

**Porzine endogene Retroviren (PERVs):
In vitro-Infektionsversuche und Adaptation an
humane Zellen**

Diplomarbeit

Vorgelegt der Mathematisch – Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität in Potsdam

Angefertigt am Robert Koch Institut, Berlin

Katrin Voigt, im August 2001

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Entwicklung der Organtransplantationen	1
1.2 Xenotransplantation als Alternative zur Allotransplantation	2
1.2.1 Mögliche Spendertiere für die Xenotransplantation	4
1.2.2 Immunologische Abstoßungsreaktionen	5
1.3 Xenozoonosen	6
1.4 Retroviren	8
1.4.1 Einteilung der Retroviren	8
1.4.2 Aufbau der Gammaretroviren	10
1.4.3 Immunsuppressive Eigenschaften von Retroviren	12
1.5 Porzine endogene Retroviren	13
2 Zielsetzung	15
3 Material und Methoden	16
3.1 Geräte	16
3.2 Verbrauchsmaterialien	17
3.2.1 Materialien für die Zellkultur	17
3.2.2 Chemikalien	17
3.2.3 Enzyme	18
3.2.4 Seren	18
3.2.5 Antikörper und Antiseren	18
3.2.6 Antibiotika	18
3.2.7 Oligonukleotide	19
3.3 Lösungen und Puffer	20
3.4 Medien	21
3.4.1 Medien zur Kultivierung von Zellen	21
3.4.2 Medien zur Kultivierung von Bakterien	21
3.5 Verwendete Zellen	22
3.5.1 Zell-Linien	22
3.5.2 PERV produzierende Zell-Linien	22
3.6 Verwendete Bakterien	22
3.6.1 <i>Escherichia coli</i>	22

3.7 Verwendete Plasmide	23
3.8 Zellbiologische Methoden	23
3.8.1 Kultivierung von Zell-Linien	23
3.8.2 Infektionsversuche	24
3.8.3 Bestimmung der Zelldichte	24
3.8.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	25
3.9 Methoden zum Virusnachweis	25
3.9.1 Reverse Transkriptase-Aktivitäts-Assay (RT-Test)	25
3.9.2 Immunperoxidase-Assay (IPA)	26
3.9.3 Virustitration	27
3.10 Molekularbiologische Methoden	27
3.10.1 Isolierung genomischer DNA	27
3.10.2 Isolierung von Plasmid-DNA	28
3.10.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA in wässriger Lösung	28
3.10.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	28
3.10.5 Sequenzierung	30
3.11 Klonierung der 5'-LTR von PERV	30
3.11.1 Ligation mit dem TOPO TA Cloning® Kit	30
3.11.2 Transformation	31
3.11.3 Restriktionsverdau	31
3.11.4 Selektion positiver Klone	32
3.11.5 Agarosegele und Gelelektion	32
3.12 Proteinanalyse	33
3.12.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	33
3.12.2 SDS-PAGE-Gelelektrophorese	33
3.12.3 Western Blot	34
4 Ergebnisse	36
4.1 Charakterisierung der verwendeten PERVs	36
4.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung von PERV	37
4.3 Infektion humaner lymphoider Zellen am Beispiel der T-Zell- Linie C8166	38

4.4 Untersuchungen zur Adaptation von PERV-A und von PERV-B an humanen 293 Zellen	41
4.4.1 Nachweis der Neuinfektion mittels PCR	41
4.4.2 Nachweis der produktiven Virusinfektion der passagierten PERV mittels RT-Aktivitätstest	43
4.4.3 Titerbestimmung der passagierten PERVs	47
4.4.4 Untersuchung der LTR-Region der passagierten PERVs	48
4.5 Charakterisierung der Adaptation von PERV-A/C	50
4.5.1 Sequenzanalyse der LTR-Region von PERV NIH/3 und PERV NIH/5	52
5 Diskussion	57
6 Zusammenfassung	66
7 Literaturverzeichnis	67
8 Anhang	78
8.1 Abkürzungsverzeichnis	78
8.2 Plasmidkarten	81
8.3 Sequenzen der molekularen PERV-LTR-Klone	84
9 Danksagung	88
10 Erklärung	89

1 Einleitung

1.1 Entwicklung der Organtransplantation

Da der Mensch von der Funktionstüchtigkeit seiner Organe abhängt, werden in Deutschland bei akutem oder chronischem Organversagen jährlich ca. 3500 Transplantationen (lat. *transplantare*: verpflanzen) durchgeführt (Eurotransplant, 2001). Für viele dieser Patienten ist die Transplantation eines Fremdorgans oft lebensnotwendig. Für andere Patienten stehen zwar überbrückende Maßnahmen wie z.B. die Dialyse zur Verfügung, aber eine Transplantation ist die einzige Möglichkeit ihre Lebensqualität zu verbessern. Die Anfänge der modernen Organtransplantation liegen in den sechziger Jahren (Hardy *et al.*, 1964). Bis Anfang der achtziger Jahre war die Überlebensdauer der transplantierten Organe vergleichsweise kurz. Die Weiterentwicklung der immunsuppressiven Therapie (Thompson, 1992), z.B. durch kombinierten Einsatz von Medikamenten und Herabsenken der Nebenwirkungen, wurden die Erfolgsaussichten einer Organtransplantation verbessert. Es besteht jedoch eine eklatante Diskrepanz zwischen der Zahl, der für eine Transplantation zur Verfügung stehenden menschlichen Organe, und der Zahl der Patienten auf den Wartelisten für solche Allotransplantationen (gr. *allos*: anders). Da zu wenig Spenderorgane verfügbar sind, deckt die Zahl der vorgenommenen Organtransplantationen bei weitem nicht den Bedarf (AKOS, 2001). Den aktuellen Stand der Transplantationsstatistik für Deutschland zeigen Tab. 1.1 und Abb. 1.1.

Tab. 1.1: Transplantationsstatistik in Deutschland, Stand per 31.12.00, nur Leichenspenden. Daten: Eurotransplant, 2001

Patientenzahl	Niere	Leber	Pankreas-Niere	Herz	Lunge	Herz-Lunge
Auf Warteliste	9510	600	153	381	270	31
Transplantiert	1641	692	232	407	147	11

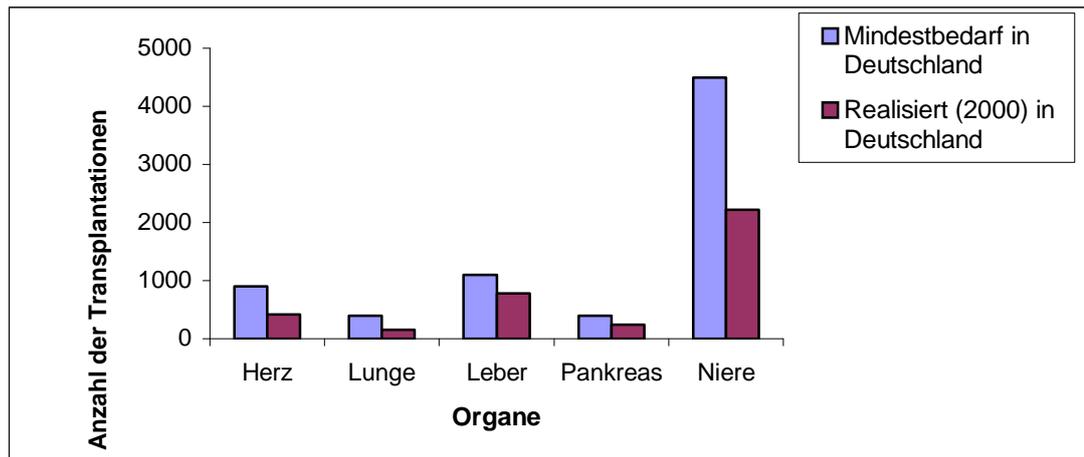


Abb. 1.1: Vergleich zwischen der Zahl der durchgeführten Transplantationen und der Zahl der Patienten auf der Warteliste für verschiedene Organe.

Dargestellt sind die Daten vom Jahr 2000 im Verantwortungsbereich vom Arbeitskreis Organspende (ASKO, 2001)

Je nach zu transplantierendem Organ versterben bis zu 30% der Patienten im Laufe der Wartezeit (Alexander & Zola, 1996; Smith, 1997). Eine weitere Möglichkeit, den akuten Organmangel einzugrenzen, ist die Entwicklung künstlicher Organe, wie das künstliche Herz (Anderson *et al.*, 2000; SoRelle, 2000). Ein anderer medizinischer Ansatz, dem Mangel an Organen entgegen zu wirken, könnte das „Tissue Engineering“ sein, welches heute schon einen wichtigen Beitrag u.a. bei Hauttransplantationen, bei der embryonale Vorhautzellen (Chang *et al.*, 2000) wie auch Hautzellen (Tanczos *et al.*, 1999) zum Einsatz kommen, darstellt. Der große Vorteil bei diesem Verfahren ist, dass bei Transplantationen eigener Zellen eine immunsuppressive Therapie überflüssig ist, da die Gefahr einer Abstoßung des transplantierten Gewebes nicht gegeben ist. Eine weitere Möglichkeit bietet die sogenannte Xenotransplantation.

1.2 Xenotransplantation als Alternative zur Allotransplantation

Bei der Xenotransplantation (gr. *xenos*: fremd) werden im Gegensatz zur Allotransplantation Organe, Gewebe oder Zellen zwischen verschiedenen Spezies verpflanzt (Kaufman *et al.*, 1995; Lanza *et al.*, 1997; Auchincloss & Sachs, 1998). Man unterscheidet zwischen konkordanter, der Übertragung

von Organen zwischen stammesgeschichtlich eng verwandten Spezies, und diskordanter Xenotransplantation, der Verpflanzung von Organen zwischen sehr unterschiedlichen Spezies.

Die ersten Versuche einer Xenotransplantation wurden 1910 von Unger durchgeführt. Im Jahr 1963 überlebte ein Patient neun Monate, dem eine Schimpansenniere transplantiert wurde (Calne, 1966; Reemtsma *et al.*, 1964). Ein Jahr später wurde eine Herztransplantation mit einem Schimpansenherz durchgeführt (Hardy *et al.*, 1964). Die Überlebensdauer dieser und anderer Organe war jedoch durch Abstoßungsreaktionen bis in die achtziger Jahre beschränkt. Nach der Weiterentwicklung der Immunsuppressionstherapie wurden Anfang der neunziger Jahre weitere Xenotransplantationen durchgeführt, bei denen u.a. Pavianorgane verpflanzt wurden. Es konnten Überlebenszeiten bis zu sechzig Tagen erreicht werden (Starzl *et al.*, 1993). Bei der Verwendung von tierischen Organen treten anatomische und physiologische Schwierigkeiten auf, welche später ausführlicher diskutiert werden. Die Organe des Spendertiers müssen kompatibel zu den Organen des Menschen sein. Dabei spielt nicht nur die Größe der Organe eine wichtige Rolle, sondern auch die enzymatische und hormonelle Ausstattung. Die hyperakute Abstoßungsreaktion (HAR) ist die auffälligste Reaktion bei diskordanten Transplantationen. Ursache für die HAR sind Antikörper gegen Galaktosyl- α -1,3-galaktosyl (Gal- α -1,3-gal)-Epitope, die sich auf den Zellen des Spendertiers befinden. Weiterhin können andere immunologische Abstoßungsreaktionen, die ebenso bei einem Allotransplantat, wie die akute (interstitiell, vaskulär) und chronische Abstoßung, auftreten. Als wichtiges Problem stellt sich bei der Xenotransplantation die Frage nach der Durchseuchung des Organdonors mit Mikroorganismen, die möglicherweise auf den Rezipienten übertragen werden können.

1.2.1 Mögliche Spendertiere für die Xenotransplantation

Nicht-humane Primaten

Aufgrund der starken phylogenetischen Verwandtschaft und anatomischen Kompatibilität der nicht-humanen Primaten zum Menschen bieten sie scheinbar günstige Spenderorgane (Goodman *et al.*, 1994). So haben Menschenaffen (Schimpanse oder Gorilla) eine bedingt vergleichbare Organgröße und –physiologie, eine ähnliche Morphologie der Organe und eine bessere immunologische Akzeptanz des Donororgans durch den Rezipienten (Bontrop *et al.*, 1993). Es besteht ferner eine Kompatibilität der Blutgruppen (O`h Uigin *et al.*, 1997). Organe anderer Primaten (z.B. Paviane) sind zu klein für erwachsene Menschen, so dass man diese in Ausnahmefällen nur für Kinder verwenden könnte. Diesen Vorteilen stehen zum einen ethische sowie tier- und artenschutzrechtliche Probleme gegenüber (Hughes, 1998; Cruz *et al.*, 2000). Weitere Gründe, die gegen die Verwendung von nicht-humanen Primaten sprechen, sind die langsame Reproduktion und geringe Nachkommenzahl (Harcourt *et al.*, 1980), sowie die schwierige Züchtung. Nicht zu vergessen ist die hohe Durchseuchung der nicht-humanen Primaten mit vielen Mikroorganismen. Man geht davon aus, dass auf Grund der phylogenetischen Nähe von Menschen und anderen Primaten das Risiko einer Infektionsübertragung durch die geringe Speziesbarriere (Allan, 1998; Allan *et al.*, 1998; Michaels *et al.*, 2001) sehr hoch ist.

Schweine

Da Primaten als Donor ausscheiden (s.o.), wurde der Einsatz von Schweinen als Spendertiere trotz der durch die phylogenetischen Divergenz verbundenen immunologischen Probleme in Betracht gezogen. Da Schweine seit langem in Europa gehalten werden, ist ihre Verwendung zu Transplantationszwecken ethisch gesehen unproblematisch. Bei den Betroffenen, die auf der Warteliste stehen, und den Patienten die schon ein Transplantat erhalten haben, ist die Akzeptanz tierischer Transplantate sehr groß. Weitere Gründe zur Nutzung von Schweineorganen für Transplantationen liegen in der ausreichend großen anatomischen

Ähnlichkeit und weitgehend physiologischen Übereinstimmung (Hannon *et al.*, 1990). Des Weiteren sind die wirtschaftlichen Faktoren von Bedeutung. Die Haltung von Schweinen ist im Vergleich zu Primaten günstig, zudem haben sie eine sehr große Nachkommenzahl. Allerdings gibt es zu den immunologischen Schwierigkeiten, wie die hyperakute Abstoßungsreaktion aufgrund der phylogenetischen Unterschiede, auch physiologische Probleme, beispielsweise ist das Erythropoetin des Schweins trotz einer Homologie von 82% im Primaten nicht funktionell (Hammer, 1998).

1.2.2 Immunologische Abstoßungsreaktionen

Bei der hyperakuten Reaktion kommt es nach einigen Minuten bis Stunden zu Schädigungen des endothelialen Gewebes der Blutgefäße des Transplantats. Diese Reaktion wird ausgelöst durch präformierte Antikörper gegen Gal- α -1,3-gal, die auf den Zellen bei allen Tieren mit Ausnahme des Menschen als Oberflächenantigene auftreten (Lin *et al.*, 1998; Sandrin *et al.*, 1993). Durch austretende Zellen und Flüssigkeit entstehen Thromben, welche die Feindurchblutung des Transplantats durch Abschneiden der Blutversorgung blockieren. Als Folge der unterbrochenen Versorgung kommt es zu Nekrosen und schließlich zum Organversagen.

Zur Vermeidung der HAR wurden mehrere Strategien entwickelt. Es wurden neutrale, aus Schweinemagen-Mucin isolierte Oligosaccharide getestet, die Anti-Gal- α -1,3-gal-Immunglobuline *in vitro* binden und die Zytotoxigenität von humanen Seren auf Schweinezellen reduzierten (Li *et al.*, 1996). Eine andere Möglichkeit um die HAR zu unterdrücken ist die Plasmaphorese, bei der Antikörper gegen Gal- α -1,3-gal aus dem Serum entfernt werden konnten. Ein weiterer Ansatz war die genetische Modifikation von Schweinen, die Entwicklung transgener Schweine. Dabei wurden die Schweine z.B. mit Genen ausgestattet, welche Enzyme kodieren, die zur Verringerung der Expression von Gal- α -1,3-gal an der Zelloberfläche beitragen (Artrip *et al.*, 1997; Osman *et al.*, 1997). Der Versuch, Gal- α -1,3-gal durch Ausschalten der Gene, die für die Produktion und Expression verantwortlich sind, zu entfernen, konnte bei Schweinen bislang noch nicht realisiert werden.

(Vanhove *et al.*, 1998). Es ist aber möglich, Gene, die humane Komplementsystem-Regulatoren kodieren, z.B. DAF (decay-accelerating factor, CD55) (Schmoekel *et al.*, 1997), MCP (Membran-Cofaktor-Protein, CD46) oder Protectin (CD59) (Byrne *et al.*, 1997), in das Genom von Schweinen einzufügen, so dass durch deren Expression die Zerstörung des fremden Gewebes durch die HAR nicht mehr möglich ist.

Neben der HAR gibt es bei der Xenotransplantation, ebenso wie bei der Allotransplantation, auch die T-Zell-vermittelte Abstoßung, die durch die Gabe von immunsuppressiven Medikamenten, z.B. Cyclosporin A, FK 506, Rapamycin und Desoxyspergulin und deren Kombination unterdrückt werden kann (Meriggi *et al.*, 1994). Ungeklärt ist, inwieweit die im Vergleich zur Allotransplantation höher anzusetzende Medikation mit Immunsuppressiva die Entstehung von Tumoren fördert, da eine lebenslange Einnahme nötig wäre. So kann es bei Xenotransplantatempfängern, ähnlich wie bei Allotransplantatempfängern, zu erhöhter Anfälligkeit gegenüber Infektionen bzw. zur Entwicklung von Krebsarten kommen, wie z.B. den Non-Hodgkin-Lymphomen. Daher ist es erforderlich, Immunsuppressiva für die Xenotransplantation zu entwickeln, um die oben genannten Risiken (Tumorentstehung usw.) auszuschließen.

1.3 Xenozoonosen

Die Übertragung einer Infektion von einer tierischen Spezies auf den Menschen wird als Zoonose bezeichnet. Derartige Vorgänge treten gelegentlich in der Natur auf (Enserink, 1999; Martin *et al.*, 1999a; Enserink, 2000). Für den Fall des Transfers von Keimen vom Spendertier auf den menschlichen Empfänger bei der Xenotransplantation wurde der Begriff Xenozoonose eingeführt. Ein großes Problem bei der Xenotransplantation ist die Durchseuchung der Spendertiere mit Mikroorganismen, die bei der Xenotransplantation auf den Rezipienten übertragen werden können (Fishman, 1997), wie z.B. die porzinen endogenen Retroviren (PERVs). Viren sind zwar speziesspezifisch, aber es kommt gelegentlich zu Transspeziesübertragungen. Viele Epidemien, hervorgerufen durch

Immundefizienz-, Influenza-, Ebola-, Hanta- und Nipah-Viren, sind infolge von Zoonosen entstanden (Le Guenno *et al.*, 1995; Enserink, 1999; Webster, 1997; Onions *et al.*, 2000). Die wohl bekanntesten Beispiele für die Apathogenität in einem Wirt und die Pathogenität in einem anderen Wirt sind die humanen Immundefizienzviren HIV-1 und HIV-2. Beide stammen von Immundefizienzviren der Affen ab. Das humane Immundefizienzvirus HIV-1 entstand durch eine Übertragung des simianen Immundefizienzvirus wildlebender Schimpansen (*chimpanzee*) (SIV_{cpz}) auf den Menschen (Gao *et al.*, 1999). Das simiane Immundefizienzvirus der Rauchgrauen Mangaben (*sooty mangabey*) (SIV_{sm}) ist mit dem humanen Immundefizienzvirus HIV-2 und dem simianen Immundefizienzvirus der Rhesusaffen (*macaca mulatta*) (SIV_{mac}) nahe verwandt. Es wurde nachgewiesen, dass die Viren nach der Übertragung auf den Menschen bzw. den Rhesusaffen entstanden sind (Gao *et al.*, 1999) und in diesen Spezies eine Immundefizienz verursachen. Um Xenozoonosen bei Xenotransplantationen zu vermeiden, versucht man, bekannte Krankheitserreger durch Züchtungen sogenannter spf-Spendertiere (specified-pathogen-free), die unter keimfreien Bedingungen gehalten werden, zu eliminieren (Swindle, 1998). Eine andere Möglichkeit ist, die Erreger durch Testen und Eliminieren der infizierten Tiere sowie durch Antibiotikabehandlungen, durch Chemotherapie und vorbeugende Impfungen auszumerzen. Es besteht die Notwendigkeit, spezifische Tests zum Nachweis dieser Mikroorganismen zu entwickeln, um die Reinheit der Tiere zu garantieren und das Risiko einer Infektion zu minimieren. Die porzinen endogenen Retroviren stellen eine große Gefahr bei der Xenotransplantation dar, denn bei Tierversuchen wurde für PERV eine Transspeziesübertragung bei NOD/SCID-Mäusen (*non-obese diabetic, severe combined immunodeficiency*) nachgewiesen (Deng *et al.*, 2000 ; van der Laan *et al.*, 2000). Man muss daher von einer potentiellen Übertragungsgefahr von PERV bei Xenotransplantationen ausgehen und diese noch intensiver untersuchen, um eine mögliche Übertragung auf den Rezipienten letztlich ausschließen zu können.

1.4 Retroviren

Viren unterscheiden sich von anderen Mikroorganismen durch folgende Eigenschaften: Sie enthalten nur einen Typ von Nukleinsäure, entweder DNA oder RNA, und sie sind nicht in der Lage, sich außerhalb lebender Zellen zu vermehren. Viren sind also keine selbständigen Organismen. Die Vermehrung erfolgt in der Wirtszelle.

Die Einteilung der Viren erfolgt entsprechend der in ihrem Genom vorhandenen Nukleinsäuren und der von ihnen verwendeten Synthesewege zur Produktion von mRNA (Lodish *et al.*, 1995). Retroviren sind Viren mit einzelsträngigem RNA-Genom und bilden eine doppelsträngige DNA als Zwischenprodukt, welches in das Zellgenom integriert und als Provirus bezeichnet wird. Bei der Infektion wird die virale RNA in eine Zelle eingeschleust. Das Enzym Reverse Transkriptase (RT, namensgebendes Enzym), eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, nutzt die RNA als Matrize für die DNA-Synthese. Somit wird den Viren der umgekehrte Weg der Replikation eröffnet (Baltimore, 1970).

1.4.1 Einteilung der Retroviren

Die historische Unterteilung der Retroviren in Typ A-, B-, C-, D- sowie Lenti- und Spumaviren (Gelderblom, 1991; Denner, 1999b) basierte auf elektronenmikroskopische Untersuchungen der morphologischen Eigenschaften des Kapsids. In der Zwischenzeit werden die Morphogenese, andere biologische Eigenschaften und vor allem die Struktur des retroviralen Genoms als Merkmale zur Einteilung herangezogen.

Die Familie der Retroviren lässt sich in die sieben folgenden Gattungen einteilen: (i) die Alpharetroviren mit dem aviären Leukose-Virus (ALV), (ii) die Betaretroviren mit dem Maus-Mamma-Tumorvirus (MMTV), (iii) die Gammaretroviren mit dem murinen Leukemievirus (MuLV) und dem felines Leukemievirus (FeLV), die morphologisch die C-Typ Viren darstellen, (iv) die Deltaretroviren mit den Rinder-Leukämie-Virus (BLV) und den humanen T-Zell-Leukämie-Viren (HTLV-Gruppe), (v) die Gattung der Epsilonretroviren,

(vi) die Lentiviren, die als wichtigste Vertreter HIV-1 und HIV-2 beinhalten, und schließlich bilden (vii) die Spumaviren die letzte Gattung (van Regenmortel *et al.*, 2001).

Ferner lassen sich die Retroviren in exogene und endogene Viren unterteilen. Beide enthalten in ihrem Genom alle Informationen, die für den Ablauf eines Infektionszyklus mit Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln benötigt werden. Das Genom bestimmter exogener Retroviren kann Onkogene enthalten. Exogene Retroviren, wie z.B. das humane Immundefizienzvirus HIV, infizieren nur bestimmte Zellen des Menschen, d.h. sie verbreiten sich horizontal von Zelle zu Zelle. Im Unterschied dazu vermehren sich die endogenen Retroviren über einen vertikalen Gentransfer, d.h. wird eine Keimzelle infiziert, so wird das Retrovirusgenom als Provirus an den aus dieser Keimzelle entstehenden Organismus weiter gegeben. Seine Erbinformation ist dann in jeder Körperzelle enthalten und wird auch an alle Tochterorganismen weitergegeben (Boeke & Stoye, 1997). Unter bestimmten Bedingungen werden sie zur Produktion von infektiösen Partikeln, die für andere Organismen exogene Viren darstellen aktiviert. Es ist davon auszugehen, dass in den Genomen aller Vertebraten endogene Retroviren vorhanden sind (Löwer *et al.*, 1996).

1.4.2 Aufbau der Gammaretroviren

Da PERVs Gammaretroviren darstellen, sollen diese hier näher beschrieben werden. Die infektiösen Partikel haben einen Durchmesser von etwa 80-100 nm (Abb. 1.2).

