)

In sämtlichen Proben konnten alle PERV-spezifischen mRNAs detektiert werden. Aufgrund der Tatsache, dass neben Vollängen-mRNA auch gespleißte *env*-mRNA nachgewiesen werden konnte, ist die wesentliche Voraussetzung für die Synthese intakter PERV-Partikel erfüllt. Da sowohl in allen Melanomzelllinien sowie in den PBMCs als auch im normalen und pathologisch veränderten Gewebe eine PERV-Expression nachweisbar war, sollten diese Expressionen im Folgenden relativ quantifiziert werden.

4.2.3 Relative Quantifizierung der PERV-mRNA-Expression

Zur Quantifizierung der PERV-mRNA wurde eine One-Step realtime RT-PCR etabliert. Im Vergleich zur Standard Realtime PCR ersparte diese Methode die vorherige cDNA-Synthese. Die isolierte RNA konnte nach der Konzentrationsbestimmung direkt als Matrize eingesetzt werden, so dass dabei die Verdünnungs- und Pipettierfehler so gering wie möglich gehalten wurden. Es wurde somit eine genaue und reproduzierbare Quantifizierung ermöglicht.

Um zunächst die Effizienz des Primerpaares PERV_real s/as unter den gegebenen Bedingungen der One-Step realtime RT-PCR zu bestimmen, wurde mit Hilfe von aus PK15-Zellen isolierter RNA eine Verdünnungsreihe in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 50 ng Gesamt-RNA hergestellt. Diese wurde zur Ermittlung der Standardgeraden in die One-Step realtime RT-PCR eingesetzt. Das MX-4000 Software-Programm errechnete für die Standardgerade einen Korrelationskoeffizienten von 0,985 und eine Primereffizienz von 102 % (Abb. 4.6).

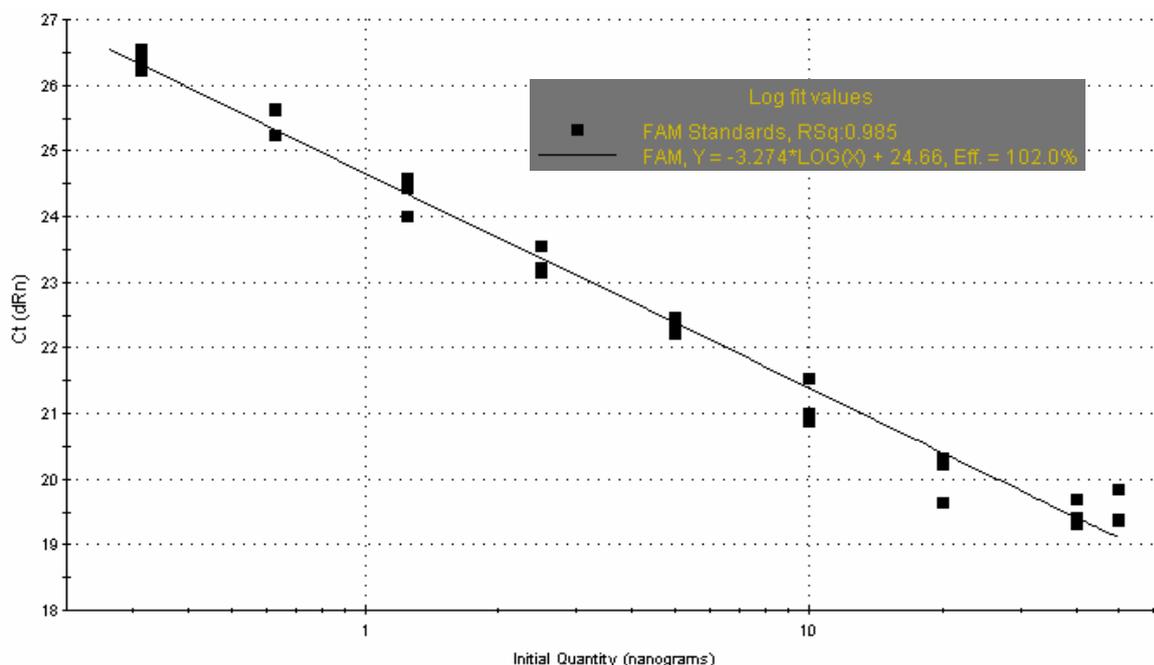


Abb.4.6: Standardgerade auf der Basis von PK15-Gesamt-RNA zur Ermittlung der Primereffizienz für die One-Step realtime RT-PCR

Die ermittelte Primereffizienz von 102 % garantierte eine genaue Quantifizierung der Proben mit dieser Methode unter den gegebenen Bedingungen.

Als nächstes konnte die Expression in den Gewebeproben und den Zellen bzw. Melanomzelllinien relativ zur PERV-Expression in PK15-Zellen nach der $2^{-\Delta CT}$ -Methode quantifiziert werden (Abb. 4.7 und 4.8). Hierfür wurden 50 ng Gesamt-RNA eingesetzt.

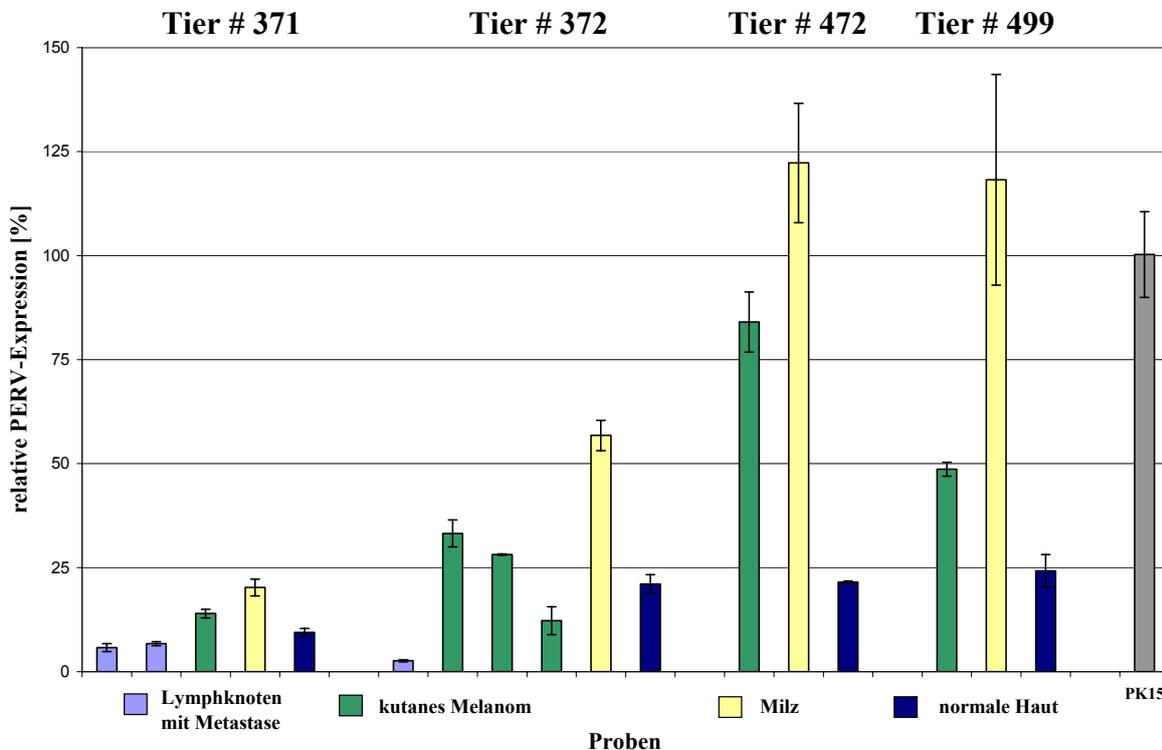


Abb.4.7: Relative PERV-Expression in den Gewebeproben bezogen auf die PERV-Expression in PK15-Zellen

Die Kontroll-Realtime PCR ohne RT-Schritt wies für sämtliche Proben keine CT-Werte auf. Eventuelle DNA-Kontaminationen, die die mRNA-Quantifizierung verfälscht hätten, konnten somit ausgeschlossen werden.

Die PERV-Expression in den Gewebeproben der 4 getesteten Tiere variierte stark. Die Expression in den Hautbiopsien war aber bei 3 von 4 Tieren annähernd gleich hoch. Bei den Tieren # 371 und # 372 sind die PERV-Expressionen in den Lymphknotenmetastasenbiopsien am geringsten. Die Lymphknotenbiopsie des Troll-Tieres # 371 wurde während des Homogenisationsschrittes zur Aufnahme in TRI Reagent in 2 Teile geteilt und getrennt voneinander aufgearbeitet. Der 1. Teil enthielt keine offensichtliche Metastase, wohingegen im 2. Teil durch eine melaninbedingte Schwarzfärbung das Vorhandensein der Metastase erkennbar war. Beide Proben wiesen keinen offensichtlichen Unterschied hinsichtlich der PERV-Expression auf. Die Biopsien der kutanen Melanome zeigten hingegen mit nur einer Ausnahme bei Tier # 372 bei allen 4 Tieren eine höhere Expression als in der jeweiligen Haut auf. In den Milzbiopsien ließen sich stets die höchsten PERV-Expressionen nachweisen. Die

PERV-Expressionen in den Milzbiopsien waren bei den Troll-Tieren # 472 und # 499 sogar höher als in den PK15-Zellen. Beim Troll-Tier # 371 war neben der geringsten Expression in der normalen Haut auch die geringste Expression in der Milz im Vergleich zu den anderen Tieren zu verzeichnen.

Auch die PERV-Expressionen in den getesteten Melanomzelllinien sowie in den PBMCs und Nevizellen variierten stark (Abb. 4.8).

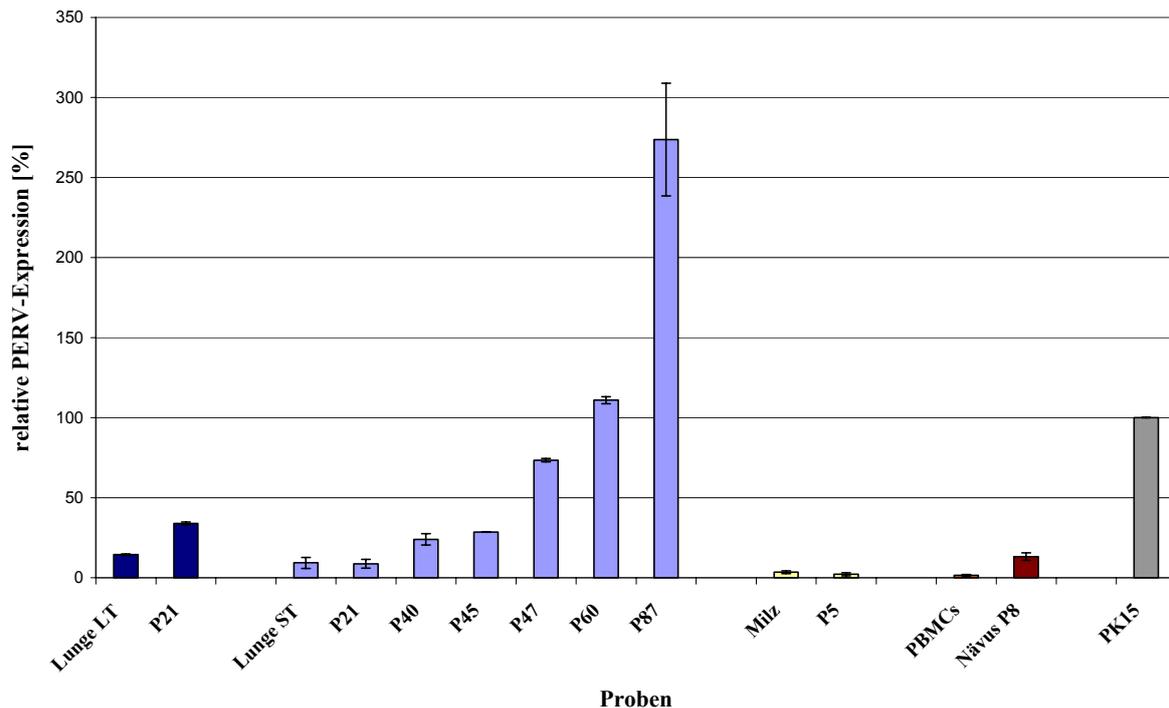


Abb.4.8: Relative PERV-Expression in den Melanomzelllinien bzw. in PBMCs und Nevizellen des Troll-Tieres # 7 bezogen auf die PERV-Expression in PK15-Zellen
(gleiche Zelllinien sind durch gleiche Farbgebung gekennzeichnet; P entspricht der Passagenanzahl, ST bzw. LT entspricht schwer bzw. leicht trypsinierbar)

In den PBMCs wurde die geringste Expression nachgewiesen. Die PERV-Expression nahm bei den Melanomzelllinien Lunge LT und Lunge ST mit zunehmender Anzahl an Passagen zu. Bei der Zelllinie Lunge LT war in der 21. Passage eine doppelt so hohe PERV-Expression im Vergleich zur Ausgangskultur zu verzeichnen. Bei der Zelllinie ST war ein deutlicher Anstieg bzw. eine Verdopplung der PERV-Expression in der 40. Passage im Vergleich zur Ausgangskultur zu sehen. Nach der 45. Passage stieg die PERV-Expression exponentiell mit zunehmender Passagenanzahl an. In der 60. Passage lag die PERV-Expression oberhalb derer des Kalibrators PK15. Die 87. Passage zeigte eine 170-fach höhere Expression im Vergleich zu der Expression in PK15-Zellen. Bei der Milz-Melanomzelllinie wurde nur eine sehr geringe PERV-Expression im Vergleich zu den getesteten Ausgangskulturen der

Lungenmetastasenzelllinien detektiert. Bei der 5. Passage war noch kein Unterschied hinsichtlich der Expression im Vergleich zur Ausgangskultur zu sehen. Die PERV-Expression bei der 8. Passage von Nevizellen war vergleichbar mit der Expression bei der Ausgangskultur der Lunge LT Zelllinie.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei den Gewebeproben die PERV-Expression in den kutanen Melanomen höher als in normaler Haut war. Allerdings wiesen die Milzbiopsien durchgängig die höchsten Expressionen auf. Die Expressionen in den Lymphknotenbiopsien mit Metastasen waren niedriger als in normaler Haut.

