

**Molekularbiologische Untersuchungen zur Interaktion der
antiretroviral wirkenden porzinen und humanen A3-
Proteine mit porzinen endogenen Retroviren (PERV) und
Charakterisierung des porzinen A3-Genlokus**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von
Diplom-Biologin
Eva Amarant Dörrschuck

Saarbrücken
2011

Tag des Kolloquiums: 12.05.2011

Dekan: Prof. Dr. Wilhelm F. Maier

Berichterstatter: Prof. Dr. Manfred J. Schmitt

Prof. Dr. Ralf R. Tönjes

Prof. Dr. Andreas Meyerhans

Vorsitz: Prof. Dr. Volkhard Helms

Akad. Mitarbeiter: Dr. Gert-Wieland Kohring

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Saarbrücken, den 07.01.2011

.....

Eva Dörrschuck

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Doktorarbeit mit dem Titel

„Molekularbiologische Untersuchungen zur Interaktion der antiretroviral wirkenden porzinen und humanen A3-Proteine mit porzinen endogenen Retroviren (PERV) und Charakterisierung des porzinen A3-Genlokus“

selbständig angefertigt und mich anderen Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Saarbrücken, den 07.01.2011

.....

Eva Dörrschuck

„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig:
Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft,
etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat,
wieder wegzuwerfen.“

Albert Einstein

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Xenotransplantation.....	1
1.1.1	Geschichte der Xenotransplantation	3
1.1.2	Immunologische Barrieren bei der Xenotransplantation	4
1.1.3	Infektiologische Barrieren bei der Xenotransplantation	7
1.2	Retroviren.....	9
1.2.1	Aufbau der retroviralen Partikel	10
1.2.2	Struktur des retroviralen Genoms	11
1.2.3	Replikationszyklus der Retroviren	12
1.2.4	Endogene Retroviren	13
1.2.5	Porzine endogene Retroviren (PERV)	14
1.3	APOBEC3 als Inhibitoren retroviraler Infektionen	16
1.3.1	Intrinsische Immunität	16
1.3.2	Restriktionsfaktoren	17
1.3.3	APOBEC3	18
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit.....	24
2	MATERIAL UND METHODEN.....	25
2.1	Verwendete Materialien und Zellen.....	25
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	25
2.1.2	Enzyme, Inhibitoren und Antibiotika	25
2.1.3	Antikörper	26
2.1.4	Bakterienstämme und Kulturmedien	27
2.1.5	Zelllinien und Kulturmedien	28
2.1.6	Plasmide	29
2.1.7	Oligonukleotide	33
2.2	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	37
2.2.1	Experimentelle Arbeiten mit Bakterien	37
2.2.1.1	Herstellung chemisch kompetenter Escherichia coli.....	37
2.2.1.2	Transformation von Escherichia coli	37
2.2.1.3	Kulturbedingungen von Escherichia coli	38
2.2.1.4	Herstellung kryokonservierter Dauerkulturen	38
2.2.2	Isolierung von Nukleinsäuren	38
2.2.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	38
2.2.2.2	Isolierung hochmolekularer, genomischer DNA.....	39
2.2.2.3	Isolierung genomischer DNA mit Hilfe von Kits.....	40
2.2.2.4	Isolierung von RNA.....	41
2.2.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	42
2.2.4	Agarosegelelektrophorese von DNA	42
2.2.5	Agarosegelelektrophorese von RNA	43
2.2.6	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	44
2.2.7	Sequenzierung von Nukleinsäuren	44
2.2.8	Restriktion von Plasmid-DNA	44
2.2.9	Ligation	45
2.2.10	Auffüllen kohäsiver Enden von DNA	45
2.2.11	Dephosphorylierung von DNA	45
2.2.12	Herstellung von cDNA	45
2.2.13	Polymerasekettenreaktion (PCR)	46

2.2.14	Rapid Amplification of cDNA ends (RACE)	47
2.2.15	Radioaktive Markierung	48
2.2.15.1	Radioaktive Markierung des λ -HindIII-Markers	48
2.2.15.2	Radioaktive Markierung einer DNA-Sonde	48
2.2.16	Southern Blot	49
2.2.17	Radioaktive Hybridisierung der Membran mit der DNA-Sonde	50
2.2.18	Isolation eines porcinen BAC-Klones	50
2.2.19	Radiation hybrid (RH)-mapping	51
2.3	Zellkultur und virologische Methode	52
2.3.1	Kultivierung von Zelllinien	52
2.3.2	Auftauen und Einfrieren von Zellen	53
2.3.3	Präparation von PBMCs	53
2.3.4	Bestimmung der Zellzahl	54
2.3.5	Transfektion adhärenter Zelllinien	54
2.3.6	Abnahme viraler Überstände	56
2.3.7	Aktivitätsbestimmung der reversen Transkriptase (RT)	56
2.3.8	Replikationsstudien von PERV auf stabil transfizierten HEK-293T	56
2.3.9	Transduktion adhärenter Zelllinien	57
2.3.10	Fluorescence activated cell sorting (FACS)	57
2.3.11	Untersuchung der Deaminierungsrate der A3-Proteine	58
2.3.12	Ultrazentrifugation zur Aufkonzentrierung retroviraler Partikel	59
2.4	Proteinbiochemische Methoden	60
2.4.1	Herstellung von Zelllysaten	60
2.4.2	Bradford-Assay	61
2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	61
2.4.4	Western Blot Analyse	62
2.4.5	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	64
2.5	Statistische Auswertungen	66
2.5.1	Chi-Quadrat-Test und Adjustierung nach Bonferroni-Holm	66
2.5.2	Statistische Auswertung von Trinukleotidpräferenzen	66
2.5.3	Phylogenetische Untersuchungen	67
2.6	Datenbankeinträge	70
3	ERGEBNISSE	71
3.1	Herstellung der PERV- und MLV-Expressionsplasmide	71
3.1.1	Herstellung von pPERV/EGFP	71
3.1.2	Herstellung von pMLV/EGFP	75
3.2	Konstruktion der porcinen A3-Expressionsplasmide	76
3.2.1	Identifikation porciner A3-Transkripte	76
3.2.2	Umklonierung der poA3-ORFs in pcDNA3.1Zeo(+)	87
3.2.3	Test der poA3-Konstrukte auf Proteinexpression	88
3.3	Charakterisierung des porcinen A3-Genlokus	89
3.3.1	Identifizierung der Gensequenz	89
3.3.2	Reorganisation des poA3-Genlokus und Identifizierung der UTRs	97
3.3.3	Bestimmung der Anzahl der A3-Genkopien im Schweinegenom	114
3.3.4	Bestimmung der chromosomalen Lokalisation des porcinen A3-Genlokus	117

3.4	Interaktion der humanen und porzinen A3-Proteine mit PERV	121
3.4.1	Verpackung der A3-Proteine in PERV-Virionen	122
3.4.2	Antiretrovirale Aktivität der A3-Proteine gegen PERV	123
3.4.2.1	Versuchsoptimierung	124
3.4.2.2	Untersuchung der A3-Proteine auf ihre antiretrovirale Aktivität gegen PERV	127
3.4.3	Deaminierung der proviralen PERV-Sequenzen durch die A3-Proteine	133
3.4.4	Gerichtete Deaminierung aufgrund einer Trinukleotidpräferenz der A3-Proteine	135
4	DISKUSSION	139
4.1	Identifikation des porzinen A3-Genlokus und der poA3-mRNAs	140
4.2	Die porzinen A3-Transkripte und deren Expression.....	142
4.3	Verpackung der porzinen und humanen A3-Proteine in PERV-Partikel.....	145
4.4	Antiretrovirale Aktivität der porzinen und humanen A3-Proteine gegen PERV	148
4.5	Deaminase-abhängige Funktion und Nukleotidpräferenz der A3-Proteine.....	150
4.6	Intrinsische Immunität, PERV und XTx	153
5	APPENDIX	157
5.1	Korrektur der kodierenden Sequenzen für poA3Z2-Z3 und poA3Z2-Z3 SVA.....	157
5.2	Evolution des porzinen A3-Genlokus.....	159
5.3	Phylogenetische Begriffe und deren Definition	164
5.4	Taxonomie der phylogenetisch untersuchten Tiere	166
5.5	Plasmidkarten	167
5.5.1	Plasmidkarte von pM91MS	167
5.5.2	Plasmidkarte von pMLV/EGFP	167
5.5.3	Plasmidkarte von pGTe[PERV-B(33)ATG]ΔchromE	168
5.5.4	Plasmidkarte von pPERV/EGFP	168
5.5.5	Plasmidkarte von pcDNA3.1Zeo(+)	169
5.5.6	Plasmidkarte von pcDNA3.1Zeo(+)_APOBEC3_HA	169
5.5.7	Plasmidkarte von pGEM®-T Easy	170
5.5.8	Plasmidkarte von pLEGFP-N1	171
5.5.9	Plasmidkarte von pMD.G2	171
5.5.10	Plasmidkarte von pcDNA3.1D/V5-His-TOPO	172
5.5.11	Plasmidkarte von pcDNA3.1D-AID-V5-His-TOPO	172
5.5.12	Plasmidkarte von pcDNA3.1(+)	173
5.5.13	Plasmidkarte von pc-Mu-APOBEC3G-HA	174
6	LITERATURVERZEICHNIS	175
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	197
8	ZUSAMMENFASSUNG (DEUTSCH).....	203

9	ZUSAMMENFASSUNG (ENGLISCH)	204
10	ÜBERSICHT ZU DEN DURCHGEFÜHRTEN ARBEITEN.....	205
11	DANKSAGUNG	207
12	LEBENS LAUF	210
13	PUBLIKATIONEN	212

1 Einleitung

1.1 Xenotransplantation

Betrachtet man die Fallzahlen der deutschen Warteliste für Nierentransplantationen in den vergangenen Jahren (Abb. 1), so ist eine klare Diskrepanz zwischen benötigten und zur Verfügung stehenden Organen und – damit einhergehend – durchgeführten Transplantationen erkennbar. Derzeit warten alleine in Deutschland über 8.000 Dialysepatienten auf eine neue Niere, wobei diese Zahl etwa dreimal höher liegt als die Anzahl der pro Jahr übertragbaren Organe. Gerade einmal 2.753 Dialysepatienten erhielten im Jahr 2008 ein lebensrettendes Organ, wobei die durchschnittliche Wartezeit bei fünf bis sechs Jahren liegt, ein Zeitraum, in dem viele Patienten versterben (www.dso.de).

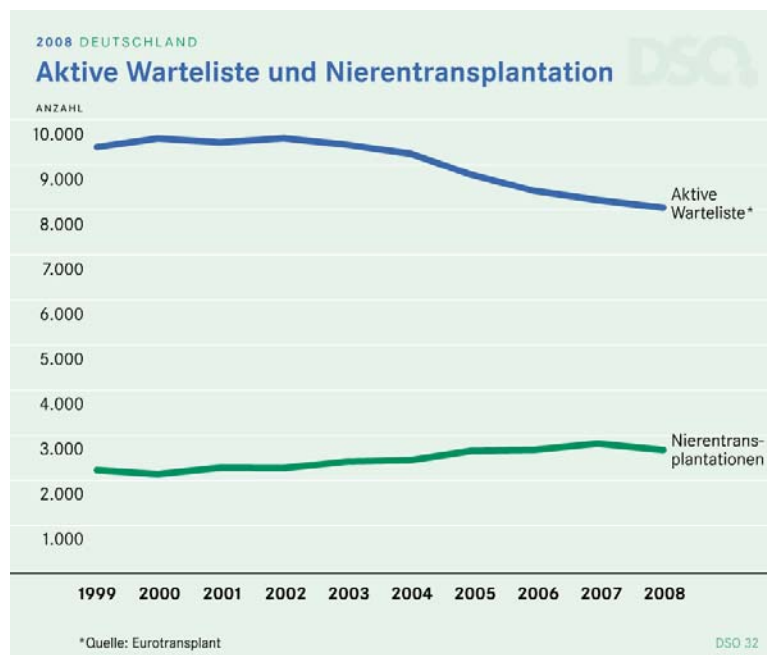


Abb. 1 Aktive Warteliste und durchgeführte Nierentransplantationen in Deutschland im Zeitraum von 1998-2008 (Quelle: www.dso.de).

Diese Problematik ist ebenfalls bei der Transplantation anderer Organe gegeben, wie Abb. 2 zeigt. Hier sind der tatsächliche Bedarf und die im Vergleich dazu durchgeführten Transplantationen für das Jahr 2004 aufgezeigt.

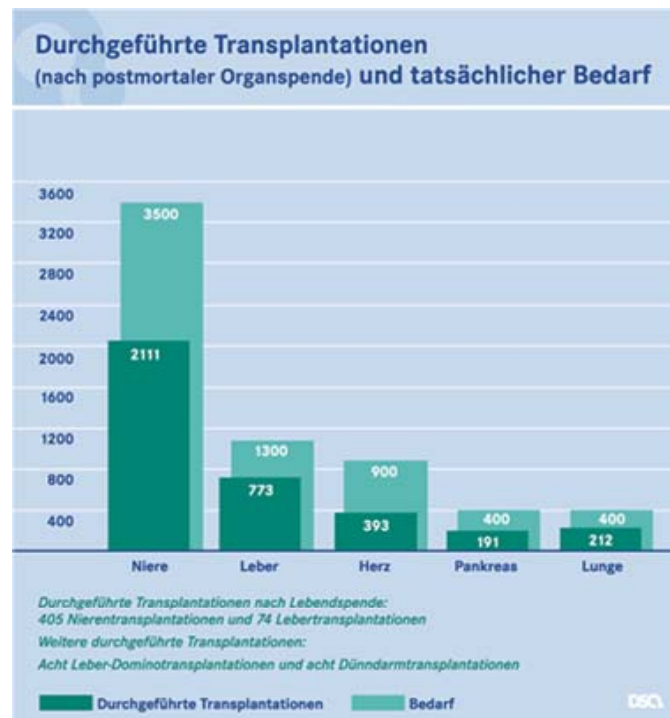


Abb. 2 Durchgeführte Transplantationen und tatsächlicher Bedarf an verschiedenen Organen in Deutschland im Jahr 2004 (www.dso.de).

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit an Spenderorganen für die Allotransplantation, bei der Spender und Empfänger derselben Spezies angehören, gibt es mehrere Ansätze, um die Lücke zwischen Bedarf und für die Transplantation zur Verfügung stehenden Organen zu schließen. Zum einen wird versucht, durch die Verwendung künstlicher Organe (z.B. Herz, Lunge, Niere) eine Alternative zur Allotransplantation zu schaffen. Allerdings dient dieses Verfahren lediglich der Zeitgewinnung, bis ein geeignetes, humanes Organ verfügbar ist. Eine weitere, viel versprechende Möglichkeit stellt die Xenotransplantation (XTx) dar. Dabei handelt es sich um die Übertragung lebender Zellen, Gewebe oder Organe zwischen verschiedenen Spezies, im konkreten Fall von einem nicht-humanen Spender auf den Menschen. Auch bei diesem Ansatz wird versucht, zumindest eine zeitliche Überbrückung zu gewährleisten, bis ein geeignetes, humanes Organ für die Verpflanzung vorliegt, wobei diese Art der Transplantation unter optimierten Voraussetzungen auch als permanenter Organersatz fungieren könnte (Buhler et al., 2002a; Buhler et al., 2002b; Fuchimoto et al., 2001; Sachs, 2000; Sykes and Sachs, 1988).

1.1.1 Geschichte der Xenotransplantation

Bis Anfang der 1960er Jahre stellten die Transplantation tierischer Organe und Gewebe auf den Menschen eher punktuelle Unternehmungen gemäß dem Prinzip „Versuch und Irrtum“ dar, als dass man von systematischen, wissenschaftlichen Studien sprechen könnte. 1963/64 wurden in den USA zwei unabhängige Studien durchgeführt, bei denen erstmals erfolgreich artfremde Organe auf den Menschen transplantiert wurden. Thomas Starzl (Denver, USA) übertrug Paviannieren auf sechs Patienten, wobei die Patienten 19-98 Tage überlebten (Starzl et al., 1964). Erfolgreicher verlief die Xenotransplantationstudie in New Orleans (USA), bei der Schimpansennieren auf sechs Patienten übertragen wurden. Zwar stellte sich bei den meisten Fällen innerhalb von zwei Monaten ein Organversagen ein, doch eine Patientin überlebte neun Monate lang ohne Anzeichen einer Abstoßung, verstarb allerdings an den Folgen der Immunsuppression (REEMTSMA et al., 1964). Ein weiteres, wichtiges Ereignis folgte im Jahr 1984, bei dem einem neugeborenen Mädchen („Baby Fae“) mit schweren, angeborenen Herzfehlern ein Pavianherz transplantiert wurde, wobei der Säugling 20 Tage lang mit dem Xenograft überleben konnte (Bailey et al., 1985).

Wie diese Beispiele zeigen, kamen bis zu diesem Zeitpunkt in erster Linie Primatenorgane für die XTx in Betracht, was vom evolutionsbiologischen Aspekt sowie aus immunologischen Gesichtspunkten nachvollziehbar ist. Allerdings ist es nicht möglich, diese Spezies in ausreichender Zahl und unter den notwendigen pathogenfreien Bedingungen zu züchten, wobei auch die Zucht an sich zu kostenintensiv wäre. Hinzu kommen ethische Bedenken und Sorgen bezüglich des Infektionsrisikos, denn aufgrund der engen Verwandtschaft zwischen Affe und Mensch könnte es im Zuge der XTx zu einer Übertragung von Erregern und somit zu der Ausbildung einer Zoonose kommen. Darunter versteht man allgemein eine von Tieren auf den Menschen übertragbare Infektionskrankheit, wobei die HIV-1-Infektion des Menschen ein sehr markantes Beispiel für eine Zoonose darstellt (Gao et al., 1999). 1999 erfolgte eine Stellungnahme durch die amerikanische Gesundheitsbehörde FDA, welche sich öffentlich gegen die Verwendung von Primaten als Spenderspezies aussprach (FDA, 1999).

Als Alternative könnten aufgrund der ähnlichen Physiologie und Anatomie Schweineorgane für die XT_x eingesetzt werden, was eine unbegrenzte Quelle an Spenderorganen darstellen würde. Allerdings gibt es auch hier Hindernisse zu überwinden. Einerseits kommt es zu verschiedenen Abstoßungsreaktionen nach der XT_x, zum anderen besteht auch hier die Gefahr, dass – kombiniert mit einer Immunsuppression des Rezipienten – tierische Pathogene auf den Menschen übertragen werden könnten (Bach et al., 1998; Chapman et al., 1995; Fishman, 1997; Fishman, 1998; Michaels et al., 1994; Michaels et al., 2001), wobei beide Problemfelder in den kommenden Kapiteln näher erörtert werden. Mittlerweile wird die Schwein-auf-Mensch-Xenotransplantation nicht nur als permanenter Organersatz oder zur Überbrückung angesehen, bis ein geeignetes, humanes Organ zur Verfügung steht. Vielmehr gibt es auf diesem Gebiet verschiedene Ansätze, um humane Erkrankungen zu behandeln. Besonders erfolgversprechend sind in Alginatkapseln inkorporierte, porzine Inselzellen, welche zur Therapie von Diabetes mellitus verwendet werden sollen (Elliott et al., 2007; Groth et al., 1994; Groth et al., 1998; Meyer et al., 2008; Tibell et al., 1994).