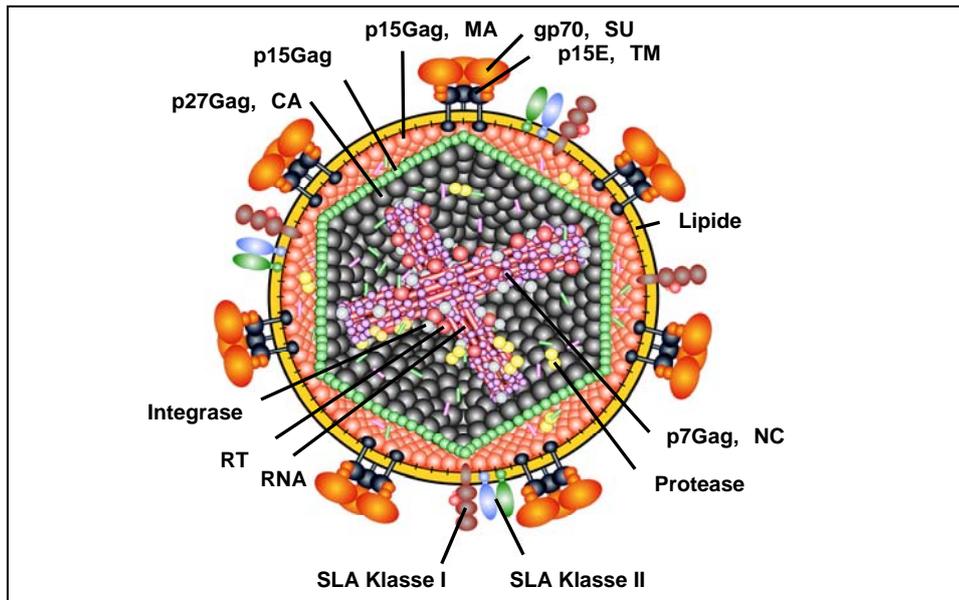


Abb. 1.2: Schematische Darstellung eines Gammaretroviruspartikels.
(modifiziert und mit freundlicher Genehmigung von Dr. Stephen Norley und Dr. Stefan Tacke)

Das Kapsid ist von einer Hüllmembran umgeben, welche von der Zellmembran der Zelle abgeleitet ist. Mit ihr sind die viralen Glycoproteine assoziiert, von denen eines als transmembranes Hüllprotein (TM) über eine Region von ca. 20 hydrophoben Aminosäuren verankert ist. Das sogenannte Oberflächenhüllprotein (surface protein, SU-Protein), ist dagegen durch Disulfidbrücken mit dem außerhalb der Membran gelegenen Teil des transmembranen Proteins verbunden. Beide werden als gemeinsames Vorläuferprotein gebildet, und während der Virusmorphogenese durch eine zelluläre Protease gespalten. Die Matrixproteine (MA) sind über aminoterminal angefügte Myristinsäurereste mit der Innenseite der Hüllmembran verbunden. Im Partikelinneren findet man das Viruskapsid. Es besteht aus Kapsidproteinen (capsid protein, CA), die wie die Matrixproteine Komponenten der gruppenspezifischen Antigene (Gag-Proteine) sind. Die

Kapside enthalten zwei identische Moleküle einzelsträngiger RNA als Virusgenom. Die RNA ist mit dem Nukleokapsidprotein (nucleocapsid protein, NC) komplexiert, das ebenfalls aus dem Gag-Vorläuferprotein hervorgeht. Als weitere virale Komponenten befinden sich im Viruspartikel die Enzyme Reverse Transkriptase (RT), die Integrase (IN) und die Protease (PR).

Die kodierenden Regionen werden am 5'- und 3'-Ende von regulatorisch wichtigen Kontrollsequenzen flankiert, die für die reverse Transkription.

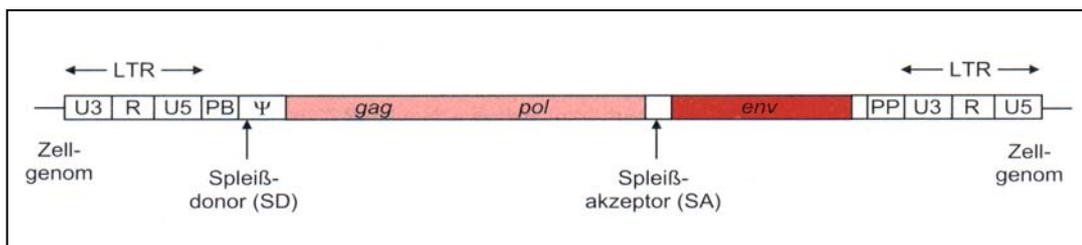


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der in das Wirtsgenom integrierten Provirus-DNA eines Retrovirus. LTR = *Long terminal repeats*, U3 = unique (besondere) Region am 3'-Ende, U5 = unique Region am 5'-Ende, R = redundante (wiederholte) Region, PB = Primerbindungsstelle, PP = Polypurinstelle, gag = gruppenspezifische Antigene, pol = Polymerase (RT), env = Env-Hüllprotein (envelope). (Modrow und Falke, 1998)

Nach der reversen Transkription wird die virale Erbinformation als doppelsträngige DNA in das Genom der Zelle integriert.

Das integrierte Provirusgenom hat an den Enden identische Sequenzfolgen, die im Verlauf des Umschreibens der einzelsträngigen RNA in die DNA generiert werden. Sie flankieren die Virusgene, und man bezeichnet sie als LTR (*Long terminal repeats*). Diese repetitiven Sequenzen bestehen aus den Regionen U3, R und U5, die an den Genomenden in gleicher Orientierung vorliegen (Abb. 1.3). Die LTR enthält alle *cis*-aktiven Sequenzen, die Promotor- und Enhancer-Elemente sowie Transkriptionsaktivator- und Repressor-Sequenzen (Vogt, 1997), welche die retrovirale Genexpression kontrollieren. Zelluläre, transaktive Proteine binden an bestimmte Regionen innerhalb der LTR, vorrangig an den U3-Sequenzen und induzieren die Transkription der Virus-Gene. Die drei Gene gag (*group specific antigene*), pol (*polymerase*) und env (*envelope*) werden von den LTR-Bereichen umgeben. Das gag-Gen kodiert für die Kapsid-, Matrix- und für die Nukleokapsidproteine. Die pol-Region kodiert für Gene, die für die

Synthese der viralen Protease, der Reversen Transkriptase und der Integrase verantwortlich sind. Das *env*-Gen kodiert die Hüllproteine.

1.5.1 Immunsuppressive Eigenschaften von Retroviren

Es konnte gezeigt werden, dass Retroviren im infizierten Wirt eine Immunsuppression induzieren (Denner, 1987). Für HIV und andere Retroviren ist eine Abhängigkeit zwischen der Virusbelastung und der Progression zu AIDS beschrieben. In der asymptomatischen Phase ist die Virusvermehrung gering, und der Infizierte ist gesund. Erst in der Endphase einer HIV-Infektion treten opportunistische Infektionen auf und korrelieren mit dem gleichzeitig vorhandenen hohen Virustiter (Fauci, 1988). Sowohl bei Allotransplantationen als auch bei Xenotransplantationen muss ein Gleichgewicht zwischen immunologischer Abstoßung und der Immunsuppression auf der Basis verschiedener Medikamente bestehen. Eine zu geringe Immunsuppression würde zur Abstoßung des Transplantates, eine zu starke Immunsuppression dagegen zu erhöhten Raten an Infektionen und Tumoren führen. Sollte tatsächlich ein Schwellenwert für die Pathogenität der Viren existieren, könnte dieser durch eine medikamentöse Immunsuppression herabgesetzt sein. Bereits geringe Viruskonzentrationen von PERV im Organismus könnten das Gleichgewicht zwischen immunologischer Abstoßung und Immunsuppression stören und zur Auslösung einer Immundefizienz führen.

Der Mechanismus der Immunsuppression ist noch unklar. Sicher dagegen ist, dass nicht nur intakte Retroviren, sondern auch inaktivierte Viren, die Reaktion humaner Lymphozyten auf T-Zell Stimulation durch Mitogene *in vitro* hemmen (Denner *et al.*, 1980; Denner *et al.*, 1985). Auch für inaktiviertes HIV-1 konnte ein immunsuppressiver Effekt *in vitro* beschrieben werden (Pahwa *et al.*, 1985). Die immunsuppressive Wirkung der Viren wird auf das transmembrane Hüllprotein p15E zurück geführt (Mathes *et al.*, 1979). Seine immunsuppressiven Eigenschaften wurden *in vitro* (Mathes *et al.*, 1979; Denner *et al.*, 1980) als auch *in vivo* beobachtet (Cianciolo *et al.*, 1980; Mangeney und Heidmann, 1998).

1.5 Porzine endogene Retroviren

Bei den porzinen endogenen Retroviren handelt es sich um Retroviren, die aus dem Genus der Gammaretroviren (ehemals C-Typ Viren) stammen. Sie kommen mit ca. 50 Kopien im Genom der verschiedenen Schweinerassen vor (Akiyoshi *et al.*, 1998; Takeuchi *et al.*, 1998). Man unterteilt PERVs in drei verschiedene Subtypen: PERV-A, -B und -C, welche u.a. große Sequenzhomologien aufweisen. Unterschiede sind vorwiegend im Bereich der Hüllproteine auszumachen (Takeuchi *et al.*, 1998), dadurch bedingen sie das unterschiedliche Wirtsspektrum der drei Gruppen (Le Tissier *et al.*, 1997). PERVs können u.a. von Schweinezell-Linien (Breese, 1970; Lieber *et al.* 1975), Tumoren (Fraizier, 1985) und Endothelzellen der Aorta (Martin *et al.* 1998) und peripheren Blutleukozyten produziert werden (Wilson *et al.*, 1998; Denner, 1999; Tacke *et al.*, 2000a). PERV-C wird zudem nach Mitogen-Stimulierung von porzinen peripheren Blutleukozyten gebildet (Wilson *et al.*, 2000). Die porzine Nierenzell-Linie PK-15 (Armstrong *et al.*, 1971; Todaro *et al.*, 1974; Le Tissier *et al.*, 1997) und die primären Endothelzellen der Aorta (Martin *et al.*, 1998) produzieren zwei verschiedene Subtypen von PERV (PERV-A und PERV-B), die in der Lage sind, humane Zellen zu infizieren (Patience *et al.*, 1997; Takeuchi *et al.*, 1998). Es konnte ferner gezeigt werden, dass Zellen verschiedener Spezies und verschiedene humane Gewebe produktiv infiziert werden können (Wilson *et al.*, 2000; Specke *et al.*, 2001b). Es ist im Moment noch unklar, ob die im Schwein exprimierten PERVs bei einer Übertragung porziner Organe den Rezipienten infizieren und Krankheitssymptome hervorrufen können. Diabetes-Patienten, denen Inselzellen vom Schwein transplantiert wurden, und Patienten deren Blut extrakorporal durch Schweinenieren, Schweineleber und Schweinemilzen geleitet wurde, gaben keine Hinweise auf die Integration von viraler DNA oder Antikörperbildung gegen PERV (Heneine *et al.*, 1998; Patience *et al.*, 1998; Paradis *et al.*, 1999; Tacke *et al.*, 2000a; Tacke *et al.*, 2001). In den bisher untersuchten Fällen handelt es sich allerdings nur um Kurzzeitkontakte zwischen porzinem und humanem Gewebe unter Immunsuppression.

Die porzinen endogenen Retroviren besitzen große Homologien in der Nukleotidsequenz, Aminosäuresequenz (Akiyoshi *et al.*, 1998; Le Tissier *et al.*, 1997) und Ähnlichkeiten in der Morphologie (Bouillant *et al.*, 1975; Denner, 1998) zu Gammaretroviren der Maus (MuLV) und der Katze (FeLV). Diese Viren rufen Leukämien und Immundefizienzen bei infizierten Tieren hervor (Fan, 1994; Hardy, 1993; Denner 1999b). Würde im Rahmen der Xenotransplantation eine Infektion mit PERV erfolgen, wäre damit die Gefahr einer daraus resultierenden Tumorerkrankung und Immunschwäche (Denner, 1998) gegeben.

2 Zielsetzung

Aufgrund des anhaltenden Organmangels bei der Allotransplantation werden ständig Alternativen in der Medizin gesucht, um den entsprechenden Bedarf an Organen zu decken. Eine der vielversprechendsten Möglichkeiten ist die Xenotransplantation, bei der die Transplantation porciner Organe auf den Menschen u.a. wegen ihrer geringen Durchseuchung mit Mikroorganismen favorisiert wird. Porzine endogene Retroviren bilden allerdings für die Xenotransplantation zur Zeit ein bisher noch unkalkulierbares Risiko, da diese Viren im Genom aller Schweine verankert sind und daher nicht eliminiert werden können. Ziel dieser Arbeit ist daher die Untersuchung des Infektionspotentials von PERVs bei humanen Zellen, wobei insbesondere die Suszeptibilität humaner lymphoider Zellen sowie eine eventuelle weitere Ausbreitung des Virus auf diesen Zellen näher bestimmt werden soll.

Aus Versuchen im Rahmen einer vorangegangenen Diplomarbeit ist bekannt, dass es bei der seriellen Passagierung einer A/C-Rekombinante von PERV sowie einer Mischpopulation aus PERV-A und PERV-B auf der humanen Nieren-Zelllinie 293 zu Veränderungen im Bereich der 5'-LTR kommt. Dabei entstehen Vervielfachungen bestimmter Sequenzbereiche. Parallel wurden biologische Effekte wie z.B. eine Erhöhung des Titers und der RT-Aktivität beobachtet. Die jeweiligen Sequenzen weisen u.a. hohe Homologie zu Bindestellen von Transkriptionsfaktoren wie z.B. NFY auf. Diese Experimente sollen nunmehr mit reinen Virusklonen von PERV-A und PERV-B durchgeführt werden, um eine Gegenüberstellung der verschiedenen Subtypen zu ermöglichen. Zusätzlich soll geklärt werden, ob diese genetischen Veränderungen bei PERV-A und -B gleichermaßen auftreten.

Für die Untersuchung, ob die beobachteten Sequenzveränderungen tatsächlich die Ursache der Titererhöhung sind, sollten klonierte Bereiche mit wenigen bzw. vielen Regulationselementen der 5'-LTR in ein Expressionsvektor-System eingefügt werden, um deren Einfluss auf die Virusreplikation zu untersuchen.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Bakterienschüttler	New Brunswick Scientific Co. Inc. (G 25)
Blotsystem	Biorad (Trans-Blot SD, Semi-dry Transfer cell)
Brutschränke	Heraeus (Cytoperm), (BBD 6220)
ELISA-Reader	Tecan (Spektra Classic)
Geldokumentationssystem - Drucker	Biorad Gel Doc 2000 Mitsubishi (P 91)
<u>Gelelektrophoresesystem:</u> - Netzteil - Gelkammern - Gelkammern	Biorad (Power Pac 300) Biorad (Wide Mini-Sub Cell GT), (Min-Sub Cell GT) Biorad (Mini PROTEAN II)
Mikroskop	Zeiss (ID 03)
pH - Meter	SCHOTT (CG 836)
Photometer	Shimadazu (UV-1202)
<u>Pipetten:</u> Normal Multichannel	Eppendorf (Reference 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl) Gilson (Reference 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl) Finnpipette; Labsystems
Pipettierhilfen	Jencons (Powerpette plus) Sarstedt (Automatic-Sarpette) Brand (accu-jet)
Sterilbänke	The Baker Co. Inc. (SterilGARD Hood)
Thermocycler	Biozym (MJ Research PTC-200)
Trockenschränke	Heraeus (Baureihe 6000)
Waagen Feinwaage	Sartorius (Iso 9001) Sartorius (IsoCal-AC 211S)
<u>Zentrifugen:</u> Tischzentrifugen Standzentrifugen PicoFuge	Eppendorf (Centifuge 5403) Eppendorf (Centrifuge 5415 D) Heraeus (Megafuge 1.0 R) Heraeus (Minifuge RF) Stratagene

3.2 Verbrauchsmaterialien

3.2.1 Materialien für die Zellkultur

Verbrauchsgegenstand	Hersteller
Filter: 0,22 µl; 0,45 µl Durchmesser	Millipore, Bradford, USA
Spritzen: 20 ml, 50 ml	Braun
96 Loch-Platte: normal, flexibel	Falcon
96 Loch-Platte: Nunclon	Greiner, Nunc
Poly-D-Lysin-Platten	Greiner, Nunc
Zellkulturflasche: 200 ml	Greiner, Nunc

3.2.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
ACE	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Agarose	Roth, Karlsruhe
BSA	SERVA, Heidelberg
DAB	Pierce, Rockford, USA
DMF	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glutamin	Biochrom KG, Berlin
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
HEPES	Biochrom KG, Berlin
IPTG	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
NaAc	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Marvel, England
PBS	RKI, Berlin
Polybrene	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
HCl (25%)	Merck, Darmstadt
SDS	SERVA, Heidelberg
Tris	Merck, Darmstadt
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
X-Gal	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt

3.2.3 Enzyme

Enzym	Hersteller
<i>AmpliTaq Gold DNA Polymerase</i>	PE Applied Biosystems
<i>Pfu DNA-Polymerase: cloned, nativ</i>	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
<i>Kpn I</i>	New England Biolab
<i>Sac I</i>	New England Biolab
<i>Trypsin</i>	RKI, Berlin

3.2.4 Seren

Serum	Hersteller
Fötales Kälberserum	Biochrom KG, Berlin

3.2.5 Antikörper und Antiseren

Name	Erkanntes Epitop
Anti-Ziege (monoklonal)	Sigma-Aldrich, Ziege IgG
FLV-Serum	p30Gag bzw. Kreuzreaktion mit p27Gag
Protein G-HRP	Biorad, München Fc-Region von Säuger-Immunglobulin
Ziege 20-Serum	p15E

3.2.6 Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller
Ampicillin (100 mg/ml)	Roth, Karlsruhe
SP (Streptomycin, Penicillin) (10000 µg/ml)	Biochrom KG, Berlin

3.2.7 Oligonukleotide (Primer)

Genesequenz	Sequenz (5´ - 3´)
Pol (PERV)	for. - TTG ACT GGG AGT GGG ACG GGT AAC - rev. - GAG GGT CAC CTG AGG GTG TTG - (Czauderna et al., 2000)
LTR (PERV)	for. - AAA GGA TGA AAA TGC AAC CTA ACC - rev. - ACG CAC AAG ACA AAG ACA CAC GAA - (Czauderna et al., 2000)
Env (PERV-A)	for. - TGG AAA GAT TGG CAA CAG CG - rev. - AGT GAT GTT AGG CTC AGT GG - (Le Tissier et al., 1997)
Env (PERV-B)	for. - TTC TCC TTT GTC AAT TCC GG - rev. - TAC TTT ATC GGG TCC CAC TG - (Le Tissier et al., 1997)
Gag (PERV)	for. - GCG ACC CAC GCA GTT GAT A - rev. - CAG TTC CTT GCC CAG TGT CCT T - (Akiyoshii et al., 1998)
β – Aktin (human)	for. - CTA CAA TGA GCT GCG TGT GG - rev. - AAG GAA GGC TGG AAG AGT GC - (R&D Systems Inc.)
M 13	for. - GTA AAA CGA CGG CCA G - rev. - CAG GAA ACA GCT ATG AC - (Invitrogen)

3.3 Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
Agarosegelelektrophorese von DNA	
Ethidiumbromidlösung	500 µl/l Ethidiumbromid in 1x TAE
TAE-Puffer 50x	242 g Tris-Base 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5M EDTA, pH 8 mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen
100 bp DNA-Marker	250 µl Marker, Gibcol BRL 150 µl Aqua dest. 100 µl Probenpuffer
Probenpuffer	2x Probenpuffer, Gibcol BRL
IPA	
Blockierungslösung	2% Milchpulver in PBS (ohne Ca / Mg)
Fixierungslösung	20% Glycerol in PBS
Substratlösung	1 ml ACE 19 ml NaAc (20 mM, pH 5,2) 10 µl Wasserstoffperoxid
SDS - Page	
Anodenpuffer	200 mM Tris gelöst in Aqua dest., pH 8,9
Gelpuffer	3 M Tris 0,3% SDS gelöst in Aqua dest., pH 8,4
Kathodenpuffer	100 mM Tris 100 mM Tricin 0,1% SDS gelöst in Aqua dest.
Proteinbestimmung	
Protein-Assay (Farbstoff-Konzentrat)	Biorad, München 1:5 verdünnt in Aqua dest.
Western Blot	
Blockpuffer	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,5% Tween 20 2% BSA 2% Milchpulver
Marker	Prestained-Marker (Biorad)
Probenpuffer	Biorad, München Trizin-Probenpuffer (1:50 verdünnt mit β-Mercaptoethanol)
Transferpuffer	48 mM Tris / HCl 39 mM Glycin 0,3% SDS 20% Methanol gelöst in Aqua dest.

Waschpuffer	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,2% BSA 0,5% Tween 20
Bakterienkultur	
IPTG-Lösung	0,1 M IPTG in Aqua dest.
X-Gal-Lösung	40 mg X-Gal gelöst in 1 ml DMF 50 mg X-Gal gelöst in 1 ml DMF

3.4 Medien

3.4.1 Medien zur Kultivierung von Zellen

Medium	Zusammensetzung
Medium für adhärente Zellen	400 ml DMEM ¹⁾ (4,5 g/l Glucose) 50 ml FKS 10 ml Glutamin 7,5 ml HEPES 5 ml SP
Medium für Suspensionszellen	400 ml RPMI ²⁾ (2 g/l Bicarbonat) 50 ml FKS 10 ml Glutamin 5 ml HEPES 5 ml SP
Einfriermedium	90% FKS 10% DMSO

1) DMEM: Dulbeccos` s Minimal Essential Medium (Eagle, 1959; Dulbecco *et al.*, 1959)

2) RPMI 1640: (Iwakata *et al.*, 1964; Moore *et al.*, 1966)

3.4.2 Medien zur Kultivierung von Bakterien

Medium	Zusammensetzung
LB – Medium	1% Trypton 0,5% Hefeextrakt 0,5% NaCl (pH 7,5) gelöst in Aqua dest.

SOC - Medium	2% Tryptone 0,5% Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose gelöst in Aqua dest.
--------------	--

3.5 Verwendete Zellen

3.5.1 Zell-Linien

Zellen	Herkunft
293 (humane Nierenzelllinie)	Wilson <i>et al.</i> , 2000 FDA, Washigton, USA
C8166 (humane T-Zelllinie)	ECACC 88051601

3.5.2 PERV produzierende Zell-Linien

Zellen	Herkunft bzw. Referenz
293 PERV NIH/3	Wilson <i>et al.</i> , 2000, Washington, USA
293 PERV NIH/5	Specke <i>et al.</i> , 2001b
293 PERV-A	Takeuchi <i>et al.</i> 1998, London, UK
293 PERV-A1	Passage von 293 PERV-A auf 293 Zellen
293 PERV-A2	Passage von 293 PERV-A1 auf 293 Zellen
293 PERV-B	Onions, Glasgow, UK
293 PERV-B1	Passage von 293 PERV-B auf 293 Zellen
293 PERV-B2	Passage von 293 PERV-B1 auf 293 Zellen
C8166 PERV NIH/5	Specke <i>et al.</i> , 2001b

3.6 Verwendete Bakterien

3.6.1 *Escherischia coli*

Bezeichnung	Referenz
TOP10F (chem. kompetent)	Invitrogen
JM 109 (chem. kompetent)	Promega

3.7 Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Selektionsmarker	Referenz
pCR2.1-TOPO	Amp, Kan	Invitrogen
Gpl-Basic	Amp	Promega
Gpl-control	Amp	Promega
pRL-TK	Amp	Promega

3.8 Zellbiologische Methoden

3.8.1 Kultivierung von Zell-Linien

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C, einer CO₂-Konzentration von 5% und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 98% (Moscovici *et al.*, 1977).

Suspensionszellen

(C8166, C8166 PERV NIH/5)

Die Kultivierung der Suspensionszellen erfolgte in einem Volumen von 40 ml in einer Zellkulturflasche (200 ml). Das Medium wurde zweimal pro Woche gewechselt. Die Zellen wurden im Verhältnis von 1:3 passagiert. Dazu wurden die Zellkulturflaschen für eine halbe Stunde aufgestellt, damit sich die Zellen am Boden absetzen konnten. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in neuem Medium resuspendiert und rekultiviert.

Adhärente Zell-Linien

(293 FDA, 293 PERV NIH/5, 293 PERV NIH/3, 293 PERV-A, 293 PERV-B)

Die Kultivierung der adhärent wachsenden 293 Zellen sowie der PERV produzierenden 293 Zellen erfolgte in einem Volumen von 20 ml in einer Zellkulturflasche (200 ml). Zweimal pro Woche wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden im Verhältnis von 1:3 passagiert. Das Medium wurde abgenommen, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsinlösung (0,25%) pro Kulturflasche kurz inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in neuem Medium resuspendiert und rekultiviert.