Die PERV-Expressionen in den Ausgangskulturen der verschiedenen Melanomzelllinien waren höher als in den PBMCs. Die Milzmetastasenzelllinie wies eine geringere PERV-Expression als die Lungenmetastasenzelllinien auf. In Abhängigkeit von der Passagenanzahl der Lungenmetastasenzelllinien konnte zudem eine Steigerung in der PERV-Expression nachgewiesen werden.

4.3 Etablierung eines porzinen Melanommarkers

Der Nachweis, dass es sich bei den untersuchten porzinen Biopsien um Melanomgewebe bzw. Gewebe mit Metastasen handelte, sollte mit Hilfe eines geeigneten Melanommarkers erfolgen. Als Tumormarker gelten die in Tumoren bzw. im Blut oder auch in anderen Körperflüssigkeiten zirkulierenden Makromoleküle, deren Auftreten oder Konzentrationsänderungen mit der Entstehung bzw. mit dem Wachstum von malignen Tumoren korrelieren. Ein Tumormarker zeichnet sich idealerweise durch seine Tumorspezifität aus, d.h. die Expression im Tumorgewebe liegt oberhalb des Grenzwertes im gesunden Gewebe (Cut off-Wert). Ein kommerziell erhältlicher Tumormarker für das humane maligne Melanom ist z.B. MIA (Melanoma inhibitory factor). Aufgrund von Erfahrungen des Labormitglieds Kristina Büscher war bekannt, dass MIA als Tumormarker für das porzine System nicht funktioniert. Demzufolge musste nach einer Alternative gesucht werden.

Die Melaninproduktion ist in Melanomen stark erhöht. Der Prozess der Melaninbildung wird durch eine Enzymkaskade reguliert. Ein daran beteiligtes Enzym ist die Tyrosinase. Auf Grundlage der in der NCBI Datenbank gespeicherten 1,9 kb großen mRNA-Sequenz für die porzine *Tyrosinase* (Accession Nr. NM_001025212) wurde mit dem Programm PrimerSelect ein Primerpaar entwickelt (Abb. 4.9).

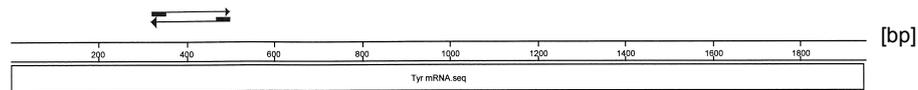


Abb.4.9: Bindungsstellen des forward (ssTyr1 for) und reverse Primers (ssTyr1 rev) an der Tyrosinase-mRNA

Die mRNA-Expression der porzinen *Tyrosinase* in den Melanombiopsien bzw. in den Gewebeproben mit Metastasen sollte im Vergleich zur Expression in normaler Haut des jeweiligen Spendertieres relativ quantifiziert werden. Die *GAPDH*-Expressionen in den Proben wurden dabei zur Normalisierung der Werte eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte aus Kosten- und Zeitgründen mittels Sybr Green realtime PCR.

Das entwickelte Primerpaar ssTyr1 for/rev wurde zunächst bei der durch das PrimerSelect Programm errechneten Annealingtemperatur von 53,8 °C in einer One-Step RT-PCR getestet (Abb. 4.10).

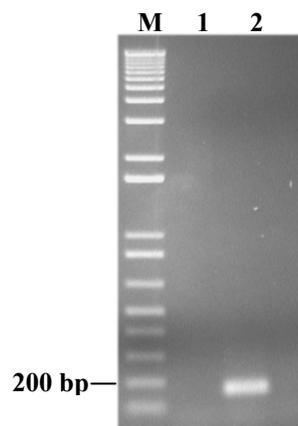


Abb.4.10: One-Step RT-PCR mit ssTyr1-Primern zum Nachweis porziner *Tyrosinase*; 1 %-iges Agarosegel, 1: Negativkontrolle (ddH₂O), 2: normale Haut des Troll-Tieres # 372

Nach der Auftrennung der PCR-Proben im Agarosegel war eine distinkte Bande kurz unter der 200 bp Markerbande zu erkennen (Abb. 4.10 Bahn 2). Diese entsprach der durch das Programm PrimerSelect errechneten Bande mit einer Größe von 177 bp. Die Negativkontrolle (Bahn 1) zeigte keine Banden auf, was die mögliche Bildung von störenden Primerdimeren ausschloss. Das Primerpaar konnte unter diesen Bedingungen für die Sybr Green realtime PCR zum Nachweis porziner *Tyrosinase* verwendet werden.

Um die Effizienz des Primerpaares ssTyr1 for/rev unter den gegebenen Bedingungen der Sybr Green realtime PCR zu bestimmen, wurde mit Hilfe der cDNA der normalen Haut des Troll-

Tieres # 372 eine Verdünnungsreihe in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 30 ng cDNA hergestellt und in die Sybr Green realtime PCR eingesetzt. Das MX-4000 Software-Programm errechnete für die Standardgerade einen Korrelationskoeffizienten von 0,970 und eine Primereffizienz von 101,5 % (Abb. 4.11).

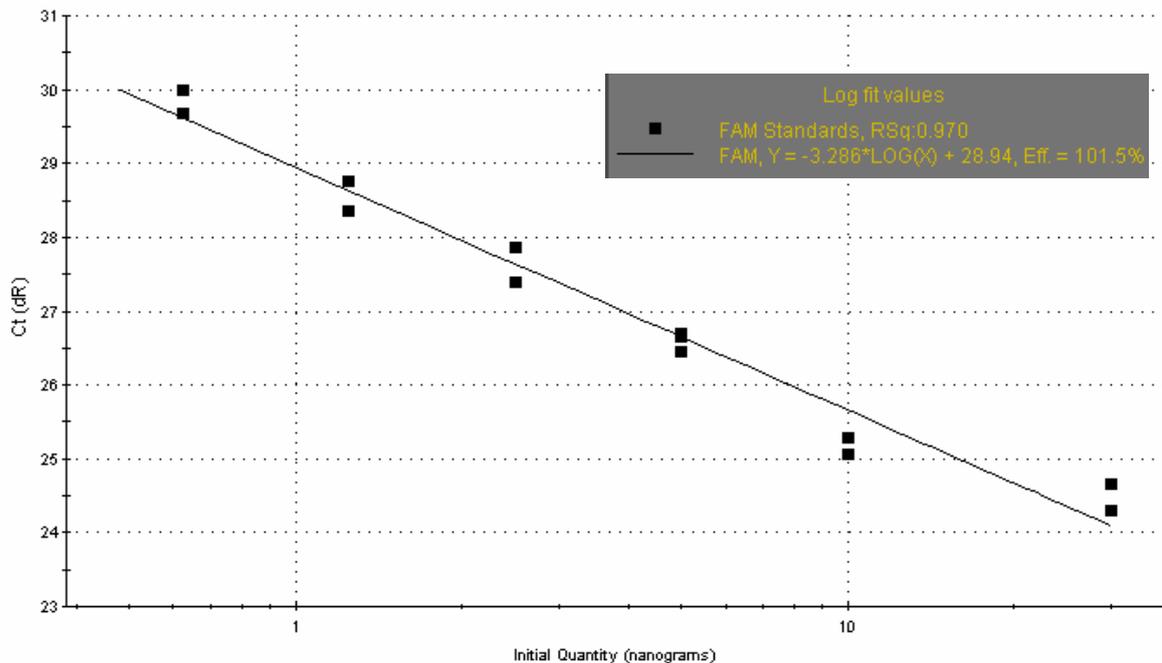


Abb.4.11: Standardgerade mit der cDNA normaler Haut (Troll-Tier # 371) als Matrize zur Ermittlung der Primereffizienz für die Sybr Green realtime PCR

Aufgrund der ermittelten 101,5 %-igen Primereffizienz war eine Voraussetzung für eine genaue relative Quantifizierung der Proben erfüllt.

Eine weitere Bedingung für eine exakte Quantifizierung mittels Sybr Green ist die Amplifikation spezifischer PCR-Produkte. Die Dissoziationskurven geben hierbei Auskunft über das Vorhandensein von spezifischen und unspezifischen PCR-Amplifikaten.

Die Dissoziationskurven für die Sybr Green realtime PCR zum Nachweis porziner *Tyrosinase* sind für die Proben des Tieres # 472 dargestellt (Abb. 4.12).

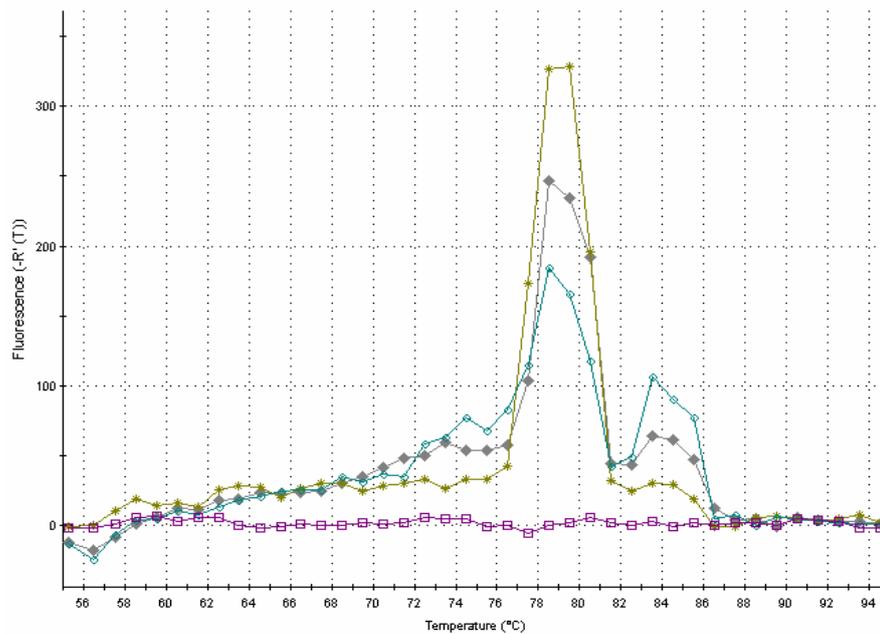


Abb.4.12: Dissoziationskurve bei der Sybr Green realtime PCR zum Nachweis porciner *Tyrosinase* am Beispiel der Proben vom Troll-Tier # 472; Magenta: Negativkontrolle (ddH₂O), Grün: kutanes Melanom, Grau: Milz, Hellblau: normale Haut

Die Dissoziationskurven bei der Sybr Green realtime PCR mit ssTyr1-Primern wiesen alle ein Maximum bei einer Schmelztemperatur zwischen 78 °C und 79 °C auf. Die durch PrimerSelect errechnete Schmelztemperatur des Amplifikates lag bei 74,4 °C. Ein weiterer wesentlich kleinerer Anstieg war bei einer Temperatur zwischen 83 °C und 84 °C zu sehen. Um sicher zu stellen, dass das richtige Produkt amplifiziert und detektiert wurde, wurden die Sybr Green realtime PCR Proben exemplarisch für das Troll-Tier # 472 auf ein 1,5 %-iges Agarosegel aufgetragen (Abb. 4.13).

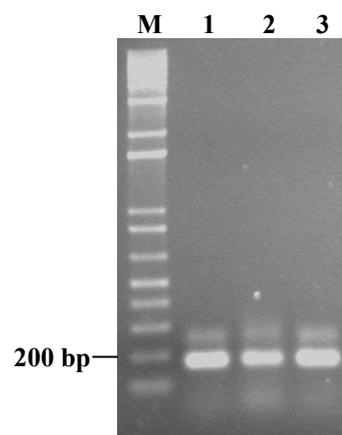


Abb.4.13: Auftrennung der PCR-Produkte der Sybr Green realtime PCR zum Nachweis porciner *Tyrosinase* am Beispiel der Proben vom Tier # 472; 1,5 %-iges Agarosegel, 1: Milz, 2: normale Haut, 3: kutanes Melanom

Die Agarosegelelektrophorese bestätigte im Wesentlichen die Ergebnisse der Dissoziationskurven.

Es waren jeweils 2 Banden pro Probe sichtbar (Abb. 4.13). Eine sehr starke Bande lag wie zuvor bei der One-Step RT-PCR mit ssTyr1-Primern (Abb. 4.10) kurz unter der 200 bp Markerbande auf Höhe der durch PrimerSelect errechneten Amplifikatgröße von 177 bp. Die zweite, wesentlich schwächere Bande wies eine ungefähre Größe von 250 bp auf. Hierbei handelte es sich um ein unspezifisches PCR-Produkt.

Die Dissoziationskurven bei der Sybr Green realtime PCR zum Nachweis porziner *GAPDH* sind exemplarisch für die Proben des Troll-Tieres # 472 abgebildet (Abb. 4.14).