1.1.2 Immunologische Barrieren bei der Xenotransplantation

Bei allen Transplantationen kann es zu einer Abstoßung des Spenderorgans kommen. Auch bei der XT_x stellt diese immunologische Barriere eine zu überwindende Hürde dar. Als problematisch ist vor allem die hyperakute Abstoßungsreaktion (*hyperacute rejection*, HAR) anzusehen, welche innerhalb von Minuten bis wenige Stunden nach Implantation des Xenotransplantates zur Zerstörung des Fremdorgans führt (Bach et al., 1991; Bach et al., 1994). Als Ursache dieser raschen Abstoßungsreaktion sind natürliche, im Menschen vorkommende, xenoreaktive Antikörper (*xenoreactive natural antibodies*, XNA) anzusehen, welche mit den Endothelzellen (*endothelial cells*, ECs) der Blutgefäße des Donororgans interagieren. Diese anti-Gal-Antikörper (IgG) reagieren mit auf porzinen Endothelzellen vorhandenen α -1,3-Gal-Epitopen (Galili et al., 1985), was zur einer Aktivierung der ECs führt, einhergehend mit Thrombenbildung und inflammatorischen Prozessen (Bach et al., 1995). Des Weiteren wird die humane Komplementkaskade über den klassischen Weg aktiviert (Platt et al., 1991), was wiederum zu einer Aktivierung der Komponente C3 und zur Synthese des sogenannten *membrane attack complex* (MAC) führt, was letztlich in einer Zelllyse resultiert (Abb. 3). Neben

der HAR existieren drei weitere immunologische Barrieren, die es zu überwinden gilt: die akut humorale Xenotransplantat-Abstoßung (*acute humoral xenograft rejection*, AHXR), die zelluläre Abstoßung (*cellular xenograft rejection*, CXR) sowie die chronische Abstoßung (Klymiuk et al., 2010; White, 1996; Yang and Sykes, 2007). Dabei richtet sich die Einteilung der Abstoßungsreaktionen primär nach klinischen Gesichtspunkten, wobei der zeitliche Verlauf entscheidend ist, während immunologische Ursachen der jeweiligen Abstoßungsreaktion nicht berücksichtigt werden (Solez et al., 1993; Williams et al., 1973). Die AHXR setzt innerhalb weniger Tage nach XT_x ein und beruht ebenfalls auf xenoreaktiven Antikörpern, wobei auch der Pathomechanismus ähnlich demjenigen der HAR ist. Weiterhin sind bei diesem Prozess ebenso Zellen des Immunsystems wie Granulozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen (NK) beteiligt (Bach et al., 1995). Im gleichen Zeitraum bis einige Wochen nach der XT_x kann die CXR beobachtet werden, welche auf der Aktivierung diverser Immunzellen wie beispielsweise T-Lymphozyten und der Bildung neuer Antikörper beruht, die gegen das Xenotransplantat gerichtet sind. Die chronische Abstoßung wiederum, welcher ein komplexer immunologischer Prozess zugrunde liegt, setzt häufig erst Monate bis Jahre nach der Transplantation ein und ist durch einen langsamen, jedoch progressiven Verlauf gekennzeichnet (Bach et al., 1995).

Um porcine Organe dennoch für die XT_x nutzen zu können, besteht ein essentieller Schritt darin, die Abstoßungsreaktionen und damit den Verlust des Xenografts zu überwinden, wobei die Überwindung der HAR Priorität hat. Die wahrscheinlich erfolgreichste Strategie, Schweineorgane für den Einsatz beim Menschen verfügbar zu machen, stellt die Züchtung transgener Schweine dar, wobei in den letzten Jahren mehrere Ansätze verfolgt wurden. Zum einen liegt die Konzentration auf der Züchtung von Schweinen, welche heterozygot oder homozygot defizient für das Enzym α -1,3-Galactosyltransferase (GT) sind, was erstmals 2002 gelang (Cooper et al., 1993; Dai et al., 2002; Dor et al., 2004; Kolber-Simonds et al., 2004; Lai et al., 2002; Phelps et al., 2003). Die Organe dieser transgenen Tiere verfügen entweder nur über eine geringe α -1,3-Gal-Expression auf der Zelloberfläche (GT-low) oder über keinerlei Expression (GT-KO) der xenoreaktiven α -1,3-Gal-Epitope, wodurch der HAR und auch der AHXR entgegen gewirkt werden könnte. Diese Vermutung bestätigte sich in einer präklinischen Studie, im Zuge derer Herzen dieser transgenen

Schweine heterotop in Paviane transplantiert wurden. Es zeigte sich, dass die GT-low-Herzen aufgrund einer HAR innerhalb von 20 Minuten abgestoßen wurden, während die Überlebensrate derjenigen Affen, welche die GT-KO-Herzen bekamen, bei bis zu sechs Monaten (179 Tage) lag (Kuwaki et al., 2005).

Es gibt weitere Faktoren, welche in das Zentrum des Interesses gerückt sind, wenn es um die Züchtung transgener Schweine geht. So sind Proteine der Blutgerinnungskaskade (z.B. Thrombomodulin) ebenso adäquate Kandidaten wie Faktoren, welche an immunologischen Prozessen (z.B. CTLA4-Ig) beteiligt sind. Von großer Bedeutung sind auch humane Regulatoren der Komplementkaskade, wodurch die Formierung der MACs unterbunden werden (Abb. 3) und diese somit ebenfalls bei der Überwindung der HAR eine essentielle Rolle spielen könnten. Im Blickpunkt bei der Züchtung transgener Schweine stehen hierbei die humanen Faktoren CD59 (Protectin), CD46 (*membrane cofactor protein*, MCP) sowie CD55 (*decay accelerating factor*, DAF), welche an verschiedenen Stellen der Komplementkaskade einen inhibierenden Einfluss ausüben (d'Apice and Cowan, 2009; Klymiuk et al., 2010).

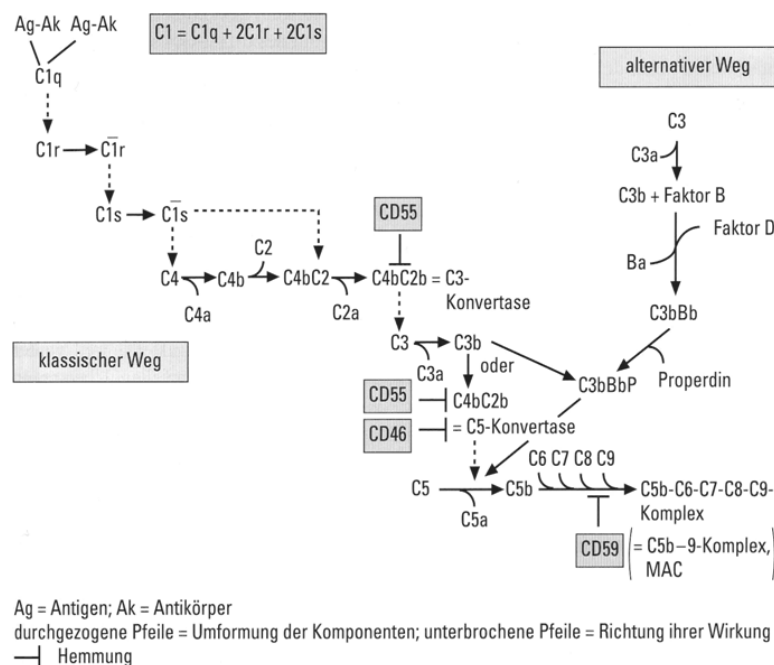


Abb. 3 Aktivierung und Regulation der Komplementkaskade (Quelle:(Grimm, 2003a)).

So wurden beispielsweise für humanes CD55 (hDAF) transgene Schweineorgane erfolgreich in einer präklinischen Studie getestet. Dabei wurden Primaten Schweineorgane heterotop oder orthotop übertragen und die Überlebensrate untersucht. Die Studie ergab, dass die durchschnittliche Überlebenszeit der Primaten, welche die transgenen Xenografts erhielten, bei 40 Tagen lag, während die Kontrolltiere bereits nach wenigen Minuten eine Zerstörung der Fremdherzen aufgrund einer HAR aufwiesen (Cozzi and White, 1995; Langford et al., 1994; Schmoeckel et al., 1996; Yannoutsos et al., 1995). Nochmals verbesserte Überlebensraten von bis zu 90 Tagen konnten wenige Jahre später – ebenfalls bei der XTx DAF transgener Schweineherzen auf Primaten – erzielt werden (Chen et al., 1999; Cozzi et al., 2000). 2005 transplantierten McGregor und Mitarbeiter Schweineherzen, welche transgen für den humanen Komplementregulator CD46 (MCP) waren, heterotop in immunsupprimierte Paviane und erreichten eine maximale Überlebensrate von 137 Tagen (McGregor et al., 2005).

Aufgrund dieser viel versprechenden Resultate entwickelte sich die Überlegung, mehrfach transgene Schweine als Organlieferanten für die XTx zu züchten, um durch diese genetischen Modifikationen Abstoßungsreaktionen weiter zu reduzieren und somit eine weitere Verbesserung der Transplantat-Überlebensraten zu erhalten (Byrne et al., 1997; Chen et al., 1999; Cowan et al., 2000; Menoret et al., 2004; Takahagi et al., 2005).

1.1.3 Infektiologische Barrieren bei der Xenotransplantation

Da einem Patienten bei einer Transplantation Immunsuppressiva verabreicht werden, um eine Abstoßung des Spenderorgans zu verhindern, besteht grundsätzlich das Risiko einer Infektion. Im Zuge der XTx besteht zudem die Gefahr hinsichtlich einer Infektion mit einem artfremden Erreger, so dass es im schlimmsten Fall zur Ausbildung einer Zoonose kommen kann (Fishman, 1997; Michaels et al., 1994; Stoye and Coffin, 1995). Es gibt zahlreiche Erreger des Schweins, die auf den Menschen übertragen werden könnten. Durch sterile und pathogenfreie (SPF) Züchtung der Spendertiere lassen sich eine Vielzahl potentieller, exogener Erreger wie Bakterien und Viren ausmerzen. Problematisch bleiben rezidiv im Schwein verbleibende Pathogene wie beispielsweise die porcinen endogenen Retroviren (*porcine endogenous retroviruses*, PERV), auf die in Kapitel 1.2.5 nochmals eingegangen wird.

Bei PERV handelt es sich um im Schweinegenom integrierte Proviren, welche in jeder Rasse zu finden sind (Dieckhoff et al., 2009). Da auch die Keimzellen über integrierte PERV-Proviren verfügen, ist es nicht möglich, diese Pathogene durch Züchtung aus den Schweinen zu entfernen. Aufgrund dessen ist eine intensive Risikoabschätzung im Vorfeld einer praktischen Anwendung der XT_x notwendig. Zwar sind beim Schwein nach bisherigen Erkenntnissen keine Erkrankungen mit PERV assoziiert; allerdings lässt sich nicht ausschließen, dass das Virus – möglicherweise nach Adaptation an den Menschen oder Rekombination mit einem humanen Virus – ein Krankheitsbild induzieren und sich innerhalb der menschlichen Spezies verbreiten kann. Das Risiko einer Zoonose ist insofern gegeben, seit gezeigt werden konnte, dass endogene Retroviren, welche von porzinen Zelllinien produziert wurden, humane Zelllinien *in vitro* infizieren können (Akiyoshi et al., 1998; Le Tissier et al., 1997; Patience et al., 1997; Wilson et al., 1998); andere *in vitro*-Studien postulierten, dass die porzinen Viren in menschlichen Blutlymphozyten (PBMCs) keine produktive Vermehrung aufweisen (Takeuchi et al., 1998).

Bei der Kultivierung menschlicher PERV-infizierter Zellen konnte festgestellt werden, dass sich die Viren mit zunehmender Dauer schneller vermehren als zu Beginn der Infektion. Somit scheinen PERVs in der Lage zu sein, sich an menschliche Zellen anzupassen, wobei bei diesem Prozess die *long terminal repeats* (LTRs) der Proviren höchstwahrscheinlich eine entscheidende Rolle spielen, zumindest konnten hier Mutationen und Adaptationen festgestellt werden (Scheef et al., 2001). Allerdings konnte bis zu diesem Zeitpunkt keine *in vivo*-Infektion nachgewiesen werden, weder bei präklinischen Studien mit nicht-menschlichen Primaten (Elliott et al., 2000; Garkavenko et al., 2004; Martin et al., 2000a; Martin et al., 2002; Simon et al., 2003; Switzer et al., 2001; Winkler et al., 2005) noch bei Patienten, die bereits porcine Transplantate erhalten haben (Garkavenko et al., 2004; Goto et al., 2004; Heinene et al., 2001; Irgang et al., 2003; Paradis et al., 1999; Sauer et al., 2003; Tacke et al., 2001). Trotzdem kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass eine PERV-Infektion des Menschen im Zuge einer XT_x nicht doch möglich ist. Gerade bei der Verwendung vaskularisierter Organe und Gewebe transgener Schweine (siehe oben) – kombiniert mit einer starken Immunsuppression – könnten freigesetzte Retroviren vom Immunsystem des Empfängers aufgrund der „genetischen Tarnung“ im Zuge der veränderten Proteinexpression auf der Oberfläche porciner Zellen nicht als fremd erkannt werden. Dadurch könnten sich die

Viren aufgrund der gegebenen Parameter ungehindert im Rezipienten ausbreiten. Da die freigesetzten Viruspartikel grundsätzlich in der Lage sind, menschliche Zellen zu infizieren, besteht die Gefahr einer Neuintegration in menschliche Zellen mit unvorhersehbaren Folgen. Es gibt nur wenige Daten zum Integrationsverhalten von PERV, doch diese deuten darauf hin, dass die Proviren bevorzugt in der Nähe von Transkriptionsstartpunkten integrieren (Moalic et al., 2006), was zu Fehlregulationen im natürlichen Expressionsmuster einer Zelle und beispielsweise zur Aktivierung von Protoonkogenen führen könnte. Daher bedarf dieser Punkt einer intensiven Risikoabschätzung, da die Folgen einer im Bereich des Möglichen liegenden Infektion bisher nicht abgeschätzt werden können.

1.2 Retroviren

Die Familie der Retroviren (*Retroviridae*), deren Nachweis erstmals Anfang des letzten Jahrhunderts durch Ellermann und Bang (Ellermann and Bang, 1908) und kurze Zeit später durch Peyton Rous gelang (Rous, 1911), lässt sich in sieben Genera unterteilen, wobei die Einteilung nach Grundsätzen des „*International Committee on Taxonomy of Viruses*“ (ICTV) (<http://www.ictvonline.org/index.asp>) erfolgt. Bei den einzelnen Genera handelt es sich um die „einfachen“ α -, β -, γ -Retroviren sowie die „komplexen“ δ - und ε -Retroviren, Lentiviren und Spumaviren. Die Klassifikation erfolgt dabei nicht nur anhand genetischer und morphologischer Unterschiede, sondern auch anhand von Besonderheiten während des Replikationszyklus sowie der verursachten Erkrankungsformen. Des Weiteren lassen sich die Vertreter dieser Familie, die vorwiegend bei Vertebraten zu finden sind, in exogene und endogene Retroviren unterteilen (Kapitel 1.2.4). Erstere beinhalten in ihrem Genom alle Informationen, die für einen vollständigen Ablauf des Replikationszyklus inklusive der Freisetzung infektiöser Nachkommenviren nötig sind (Modrow et al., 2003).

1.2.1 Aufbau der retrovirealen Partikel

Morphologisch betrachtet handelt es sich bei Retroviren um RNA-Viren mit einem Durchmesser von 80-100 nm. Die infektiösen Partikel sind von einer Lipiddoppelschicht umhüllt (Abb. 4), welche sich von der Cytoplasmamembran der infizierten Zelle ableiten lässt und neben zellulären Proteinen auch virale Glykoproteine (*envelope*, Env) beinhaltet. Letztere bestehen aus einem externen (*surface unit*, SU) und einem transmembranen (TM) Protein, welche nach Freisetzung des Viruspartikels zur rezeptorvermittelten Neuinfektion dienen. Im Inneren der mit Matrixproteinen (MA) ausgekleideten Hüllmembran liegt das Kapsid (*capsid*, CA), bei dem es sich um eine Multiproteinstruktur mit einer – je nach Virusgenus – konischen oder sphärisch-ikosaedrischen Form handelt. Darin eingeschlossen befindet sich neben den retrovirealen Replikationsenzymen Protease (PR), Integrase (IN) und Reverse Transkriptase (RT) das virale Genom. Dieses setzt sich aus zwei einzelsträngigen Plusstrang-RNA-Kopien mit einer Länge von je 7-12 kb pro RNA zusammen, die mit Nukleokapsidproteinen (*nucleocapsid*, NC) komplexiert vorliegen (Coffin et al., 1997; Modrow et al., 2003).

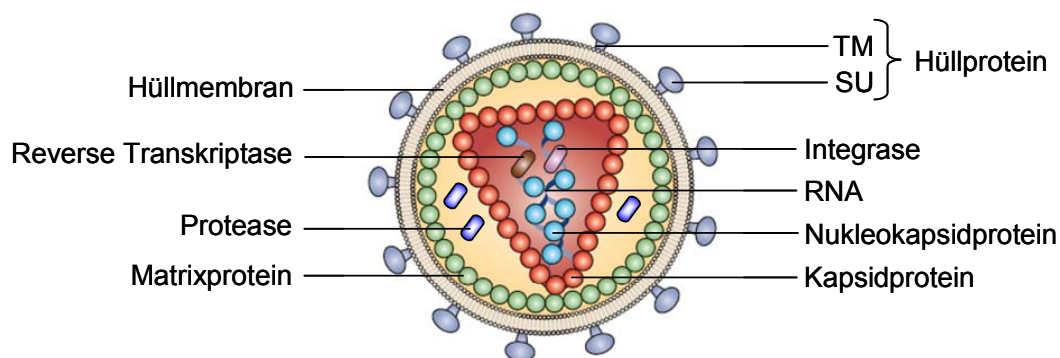


Abb. 4 Schematische Darstellung zum Aufbau eines retroviralen Partikels (modifiziert nach (D'Souza and Summers, 2005)).