3.8.2 Infektionsversuche

Zur Infektion der adhären wachsenden Zellen wurde das Medium abgenommen und zur Hälfte durch zellfreiem Überstand von PERV produzierenden Kulturen ersetzt und mit frischem Medium aufgefüllt. Als Infektionsverstärker wurde Polybrene (6 µl/ml) verwendet. Nach ca. 18 Stunden wurde das Medium erneut abgenommen und durch frisches ersetzt. Die weitere Kultivierung erfolgte wie oben beschrieben.

Um Suspensionszellen zu infizieren, wurden sie zunächst sedimentiert (800 x g, 10 min bei RT) und das Sediment wurde mit 50% zellfreiem PERV-haltigem Kulturüberstand und 50% neuem Medium resuspendiert. Zur Zellsuspension wurde Polybrene (6 µg/ml) gegeben und nach ca. 18 Stunden wurde der Überstand nach dem Abzentrifugieren der Zellen durch neues Medium ersetzt.

3.8.3 Bestimmung der Zelldichte

Die adhären wachsenden Zellen wurden im Gegensatz zu den Suspensionszellen zunächst trypsiniert und dann in Medium resuspendiert.

Die Zelldichte wurde mittels der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es wurde eine Vital-Färbung der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau vorgenommen. Bei dieser Färbung erscheinen lebende Zellen im Phasenkontrastmikroskop leuchtend hell, tote Zellen dagegen blau. Die Graduierung der Zellkammer bedingt, dass 16 Quadrate einem Volumen von 10^{-4} ml entsprechen. Es wurden 4 x 16 Quadrate ausgezählt.

Die Berechnung der Zellzahl/ml :

$$Z = N \times 2 \times 10^4$$

Z = Zellzahl/ml

N = gezählte Zellen

2 = Verdünnungsfaktor

10^4 = Faktor der Zählkammer

3.8.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieren

Zum Einfrieren wurden die adhären wachsenden Zellen und die Suspensionszellen zunächst in Suspension gebracht. Das Sediment wurde in frischem Medium resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 1×10^7 Zellen pro ml in Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in Schraubampullen aliquotiert und für ca. 24 Stunden bei -80°C in Polyesterolkammern aufbewahrt. Anschließend wurden die Ampullen in flüssigen Stickstoff eingelagert.

Auftauen

Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellen bei 37°C in ein einem Wasserbad geschwenkt. Nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension sofort in 10 ml vorgewärmtes Medium gegeben, resuspendiert und für 10 min bei RT und $800 \times g$ zentrifugiert. Danach wurde das Sediment mit frischem Medium resuspendiert, in eine 200 ml Zellkulturflasche überführt und kultiviert.

3.9 Methoden zum Virusnachweis

3.9.1 RT-Test (Reverse Transkriptase-Aktivitäts-Assay)

Die Messung der RT-Werte der zellfreien Kulturüberstände aus den Infektionsversuchen erfolgte in regelmäßigen Abständen nach Anleitung des Herstellers (C-Type Virus RT-Aktivitäts-Assay CAVIDI TECH, Uppsala, Schweden).

Die 96 Loch-Platte im Kit sind mit Poly-Adenosin beschichtet. Befinden sich im zellfreiem Kulturüberstand (zu untersuchende Probe) aufgrund einer Infektion Viren, werden diese lysiert und dadurch wird eine C-Typ Reverse Transkriptase freigesetzt. Durch dieses Enzym werden die im Reaktions-Mix enthaltene Brom-Deoxyuridintriphosphate (BrdUTP) an das Polyadenosin

der Platte synthetisiert. Ein BrdU-bindender Antikörper bindet an das DNA-Stück und ermöglicht über seine Konjugation an eine alkalische Phosphatase den RT-Nachweis durch eine Farbreaktion. Gemessen wird die Farbintensität anhand der Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm mit 560 nm als Korrekturwellenlänge. Die Sensitivität des Assays kann durch kurze (3 Stunden) oder längere (12 Stunden) Reaktionszeit sowie durch Messung der Farbintensitäten zu unterschiedlichen Zeitpunkten variiert werden. Die Quantifizierung der RT-Aktivität erfolgt über die parallele Messung eines MuLV-RT-Standards bekannter Aktivität.

3.9.2 Immunperoxidase Assay (IPA nach Stephan et al., 2001)

Der IPA stellt eine immunologische Nachweismöglichkeit der Expression von Proteinen in den Zellen dar. Die Zellen wurden auf einer mit Poly-D-Lysin beschichteten Platte arretiert. Nach einer Inkubation über Nacht im Brutschrank wurden die Zellen mit PBS gewaschen und über Nacht bei -20°C mit Methanol fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einer Blockierungslösung (2% Milchpulver in PBS) für eine Stunde im Brutschrank (37°C) inkubiert. Danach wurde das Antiserum (Ziege 20) in einer Verdünnung von 1:100 in Blockierungslösung für eine Stunde auf die Zellen gegeben und im Brutschrank (37°C) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde der Zweitantikörper (Protein G; 1:5000 in Blockierungslösung verdünnt) überschichtet und die Proben wurden im Brutschrank (37°C) für eine Stunde inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurde die Substratlösung auf die Zellen gegeben. Nach 20 min wurde die Färbung unter dem Mikroskop beobachtet. Die Zellen wurden anschließend mit Glycerol (20%) überschichtet, bei 4°C gelagert und ausgewertet.

3.9.3 Virustitration

Es wurden 6×10^3 Zellen (in frischen Medium resuspendiert) in einem Volumen von 100 μl pro well auf eine 96 Loch-Platte gegeben. Anschließend wurde die Platte über Nacht in einem Brutschrank gestellt, um die Zellen zu arretieren. Nach der Inkubation wurde 100 μl zellfreier, Kulturüberstand mit gleichen RT-Werten (120 mU/ml) von verschiedenen PERV produzierenden Kulturen seriell in siebenfacher Bestimmung bis zu 1:2048 ausverdünnt. Anschließend wurde Polybrene (6 $\mu\text{g/ml}$) hinzugegeben und für ca. 18 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium abgenommen, durch neues Medium ersetzt, und die Zellen wurden 3-4 Tage im Brutschrank kultiviert. Sobald die 96 Loch-Platte konfluent bewachsen war, wurden die Zellen 1:3 verdünnt. Nach ca. 4 Wochen erfolgte die Umsetzung der Zellen auf eine Poly-D-Lysin beschichtete 96 Loch-Platte. Die anschließende Färbung der exprimierten Proteine erfolgte nach dem IPA-Protokoll (3.9.2). Bei der Auswertung wurden die einzelnen Verdünnungen auf eine Infektion (Färbung) überprüft. Im Anschluss erfolgte die Berechnung der $TCID_{50}$.

3.10 Molekularbiologische Methoden

3.10.1 Isolierung genomischer DNA

Die genomische DNA wurde aus allen oben aufgeführten Zellen in regelmäßigen Abständen isoliert. Dazu wurde das „QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet. Es wurden 200 μl einer Zellsuspension (2×10^6 Zellen/ml) mit RNase behandelt. Anschließend wurde das Lysat durch chromatographische Auftrennung über Anionenaustauscher-Säulen von Proteinen und Salzen gereinigt. Die DNA wurde mit 100 μl Aqua dest. von der Säule gewaschen.

3.10.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab wurde das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet. Hierbei wurde das RNase behandelte Bakterienlysat aus 4 ml Kultur über Anionenaustauscher-Säulen gereinigt. Die DNA wurde in 50 µl Aqua dest. eluiert.

3.10.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA in wässriger Lösung

Die Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren in Lösung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Durch Bildung des Quotienten der Absorption bei 260 nm und der Absorption bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäuren, wurde der Grad an Verunreinigung der DNA-Probe durch Proteine ermittelt. Ein OD_{260}/OD_{280} -Wert von 1,8 bis 2,0 entspricht einer reinen DNA. Größere Werte weisen auf RNA-, niedrigere Werte auf Proteinverunreinigungen hin.

3.10.4 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) basiert auf der enzymatischen Vermehrung von DNA-Fragmenten. Die zu vermehrende doppelsträngige DNA wird bei 95°C in Einzelstränge aufgeschmolzen (Denaturierung). Danach binden zwei Oligonukleotid-Primer bei 50-70°C an den entgegengesetzten Enden der beiden zu vermehrenden komplementären DNA-Stränge („annealing“). Die Hybridisierungstemperatur für die Oligonukleotid-Primer ist von deren Länge und G/C-Gehalt abhängig. Die Polymerase beginnt bei 72°C die Neusynthese des komplementären Stranges am 3'-Ende des Primers (Elongation). Durch Wiederholung der Zyklen (Denaturierung-Annealing-Elongation) kann theoretisch ein einziges DNA-Molekül exponentiell amplifiziert werden.

Die PCR wurde zu verschiedenen Zwecken verwendet. Eine Anwendung beinhaltet den Nachweis von Proviren in der genomischen DNA der im Kapitel 3.5 aufgeführten Zellen (Ansatz 1).

Ein anderer Ansatz der PCR war die Amplifikation der LTR-Region (Ansatz 1) aus den aufgeführten Zellen, um die 5'LTR von PERV zu klonieren (Kapitel 3.12). Des Weiteren wurde die PCR genutzt, um die klonierten LTR-Regionen aus dem pCR2.1TOPO-Vektor zu amplifizieren (Ansatz 2) und um das Anfügen von Restriktionsschnittstellen (*KpnI* / *SacI*) an die sequenzierten LTR-Regionen zu erreichen (Ansatz 3).

Ansatz 1:

300-600 ng genomische DNA
 5 µl Primer 1 (10 pmol/µl)
 5 µl Primer 2 (10 pmol/µl)
 5 µl dNTP-Mix (10 mM)
 5 µl PCR-Puffer (10 mM)
 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
 ad 50 µl Aqua dest.

Programm:

95°C	10:00 min	35 Zyklen
95°C	1:00 min	
60°C	1:20 min	
72°C	1:00 min	
72°C	7:00 min	

Ansatz 2:

100 ng Plasmid-DNA
 5 µl Primer 1 (10 pmol/µl)
 5 µl Primer 2 (10 pmol/µl)
 5 µl dNTP-Mix (10mM)
 5 µl PCR-Puffer (10mM)
 0,5 µl Taq-Polymerase (5U/µl)
 ad 50 µl Aqua dest.

Programm:

95°C	10:00 min	35 Zyklen
95°C	1:00 min	
60°C	1:20 min	
72°C	1:00 min	
72°C	7:00 min	

Ansatz 3:

300-600 ng genomische DNA
 5 µl Primer 1 (10 pmol/µl)
 5 µl Primer 2 (10 pmol/µl)
 5 µl dNTP-Mix (10 mM)
 5 µl PCR-Puffer (10 mM)
 0,5 µl Polymerase (Taq/Pfu 11:1)
 ad 50 µl Aqua dest.

Programm:

95°C	10:00 min	40 Zyklen
95°C	1:00 min	
58°C	1:20 min	
72°C	1:50 min	
72°C	7:00 min	

3.10.5 Sequenzierung (Sanger *et al.*, 1977)

Die Sequenzierung der DNA-Proben wurde von der Firma Toplab (Martinsried) durchgeführt. Die dafür benötigten Primer sind im Kapitel 3.2.7 aufgeführt. Die Analyse der Sequenzen erfolgte mit dem Programm „Lasergene“. Zum Homologievergleich wurde PERV-MSL (AF038600), PERV-B (AJ133818) und Tsukuba-1 (AF038599) aus der Genbank EMBL genutzt.

3.11 Klonierung der 5´-LTR von PERV

Die Klonierung der 5´-LTR beinhaltet folgende Teilschritte: (i) Amplifikation genomischer DNA mittels LTR-Primer (3.10.4), (ii) TA-Klonierung des PCR-Produktes (3.11.1; 3.11.2; Invitrogen), (iii) Sequenzierung der klonierten DNA zur Klon-Verifizierung (3.10.5), (iv) Einfügen von Schnittstellen mittels PCR (3.10.4), (v) Subklonierung der PCR-Amplifikate (3.11.1; 3.11.2; Invitrogen), (vi) Transformation des Zielvektors (3.11.2; Promega), (vii) Restriktionsverdau der Plasmid-DNA und des Zielvektors (3.11.3), (viii) Agarosegelelektion (3.11.5) und (ix) Klonierung der Plasmid-DNA mit dem Expressions-Zielvektor (3.11.2 Promega).

3.11.1 Ligation mit dem TOPO TA Cloning®Kit (Invitrogen)

Die TA-Klonierung basiert auf dem Ansatz, dass die Taq-Polymerase u.a. keine PCR-Fragmente mit glatten Enden produziert, sondern einen spezifischen Überhang von einer Base schafft (Clark, 1988). Diese Base ist ein Adenosin. Das TOPO TA Cloning® Kit von Invitrogen verwendet statt einer Ligase einen mit Topoisomerase I aktivierten TA-Vektor, d.h. es kommt zu einer Selbstligation. Die Ligation ist innerhalb von 5 bis 30 min abgelaufen.

Ansatz:

2-4 µl PCR-Produkt

1 µl Salz-Lösung

1 µl TOPO-Vektor

ad 6 µl Aqua dest.

3.11.2 Transformation

Die Transformation erfolgte nach Anleitung der Hersteller Invitrogen und Promega. Die Angaben der Firma Promega sind in den Klammern zu finden. Es wurden 50 µl (100 µl) kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut und 2 µl vom TOPO Kloning-Reaktionsansatz (1-50 ng Plasmid-DNA) dazugegeben. Der Transformationsansatz wurde für 5 bis 30 min (5 min) auf Eis gehalten, damit die DNA an die Bakterienmembran binden kann, und dann einem Hitze-Schock 30 s bei 42°C (45-50 s) ausgesetzt und im Anschluss erneut auf Eis gestellt. Durch den Hitze-Schock werden die Bakterienmembranen geöffnet, damit Plasmid-DNA eindringen kann. Nach dem Hitzeschock wurden 250 µl SOC-Medium (900 µl LB-Medium) zu dem Ansatz gegeben und die Bakteriensuspension bei 37°C für 60 min geschüttelt. Die transformierten Bakterien wurden auf Platten mit LB-Medium mit selektierendem Antibiotikum, X-Gal (bzw. X-Gal und IPTG) ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

3.11.3 Restriktionsverdau

Die Restriktionsendonukleasen vom Typ II bestehen aus zwei unabhängigen Proteinen, Restriktionsenzym und Methylase, die beide die gleiche Zielsequenz erkennen. Das Restriktionsenzym schneidet die DNA während die Methylase hemimethylierte DNA vollständig methyliert und so vor dem Abbau durch das Restriktionsenzym schützt. Restriktionsendonukleasen erkennen jeweils eine bestimmte Nukleotidsequenz und schneiden doppelsträngige DNA genau an dieser Stelle. Je nach Enzym können überhängende („sticky“) oder glatte („blunt“) Enden entstehen. Die Analyse durch Gelelektrophorese (3.11.5) erlaubt eine Aussage über die Größe von

Plasmidfragmenten und den Aufbau der geschnittenen Plasmide. Bei Kontroll-Restriktionen wurde in der Regel nicht mehr als 1 µg Plasmid-DNA mit einem oder mehreren Enzymen für 60 min verdaut (Ansatz 1). Sollte die Plasmid-DNA für weitere Klonierungen vollständig geschnitten werden, wurde der gesamte Plasmid-DNA-Ansatz über Nacht verdaut (Ansatz 2).

Ansatz 1:

1 µg DNA

1,5 µl *KpnI*

1,0 µl *SacI*

2,0 µl Puffer NEB 4

13,5 µl Aqua dest.

Ansatz 2:

20 µg DNA

3,0 µl *KpnI*

1,5 µl *SacI*

5,0 µl Puffer NEB 4

0,5 µl Aqua dest.

3.11.4 Selektion positiver Klone

Durch die Nutzung von LB/Amp./X-Gal-Platten konnte eine Selektion positiver, d.h. transformierter Bakterien erfolgen. Die Verwendung von Ampicillin im Nährboden ermöglicht ausschließlich das Wachstum transformierter Bakterien, die durch die Aufnahme eines Resistenzgen-tragenden Vektors Ampicillin-resistent geworden sind. Um weiter zwischen Bakterien mit Plasmid und Bakterien mit Plasmid/DNA unterscheiden zu können, wurde eine blau-weiß Selektion durchgeführt. Die positiven Klone, welche weiß gefärbt sind, wurden in ein 50 ml Falconröhrchen mit 5 ml LB/Amp.-Medium (50 µg/ml Amp.) überführt, über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

3.11.5 Agarosegele und Gelelution (Sambrock *et al.*, 1989)

Allgemein ist die Elektrophorese definiert als die Bewegung von geladenen Teilchen im elektrischen Feld. DNA-Moleküle tragen wie Proteine eine elektrische Ladung. Da die DNA negativ geladen ist, wandern die Moleküle im elektrischem Feld zum positiven Pol. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Form der Moleküle, von seiner elektrischen Ladung und seiner Größe. Je kleiner das Molekül desto schneller passiert es das Gel. Die

Auftrennung erfolgt demnach nach der Größe. Zunächst wurde die Agarose eingewogen und in 1xTAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach dem Abkühlen wurden die Gele gegossen. Als Laufpuffer diente ebenfalls 1xTAE-Puffer. Das PCR-Produkt bzw. die Plasmid-DNA wurden in einem 2fach Ladepuffer und zum Vergleich der DNA- Bandengrößen, parallel ein Standard-DNA-Basenpaarmarker (Gibco, BRL) auf ein Agarosegel aufgetragen. Um die DNA sichtbar zu machen, wurde sie in einem Ethidium-Bromid-Bad für 10 bis 30 min gefärbt, und über einer UV-Lampe fotografiert. Zu isolierende Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ von Qiagen nach Angabe des Herstellers extrahiert.

3.12 Proteinanalyse

3.12.1 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976)

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte in Mikrotiterplatten. Im Test wurden die einzelnen Proben einer Dreifachbestimmung unterzogen. Als Standard wurde BSA verwendet. In den Mikrotiterplatten wurden 4 µl Standard bzw. Probe vorgelegt und dazu je 196 µl gefilterte Bradford-Stammlösung (1:5 verdünnt in Aqua dest.) pipetiert. Nach einer Inkubation von 5-60 min erfolgte die Absorbationsbestimmung bei 560 nm im ELISA-Reader. Die Proteinkonzentration der Proben wurde relativ zur Standard-BSA-Konzentration ermittelt.

3.12.2 SDS-PAGE-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen aufgrund ihrer unterschiedlichen Masse durch ein Polyacrylamidgel dem ein elektrisches Feld angelegt wird. Die adhärent wachsenden Zellen wurden trypsiniert, in frischem Medium resuspendiert, in

der Neubauer-Zählkammer gezählt und anschließend sedimentiert. Das Zellsediment, welches 1×10^7 Zellen umfasste, wurde in 200 μ l 8 M Harnstoff lysiert. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99°C aufgeköcht. Die Proben wurden nach dem Aufköchen auf ein Polyacrylamidgel (Trizin-Gel) aufgetragen, welches sich in ein Sammel- und Trenngel gliederte. Das Sammelgel (4% Polyacrylamid) diente der Fokussierung der Proteine, die dann im Trenngel (12% Polyacrylamid) aufgetrennt wurden. Als Marker diente ein vorgefärbter acht Banden Marker (Prestained-Marker, Biorad). Zum Einwandern der Proben in das Sammelgel wurde eine Spannung von 30V angelegt. Die Auftrennung der Proteine im Trenngel erfolgte bei einer Spannung von 60V.

Sammelgel (4%):

1,653 ml Aqua dest.

1,066 ml Gelpuffer

0,427 ml Acrylamid (30%)

2,42 μ l TEMED

32 μ l Amoniumpersulfat

Trenngel (12%):

2,13 ml Aqua dest.

2,66 ml Gelpuffer

3,2 ml Acrylamid (30%)

5,3 μ l TEMED

53,2 μ l Amoniumpersulfat

3.12.3 Western Blot

Beim Western Blot werden aufgetrennte Proteine aus einem SDS-Gel auf die Oberfläche einer Membran transferiert, um sie mit Hilfe einer spezifischen Antikörperreaktion zu detektieren (Towbin *et al.*, 1989, Egger *et al.*, 1994).

Die negativ geladenen Proteine wandern in einem angelegten elektrischen Feld zur Anode, auf welcher sich eine Membran (PVDF-Membran) befindet. Dabei erfolgt eine Bindung der Proteine an die Membran. Nach dem Blocken der Membran mit 2% Milchpulver in PBS, um unspezifische Bindungen des ersten Antikörpers an die Membran zu vermeiden, erfolgte eine Inkubation unter Schütteln mit dem Erstantikörper (Antikörper gegen rp15E aus Ziege, 1:500; Antikörper gegen p30Gag von FLV, 1:200 in Waschpuffer verdünnt) bei 4°C über Nacht. Die überschüssigen Antikörper wurden durch Waschen mit Waschpuffer entfernt. Anschließend wurde die Membran mit Protein G (1:2000 in Waschpuffer verdünnt) (ein POD-markiertes Immunglobulin als

Zweitantikörper gegen Epitope des Erstantikörpers) für zwei Stunden ebenfalls unter Schütteln bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen der Membran zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurden die Proteine mittels einer DAB-Färbung (Diaminbenzidin + Wasserstoffperoxid) sichtbar gemacht. Dabei setzt die an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase das Wasserstoffperoxid zu einem braunen Farbstoff um.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der verwendeten PERVs

Um die in dieser Arbeit verwendeten porcinen endogenen Retroviren zu charakterisieren, wurde gemeinsam von Dr. K. Boller, PEI, und Dr. M. Özel, RKI, elektronenmikroskopische Analysen durchgeführt (Abb. 4.1, 4.2).

Des Weiteren wurden PCR-Reaktionen mittels PERV-spezifischen Primern zum Nachweis der Integration des Provirus in das Genom der Wirtszellen durchgeführt und die Reverse Transkriptase (RT)-Aktivität in zellfreien Kulturüberständen der jeweiligen Zell-Linien als Beweis einer produktiven Infektion gemessen. Bei den Untersuchungen wurde zum einen mit reinen Virus-Klonen PERV-A (293 PERV-A) (Takeuchi, Y.) und PERV-B (293 PERV-B) (Onions, D.) gearbeitet, die von der humanen Nierenzell-Linie 293 produziert werden. Zum anderen wurde Virus aus einer PERV-produzierenden humanen T-Zell-Linie C8166 (C8166 PERV NIH/5), verwendet. Weitere Versuche wurden mit zwei PERV-Klonen, die von humanen 293 Zellen produziert werden - 293 PERV NIH/3 - (Wilson, C.) und -293 PERV NIH/5- unternommen. Diese Viren stellen eine Rekombination von PERV-A und PERV-C dar. Diese Rekombination entstand bei der Infektion menschlicher Zellen mit PERV, welche von Mitogen-stimulierten Blutleukozyten des Schweins freigesetzt wurden. Es handelt sich um die 3. bzw. 5. Passage auf 293 Zellen.

4.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen von PERV

Durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte eine erste Einschätzung über den Grad der Virusfreisetzung erreicht werden.

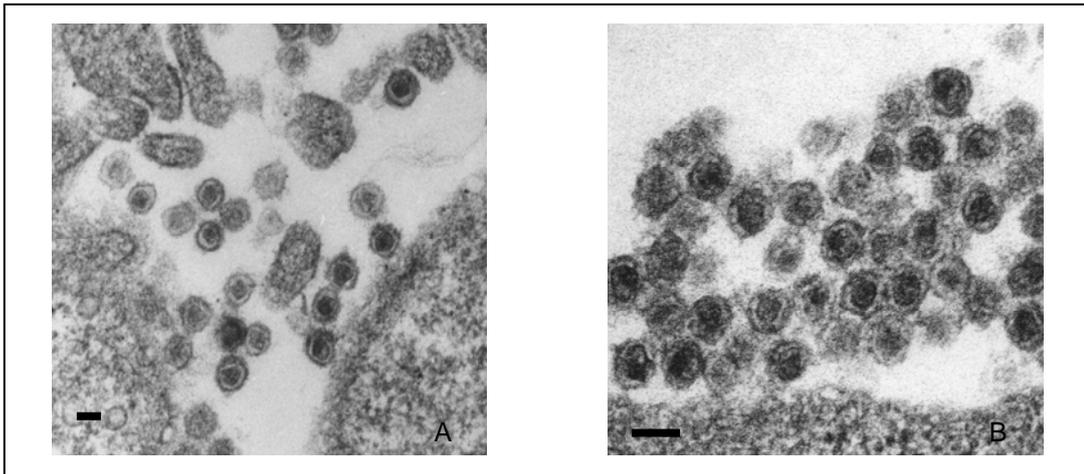


Abb. 4.1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von PERV produzierenden Zell-Linien. In der Abb. 4.1 A ist eine infizierte PK-15 Zell-Linie (porzine Nierenzell-Linie), in Abb. 4.1 B ist eine 293 PERV infizierte Zell-Linie (humane Nierenzell-Linie) dargestellt. Der Balken entspricht 100 nm. Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Dr. K. Boller ,PEI, zur Verfügung gestellt.