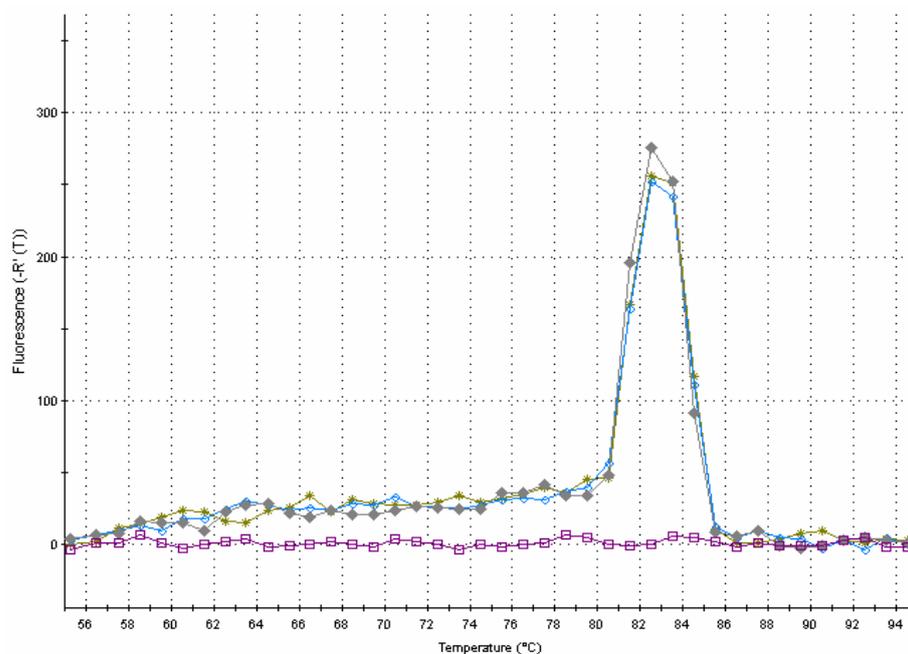


Abb.4.14: Dissoziationskurve bei der Sybr Green realtime PCR zum Nachweis porziner *GAPDH* am Beispiel der Proben vom Troll-Tier # 472; Magenta: Negativkontrolle (ddH₂O), Grün: kutanes Melanom, Grau: Milz, Hellblau: normale Haut

Die Dissoziationskurven bei der Sybr Green realtime PCR mit porzinen *GAPDH*-Primern zeigten ein Maximum bei einer Schmelztemperatur zwischen 82 °C und 83 °C. Diese Temperatur entsprach der für das *GAPDH*-Amplifikat errechneten Schmelztemperatur.

Die Dissoziationskurven bzw. die Agarosegelelektrophorese für die Proben sprachen für den Einsatz der ssTyr1- und *GAPDH*-Primer in der Sybr Green realtime PCR.

Die Ergebnisse der Sybr Green realtime PCR für die Gewebeproben mit jeweils 25 ng an cDNA sind für jedes Tier tabellarisch dargestellt (Tab. 4.1 - 4.4). Auf die separate Aufführung der *GAPDH*-Expressionen in den Gewebeproben wurde verzichtet, da die Expressionen in allen Geweben auf annähernd gleichem Niveau lagen. Die Berechnungen zur relativen Quantifizierung erfolgten mittels $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode.

Zur besseren Veranschaulichung wurden neben den normalisierten *Tyrosinase*-Expressionen auch die zuvor ermittelten PERV-Expressionen in den jeweiligen Melanombiopsien im Vergleich zur Expression in normaler Haut aufgeführt.

Tab. 4.1: Relative *Tyrosinase*- bzw. PERV-Expressionen in den Biopsien bezogen auf die Expression in normaler Haut des Troll-Tieres # 371

Biopsie	<i>Tyrosinase</i>-Expression	PERV-Expression
Lymphknoten mit Metastase a	4,68 +/- 0,57	0,62 +/- 0,10
Lymphknoten mit Metastase b	33,88 +/- 4,80	0,72 +/- 0,05
Kutanes Melanom	29,58 +/- 0,47	1,48 +/- 0,10
Milz	1,10 +/- 0,16	2,16 +/- 0,21
<i>Normale Haut</i>	1,00 +/- 0,09	1,00 +/- 0,10

Tab. 4.2: Relative *Tyrosinase*- bzw. PERV-Expressionen in den Biopsien bezogen auf die Expression in normaler Haut des Troll-Tieres # 372

Biopsie	<i>Tyrosinase</i>-Expression	PERV-Expression
Lymphknoten	5,18 +/- 1,33	0,13 +/- 0,01
Kutanes Melanom	3,85 +/- 0,69	1,58 +/- 0,16
Kutanes Melanom	19,65 +/- 1,35	1,34 +/- 0,01
Kutanes Melanom	24,02 +/- 3,17	0,58 +/- 0,16
Milz	0,78 +/- 0,23	2,71 +/- 0,17
<i>Normale Haut</i>	1,00 +/- 0,11	1,00 +/- 0,11

Tab. 4.3: Relative *Tyrosinase*- bzw. PERV-Expressionen in den Biopsien bezogen auf die Expression in normaler Haut des Troll-Tieres # 472

Biopsie	<i>Tyrosinase</i>-Expression	PERV-Expression
kutanes Melanom	215,39 +/- 35,54	3,90 +/- 0,34
Milz	5,90 +/- 2,84	5,68 +/- 0,67
<i>Normale Haut</i>	1,00 +/- 0,28	1,00 +/- 0,01

Tab. 4.4: Relative *Tyrosinase*- bzw. PERV-Expressionen in den Biopsien bezogen auf die Expression in normaler Haut des Troll-Tieres # 499

Biopsie	<i>Tyrosinase</i>-Expression	PERV-Expression
Kutanes Melanom	4,21 +/- 1,55	2,03 +/- 0,07
Milz	0,46 +/- 0,19	4,92 +/- 1,05
<i>Normale Haut</i>	1,00 +/- 0,20	1,00 +/- 0,16

Bei allen 4 Tieren war die *Tyrosinase*-Expression in den kutanen Melanomen im Vergleich zur normalen Haut stark bis sehr stark erhöht. Die Expressionen waren mindestens 4- bis circa 30-fach erhöht. Beim Troll-Tier # 472 wurde sogar eine 215-fach höhere Expression nachgewiesen (Tab. 4.3). Auffällig war, dass die *Tyrosinase*-Expressionen in den 3 getesteten kutanen Melanomen des Troll-Tieres # 372 unterschiedlich stark waren (Tab. 4.2). Es war keine Korrelation mit der Stärke der PERV-Expression ersichtlich. Die Lymphknotenbiopsien mit Metastasen der Troll-Tiere # 371 und # 372 zeigten eine höhere *Tyrosinase*-Expression als in normaler Haut auf (Tab. 4.1 und 4.2). Die Expressionen waren circa 5- bis 34-fach erhöht. Die gesplittete Lymphknotenbiopsie des Tieres # 371 wies eine geringere *Tyrosinase*-Expression in dem Teil ohne offensichtliche maligne Veränderung (Lymphknoten mit Metastase a) im Vergleich zu dem Teil mit Metastasenbefall (Lymphknoten mit Metastase b) auf. Die PERV-Expressionen waren in beiden Teilen hingegen gleich stark (Tab. 4.1). Mit Ausnahme der Biopsie vom Troll-Tier # 472, welches auch schon eine sehr hohe Expression im kutanen Melanom aufwies, waren bei allen Milzbiopsien der Spendertiere keine erhöhten *Tyrosinase*-Expressionen im Vergleich zur normalen Haut zu verzeichnen (Tab. 4.3).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die *Tyrosinase*-Expressionen in allen Primärtumoren (kutanen Melanomen) und in den Geweben mit Metastasen im Vergleich zur

normalen Haut mindestens um das 4- bis 5-fache erhöht waren, womit der Melanomcharakter bestätigt wurde. In den Milzbiopsien waren keine bzw. nur geringfügig höhere *Tyrosinase*-Expressionen zu verzeichnen.

4.4 Nachweis der PERV-Expression auf Proteinebene

4.4.1 Western Blot Analysen

4.4.1.1 Etablierung der Positivkontrollen

Für den Nachweis der Expression der PERV-spezifischen Proteine p15E und p27Gag in Western Blot Analysen wurden Positivkontrollen benötigt. Dazu wurden Transformationen von *E.coli* mit den Expressionsvektoren pCALn(*p15E*) und pQ-30(*p27gag*) durchgeführt. Nach der jeweiligen Proteinexpression durch IPTG-Induktion erfolgte die Aufreinigung der rekombinanten Proteine. Das Ergebnis der IPTG-Induktion zur Expression der rekombinanten Proteine ist nachfolgend dargestellt (Abb. 4.15).

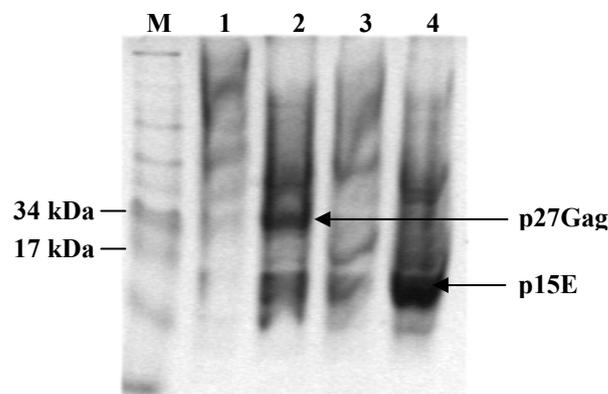


Abb.4.15: SDS-PAGE Analyse der IPTG-induzierten Expression von p27Gag bzw. p15E;

M: SeeBlue Plus2-Marker, 1 und 2: vor und nach der IPTG-Induktion der p27Gag Expression, 3 und 4: vor und nach der IPTG-Induktion der p15E Expression

Wie anhand der SDS-PAGE Analyse ersichtlich wurde, war sowohl die p27Gag-Expression als auch die p15E-Expression in *E.coli* erfolgreich (Abb. 4.15). Im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle (Bahn 1) der p27Gag-Expression war bei der induzierten Kontrolle (Bahn 2) kurz unter der 34 kDa-Markerbande eine starke Proteinbande zu sehen. Das rekombinante p27Gag mit dem 6x His-Taq hatte eine zu erwartende Größe von ca. 28 kDa. Der 6x His-Taq hat eine Größe von 0,823 kDa und verändert somit die Größe des rekombinanten Proteins (27 kDa) nur unwesentlich. Bei der p15E-Expression war ebenfalls

im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle in Bahn 3 eine sehr starke Proteinbande unter der 17 kDa-Markerbande in Bahn 4 sichtbar. Das rekombinante p15E setzt sich aus der p15E-Ektodomäne mit einer Größe von 12 kDa und dem 4 kDa großen Calmodulin-Bindungspeptid-Fusionsprotein zusammen. Demzufolge hatte das rekombinante p15E eine zu erwartende Größe von 16 kDa. Die jeweiligen Zellysate konnten nun zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine eingesetzt werden.

Während der Proteinaufreinigungen mittels Ni-NTA- bzw. Calmodulin-Affinitätschromatographie wurden zur späteren Beurteilung der Qualität der Aufreinigung sämtliche Fraktionen für die SDS-PAGE Analyse aufbewahrt. Die SDS-PAGE Analysen für die p27Gag- bzw. p15E-Aufreinigungen sind im Folgenden dargestellt (Abb. 4.16 und 4.17).

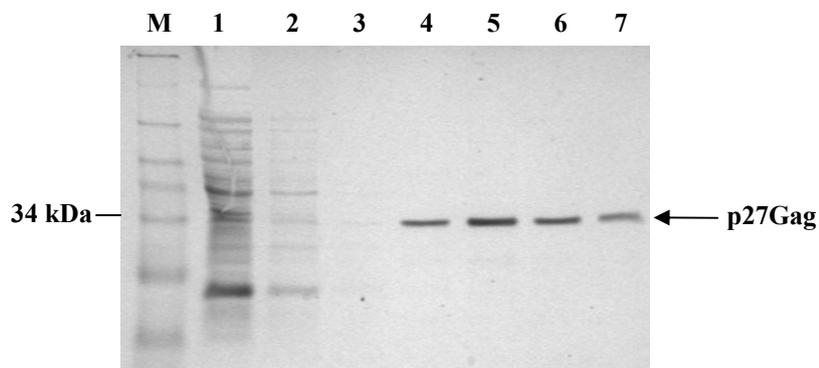


Abb.4.16: SDS-PAGE Analyse der p27Gag Aufreinigung über einen 6x His-Taq; M: SeeBlue Plus2-Marker, 1: Durchlauf; 2 und 3: erste und letzte Waschfraktion; 4 - 7: Elutionsfraktionen

Im Durchlauf waren erwartungsgemäß viele Proteinbanden auf unterschiedlichen Höhen zu sehen (Abb. 4.16, Bahn 1). Kurz unter der 34 kDa-Bande des Markers ist auch eine Bande auf der zu erwartenden Höhe des p27Gag zu erkennen. Dies deutete auf ein unvollständiges Binden des rekombinanten p27Gag an die Säule hin. In der ersten Waschfraktion (Bahn 2) war, zusätzlich zu den ausgewaschenen, unspezifisch gebundenen *E.coli*-Proteinen, eine Bande auf der Höhe des p27Gag zu erkennen. In der letzten Waschfraktion waren nur noch sehr schwache Banden ersichtlich (Bahn 3). Die Elutionsfraktionen (Bahn 4 bis 7) enthielten das vollständig aufgereinigte rekombinante p27Gag ohne ersichtliche Kontaminationen durch Fremdproteine.

Die SDS-PAGE Analyse der Aufreinigung von p27Gag zeigte, dass das rekombinante Protein nicht vollständig an das Säulenmaterial gebunden hatte und auch bei den Waschdurchgängen Verluste auftraten. Allerdings wiesen die Elutionsfraktionen p27Gag in konzentrierter,

aufgereinigter Form auf. Die Elutionsfraktionen wurden nach der SDS-PAGE Analyse vereint.