1.2.2 Struktur des retroviralen Genoms

Vergleichbar mit eukaryotischer RNA trägt auch das einzelsträngige RNA-Genom der Retroviren am 5'-Ende eine Cap-Struktur und am 3'-Ende ein Polyadenylierungssignal. Der Großteil des retroviralen Genoms besteht aus dem Gen *env* (*envelope*) sowie dem überlappenden Leserahmen *gag/pol* (Abb. 5). Alle strukturellen Proteine (MA, CA, NC) werden durch *gag* (*group specific antigen*) kodiert, während das *pol* (*polymerase*)-Gen die Information für die Bildung der viralen Enzyme (IN, PR, RT) besitzt. Das *env*-Gen wiederum kodiert für die viralen Hüllproteine. Bei allen Retroviren wird das Genom von zwei repetitiven Kontrollsequenzen flankiert, welche über den Promotor, die Transkriptionstermination sowie das Polyadenylierungssignal verfügen und eine wichtige Rolle bei der reversen Transkription spielen. Im Provirus handelt es sich bei diesen Bereichen um zwei identische *long terminal repeats* (LTRs), die für die Integration der proviralen Sequenz in das DNA-Genom der Wirtszelle essentiell sind. Das Verpackungssignal ψ , welches sich zwischen der 5'LTR und *gag* befindet, ist für die Inkorporation des retroviralen RNA-Genoms in die sich bildenden Viruspartikel verantwortlich. Diese Genomstruktur ist allen sieben Genera der Familie gemein, wobei zwischen einfachen und komplexen Retroviren unterschieden werden muss. Während einfache Retroviren, wie beispielsweise PERV und das murine Leukämievirus (MLV), welche zum Genus der gamma-Retroviren (γ -Retroviren) gehören, für keine zusätzlichen Proteine kodieren, besitzen komplexe Retroviren wie HIV-1, ein Mitglied der Lentiviren, Leserahmen für akzessorische Proteine wie beispielsweise Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr und Vpu (Freed and Martin, 2007; Modrow et al., 2003).

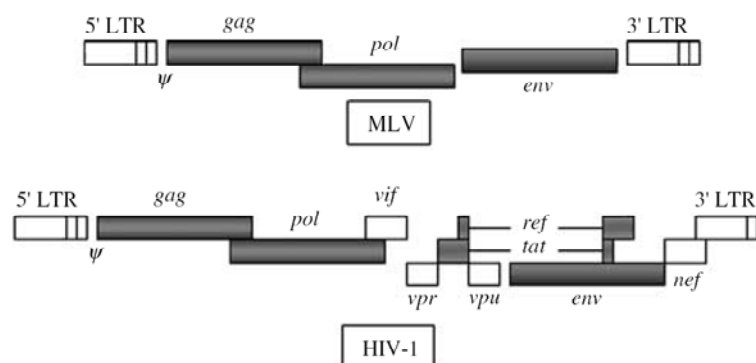


Abb. 5 Schematische Darstellung zum Aufbau des Genoms von MLV (oben) und HIV-1 (unten). HIV-1 als komplexes Retrovirus besitzt im Vergleich zu einfachen Retroviren wie MLV zusätzliche Leserahmen für akzessorische Proteine (Quelle: (Breckpot et al., 2007)).

1.2.3 Replikationszyklus der Retroviren

Mit Hilfe des externen Glykoproteins Env (Kapitel 1.2.1) heften sich die infektiösen Viruspartikel an entsprechende Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzelle (Abb. 6), woraufhin die Viren endozytiert werden (Miyachi et al., 2009). Innerhalb der Endosomen kommt es durch Konformationsänderungen innerhalb des Glykoproteinkomplexes zu einer Fusion der viralen Hüllmembran mit der Cytoplasmamembran, was in der Freisetzung des Kapsids in das Zellinnere resultiert. Dabei scheint die Fusion Dynamin-abhängig zu sein (Miyachi et al., 2009). Im Cytoplasma der infizierten Zelle erfolgt die reverse Transkription des viralen RNA-Genoms durch die RT in doppelsträngige DNA (Provirus), wobei die provirale Sequenz mit Proteinkomponenten gebunden bleibt (Präintegrationskomplex). Bei Lentiviren wie HIV-1 kann dabei der Komplex aktiv durch die Kernporen in den Zellkern transportiert werden, während alle anderen Retroviren erst im Zuge der Zellteilung und der damit verbundenen Auflösung der Kernmembran die provirale Sequenz in das Genom der Wirtszelle integrieren können. Dieser Schritt erfolgt durch die virale Integrase. Nach Integration kann die Virus-DNA durch die zelluläre DNA-Polymerase II transkribiert werden. Die dadurch entstehende RNA dient einerseits als Matrize für die Translation der viralen Proteine, andererseits kann sie als Genom in die reifenden Viruspartikel inkorporiert werden. Die viralen Bestandteile lagern sich an der Cytoplasmamembran der infizierten Zelle an, wo die Virionen durch Knospung freigesetzt werden. Nachfolgende Prozesse in den Virionen führen zur Reifung der viralen Partikel, wodurch die Nachkommenviren ihre Infektiosität erhalten (Coffin et al., 1997; Modrow et al., 2003).

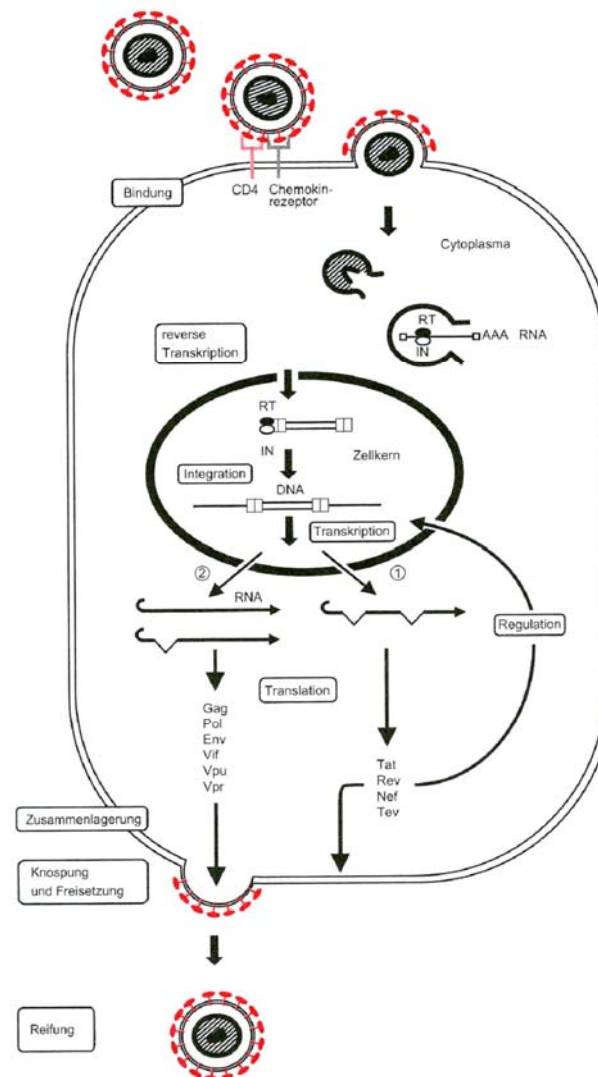


Abb. 6 Schematische Darstellung des retroviralen Replikationszyklus (Quelle: Modrow et al., 2003).

1.2.4 Endogene Retroviren

Als endogene Retroviren (ERVs) werden retrovirale Sequenzen bezeichnet, welche als Proviren stabil im Genom aller Zellen eines Organismus integriert zu finden sind. Die ERVs tragen die genetische Information von Retroviren und werden aufgrund einer Infektion der Keimbahn vertikal von Generation zu Generation nach den Mendelschen Regeln vererbt (Coffin et al., 1997; Herniou et al., 1998). Die meisten ERVs weisen Mutationen innerhalb ihrer Nukleinsäuresequenzen auf, weshalb diese Proviren – mit wenigen Ausnahmen, zu denen auch porzine endogene Retroviren (PERV) gehören – nicht mehr in der Lage sind, einen vollständigen Replikationszyklus zu durchlaufen (Wilkinson et al., 1994). Dadurch sind sie für den Wirtsorganismus nicht pathogen und können sogar vom infektiologischen Aspekt betrachtet Vorteile bieten. So konnte gezeigt werden, dass eine Expression des Env-

Proteins aufgrund einer kompetitiven Hemmung zu einem Infektionsschutz gegen exogene Retroviren führen kann, falls der gleiche Rezeptortropismus vorliegt (Coffin et al., 1997; Limjoco et al., 1993). Andererseits stellen ERVs jedoch auch eine Gefahr für die Integrität des Genoms dar, da sie beispielsweise durch die Aktivität der LTRs oder durch Rekombinationsereignisse zu einer Aktivierung von Protoonkogenen beitragen können (Coffin et al., 1997; Fan, 1990; Fischer and Cavazzana-Calvo, 2005).

1.2.5 Porzine endogene Retroviren (PERV)

Diese γ -Retroviren wurden erstmals Anfang der 1970er Jahre nachgewiesen (Armstrong et al., 1971; Breese, 1970) und als PERV bezeichnet (Todaro et al., 1973). PERV rückten im Zuge einer Risikoabschätzung für die XTx ins Zentrum des Interesses und weiterer Untersuchungen, als 1997 gezeigt werden konnte, dass sie in der Lage sind, *in vitro* menschliche Zellen zu infizieren (Le Tissier et al., 1997; Martin et al., 1998; Patience et al., 1997; Wilson et al., 1998). Im Zuge einer XTx könnten die PERV-Proviren durch mitogene Stimuli (Akiyoshi et al., 1998; Martin et al., 1998; Wilson et al., 1998) oder einen anderen, bisher unbekannten Mechanismus aktiviert werden, wodurch die Gefahr einer PERV-Transmission *in vivo* stark erhöht wäre. Dieses verstärkte Risiko ist realistisch, denn für MLV konnte bereits gezeigt werden, dass das Virus durch eine Lymphozyten-Mischkultur *in vitro* aktiviert werden kann (Hirsch et al., 1972; Levy et al., 1977).

Es existieren – neben PERV-D, von dem lediglich 257 Nukleotide des *env*-Bereiches bekannt sind (Patience et al., 2001) – mindestens drei weitere Klassen infektiöser PERV: PERV-A, PERV-B sowie PERV-C, welche sich in ihren *env*-Genen unterscheiden (Le Tissier et al., 1997; Takeuchi et al., 1998), während die *gag*- und *pol*-Gene eine große Homologie untereinander aufweisen. Da die *env*-Gene für die Produktion der Hüllproteine verantwortlich sind, verfügen die drei Virus-Subtypen über eine jeweils spezifische Rezeptorerkennung und somit über einen verschiedenartigen Wirtstropismus (Le Tissier et al., 1997; Patience et al., 1997; Takeuchi et al., 1998; Tönjes, 1999; Wilson et al., 2000). Aufgrund dessen sind PERV-A und PERV-B als polytrop anzusehen, da sie auch in der Lage sind, menschliche Zellen zu infizieren (Le Tissier et al., 1997), während PERV-C ecotrop ist, da sich Infektionen auf Schweinezellen beschränken (Akiyoshi et al., 1998; Wilson et al., 1998). Bislang konnten zumindest für PERV-A zwei sequenzverwandte

humane Rezeptoren (HuPAR-1 und HuPAR-2) identifiziert werden, bei denen es sich um mehrfach membranspannende Proteine handelt, deren biologische Funktion jedoch bisher noch nicht vollständig geklärt werden konnte (Ericsson et al., 2003). Die beiden Proteine gehören zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren, und nach neueren Erkenntnissen ist PAR-2 (Synonym: RFT1, Gene ID: 55065) am Riboflavin-Transport beteiligt (Yonezawa et al., 2008).

Vom evolutionären Standpunkt aus betrachtet sind PERV-A und -B vor etwa 7,5 Millionen Jahren ins Schweinegenom integriert, wobei der Ursprung höchstwahrscheinlich in Afrika liegt (Niebert and Tönjes, 2005; Tönjes and Niebert, 2003). PERV-C lässt sich auf einen späteren Zeitpunkt zurückdatieren. Diese Klasse entstand sehr wahrscheinlich vor 1,5 Millionen Jahren im Zuge einer Rekombination von PERV-A mit einem unbekannten Vorfahren (Niebert and Tönjes, 2005). Im Gegensatz dazu konnten in Pekaris, welche die nächsten Verwandten der Schweine darstellen, keine PERV-Sequenzen detektiert werden. Eine plausible Erklärung basiert darauf, dass die Trennung der *Suidae* und der *Tayassuidae* bereits vor 15-50 Millionen Jahren – also vor der erstmaligen PERV-Infektion – im Eozän erfolgte (Niebert and Tönjes, 2005) (Kapitel 5.2).

Innerhalb des Schweingenoms gibt es 30-50 Integrationsorte proviraler PERV-Sequenzen, wobei die meisten Proviren defekt sind (Akiyoshi et al., 1998; Czauderna et al., 2000; Le Tissier et al., 1997; Patience et al., 1997; Tönjes, 1999). Mit Hilfe einer Durchmusterung von Genombibliotheken auf Basis von künstlichen, bakteriellen Chromosomen (*bacterial artificial chromosome*, BAC) konnten jedoch verschiedene PERV-Volllängensequenzen mit offenen Leserahmen für *gag*, *pro/pol* und *env* identifiziert werden (Niebert et al., 2002). Für PERV-A konnten bisher drei (Krach et al., 2001; Niebert et al., 2002; Tönjes et al., 2000), für PERV-B zwei (Czauderna et al., 2000; Krach et al., 2001) und für PERV-C zumindest eine funktionale Volllängenkopie unter Verwendung einer genomischen Phagenbibliothek der porzinen Nierenzelllinie MAX-T gefunden werden (Preuss et al., 2006), welche im Zuge ihrer Identifikation molekular charakterisiert wurden.

Für diese Doktorarbeit wurde der Moleklarklon PERV-B(33) verwendet, welcher eine Länge von 8.918 bp besitzt und dessen provirale Organisation in Abb. 7 detailliert wiedergegeben ist (Czauderna et al., 2000). PERV-B(33) wies eine Punktmutation (G zu A) im *env*-Startcodon auf, wodurch es zu einem Aminosäureaustausch von Methionin zu Isoleucin kam und dies zu einem Verlust der

Replikationskompetenz des Provirus führte. Die Mutation wurde jedoch mit Hilfe einer molekularen Klonierung behoben und somit das Startcodon wieder hergestellt (PERV-B(33)/ATG) (Czauderna et al., 2000).

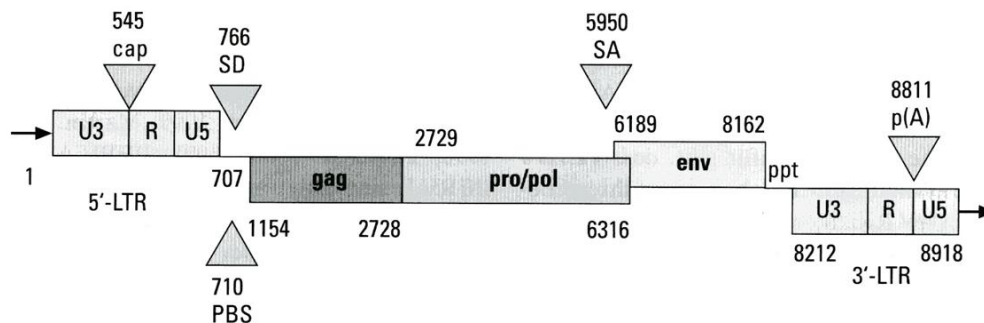


Abb. 7 Provirale Organisation des Molekularklons PERV-B(33) mit den für Retroviren typischen Genen *gag*, *pro/pol* und *env* und den flankierenden LTRs. Die Zahlen entsprechen der Nukleotidposition (ausgehend von Base 1 der 5'-LTR) und geben Anfang sowie Ende der jeweiligen Struktur an (cap: Startpunkt der Transkription, SD: Spleißdonor-Stelle, SA: Spleißakzeptor-Stelle, p(A): Polyadenylierungsstelle, PBS: Primer-Bindungsstelle) (Quelle: (Grimm, 2003b)).

1.3 APOBEC3 als Inhibitoren retroviraler Infektionen

1.3.1 Intrinsische Immunität

Ein Organismus bzw. höheres Lebewesen ist dem Angriff von Pathogenen nicht schutzlos ausgeliefert. Vertebraten besitzen neben dem angeborenen (unspezifischen) Immunsystem die adaptive (erworbene) Immunabwehr. Dabei handelt es sich um sehr effektive Wege, um beispielsweise gegen virale Infektionen vorzugehen. Beide Abwehrsysteme besitzen jedoch den entscheidenden Nachteil, dass sie lediglich auf eine bereits erfolgte Infektion reagieren können, da die Aktivierung der immunologischen Prozesse durch die Erkennung der replizierenden Viren erfolgt. Kürzlich wurde ein dritter Zweig des Immunsystems entdeckt: die intrinsische Immunität (Bieniasz, 2004). Dabei handelt es sich um einen zellbasierten, antiviralen Verteidigungsmechanismus, bei dem zelluläre Proteine, welche normalerweise konstitutiv exprimiert werden, spezifisch gegen Retroviren gerichtet sind. Es wird darüber spekuliert, wie sich die intrinsische Immunität ausgebildet hat. Ein mögliches Szenario wäre evolutionsbiologisch betrachtet, dass Retroviren aufgrund ihrer erfolgreichen Anpassung an Eukaryoten einen so starken Selektionsdruck ausübten (z. B. durch eine effiziente Replikation, Integration in die DNA der Wirtszelle, Abtöten und maligne Transformation der genetischen Expression der Wirtszelle), dass die Wirtsspezies im Zuge dessen antivirale Mechanismen

entwickelt hat, um der Replikation der Viren entgegen zu wirken. Dabei setzt sich die intrinsische Immunität aus verschiedenen zellulären Proteinen zusammen, welche den viralen Replikationszyklus an unterschiedlichen Stellen blockieren.

1.3.2 Restriktionsfaktoren

Diese spezifischen, zellulären Proteine verleihen bestimmten Zellen einen nicht-permissiven Phänotyp, d.h. bei diesen Zellen kann keine produktive, virale Replikation festgestellt werden. Da man bis zur Entdeckung dieser zellulären Proteine die Ursache für diesen Block nicht kannte, wurden die bis dahin unbekannten Faktoren als Restriktionsfaktoren bezeichnet.

Aktuell sind drei verschiedene Gruppen von Restriktionsfaktoren identifiziert worden, welche an verschiedenen Stellen des retroviralen Replikationszyklus angreifen. Einen sogenannten *early postentry block* bilden die Faktoren TRIM5 α , TRIMCyp und Fv1. Diese zellulären Proteine sind in der Lage, sich an die Kapsidproteine anzulagern und somit den Replikationszyklus zwischen Virusteintritt und reverser Transkription durch Inhibition des viralen *uncoating* zu blockieren (Baumann, 2006). Die bisher am besten untersuchten Vertreter, die TRIM5 α -Proteine, wurden als Restriktionsfaktoren bei verschiedenen Spezies beschrieben (Hatzioannou et al., 2004; Perez-Caballero et al., 2005; Sawyer et al., 2005; Schaller et al., 2007; Song et al., 2005; Stremlau et al., 2004; Yap et al., 2004; Ylinen et al., 2006). Dabei determiniert die kapsidbindende Domäne der jeweiligen Proteine, gegen welche Retroviren eine inhibierende Wirkung erfolgt, was wiederum einen Einfluss auf den retroviralen Wirtstropismus hat (Hatzioannou et al., 2003; Hatzioannou et al., 2006; Nakayama et al., 2005; Perez-Caballero et al., 2005; Perron et al., 2004; Sebastian and Luban, 2005; Stremlau et al., 2005; Stremlau et al., 2006; Yap et al., 2005).