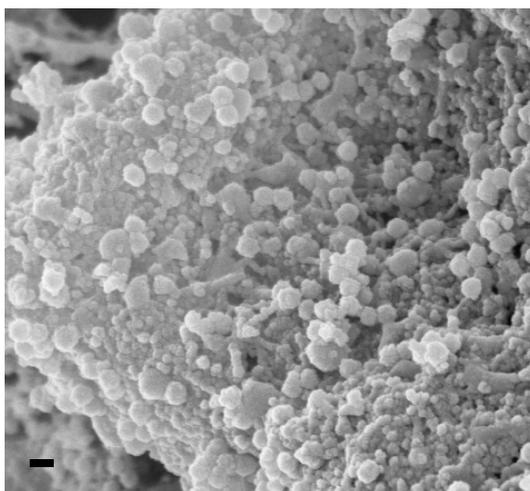


Abb. 4.2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer PERV produzierenden 293-Zell-Linie (239 PERV NIH/5). Der Balken entspricht 100 nm. Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Dr. Özel, RKI, zu Verfügung gestellt.

In der Abb. 4.1 sind porcine endogene Retroviren, die von PK-15 bzw. 293 Zellen freigesetzt wurden, dargestellt. Die in Abb. 4.1 A gezeigten porcinen Nierenzellen sind durch eine deutlich geringere Virusfreisetzung als die in Abb. 4.1 B dargestellte humane Nierenzell-Linie charakterisiert. Der Unterschied ist repräsentativ für die gesamte Zellpopulation und wurde mit anderen Methoden wie z.B. durch RT-Aktivitätstest und Virustiter bestätigt. In der Morphologie der Viren beider Zell-Linien sind keine Unterschiede festzustellen. Die Abb. 4.2 zeigt Freisetzung von PERV in einer rasterelektronenmikroskopische Darstellung.

4.3 Infektion humaner lymphoider Zellen am Beispiel der T-Zell-Linie C8166

Es sollte untersucht werden, ob PERV, das von C8166 Zellen produziert wird, auf uninfizierte C8166 Zellen übertragen werden kann. Die vorgenommene Viruspassagierung ist in der Abb. 4.3 zu sehen.

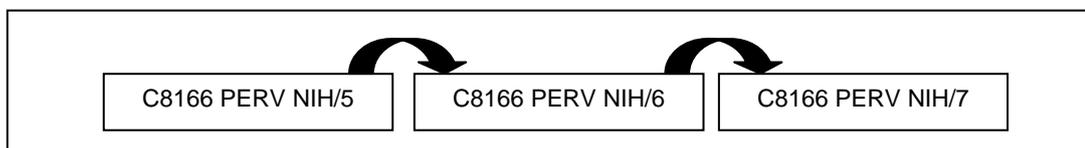


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der Passagierung von PERV auf C8166 Zellen.

Es wurde zuerst durch eine PCR mit PERV-spezifischen Primern die Virusintegration der Ausgangszell-Linie (C8166 PERV NIH/5) untersucht. Die Virusfreisetzung wurde mit einem für Gammaretroviren spezifischen RT-Test bestimmt. Nach erfolgter Passagierung wurden die neu infizierten Zellen ebenfalls mittels PCR auf Virusintegration getestet. Die Virusfreisetzung wurde mittels RT-Test in regelmäßigen Abständen überprüft. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abb. 4.4, Abb. 4.5 und 4.6 dargestellt.

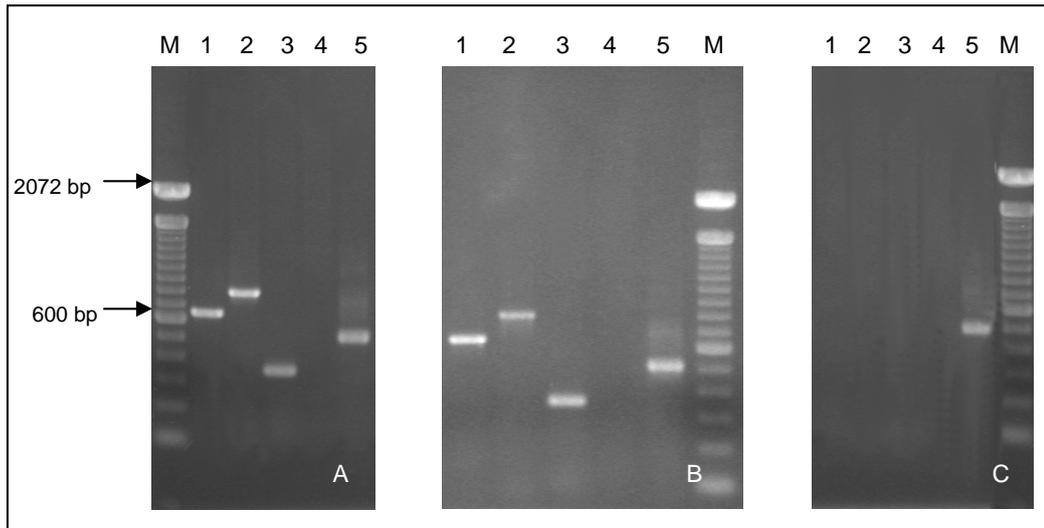


Abb. 4.4: Nachweis der Provirusintegration in den mit PERV infizierten C8166 Zellen. Der Nachweis erfolgte mit PERV-spezifischen Primern. Die Amplifikationsprodukte wurden in der Gelelektrophorese dargestellt. M = Marker (100 Basenpaarmarker) 1= *gag*; 2 = *pol*; 3 = *env-A*; 4 = *env-B*; 5 = β -Aktin als DNA-Kontrolle
A = C8166 PERV NIH/5; B = C8166 PERV NIH/6; C = C8166 PERV NIH/7

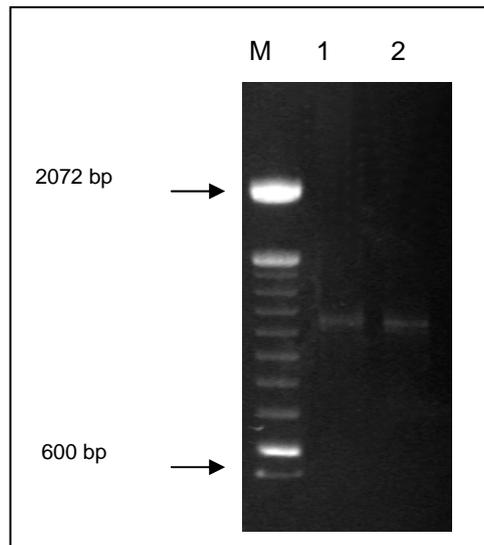


Abb. 4.5: Amplifikation der LTR-Regionen von PERV von verschiedenen Passagen auf C8166. Die Amplifikate wurden in der Gelelektrophorese dargestellt.
M = Marker (100 Basenpaarmarker); 1 = C8166 PERV NIH/5; 2 = C8166 PERV NIH/6

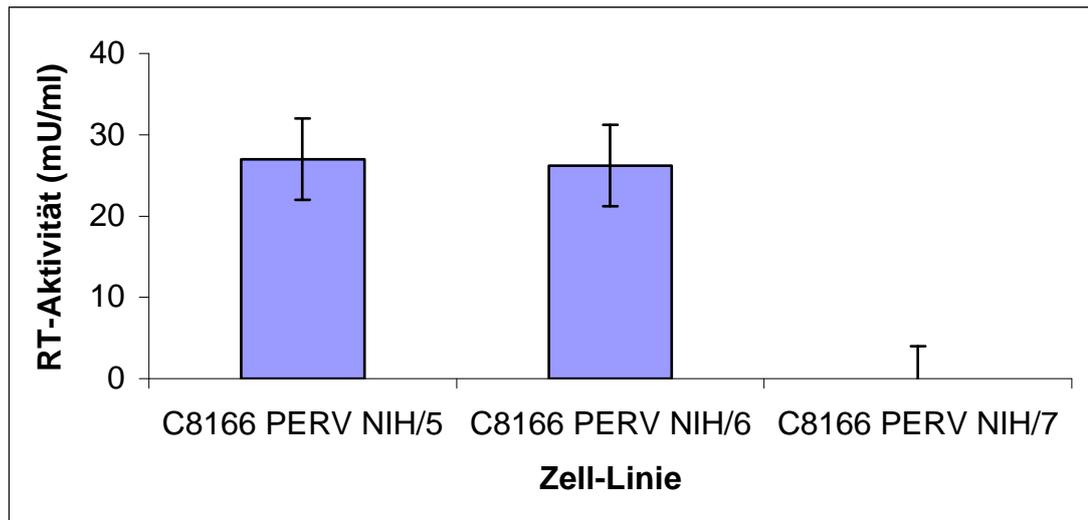


Abb. 4.6: RT-Aktivitäten in den Kulturüberständen von PERV infizierten C8166 Zellen.

Aus den Abb. 4.4 und 4.5 wird ersichtlich, dass das Provirus in der Ausgangszell-Linie C8166 die mit PERV NIH/5 infiziert wurde und nach der ersten Passagierung in den neu infizierten C8166 Zellen integriert ist (C8166 NIH/6). Nach der zweiten Passage konnte keine Provirusintegration festgestellt werden. Die Virusproduktion (Abb. 4.6) ist bei der Ausgangszell-Linie mit ca. 27 mU/ml am größten. Nach der ersten Passagierung produziert die neu infizierte Zell-Linie mit ca. 26 mU/ml RT-Aktivität nur etwas weniger Virus. Nach der zweiten Passagierung konnte keine Virusfreisetzung nachgewiesen werden (Abb. 4.4).

Es konnte das erste Mal gezeigt werden, dass PERV sich von humanen lymphoiden Zellen weiter auf lymphoide Zellen übertragen lässt. Somit stellt das Virus eine potentielle Gefahr für das Immunsystem bei eventuellen Xenotransplantationen dar. Es konnte jedoch keine weitere Adaptation des Virus an die T-Zellen festgestellt werden wie sie bei 293 Zellen beobachtet wurde, d. h. keine erhöhte Virusproduktion und keine Verlängerung der LTR festgestellt.

Allerdings wurden derartige Veränderungen bei PERV NIH/7 auf 293 Zellen auch nicht mehr beobachtet.

4. 4 Untersuchungen zur Adaptation von PERV-A und PERV-B an humane 293 Zellen

4.4.1 Nachweis der Neuinfektion mittels PCR

Aus vorherigen Untersuchungen, in denen eine serielle Passagierung von PERV NIH/3 (A/C-Rekombinante) sowie von PK-15 PERV (Mischpopulation aus PERV-A und PERV-B) auf humane 293 Zellen vorgenommen wurde, konnte eine Verlängerung der LTR-Region, ein Anstieg der RT-Aktivität und des Virustiters festgestellt werden (Denner *et al.*, 2001b). Aus diesem Grund wurden als Vergleich Versuche mit PERV-A und PERV-B vorgenommen. In der Abb. 4.7 sind die erfolgten Passagierungen, und als Vergleich die Passagierungen der PERV-A/C-Rekombinanten, dargestellt.

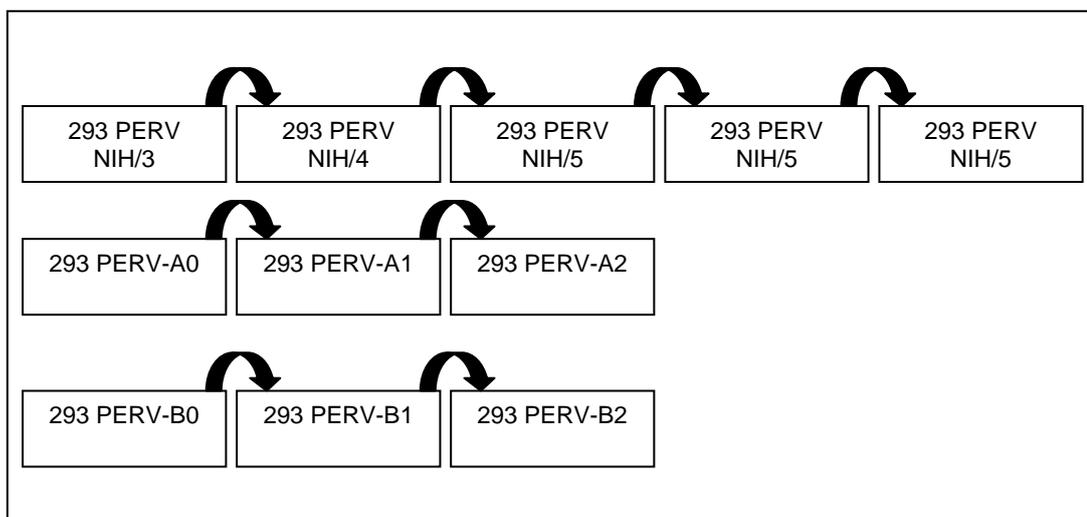


Abb. 4.7: Schematische Darstellung der Passagierung von PERV.

Zur Detektion der PERV-Infektion wurde zunächst eine PCR mit Primern spezifisch für die *env*-, *pol*- und *gag*-Region von PERV zum Nachweis einer Provirusintegration in das Genom der Zellen eingesetzt. Die Ergebnisse sind in den Abb. 4.8, 4.9 und 4.10 dargestellt. Sie zeigen, dass die Ausgangszell-Linien und die neu infizierten Zellen das Provirus enthalten.

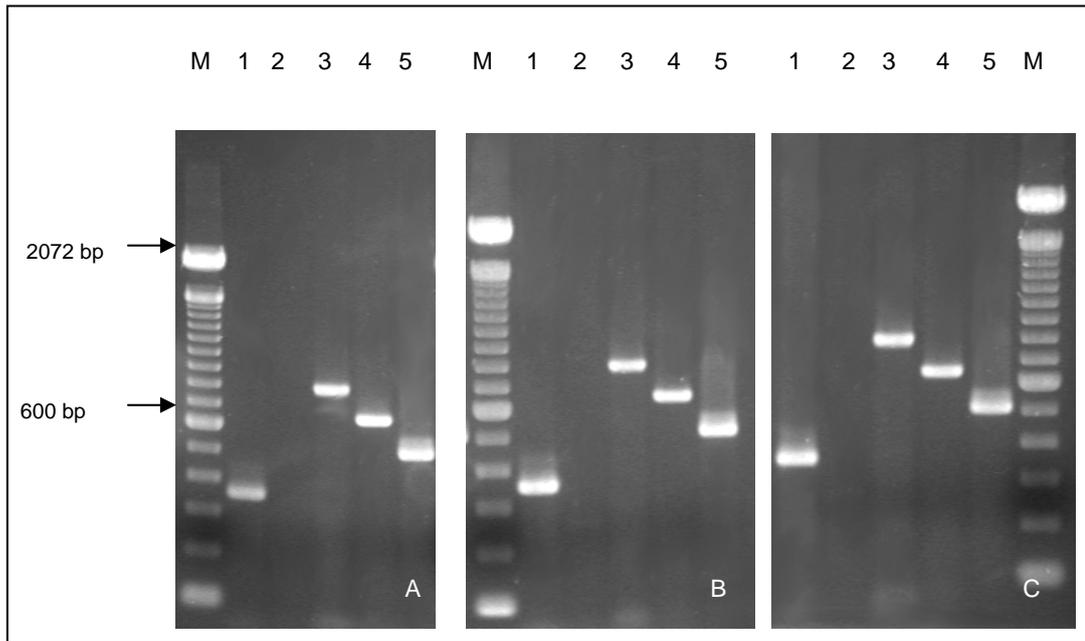


Abb. 4.8: Nachweis der Provirusintegration in den mit PERV-A infizierten 293 Zellen. Der Nachweis erfolgte mit einer PCR mit PERV-spezifischen Primern. Die Amplifikationsprodukte wurden in der Gelelektrophorese dargestellt. M = Marker (100-Basenpaarmarker) 1 = *env-A*; 2 = *env-B*; 3 = *pol*; 4 = *gag*; 5 = β -Aktin als DNA-Kontrolle A = 293 PERV-A0; B = 293 PERV-A1; C = 293 PERV-A2

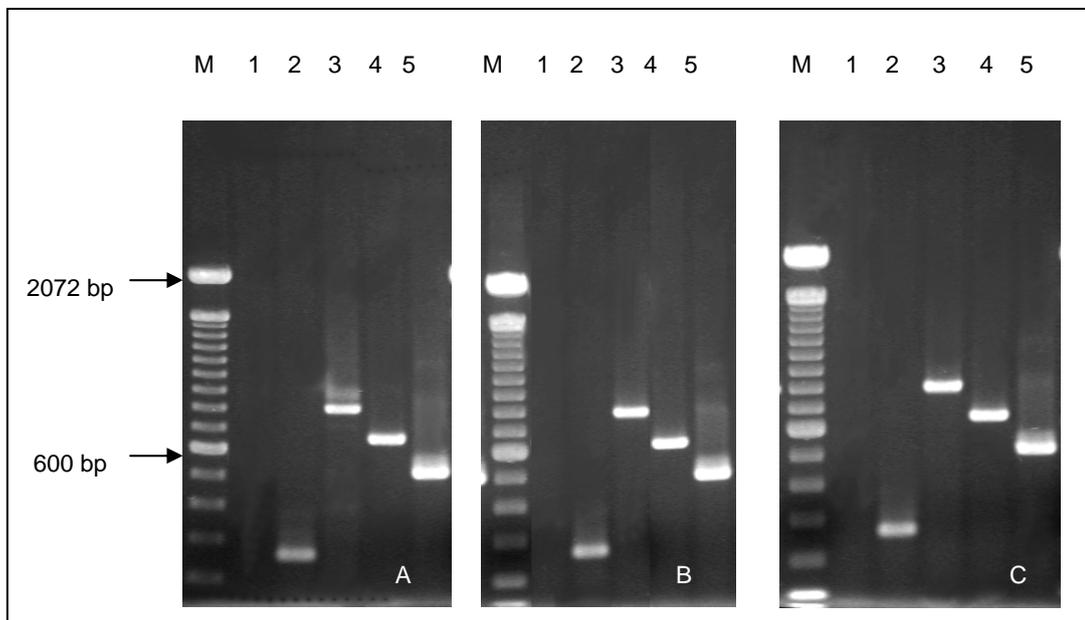


Abb. 4.9: Nachweis der Provirusintegration in den mit PERV-B infizierten 293 Zellen. Der Nachweis erfolgte mit PERV-spezifischen Primern. Die Amplifikationsprodukte wurden in der Gelelektrophorese dargestellt. M = Marker (100 Basenpaarmarker) 1 = *env-A*; 2 = *env-B*; 3 = *pol*; 4 = *gag*; 5 = β -Aktin als DNA-Kontrolle A = 293 PERV-B0; B = 293 PERV-B1; C = 293 PERV-B2

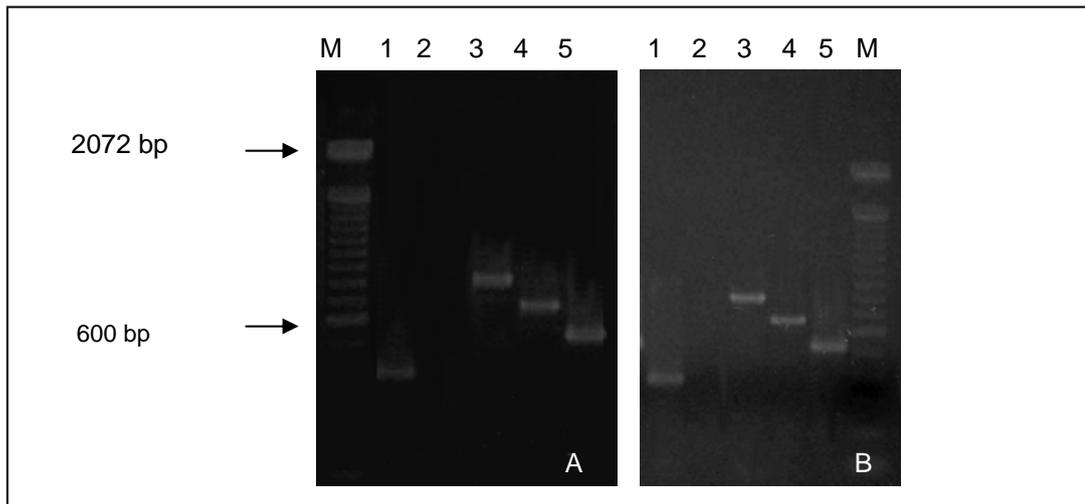


Abb. 4.10: Nachweis der Provirusintegration in den mit PERV NIH/3 bzw. PERV NIH/5 infizierten 293 Zellen. Der Nachweis erfolgte mit PERV-spezifischen Primern. Die Amplifikationsprodukte wurden in der Gelelektrophorese dargestellt. Abb. 4.10 A stellt die Amplifikate der 293 PERV NIH/3 produzierenden Zellen und Abb. 4.10 B die Amplifikate der 293 PERV NIH/5 produzierenden Zellen dar. M = Marker (100 Basenpaarmarker); 1 = *env A*; 2 = *env B*; 3 = *pol*; 4 = *gag*; 5 = β -Aktin als DNA-Kontrolle

4.4.2 Nachweis der produktiven Virusinfektion der passagierten PERVs mittels RT-Aktivitätstest

Es wurde ein RT-Aktivitäts-Test für Gammaretroviren durchgeführt, um eine produktive Infektion nachzuweisen. Die Abbildungen 4.11 bis 4.15 zeigen, dass eine Virusproduktion erfolgt. Es sind Unterschiede in der Virusproduktion der einzelnen Passagen zu sehen. Die PERV-A0-produzierenden Zellen zeigen mit einem RT-Wert von ca. 180 mU/ml die höchste Virusfreisetzung, die erste Passagierung folgt mit einem Wert von ca. 130 mU/ml und bei der zweiten Passage wird mit ca. 100 mU/ml am wenigsten Virus freigesetzt. Da während der Untersuchungen ein unterschiedliches Wachstum der einzelnen PERV infizierten Zellen festgestellt wurde, wurden die RT-Aktivitäten zum Vergleich auf eine einheitliche Zell-Zahl bezogen (Abb. 4.12 und 4.14).

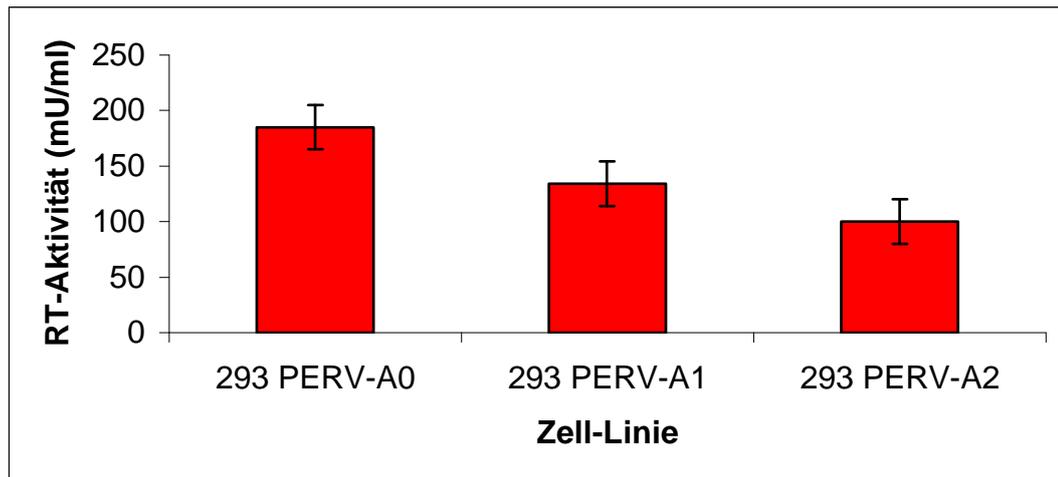


Abb.4.11: RT-Aktivitäten im Überstand der PERV-A infizierten 293 Zellen.

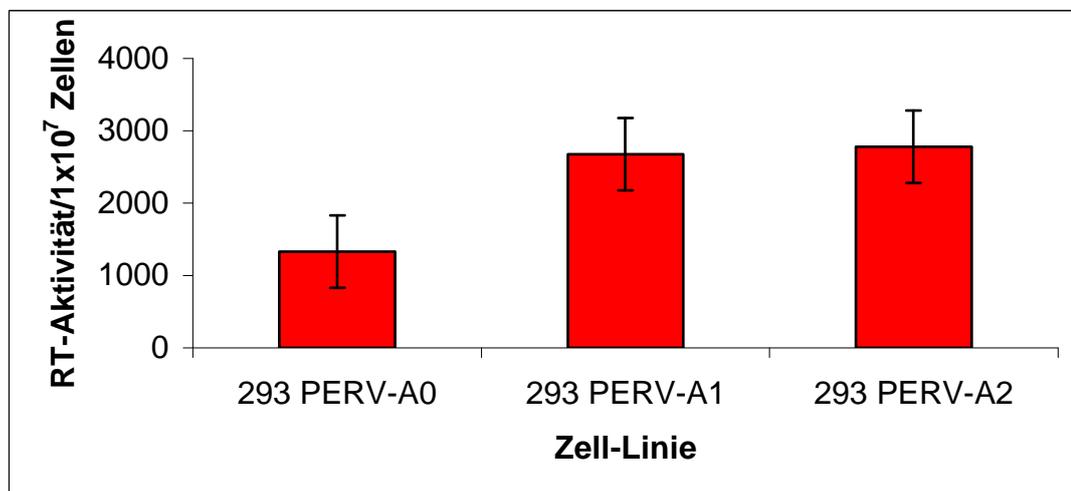


Abb. 4.12: RT-Aktivitäten in den zellfreien Überständen PERV infizierten Zellen bezogen auf 1×10^7 Zellen.