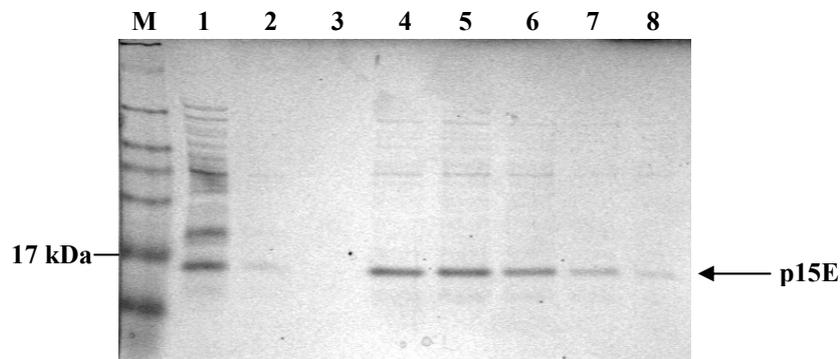


Abb.4.17: SDS-PAGE Analyse der p15E Aufreinigung über ein Calmodulin-Bindungspeptid-Fusionsprotein; M: SeeBlue Plus2-Marker, 1: Durchlauf, 2 und 3: erste und letzte Waschfraktion, 4 - 8: Elutionsfraktionen

Die Durchlauf-Fraktion mit dem ungebundenen Material wies neben den Banden mit ungebundenen *E.coli*-Proteinen auch eine starke Bande kurz unter der 17 kDa-Markerbande auf Höhe des rekombinanten p15E (16 kDa) auf (Abb. 4.17, Bahn 1). In der ersten Waschfraktion (Bahn 2) war ebenfalls, neben den Banden der herausgewaschenen unspezifisch gebundenen Proteine, eine Bande auf Höhe des p15E zu erkennen. Die letzte Waschfraktion war proteinfrei. In den Elutionsfraktionen (Bahn 4 bis 8) waren neben den deutlichen Banden mit rekombinanten p15E zusätzliche Banden mit unspezifisch gebundenen Proteinen erkennbar.

Im ungebundenen Material sowie in den Waschfraktionen war rekombinantes p15E nachweisbar. Dies deutete auf eine unzureichende Bindung an das Säulenmaterial bzw. auf eine Überladung hin. Die Elutionsfraktionen wiesen neben dem p15E weitere Proteinbanden auf, so dass die Aufreinigung nicht unter optimalen Bedingungen erfolgt war. Da die Nebenbanden mit Fremdproteinen in den Eluaten im Vergleich zu den p15E-Banden sehr schwach waren, wurde auf eine erneute Aufreinigung unter optimierten Bedingungen verzichtet. Die Elutionsfraktionen wurden nach der SDS-PAGE Analyse vereint.

Als weitere Positivkontrolle wurde pelletiertes Virus aus den gesammelten Überständen PERV-infizierter HEK 293-Zellen durch Ultrazentrifugation über eine Saccharosekissen gewonnen.

Für den Einsatz des Viruspellets und der rekombinanten Proteine als Positivkontrollen wurde vorab eine Konzentrationsbestimmung mit Hilfe der BCA-Methode vorgenommen. Bei der Bestimmung wurde aber deutlich, dass die Elutionspuffer der rekombinanten Proteine Störsubstanzen wie EGTA, β -Mercapthoethanol bzw. Imidazol enthielten. Demzufolge musste ein Pufferaustausch mit Hilfe der Dialyse erfolgen.

Nach der Dialyse war eine Konzentrationsbestimmung für die rekombinanten Proteine problemlos möglich.

Die Positivkontrollen wurden im Folgenden in Western Blot Analysen auf Basis der ECL-Detektion auf ihre Eignung getestet. Dazu wurden 4,25 μ g Gesamt-Protein vom Viruspellet und jeweils 500 ng der rekombinanten Proteine p15E und p27Gag eingesetzt. Zunächst erfolgte der Nachweis von p15E. Nach der Regeneration der Membran wurde der p27Gag-Nachweis durchgeführt. Die Ergebnisse der Western Blot Analysen sind nachfolgend dargestellt (Abb. 4.18 a und b).

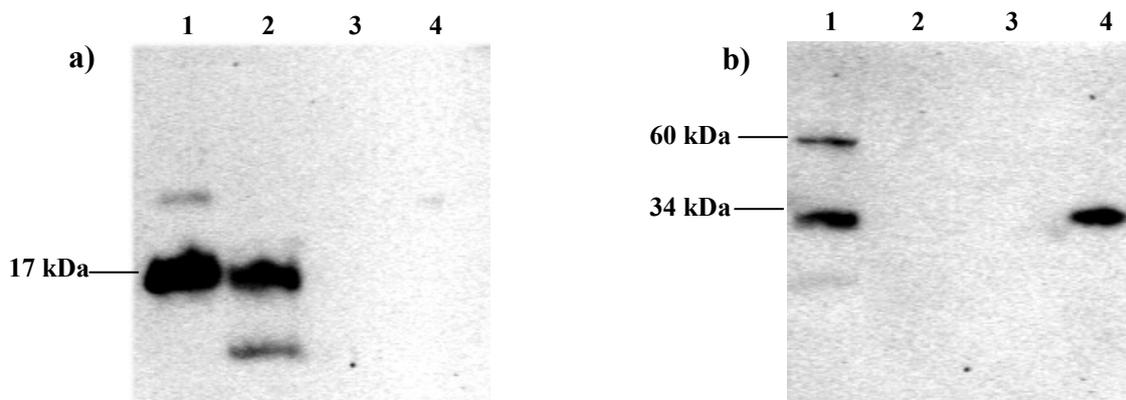


Abb.4.18: Western Blot Analysen mit ECL-Detektion zur Überprüfung der Eignung der Positivkontrollen, a): Nachweis von p15E, b) Nachweis von p27Gag nach Regeneration der Membran; 1: Viruspellet, 2: rekombinantes p15E, 3: leer, 4: rekombinantes p27Gag

Bei der Western Blot Analyse zum Nachweis von PERV-spezifischem p15E war auf Höhe der 17 kDa-Markerbande (bei der ECL-Detektion ist der Marker nicht sichtbar) sowohl beim Viruspellet in Bahn 1 als auch beim rekombinanten, aufgereinigten p15E in Bahn 2 eine starke Bande auf Höhe des p15E zu sehen (Abb. 4.18 a). Ein Größenunterschied zwischen dem viralen p15E (18 kDa) und dem rekombinanten p15E (16 kDa) war nicht deutlich zu erkennen. Die Bande oberhalb des p15E in Bahn 1 stellte wahrscheinlich ein Dimer, die Bande unterhalb des rekombinanten p15E in Bahn 2 ein Zerfallsprodukt dar.

In der Bahn 4 mit rekombinanten p27Gag war keine Bande zu sehen. Eine Kreuzreaktion des p15E Antiserums mit p27Gag war erwartungsgemäß nicht vorhanden.

Die Western Blot Analyse zum Nachweis von PERV-spezifischem p27Gag zeigte beim Viruspellet in Bahn 1 sowie beim rekombinanten p27Gag in Bahn 4 kurz unter der 34 kDa-Markerbande auf p27Gag-Höhe eine spezifische Bande (Abb. 4.18 b). Daneben war beim Viruspellet in Bahn 1 zwischen der 78 und 55 kDa-Markerbande eine weitere Bande zu sehen. Hierbei handelte es sich um das 60 kDa große Gag-Vorläuferprotein. Eine Kreuzreaktion des p27Gag Antiserums mit p15E in Bahn 1 bzw. Bahn 2 lag nicht vor. Die sehr schwache Bande unterhalb des p27Gag in Bahn 1 stellte ein Zerfallsprodukt dar.

Zusammenfassend ließ sich sagen, dass das Viruspellet sowie die rekombinanten PERV-spezifischen Proteine p15E und p27Gag für den Einsatz als Positivkontrollen für Western Blot Analysen mit ECL Detektion zum Nachweis PERV-spezifischer Proteine in den Proben geeignet waren.

4.4.1.2 Bestimmung der Nachweisgrenze für p15E und p27Gag

Um die Nachweisgrenze für die PERV-Proteine p15E und p27Gag im Western Blot mit ECL-Detektion zu ermitteln, wurden verschiedene Verdünnungsstufen der Proteine eingesetzt. Die Ergebnisse für eine Filmexpositionsdauer von 5 sec sind für die jeweiligen Proteine dargestellt (Abb. 4.19).

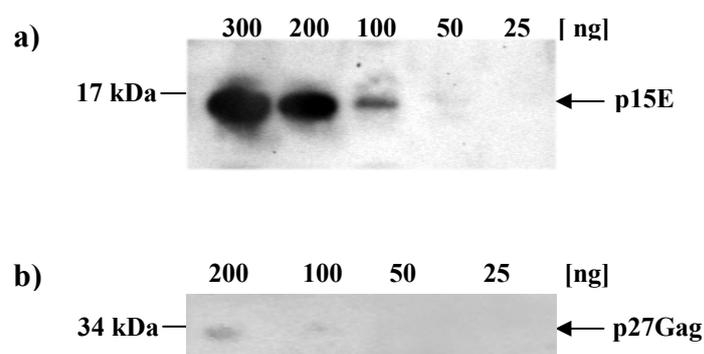


Abb.4.19: Bestimmung der Nachweisgrenze von PERV-spezifischen Proteinen in Western Blot Analysen mit ECL-Detektion anhand von Verdünnungsreihen; a) Nachweisgrenze von p15E, b) Nachweisgrenze von p27Gag

Beim Western Blot zur Bestimmung der Nachweisgrenze von p15E war nur noch eine sehr schwache Bande bei 50 ng rekombinanten p15E zu sehen (Abb. 4.19 a). Bei der Bestimmung der Nachweisgrenze für p27Gag war nur noch eine sehr schwache Bande bei einer Konzentration von 100 ng rekombinanten p27Gag zu erkennen (Abb. 4.19 b).

4.4.1.3 Nachweis PERV-spezifischer Proteine in den Gewebeproben und in den Melanomzelllinien

Für den Nachweis der PERV-Proteine p15E und p27Gag in den Gewebeproben wurden zunächst 30 µg Gesamtprotein je Probe eingesetzt. Es konnte jedoch weder beim Einsatz von 30 µg noch bei einem späteren Einsatz von 50 µg Gesamtprotein ein Nachweis von p15E in den Gewebeproben des Troll-Tiers # 371 erbracht werden. Auf die Darstellung der Western Blot Analysen ohne Nachweis wurde verzichtet.

Nach der Regeneration der Membran mit 30 µg Gesamtprotein wurde die Western Blot Analyse zum Nachweis von p27Gag durchgeführt (Abb. 4.20).

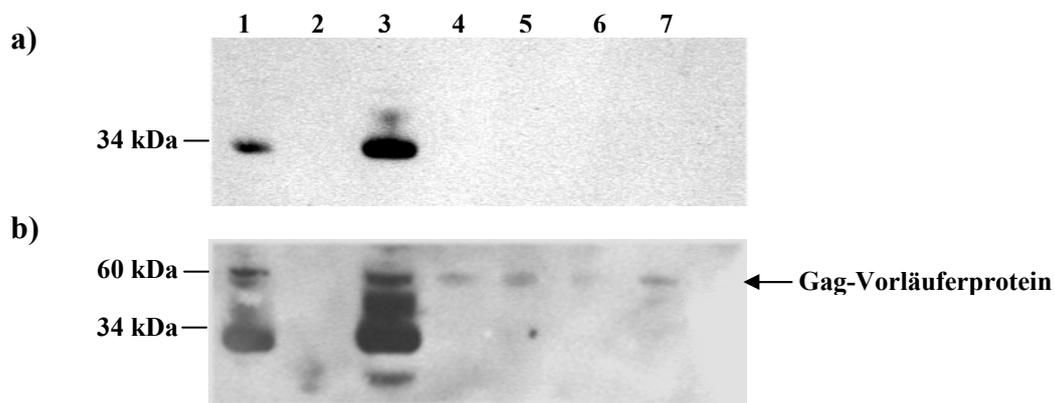


Abb.4.20: Western Blot Analyse mit ECL-Detektion nach Regeneration der Membran zum Nachweis von p27Gag für 30 µg Gesamtprotein der Gewebeproben vom Tier # 371; a) nach 5 sec Filmexposition b) nach 3 min Filmexposition, 1: Viruspellet (2,8 µg), 2: rekombinantes p15E (500 ng), 3: rekombinantes p27Gag (500 ng), 4: Lymphknoten mit Metastase b, 5: kutanes Melanom, 6: Milz, 7: normale Haut

Nach kurzer Filmexposition waren nur bei den Positivkontrollen (Bahn 1 und 3) Banden auf p27Gag-Höhe zu sehen (Abb. 4.20 a). Nach längerer Filmexposition (3 min) waren auf Höhe des 60 kDa großen Gag-Vorläuferproteins sowohl beim Viruspellet als auch bei allen getesteten Proben zusätzliche Banden zu sehen (Abb. 4.20 b, Bahn 4 - 7). Die Stärke der Banden variierten. Die stärkste Bande war beim kutanen Melanom (Bahn 5) und die schwächste bei der Milz (Bahn 6) zu sehen. Die Bande bei der Lymphknotenprobe (Bahn 4) war ähnlich stark wie die Bande bei der normalen Haut (Bahn 7). Auf der Höhe von p27Gag wurden keine Banden bei den Proben detektiert. Die Positivkontrolle mit rekombinanten p27Gag wies bei der langen Expositionszeit neben der Bande auf p27Gag-Höhe viele unspezifische Banden auf.

Für den Nachweis von p15E und p27Gag wurden von den Melanomzelllinien jeweils 30 µg Gesamtprotein eingesetzt. P15E konnte in allen Lungenmetastasenzellkulturen nachgewiesen werden (Abb. 4.21).

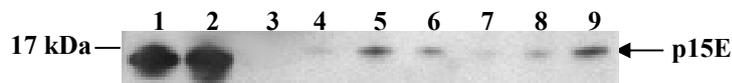


Abb.4.21: Nachweis von p15E in Western Blot Analysen mit ECL-Detektion unter Verwendung von 30 µg Gesamtprotein der Lungenmetastasenzelllinien; 1: Viruspellet (4,25 µg Gesamtprotein), 2: rekombinantes p15E (500 ng), 3: rekombinantes p27Gag (500 ng), 4: Lunge ST P21, 5: Lunge LT P21, 6: Lunge ST P40, 7: Lunge ST P45, 8: Lunge ST P60, 9: Lunge ST P87 (P entspricht der Passagenanzahl, ST bzw. LT entspricht schwer bzw. leicht trypsinierbar)

Die Intensität der p15E-Banden auf der Höhe der Positivkontrollen variierte bei den Lungenmetastasenzellkulturen (Abb. 4.21, Bahn 4 - 9). Die schwächsten Banden waren in Bahn 4 (Lunge ST P21) und 7 (Lunge ST P60) zu sehen. In der Bahn 9 (87. Passage der Lunge ST-Zelllinie) konnte die stärkste Bande detektiert werden.