Die zweite Gruppe wird von den APOBEC3-Proteinen gebildet, bei denen es sich um Cytosin-Deaminasen handelt und welche in nachfolgendem Abschnitt detailliert behandelt werden. Diese Enzyme favorisieren einzelsträngige DNA als Substrat und induzieren durch Deaminierung von Cytosinen Hypermutationen in der proviralen Sequenz. Der genaue Mechanismus ist in Kapitel 1.3.3 beschrieben.

Ein dritter, kürzlich entdeckter Restriktionsfaktor stellt Tetherin dar (Neil et al., 2007; Neil et al., 2008; Van Damme N. et al., 2008). Dabei handelt es sich um ein zelluläres Protein, welches sich an reifende Viruspartikel an der zellulären Wirtsmembran anbindet (*to tether* = anbinden) und somit die Knospung der Nachkommenviren zu

verhindern scheint (Evans et al., 2010; Neil et al., 2008). Somit könnte dieser Faktor nicht nur einen Block für Retroviren, sondern für alle membranumhüllten Viren darstellen.

1.3.3 APOBEC3

Die APOBEC3-Proteine (A3-Proteine) stellen einen Teil der intrinsischen Immunität dar und sind für die Inhibition des retroviralen Replikationszyklus während der reversen Transkription verantwortlich. Die Identifikation des bekanntesten Vertreters dieser Proteinfamilie, das humane APOBEC3G (*apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G*, huA3G), erfolgte im Zuge von HIV-1-Studien. Es konnte festgestellt werden, dass HIV-1-Viren, welche eine Deletion des Vif (*viral infectivity factor*, HIV-1 Δ vif) aufwiesen, nicht in der Lage waren, sich in nicht-permissiven Zellen wie beispielsweise CD4⁺ T-Zellen auszubreiten, die von HIV-1 normalerweise infiziert werden können (Gabuzda et al., 1992; Sakai et al., 1993; Sova and Volsky, 1993; Strebel et al., 1987; von Schwedler et al., 1993). HIV-1 Δ vif war zwar in der Lage, die nicht-permissiven Zellen einmalig zu infizieren, die Nachkommenviren zeigten aber einen nicht-infektiösen Phänotyp, weshalb sie die nächste Zielzelle nicht mehr produktiv befallen konnten (Gabuzda et al., 1992; Sova and Volsky, 1993; von Schwedler et al., 1993). Durch Fusion nicht-permissiver Zellen (CEM) mit permissiven Zellen (CEM-SS) wurde deutlich, dass in den Heterokaryonzellen die nicht-permissive Eigenschaft dominant war, da auch hier nicht-infektiöse HIV-1 Δ vif-Partikel produziert wurden (Madani and Kabat, 1998; Simon et al., 1998). Somit scheinen die nicht-permissiven Zellen einen Faktor zu exprimieren, welcher wiederum durch Vif neutralisiert werden kann (Madani and Kabat, 1998; Simon et al., 1998). Dieser Faktor wurde im Jahr 2002 durch Sheehy und Mitarbeiter identifiziert und CEM15 benannt (Sheehy et al., 2002), jedoch später aufgrund seiner Homologie der APOBEC-Proteinfamilie zugeordnet und als huA3G bezeichnet, wobei der Name auf dem zuvor identifizierten Mitglied APOBEC1 beruht (Teng et al., 1993).

Bei der APOBEC-Proteinfamilie handelt es sich um Cytosin-Deaminasen, welche gewebespezifisch exprimiert werden und über eine RNA-editierende oder DNA-mutierende Aktivität verfügen (Harris et al., 2002; Jarmuz et al., 2002; Teng et al., 1993). Beim Menschen setzt sich die Familie aus der *activation induced deaminase* (AID), A1, A2, A3A-H sowie A4 zusammen (Conticello et al., 2005; Jarmuz et al., 2002; OhAinle et al., 2006; Rogozin et al., 2005). Während die natürliche Funktion von A2 und A4 noch unbekannt ist, deaminiert A1 ein Cytosin an Nukleotidposition 6666 innerhalb der mRNA des ApolipoproteinB, was in einem trunkierten Proteinprodukt resultiert (Mehta et al., 2000; Teng et al., 1993), wobei beide Proteine unterschiedliche physiologische Aufgaben übernehmen. Im Gegensatz dazu ist AID, welches in B-Zellen exprimiert wird, für die natürliche, humorale Immunantwort zuständig und spielt durch Deaminierungsprozesse bei der Diversifizierung der Immunglobulingene und bei der *class switch recombination* eine wichtige Rolle (Muramatsu et al., 1999; Muramatsu et al., 2000).

Antivirale Aktivität der A3-Proteine

Einige Mitglieder der A3-Subfamilie erwiesen sich im Zuge der Forschung als effektive Inhibitoren in Bezug auf die Replikation endogener und exogener Retroviren. Um ihre restriktive Wirkung ausüben zu können, müssen die Deaminasen im Cytoplasma der infizierten Zelle durch Interaktion mit den Nukleokapsid-Proteinen zuerst in die reifenden Viruspartikel inkorporiert werden (Alce and Popik, 2004; Cen et al., 2004; Luo et al., 2004; Schafer et al., 2004), wobei auch die Eigenschaft der A3-Proteine, einzelsträngige RNA zu binden, ebenso eine Rolle zu spielen scheint (Burnett and Spearman, 2007; Khan et al., 2005; Khan et al., 2007; Soros et al., 2007; Svarovskaia et al., 2004; Zennou et al., 2004). Die A3-Proteine entfalten ihre antivirale Aktivität nach Infektion der neuen Zielzelle während der reversen Transkription (Abb. 8). Diese Enzyme induzieren während der reversen Transkription C-zu-U-Basensubstitutionen durch Deaminierung von Cytosinen innerhalb der viralen, einzelsträngigen (-)-DNA, was zu einer G-zu-A-Hypermutation der proviralen Sequenz führt (Browne and Littman, 2008; Lecossier et al., 2003; Perkovic et al., 2009; Suspene et al., 2004; Yu et al., 2004b; Zhang et al., 2003).

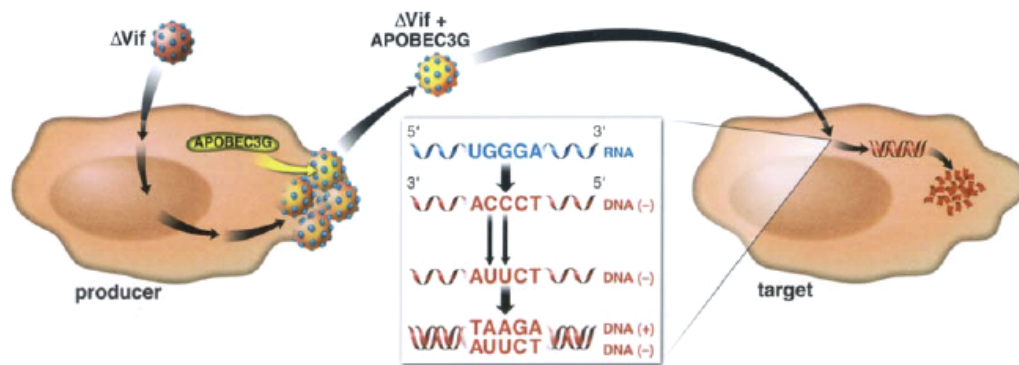


Abb. 8 Modell zur Veranschaulichung der antiviralen Aktivität von huA3G gegenüber HIV Δ vif in permissiven Zellen. Nach Inkorporation der Cytosin-Deaminasen in die reifenden Viruspartikel werden die A3-Proteine durch Infektion in die neue Zielzelle übertragen. Dort bewirken sie während der reversen Transkription eine Deaminierung von Cytosin-Resten innerhalb des (-)-DNA-Stranges, was zu einer G-zu-A-Hypermutteration des (+)-DNA-Stranges der proviralen Sequenz führt (Quelle: (Mariani et al., 2003)).

Einerseits wird anhand der Mutationen die Infektiosität der Viren bereits stark reduziert, bedingt durch Verschiebungen innerhalb der offenen Leserahmen sowie durch Einbau von Stopcodons. Andererseits werden durch die Uracile in der DNA zelluläre Reparaturenzyme wie die Uracil-DNA-Glykosylase und die Apurin/Apyrimidin-Endonuklease aktiviert, welche wiederum die mutierten Sequenzen degradieren (Schröfelbauer et al., 2005; Yang et al., 2007). Neben diesem deaminase-abhängigen existiert offensichtlich ein deaminase-unabhängiger Wirkmechanismus, der wahrscheinlich auf einer sterischen Hemmung der Reversen Transkriptase durch die A3-Proteine beruht (Bishop et al., 2006; Bishop et al., 2008; Guo et al., 2006; Newman et al., 2005).

Evolution und Struktur des A3-Genlokus sowie darauf basierende Nomenklatur

Bei den Menschen besteht die A3-Subfamilie aus sieben Vertretern (huA3A, -B, -C, -D, -F, -G und -H). Alle A3-Gene sind als Tandem auf Chromosom 22 angeordnet (Jarmuz et al., 2002), wobei die Expansion durch Genduplikationen und -deletionen entstanden ist (Larue et al., 2008). Die A3-Proteine verfügen entweder über eine (A3A, -C und -H) oder über zwei (A3B, -D, -F und -G) Zink-koordinierende Domänen (Jarmuz et al., 2002). Die Zink-koordinierenden Domänen spielen eine entscheidende Rolle bei der Zuordnung der verwandtschaftlichen Verhältnisse der A3-Proteine untereinander und der Namensgebung, welche 2009 durch LaRue und Mitarbeiter erneuert wurde (Larue et al., 2009). Die neue Nomenklatur soll der Vereinfachung bei der Namensgebung für neu identifizierte A3-Gene und deren kodierte Proteine dienen, da gerade bei Nichtprimaten diese Genloci im Vergleich zu dem humanen A3-Lokus oftmals gravierende Unterschiede aufweisen, weshalb eine

korrekte Benennung (wie A3A-A3H) mittels Identifikation des entsprechenden humanen, orthologen Gens sehr schwierig ist (Larue et al., 2009).

Die reformierte Namensgebung richtet sich nach der Aminosäuresequenz der Zink-koordinierenden Domänen (HxEx₂₃₋₂₈PCx₂₋₄C) sowie der unmittelbaren Sequenzumgebung der jeweiligen A3-Proteine. Daraus lassen sich drei konservierte Domänen (Z1, Z2 und Z3) ableiten (Abb. 9). Während Eindomänenproteine lediglich über eine Z-Domäne (Z1, Z2 oder Z3) verfügen, bestehen Doppeldomänenproteine aus einer Kombination zweier Z-Domänen, wobei bisher nur die Kombinationen Z2-Z1, Z2-Z2 oder Z2-Z3 identifiziert werden konnten (Larue et al., 2009). Falls innerhalb eines Genlokus mehrere Domänen des gleichen Z-Typs vorkommen sollten, so werden diese mit Hilfe von Kleinbuchstaben durchnummeriert.

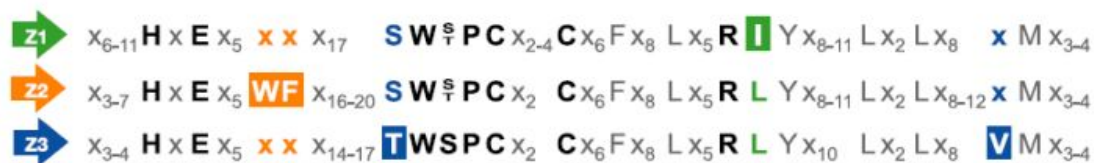


Abb. 9 Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz der Zink-koordinierenden Domänen Z1, Z2 und Z3. Konservierte Aminosäuren sind hervorgehoben (schwarz und fett gedruckt: konservierte Aminosäuren bei allen Motiven; bunt unterlegt mit weißer Schrift: konservierte Aminosäuren, die charakteristisch sind für die jeweilige Z-Domäne) (Quelle: (Larue et al., 2009)).

Dieselbe chromosomale Anordnung der A3-Gene konnte man außer beim Menschen auch bei weiteren Primaten wie Schimpansen und Rhesusaffen finden (Abb. 10). Im Gegensatz dazu weisen andere Vertreter der Klasse Mammalia abweichende Muster bei der Anzahl der A3-Gene auf (Bogerd et al., 2008; Jonsson et al., 2006; Larue et al., 2008; Münk et al., 2008; Zielonka et al., 2009). Zugrunde liegt ein gemeinsamer Vorfahr, welcher ursprünglich über die drei Zink-koordinierenden Domänen (Z1, Z2 und Z3) verfügte. Erst nach Aufspaltung des phylogenetischen Stammbaumes kam es zur unterschiedlichen Entwicklung bei den Säugetieren.

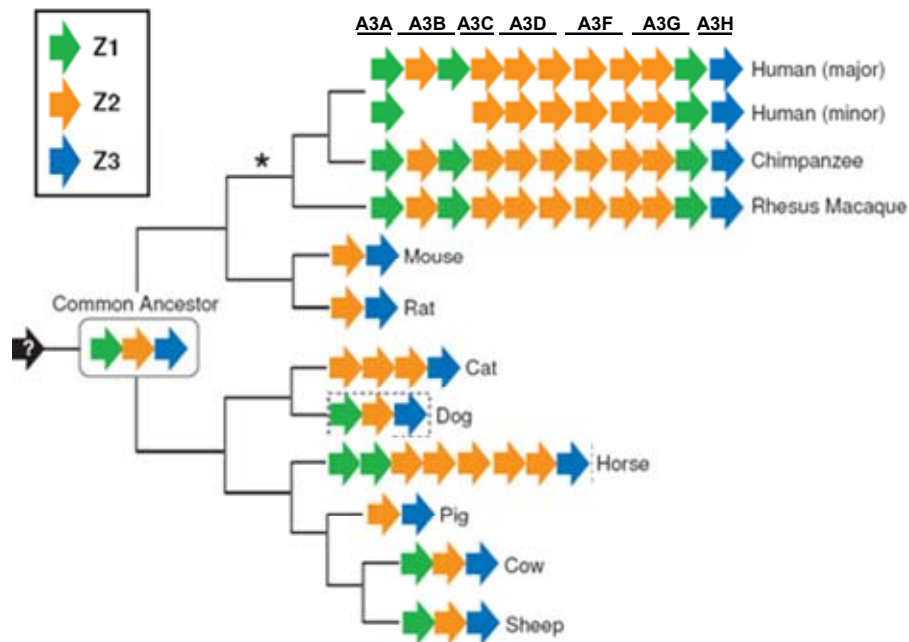


Abb. 10 Schematische Darstellung der Verteilung der A3-Gene bei verschiedenen Spezies der Klasse Mammalia. Der letzte, gemeinsame Vorfahr verfügte über alle drei A3-Gene in der Orientierung Z1-Z2-Z3 (grün: Z1, orange: Z2, blau: Z3). Der Stern gibt den evolutionsbiologischen Zeitpunkt an, an dem die Expansion innerhalb des A3-Genlokus erfolgte (modifiziert nach (Larue et al., 2008)).

Bei der Ausprägung der genetischen A3-Zusammensetzung spielen dabei Wirt-Virus-Interaktionen eine entscheidende Rolle (Larue et al., 2008), wobei durch alternatives Spleißen und Durchlesetranskription die Vielfalt an A3-Proteinen zusätzlich erhöht wurde (Harari et al., 2009; Larue et al., 2008; Münk et al., 2008). Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die alte und neue Nomenklatur der A3-Gene und der dazugehörigen Proteine (Tab. 1).

Tab. 1 Vergleich der alten und neuen Nomenklatur der A3-Gene und der dazugehörigen Proteine verschiedener Spezies (modifiziert nach (Larue et al., 2009)).

a: leere Bereiche bei der alten Nomenklatur sind dadurch bedingt, dass die neue Nomenklatur bereits in den Originalartikeln verwendet wurde.

b: Die Lücken bei den Gennamen können dadurch begründet werden, dass das resultierende Protein ein Produkt zweier Gene ist, welches durch Durchlesetranskription und alternatives Spleißen entstanden ist.