In der Abb. 4.12 ist zu erkennen, dass die RT-Aktivität im Überstand von PERV-A0 in infizierten 293 Zellen mit ca. $1300 \text{ mU}/1 \times 10^7$ Zellen am niedrigsten sind. Die RT-Aktivität in den Überständen von PERV-A1 infizierten 293 Zellen sind mit ca. $2600 \text{ mU}/1 \times 10^7$ Zellen höher. Die höchsten RT-Aktivitäten wurden jedoch im Überstand der 293 PERV-A2 produzierenden Zell-Linie mit ca. $2700 \text{ mU}/1 \times 10^7$ Zellen gemessen (Abb. 4.12).

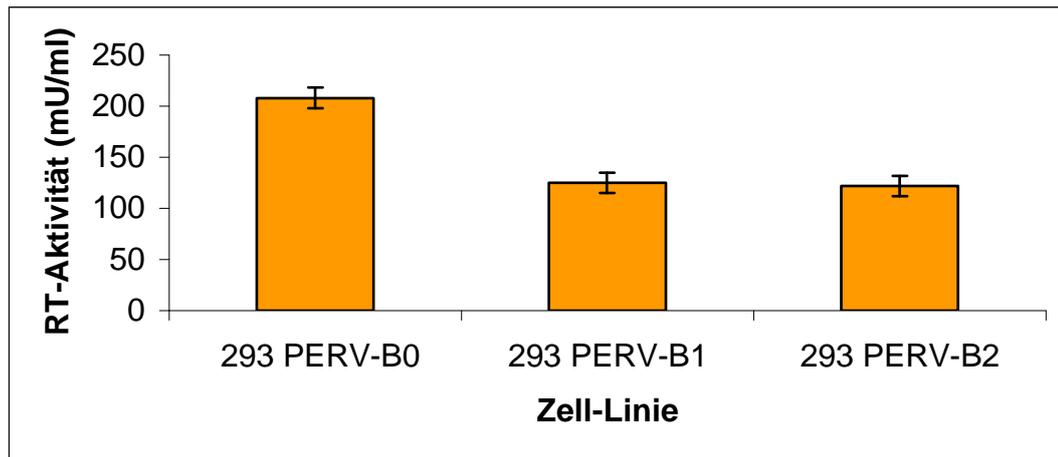


Abb.4.13: RT-Aktivitäten im Überstand der PERV-B infizierten 293 Zellen.

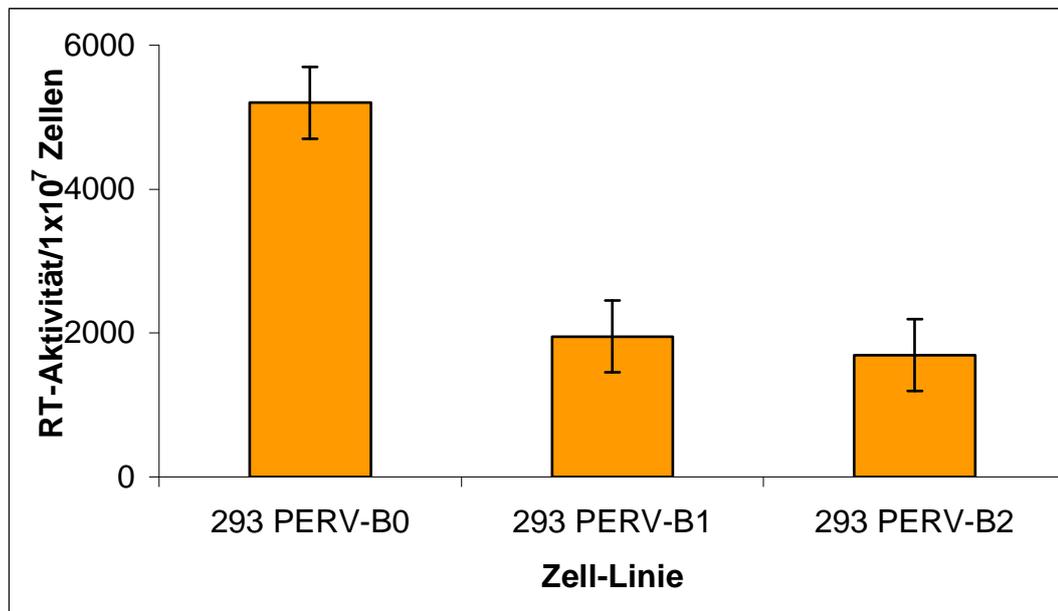


Abb. 4.14: RT-Aktivitäten in den zellfreien Überständen von PERV infizierten Zellen bezogen auf 1×10^7 Zellen.

Im zweiten Versuch wurde PERV-B passagiert.

Die Virusproduktion ist auch bei den Passagen von PERV-B unterschiedlich (Abb. 4.13). Der Kulturüberstand der Ausgangszell-Linie (PERV-B0) zeigt mit einem Wert von ca. 200 mU/ml die höchste Virusproduktion, die erste Passage liegt mit einem Wert mit ca. 125 mU/ml zwischen dem RT-Wert des Überstandes der Ausgangszell-Linie und der zweiten Passage. Die zweite Passage von PERV-B (PERV-B2) zeigt mit einem Wert von ca. 120 mU/ml die geringere Virusfreisetzung. In Abb. 4.14 kann man zwar eine Veränderung der RT-Aktivitäten erkennen, aber es handelt sich um eine

Verringerung von Passage zu Passage. Die RT-Aktivitäten in den Kulturüberständen der PERV-B0 produzierenden 293 Zellen ist mit ca. 529 mU/1x10⁷ Zellen am größten. Die PERV-B1 produzierende Zell-Linie setzt mit einer RT-Aktivität von ca. 1900 mU/1x10⁷ Zellen deutlich weniger Virus frei. Die RT-Aktivitäten der PERV-B2 produzierende 293 Zell-Linie liegt mit ca. 1700 mU/1x10⁷ Zellen nur gering unter den RT-Aktivitäten der PERV-B1 produzierenden 293 Zellen.

Bei diesen zwei Versuchen konnte eindeutig gezeigt werden, dass sich die Virusklone PERV-A und -B auf humane Nierenzellen seriell passagieren lassen.

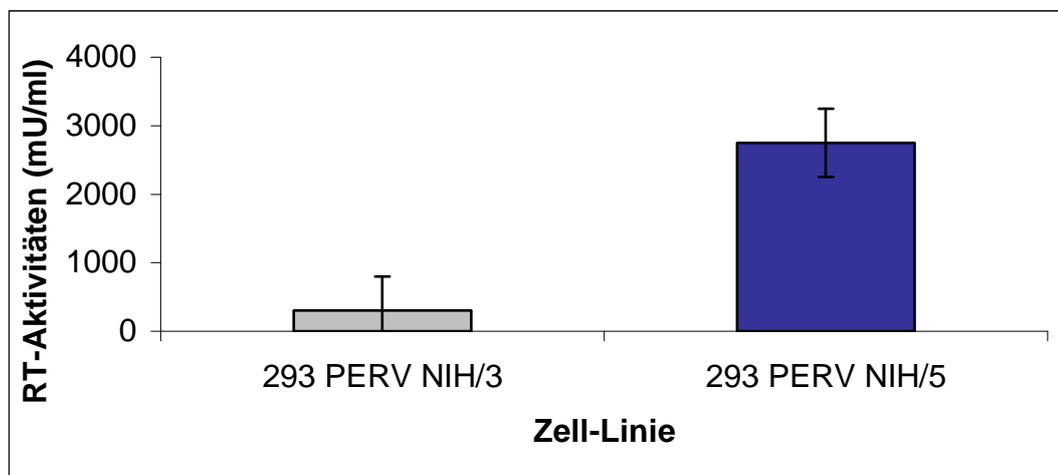


Abb. 4.15: Durchschnittliche RT-Aktivitäten in den zellfreien Kulturüberständen PERV produzierender Zellen. Es sind die Überstände von 293 PERV NIH/3 und 293 PERV NIH/5 als Vergleich zu den oben aufgeführten Passagen dargestellt.

Aus der Abb. 4.15 ist wiederum ersichtlich, dass bei der 3. Passage von PERV auf 293 Zellen (PERV NIH/3) der RT-Wert mit ca. 300 mU/ml um ein zehnfaches kleiner ist als bei der 5. Passage (PERV NIH/5) mit 3000 mU/ml. Um eine Aussage über den Anteil der intakten bzw. infektiösen Viren im Kulturüberstand machen zu können, müssen die verschiedenen PERV-Passagen titriert werden.

In einem dritten Versuch wurden verschiedene Passagen des PERV-A/C-Klons verglichen.

4.4.3 Titerbestimmung der einzelnen Passagen von PERV

Um die Menge an infektiösen Viren im Zellkulturüberstand festzustellen, wurde eine Titration der PERVs (bei jeweils gleichen RT-Aktivitäten) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels IPA. In Abb. 4.16 sind die Virustiter von zellfreien Kulturüberständen PERV produzierender Zell-Linien dargestellt.

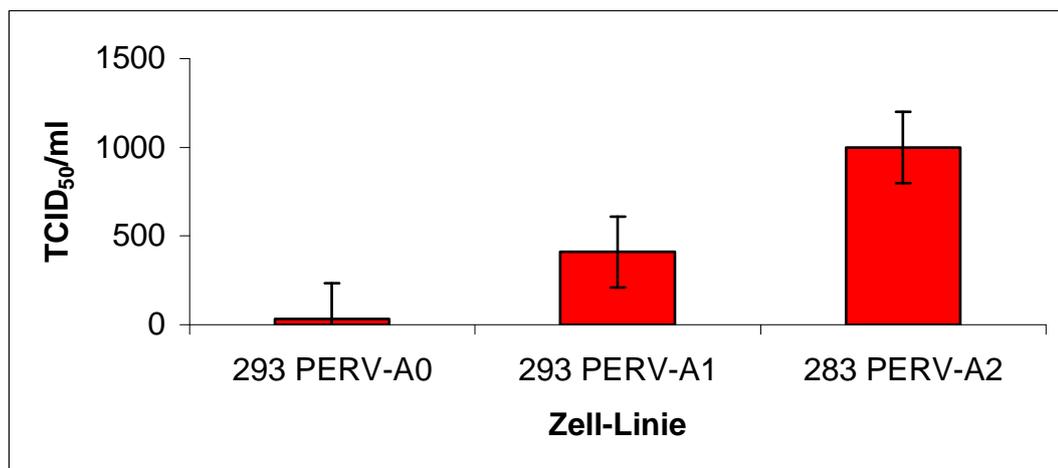


Abb. 4.16: Virustiter der einzelnen PERV-Passagen (PERV-A).

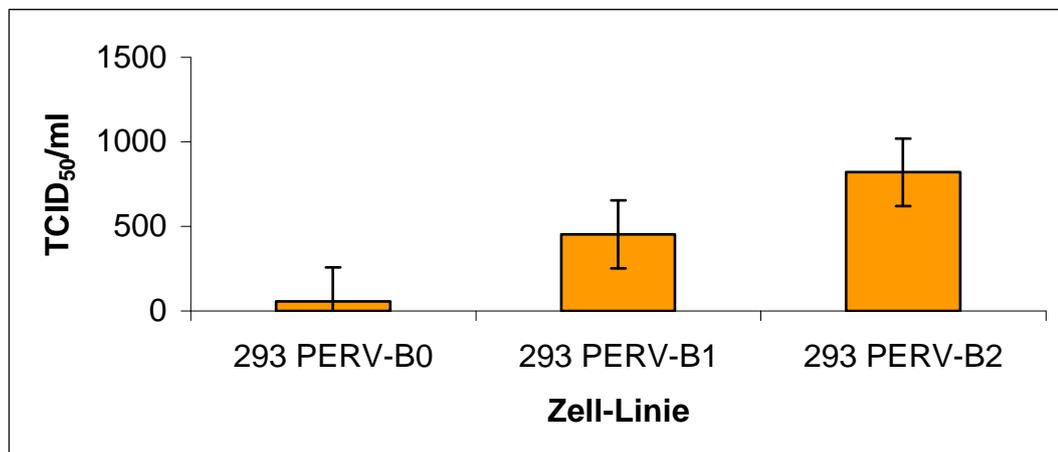


Abb. 4.17: Virustiter der einzelnen PERV-Passagen (PERV-B).

Aus Abb. 4.16 wird ersichtlich, dass PERV-A0 mit ca. 30 $TCID_{50}/ml$ einen geringeren Titer aufweist als PERV-A1 mit 410 $TCID_{50}/ml$ und PERV-A2 mit 1000 $TCID_{50}/ml$. Weiterhin ist in Abb. 4.17 zu erkennen, dass PERV-B0 Zellen mit ca. 50 $TCID_{50}/ml$ einen geringeren Titer als PERV-B1 mit ca. 450 $TCID_{50}/ml$ und PERV-B2 mit 820 $TCID_{50}/ml$ zeigen.

Somit wurde bei den seriellen Passagen von PERV-A und PERV-B ein Virustiteranstieg nachgewiesen.

Ein Anstieg des Virustiters kann, wie für PERV NIH/5 gezeigt, durch genetische Veränderungen in der LTR hervorgerufen werden.

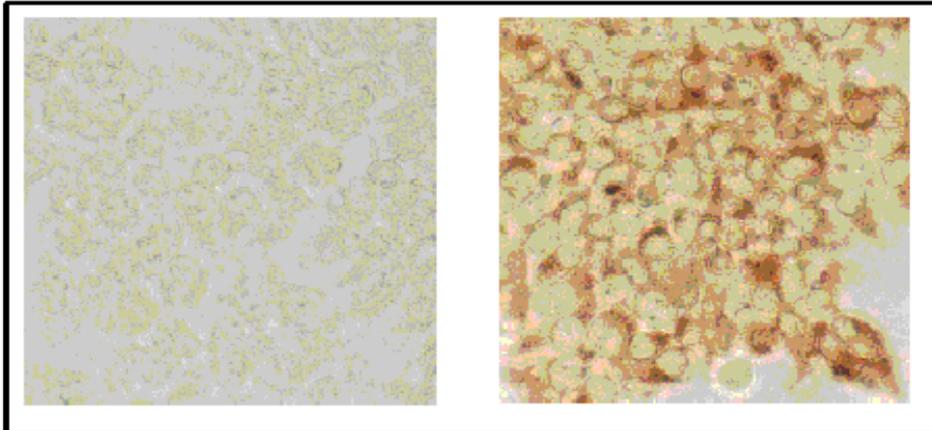


Abb. 4.18: Mikroskopische IPA-Aufnahmen, die durch ein inverses Lichtmikroskop (Axiovert, Zeiss) bei einer 400fachen Vergrößerung aufgenommen wurden. Mit freundlicher Genehmigung von Volker Specke, RKI.

4.4.4 Untersuchungen der LTR-Region von PERV

Um die gezeigten Ergebnisse auf molekularer Ebene zu charakterisieren, wurden die LTR-Regionen dieser Viren, welche für die Virusproduktion eine wichtige Rolle spielen, untersucht. Die LTR-Region spielt wie schon erwähnt u.a. bei der reversen Transkription, der Integration der Virus-DNA in das Genom von Zellen und der viralen Genexpression eine wichtige Rolle. Veränderungen in dieser Region könnten z.B. Auswirkungen auf eine gesteigerte Virusreplikation der infizierten Zellen haben. Es wurde die 5'-LTR-Region von PERVs, welche in das Genom der jeweiligen neuinfizierten Zellen integriert sind, mittels PCR untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.19 dargestellt.

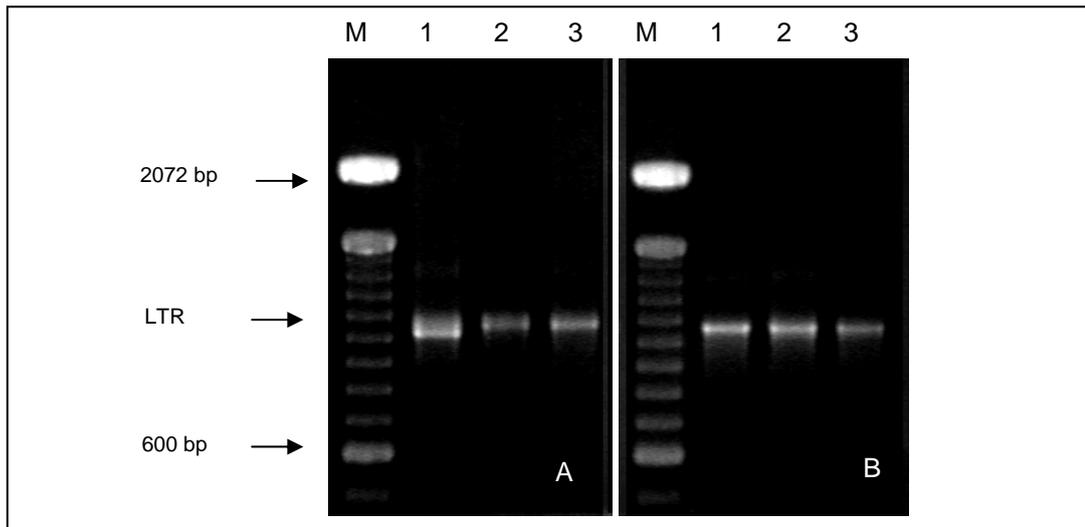


Abb. 4.19: Amplifikation der LTR-Region der verschiedenen PERVs nach der Passagierung.

Es wurde eine PCR mit PERV-spezifischen Primern, die in der LTR-Region von PERV binden durchgeführt. Die Amplifikate wurden in der Gelelektrophorese dargestellt. In Abb. 4.19 A sind die Amplifikate der LTR-Regionen von PERV-A dargestellt. M = Marker (100 Basenpaarmarker); 1 = PERV-A0, 2 = PERV-A1, 3 = PERV-A2. In Abb. 4.19 B sind die Amplifikate der LTR-Regionen von PERV-B dargestellt. M = Marker (100 Basenpaarmarker); 1 = PERV-B0; 2 = PERV-B1, 3 = PERV-B2.

Bei dieser Untersuchung konnten Verlängerungen im Bereich der LTR-Regionen bei PERV-A beobachtet werden. Die durchschnittliche LTR-Länge von PERV-A0 beträgt 1034 bp, die von PERV-A1 1052 bp und von PERV-A2 1070 bp. Bei der seriellen Passagierung von PERV-B kam es zu keiner Verlängerung im Bereich der LTR-Regionen. Die durchschnittliche Länge der LTR von PERV-B umfasst 1067 bp.

4.5 Charakterisierung der Adaptation von PERV-A/C

Da die Unterschiede in den Bereichen der LTR-Regionen bei den vorhandenen Passagen der PERV-A/C-Rekombinanten PERV NIH/3 bis PERV NIH/5 am deutlichsten sind (Abb. 4.20), wurden diese zu näheren Untersuchungen herangezogen.

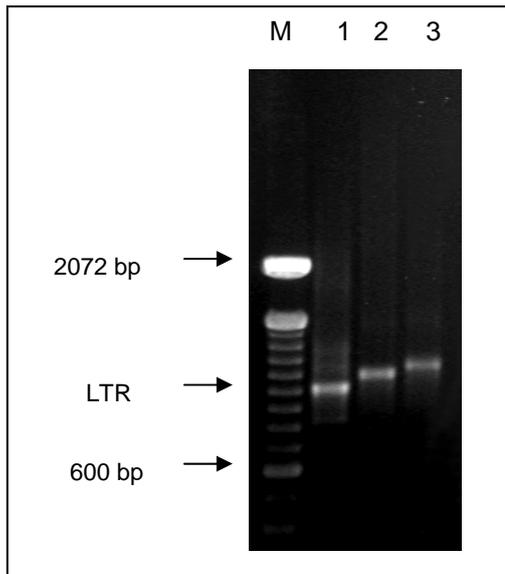


Abb. 4.20: Amplifikation der LTR-Regionen der verschiedenen PERV-Passagen. Die Amplifikation erfolgte durch eine PCR mit PERV-spezifischen Primern, die in der LTR-Region von PERV binden. Die Amplifikate wurden in der Gelelektrophorese dargestellt. M = Marker (100 Basenpaarmarker); 1 = PERV produzierende PK-15 Zellen (porzine Nierenzell-Linie) als Vergleich; 2 = 293 PERV NIH/3; 3 = 293 PERV NIH/5

Die durchschnittliche LTR-Länge der Passage PERV NIH/3 liegt bei 1100 bp und die der Passage PERV NIH/5 bei 1200 bp.

Da bei der Passagierung des Virus ein Anstieg der RT-Aktivität und des Virustiters sowie eine Verlängerung der LTR-Regionen gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage ob das Virus infektiöser geworden ist oder ob mengenmäßig mehr Virus produziert wird. Durch einen Western Blot wurde die Frage beantwortet. In der Abb. 4.21 sind die Ergebnisse zu sehen.

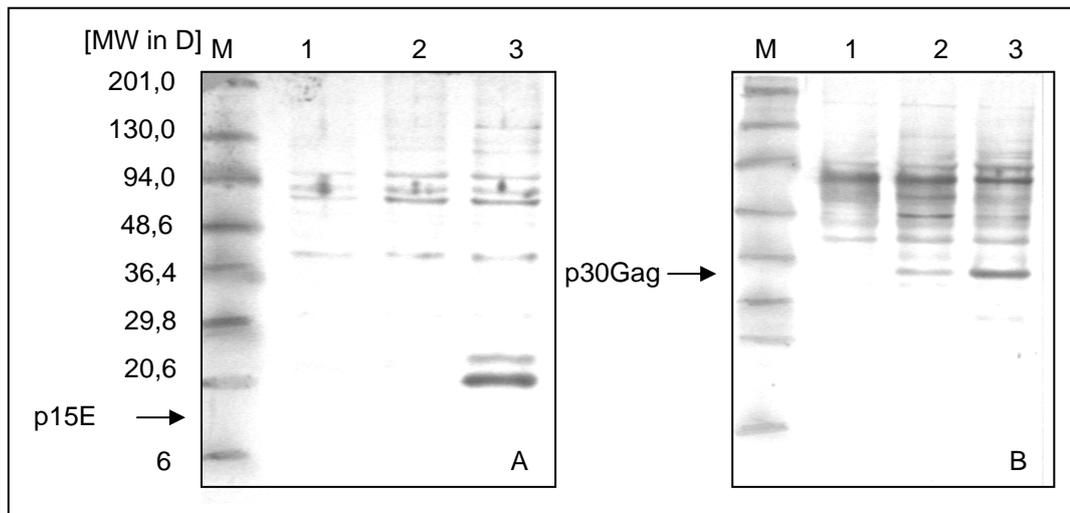


Abb. 4.21: Western Blot der verschiedenen PERV produzierenden 293 Zellen.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE, danach erfolgte der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran. M = Marker (8-Banden *Prestained*-Marker); 1 = 293 FDA als Negativ-Kontrolle; 2 = 293 PERV NIH/3; 3 = 293 PERV NIH/5. In der Abb. 4.21 A wurde ein Erstantikörper gegen das Hüllprotein p15E verwendet. In der Abb. 4.21 B wurde ein Erstantikörper gegen das Protein p30Gag verwendet. Als Zweitantikörper diente jeweils Protein-G.

Es wurden zum einen Antikörper gegen das p15E und zum anderen Antikörper gegen das p30Gag eingesetzt. Da die Möglichkeit besteht, dass zwar viele Viren produziert werden, aber nicht alle intakt und somit infektiös sind, wurde der Antikörper gegen p15E verwendet.

Das Protein p30Gag beschreibt die Menge an im Zell-Lysat enthaltenden Gesamtvirus, somit defekte und intakte Viren. Man kann in der Abb. 4.21 A sehen, dass im Zell-Lysat der uninfizierten 293 FDA Zellen wie erwartet kein Hüllprotein p15E gefunden wurde. Im Zell-Lysat der PERV NIH/5 produzierenden 293 Zellen konnte mit den Antikörper größere Mengen des p15E detektiert werden. Im Zell-Lysat der PERV NIH/3 produzierenden 293 Zellen wurde kein p15E-Protein erfasst.

Die Abb. 4.21 B zeigt, dass im Zell-Lysat der uninfizierten 293 FDA Zellen kein p30Gag-Protein nachgewiesen werden konnte. Im Zell-Lysat der 293 PERV NIH/5 infizierten Zellen wurde eine große Menge an p30Gag gefunden und im Zell-Lysat der PERV NIH/3 produzierenden 293 Zellen eine deutlich geringere Menge an p30Gag. Das Mengenverhältnis zwischen p30Gag und p15E entscheidet über die Infektiösität der PERV-Passagen. Bei gleicher Zell-Lysat-Menge wurde weniger Env nachgewiesen als Gag.