Bei der Milzmetastasenzelllinie sowie den PBMCs und den Nevizellen war kein p15E-Nachweis möglich. Auf die Abbildung der entsprechenden Western Blots ohne Nachweis wurde verzichtet.

Nach der Regeneration der Membran wurde eine Western Blot Analyse zum Nachweis von p27Gag in den Melanomzelllinien durchgeführt. Im Folgenden ist der Nachweis für die Lungenmetastasenzelllinien dargestellt (Abb. 4.22).

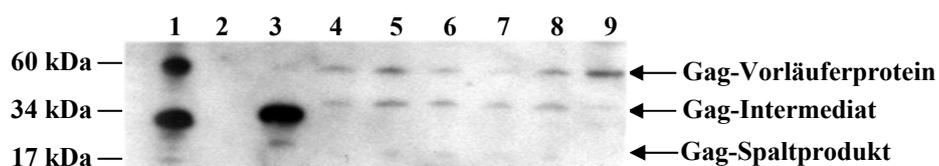


Abb.4.22: Western Blot Analyse mit ECL-Detektion zum Nachweis von p27Gag unter Verwendung von 30 µg Gesamtprotein der Lungenmetastasenzelllinien; Bahn 1: Viruspellet (4,25 µg Gesamtprotein), 2: rekombinantes p15E (500 ng), 3: rekombinantes p27Gag (500 ng), 4: Lunge ST P21, 5: Lunge LT P21, 6: Lunge ST P40, 7: Lunge ST P45, 8: Lunge ST P60, 9: Lunge ST P87 (P entspricht der Passagenanzahl, ST bzw. LT entspricht schwer bzw. leicht trypsinierbar)

Bei allen getesteten Lungenmetasenzellkulturen waren spezifische Banden mit unterschiedlichen Intensitäten zu erkennen. Allerdings lagen die Banden bei den Positivkontrollen nicht auf der erwarteten Höhe (Abb. 4.22, Bahn 1 (Viruspellet) und Bahn 3 (rekombinantes p27Gag)). Das rekombinante p27Gag lag über der 34 kDa-Markerbande. Zusätzlich waren auch die spezifischen Banden bei den Proben oberhalb der 34 kDa-

Markerbande und der Positivkontrollen zu sehen. Weitere spezifische Banden waren ungefähr auf Höhe des 60 kDa großen Gag-Vorläuferproteins und sehr schwache Banden auf Höhe der 17 kDa-Markerbande bei fast allen Lungenmetastasenzellkulturen erkennbar. In der Bahn 7 (Lunge ST P45) war eine stärkere Bande auf Höhe des 60 kDa-Gag-Vorläuferproteins im Vergleich zur Bande über der 34 kDa-Markerbande zu sehen. In Bahn 9 (Lunge ST P87) verhielten sich die Bandenintensitäten genau entgegengesetzt. Bei allen weiteren Proben der getesteten Lungenmetastasenzelllinien waren die Bandenintensitäten annähernd gleich stark. Da sich die Positivkontrolle für das rekombinante Gag auf der falschen Höhe befand bzw. die spezifischen Banden bei den Proben oberhalb der Positivkontrollen lagen, wurde die Western Blot Analyse für einige Lungenmetastasenzellkulturproben wiederholt, um Fehler in der Methodik ausschließen zu können.

Die Wiederholung der Western Blot Analyse zum Nachweis von p27Gag für die Lungenmetastasenzelllinien Lunge ST und Lunge LT erfolgte, im Unterschied zu 30 µg im ersten Versuch, mit 50 µg Gesamtprotein (Abb. 4.23).

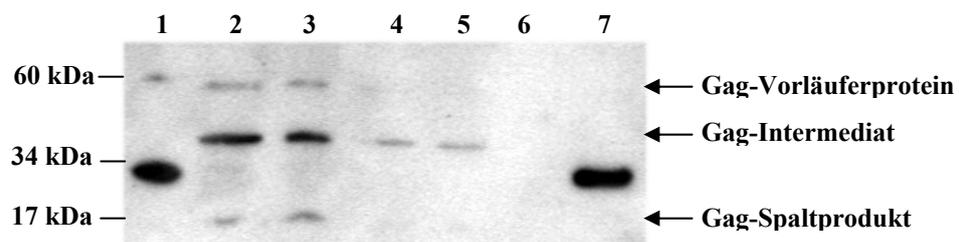


Abb.4.23: Western Blot Analyse mit ECL-Detektion zum Nachweis von p27Gag unter Verwendung von 50 µg Gesamtprotein der Lungenmetastasenzelllinien; 1: Viruspellet (4,25 µg Gesamtprotein), 2: Lunge LT, 3: Lunge LT P21, 4: Lunge ST, 5: Lunge ST P21, 6: leer, 7: rekombinantes p27Gag (300 ng), (P entspricht der Passagenanzahl, ST bzw. LT entspricht schwer bzw. leicht trypsinierbar)

Bei der Wiederholung der Western Blot Analyse zum Nachweis von PERV-spezifischem p27Gag wurden die Ergebnisse für die Proben im Wesentlichen reproduziert. Die Banden der Positivkontrollen lagen bei der Wiederholung auf der zu erwartenden Höhe. Die Proben wiesen erneut über der 34 kDa-Markerbande eine spezifische Bande auf, die unterschiedlich stark war. Zusätzlich war bei jeder Probe kurz unter dem 60 kDa großen Gag-Vorläuferprotein eine Bande mit unterschiedlicher Intensität zu sehen. Bei der Zelllinie Lunge LT in den Bahnen 2 und 3 waren starke Banden sowie bei der Zelllinie ST in den Bahnen 4 und 5 schwache Banden erkennbar. In den Bahnen 2 (Lunge LT) und 3 (Lunge LT P21) waren auf Höhe der 17 kDa-Markerbande weitere deutliche Banden sichtbar.

Bei der Milzmetastasenzelllinie sowie bei den PBMCs und den Nevizellen war kein p27Gag-Nachweis möglich. Auf die Darstellung der entsprechenden Western Blots ohne Nachweis wurde verzichtet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein eindeutiger Nachweis der Expression des transmembranen Hüllproteins p15E von PERV nur bei den Lungenmetastasenzellkulturen erfolgte. Hierbei zeichnete sich ab, dass mit zunehmender Passagenanzahl die Expression von p15E anstieg. Die Zellkultur mit der höchsten Anzahl an Passagen wies dabei die stärkste Expression auf. Dies korrelierte mit den Befunden hinsichtlich der Expression von PERV-spezifischer mRNA (Kapitel 4.2.3, Abb. 4.7). In sämtlichen Gewebeproben, in den übrigen Melanomzelllinien bzw. in PBMCs und Nevizellen wurde kein p15E detektiert.

Ein eindeutiger Nachweis der Expression von p27Gag von PERV konnte weder für die Gewebeproben noch für die Melanomzelllinien sowie PBMCs und Nevizellen erbracht werden. Allerdings waren bei den Gewebeproben nach längerer Filmexposition spezifische Banden auf Höhe des 60 kDa Gag-Vorläuferproteins zu sehen. Bei den Lungenmetastasenzellen waren schon nach kurzzeitiger Filmexposition spezifische Banden etwa in Höhe des 60 kDa großen Gag-Vorläuferproteins, sowie etwa bei 40 kDa und 17 kDa sichtbar.

4.4.2 Nachweis der Expression von PERV-Proteinen mittels Immunfluoreszenz

Für den Nachweis der Expression des transmembranen Hüllproteins p15E bei den Melanomzelllinien mittels Immunfluoreszenz wurden exemplarisch die 40. und 60. Passage der Lungenmetastasenzelllinie ST, sowie die 5. Passage der Milzmetastasenzelllinie getestet. Als Negativkontrolle dienten HEK 293-Zellen und als Positivkontrolle PK15-Zellen. Bei allen untersuchten Zellen wurde eine Permeabilisierung durchgeführt. Die durch die FITC-Markierung des Sekundärantikörpers bedingte grüne Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops bei einer Wellenlänge von 505 - 530 nm detektiert.

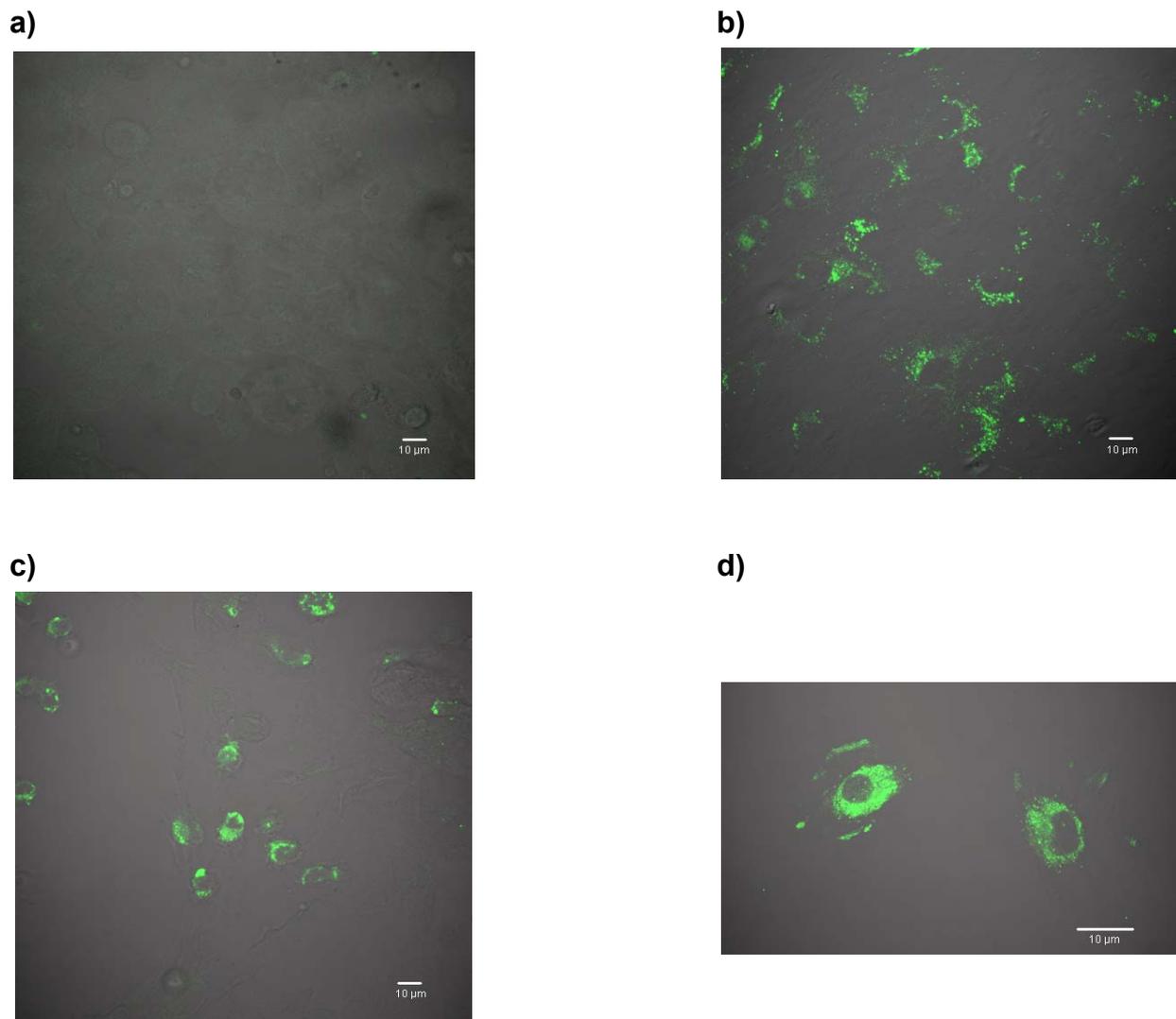


Abb.4.24: Immunfluoreszenz zum Nachweis von p15E in Lungenmetastasenzellen mittels FITC-Markierung (630-fache Vergrößerung, Durchlicht und Fluoreszenzkanal) a) Negativkontrolle HEK 293, b) Positivkontrolle PK15, c) Lunge ST P60, c) Lunge ST P60 (Detailansicht)

Bei den HEK 293-Zellen als Negativkontrolle war, neben der geringfügig auftretenden Autofluoreszenz, keine spezifische Fluoreszenz zu erkennen (Abb. 4.24 a). Die Positivkontrolle (PK15-Zellen) wies dagegen starke spezifische Fluoreszenzsignale auf (Abb. 4.22 b). Diese Signale waren cytoplasmatisch besonders um die Kernregion der Zellen lokalisiert. Bei den Lungenmetastasenzelllinien Lunge ST P40 und P60 konnte die spezifische Fluoreszenz im cytoplasmatischen Raum und verstärkt um die Kernregion herum detektiert werden. Die Immunfluoreszenzaufnahmen sind exemplarisch für die Zelllinie Lunge ST P60 dargestellt (Abb. 4.22 c und d). Die Milzmetastasenzelllinie wies keine spezifische Fluoreszenz auf, so dass auf eine Abbildung verzichtet wurde.

Der Nachweis des transmembranen Hüllproteins p15E von PERV war somit bei der 40. und 60. Passage der Lungenmetastasenzelllinie ST möglich.