TABLE 1. APOBEC3 genes and proteins of representative nonprimate mammals

Genus and species (common name)	Old name (reference)		New name (reference)	
	Gene ^a	Protein ^a	Gene ^b	Protein
<i>Bos taurus</i> (cattle)			<i>A3Z1</i> (13)	A3Z1
			<i>A3Z2</i> (13)	A3Z2
			<i>A3Z3</i> (13)	A3Z3
	<i>A3F</i> (12)	A3F		A3Z2-Z3 (13)
<i>Equus caballus</i> (horse)	<i>A3A1</i> (2)	A3A1	<i>A3Z1a</i>	A3Z1a
	<i>A3A2</i> (2)	A3A2	<i>A3Z1b</i>	A3Z1b
	<i>A3F1</i> (2)	A3F1	<i>A3Z2a-Z2b</i>	A3Z2a-Z2b
	<i>A3F2</i> (2)	A3F2	<i>A3Z2c-Z2d</i>	A3Z2c-Z2d
	<i>A3C</i> (2)	A3C	<i>A3Z2e</i>	A3Z2e
	<i>A3H</i> (2)	A3H	<i>A3Z3</i>	A3Z3
<i>Felis catus</i> (cat)	<i>A3Cc</i> (17)	A3Cc	<i>A3Z2a</i>	A3Z2a
	<i>A3Ca</i> (17)	A3Ca	<i>A3Z2b</i>	A3Z2b
	<i>A3Cb</i> (17)	A3Cb	<i>A3Z2c</i>	A3Z2c
	<i>A3H</i> (17)	A3H	<i>A3Z3</i>	A3Z3
		A3CH (17)		A3Z2b-Z3
<i>Mus musculus</i> (mouse)	<i>A3</i> (15)	A3	<i>A3Z2-Z3</i>	A3Z2-Z3
<i>Ovis aries</i> (sheep)			<i>A3Z1</i> (13)	A3Z1
			<i>A3Z2</i> (13)	A3Z2
			<i>A3Z3</i> (13)	A3Z3
	<i>A3F</i> (12)	A3F		A3Z2-Z3 (13)
<i>Rattus norvegicus</i> (rat)	<i>A3</i>	A3	<i>A3Z2-Z3</i>	A3Z2-Z3
<i>Sus scrofa</i> (pig)			<i>A3Z2</i> (13)	A3Z2
			<i>A3Z3</i> (13)	A3Z3
	<i>A3F</i> (12)	A3F		A3Z2-Z3 (13)

Virale Mechanismen zur Abwehr der A3-Proteine

Einige Viren haben im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt, um dem restriktiven Einfluss der A3-Proteine zu entgehen. Bei Lentiviren beispielsweise spielt das Protein Vif eine entscheidende Rolle. Dieses bindet an huA3G und fungiert dann als Adaptorprotein, indem es eine Verbindung mit dem E3-Ligase-Komplex herstellt (Wolfe et al., 2010; Yu et al., 2004c). Als Resultat werden die A3-Proteine polyubiquitiniert und dem proteasomalen Abbau zugeführt (Conticello et al., 2003; Liu et al., 2004; Marin et al., 2003; Mehle et al., 2004; Shao et al., 2010; Sheehy et al., 2003; Stopak et al., 2003). Auch einfache Retroviren besitzen einen Mechanismus, um sich vor dem wirtseigenen A3-Protein zu schützen. So konnte für MLV gezeigt werden, dass das muA3 nicht in die MLV-Partikel inkorporiert wird. Somit muss dieses Virus über einen Weg verfügen, um die cytoplasmatisch lokalisierten Cytosin-Deaminasen aus dem viralen Kapsid auszuschließen (Cullen, 2006; Doehle et al., 2005; Kobayashi et al., 2004). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass

beispielsweise huA3G sehr wohl in der Lage ist, einen effektiven Block gegen die MLV-Replikation zu bilden (Mangeat et al., 2003; Mariani et al., 2003). Die Virus-Wirt-Interaktion scheint somit eine entscheidende Rolle beim Aufbau der retroviralen Resistenz gegen das wirtseigene A3-Protein zu spielen.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte untersucht werden, ob humane und porcine A3-Proteine antiretrovirale Eigenschaften gegen PERV aufweisen und auf welchem Mechanismus die entsprechende Restriktion beruht. Dabei sollten die Daten zur Evaluierung des Risikos im Zuge einer Xenotransplantation dienen. In einem ersten Schritt wurde auf cDNA-Ebene nach poA3-Transkripten gesucht, deren Nukleotidsequenzen durch Charakterisierung des *poA3*-Genlokus und Determination der Exon-Intron-Strukturen untermauert wurden. Die porcinen und humanen A3-Proteine wurden in einem geeigneten Testsystem hinsichtlich ihrer Aktivität gegen PERV und MLV untersucht. MLV wurde dabei als interne Kontrolle mitgeführt, da es sich bei diesem Vertreter ebenfalls um ein γ -Retrovirus handelt, welches – verglichen mit PERV – eine Sequenzhomologie von etwa 60 % aufweist (Czauderna et al., 2000; Tönjes et al., 2000) und zu dem bereits mehrere Studien hinsichtlich einer A3-Interaktion erfolgten. Die antiretroviralen Eigenschaften wurden dabei sowohl hinsichtlich ihrer Konzentrationsabhängigkeit als auch in einer Langzeitstudie untersucht. Abschließend sollte festgestellt werden, ob die Restriktion der PERV-Replikation auf eine Deaminierung der proviralen Sequenzen zurückzuführen ist und ob diese Deaminierung in einem bestimmten Nukleotidkontext erfolgt.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien und Zellen

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von den Firmen Merck, Roth und Sigma-Aldrich bezogen. Die Verbrauchsmaterialien für die molekularbiologischen Arbeiten und für die Zellkultur stammen von den Firmen Eppendorf, Greiner, Nunc, Sarstedt und Sartorius.

2.1.2 Enzyme, Inhibitoren und Antibiotika

Enzyme	Lieferant
AmpliTaq Gold DNA Polymerase	Applied Biosystems
Antarctic Phosphatase	NEB
DNaseI	NEB
Expand High Fidelity PCR System	Roche
Klenow Large Fragment DNA Polymerase I	NEB
KOD XL DNA Polymerase	Novagen
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	NEB
Restriktionsendonukleasen	NEB
RNase I	Boehringer Ingelheim
Proteinase K	Gibco
T4 DNA Ligase	NEB
T4 DNA Polymerase	NEB
Taq DNA Polymerase	NEB

Antibiotika	Lieferant
Ampicillin	Boehringer Mannheim
Geneticin (G418)	Gibco
Kanamycin	Sigma
Penicillin	Biochrom AG
Streptomycin	Biochrom AG
Zeocin	Invitrogen

Protease-Inhibitoren	Lieferant
Aprotinin	AppliChem
Leupeptin	AppliChem
Pepstatin	AppliChem
PMSF	AppliChem

2.1.3 Antikörper

Name	Verdünnung	Lieferant
Monoclonal Anti-HA, clone HA-7	1:4.000	Sigma
Mouse Anti V5-tag (MCA1360)	1:5.000	Serotec
Monoclonal beta Actin [AC-15] antibody	1:5.000	Biozol
Anti-p30 (PERV)	1:3.000	Eurogentec
Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	1:10.000	Dianova
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	1:10.000	Dianova

Die Herstellung des polyklonalen anti-p30-Antikörpers, welcher gegen das Kapsid-Protein von PERV gerichtet ist, wurde von der Firma Eurogentec durchgeführt. Details können der Publikation Fischer et al. (Fischer et al., 2003) entnommen werden.

2.1.4 Bakterienstämme und Kulturmedien

Stamm	Genotyp	Lieferant
DH5 α	F- ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
DH10B	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139</i> Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ - <i>rpsL nupG</i> /pMON14272 / pMON7124	Invitrogen
GM2163	F ⁻ <i>dam13::Tn9 dcm-6 hsdR2 leuB6 hisG4 thi-1 ara-14 lacY1 galK2 galT22 xylA5 mtl-1 rpsL136 tsx78 mcrA mcrB1 fhuA31 glnV44 rfbD1</i>	NEB
TOP10	F- <i>mrcA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80d/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74, deoR recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU endA1 galK</i> λ - <i>rpsL nupG</i>	Invitrogen

LB-Medium/Agar

Trypton	1.0 % (w/v)
Hefeextrakt	0.5 % (w/v)
NaCl	1.0 % (w/v)
(Agar	1.5 %)
pH 7.0, autoklaviert	

SOC-Medium

Trypton	2.0 % (w/v)
Hefeextrakt	0.5 % (w/v)
NaCl	10 mM
Glukose	20 mM
MgCl ₂	10 mM
KCl	2.5 mM
MgSO ₄	10 mM
pH 7.0, autoklaviert	

TB-Medium

Trypton	1.2 % (w/v)
Hefeextrakt	2.4 % (w/v)
Glycerin	0.4 % (v/v)
KH ₂ PO ₄	17 mM
K ₂ HPO	72 mM
pH 7.0, autoklaviert	

Die transformierten Bakterien wurden durch Zugabe der Antibiotika Ampicillin (50 μ g/ml) oder Kanamycin (10 μ g/ml) zum Kulturmedium selektioniert.

Zum LB-Agar wurden zwecks Blau-Weiß-Selektion der positiven Klone 4.5 ml/l X-Gal-Lösung (0.1 g X-Gal in 5 ml Dimethylformamid gelöst, Roth KG) und 2ml/l IPTG-Lösung (0.048 g IPTG in 2 ml Reinstwasser gelöst, Roth KG) zugefügt.

2.1.5 Zelllinien und Kulturmedien

Zelllinie	Charakterisierung	Lieferant
Dubca	Kamel (dubai camel)-Fibroblasten-Zelllinie	LGC Promochem
HEK-293T	Humane Nieren-Zelllinie; stabile Expression des „large-T“-Antigens (Neo-Resistenz), was zu einer verstärkten Expression von unter SV40-Promotorkontrolle stehenden Genen führt	ATCC
L45	Porzine T-Lymphozyten-Zelllinie	ECACC
MAX-T	Porzine Nieren-Zelllinie aus einem d/d-Haplotyp-Minischwein, stabile Expression des „large-T“-Antigens (Neo-Resistenz)	Pauly et al., 1995
PK15	Porzine Nieren-Zelllinie aus <i>Sus scrofa</i>	ATCC
SCP	Zelllinie des Schafgehirns	ATCC

Kulturmedium für L45

RPMI 1640 + 2 mM L-Glutamin + 1 mM Natriumpyruvat + 50 mM 2-Mercaptoethanol + 10 % FKS

Kulturmedium für Dubca und SCP

MEM + 2 mM L-Glutamin + 1.5 g/l Natrium-Bicarbonat + 0.1 mM NEA + 1 mM Natriumpyruvat + 10 % FKS

Kulturmedium für MAX-T und PK15

DMEM + 2 mM L-Glutamin + 0.1 mM NEA + 10 % FKS

Kulturmedium für HEK-293T

DMEM + 2 mM L-Glutamin + 0.1 mM NEA + 10 % FKS + 500 µg/ml Geneticin

Kulturmedium für stabil transfizierte HEK-293T

DMEM + 2 mM L-Glutamin + 0.1 mM NEA + 10 % FKS + 400 µg/ml Zeocin

Um einer bakteriellen Kontamination entgegenzuwirken, wurde jedem Medium Penicillin (100 Units/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) zugefügt. Das FKS wurde vor der Verwendung 30 min bei 56 °C inkubiert, um das im Serum vorhandene Komplementsystem zu inaktivieren.

2.1.6 Plasmide

Die Plasmidnamen für die einzelnen A3-Konstrukte entsprechen der Labornomenklatur. Die Publikationsnomenklatur ist zwecks besserer Zuordnung am Ende der jeweiligen Charakterisierung angegeben (mittlere Spalte).

Plasmidname	Charakterisierung	Herkunft
pGEM [®] -T Easy	Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten mit A-Überhang	Promega
pBS-Not[PERV-B(33)ATG] #7	Moleklarklon aus PK15 mit einer vollständigen PERV-B-Sequenz, kloniert in pBS_KS (Stratagene) über NotI, replikationskompetent	(Czauderna et al., 2000)
pGTe[PERV-B(33)ATG] Δchrom	PERV-B(33)ATG-Sequenz ohne chromosomale Flanken mit <i>Taq</i> -Polymerase aus pBS-Not[PERV-B(33)ATG] amplifiziert, kloniert in pGEM [®] -T Easy, nicht replikationskompetent	konstruiert von Nicole Fischer (PEI)
pGTe[PERV-B(33)ATG] ΔchromE # 11	Austausch des proviralen Bereiches von pGTe[PERV-B(33)ATG]Δchrom mit der entsprechenden Sequenz aus pBS-Not[PERV-B(33)ATG] zwischen den Restriktionsschnittstellen <i>Mfe</i> I (nt 1772-1777) und <i>Pac</i> I (nt 7743-7750) zur Wiederherstellung der Replikationskompetenz	selbst konstruiert

pGTe[PERV-B(33)ATG_EGFP] Δ chromE # 11/5	Ersatz eines Teil des <i>env</i> -Bereiches durch EGFP zwischen den Restriktionsschnittstellen <i>KpnI</i> (nt 7017-7022) und <i>PacI</i> (nt 7743-7750)	selbst konstruiert
pGTe[PERV-B(33)ATG_CMV_EGFP] Δ chromE # 11/1	Addition eines CMV-Promotors vor das EGFP über die Schnittstelle <i>KpnI</i> (nt 7017-7022) zur Steigerung der intrazellulären Fluoreszenzintensität nach Transfektion = pPERV-EGFP	selbst konstruiert
pcDNA3.1/Zeo(+)	Klonierungsvektor, vermittelt Zeocin-Resistenz	Invitrogen
pc[333_HA] # 2	Expressionsplasmid für eine porcine A3-Sequenz mit einem ORF von 333 bp, Nukleotide identisch zu poA3-cDNA (nt 1-231 und 512-613), ohne zink-koordinierende Domäne (Exon 3 fehlt), keine Protein-Expression	selbst konstruiert
pc[591_HA] # 2	Expressionsplasmid für eine porcine A3-Sequenz mit einem ORF von 591 bp, Nukleotide identisch zu poA3-cDNA (nt 1-489 und 512-613), Deletion im nt-Bereich 490-511 (=C-Terminus Exon 3), keine Protein-Expression	selbst konstruiert
pc[789_HA] # 2	Expressionsplasmid für eine porcine A3-Sequenz mit einem ORF von 789 bp, Nukleotide identisch zu SV-N-cDNA (nt 1-231 und 286-843), Deletion des HAE-Motivs innerhalb der zink-koordinierenden Domäne, schlechte bis keine Protein-Expression	selbst konstruiert

pc[843_HA] # 2	Expressionsplasmid für die porcine N-terminale A3-Spleißvariante mit einem ORF von 843 bp, mit HA-tag = A3Z2	selbst konstruiert
pc[708_HA] # 2	Expressionsplasmid für die porcine A3-Spleißvariante mit einem ORF von 708 bp, Nukleotide identisch zu poA3-cDNA (nt 1-231 und 784-1260), mit HA-tag, 1 Serin zu viel am C-Terminus (SSSS), bedingt durch einen fehlerhaften 3'-Primer = A3Z2-Z3 SVA	selbst konstruiert
pc[1260_HA] # 5	Expressionsplasmid für das porcine Doppeldomänen-A3 mit einem ORF von 1260 bp, mit HA-tag, 1 Serin zuviel am C-Terminus (SSSS), bedingt durch einen fehlerhaften 3'-Primer = A3Z2-Z3	selbst konstruiert
pc[SV-C_HA] # 10	Expressionsplasmid für die porcine A3-Spleißvariante mit einem ORF von 705 bp, mit HA-tag, Serin-Addition am C-Terminus entfernt = A3Z2-Z3 SVA_SSS	selbst konstruiert
pc[poA3_HA] # 4	Expressionsplasmid für das porcine Doppeldomänen-A3 mit einem ORF von 1257 bp, mit HA-tag, Serin-Addition am C-Terminus entfernt = A3Z2-Z3_SSS	selbst konstruiert
pM91MS	replikationskompetentes, amphotropes MLV	(Hartl et al., 2005)

pM91MS/EGFP # 19	Austausch eines Teils des <i>env</i> -Bereiches der proviralen MLV-Sequenz durch eine CMV-EGFP-Kassette über die Restriktionsschnittstellen <i>Nsi</i> I (nt 7486-7491) und <i>Pac</i> I (nt 8890-8897) = pMLV/EGFP	selbst konstruiert
pMD.G2	Kkdiert für das VSV-G Hüllprotein, kloniert in pUC18, unter Kontrolle eines CMV-Promotors	(Naldini et al., 1996)
pcDNA3.1-AID-V5-6xHis	humanes AID, kloniert in pcDNA3.1D/V5-His-Topo (Invitrogen) = huAID	(Zheng et al., 2004)
pcDNA3.1-A1-V5-6xHis	humanes A1, C-terminales V5- und His-tag, kloniert in pcDNA3.1D/V5-His-Topo (Invitrogen) = huA1	(Zheng et al., 2004)
pcDNA3.1-A2-V5-6xHis	humanes A2, C-terminales V5- und His-tag, kloniert in pcDNA3.1D/V5-His-Topo (Invitrogen) = huA2	(Zheng et al., 2004)
pc-Mu-A3G-HA	kodiert murines A3, C-terminales Epitop: HA, Klonierungsvektor: pcDNA3.1(+) (Invitrogen) = muA3	(Mariani et al., 2003)
huA3A	humanes A3A, C-terminaler HA-tag, kloniert in pcDNA3.1/Zeo(+)	(Wiegand et al., 2004)
huA3B	humanes A3B, C-terminaler HA-tag, kloniert in pcDNA3.1/Zeo(+)	(Muckenfuss et al., 2006)
huA3C	humanes A3C, C-terminaler HA-tag, kloniert in pcDNA3.1/Zeo(+)	(Muckenfuss et al., 2006)
huA3F	humanes A3F, C-terminaler HA-tag, kloniert in pcDNA3.1/Zeo(+)	(Muckenfuss et al., 2006)
huA3G-myc	humanes A3G, C-terminaler myc-tag, kloniert in pcDNA3.1/Zeo(+)	(Marin et al., 2003)

huA3G(B)	humanes A3G aus huA3G-myc, C-terminaler HA-tag, kloniert in pcDNA3.1/Zeo(+)	konstruiert von Marion Battenberg (PEI)
huA3H	humanes A3H, C-terminales Epitop: HA, kloniert in pcDNA3.1/Zeo(+)	(Muckenfuss et al., 2006)

2.1.7 Oligonukleotide

Alle Primer wurden von MWG Eurofins Operon in Auftragsarbeit hergestellt.

Die Namen der Oligonukleotide (Primer) entsprechen der Labornomenklatur. Die Angabe über Exon- bzw. Intronposition der Oligonukleotide ist teilweise abweichend zum realen Aufbau des porzinen A3-Genlokus, kann jedoch anhand eines Sequenzabgleiches mit der entsprechenden Gensequenz (Kapitel 3.3.2, Datenbanknummer: EU871587) folgerichtig zugeordnet werden.