Damit konnte gezeigt werden, dass die Zell-Linie 293 PERV NIH/5 mehr Virus produziert als die Zell-Linie 293 PERV NIH/3, und dass PERV/5 möglicherweise anteilmäßig mehr p15E enthält.

4.5.1 Sequenzanalyse der LTR-Regionen von 293 PERV NIH/3 und 293 PERV NIH/5

Es wurden Sequenzanalysen durchgeführt, um geeignete molekulare Klone (PERV NIH/3 mit wenigen und PERV NIH/5 mit vielen direkten Sequenzwiederholungen) für die geplanten Promotor-Expressions-Studien zu erhalten. Die Auswertung der Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe der Programme *DNAstar* und *Gene stream*.

Es erfolgte ein Homologie-Vergleich der jeweiligen Klone untereinander. Ferner erfolgte ein Sequenzvergleich mit LTR-Bereichen von veröffentlichten Klonen (Genbank). In der Abb. 4.22 sind die sequenzierten LTR-Bereiche der klonierten viralen 5'-LTR schematisch dargestellt. Sie Sequenzen sind im Anhang zu finden.

Man kann erkennen, dass die LTR der passagierten PERVs aus unterschiedlich vielen direkten Sequenzwiederholungen (37 bp-Wiederholung = blaue Balken) aufgebaut sind. In der LTR der PERV NIH/3-Passage findet man zusätzlich einen 21 bp und einen 24 bp-Block. Die LTR der PERV NIH/5-Passage enthält außerdem einen 5 bp und einen 13 bp-Block. Der Klon Nr. 4 der PERV NIH/5 produzierenden 293 Zellen zeigt eine ähnliche Sequenz wie die PERV NIH/3-Passage, enthält aber einen 37 bp mehr. Bei PERV NIH/3 sind zahlreichen Mutationen und Insertionen von Nukleotiden zu verzeichnen.

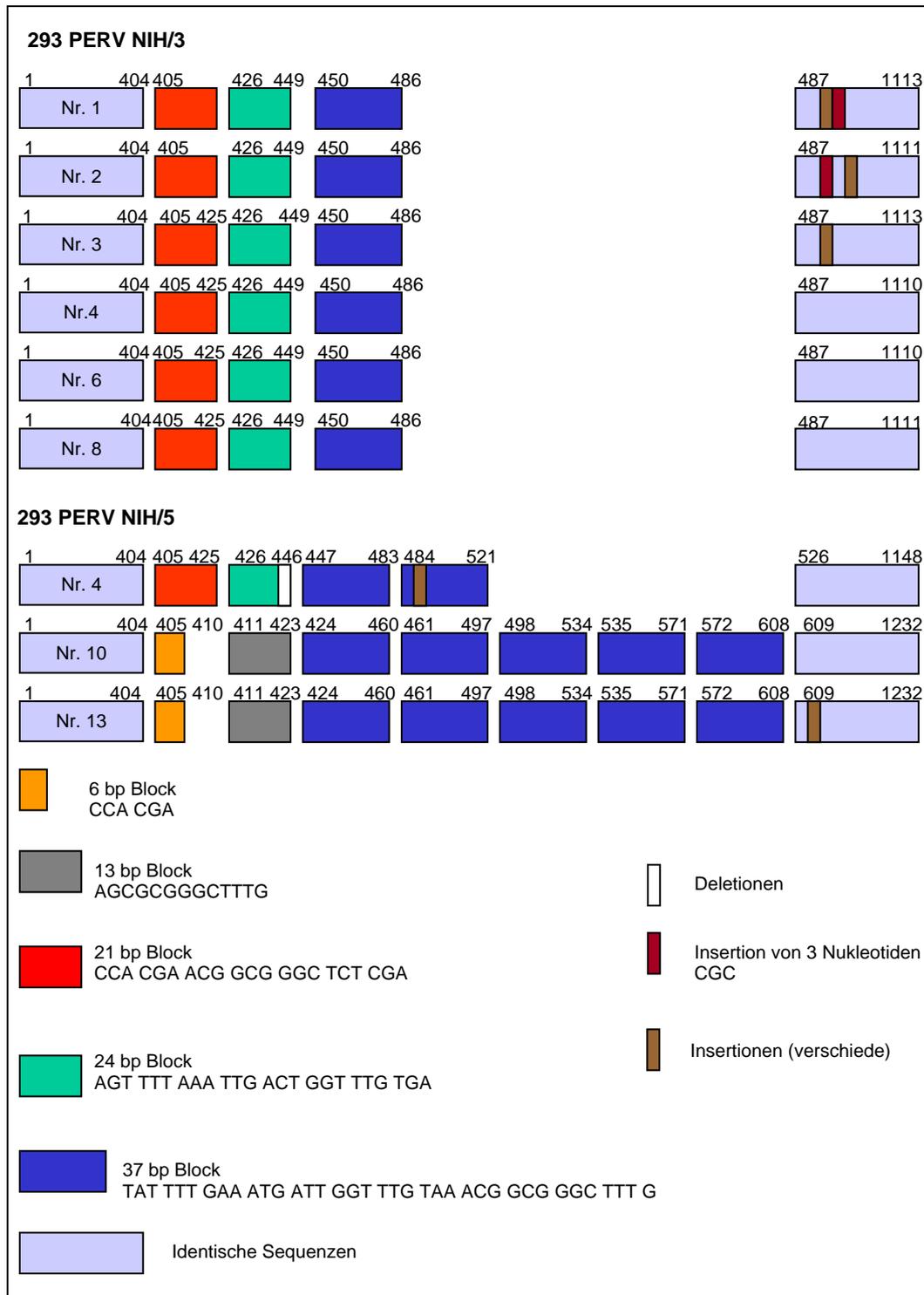


Abb. 4.22: Schematische Darstellung der Veränderungen der 5' LTR von 293 PERV NIH/3 und 293 PERV NIH/5. Es sind verschiedene LTR-Klone der PERV-Passagen dargestellt. Die Bedeutung der farblich gekennzeichneten Balken sind in den Legenden angegeben.

Es wurde festgestellt, dass die 37 bp- Sequenzwiederholungen Homologien zu den Bindestellen des Transkriptionsfaktor „NFY“ und zu einer viralen „CCAT“-Box aufweist.

Stromabwärts der Sequenzwiederholungen der LTR von PERV findet man Homologien zu einer retroviralen „TATA“-Box.

Die Homologien sind in der folgenden Abb. 4.23 ersichtlich.

TAT TTT GAA ATG ATT GGT TTG TAA AGC GCG TTT GT	37 bp Wiederholung von PERV NIH-LTR
NYS ATT GGY YA	Bindestelle des Transkriptionsfaktor „NFY“
TS ATT GGY YNN N	virale „CCAT“-Box
TTGGAATAAAATCCT	5'-LTR von PERV
NCTATAAAAR	retrovirale „TATA“-Box

Abb. 4.23: Homologievergleich zwischen 37 bp – Wiederholung der LTR von PERV und von Transkriptionsfaktorbindestellen.

Weiterhin findet man stromabwärts der „TATA“-Box in der U5-Region der LTR von PERV eine Homologie zu einer Hormonrezeptor-Bindestelle mit einfachen Nukleotid-Unterschieden (Single nucleotide polymorphism = SNP) zu einem Östrogenrezeptor. Diese Homologie ist in der Abb. 4.24 dargestellt.

AAGACCGCTTCTCGTGAGTGATT	PERV-C
AGGTCANNNTGACCT	ERE
CGCTTCTCGTGATGT	EREC
* * * * *	
ERE = Östrogen-Rezeptor-Elemente	
EREC = Hormon-Rezeptor-Element von PERV-C	
TGA = Trinukleotid-Linker-Sequenz	
* = SNP	

Abb. 4.24: Homologievergleich zwischen den Östrogen-Rezeptor-Element und den möglichen Hormon-Rezeptor-Element der 5'-LTR von PERV.

Für die geplanten Expressionsversuche wurden Klone der PERV-Passage PERV NIH/3 mit wenigen 37 bp-Sequenzwiederholungen und Klone der PERV-Passage PERV NIH/5 mit vielen 37 bp-Sequenzwiederholungen benötigt, um möglichst große Unterschiede in der Expression zu zeigen.

In der Abb. 4.25 ist der geplanten Ablauf dargestellt.

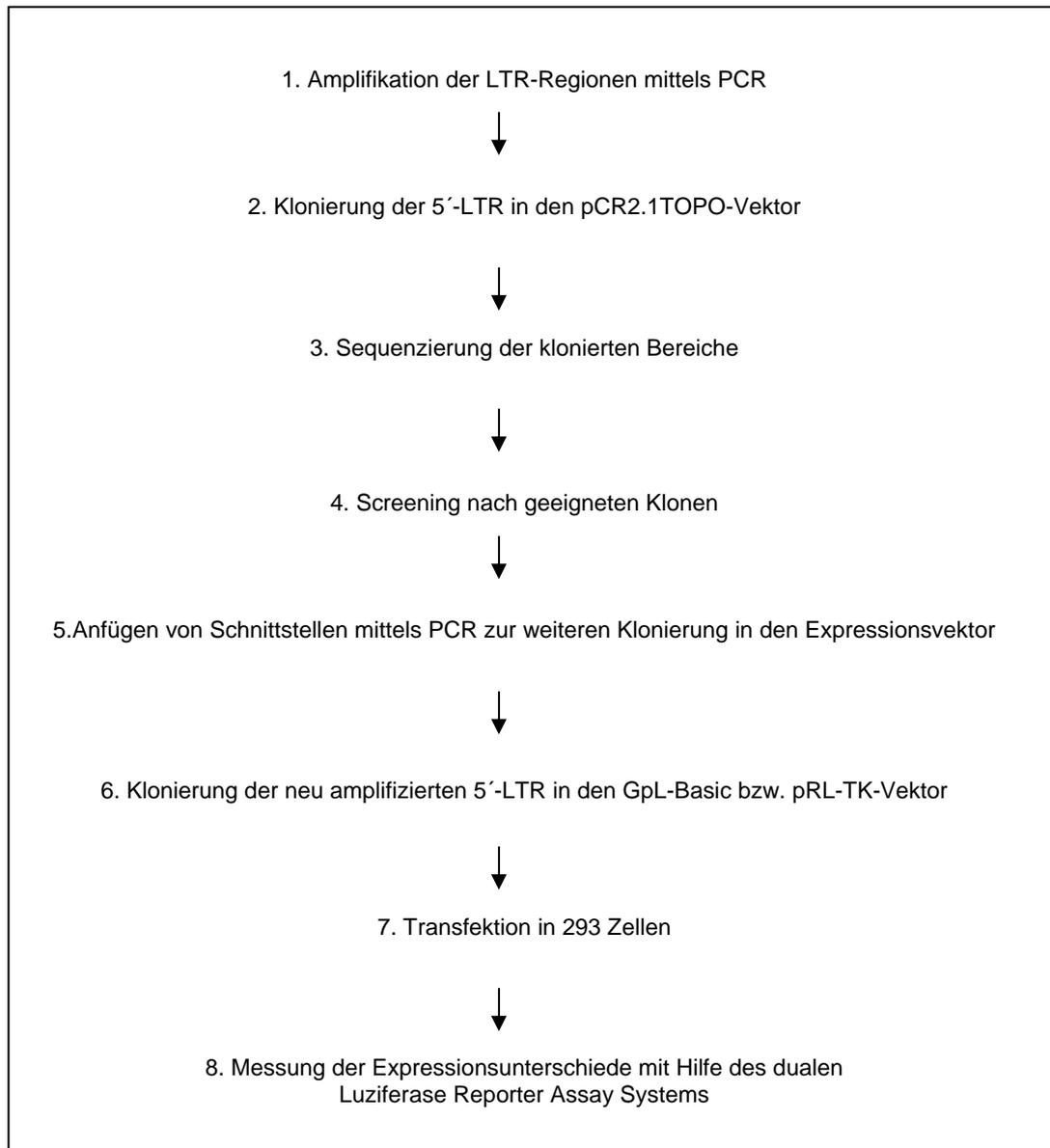


Abb. 4.25: Schematische Darstellung des geplanten Ablaufs der Expressionsversuche mit PERV NIH/3 und PERV NIH/5.

Die LTR von PERV NIH/3 und PERV NIH/5 mit jeweils unterschiedlich langen Multimerisierungen werden vor die Luziferase (vom Leuchtkäfer) im Expressionsvektor (GpL-Basis-Vektor), kloniert. Um Unterschiede während der Transfektion abzugleichen, wurde ein zweiter Vektor (pRL-TK) mit einer

anderen Luziferase (Renilla Luziferase) verwendet. Beide Vektoren werden in uninfizierte 293 Zellen transfiziert. Zur Überprüfung des Systems wird unabhängig von diesen Vektoren ein GpL-Control-Vektor in andere uninfizierte 293 Zellen transfiziert. Zunächst wird die Lumineszenz des Kontroll-Vektors pRL-TK gemessen, und die Reaktion danach abgestoppt. In der zweiten Messung wird die Lumineszenz des Basis-Vektors erfasst. So erfolgt eine vergleichende Messung zwischen den Basis- und Kontroll-Vektor.

5 Diskussion

Bei den Xenotransplantationen besteht die Gefahr von Transspeziesinfektionen, sogenannte Xenozoonosen. Hierbei spielen die PERVs eine besondere Rolle, da sie in allen Schweinerassen vorkommen (Ericsson *et al.*, 2001; Patience *et al.*, 2001), aus porzinen Gewebe freigesetzt werden können (Wilson *et al.*, 1998) und in der Lage sind humane Zellen zu infizieren (Le Tissier *et al.*, 1997; Patience *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1998a; Wilson *et al.*, 1998; Denner, 1999; Specke *et al.*, 2001b; Tacke *et al.*, 2000a; Tacke *et al.*, 2000b). Daher wurden diese endogenen Retroviren in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht. Damit soll ein Beitrag zur Risikoabschätzung bei möglichen Xenotransplantationen geleistet werden.

Infektionsversuchen mit humanen lymphoiden Zellen am Beispiel der T-Zell-Linie C8166

PERVs zeigen eine große Ähnlichkeit in der Morphologie (Bouillant *et al.*, 1975) und große Homologie in der Nukleotid- und Aminosäuresequenz (Akiyoshi *et al.*, 1998; Le Tissier *et al.*, 1997) zu Gammaretroviren der Mäuse (MuLV) und Katzen (FeLV), welche Leukämien und Immundefizienzen (Fan, 1994; Hardy, 1993) induzieren. Aus diesem Grunde ist die Untersuchung der Infektion des Immunsystems mit PERV von besonderer Wichtigkeit. Die Infektion von T-Zellen mit PERV, aber auch von anderen humanen Zellen des Immunsystems, wie z.B. Monozyten und periphere Blutleukozyten, konnte unlängst gezeigt werden (Denner, 1999; Specke *et al.*, 2001b). Es stellte sich die Frage, ob PERV in der Lage ist, sich in Immunzellen zu vermehren und andere Zellen des Immunsystems zu infizieren. PERV wurde auf humanen lymphoiden Zellen passagiert, um die Übertragbarkeit von PERV auf diese Zellen zu untersuchen. Es konnte erstmals eine Übertragung gezeigt werden, allerdings ist die Infektion erst lange Zeit (9 Wochen) nach der Passage von PERV nachweisbar, und die Replikation ist gering. Das Virus stellt somit eine potentielle Gefahr für Zellen des menschlichen Immunsystems bei Xenotransplantationen dar. Es müssen

weitere Untersuchungen an humanen Immunzellen erfolgen, um das Risiko von daraus resultierenden Leukämien und Immundefizienzen abzuschätzen.

Adaptation von PERV-A und -B an humane Nierenzellen: Mögliche Ursachen

Diese Versuche wurden als Vergleich zu bereits vorliegenden Daten durchgeführt, in denen eine PERV-A/C-Rekombinante (PERV NIH/3), und eine Mischpopulation aus PERV-A und PERV-B von einer porcinen Nierenzell-Linie PK-15 PERV auf 293 Zellen seriell passagiert wurde. Dabei konnten Veränderungen in den LTR-Regionen beider Virus-Passagen festgestellt werden. Diese Veränderungen beinhalten Vervielfältigungen von direkten Sequenzwiederholungen, die zwischen 1,5 und 5,5-mal in der U3-Region der 5'-LTR vorlagen. Zusätzlich konnten verschiedene Insertionen wie z.B. in der 5. Passage von 293 PERV NIH (3 Nukleotide), und diverse Deletionen und Mutationen gezeigt werden.

Bei der Passagierung von PERV auf humanen Zellen entstanden PERVs mit unterschiedlich langen LTR-Regionen, die RT-Aktivität stieg an und der Virustiter nahm zu. Da die PERVs in humanen Zellen besser replizieren und im Genom der Schweine so nicht vorkommen, wurden sie als human adaptierte PERVs (HAPs) bezeichnet (Denner *et al.*, 2001b).

Es war bei den Passagen des PERV-AB-Gemisches unklar, ob die Veränderungen der LTR und die daraus resultierende Adaptation auf PERV-A oder PERV-B zurückzuführen ist. Um die Adaptation von PERV an humane Zellen besser zu charakterisieren, wurde in zwei unabhängigen Ansätzen PERV-A und PERV-B getrennt untersucht. Dabei wurden die RT-Aktivitäten, Virustiter und die LTR-Regionen, welche vor allem für die Virusreplikation von Bedeutung sind, untersucht. Bei der Passagierung von PERV-A auf 293 Zellen wurden ähnliche Ergebnisse wie in den vorangegangenen Untersuchungen erzielt. Es konnten Verlängerungen im Bereich der LTR-Region und eine Zunahme der RT-Aktivität und des Virustiter beobachtet werden.

Sequenzwiederholungen, wie sie bei den seriellen Passagen von PERV auftraten, konnten auch bei Untersuchungen des endogenen Retrovirus der Maus *Mus dunni*, (Wolgamot *et al.*, 1999), des Moloney-Maus-Leukämie-Virus (van Beveren *et al.*, 1982), der humanen T-Zell-Leukämie-Viren des Typs I und II (Paskalis *et al.*, 1986; Shimotohno *et al.*, 1984), und vor kurzem auch für PERV (Scheef *et al.*, 2001) gezeigt werden.

Bei der Passage von PERV-B sind keine sichtbaren Verlängerungen im Bereich der LTR zu erkennen und es kam zu einer Abnahme des RT-Wertes von Passage zu Passage. Ungeachtet dessen war ein Anstieg des Virustiters zu beobachten. Da weder eine LTR-Verlängerung noch ein Anstieg der RT-Aktivität bei den seriellen Passagen von PERV-B beobachtet wurde, müssen andere Veränderungen für den Anstieg des Virustiters verantwortlich sein. Es könnten z.B. Veränderungen in der Env-Region auftreten, die zu Abweichungen in den Rezeptorbindestellen und zur Verwendung eines anderen Rezeptors, wie es bei einem aviären Retrovirus gezeigt werden konnte, führen (Taplitz, 1997).

Bei der Passagierung von PERV-A und PERV-B auf 293 Zellen wurde während des Versuchs ein unterschiedliches Zellwachstum beobachtet.

Aus diesem Grund wurde die Gesamt-RT-Aktivität in der Zellkulturflasche auf eine einheitliche Zell-Zahl umgerechnet. Inwieweit das unterschiedliche Zellwachstum einen Einfluss auf den Virustiter hat, bleibt noch zu untersuchen. Die größten Veränderungen wurden bei der seriellen Passagierung von PERV-A/C auf 293 Zellen erzielt, weswegen diese molekularen Klone für die geplanten Expressionsversuche verwendet wurden.

Nach der Amplifikation der LTR-Bereiche der 3. und 5. Passage von PERV-A/C, wurden bestimmte LTRs dieser Viren kloniert und sequenziert. Nach den erfolgten Sequenzierungen wurde deutlich, dass sich direkte Sequenzvervielfachungen (37 bp) in der U3-Region der LTR von PERV befinden, wie sie schon beschrieben wurden (Schwendemann, 2000; Denner, 2001b).

Diese Arbeit bestätigt die Befunde, dass es innerhalb der seriellen Passagen zu unterschiedlich vielen Sequenzvervielfachungen kommen kann und dass

es eine hauptsächlich vorkommende LTR in jeder Passage gibt (Abb. 4.19; 5.1 A).

Es wurden gezielt Klone mit wenigen (239 PERV NIH/3) und mit vielen (293 PERV NIH/5) Sequenzwiederholungen gewählt, um möglichst große Unterschiede in dem später angestrebten Expressionssystem zu erzielen. Bei den Klonen 1-5 und 8 (PERV NIH/3) wurde nur einmal die 37 bp-Sequenz gefunden(siehe Anhang), und bei den Klonen 10 und 13 (PERV NIH/5) traten bis zu fünf Wiederholungen dieser 37 bp-Sequenz auf (Abb.5.1 B). Die Sequenzwiederholungen der molekularen Klone von PERV NIH/3 und PERV NIH/5, welche im Rahmen der oben genannten Diplomarbeit analysiert wurden, konnten mit einigen Unterschieden auch in der vorliegenden Arbeit gefunden werden. Die Unterschiede betreffen die gezielt ausgewählte Anzahl der enthaltenen Sequenzwiederholungen in der LTR-Region, und die zahlreich vorkommenden Punktmutationen, die nicht in den Multimerisierungen, sondern am Anfang und am Ende der jeweiligen Sequenzen zu finden sind. Weiterhin sind Insertionen und Deletionen zu beobachten. In den folgenden Abbildungen (Abb. 5.1 A und B) werden die Unterschiede zwischen den Sequenzen deutlich.

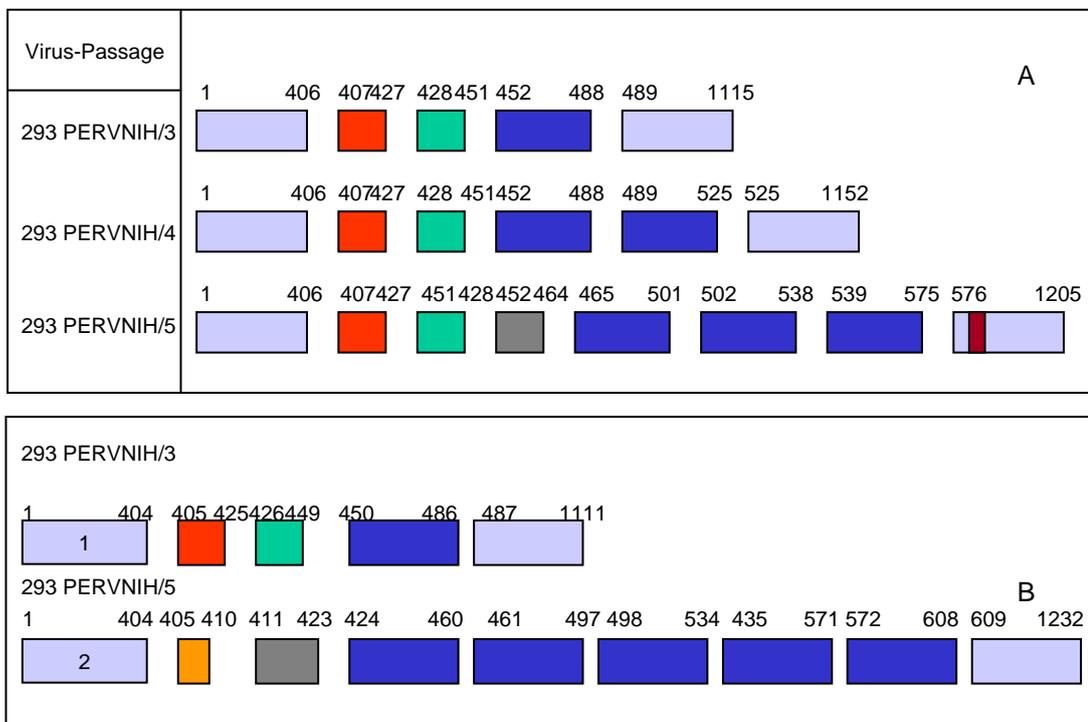


Abb.5.1: Schematische Darstellung des LTR-Aufbaus der verschiedenen Virus-Passagen. A = die hauptsächlich vorkommenden LTR-Sequenzen der Virus-Passagen. B = ausgewählte LTR-Sequenzen für Expressionspromotor-Studien, 1= Klone 1-5 und 8; 2 = Klone 10 und 13
Farblegende Siehe Abb. 4. 22. (Ergebnisteil).