Abkürzungen: LT: leicht trypsinierbar, ST: schwer trypsinierbar, P: Passagenanzahl, + : Nachweis erfolgt, (+) : kein eindeutiger Nachweis, - : kein Nachweis, n.o.: noch offen, n.d.: nicht durchgeführt

In den Lungenmetastasenzelllinien LT und ST wurden in Abhängigkeit von der Passagenanzahl eine Zunahme der PERV-Expressionen auf RNA- und Proteinebene nachgewiesen (Tab. 4.5). Durch Western Blot Analysen konnte ein eindeutiger Nachweis des p15E von PERV und des Gag-Vorläuferproteins erfolgen. Für einige ausgewählte Passagen der Lungenmetastasenzelllinie ST wurde auch ein Nachweis der PERV-Expression mittels Immunfluoreszenz erbracht. In der Milzmetastasenzelllinie sowie in den PBMCs und Nevizellen konnte eine PERV-mRNA-Expression detektiert werden. In den PBMCs wurde die schwächste Expression festgestellt. Die Expression der PERV-spezifischen Proteine konnte durch Western Blot Analysen nicht bestätigt werden. Bei der Milzmetastasenzelllinie war auch kein Nachweis der Expression des p15E von PERV mittels Immunfluoreszenz möglich.

In den Primärtumoren wurde eine erhöhte Expression von PERV im Vergleich zur Expression in normaler Haut festgestellt. Die Lymphknotenbiopsien mit Metastasen wiesen eine geringere Expression als in normaler Haut auf, wohingegen die Expression von PERV in den Milzbiopsien durchgehend am höchsten waren. In den Gewebebiopsien des Tieres # 371 erfolgte mittels Western Blot Analysen ein Nachweis des Gag-Vorläuferproteins. Eine Detektion des transmembranen Hüllproteins p15E war nicht möglich.

5. Diskussion

5.1 Nachweis der Expression von PERV in den Biopsien, Zelllinien sowie PBMCs

Nachdem im Genom der Troll-Tiere mit Melanomen PERV-A, -B und -C Proviren nachgewiesen werden konnten, wurde auch die Expression aller 3 replikationsfähigen PERV-Subtypen erwartet.

In allen getesteten porzinen Biopsien und Zelllinien sowie PBMCs wurden sämtliche PERV-spezifischen mRNAs detektiert, was eine *in vivo* und *in vitro* Expression von PERV-mRNA nachweist. Neben der Vollängen-mRNA konnte auch in allen Gewebeproben und Zelllinien sowie in den PBMCs gespleißte env-mRNA detektiert werden, womit die Voraussetzung für eine Synthese von intakten PERV-Partikeln gegeben ist.

Aufgrund der Tatsache, dass auch in den Gewebebiopsien der normalen Haut, der Milz sowie in normalen PBMCs und Nevizellen eine PERV-Expression auf RNA-Ebene detektiert wurde, kann gefolgert werden, dass sich dies im Falle einer Korrelation zwischen der Expression von PERV und der Tumorentstehung in Troll Schweinen nur durch qualitative oder quantitative Unterschiede erklären ließe.

5.1.1 Erhöhte Expressionen von PERV in den Primärtumoren und deren Ursachen

Aus den Expressionsstudien für die kutanen Melanome der Tiere # 371, # 372, # 472 und # 499 lässt sich ableiten, dass die Expressionen von PERV-mRNA in Primärtumoren im Vergleich zur Expression in normaler Haut erhöht sind. Dies lässt vermuten, dass zwischen der Tumorinzidenz und der erhöhten PERV-Expression ein Zusammenhang besteht.

Die gesteigerte Expression könnte auf die erhöhten Transkriptionsleistungen in Tumoren zurückzuführen sein, wobei die PERV-Expression dabei unspezifisch beeinflusst werden könnte.

Eine weitere Möglichkeit ist die Tumorinduktion durch Insertionsmutagenese. In Abhängigkeit vom Integrationsort der Provirus-DNA im Wirtsgenom könnte es zu einer Aktivierung von Onkogenen oder zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen, wenn entsprechende zelluläre Gene tangiert werden. Für PERV existieren aber derzeit keine Hinweise auf derartige Mechanismen.

Die Western Blot Analysen zum Nachweis der PERV-spezifischen Proteine erfolgten bisher nur für die Biopsien des Tieres # 371. Im kutanen Melanom konnte bei einem Einsatz von 30 µg Gesamtprotein erst nach stark verlängerter Filmexpositionszeit ein Nachweis des 60 kDa großen PERV-Gag-Vorläuferproteins erbracht werden. Die Stärke der Expression des Vorläuferproteins korrelierte mit der Stärke der PERV-Expression auf RNA-Ebene. In dem kutanen Melanom war eine höhere PERV-Proteinexpression als in normaler Haut zu verzeichnen. Das prozessierte Hauptstrukturprotein p27Gag von PERV wurde nicht detektiert. Die ermittelte Nachweisgrenze für p27Gag lag bei 100 ng des Proteins. Ein Nachweis der Expression des Env-Vorläuferproteins bzw. des p15E wurde beim Einsatz von 30 µg Gesamtprotein nicht erbracht. Die Expression lag demnach unter der ermittelten Nachweisgrenze von 50 ng. Da in einem PERV-Partikel anteilig mehr Gag-Proteine als Hüllproteine vorhanden sind, ist es möglich, dass ein Nachweis des Gag-Vorläuferproteins in der Western Blot Analyse erfolgt, aber eine Detektion des Env-Vorläuferproteins aufgrund von zu geringen Konzentrationen ausbleibt.

Die Gewebeprobe des Tieres # 371 wiesen im Vergleich zu den Gewebeprobe der anderen Troll-Tiere die niedrigsten Expressionsraten an PERV-mRNA auf. Demzufolge lässt sich zu den bisher erfolgten Untersuchungen auf Proteinebene sagen, dass es schon anhand der Probe des Tieres mit den geringsten PERV-mRNA Expressionsraten möglich war, einen Anhaltspunkt für die PERV-Expression auf Proteinebene zu erhalten. Zur Verifizierung der Ergebnisse ist die Analyse der Expressionen in den Gewebeprobe der anderen Tiere notwendig. Dies war allerdings aufgrund der unterschiedlichen Lieferzeitpunkte der Probe noch nicht möglich. Es ist nicht auszuschließen, dass bei den verbleibenden Gewebeprobe der Tiere # 372, # 472 und # 499 neben dem Nachweis der Gag-Proteine auch eine Detektion des transmembranen Hüllproteins p15E von PERV erfolgen könnte. Durch die Expression des p15E von PERV, welches immunsuppressive Eigenschaften aufweist (Tacke et al., 2000) könnten Tumorzellen vor der T-Zell-vermittelten Zerstörung durch das Komplementsystem geschützt sein. Die Tumorzellen hätten dadurch einen Selektionsvorteil. Dies wurde bereits für einige exogene (Mangeny et al., 1998, Blaise et al., 2001) und endogene Retroviren wie HERV-K (Mangeny et al., 2001) nachgewiesen. Auch für ein murines endogenes Retrovirus wurde ein ähnlicher Effekt beschrieben. Dazu wurde mittels RNA-Interferenz die Expression des spontan induzierten murinen endogenen Retrovirus, das in den murinen Melanomzellen B16 exprimiert wird, herunterreguliert. Dies resultierte in der Abstoßung der Tumorzellen in immunokompetenten Mäusen, wohingegen die Kontrollmelanomzellen zu einem letalen Tumor heranwachsen (Mangeny et al., 2005).

Eine erhöhte Expression von PERV könnte auch durch die Tumordinfiltration durch T-Lymphozyten bedingt sein. Nach einer Stimulation von porzinen Immunzellen kommt es zur Aktivierung und Freisetzung von PERV, wobei der Virustiter vom Proliferationsgrad der Zellen abhängig ist (Tacke et al., 2003). Eine Aktivierung von endogenen Retroviren durch immunologische Reaktionen wurde auch bei der Maus beschrieben (Hirsch et al., 1970).

5.1.2 Erhöhte PERV-Expressionen in den Milzen und deren Ursachen

Bei allen untersuchten Tieren mit Melanomen waren die Expressionen von PERV-mRNA in der Milz am höchsten. Auf Proteinebene konnte jedoch bei der Milzbiopsie des Tieres # 371 durch Western Blot Analysen keine höhere Expression als in normaler Haut detektiert werden. Wie schon bei dem kutanen Melanom des Tieres, erfolgte auch in der Milz bei einem Einsatz von 30 µg Gesamtprotein kein Nachweis der Expression des p15E von PERV. Die Expression lag auch hier unter der Nachweisgrenze. Ein Nachweis des p27Gag von PERV, beim Einsatz der gleichen Menge an Gesamtprotein, war ebenfalls nicht möglich. Es konnte nur der Nachweis der Expression des Gag-Vorläuferproteins nach stark verlängerter Filmexpositionszeit erbracht werden. Somit lag auch hier die Expression des p27Gag unter der Nachweisgrenze. Durch die fehlende Untersuchung der Gewebebiopsien der anderen Spendertiere bleibt eine Bestätigung dieses Ergebnisses hinsichtlich der PERV-Proteinexpression allerdings noch aus.

In verschiedenen Gewebearten wird die Genexpression spezifisch kontrolliert bzw. reguliert. Demzufolge besteht die Möglichkeit, dass im Zuge der gewebsspezifischen Regulation in der Milz nur eine eingeschränkte Repression der PERV-Replikation stattfindet, so dass hohe Expressionen an PERV-mRNA nachweisbar sind.

Die hohe PERV-Expression in der normalen Milz könnte auch auf die tumorbedingte, antigen-induzierte Stimulierung der porzinen PBMCs zurückzuführen sein. In der Milz findet die antigen-induzierte Differenzierung und Proliferation der eingewanderten B- und T-Lymphozyten statt. Nach einer Stimulation dieser Zelltypen kommt es zur Aktivierung und Freisetzung von PERV (Tacke et al., 2003).

5.1.3 Keine erhöhten PERV-Expressionen in den Geweben mit Metastasen

In den Lymphknotenbiopsien mit Metastasen wurde bei den Tieren # 371 und # 372 im Vergleich zu normaler Haut eine niedrigere PERV-mRNA-Expression festgestellt. Wie auch schon bei den anderen getesteten Biopsien des Tieres # 371, konnte durch Western Blot Analysen mit 30 µg Gesamtprotein kein Nachweis der p15E-Expression von PERV erfolgen. Ein Nachweis des Gag-Vorläuferproteins war nach stark verlängerter Filmexpositionszeit möglich. Die Expressionsstärke war geringer als in normaler Haut und korrelierte somit mit den Ergebnissen der PERV-mRNA-Quantifizierung.

Da auch in den Lymphknoten eine antigen-induzierte Differenzierung und Proliferation der Lymphozyten stattfindet, könnte auch hier wie in der Milz eine erhöhte PERV-Expression aufgrund der proliferierenden Lymphozyten erfolgen. Durch einen Metastasenbefall wäre es aber möglich, dass es zu einer Funktionsbeeinträchtigung der Lymphknoten kommt, die die Differenzierung und Proliferation der Immunzellen beeinträchtigt. Im Krankheitsverlauf der Leukämie wird davon ausgegangen, dass die Einwanderung von Tumorzellen in die Lymphknoten, die Milz und die Leber zu Funktionsstörungen führt, da sie durch die Ausschüttung von Hemmstoffen die Ausreifung der übrigen Zellen verhindern (Roth A. & Glasmacher A., 2002; Kapitel 2). Für die erfolgten PERV-Expressionsstudien standen nur Lymphknotenbiopsien mit Metastasen und kein normales Lymphknotengewebe für einen Vergleich mit normaler Haut zur Verfügung. Bei nachfolgenden Untersuchungen könnte durch eine zusätzliche Expressionsanalyse normaler Lymphknotenbiopsien Rückschlüsse auf gewebsspezifische PERV-Expressionsmuster gezogen werden.

5.1.4 Erhöhte PERV-Expressionen in den Lungenmetastasenzelllinien ST und LT

In den Ausgangskulturen der Lungenmetastasenzelllinien war im Vergleich zu normalen PBMCs eine erhöhte PERV-mRNA-Expression zu verzeichnen.

Auf Proteinebene konnte mittels Western Blot Analyse bei einem Einsatz von 30 µg Gesamtprotein ein eindeutiger Nachweis des transmembranen Hüllproteins p15E erbracht werden. Bei der Western Blot Analyse zur Detektion von p27Gag-Proteinen war eine Bande zu erkennen, die auf gleicher Höhe wie das 60 kDa große Gag-Vorläuferprotein der Positivkontrolle (Viruspellet) lief. Allerdings wurde kein p27Gag, sondern durchgängig ein wesentlich größeres Protein (circa 40 kDa) und ein ungefähr 17 kDa großes Protein detektiert. Eine Erklärung ist hier möglicherweise in der fehlenden Kontrolle der Lesegenauigkeit (proof

reading) der Reversen Transkriptase zu finden. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-3} bis 10^{-4} werden falsche Basen in die neusynthetisierten DNA-bzw. RNA-Stränge eingebaut. Ein möglicher Grund für die veränderten Proteine könnte demnach eine Mutation innerhalb der *gag*-Sequenz sein, wodurch eine andere Proteaseschnittstelle entstanden ist. Das circa 40 kDa große Protein würde dabei ein Intermediat des Gag-Vorläuferproteins und das 17 kDa große Protein das davon abgeleitete Spaltprodukt darstellen. Um diesen Sachverhalt zu klären, müsste mit Hilfe der PCR bei Verwendung der für die *p27gag*-Klonierung eingesetzten Primer eine Amplifikation dieser Sequenz mit anschließender Sequenzierung erfolgen.