Name	5' → 3'- Sequenz	T _m [°C]
Primer zur Klonierung des PERV/EGFP Expressionsplasmides		
KpnI_GFP_For	cagtgagggtacatggtgagcaagggcgaggag	74.5
GFP_PacI_Rev	tctctgttaattaattactgtacagctcgtccatgcc	68.4
For_KpnI_CMV	ggtacctagttattaatagtaataattacgggggtc	66.1
Rev_CMV_KpnI	ggtaccgtcgactgcagaattc	62.1
Primer zur Klonierung des MLV/EGFP-Expressionsplasmides		
f_Nsi_CMV	cagtgaatgcattagttattaatagtaataattacgggggtcattag	67.4
GFP_PacI_Rev	tctctgttaattaattactgtacagctcgtccatgcc	68.4
Primer zur Suche nach poA3-Transkripten (ORFs) auf cDNA-Ebene		
poGFAT_for	aaccagtcctgtcaatagcc	59.8

poGFAT_rev	acgagagagattgcagcttcc	59.8
6f_poAPO3	gacctcagcgctgagac	61.0
6r_poAPO3	cacgaagttgtccagcagtgtg	62.7
7f_poAPO3	catctgctgccaggtggaag	61.4
7r_poAPO3	ccacggctggaagggcatcc	65.5
1f_Ss3F	atggatcctcagcgctgagacaatgg	68.0
1r_Ss3F	tcatctcgagtcacttcttgatgatgatgaaggctc	68.3
10f_poAPO3	atggatcctcagcgctgagacaatggcc	70.9
9r_poAPO3	tcaccacctggcgtgagcac	63.5
r2_SV-N_poAPO3	tcagcggtaacaaatccaactagcatccacgag	69.6
f_pA3_cDNA	atggatcctcagcgctgag	64.5
r_pA3_cDNArc	tcatctcgagtcacttcttgatg	61.0
Primer zur Addition einer Kozak- und einer HA-Sequenz an die poA3-Sequenzen		
f_NheI_K_APO	gctagcactatggatcctcagcgctgag	70.9
r_333591_HA_XhoI	ctcgagtcaagcataatctggaacatcatatggatagctctgtgacc aagcgttg	> 75
r_843_HA_XhoI	ctcgagtcaagcataatctggaacatcatatggatagcggtaacaa atccaactagcatc	> 75
r_789_HA_XhoI	ctcgagtcaagcataatctggaacatcatatggatagcggtaacaa atccaactagcatc	> 75
f_Acc65I_K_708_APO	ggtaccactatggatcctcagcgctgag	71.2
r_708_HA_NotI	gcggccgctcaagcataatctggaacatcatatggatatctcgagt cacttcttgatg	> 75
r_pA3_HA_NotIrc	gcggccgctcaagcataatctggaacatcatatggatatctcgagt cacttcttgatgatgaaggatg	76.5
Primer zur Ermittlung der poA3-Gensequenz		
9f_poAPO3	atggatcctcagcgctgagac	64.0
3r_RH_poAPO3	ggttttgaaagatgccttgaagaaacag	64.6
f_Exon2_1	ccagaggagtggtccatgagttatctcc	68.9

f_Exon2_2	ctctgggcggaaccgctcctacatc	71.1
r_EI_2	ctgttctcctccaggaactgagccac	69.3
r_EI_3	ctgactccagaagtagtagaggcgagc	69.0
for_EI_8	tcgcctctactacttctggaagtcag	66.2
7r_poAPO3	ccacggctggaagggcatcc	65.5
f_Exon4_3	caacactgctggaacaacttcgtg	64.6
r_Exon5_2	gctggttgccaaactgtgtatg	62.8
for_EI_7	caaccagccccgggtcttggc	70.4
r_EI_6	aggtggtgccgattgctgatgaaatcaacc	68.7
for_EI_3	tgatttcacagcaatcggcaccacctg	67.5
3r_Ss3F	agagccgtcggcttatgctctcgc	67.8
for_EI_2	aaagcgggtctccgtggctgtcatg	69.5
2r_Ss3F	gaaccgagtcgcaaattctgaaggaatcc	68.1
Primer für das RH mapping und die Kolonie-PCR		
f_Intron1_1	ctggaaagtcttccagcaggggaattc	66.1
r_Exon2_2	gatgccttggaagaaacagttctttcc	64.6
f_Exon5_1	tcttggcgcctactatctgaggaag	67.8
r_Intron5_1	tgttctcagacgctgaatggaggagc	67.8
Primer für das Editing-Assay		
KpnI_GFP_For	cagtgaggtacatgggtgagcaagggcgaggag	74.5
GFP_PacI_Rev	tctctgttaattaattactgtacagctcgtccatgcc	68.4
Primer zur Herstellung des phylogenetischen Stammbaumes		
for_EI_5	agcgacatgcagaaattcgttttattgacaag	64.7
1r_Ss3F	tcatctcgagtcacttcttgatgatgatgaaggtc	68.3

f_Intron4_C2	tcctggccaacaaagaaggatgagac	66.2
r_Exon6_C	tcttgtcaataaaacgaatttctgcatgtcgc	64.7
Primer zur Herstellung der Southern Blot-Sonde		
for_EI_5	agcgacatgcagaaattcgttttattgacaag	64.7
1r_Ss3F	tcatctcgagtcacttcttgatgatgatgaaggtc	68.3
Primer zur Identifizierung der UTR-Regionen		
1r_Ss3FII	ccattgtctcaggcgctgaggatccat	64.6
r_E1_UTR	gtggtttgcttcctcaggctcagac	60.2
rev_A3Z2-Z3LR	cctccgagcagcaggaccaat	65.8
r_Exon5_1	agcagcctttgtcaagaatggagtcac	66.1
r_A3Z3_E2_b	ctgttgatgaatatatttcttttagtagattcat	60.4
r_5'UTR_A3Z3	cagattccgggagtcctgaggc	65.8
A3Z2-Z3 outer 3'RACE (Larue et al., 2008)	ccaaggagctgggtgatttc	60.4
A3Z2-Z3 poA3 inner 3'RACE (Larue et al., 2008)	ctggagcaatacagcgagag	59.3
f_EI_8	tcgcctctactacttctggaagtcag	66.2

2.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.2.1 Experimentelle Arbeiten mit Bakterien

2.2.1.1 Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli*

Um Plasmid-DNA schnell und einfach amplifizieren zu können, bedient man sich der Transformation von Bakterien, bei der die DNA in Bakterien eingebracht und im Zuge der zellulären Replikation vervielfältigt wird. Damit Bakterien fremde DNA aufnehmen können, müssen die prokaryotischen Zellen vorbehandelt werden. Hierfür wurden 5 ml LB-Medium mit einer Kolonie eines der verwendeten Bakterienstämme (DH5 α , DH10B, GM2163, TOP10) angeimpft und über Nacht kultiviert (200 rpm, 37 °C). Mit dieser Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium angeimpft und die Hauptkultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5-0.55 kultiviert. Nach 5 min auf Eis wurden die Bakterien pelletiert (4.000 rpm, 10 min, 4 °C, Minifuge RF, Heraeus) und in 40 ml Puffer TFB1 resuspendiert. Nach weiteren 5 min auf Eis und erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 4 ml Puffer TFB2 resuspendiert. Nach 15 min auf Eis wurde die Bakteriensuspension zu je 100 μ l Aliquots auf Trockeneis schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

TFB1

KAc	30 mM
RbCl	10 mM
CaCl ₂ ·5H ₂ O	10 mM
MnCl ₂ ·4H ₂ O	50 mM
Glycerin	15 % (v/v)
pH 5.8 mit HAc, sterilfiltriert	

TFB2

MOPS	10 mM
CaCl ₂	75 mM
RbCl	10 mM
Glycerin	15 % (v/v)
pH 6.5 mit KOH, sterilfiltriert	

2.2.1.2 Transformation von *Escherichia coli*

Pro Ansatz wurde ein Aliquot mit kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut. Mindestens 4 μ l eines Ligationsansatzes (siehe 2.2.9) bzw. 10 ng Plasmid-DNA im Zuge einer Retransformation wurde zu den *E. coli*-Zellen gegeben und die Ansätze 30 min auf Eis belassen, damit sich die DNA an die bakterielle Zellwand anlagern konnte. Die Aufnahme der DNA in die Zelle wurde durch Hitzeschock (42 °C, 1 min) ermöglicht. Nach 2 min auf Eis wurden 500 μ l vorgewärmtes SOC-Medium zu den

Bakterien gegeben und der Ansatz 1 h bei 37 °C und 200 rpm zwecks Zellregeneration und Ausbildung der Antibiotikaresistenz inkubiert. Abschließend wurde der Transformationsansatz (100-500 µl) auf vorgewärmten LB_{Amp}- bzw. LB_{Kan}-Agarplatten ausgestrichen und die Bakterien im Brutschrank (Heraeus) bei 37 °C über Nacht (ÜN) angezogen, bis Kolonien sichtbar wurden. Zusätzlich enthielt der Nährboden X-Gal und IPTG, wodurch die positiven Klone über Blau-Weiß-Selektion detektiert werden konnten.

2.2.1.3 Kulturbedingungen von *Escherichia coli*

Die Bakterien wurden in LB-Medium oder TB-Medium inklusive Selektionsantibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) auf einem Rundschüttler (innova 4000, New Brunswick Scientific) ÜN bei 200 rpm und 37 °C kultiviert. Falls Plasmide von mehr als 10 kb Länge in die Bakterien transformiert wurden, erfolgte das Wachstum bei 30 °C.

2.2.1.4 Herstellung kryokonservierter Dauerkulturen

Zum Anfertigen einer Dauerkultur wurden 700 µl einer ÜN-Kultur in einem Verhältnis von 1:2 mit 99%-igem, sterilem Glycerin in ein steriles Kryoröhrchen (Greiner) gegeben. Der Ansatz wurde gevortext und bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Alkalische Lyse

Von einer 5 ml ÜN-Kultur, die in TB_{Amp}-Medium aufgezogen wurde, wurden 1.5 ml abgenommen, die Bakterienzellen 20 s bei 13.000 rpm (Centrifuge 5415, Eppendorf) abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl kaltem GTE-Puffer (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lyse-Puffer (200 mM NaOH, 1 % SDS) wurden die Proben 5 min auf Eis belassen, bevor jeweils 150 µl Neutralisationslösung (3 M NaAc) dazu pipettiert wurden. Die Proben wurden gevortext und weitere 5 min auf Eis gestellt. Zur Sedimentierung der präzipitierten Proteine und der chromosomalen DNA wurden die Proben zentrifugiert (13.000 rpm, 5 min), der Überstand in ein neues 1.5 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 1 ml 96%-igem EtOH gefällt. Nach zweiminütiger Fällung auf Eis wurde die DNA durch Zentrifugation pelletiert (13.000 rpm, 1 min). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet bei 37 °C im Thermoblock

(Thermomixer comfort, Eppendorf) getrocknet und danach in 60 µl RNaseA-haltigem TE-Puffer (RNase A-Konzentration = 0.1 mg/ml) aufgenommen. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

Aufreinigung mit Hilfe von Kits

Bei der Plasmid-Aufreinigung mit Hilfe von Kits wird einerseits ein höherer Reinheitsgrad erreicht, da die DNA an Anionenaustauschersäulen gebunden wird, wodurch RNA, Proteine und sonstige zelluläre Bestandteile durch verschiedene Waschschriffe effektiv entfernt werden können. Zum anderen können je nach verwendetem Kit bzw. Ausgangsvolumen hohe Plasmid-Ausbeuten erzielt werden. Zusätzlich ist es möglich, eine spezielle Aufreinigung durchzuführen, um bakterielle Endotoxine zu entfernen. Dieser Schritt ist vor allem dann wichtig, wenn vorgesehen ist, die Plasmid-DNA für Transfektionen zu verwenden, da Endotoxine eine zellschädigende Wirkung besitzen. Alle verwendeten Kits wurden von der Firma Qiagen bezogen und die Aufreinigung nach Angabe des Herstellers durchgeführt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte entweder in Aqua dest. oder unter Verwendung eines bestimmten (endotoxinfreien) Puffers. Für kleinere Maßstäbe (5 ml Bakterienkultur) diente das *Qiaprep[®] Spin Miniprep Kit*. Größere Plasmid-Mengen (50-250 ml Bakterienkultur) wurden mit Hilfe des *QIAfilter Plasmid Midi Kit* oder des *EndoFree[®] Plasmid Maxi Kit* präpariert. Die Bakterien wurden durch 15-minütige Zentrifugation bei 5.000 rpm und 4 °C (Minifuge RF, Heraeus) gewonnen, die Pelletierung der Plasmid-DNA erfolgte 30 min bei 10.000 rpm und 4 °C (Sorvall RC 26 PLUS, Thermo Fisher Scientific). Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.2.2 Isolierung hochmolekularer, genomischer DNA

Die Isolierung hochmolekularer, genomischer DNA basiert auf einem von Blin and Stafford (Blin and Stafford, 1976) etablierten Protokoll, welches modifiziert wurde (Sambrook et al., 1989). Bei dieser Aufreinigung entstehen genomische DNA-Fragmente, die eine Größe zwischen 100-150 kb besitzen. Als Ausgangsmaterial dienten entweder zwei T75-Flaschen (Nunc), die konfluent mit adhären, eukaryontischen Zellen bewachsen waren, oder PBMCs, welche vorab aus 20-30 ml Blut aufgereinigt wurden. Die Zellen wurden zweimal mit je 10 ml eiskaltem PBS (w/o Ca/Mg) gewaschen. Im Falle der adhären, Zellen wurden diese mit einem Zellschaber (Sarstedt) abgekratzt und in ein 50 ml-PP-Röhrchen (Greiner) überführt, um die Zellen bei 1.000 rpm, 5 min und 4 °C (Varifuge 3.0R, Heraeus) zu pelletieren.

Die Zellpellets wurden in 15 ml Extraktionspuffer (10 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM EDTA pH 8.0, 0.5 % SDS) gelöst. Zu diesem Ansatz wurden 30 µl RNaseA [10 mg/ml] gegeben, vorsichtig gemischt und die Proben 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 75 µl Proteinase K [20 mg/ml] zugegeben und die Proben weitere 3 h bei 54 °C unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Nach Abkühlen der Lösung auf RT wurde zwecks DNA-Extraktion ein gleicher Volumenanteil Tris-äquilibriertes Phenol (Roti®-Phenol pH 7.5-8.0, Roth) zugegeben und die beiden Phasen behutsam miteinander vermischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (5.000 rpm, 15 min, RT, Minifuge RF, Heraeus). Die wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß übertragen und der Phenolschritt 2 x wiederholt. Nach der dritten Extraktion wurden zu der wässrigen Phase 2 Vol 100%-iges EtOH und 0.2 Vol 5 M NH₄Ac gegeben. Der Ansatz wurde vermischt, bis keine Schlieren mehr erkennbar waren, und die präzipitierte DNA anschließend abzentrifugiert (5.000 rpm, 20 min, 4 °C). Das Pellet wurde mit 70%-igem EtOH gewaschen und bei RT getrocknet. Auf die DNA wurden 400 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) gegeben und ÜN bei 4 °C gelöst und gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der genomischen DNA erfolgte durch eine photometrische Messung, wobei zuvor eine Verdünnung von 1:100 hergestellt wurde (Kapitel 2.2.3).

2.2.2.3 *Isolierung genomischer DNA mit Hilfe von Kits*

Falls keine hochmolekulare DNA einzusetzen war, wurde die genomische DNA unter Verwendung des *DNeasy® Blood and Tissue Kit* (Qiagen) isoliert. Als Ausgangsmaterial dienten in der Vertiefung einer Sechsllochplatte bis zur Konfluenz kultivierte, adhärente Zellen, was einer ungefähren Zellzahl von je 1x10⁶ Zellen/Loch entspricht. Diese wurden 5 x mit eiskaltem PBS (w/o Ca/Mg) gewaschen, bevor sie mit je 1 ml PBS (w/o Ca/Mg) + 1 mM EDTA 5 min im Brutschrank abgelöst wurden. Die Zellen wurden daraufhin abzentrifugiert (2.000 rpm, 5 min, RT, Centrifuge 5415 D, Eppendorf) und in 200 µl PBS (w/o Ca/Mg) resuspendiert. Die Isolation der genomischen DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Methode basiert auf der Bindung der genomischen DNA an Silicagelmembranen, wodurch alle anderen zellulären Bestandteile durch verschiedene Waschschriffe entfernt werden konnten. Die genomische DNA wurde anschließend durch Zugabe von 200 µl Puffer AE und einem kurzen Zentrifugationsschritt (1 min, 8.000 rpm, RT) eluiert, die Konzentration photometrisch bestimmt (Kapitel 2.2.3) und die Proben bei 4 °C gelagert.

2.2.2.4 Isolierung von RNA

Isolierung von Gesamt-RNA

Um Gesamt-RNA aus Zellen zu präparieren, wurden die Zellen 1 x mit PBS (w/o Ca/Mg) gewaschen und abzentrifugiert (1.000 rpm, 5 min, 4 °C, Varifuge 3.0R, Heraeus). Ausgehend von der Zellzahl wurde eine entsprechende Menge Phenol- und GTC-haltiges *TRIzol*[®] Reagent (Invitrogen) zugegeben. Dabei gilt, dass pro 5 x 10⁶ Zellen je 1 ml TRIzol zu den Zellen gegeben werden sollte, um eine optimale Lyse zu erreichen. Die Proben wurden durch Pipettieren homogenisiert und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 200 µl Chloroform / ml TRIzol zugegeben, der Ansatz 15 s manuell geschüttelt und 3 min bei RT belassen. Die Phasentrennung erfolgte anschließend 15 min bei 5.000 rpm und 4 °C (Biofuge fresco, Eppendorf), wobei die obere, wässrige Phase im Anschluss in ein neues, RNase-freies Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt wurde. Zur Präzipitation wurden 500 µl RNase-freies Isopropanol / ml TRIzol zugegeben, der Ansatz 10 min bei RT inkubiert und die RNA anschließend abzentrifugiert (5.000 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das RNA-Pellet einmal mit 75%-igem RNase-freiem EtOH (1 ml EtOH / ml TRIzol) gewaschen und die RNA nochmals abzentrifugiert (5.000 rpm, 5 min, 4 °C). Nach dem Trocknen des RNA-Pellets bei RT wurde die RNA in autoklaviertem DEPC-H₂O aufgenommen. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (Kapitel 2.2.3) und die RNA-Qualität gelelektrophoretisch überprüft (Kapitel 2.2.5). Die Proben wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Isolierung von mRNA

mRNA wurde mit Hilfe des *mRNA-ONLY*[™] *Eukaryotic mRNA Isolation Kit* (Epicentre Biotechnologies) nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die photometrische Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration beruht darauf, dass Nukleinsäuren (260 nm) und Proteine (280 nm) unterschiedliche Absorptionsmaxima besitzen. Die Messung erfolgte mit Hilfe des Photometers *GeneQuant pro* (Amersham Biosciences). Die ermittelten Quotienten OD_{260}/OD_{280} geben eine Aussage über die Reinheit der aufbereiteten Nukleinsäuren. Bei reiner DNA sollte der Quotient zwischen 1.6 und 1.8 liegen, bei reiner RNA zwischen 2.0 und 2.2.

2.2.4 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die Agarosegelelektrophorese stellt ein einfaches und effektives Verfahren dar, um DNA-Moleküle nach ihrer Größe aufzutrennen. Dabei wirkt die auspolymerisierte Agarose als Molekularsieb, wodurch die negativ geladenen DNA-Moleküle während ihrer Wanderung im elektrischen Feld in Richtung Anode abhängig von ihrer Größe voneinander getrennt werden.

In den meisten Fällen wurde ein 1%-iges Agarosegel benutzt, um die DNA-Fragmente voneinander zu trennen. Hatten die zu trennenden DNA-Moleküle eine Größe über 5 kb, wurde die Agarosekonzentration auf 0.8 % reduziert. Im Gegensatz dazu wurde sie auf 1.5 % erhöht, falls die DNA-Fragmente kleiner als 0.5 kb waren. In letztem Fall wurde das Gel auch nicht mit 1x TAE (40 mM Tris-Acetate, 1 mM EDTA, pH 8.3), sondern mit 1x TBE (89 mM Tris/HCl, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA) angesetzt, um trotz der kleinen Fragmentgrößen distinkte Banden zu erhalten.

Nachdem die entsprechende Menge Agarose zu dem Puffer gegeben worden war, wurde die Suspension in der Mikrowelle bis zur vollständigen Auflösung der Agarose erhitzt. Die Lösung wurde auf etwa 50 °C abgekühlt und mit 50 µg/ml Ethidiumbromid (Roth) versetzt, welches in der Lage ist, mit DNA zu interkalieren, wodurch die DNA-Fragmente später per UV-Licht detektiert werden können. Das Gel wurde daraufhin in einen Gelschlitten gegeben und bis zur Weiterverwendung – mindestens jedoch 1 h – stehen gelassen, um eine vollständige Polymerisation zu gewährleisten. Bevor die DNA-Proben aufgetragen wurden, wurden diese mit 1/6 Vol 6x GLB (30 % Glycerin (v/v), 0.25 % Bromphenolblau, 0.25 % Xylencyanol) versetzt. GLB dient dabei nicht nur zur Markierung der Laufrichtung, sondern ermöglicht auch aufgrund des darin enthaltenen Glycerins ein Absacken der Proben in die Geltaschen. Um eine Aussage über die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente treffen zu können,

wurde als Größenstandard *SmartLadder*TM (Eurogentec) mitgeführt. Die Auftrennung der DNA-Moleküle erfolgte bei 120 V über einen Zeitraum von 1 h (Horizon11•14, Gibco). Die Gele wurden unter UV-Licht photographisch dokumentiert und die DNA-Banden gegebenenfalls aus dem Gel ausgeschnitten, um die DNA zur Weiterverwendung aus dem Gel zu isolieren (Kapitel 2.2.6).