Die LTR von PERV: Funktionelle Domänen

Die LTR-Region spielt unter anderem bei der viralen Transkription, der Integration der Virus-DNA in das Genom von Zellen, und der viralen Genexpression eine wichtige Rolle. Diese Region kann ebenso nach der Integration in das Zellgenom zur Expression zellulärer Gene beitragen. Veränderungen in der LTR-Region können somit zu einer Steigerung der Replikationsfähigkeit der Viren bzw. zu einer veränderten Expression von zellulären Genen führen. Sollten dies Protoonkogene sein, könnten sie unter Umständen zur Verstärkung der zellulären Proliferation und zur Entstehung von Tumoren führen. Ähnliche Multimerisierungen, konnten auch bei anderen Klonen von PERV-A und PERV-B beobachtet werden (Czauderna *et al.*, 2000; Scheef *et al.*, 2001).

Neben dem Vorhandensein einer retroviralen „TATA-Box“ und einer viralen „CCAT“-Box wurden in den 37 bp Sequenzwiederholungen Homologien zu Bindestellen des Transkriptionsfaktors „NFY“ gefunden. Diese Elemente stellen Bestandteile des Promotors dar. Sie sind stromaufwärts von Promotoren in der U3-Region der LTR gelegen.

Vervielfältigungen von direkten Sequenzwiederholungen, die Regulations-Elemente bzw. Enhancer-Elemente darstellen und die zu einer gesteigerten Genexpression und daraus folgend zu einer Steigerung der Virusreplikation führen wurden bei verschiedenen Retroviren beobachtet, wie z.B. bei den humanen Leukämie-T-Zell-Viren des Typs I und II (van Beveren *et al.*, 1982). Der Aufbau der Enhancer-Region umfasst unter anderem eine verschieden große Anzahl von Transkriptionsfaktor-Bindestellen als Enhancer-Elemente. In der Abb. 5.2 sind die unterschiedlichen Regionen der PERV-LTR dargestellt.

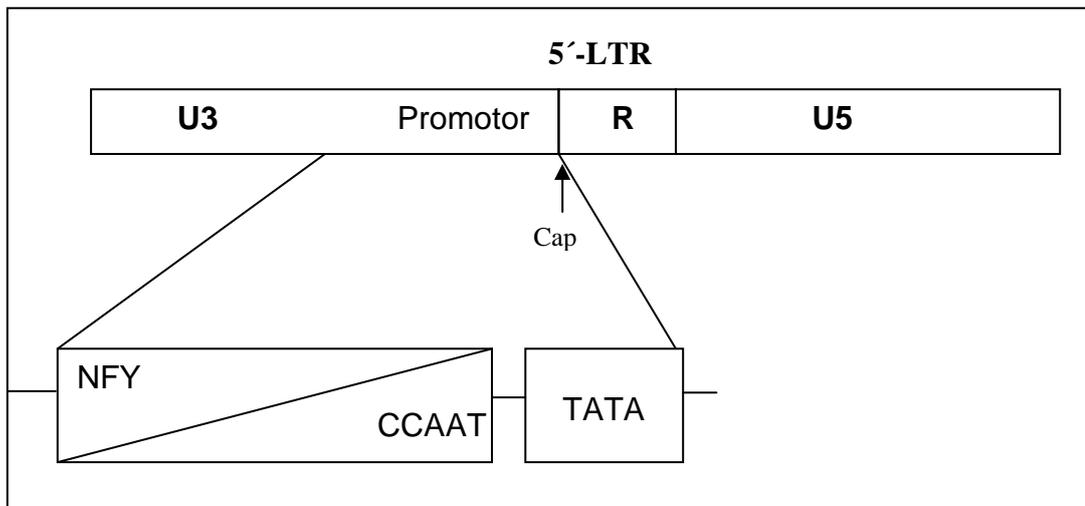


Abb. 5.3: Schematische Darstellung der Organisation und Struktur PERV-LTR. Die „CCAAT“-Box bzw. die Bindestelle für den Transkriptionsfaktor „NFY“, die in den direkten Sequenzwiederholungen vorliegen, sind stromaufwärts vom Promotor, der eine „TATA“-Box enthält, gelegen (Schwendemann, 2000).

Es konnte des weiteren in der LTR von PERV eine Homologie zu hormonabhängigen Rezeptoren gefunden werden. Die Sequenzen befinden sich stromabwärts der „TATA“-Box in der U5-Region.

Es wurde in jüngsten Untersuchungen festgestellt, dass Nukleotid-Polymorphismen der LTR von PERV-A und PERV-B/C eine starke Affinität zu Östrogenrezeptor-Bindestellen aufweisen (Qinn und Langford, 2001). Es könnte sich um mutmaßliche hormon-reagierende Regionen handeln. Hinweise zu dieser Vermutung geben nicht nur hormonabhängige eukaryotische Transkriptionskomplexe, sondern auch Versuche mit dem Maus-Mamma-Tumor-Virus (MMTV), dessen Transkriptionsrate bei der Anwesenheit von Glucocorticoiden anstieg (Truss *et al.*, 1996; Adler *et al.*, 1993).

Adaptation von PERV an humane Zellen: Mögliche Konsequenzen

Ähnlich wie die hier aufgezählten Multimerisierungen von Sequenzen der LTR wurden sie bei verschiedenen Retroviren beschrieben und sie sind immer mit neuen biologischen Eigenschaften assoziiert. Dies betrifft nicht nur exogene, sondern auch endogene Retroviren.

(i) Für das endogene Virus der Maus *Mus dunni*, MDEV konnte gezeigt werden, dass diese Proviren in Mauszellen nicht replizieren. Sie enthalten in der U3-Region der LTR 1,15 Kopien einer 80 bp-Sequenzwiederholung. Nach Behandlung mit Steroiden wurden replizierende Viren beobachtet. Die replizierenden molekularen Klone weisen im Schnitt 6,15 Kopien der 80 bp-Sequenzwiederholung auf (Wolgamot *et al.*, 1999). Es wird davon ausgegangen, dass es durch die Behandlung der Mauszellen mit Steroiden zu genetischen Veränderungen in der LTR und somit zur Aktivierung der Transkription, verbunden mit einer Virusreplikation, kommt. Der Mechanismus der Multimerisierung ist derzeit noch unbekannt. Es wird angenommen, dass es zu einem homologen „misannealing“ (falsche Anlagerung) während der reversen Transkription kommt (Wolgamot *et al.*, 1999; Scheef *et al.*, 2001). Es lässt sich also folgern, dass eine Vervielfältigung von Transkriptions-Enhancer unter anderem für die Replikationsfähigkeit der MDEVs nötig ist.

(ii) Es wurden Proviren des feline Leukämievirus (FeLV), die aus Tumoren der Milz infizierter Katzen stammen isoliert, welche eine Verdreifachung einer 21 bp langen direkten Sequenzwiederholung in der U3-Region der LTR im Vergleich zu Proviren, die aus Katzen ohne Tumoren stammen zeigten (Athas *et al.*, 1995). Bei diesen Sequenzwiederholungen handelt es sich um Bestandteile des Transkriptions-Enhancers, die die virale Genexpression und daraus folgend die Virusreplikation verstärken.

(iii) Analysen von proviralen U3-Regionen molekularer FeLV-Klone, welche in Katzen T-Zell Tumore induzierten, zeigten neben Punktmutationen und Nukleotidaustauschen Verdopplungen von Enhancer-Regionen (Rohn *et al.*, 1994). In den U3-Regionen der FeLV-Proviren aus Katzen ohne Tumore konnten keine Duplikationen festgestellt werden.

(iv) In anderen Veröffentlichungen (Morrison *et al.*, 1994) wurde gezeigt, dass es bei murinen Retroviren (SL3-3), die T-Zell Lymphome induzieren, durch Rekombination während der viralen Replikation zur Multimerisierung eines Sequenzmotives kommt, welches unter anderem für die gesteigerte Pathogenität dieser Viren verantwortlich ist. Dabei handelt es sich um ein 72 bp langes Transkriptions-Enhancer-Element. Es ist zwischen einmal und

viermal in der U3-Region der LTR stromaufwärts der „TATA“-Box und des „CCAAT“-Elements lokalisiert.

(v) Weitere Untersuchungen wurden bei der spontanen Leukämie, die in ARK-Mäusen auftritt und durch das *mink cell focus-forming* (MCF) Virus hervorgerufen wird, durchgeführt. Man konnte zeigen, dass die Leukämie-auslösenden MCF-Viren unter anderem durch Rekombination von verschiedenen endogenen murinen Retroviren entstehen. In allen spontan auftretenden Tumoren wurden MCF-Viren mit Duplikationen von Bestandteilen des Enhancer-Elements unterschiedlicher Länge, welche in der U3-Region der LTR lokalisiert sind, nachgewiesen (Stoye *et al.*, 1991).

(vi) In anderen Untersuchungen (Holland *et al.*, 1989) konnte gezeigt werden, dass die Multimerisierung des Transkriptions-Enhancer für die Steigerung der Pathogenität von Leukämie-auslösenden Viren verantwortlich ist.

Es lässt sich vermuten, dass es sich bei den Vervielfältigungen der direkten Sequenzwiederholungen, die in der U3-Region der 5'LTR der verschiedenen Virus-Passagen gelegen sind, um Regulations-Elemente bzw. Enhancer-Elemente in Analogie zu den oben aufgeführten Daten handelt. Dies kann letztlich nur mit den angestrebten Promotorstudien nachgewiesen werden.

In derartigen Promotor-Aktivitäts-Studien mit molekularen Klonen konnte festgestellt werden, dass mit zunehmender Anzahl der Sequenzwiederholungen die Promotoraktivität in den transfizierten Zellen zunimmt und die U3-Multimerisierungsbox wie ein Enhancer-Element arbeitet (Scheef *et al.*, 2001). Man kann davon ausgehen, dass in den hier angestrebten Expressionsstudien ähnliche Ergebnisse erzielt werden.

Ein Western Blot sollte die Frage klären, ob PERV-A/C bei der seriellen Passage auf 293 Zellen infektiöser geworden ist oder mengenmäßig mehr Viren repliziert werden. Durch das Auftragen von Zell-Lysaten, welche die gleiche Anzahl an lysierten Zellen beinhalteten, konnte festgestellt werden, dass mehr Virus produziert wird, also eine gesteigerte Replikation stattfindet. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass auch infektiöseres Virus produziert wird, welches mehr Env-Proteine enthält.

Implikation der Ergebnisse für die Xenotransplantation

Alle hier durchgeführten Infektionsstudien mit humanen Zellen (C8166 und 293 Zellen) sind nur bedingt auf die *in vivo*-Situation übertragbar. Während eine Adaptation an humane Nierenzellen nachgewiesen wurde, gibt es bisher noch keine Hinweise für eine Infektion bei ersten Xenotransplantrezipienten und bei Fleischern mit intensiven Blut-Blut- Kontakt mit Schweinen (Paradis *et al.*, 1999; Tacke *et al.*, 2000a; Tacke *et al.*, 2001). Auch erste Tiermodelle, sowohl mit Kleintieren (Specke *et al.*, 2001a) als auch mit nicht-humanen Primaten (Specke, eingereicht) zeigten, dass keine Infektion stattgefunden hat, obwohl bei mehreren Modellen Immunsuppressiva angewendet wurden. PERV konnte bislang nur auf NOD/SCID-Mäuse übertragen werden (Deng *et al.*, 2000; van der Laan *et al.*, 2000).

10 Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde am Robert-Koch-Institut, Berlin, in der Zeit vom 1. März 2001 bis 3. September 2001 unter der Leitung von Prof. R. Kurth und Dr. Denner angefertigt.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbständig unter Anleitung verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Berlin, 31.08.01

Katrin Voigt

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Infizierbarkeit von humanen lymphoiden Zellen mit PERV untersucht. Dabei konnte zum ersten Mal eine Infektion von T-Zellen gezeigt werden, die nicht nur durch eine Provirusintegration charakterisiert ist, sondern auch durch eine Virusproduktion. Ähnlich wie bei anderen humanen lymphoiden Zellen ist die Virusreplikation gering. In Ergänzung zu bereits durchgeführten Adaptationsversuchen mit einer PERV-A/C-Rekombinante und einer Mischpopulation aus PERV-A und PERV-B wurde hier die Adaptation der beiden Subtypen PERV-A und PERV-B an die humane Nierenzell-Linie 293 jeweils unabhängig voneinander untersucht. Bei dem PERV-A-Klon wurde mit jeder Passage eine Verlängerung der LTR festgestellt, sowie eine Erhöhung der RT-Aktivitäten und des Titers beobachtet. Dagegen wurde bei dem PERV-B-Klon keine Verlängerung der LTR beobachtet. Obwohl die RT-Aktivität nicht zunahm wurde dennoch eine Zunahme des Virustiters festgestellt.

Die Sequenzen der LTR der seriell passagierten PERV-A/C-Klone weisen Multimerisierungen auf, welche Transkriptionsfaktorbindestellen (z.B. NFY) enthalten. Um den Einfluss der Sequenzwiederholungen auf die Virusreplikation zu untersuchen, wurde die 5'-LTR verschiedener PERV-Klone unterschiedlicher Passagen kloniert und sequenziert, und für Expressionsstudien in einem dualem Luziferase-Expressionssystem vorbereitet.

Untersuchungen von mit PERV verwandten Retroviren zeigten, dass Multimerisierungen derartiger Sequenzen in der LTR nicht nur mit einer Steigerung der Virusreplikation, sondern auch mit einem erhöhtem Tumorrisiko assoziiert ist. Für eine entgeltliche Einschätzung des Infektionsrisikos durch PERV bei der Xenotransplantation müssen weitere Untersuchungen *in vitro*, aber insbesondere *in vivo* durchgeführt werden, um eine Gefährdung der Transplantatrecipienten durch Immundefizienzen und Tumore auszuschließen und eine Übertragung der Viren auf Dritte zu vermeiden.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIDS	Erworbenes Immunschwächesyndrom (acquired immune deficiency syndrome)
AKOS	Arbeitskreis Organspende
ALV	Aviäres Leukose-Virus
Amp.	Ampicillin
ATCC	American Type Culture Collection
BLV	Rinder-Leukämie-Virus
bp	Basenpaar (base pair)
BrdUTP	Brom-Deoxyuridintriphosphat
BSA	Rinderserum - Albumin (bovine serum albumin)
CD	cluster of differentiation
DAB	Diaminbenzidin
DAF	decay-accelerating factor
DMF	N, N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EM	Elektronenmikroskopie
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
env	Envelope
Env - Protein	Hüllenprotein(envelope protein)
FDA	Federal Drug Administration
FeLV	felines Leukämievirus
FKS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s)
gag	gruppenspezifische Antigene

Gal- α -1,3-gal	Galaktosyl- α -1,3-galaktosyl
HAP	human-adaptiertes PERV
HAR	hyperakute Abstossungsreaktion (hyperacute rejection)
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HTLV	humanes T-Zell Leukämievirus
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Ig	Immunglobulin
IPA	Immunperoxidase Assay
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kDa	Kilodalton
LTR	long terminal repeat
M	Mol
MA	Matrixprotein
mM	Millimol
MMTV	Mausmammatumovirus
mRNA	messenger- RNA
MuLV	murines Leukämievirus
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NC	Nukleokapsidprotein (nucleocapsid protein)
NIH	National Institutes of Health
NOD	non-obese diabetic
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
p15E	Transmembranes Hüllprotein der C-Typ Viren
PBS	Phosphat-gepufferte-Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
PERV	prozines endogenes Retrovirus

pol	Polymerase
PR	Protease
R	wiederholte (redundante) Region
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rp15E	Rekombinantes p15E
RT	Reverse Transkriptase/ Raumtemperatur
s	Sekunde
SA	Spleißakzeptor
SCID	severe combined immunodeficiency
SD	Spleißdonor
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SNP	Single Nukleotide Polymorphism
SIV	simianes Immundefizienzvirus
spf	specified-pathogen-free
SU	Oberflächenprotein (surface)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TCID	tissue culture infectious dose
TM	transmembranes Hüllenprotein
Tween 20	Polyoxyethylen – Sorbitan – Monolaurat
U	Einheit (unit)
U3 (5)	besondere (unique) Region am 3`Ende (5`Ende)
UV	Ultraviolett
V	Volt
X-Gal	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl B-D-Galactop

8. Plasmidkarten

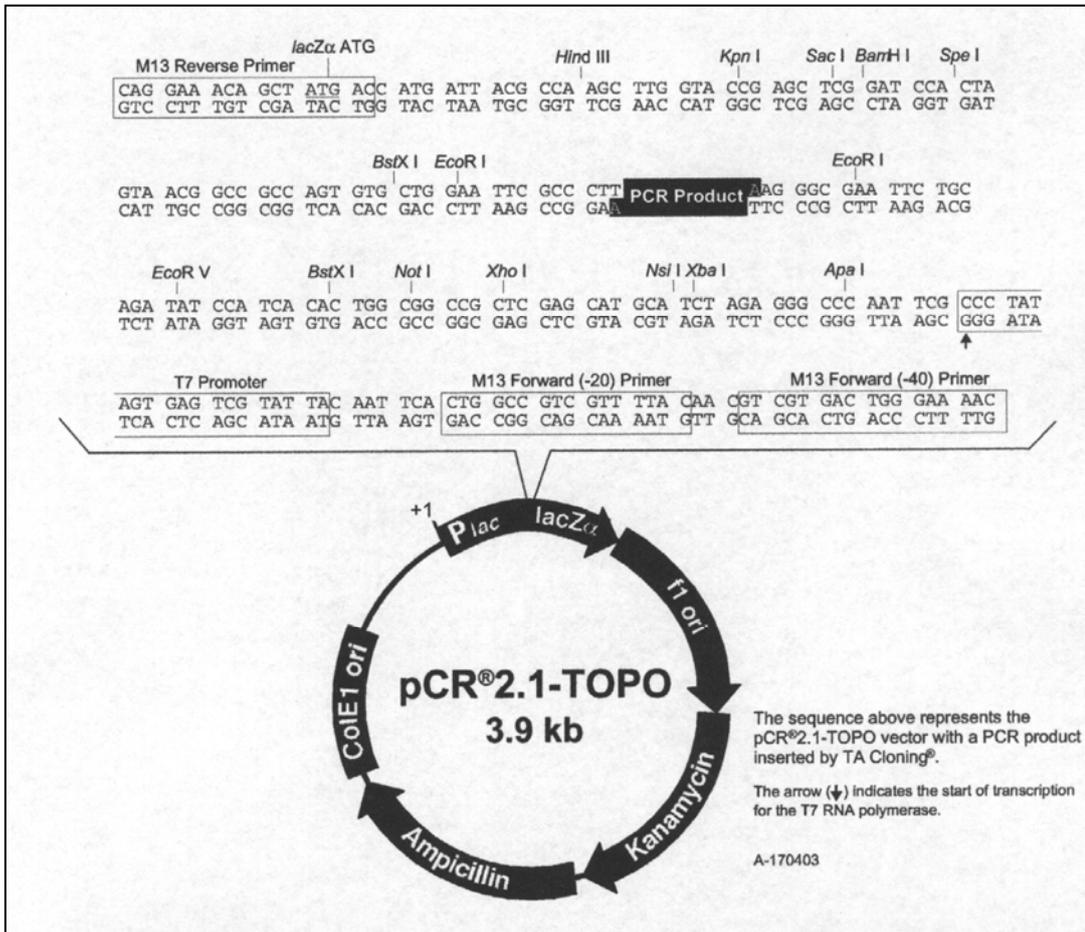


Abb. 9.1: pCR®2.1-TOPO.

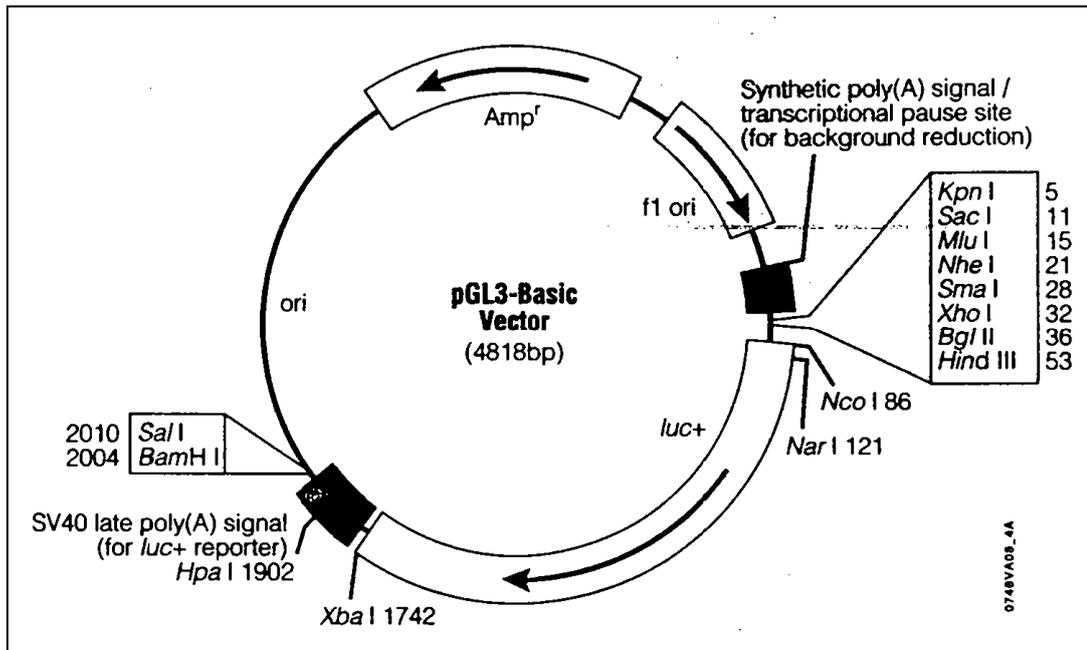


Abb. 9.2: pGI-Basic-Expressionsvektor.

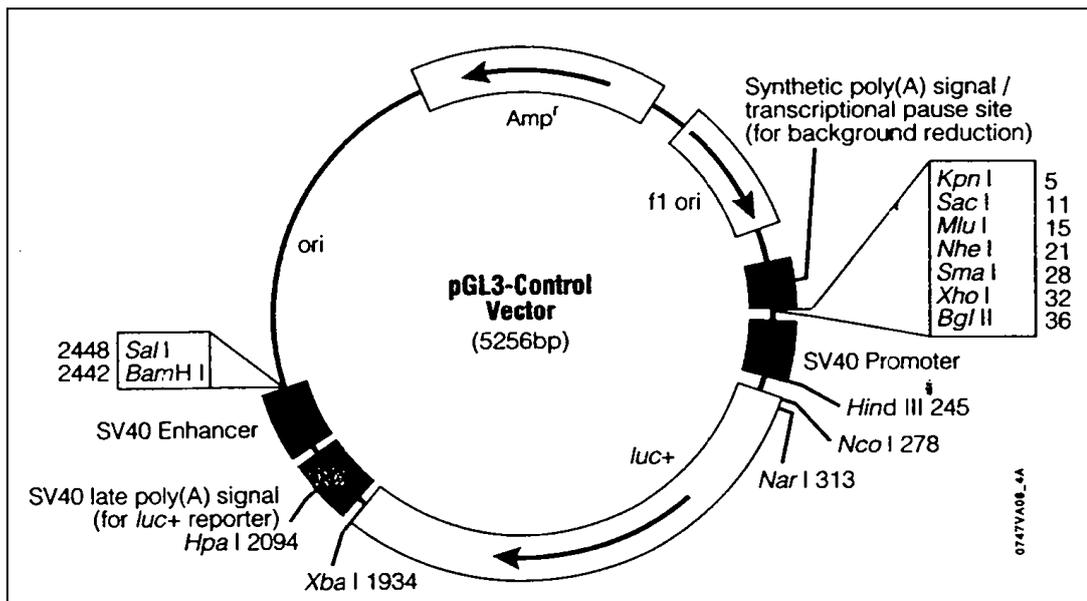


Abb. 9.3: pGI-3-control-Vektor

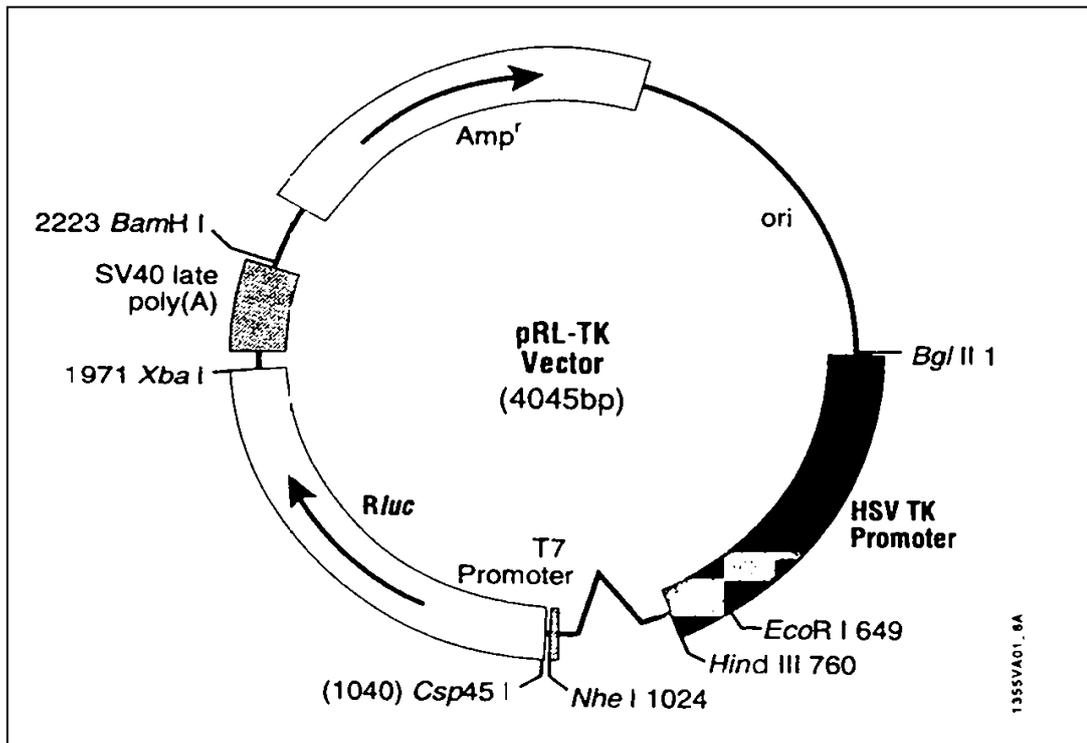


Abb. 9.4: pRL-TK –Vektor.