Bei der 40. und 60. Passage der Lungenmetastasenzelllinie ST erfolgte der p15E-Nachweis sowohl mittels Western Blot Analyse als auch mit Hilfe der weniger sensitiven Immunfluoreszenztechnik. Die p15E-spezifische Fluoreszenz konnte besonders im Cytoplasma nahe der Kernregion detektiert werden. Die Zellen wurden zuvor permeabilisiert, so dass ein Nachweis des transmembranen Hüllproteins p15E von PERV auch im Cytoplasma der Zellen möglich war. Die Translation des Env-Vorläuferproteins findet cytoplasmatisch am rauen endoplasmatischen Reticulum (ER) statt. Die anschließende posttranslationale Modifikation erfolgt im Lumen des ER. Dies erklärt den verstärkten Nachweis um den Nucleus.

Wie schon bei der Quantifizierung der PERV-Expression auf RNA-Ebene, konnte auch auf Proteinebene eine Zunahme der PERV-Expression in Abhängigkeit von der Passagenanzahl festgestellt werden. Bei der seriellen Passagierung von PERVs in humanen Zellen wurden Adaptionen festgestellt, die aufgrund von gesteigerten Replikationsraten zu einer Erhöhung des Virustiters führen. Diese Adaptionerscheinungen sind auf Multimerisierungen bestimmter Sequenzmotive in der LTR-Region zurückzuführen (Denner et al., 2001, 2002 und 2003). Die mittels Western Blot Analysen und Immunfluoreszenz nachgewiesenen Proteine bilden die Voraussetzung für die Assemblierung infektiöser PERV-Partikel, die die Zellen erneut infizieren könnten. Im Zuge der seriellen Passagierung könnte es zu den beschriebenen Adaptionerscheinungen kommen. Um diesen Sachverhalt abzuklären, müsste zum einen die DNA von verschiedenen Passagen der Lungenmetastasenzelllinien in einer PCR mit Hilfe LTR-Region flankierender Primer getestet werden. Bei auftretender Multimerisierung in der LTR-Region würden dann unterschiedlich lange Amplifikate in Abhängigkeit von der Passagenanzahl nach der Auftrennung der PCR-Proben im Agarosegel zu sehen sein. Des Weiteren müsste die Bildung intakter, infektiöser Partikel mit Hilfe eines Infektionsversuches von z.B. HEK 293-Zellen durch Inkubation mit Überständen der o.g.

Zelllinien abgesichert werden. Eine Freisetzung von Partikeln kann auch durch den Nachweis der Reversen Transkriptase-Aktivität in den Zellkulturüberständen erfolgen.

5.1.5 Erhöhte PERV-mRNA-Expression in der Milzmetastasenzelllinie

Die PERV-mRNA-Expression war in der Milzmetastasenzelllinie höher als in PBMCs.

Eine Aussage über die Abhängigkeit der PERV-Expression von der Passagenanzahl konnte nicht getroffen werden, da nur wenige Passagen vorlagen, die Passagenabstände zu gering waren und die vorhandene Zeit eine ausreichend lange serielle Passagierung nicht zuließ. Die PERV-mRNA-Expressionen in den getesteten Passagen der Milzmetastasenzelllinie waren im Vergleich zu den Expressionen in der Lungenmetastasenzelllinien nur gering, so dass auf Proteinebene die Expressionen der PERV-spezifischen Proteine p15E und p27Gag unter der Nachweisgrenze lagen. Ein Nachweis konnte weder durch Western Blot Analysen bei einem Einsatz von 30 µg Gesamtprotein noch durch Immunfluoreszenz erfolgen. Es besteht eine offensichtliche Diskrepanz zwischen der ermittelten hohen PERV-Expression in den untersuchten Milzbiopsien und der relativ schwachen Expression in den Milzmetastasenzelllinien. Bei Expressionsstudien von HERV-K in Melanombiopsien und in den daraus kultivierten Melanomzelllinien wurde in einem Fall Ähnliches detektiert. Es wurde vermutet, dass sich bei der *in vitro* Kulturnahme Zellen mit einer geringeren HERV-K Expression durchsetzen konnten (Büscher et al., 2005). Bei der Kultivierung der Milzmetastasenzellen könnte es demnach zu einem Selektionsvorteil von Zellen mit geringerer PERV-Expression gekommen sein.

5.2 Marker zur molekularen Identifizierung der Melanome in porzinen Gewebebiopsien

Um zu überprüfen, ob die untersuchten porzinen Gewebe auch tatsächlich Tumore darstellen, wurde ein Melanommarker identifiziert und etabliert. Auf RNA-Ebene wurde in den Geweben die Expression des Enzyms Tyrosinase quantifiziert. Dies erfolgte aus Kosten- und Zeitgründen mit Hilfe der Sybr Green realtime PCR.

Diese unspezifische Quantifizierungsmethode weist im Vergleich zur sensitiven und spezifischen Quantifizierung z.B. durch die Taq-Man-Methode einige Vor- und Nachteile auf. Zu den Vorteilen zählt die Tatsache, dass mit Fluoreszenzfarbstoffen viele verschiedene Gene analysiert werden können, ohne dass markierte genspezifische Sonden entwickelt und gekauft

werden müssen. Dadurch lassen sich auch die Kosten bei einer PCR-Optimierung einschränken. Mit Hilfe der Dissoziationskurven können mögliche Interaktionen von Primern sowie die Amplifikation spezifischer und unspezifischer PCR-Produkte detektiert werden. Als Nachteil ist die Notwendigkeit einer hohen PCR-Spezifität zu sehen, da Sybr Green unspezifisch an jegliche doppelsträngige DNA bindet. Dadurch kann es auch in den Negativkontrollen bedingt durch eine Anlagerung an Primer-Dimere, zu Fluoreszenzsignalen kommen. Die Auswertung von Dissoziationskurven zur Detektion möglicher unspezifischer Amplifikate, die zum Fluoreszenzsignal beitragen, ist unumgänglich. Darüberhinaus interkalieren mehrere Moleküle des Fluoreszenzfarbstoffs mit dem PCR-Produkt. Die Anzahl ist abhängig von der Größe des Amplifikates. Je größer das PCR-Produkt, desto stärker ist auch das Fluoreszenzsignal, was eine vergleichende Quantifizierung unterschiedlich langer Amplifikate beeinträchtigt.

Anhand der Dissoziationskurven für die *GAPDH*-Quantifizierung wurde die Amplifikation des spezifischen *GAPDH*-PCR-Produktes bestätigt. Die *GAPDH*-Expressionen waren in allen getesteten Gewebeproben annähernd gleich hoch, so dass eine Normalisierung der Proben mit Hilfe dieser Werte legitimiert war. Die Dissoziationskurven der Sybr Green realtime PCR zur Quantifizierung der *Tyrosinase*-Expression und die Auftrennung der Proben im Agarosegel zeigten, dass neben dem spezifischen *Tyrosinase*-PCR-Amplifikat auch ein weiteres unspezifisches Amplifikat auftrat. Dies deutete auf eine nicht-optimierte PCR Reaktion hin. Da aber das spezifische PCR-Produkt wesentlich stärker amplifiziert wurde und sich die Schmelzkurven des spezifischen und unspezifischen PCR-Produktes nicht überschneiden, wurde aus Zeitgründen auf eine weiterführende Optimierung verzichtet. Zudem sollte nur eine relative Quantifizierung der Proben vorgenommen werden.

Die Expression der *Tyrosinase* war in allen Primärtumoren und Geweben mit Metastasen im Vergleich zur Expression in normaler Haut erhöht. In normaler Haut und Milz waren die *Tyrosinase*-Expressionen auf annähernd gleichem Niveau. Die Überexpression in den Melanombiopsien und in den Geweben mit Metastasen erlaubte eine Diskriminierung zwischen pathologisch veränderten und normalen Geweben und verifizierte somit die Anwendbarkeit als Tumormarker. Die Höhe der *PERV*-Expressionen in den Melanombiopsien konnte nicht mit dem Grad der *Tyrosinase*-Überexpression in Verbindung gebracht werden. In den kutanen Melanomen des gleichen Tieres waren Unterschiede in den *Tyrosinase*-Expressionen zu verzeichnen. Dies könnte mit den Biopsienahmen im Zusammenhang stehen. Durch den unterschiedlichen Anteil an pathologisch verändertem und unauffälligem Gewebe in der Biopsie variierte auch der Anteil an isolierter RNA aus diesen

Bereichen. Am Beispiel der geteilten Biopsie des Lymphknotens mit Metastase vom Tier # 371 wurde deutlich, dass im optisch normalen Teil eine geringere *Tyrosinase*-Expression als in dem Gewebeanteil mit Metastase vorhanden war. In beiden Teilen lag allerdings die Stärke der Expression deutlich über der Expression in normaler Haut. Durch den Metastaseneinfall könnte demnach auch das angrenzende Gewebe beeinflusst werden.

6. Zusammenfassung

Porzine endogene Retroviren (PERVs) sind im Genom aller Schweine integriert. Ihre Expression in normalen porzinen Geweben sowie in Tumoren und ihre biologische Rolle ist bisher nicht ausführlich untersucht worden. Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte die Expression von PERVs in porzinen Melanomgeweben und Melanomzelllinien im Vergleich zum Normalgewebe und zu PBMCs analysiert werden. Des Weiteren sollte ein porziner Melanommarker identifiziert und genutzt werden, um den Melanomcharakter der Biopsien zu bestätigen. Die Expression von PERVs in porzinen Melanomen ist von Interesse, da unlängst in humanen Melanomen eine erhöhte Expression des endogenen Retrovirus HERV-K beschrieben wurde und ein *in vivo* Modellsystem zur Untersuchung der Beteiligung endogener Retroviren an der Tumorentstehung gesucht wird.

Im Genom der fünf untersuchten Trolle Schweine, die durch eine erhöhte Melanominzidenz charakterisiert sind, konnten alle drei replikationsfähigen PERV-Subtypen, die humantropen PERV-A und PERV-B sowie das ecotrope PERV-C mittels PCR detektiert werden. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte mittels One-Step realtime RT-PCR. Es wurde gezeigt, dass in den Milzen und in den kutanen Melanomen eine höhere Expression als in normaler Haut vorlag. In den Lymphknoten mit Metastasen wurde dagegen eine niedrigere Expression als in normaler Haut festgestellt. In den 3 untersuchten Melanomzelllinien wurde eine stärkere Expression von PERV detektiert. Bei den Lungenmetastasenzelllinien wurde sogar in Abhängigkeit von der Passagenanzahl eine Zunahme der Expression beobachtet. Die porzine *Tyrosinase* wurde als geeigneter Melanommarker identifiziert. Die mit Hilfe einer Sybr Green realtime PCR ermittelte höhere Expression der porzinen *Tyrosinase* in den Melanomgeweben im Vergleich zu normalem Gewebe bestätigte den Melanomcharakter der Biopsien.

Bei ersten Untersuchungen zum Nachweis von PERV-Proteinen wurde mit Hilfe von Western Blot Analysen das Gag-Vorläuferprotein in einem Melanom nachgewiesen. Das gesplattene PERV-Hauptstrukturprotein p27Gag und das transmembrane Hüllprotein p15E sowie dessen Vorläuferprotein wurden nicht detektiert. Während in den PBMCs und einer Milzmetastasenzelllinie keine PERV-Proteine nachgewiesen wurden, konnten in den Lungenmetastasenzelllinien eine Expression des p15E und des Gag-Vorläuferproteins beobachtet werden, die mit der Passagierung zunahm. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz wurde die Expression des p15E bestätigt. Diese Ergebnisse zeigen eine erhöhte PERV-Expression in porzinen Melanomen. Die Funktion von PERV bei der Tumorentstehung ist noch unklar, u.a. könnte die Expression des immunsuppressiven p15E die Tumorabstoßung verhindern.

7. Literaturverzeichnis

Akiyoshi R., Denaro M., Zhu H., Greenstein J.L., Banerjee P., Fishman J.A. (1998), Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine, *J. Virol.* 72, 5, 4503-4507

Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (Hrsg) (2004), *Krebs in Deutschland-Häufigkeiten und Trends*, 4. Auflage, Saarbrücken

Blaise S., Mangeney M., Heidmann T. (2001), The envelope of Mason-Pfizer monkey virus has immunosuppressive properties, *J. Gen. Virol.* 82, 1597-1600

Blusch J.H., Patience C., Martin U. (2002), Pig endogenous retroviruses and xenotransplantation (Review), *Xenotransplantation* 9, 242-251

Blusch J.H., Patience C., Takeuchi Y., Templin C., Roos C., Von Der Helm K., Steinhoff G., Martin U. (2000), Infection of nonhuman primate cells by pig endogenous retrovirus, *J. Virol.* 74, 16, 7687-7690

Breese S.S. Jr. (1970), Virus-like particles occurring in cultures of stable pig kidney cell lines, *Ach. Gesamte Virusforsch.* 30, 401-404

Breitbart E.W., Wende A., Mohr P., Greinert R., Volkmer B. (2004), *Hautkrebs*, GBE-Heft 22, Seite 7, 9

Büscher K., Trefzer U., Hofmann M., Sterry W., Kurth R., Denner J. (2005), Expression of Human Endogenous Retrovirus K in Melanomas and Melanoma Cell Lines, *Cancer Res.* 65, 10, 4172-4180

Cui J., Chen D., Misfeldt M.L., Swinfard R.W., Bystry J.(1995); Antimelanoma antibodies in swine with spontaneously regressing melanoma, *Pigment Cell Research* 8, 60-63

Czauderna F., Fischer N., Boller K., Kurth R., Tönjes R.R.(2000), Establishment and Characterization of Molecular Clones of Porcine Endogenous Retroviruses Replicating on Human Cells, *J. Virol.* 74, 9, 4028-4038

Denner J. (1976), Immunological activation of type C retroviruses, *Biol. Rundschau* 14, 230-231

Denner J. (1998), Immunosuppression by retroviruses: implications for xenotransplantation, *Ann. N Y Acad. Sci.* 862, 75-86

Denner J. (2001), *Xenotransplantation, Transspezies-Übertragung von Retroviren und AIDS (2001), Biotechnologische Verfahren und Möglichkeiten in der Medizin*, RKI-Schrift 1/01, 164-183.