2.2.5 Agarosegelelektrophorese von RNA

RNA lässt sich ebenfalls gelelektrophoretisch auftrennen, allerdings bedarf dies eines anderen Protokolls. Vor der Gelelektrophorese muss die RNA zuerst denaturiert werden, um die enthaltenen Sekundärstrukturen zu zerstören. Dabei wurden 1 µg Gesamt-RNA mit 10 µl Glyoxal-Mix versetzt, die Proben 30 min – 1 h bei 55 °C inkubiert und danach auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 3 µl 5x RNA-Blaumarker (10 mM Na₃PO₄, pH 6.8, 10% Ficoll, 0.4 g Bromphenolblau, autoklaviert) wurden die Proben auf ein 1.5%-iges Agarosegel (ohne Ethidiumbromid) aufgetragen, welches mit 1x BTPE-Puffer (10x BTPE: 10 mM PIPES, 30 mM Bis-Tris, 10 mM EDTA, pH 6.5) hergestellt wurde. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V während eines Zeitraumes von 3 h und wurde anschließend unter UV-Licht photographisch dokumentiert. Falls die RNA nicht degradiert ist, sollten zwei Banden zu sehen sein, bei denen es sich um die 18S-rRNA (1.9 kb) und die 28S-rRNA (4.7 kb) handelt, welche sich stöchiometrisch im Verhältnis von etwa 1:2 darstellen sollten.

Glyoxal-Mix:

DMSO (100 %)	6 ml
6 M Glyoxal (deionisiert)	2 ml
10x BTPE	1.2 ml
80 % Glycerin	0.6 ml
EtBr (10 mg/ml)	0.2 ml
Lagerung der Aliquots bei -80 °C	

2.2.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurde das *GeneClean[®] Turbo Kit* (Qbiogene) verwendet. Nach Zugabe eines hochkonzentrierten, chaotropen Salzes wurden die ausgeschnittenen Agaroseblöckchen durch Erwärmung geschmolzen und die DNA durch Anbindung an eine Silikagelmembran zurückgewonnen. Die Isolation aus dem Gel erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die DNA-Fragmente wurden durch Zugabe von 30 µl Aqua dest. von der Matrix eluiert und die DNA-Menge quantifiziert (Kapitel 2.2.3).

2.2.7 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Die Sequenzierung der Nukleinsäuren wurde von der Firma Eurofins MWG Operon durchgeführt (Option „value read“). Die DNA-Proben, welche eine Konzentration von je 1.5 µg aufwiesen, wurden in einer Speedvac sc 100 (Savant) lyophilisiert und auf dem Postweg versandt. Entweder wurden die Sequenzierprimer „M13 uni (-43)“ und „M13 rev (-49)“ verwendet, oder es wurden entsprechend spezifische Sequenzierprimer [10 pmol/µl] mitgeschickt.

2.2.8 Restriktion von Plasmid-DNA

Alle DNA-Restriktionen wurden mit kommerziell erhältlichen Endonukleasen (NEB) nach Angabe des Herstellers durchgeführt.

Standardansatz eines präparativen Restriktions-Verdaus:

- 10 µg DNA
- 10 U Restriktionsenzym (im Falle eines Doppelverdaus je 10 U)
- 5 µl 10x Puffer (Puffer 1-4 je nach Endonuklease, NEB)
- 5 µl 10%-iges BSA (essentiell für einige Restriktionsenzyme, NEB)
- ad 50 µl Aqua dest.

Die Restriktionsansätze wurden 3 h oder ÜN bei 37 °C inkubiert, danach auf ein Agarosegel aufgetragen (Kapitel 2.2.4) und das gewünschte DNA-Fragment gegebenenfalls aus dem Gel isoliert (Kapitel 2.2.6).

Im Falle eines analytischen Restriktions-Verdaus wurde das Volumen auf 20 µl reduziert, 1 µg Plasmid-DNA und dementsprechend weniger Enzym und Puffer verwendet. Die Inkubationsdauer betrug 1 h.

2.2.9 Ligation

Zur kovalenten Verknüpfung von Insert- und Vektor-DNA wurden äquimolare Mengen der zu ligierenden Fragmente eingesetzt und durch die Verwendung einer *T4-DNA-Ligase* (NEB) zusammengefügt. In einem Reaktionsvolumen von 10-20 µl wurden 10-200 ng Vektor-DNA mit 1 µl *T4-DNA-Ligase* und entsprechende Mengen von 5x *T4-DNA-Ligase*-Puffer und Insert-DNA 2 h bei RT oder ÜN bei 16 °C inkubiert. Nach Inkubation wurde der Ligationsansatz kurz bei -20 °C eingefroren. Zur anschließenden Transformation in kompetente *E. coli*-Stämme wurden 4-20 µl des Ligationsansatzes eingesetzt (2.2.1.2).

2.2.10 Auffüllen kohäsiver Enden von DNA

Wenn DNA-Fragmente ligiert werden sollten, welche zuvor mit Enzymen restringiert wurden, die nicht komplementäre Enden bilden, wurden diese 5'-überhängenden Enden mit Hilfe der *Klenow Large Fragment DNA Polymerase I* (NEB) und bei 3'-überhängenden Enden mit der *T4 DNA Polymerase* (NEB) nach Angaben des Herstellers aufgefüllt. Durch Zugabe von Nukleotiden wurden somit glatte Enden produziert, welche ligiert werden konnten.

2.2.11 Dephosphorylierung von DNA

Um zu verhindern, dass sich nach einer Restriktion die linearisierte DNA wieder rezirkuliert, wurde diese dephosphoryliert. Dazu wurde die *Antarctic Phosphatase* (NEB) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dieses Enzym kann hitzeinaktiviert werden, sodass eine anschließende Aufreinigung der DNA überflüssig wird.

2.2.12 Herstellung von cDNA

5 µg Gesamt-RNA wurden mit Hilfe des *SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.13 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Eine PCR erlaubt die selektive Amplifikation bestimmter DNA-Bereiche aus verschiedenen Ausgangsmaterialien (= Template) wie z.B. cDNA, genomischer oder Plasmid-DNA (Mullis and Faloona, 1987; Saiki et al., 1992). Dabei wird auf thermostabile, DNA-abhängige DNA-Polymerasen zurückgegriffen, die unter Anwesenheit von spezifischen Oligonukleotiden (Primer), Puffer, Desoxynukleotiden und unter bestimmten, zyklischen Bedingungen ein gewünschtes DNA-Fragment exponentiell vermehren können.

Im Allgemeinen lässt sich eine PCR-Reaktion in drei verschiedene Schritte unterteilen. Zunächst erfolgt ein Denaturierungsschritt bei 94 °C, sodass ein doppelsträngiges DNA-Template in seine Einzelstränge dissoziiert. Daraufgehend hybridisieren die Primer an komplementäre Bereiche innerhalb der Matrize, ein Schritt, den man als „Annealing“ bezeichnet. Für jedes eingesetzte Primerpaar gibt es eine optimale Annealingtemperatur, die abhängig vom G/C-A/T-Gehalt sowie der Länge der Primer ist und sich nach der Wallace-Regel (Suggs et al., 1981) kalkulieren lässt: $T_a [^{\circ}\text{C}] = 4x(\text{G}+\text{C}) + 2x(\text{A}+\text{T}) - 5$. Der dritte Schritt einer PCR besteht in der Elongation des zu vervielfältigenden DNA-Abschnittes bei einer Temperatur von 72 °C, was in der Regel dem Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase entspricht.

In den meisten Fällen wurde die *Taq*-Polymerase (NEB) bzw. die *AmpliTaq Gold*[®] DNA Polymerase (Applied Biosystems) verwendet, die dem Archaeobakterium *Thermus aquaticus* entstammen. Dieses Enzym verfügt über eine gute Prozessivität, jedoch nicht über eine 3'-5'-Korrekturlesefunktion. Daher wurde bei der Amplifikation größerer Fragmente entweder auf die *Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase* (Finnzymes über NEB) oder das *Expand High Fidelity PCR System* (Roche) zurückgegriffen. Bei Ersterem handelt es sich um eine Polymerase, die sowohl über eine 5'-3'-Polymerase- als auch über eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität verfügt. Bei Letzterem wiederum handelt es sich um ein Polymerasegemisch, bestehend aus der *Taq*-Polymerase und der *Pwo*-Polymerase aus *Pyrococcus woesei*. Bei der Amplifikation von Bereichen aus genomischer DNA hat sich die *KOD XL DNA Polymerase* (Novagen) als hilfreich erwiesen, da sie neben einer effizienten Amplifikationsrate auch sehr akkurat über GC-reiche und lange DNA-Bereiche liest.

Ein Standard-PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Template	10 ng bei Plasmid-DNA bzw. 100-500 ng bei genomischer DNA bzw. Aliquot einer Bakterienkultur (= Kolonie-PCR) bzw. 2 µl cDNA
Betain	5 µl (eingesetzt bei PCR auf genomischer DNA)
10x PCR-Puffer	5 µl
vorwärts (<i>forward</i>)-Primer	10 pmol
rückwärts (<i>reverse</i>)-Primer	10 pmol
Desoxynukleotide	je 200 µM
Polymerase	1-5 U
Aqua dest.	ad 50 µl

Standard-PCR-Reaktion:

initiale Denaturierung:	1x	94 °C	3 min
Amplifikation:	35x	94 °C	30 sec
		T_a [°C]	30 sec
		72 °C	x sec oder min
finale Elongation:	1x	72 °C	10 min
abkühlen:	1x	4 °C	halten über die Zeit

Die Annealingtemperatur (T_a) wurde entsprechend der verwendeten Primer festgelegt. Die Elongationszeit bei 72 °C richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes sowie nach der Amplifikationsrate der eingesetzten Polymerase. Je nach verwendeter Polymerase wurden die PCR-Bedingungen entsprechend den Angaben des Herstellers modifiziert.

2.2.14 Rapid Amplification of cDNA ends (RACE)

Die UTR-Bereiche einer mRNA wurden unter Verwendung des *5'/3'RACE Kit, 2nd Generation* und des *Expand High Fidelity PCR System* (beides von Roche Applied Science) identifiziert. Die entsprechenden Kits wurden nach Angaben des Herstellers verwendet. Für die cDNA-Synthese, bei der es sich um den ersten Schritt der RACE handelt, wurde isolierte mRNA verwendet (Kapitel 2.2.2.4).

2.2.15 Radioaktive Markierung

2.2.15.1 Radioaktive Markierung des λ -HindIII-Markers

Zur radioaktiven Markierung des Markers wurde das *Amersham Rediprime II DNA Labeling System* (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers verwendet. 3 μ l λ -HindIII-Marker (NEB) wurden mit TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) ad 50 μ l in ein Safe-Lock-Reaktionsgefäß (Eppendorf) gegeben und 5 min im Wasserbad aufgeköcht, bevor der Ansatz 5 min auf Eis abgekühlt wurde. Danach wurde der denaturierte Marker auf einen im Kit vorhandenen, bereits aliquotierten Reaktionsmix gegeben und dazu 5 μ l (= 50 μ Ci = 1.85 MBq) [α -P32]dCTP (Hartmann Analytic) gegeben. Der Ansatz wurde 12x auf- und abpipettiert und 10 min bei 37 °C inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 5 μ l 0.2 M EDTA abgestoppt wurde. Die Aufreinigung des radioaktiv markierten Markers erfolgte über *illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns* (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers. Vom Eluat wurden 2 μ l abgenommen, in ein Szintillationsröhrchen (*Mini Poly-Q Vial*, Beckman) überführt und die spezifische Radioaktivität [cpm] der Fraktion durch den Szintillationszähler LS-6500 (Beckman) ermittelt. Pro im Gel mitgeführter Markerspür wurden 2×10^5 cpm eingesetzt (Kapitel 2.2.16). Der markierte Marker wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.15.2 Radioaktive Markierung einer DNA-Sonde

Zur Sondenmarkierung wurde aufgrund der höheren Ausbeute das *Amersham MegaprimeTM DNA Labeling Kit* (RPN1606, GE Healthcare) verwendet. Hierzu wurden 50 ng des nach Isolation aus dem Agarosegel aufgereinigten Restriktionsfragmentes mit 5 μ l Primer (im Kit vorhanden) gemischt und ad 50 μ l mit Aqua dest. aufgefüllt. Der Ansatz wurde 5 min im Wasserbad aufgeköcht und abzentrifugiert. Nach Abkühlung des Ansatzes auf Eis wurden 10 μ l Puffer, 2 μ l Klenow-DNA-Polymerase und 5 μ l (= 50 μ Ci = 1.85 MBq) [α -P32]dCTP (Hartmann Analytic) zugegeben, einige Male auf- und abpipettiert und 10 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 5 μ l 0.2 M EDTA wurde der radioaktive Einbau abgestoppt. Während der Ansatz auf Eis gelagert wurde, wurde parallel eine NICKTM-Säule (*Sephadex G-50 DNA Grade*, Amersham Biosciences) mit 1 ml 1x TEN (50 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0) äquilibriert. Danach wurde der radioaktive Ansatz mittig auf den Filter der Säule aufgebracht und durch Zugabe von 1x TEN eluiert. Dieser Schritt dient dazu, die nicht inkorporierten Radionukleotide

und die radioaktiv markierte DNA-Sonde voneinander zu trennen. Dabei wurden die ersten 8 Tropfen verworfen, die restlichen in zwölf 1.5 ml-Reaktionsgefäßen zu je 2 Tropfen/Fraktion gesammelt. Von jeder Fraktion wurde wie in Kapitel 2.2.15.1 angegeben die spezifische Radioaktivität [cpm] ermittelt. Diejenigen Fraktionen, welche die Sonde enthielten, wurden in einem Safe-Lock-Reaktionsgefäß (Eppendorf) vereint, vor der Hybridisierung nochmals kurz aufgekocht (5 min) und direkt wieder auf Eis gestellt, um die Sonde einzelsträngig zu halten. Die Sonde wurde direkt nach der Markierung verwendet.

2.2.16 Southern Blot

10 µg hochmolekulare, genomische DNA (Kapitel 2.2.2.2) wurden mit je 100 U *EcoRI* (h.c.) bzw. 100 U *BglII* (h.c.) 3.5 h bei 37 °C restringiert. Die Proben wurden mit 1/6 Vol 6x GLB versetzt und in die Taschen eines großen (20x24 cm) 0.8%-igen Agarosegels gegeben. Rechts bzw. links der Proben wurde λ -HindIII-Marker (3 µl Marker, 5 µl Aqua dest., 2 µl Blaupuffer) aufgetragen, dem zuvor je 2×10^5 cpm radioaktiv markierter λ -HindIII-Marker zugefügt wurde, um die Markerbanden nicht nur bei der photographischen Dokumentation unter UV-Licht, sondern auch später nach der Filmexposition erkennen zu können. Die Proben wurden bei 100 V über einen Zeitraum von 1.5 h in das Gel einlaufen gelassen, danach wurde die Gelelektrophorese ÜN bei 50 V fortgesetzt. Am nächsten Tag wurde das Gel photographisch unter UV-Licht dokumentiert, bevor es für den Southern Blot vorbehandelt wurde. Um DNA-Fragmente über 5 kb Länge effizient auf eine Membran zu transferieren, erfolgte zuerst eine Depurinierung der DNA, wofür das Gel mit 0.25 M HCl überschichtet und 15 min lang auf einem Taumelschüttler (WT 12, Biometra) belassen wurde. Darauf erfolgte eine 2 x 20-minütige Lagerung des Gels in Denaturierungslösung (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl), gefolgt von einer 2 x 20-minütigen Inkubation in Neutralisationslösung (0.5 M Tris, pH 7.5, 1.5 M NaCl). Danach wurde das Gel auf zwei Lagen Whatman-3MM-Papier (Schleicher & Schuell) gebettet, welches in ein mit 20x SSC (3 M NaCl, 0.3 M NaCitrat, pH 7.0) gefülltes Reservoir ragte. Direkt auf das Gel wurde eine auf Gelgröße zugeschnittene Nylonmembran (Porablot NY amp, Machery & Nagel) gelegt. Die Seitenränder des Gels wurden mit Plastikstegen umrandet, um sicherzustellen, dass der Transferpuffer nicht am Gel vorbeiläuft. Der Blotaufbau wurde durch Auflegen mehrerer Schichten Whatman-3MM-Papier, einem Stapel saugfähiger Papiertücher und einem Gewicht

von 500 g abgeschlossen. Der Kapillartransfer der DNA erfolgte ÜN und bei RT vertikal aus dem Gel heraus auf die Nylonmembran. Am darauf folgenden Tag wurde der Blot abgebaut, die Membran 5 min in 6x SSC gelegt und die DNA anschließend durch UV-Bestrahlung im *UV StratalinkerTM 1800* (Stratagene) kovalent an die Nylonmembran gebunden, bevor die Membran für die radioaktive Hybridisierung verwendet wurde (Kapitel 2.2.17).

2.2.17 Radioaktive Hybridisierung der Membran mit der DNA-Sonde

Um eine unspezifische Hybridisierung der DNA-Sonde zu verhindern, wurde die Nylonmembran in einer Rollflasche mit 20 ml Hybridisierungslösung (6x SSC, 5x Denhardt (Sigma), 0.5 % SDS, 50 µg/ml Hefe-tRNA (Invitrogen)) 3 h lang bei 65 °C präinkubiert. Die markierte DNA-Sonde (Kapitel 2.2.15.2) wurde vor der Verwendung nochmals durch zehnminütiges Aufkochen denaturiert und in einer Konzentration von $1\text{-}2 \times 10^6$ cpm/ml frischer Hybridisierungslösung eingesetzt und diese dann auf die Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte 72 h lang bei 65 °C in einem Hybridisierungsofen. Zur Entfernung ungebundener Sonden-DNA wurde der Blot mit Waschpuffer I (2x SSC, 0.1 % SDS) 3x20 min (2x bei RT, 1x bei 65 °C) behandelt. Darauf folgte ein zweiter Waschschrift mit Waschpuffer II (0.2x SSC, 0.1 % SDS) bei 65 °C über einen Zeitraum von 20 min. Anschließend wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt, in eine Filmkassette geklebt, ein Film (HyperfilmTM, Amersham Biosciences) aufgelegt und dieser bis zur Entwicklung 4 Tage bei -80 °C exponiert.

2.2.18 Isolation eines porzinen BAC-Klones

Diese Isolation wurde von Ronny Möller (PEI) durchgeführt und ist Bestandteil der Publikation Dörrschuck *et al.* (Dörrschuck *et al.*, 2011).