9 Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Ehemann für seine liebevolle Unterstützung während meines gesamten Studiums, insbesondere während der Diplomarbeit.

Herrn Prof. Dr. R. Kurth danke ich für die Möglichkeit, meine Diplomarbeit am Robert-Koch-Institut anfertigen zu können.

Ich danke vor allem Herr Prof. Dr. Micheel für die freundliche und fachübergreifende universitäre Betreuung und die interessanten Anregungen.

Vielen Dank an Herr Dr. J. Denner für die interessante Themenstellung dieser Arbeit, für seine Unterstützung bei allen anstehenden Problemen und die stete Bereitschaft zur Diskussion.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Volker Specke für seine Unterstützung bei dieser Arbeit durch Rat und Tat danken.

Ganz herzlich danke ich Ulla Thiesen für das nette Arbeitsklima. Danke dem Rest der Arbeitsgruppe.

Ich danke auch der Arbeitsgruppe von Dr. S. Norley für die Hilfsbereitschaft bei allen Fragen.

Ich danke meiner besten Freundin Grit Patzig.

Besonderen Dank gilt meinen Eltern und meiner Oma für ihre großartige Unterstützung.

7 Literaturverzeichnis

Adler, A., J., Scheller, A., Robins, D. M. (1993) The stringency and magnitude of androgen-specific gene activation are combinatorial functions of receptor binding site sequences. *Mol. Cell. Biol.* 13, 6326-6335.

Akiyoshi, D. E., Denaro, M., Zhu, H. *et al.* (1998) Identification of full-length cDNA for an endogenous of miniature swine. *J. Virol.* 72, 4503-4507.

Alexander, J. W. & Zola, J. C. (1996) Expanding the donor pool: use of marginal donors for solid organ transplantation. *Clinical Transplantation* 10, 1-19.

Allan, J. S. (1998) The risk of using baboons as transplantat donors Exogenous and endogenous viruses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 862, 87-99.

Allan, J. S., Broussard, S. R., Michaels, M. G. *et al.* (1998) Amplification of simian retroviral sequences from human recipients of baboon liver transplantats. *AIDS Research Human Retroviruses* 14, 821-824.

Anderson, J. B., Wood, H. G., Allaire, P. E., Bearnson, G., Khanwilkar, P. (2000) Computational flow study of the continous flow ventricular assist device prototype number 3 blood pump. *Artif. Organs* 24, 377-385.

Atrip, J. H., S., I., Minanov, O., P., Kwiatkowski, P. A. & Michler, R. E. (1997) Cardiac xenotransplantation. *Curr. Opin. Cardiol.* 12, 172-178.

Armstrong, J. A., Porterfield, J. S. & De Madrid, A. T. (1971) C-type virus particles in pig kidney cell lines. *J. Virol.* 10, 195-198.

Auchincloss, H., Jr. & Sachs, D. H. (1998) *Xenogeneic transplantation.* *Ann. Rev. Immunol.* 16, 433-470.

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

Bontrop, R. E., Kenter, M., Otting, N. & Jonker, M. (1993) Major histocompatibility complex class II polymorphism in humans and chimpanzees. *J. Med. Primatol.* 1, 50-56.

Boeke, J. D. & Stoye, J. P. (1997) Retrotransposons, Endogenous Retroviruses, and the Evolution of Retroelements. In: *Retroviruses.* Coffin, J. M. , Hughes; S. H. & Varmus, H. E. (Hrsg.) 343-435. Gold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Bouillant**, A. M. P., Greig, A. S., Lieber, M. M. & Todaro, G. J. (1975) The type C virus production by continuous line of pig oviduct cells (PFT). *J. Gen. Virol.* 27, 173-180.
- Breese**, S. S., Jr. (1970) Virus-like partikels occurring in culture of stable pig kidney cell lines. *Arch. Gesamte Virusforschung* 30, 401-404.
- Bradford**, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254.
- Byrne**, G. W., Mc Curry, K. R., Martin, M. J., Mc Clellan, S. M., Platt, J. L. & Logan, J. S. (1997) Transgenic pigs expressing human CD59 and decay-accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement-mediated damage. *Transplantation* 63, 149-155.
- Calne**, R. Y. (1966) Homo- and heterotransplantation. *Curr. Probl. Surg.*, 3-56.
- Chang**, D. W., Sanchez, L. A., Veith, F. J., Wain, R. A., Okhi, T., Suggs, W. D. (2000) Can a tissue-engineered skin graft improve healing of lower extremity foot wounds after revascularization? *Ann. Vasc. Surg.* 14, 44-49.
- Cianciolo**, G. J., Matthews, T. J., Bolognesi, D. P., Snyderman, R. (1980) Macrophage accumulation in mice is by low molecular weight products from murine leukemia viruses. *J. Immunol.* 124, 2900-2905.
- Clark**, J. M., (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucl. Acids Res.* 16, 9677-9686.
- Cruz**, J., Teixeira, J., Fiuza, C., Araujo, R. & Braga, A. (2000) Ethical challenges of xenotransplantations. *Transplant. Proc.* 32, 2687.
- Czuderna**, 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, 4028-4038.
- Darnell**, James (1996) Einige Transkriptionsaktivatoren werden durch fettlösliche Hormone kontrolliert. In: *Molekulare Zellbiologie* (2. Auflage) S. 478-482.

- Deng**, Y. M., Tuch, B. E. & Rawlinson, W. D. (2000) Transmission of porcine endogenous retroviruses in severe combined immunodeficient mice xenotransplanted with fetal porcine pancreatic cells. *Transplantation* 70, 1010-1016.
- Denner**, J., Wunderlich, V. & Bierwolf, D. (1980) Suppression of human lymphocyte mitogen response by disrupted primate retrovirus of type C (baboon endogenous virus) and type D (PMVF). *Acta. Biol. Med. Germ.* 39 (11-12), K 19-26.
- Denner**, J., Wunderlich, V. & Syndow, G. (1985) Suppression of human lymphocyte mitogen response by retrovirus of type D. I. Action of purified intact and disrupted virus. *Arch. Virol.* 86 (3-4), 177-186.
- Denner**, J. (1987) Immunsuppression by oncogenic retroviridae. In: Immune Modulation by infectious agents, Zschiesche, W.(Hrsg.) *Gustav Fischer Verlag*, S.140-201.
- Denner**, J. (1998) Immunsuppression by retrovirus: implications for xenotransplantation. *Ann. NY Acad. Sci.* 862,75-86.
- Denner**, J. (1999a) Immunsuppression durch Retroviren: Implikationen für die Xenotransplantation. *Transplantationsmedizin*, 11, 223-233.
- Denner**, J. (1999b) Biological characterization of porcine endogenous retroviruses and specific diagnostics. *IBC's 5th Annual International Conference on Xenotransplantation*, December, 6.-7. 1999, Boston.
- Denner**, J. (2000) Mikrobiologische Risiken der Xenotransplantation. In: Engels, Badura-Lotter, G., Schickanz, S. (Hrsg). *Neue Perspektiven der Transplantationsmedizin im interdisziplinären Dialog*, *Nomos Verlagsgesellschaft*, Baden-Baden 142-169.
- Denner**, J. (2001a) Xenotransplantation, Transspezies-Übertragung von Retroviren und AIDS. In: Arndt, D., Obe, G., Kleeberg, U. (Hrsg) *Biotechnologische Verfahren und Möglichkeiten in der Medizin*. Hrsg. *MMV-Medizin-Verlag*, München, 164-169.
- Denner**, J., Specke, V., Schwendemann, J., Tacke, S. J. (2001b) Porcine endogenous retroviruses (PERVs): Adaptation to human cells and attempts to infect small animals and non-human primates. *Ann. Transplantation*, im Druck.

- Dulbecco**, R., Freeman, G. (1959) Dulbecco's modification of MEM. *Virology* 8, 396.
- Eagle**, H. (1959) Minimum Essential Medium. *Science* 130, 432.
- Egger**, D., Bienz, K., (1994) Protein (western) blotting. *Mol. Biotechnol.* 1, 289-305.
- Enserink**, M. (1999) New virus fingered in Malaysian epidemic. *Science* 284, 407, 409-410.
- Enserink**, M. (2000) Emerging diseases. Malaysian researchers trace Nipah virus outbreak to bats. *Science* 289, 518-519.
- Erisson**, T., Oldmixon, B., Blomberg, J., Rosa, M., Patience, C., Anderson, G. (2001) Identification of novel porcine endogenous betaretrovirus sequences in miniature swine. *J. Virol.* 75, 2765-2770.
- Fan**, H. (1994) Retroviruses and their role in cancer. *In the Retroviruses*, Vol. 3, pp. 313-362. Edited by J. A. Levy: Plenum Press N.Y.
- Fauci**, A. S. (1988) The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanism of pathogenesis. *Science* 239, 617-622.
- Fishman**, J. A. (1997) Xenosis and xenotransplantation: addressing the infectious risk posed by an emerging technology. *Kidney Int. Suppl.* 58, 41-45.
- Franzier**, M. E. (1985) Evidence for retrovirus in miniature swine with radiation-induced leukemia or metaplasia. *Arch. Virol.* 83, 83-97.
- Gao**, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M. Michael, S. F., Cummins, L. B., Arthur, L. O., Peeters, M., Shaw, G. M., Sharp, P. M. & Hahn, B. H. (1999) Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan Troglodytes. *Nature* 397, 436-441.
- Gelderblom**, H. R. (1991) Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *Aids* 5, 617-637.
- Goodman**, M., Baily, W. J., Hayasaka, K., Stanhope, M. J., Slighton, J. & Czelusniak, J. (1994) Molecular evidence on primate phylogeny from DNA sequences. *Am. J. Phys. Antropol.* 1, 3-24.
- Hammer**, C. (1998) Physiological obstacles after xenotransplantation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 862, 19-27.

- Hannon**, J. P., Bossone, C. A. & Wade, C. E. (1990) Normal physiological Values for conscious pigs used in biomedical research. *Lab. Anim. Sci.* 40, 293-298.
- Harcourt**, A. H., Fossey, D., Stewart, K. J. & Watts, D. P. (1980) Reproduction in wild gorillas and some comparisons with chimpanzees. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 28, 59-70.
- Hardy**, J. D., Kurrus, F. E., Chavaz, C. M. & Al, E. (1964) Heart transplantation in man: Developmental studies and review of the case. *JAMA* 188, 1125-1132.
- Hardy**, W. D. (1993) Feline oncoretroviruses. In: *The Retroviruses*. 2, pp. 109-180. J. A. Levy: Plenum Press, N. Y.
- Heineine**, W., Tibell, A., Switzer, W. M., Sandstrom, P., Rosales, G. V., Mathews, A., Korsgren, O., Chapman, L. E., Folks, T. M. & Groth, C. G. (1998) No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts. *Lancet* 352, 695-699
- Holland**, C., A., Chattopadhyay, S. K., Koehne, C., O'Donnell, P. V. (1988) Influence of enhancer dequences on thymotropism and leukemogenicity of mink cell focus-forming viruses. *J. Virol.* 63, 1284-1292.
- Hughes**, J. (1998) Xenografting: ethical issues. *J. Med. Ethics* 24, 18-24.
- Ibelgaufts**, H. (1992) *Gentechnologie von A-Z*, Verlag Chemie, Weinheim, New York.
- Iwakata**, S., Grace, J. T. J. (1964) "RPMI-Medium". *N. Y. J. Med.* 64, 2279.
- Kaufman**, C. L., Gaines, B. A. & Ildstad, S. T. (1995) Xenotransplantation. *Ann. Rev. Immunol.* 13, 339-367.
- Laemmli**, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lanza**, R. P., Cooper, D. K. & Chick, W. L. (1997) Xenotransplantation. *Scientific American* 277, 54-59.
- Le Guenno**, B., Formentry, P., Wyers, *et al.* (1995) Isolation and partial charakterisation of a new strain of Ebola virus. *Lancet* 345, 1271-1274.
- Le Tissier**, P. I., Stoy, J. P., Takeuchi, Y., Patience, C. & Weiss, R. A. (1997) Two sets of humantropic pig retrovirus. *Nature* 389, 681-682.
- Lieber**, M. M., Sherr, C. J., Benveniste, R. E. & Todaro, G. J. (1975) Biologic and immunologic properties of porcine type C viruses. *J. Virol.* 66, 616-619.

- Lin**, S. S., Wieder, B. C., Diamond, L. E., Lawson, J. H., Hoopes, C. W., Daniels, L. J., Daggett, C. W., Parker, W., Harland, R. C., Davis, R. D., Bollinger, R. R., Logan, J. S. & Platt, J. L. (1998) The role of antibodies in a acute vascular rejection of pig-to-baboon cardiac transplantats. *J. Clin. Invest.* 101, 1746-1756.
- Lodish**, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (1999) *Molecular Cell Biology* W. H. Freeman.
- Löwer**, R., Löwer, J. & Kurth, R. (1996) The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 5177-5184.
- Mangeney**, M. & Heidman, T. (1998) Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immune rejection in vivo. *Proc. Natl, Acad. Sci. USA.* 95, 14920-14925.
- Marchuck**, D., Drum, M., Saulino, A., Collins F. S., (1991) Construction of T-vektors, a rapid and general system for direkt cloning of unmodified PCR products. *Nucl. Acids Res.* 19, 1154.
- Martin**, J., Herniou, E., Cook, J., O'Neill, R. W. & Tristem, M. (1999a) Interclass transmission and phylogenetic host tracking in murine leukemia virus-related retroviruses. *J. Virol.* 73, 2442-2449.
- Martin**, U., Kiesig, V., Blusch, J. H. *et al.* (1998a) Expression of pig endogenous retrovirus by primary porcine endothelial cells and infection of human cells. *Lancet* 352, 692-694
- Martin**, U., Steinhoff, G., Kiessing, V., Chikobava, M., Morschheuser, T., Lapin, B., Haverich, A. (1998b) Porcine endogenous retrovirus (PERV) was not transmitted from porcine endothelial cells to baboons in vivo. *Transpl. Int.* 11, 247-251.
- Mathes**, E. L., Olson, R. G., Hebebrand, L. C., Hoover, E. A., Schaller, J. P., Adams, P. W., & Nichols, W. S. (1979) Immunosuppressive properties of a virion polypeptide, a 15.000-dalton protein, from feline leukemia virus. *Cancer Res.* 39, 950-955.
- Meng**, X. J., Purcell, R. H., Halbur, P. G. *et al.* (1997) A novel virus in swine is closely related to human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 9860-9865.

- Meriggi**, F., Forni, E., Bismuth, H. (1994) What future for clinical xenograft of the liver? *Giorn. Chirog.* 15, 183-189.
- Michaels**, M. G., Jenkins, F.J., George, K. S. *et al.* (2001) Detection of Infectious Baboon Cytomegalovirus after Baboon-to-human Liver Xenotransplantation. *J. Virol.* 75, 2825-2828.
- Modrow** und Falke (1998) Retroviren. In: Molekulare Virologie. S. 290-331.
- Moore**, G. E., Sandberg, A. A. & Ulrich, K. (1966). RPMI-Medium. *J. Natl. Cancer Inst.* 36, 405.
- Moorison**, H. L., Soni, B., Lenz, J. (1994) Long terminal repeat enhancer core sequences in provirus adjacent to c-myc in t-cell lymphomas by a murine retrovirus. *J. Virol.* 69, 446-455.
- Moscovici**, C., Moscovici, M. G., Jiminez, H., Lai, M. M. C., Hayman, M. J. Vogt, P. K. (1977) Continuous tissue culture lines derived from chemically induced tumors of Japanese quail. *Cell* 11, 95-103.
- O`h Uigin**, C., Sato, A & Klein, J (1997) Evidence for convergent evolution of A and B blood group antigens in primates. *Hum. Genet.*, 2, 141-148
- Onions**, D., Cooper, D. K., Alexander, T. J. *et al.* (2000) An approach to the control of disease transmission in pig-to-human xenotransplantation. *Xenotransplantation* 7, 143-155.
- Osman**, N., Mc Kenzie, I. F., Osterried, K., Loannou, Y. A., Desnick, R. J. & Sandrin, M. S. (1997) Combined transgenic expression of alphasialosidase and alpha-1,2-fucosyltransferase leads to optimal reduction in the major xenoepitope Gal-alpha(1,3)Gal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 14677-14682.
- Pahwa**, S., Pahwa, R., Saxinger, C., Gallo, R. C. & Good, R. A. (1985) Influence of the human T-lymphotropic virus lymphadenopathy associated virus on functions of human lymphocytes: evidence for immunosuppressive effects and polyclonal B-cell activation by banded viral preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 8198-202.
- Paradis**, K., Langford, G., Long, Z., Heneine, W., Sandstrom, P., Switzer, W. M., Chapman, L. E., Lockey, C., Oniones, D., The XEN 111 Study Group, Otto, E. (1999) Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. *Science* 285, 1236-41.

- Paskalis**, H., Felber, B. K., Pavlakis, G. N. (1986) Cis-acting sequences responsible for the transcriptional activation of the human T-cell leukemia virus type I constitute a conditional enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 6558-6562.
- Patience**, C., Takeuchi, Y. & Weiss, R.A. (1997) Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pig. *Nat. Med.* 3, 282-6.
- Patience**, C., Patton, G. S., Takeuchi, Y., Weiss, R. A., Mc Clure, M. O., Rydberg, L. & Breimer, M. E. (1998) No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys. *Lancet* 352, 699-701.
- Patience**, C., Switzer, W. M., Takeuchi, Y., Griffith, D. J., Goward, M. E., Heneine, W., Stoye J. P., Weiss, R. A. (2001) Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species. *J. Virol.* 75, 2771-2775.
- Qinn**, G. and Langford, G. (2001) The porcine endogenous retrovirus long terminal repeat a single nucleotide polymorphism that confers distinct differences in estrogen receptor binding affinity between PERV A and PERV B/C subtypes. *J. Virol.* 286, 83-90.
- Reemtsma**, K., Mc Cracken, B. H., Schlegel, J. U. & Al., e. (1964). Renal heterotransplantation in man. *Ann. Surg.*, 160, 384-410.
- Sandrin**, M. S., Vaughan, H. A., Dabkowski, P. L. & Mc Kenzie, I. F. C. (1993) Anti-pig IgM Antibodies in Human Serum React Predominantly with Gal-alpha-1,3-Gal Epitopes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 90, 2919.
- Scheef**, G., Fischer, N., Krach, U., Tönjes, R.R. (2001) The number of a U3 Repeat Box Acting as an Enhancer in Long Terminal Repeats of Polytopic Replication-Competent Porcine Endogenous Retroviruses Dynamically Fluctuates during Serial Virus Passages in Human Cells. *J. Virol.* 75, 6933-6940.
- Schmoeckel**, M., Nollert, G., Shahmohammadi, M., Müller-Hocker, C. & Reichert, B. (1997) Transgenic human decay accelerating factor makes normal pigs function as a concordant species. *J. Heart lung Transplant.* 16, 758-764.
- Schwendemann**, J. (2000) Porzine endogene Retroviren (PERVs): Wirtsspektrum und biologische Eigenschaften, Diplomarbeit, Universität Heidelberg.

- Shimotohno**, K., Golde, D. W., Miwa, M., Sigimura, S., Chen, I. S. Y. (1984) Nukleotide sequences analysis of the long terminal repeat of human T-cell leukemia virus type II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 1079-1083.
- Smith**, C. M. (1997). Patient selection, evaluation, and preoperative management for lung transplant candidates. *Clinics in Chest Medicine* 18, 183-197.
- SoRelle**, R. (2000). First US implantation of DeBakey ventricular assist device. *Circulation* 101, 9056-7.
- Specke**, V., Tacke, S. J., Boller K., Schwendemann, J., Denner, J. (2001a) Porcine endogenous retrovirus (PERVs): In vitro host range and attempts to establish small animal models. *J. Gen. Virol.* 82, 837-844.
- Specke**, V., Rubant, S., Denner, J. (2001b) Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Virology* 285, 177-180.
- Starzl**, T.E., Fung, J., Tzakis, A., Todo, S., Dementris, A. J., Marino, I. R., Doyle, H., Zeevi, A., Warty, V., Michaels, M. & *et al.* (1993). Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet*, 341, 65-71
- Stephan**, O., Tacke, S., Bodusch, K., Berg, A., Denner, J. (2001) Sensitive and specific detection methods for porcine endogenous retroviruses applicable to experimental and clinical xenotransplantation. *Xenotransplantation* 8, 125-135.
- Stoye**, J. P. and Coffin, J. M. (1995) The danger of xenotransplantation. *Nature Med.* 1, 1100.
- Swindle**, M. M. (1998) Defining appropriate health status and management programs for specific-pathogen-free swine for xenotransplantation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 30, 111-120.
- Tacke**, S., Kurth, R., Denner, J. (2000a) Porcine endogenous retrovirus inhibits human immune cells: Risk for xenotransplantation. *Virology* 268, 87-93
- Tacke**, S. J., Specke, V., Stephan, O., Seibold, E., Bodusch, K., Denner, J. (2000b) Porcine endogenous retroviruses: Diagnostic assays and evidence for immunosuppressive properties. *Transplant. Proc.* 32, 1166

- Tacke**, S., Bodusch, K., Berg, A., Denner, J. (2001) Sensitive and specific detection methods for porcine endogenous retroviruses applicable to experimental and clinical xenotransplantation. *Xenotransplantation* 8, 125-135
- Takeuchi**, Y., Patience, C., Magre, S., *et al.* (1998) Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus. *J. Virol.* 72, 9986-9991
- Tanczos**, E., Horch, R. E., Bannasch, H., Andree, C., Walgenbach, K. J., Voigt, M., G. B. (1999). Keratinocyte transplantation and tissue engineering. New approaches in treatment of chronic wounds. *Zentralbl. Chir.*, 124 Suppl. 1, 81-6.
- Tapitz**, R. A., Coffin, J. M. (1997) Selection of an avian retrovirus mutant with extended receptor usage. *J. Virol.* 71, 7814-7819.
- Thomson**, A. W. (1992). The spectrum of action of new immunosuppressive drugs. *Clin. Exp. Immunol.* 2, 170-173.
- Todaro**, G. J., Benveniste, R. E., Lieber, M. M. & Sherr, C. J. (1974) Characterisation of a type C-virus released from the porcine cell line PK(15). *Virology* 58, 65-74.
- Truss**, M., Barsch, J., Mows, C., Chaves, S., and Beato, M. (1996) Chromatin structure of the MMTV promotor and its changes during hormonal induction. *Cell. Mol. Neurobiol.* 16, 85-101.
- Van der Breven**, C., Rands, E., Chattopadhyay, S. K., Lowy, D. R. and Verma, I. M. (1982) Long terminal repeat of murine retroviral DNAs: sequence analysis, host-proviral junctions, and preintegration site. *J. Virol.* 41, 542-556.
- Van der Laan**, L. J., Lockey, C., Griffeth, B. C. *et al.* (2000) Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* 407, 90-94.
- Vanhove**, B., Renard, J. P. & Soullillou, J. P. (1998). Genetic engineering in the pig. Gene knockout and alternative techniques. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 826, 28-36
- Vogt**, V. M. (1997) Retroviral Virions and Genomes. In: *Retroviruses*. Coffin, J. M., Hughes, S.H. & Varmus, H.E. (Hrsg.) 27-69. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.*

Webster, R. G. (1997). Influenza virus: transmission between species and to emergence of the next human pandemic. *Arch. Virol.* 13 (Suppl.), 105-11.

Wilson, C. A., Wong, S., Muller, J. et al. (1998) Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *J. Virol.* 72, 3082-3087.

Wilson, C. A., Wong, S., VanBrocklin, M. & Federspiel, M. J. (2000) Extended analysis of the in vitro tropism of porcine endogenous retrovirus. *J. Virol.* 74, 49-56.

Wolgamot, G. and Miller, A. D. (1999) Replication of *Mus dunni* depends on promoter activation followed by enhancer multimerisation. *J. Virol.* 73, 9803-9809.