Denner J., Specke V., Tacke S.J., Özel M. (2002), Porcine Endogenous Retrovirus (PERVs): Diagnostic Assays, Adaptation to Human Cells and Infection Experiments with Small Animals and Non-human Primates, *Tx. Med.* 14, 171-183

- Denner J., Specke V., Thiesen U., Karlas A., Reinhard K. (2003), Genetic alterations of the long terminal repeat of an ecotropic porcine endogenous retrovirus during passage in human cells, *Virology* 314, 125-133
- Ericson T., Oldmixton B., Blomberg J., Rosa M., Patience C., Andersson M (2001), Identification of novel porcine endogenous betaretrovirus sequences in miniature swine, *J. Virol.* 75, 2765-2670
- 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., Miyazawa T., Salomon D.R., Weiss R.A., Patience C. (2003), Identification of receptors for pig endogenous retrovirus, *PNAS* 100, 11, 6759-6764
- Frazier M.E (1985), Evidence for retrovirus in miniature swine with radiation-induced leukemia or metaplasia, *Arch. Virol.* 44, 269-275
- Hein R., Bosserhoff A.K., Degitz K. (2000), Tumormarker des malignen Melanoms, *Manual Maligne Melanome*, Tumorzentrum München
- Hirsch M.S., Black P.H., Tracy G.S., Leibowitz S., Schwartz R.S. (1970), Leukemia Virus Activation in Chronic Allogeneic Disease, *Proc. Nat. Acad. Sci* 67, 1914-1917
- Horak V., Soukupova P., Sinkora J., Rehakova Z., Veselsky L., Malek O., Hradecky J., Klaudy J. (2003), Melanoma devitalization induces T cell anti-tumour immunity in the MeLiM miniature pigs, *Pigment Cell Research* 16, 583-583(1)
- Hruban V., Horak V., Fortyn K., Hradecky J., Klaudy J., Smith D.M., Reisnerova H., Majzlik I. (2004), Inheritance of malignant melanoma in the MeLiM strain of miniature pigs, *Vet. Med.-Czech.* 49, 453-459
- Lander E.S., Linton L.M., Birren B., (2001), Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature*, 409, 860-921
- Le Tissier P., Stoye J.P., Takeuchi Y., Patience C., Weiss R.A. (1997), Two sets of human-tropic pig retroviruses, *Nature* 389, 681-682
- Li M., Huang X., Zhu Z., Gorelik E. (1999), Sequence and Insertion Sites of Murine Melanoma-Associated Retrovirus, *J. Virol.* 73, 11, 9178-9186
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method, *Methods* 25, 402-408
- Lottspeich F. & Zorbas H. (1998), *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Kapitel 5.3.4, Seite 96
- Löwer R., Löwer J., Frank H., Harzmann R., Kurth R. (1984), Human teratocarcinomas cultured in vitro produce unique retrovirus-like viruses, *J. Gen. Virol.* 65, 887-898
- Löwer R., Boller K., Hasenmaier B., Korbmacher C., Müller-Lantzsch N., Lower J., Kurth R. (1993); Identification of human endogenous retrovirus with complex mRNA expression and particle formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4480-4484

- Mangeny M. & Heidmann T. (1998), Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immune rejection in vivo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 14920-14925
- Mangeny M., de Parseval N., Thomas G., Heidmann T. (2001), The full-length envelope of an HERV-H human endogenous retrovirus has immunosuppressive properties, J. Gen. Virol. 82, 10, 2515-2518
- Mangeny M., Pothlichet J., Renard M., Ducos B., Heidmann T. (2005), Endogenous retrovirus expression is required for murine melanoma tumor growth in vivo, Cancer Res. 65, 7, 2588-2591
- Modrow S. & Falke D. (2002), Molekulare Virologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Kapitel 18.1.1-18.1.3
- Muster T., Waltenberger A., Grassauer A., Hirschl S., Caucig P., Romirer I., Födinger D., Seppel H., Schanab. O., Magin-Lachmann C., Löwer R., Jansen B., Pehamberger H., Wolff Klaus (2003), An Endogenous Retrovirus Derived from Human Melanoma Cells, Cancer Res. 63, 8735-8741
- Mülhardt C. (2000), Der Experimentator, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Kapitel 2.4
- Müller S., Wanke R., Distl O. (1995), Segregation von Pigmentzellanomalien beim Münchener Miniaturschwein (MMS) Trol in Kreuzungen mit der Deutschen Landrasse, Dtsch. tierärztl. Wschr. 102, 391-394
- Ono M., Kawakami M., Ushikubo H. Stimulation of expression of the human endogenous retrovirus genome by female steroid hormones in human breast cancer cell line T47D, J. Virol. 61, 2059-2062
- Patience C., Switzer W.M., Takeuchi Y., Griffiths D.J., Goward M.E., Heneine W., Stoye J.P., Weiss R.A. (2001), Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs related species, J. Virol. 75, 2771-2775
- Ragheb J.A., Anderson W.F. (1994), Uncoupled expression of Moloney murine leukaemia virus envelope polypeptides SU and TM: a functional analysis of the role of TM domains in viral entry, J. Virol. 68, 3207-3219
- Roth A. & Glasmacher A. (2002), Chronische lymphatische Leukämie-Ein Ratgeber für Patienten, MedacSchering Onkologie; Kapitel 2, Seite 14
- Specke V., Rubant S., Denner J. (2001a), Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses (PERVs), Virol. 285, 177-180
- Specke V., Tacke S.J., Boller K., Schwendemann J., Denner J. (2001b), Porcine endogenous retroviruses: *in vitro* host range and attempts to establish small animal models, J. Gen. Virol. 82, 837-844
- Specke V. & Denner J. (2003), Porcine endogene Retroviren (PERVs) und Xenotransplantation, Dtsch. Med. Wochenschr. 2003 128, 1301-1306

- Suzuka I., Shimizu N., Sekiguchi K., Hoshino H., Kodama M., Shimotohno K. (1986), Molecular cloning of unintegrated closed circular DNA of porcine retrovirus, *FEBS Lett* 198, 339-343
- Tacke S.J., Kurth R., Denner J. (2000), Porcine Endogenous Retroviruses Inhibit Human Immune Cell Function: Risk for Xenotransplantation?, *Virology* 268, 87-93
- Tacke S.J., Specke V., Denner J. (2003), Differences in Release and Determination of Subtype of Porcine Endogenous Retroviruses Produced by Stimulated Normal Pig Blood Cells, *Intervirology* 46, 17-24
- Takeuchi Y., Patience C., Magre S., Weiss R., Banerjee P., Le Tissier P., Stoye J.P. (1998), Host Range and Interference Studies of Three Classes of Pig Endogenous Retroviruses, *J. Virol.* 72, 12, 9986-9991
- Vincent-Naulleau S., Le Chalony C., Leplat J., Bouet S., Bailly C., Spatz A., Vielh P., Avril M., Tricaud Y., Gruand J., Horak V., Frelat G., Geffrotin C. (2004), Clinical and Histopathological Characterization of Cutaneous Melanomas in the Melanoblastoma-Bearing Libechov Minipig Model, *Pigment Cell Res.* 17; 24-35
- Wang-Johanning F., Frost A.R., Jian B., Epp L., Lu D.W. Johanning G.L. (2003), Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer, *Oncogene* 22, 1528-1535
- Weidner C. (1991), Pigmentzellanomalien beim Münchener Miniaturschwein Troll®: Klinische, histologische immunhistologische und enzymhistochemische Untersuchungen, *Diss. Med. vet., LMU München*
- Wilson C.A., Wong S., VanBrocklin M., Federspiel M.J. (1999), Extended Analysis of the In Vitro Tropism of Porcine Endogenous Retrovirus, *J. Virol.* 74, 1, 49-56

8. Anhang

8.1 Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide

Tab.8.1: verwendete Oligonukleotide

Primer	Gen	Sequenz	Annealing-temperatur
porz. GAP-DH for porz. GAP-DH rev	<i>GAPDH</i> von sus scrofa	5'-CTGCCCTTCTGCTGATGC 5'-TCCACGATGCCGAAGTTGTC	55°C
vorSD_up hinterSD_rev hinterSA_rev	Vollängen mRNA bzw. gespleißte <i>env</i> - mRNA	5'-TGCTGTTTGCATCAAGACCGC 5'-ACAGACACTCAGAACAGAGAC 5'-ATGGAGGCGAAGCTTAAGGG	55°C
PK1 for PK6 rev	<i>pol</i> von PERV	5'-TTGACTTGGGAGTGGGACGGGTAAC 5'-GAGGGTCACCTGAGGGTGTTGGAT	55°C
PERV-gag1 PERV-gag2	<i>gag</i> von PERV	5'-GCGACCCACGCAGTTGCATA 5'-CAGTTCCTTGCCCAGTGTCTT	55°C
PERV A-env1 PERV A-env2	<i>env</i> von PERV A	5'-TGGAAAGATTGGCAACAGCG 5'-AGTGATGTTAGGCTCAGTGG	60°C
PERV B-env1 PERV B-env2	<i>env</i> von PERV B	5'-TTCTCCTTTGTCAATTCCGG 5'-TACTTTATCGGGTCCCACTG	55°C
PERV C-env1 PERV C-env2	<i>env</i> von PERV C	5'-CTGACCTGGATTAGAACTGG 5'-ATGTTAGAGGATGGTCCTGG	55°C
ssTyr1 for ssTyr1 rev	<i>Tyrosinase</i> von sus scrofa	5'-GCTTTGGCAACTTCATGGGATTTA 5'-CGAAGTCTGGGCTGGTAGTATGTT	54°C
real_PERVs real_PERVas	<i>gag</i> von PERV	5'-TCCAGGGCTCATAATTTGTC 5'-TGATGGCCATCCAACATCGA	54°C
PERV-Sonde	<i>gag</i> von PERV	5'-AGAAGGGACCTTGGCAGACTTTCT	54°C

8.2 Proteingrößenmarker

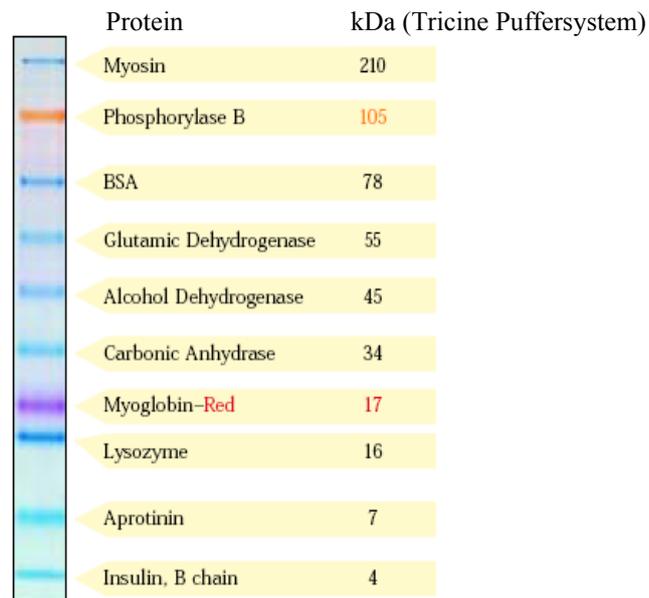


Abb.8.1: Invitrogen SeeBlue Plus2

8.3 DNA-Größenmarker

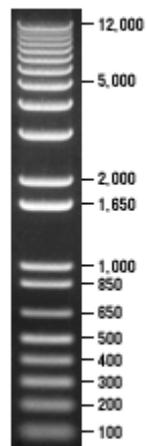


Abb.8.2: Invitrogen 1 kb⁺-DNA Marker

8.4 Induzierbare Expressionsvektoren

Der pQE-30 Proteinexpressionsvektor erlaubt die Aufreinigung des rekombinanten Proteins über einen 6x His-Taq, welcher beliebig am N- oder C-Terminus des Proteins lokalisiert werden kann (Abb. 8.3).

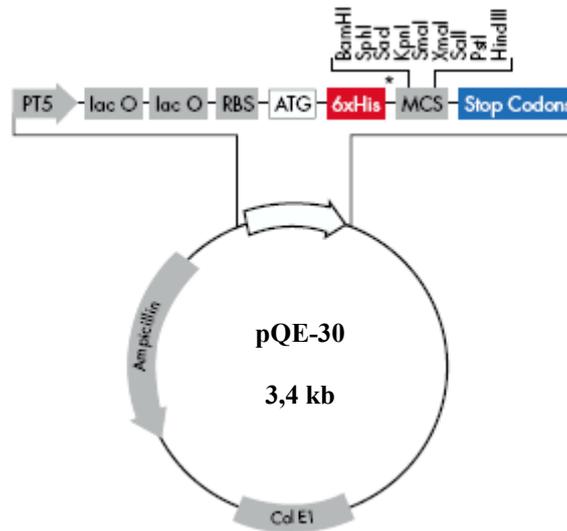


Abb:8.3 Proteinexpressionsvektor pQE-30

Der pCAL-n Proteinexpressionsvektor ermöglicht die spätere Aufreinigung des rekombinanten Proteins über ein Calmodulin-Bindungspeptid-Fusionsprotein (CBP), welches am N- oder C-Terminus der Proteinsequenz lokalisiert ist (Abb. 8.4).

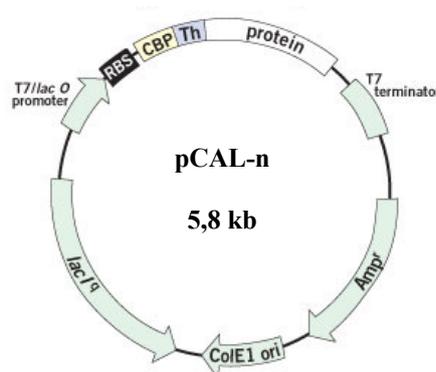


Abb:8.4 Proteinexpressionsvektor pCAL-n