Zur Gewinnung eines porzinen BAC-Klons, welcher den kompletten A3-Genlokus enthielt, wurde die *CHORI-242 porcine (Sus Scrofa) BAC library* (<http://bacpac.chori.org/porcine242.htm>) (Osoegawa *et al.*, 1998)) unter Zuhilfenahme eines HDH-Filter-Sets (Nummer: 007344) durchsucht. Das Filterset bestand aus elf positiv geladenen, 22x22 cm großen Nylonfiltern, auf denen alle Klone der Bibliothek in Gitterform aufgetragen waren. Die Filter wurden mit der [alpha-P32]dCTP-markierten, C-terminal gelegenen, porzinen A3-Sonde hybridisiert (Kapitel 2.2.15.2) und gemäß des Southern-Blot-Protokolls (Kapitel 2.2.16) bearbeitet. Da jeder Klon zweimal in kurzem Abstand und in einem bestimmten

Muster voneinander aufgetragen wurde, konnten die beiden Signale mit Hilfe einer mitgelieferten Schablone genau einem Klon zugeordnet werden. Somit wurde ein BAC-Klon (Name: AC2) mit positivem Signal (Klon-Nummer: CH242-330G8) bestellt und dieser für eine Kolonie-PCR eingesetzt (Kapitel 2.2.13), um sicher zu gehen, dass der komplette A3-Genlokus innerhalb der BAC-DNA vorliegt. Dafür wurden die Primer f_Intron1_1 und r_Exon2_2 verwendet, welche an den N-terminal lokalisierten Bereich des porzinen A3Z2-Gens binden. Danach wurde die DNA unter Verwendung des *QIAGEN® Large-Construct Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die BAC-DNA wurde anschließend für eine Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) eingesetzt (Kapitel 2.4.5).

2.2.19 Radiation hybrid (RH)-mapping

Dieser Versuch wurde von Dr. Andreas Spötter (TiHo Hannover) durchgeführt und ist Bestandteil der Publikation Dörrschuck *et al.* (Dörrschuck *et al.*, 2011).

Das hier verwendete *INRA-University of Minnesota porcine Radiation Hybrid panel* (RH-panel) (Hawken *et al.*, 1999; Milan *et al.*, 2000; Yerle *et al.*, 1998) stammt von *INRA, Laboratoire de Genetique Cellulaire, BP27, Castanet-Tolosan, France*. Das RH-Panel besteht aus 118 Schwein-Hamster-Hybridklonen, deren genomische DNAs für zwei verschiedene PCR-Reaktionen verwendet wurden. Die erste PCR wurde mit dem Primerpaar f_Intron1_1 und r_Exon2_2 durchgeführt, welches eine Genregion von 276 bp flankiert und das 3'-Ende des Introns 1 und einen Großteil des Exons 2 des porzinen A3Z2-Gens umfasste. Mit dem zweiten Primerpaar f_Exon5_1 und r_Intron5_1 wurde ein 479 bp langes Fragment amplifiziert, welches den 3'-Teil des Exons 2 und den 5'-Teil des Introns 2 des porzinen A3Z3-Gens enthält. Für die PCR wurde die *Taq*-Polymerase verwendet, die Reaktion verlief über 30 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt bei 94 °C (1 min), einem Annealing bei 62 °C (1 min) und einer Elongation bei 72 °C (45 sec). Da die PCR auf genomischer DNA erfolgte, wurde den Ansätzen Betain zugefügt. Die PCR-Ergebnisse wurden wie folgt ausgewertet: für jeden Hybridklon, welcher jeweils ein Chromosomen-Fragment der Schweine-DNA enthält, wurde analysiert, ob die PCR zu einem positiven (1) oder zu einem negativen Ergebnis (0) führte. Somit wurde eine Kodierung aus 118 Zahlen erhalten, welche statistisch unter Zuhilfenahme der frei zugänglichen Software *IMpRH mapping tool* (<http://www.toulouse.inra.fr/>) ausgewertet wurde. Dabei wurde mit Hilfe der Zweipunktanalyse dieses Programmes die Kodierung aller in der Genbank

vorhandenen, chromosomalen Marker mit den entsprechenden Kodierungen der durchgeführten PCRs verglichen. Somit wurden die am nächsten gelegenen Marker identifiziert und determiniert, mit welchen Markern der porcine A3-Genlocus gekoppelt vorliegt, um aufgrund dieser Resultate wiederum eine Aussage treffen zu können, auf welchem porcinen Chromosom (SSC; *Sus scrofa chromosome*) die beiden Gene lokalisiert sind.

2.3 Zellkultur und virologische Methode

2.3.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Zelllinien bzw. primären Zellen wurden in entsprechendem Medium (Kapitel 2.1.5) sowie einem Inkubator (BBD6220, Heraeus) bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Feuchte von 95 % kultiviert und zweimal pro Woche passagiert. Dabei wurden die adhärenenten Zellen einmal mit PBS (w/o Ca/Mg) gewaschen und durch Zugabe von 2 ml Trypsinlösung (10 ml 2.5%-iges Trypsin Melnick, 15 ml Versen, 30 ml PBS (w/o Ca/Mg)) pro T75-Zellkulturflasche vom Flaschenboden abgelöst und danach in 8 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert. Adhärenente Zellen wurden regulär im Verhältnis 1:10 gesplittet. Suspensionszellen hingegen wurden abzentrifugiert (1.000 rpm, 5 min, RT, Varifuge 3.0R, Heraeus), ausgezählt (Kapitel 2.3.4) und auf eine Zellzahl von 1x10⁶ Zellen/ml mit frischem Medium eingestellt.

Versen

NaCl	159 mM
KCl	3 mM
Na ₂ HPO ₄	6.6 mM
KH ₂ PO ₄	1.2 mM
Titriplex	0.2 mM

2.3.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Einfrieren

Subkonfluente, adhärenente Zellen wurden vom Boden des Kulturgefäßes abtrypsinisiert und in entsprechendem Medium resuspendiert. Die abgelösten Zellen bzw. Suspensionszellen wurden ausgezählt (Kapitel 2.3.4) und anschließend abzentrifugiert (1.000 rpm, 5 min, 4 °C, Varifuge 3.0R, Heraeus). Tropfenweise und unter vorsichtigem Schwenken wurde Einfrierlösung (90 % FKS (Gibco), 10 % DMSO (Sigma)) zugegeben, bis eine geeignete Zellkonzentration vorlag. Diese liegt bei adhärenenten Zellen bei $1\text{-}2 \times 10^6$ Zellen/ml, bei Suspensionszellen $5\text{-}10 \times 10^6$ Zellen/ml. Je 1.8 ml Zellsuspension wurde in Kryogefäße (*Cryo Vials*, Greiner) eingefüllt, die Gefäße in einen mit Isopropanol gefüllten Behälter (Nalgene) gestellt, bei -80 °C ÜN gefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff transferiert.

Auftauen

Die Kryogefäße wurden dem flüssigen Stickstoff entnommen, bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension in einer T75-Kulturflasche ausgesät, in die zuvor das entsprechende, vorgewärmte Kulturmedium gefüllt wurde. Die Zellen wurden ÜN im CO₂-Inkubator kultiviert. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium nochmals gewechselt, um das cytotoxische DMSO zu entfernen.

Sobald die Zellen konfluent gewachsen waren, wurde vor dem ersten Splitten ein Test auf Kontamination durch Mycoplasmen durchgeführt. Dabei wurde das *PCR-Mycoplasmen-Testkit* (AppliChem) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.3.3 Präparation von PBMCs

PBMCs wurden aus maximal 30 ml Blut über einen Dichtegradienten isoliert. Hierfür wurde 15 ml vorgewärmtes Histopaque®-1077 (Sigma) in ein Leucosep-Röhrchen mit Trennscheibe (Greiner) gegeben. Das Histopaque wurde unter die Fritte zentrifugiert (2.200 rpm, 10 min, RT, Varifuge 3.0R, Heraeus). Dann wurde das Blut in das Falkongefäß gegeben und ein 20-minütiger Zentrifugationsschritt ohne Bremse bei 2.200 rpm und RT angeschlossen. Dabei wurden die PBMCs von Granulozyten, Thrombozyten und Erythrozyten getrennt. Der milchig-trübe PBMC-Ring – bestehend aus Lymphozyten und Monozyten – wurde mit einer Pipette abgezogen, in ein 50 ml-PP-Röhrchen (Greiner) überführt und 2x mit PBS (w/o Ca/Mg) ad 50 ml gewaschen. Noch im Pellet vorhandene Erythrozyten wurden durch 15-minütige Inkubation in

20 ml 0.86%-iger NH_4Cl -Lösung bei 37 °C lysiert. Die Zellen wurden nochmals mit PBS (w/o Ca/Mg) gewaschen, in 5 ml Medium (Kapitel 2.1.5) aufgenommen und die Zellzahl bestimmt (Kapitel 2.3.4). Ein Teil der Zellen wurde eingefroren (Kapitel 2.3.2) und der Rest für die Aufreinigung genomischer DNA (Kapitel 2.2.2.2) bzw. RNA (Kapitel 2.2.2.4) verwendet. Vor der RNA-Isolierung wurden die Zellen zuerst in Kultur genommen. Dies setzte voraus, dass die Zellen auf etwa 1×10^6 Zellen/ml Medium eingestellt und mit PHA [5 µg/ml] (Calbiochem) stimuliert wurden. Nach drei Tagen wurde das Medium ausgetauscht und RPMI1640 mit IL-2 (200 U/ml Medium; R&D Systems) verwendet.

2.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Adhärente Zellen wurden in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer (Tiefe: 0.2 mm, Fläche: 0.0625 mm^2) ausgezählt. Vor der Bestimmung wurde ein Aliquot der Zellsuspension 1:10 mit Medium verdünnt. Davon wurde wiederum ein Aliquot 1:2 mit Trypanblau (Gibco) vermischt. Die Auszählung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Suspensionszellen wurden im Kulturmedium resuspendiert, ein Aliquot vor der Pelletierung der Zellen genommen und 1:2 mit Trypanblau versetzt. Die Auszählung wurde in einer Thoma-Kammer (Tiefe: 0.1 mm, Fläche: 0.0025 mm^2) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.5 Transfektion adhärenter Zelllinien

Transiente Transfektion

Eine Transfektion in einer Sechslachplatte (Cell+, Sarstedt) wurde mit *LipofectamineTM Transfection Reagent* und *PLUS-Reagenz* (beides von Invitrogen) durchgeführt. Die dabei entstehenden DNA-Liposomen-Komplexe können durch Membranfusion mit den zu transfizierenden Zellen verschmelzen und Plasmid-DNA auf diesem Wege in die Zelle eingebracht werden. Am Tag vor der Transfektion wurden je 8×10^5 HEK-293T-Zellen/Loch ausgesät, um für die Transfektion eine 80%-ige Konfluenz zu gewährleisten. Pro Transfektionsansatz wurden das PERV/EGFP- bzw. MLV/EGFP-Expressionsplasmid, ein A3-Expressionsplasmid bzw. das leere Plasmid pcDNA3.1Zeo(+) sowie das VSV-G kodierende Plasmid pMD.G2 in einem Verhältnis von 1:1:0.1 (1 µg:1 µg:100 ng) zueinander gegeben. Dazu kamen 20 µl PLUS-Reagenz und 100 µl serumfreies Medium, gefolgt von einer 15-minütigen Inkubation bei RT. Jedem Ansatz wurden 5 µl Lipofectamine und weitere 100 µl serumfreies Medium zugefügt. Nach erneuter 15-minütiger Inkubation

wurden die Ansätze ad 1 ml mit serumfreiem Medium aufgefüllt und auf die zuvor mit serumfreiem Medium gewaschenen Zellen gegeben (3 h, CO₂-Inkubator). Danach wurden die Transfektionsansätze durch serumhaltiges Medium ersetzt. Zur Verbesserung der Virusproduktion wurde das Medium nach 24 h erneuert.

Falls ein größerer Maßstab gebraucht wurde, erfolgte die Transfektion in T75-Zellkulturflaschen (Nunc). Dabei wurden 8x10⁶ HEK-293T-Zellen/Flasche am Abend zuvor ausgesät. Die drei Plasmide (s. o.) wurden zu je 8 µg:8 µg:800 ng verwendet, 780 µl Optimem I (Gibco) sowie 860 µl Lösung B (80 µl Lipofectamine + 780 µl Optimem 1) zugegeben und die Ansätze 45 min bei RT zwecks Komplexbildung inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit PBS (w/o Ca/Mg) wurde der Ansatz mit Optimem 1 auf 8 ml aufgefüllt und 4 h lang auf die Zellen gegeben (CO₂-Inkubator). Danach wurde der Ansatz wieder durch serumhaltiges Medium ersetzt. Zur Verbesserung der Virusproduktion wurde das Medium nach 24 h erneuert. Nach zwei Tagen wurde die Transfektionseffizienz fluoreszenzmikroskopisch kontrolliert. Dabei wurde das Mikroskop Axiovert 200M der Firma Zeiss verwendet.

Stabile Transfektion

Um stabil A3-exprimierende HEK-293T-Zelllinien herzustellen, wurden die Zellen im Sechslotchformat mit 500 ng der entsprechenden Plasmid-DNA unter Verwendung von Lipofectamine und PLUS-Reagenz transfiziert. Die DNA wurde mit 10 µl PLUS-Reagenz und 100 µl serumfreiem Medium versetzt, 15 min bei RT inkubiert und im Anschluss 2.5 µl Lipofectamine und weitere 100 µl serumfreies Medium zugegeben. Die Transfektion wurde wie oben angegeben durchgeführt. Der Unterschied zur transienten Transfektion bestand darin, dass nach einem Tag das geneticinhaltige Medium gegen geneticinfreies Medium ausgetauscht wurde. Nach einem weiteren Tag erfolgte ein erneuter Mediumwechsel. Bei diesem Schritt wurde Medium auf die Zellen gegeben, welches mit Zeocin supplementiert wurde (400 µg/ml Medium, Invitrogen), um damit diejenigen Zellen zu selektionieren, welche erfolgreich transfiziert wurden. Die sich bildenden Kolonien eines Ansatzes wurden vereint und unter fortwährender Selektion mit zeocinhaltigem Medium kultiviert.

2.3.6 Abnahme viraler Überstände

Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellkultur-Überstände, in denen sich die pseudotypisierten Viruspartikel befanden, abgenommen und in ein Kryoröhrchen (Greiner) sterilfiltriert (0.45 µm Filter, Sartorius). Es wurden 2x 100 µl Aliquots für die RT-Aktivitäts-Bestimmung hergestellt (Kapitel 2.3.7) und alle Proben bei -80 °C gelagert.

2.3.7 Aktivitätsbestimmung der reversen Transkriptase (RT)

Die Menge an pseudotypisierten Viruspartikeln im Zellkulturüberstand wurde indirekt über ihre RT-Aktivität bestimmt. Dafür wurde das Protokoll B des *C-type-RTTM Activity Assay* (Cavidi Tech) nach Angaben des Herstellers benutzt. Grundlage des Assays ist der Einbau von im Reaktionsmix enthaltenen Bromo-Deoxyuridintriphosphaten (BrdUTP) in einen DNA-Strang. Dieser wird nach Bindung der RT – welche den Viruspartikeln entstammt und durch Lyse der Viren freigesetzt wurde – an einen immobilisierten polyA-Matrizen/Primer-Komplex synthetisiert. Im nächsten Schritt lagern sich Antikörper spezifisch an BrdUTP an, die wiederum mit einer Alkalischen Phosphatase gekoppelt sind. Die kolorimetrische Detektion (405 nm) erfolgt durch Zugabe von *para*-Nitrophenylphosphat (farblos), welches durch die Phosphatase zu *para*-Nitrophenol (gelb) umgesetzt wird. Dabei ist die Gelbfärbung proportional zur RT-Aktivität der Probe. Je 10 µl der viralen Überstände wurden pro Loch einer 96-Lochplatte aufgetragen. Falls die Proben eine zu hohe RT-Aktivität besaßen, wurden diese 1:5 oder 1:10 mit im Kit enthaltenem Puffer B verdünnt. Von jeder Probe wurde eine Dreifachbestimmung zwecks Erstellung des Mittelwertes durchgeführt. Aufgrund eines mitgeführten MMuLV-RT-Standards konnte die RT-Aktivität [mU/ml] einer jeden Probe bestimmt werden.

2.3.8 Replikationsstudien von PERV auf stabil transfizierten HEK-293T

Die stabil A3-exprimierenden HEK-293T-Zellen wurden im Sechsllochformat ausgesät und während des gesamten Versuchszeitraumes in zeocinhaltigem Medium kultiviert. Am Tag nach der Aussaat wurde die Replikationskurve durch Transfektion von 1 µg pBS_Not [PERV-B(33)ATG] #7 gestartet. Dabei wurden Lipofectamine und PLUS-Reagenz entsprechend der eingesetzten DNA-Menge verwendet. Über einen Zeitraum von 30 Tagen wurden im Abstand von 3-4 Tagen die viralen Überstände

genommen (Kapitel 2.3.6) und die Zellen entsprechend gesplittet. Die RT-Aktivität der Proben wurde anschließend bestimmt (Kapitel 2.3.7).

2.3.9 Transduktion adhärenter Zelllinien

Am Abend vor der Transduktion wurden 1.5×10^5 HEK-293T-Zellen pro Loch einer Zwölflochplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Virus-Überstände aufgetaut und je 80 mU RT pseudotypisierte PERV/EGFP bzw. 50 mU RT pseudotypisierte MLV/EGFP in einem $V_{\max}$ von 500 μ l auf die Zellen gegeben. Dabei wurde jeder verwendete virale Überstand für je drei Transduktionen eingesetzt, um bei der Auswertung einen Mittelwert zu erhalten. Die Transduktionsansätze wurden 6 h lang auf den Zellen belassen (CO_2 -Inkubator), ehe sie durch frisches Medium ersetzt wurden.

2.3.10 Fluorescence activated cell sorting (FACS)

Drei Tage nach der Transduktion wurden die Zellen zweimal mit PBS (w/o Ca/Mg) gewaschen und durch Zugabe von je 300 μ l PBS (w/o Ca/Mg) + 1 mM EDTA pro Loch einer Zwölflochplatte aus den Vertiefungen abgelöst. Die Zellen eines Ansatzes wurden jeweils in ein FACS-Röhrchen (BD Biosciences) überführt, die Röhrchen mit FACS-Waschpuffer (1 % FKS (v/v), 0.1 % NaN_3 (w/v) in PBS (w/o Ca/Mg)) aufgefüllt und die Zellen abzentrifugiert (1.200 rpm, 10 min, 4 °C, Minifuge T, Heraeus). Die Zellen wurden anschließend durch Zugabe von FACS-Fix (1 % Paraformaldehyd (w/v) in PBS (w/o Ca/Mg)) auf 5×10^5 Zellen/ml eingestellt und bis zur Messung bei 4 °C (maximal eine Woche) gelagert.

Die Zellen wurden im FACScan (BD Biosciences) vermessen. Die Durchflusszytometrie beruht darauf, dass Zellen mit Hilfe eines Flüssigkeitsstromes vereinzelt werden. Dabei wird jede Zelle entlang ihres Weges vertikal durch eine Messkammer geleitet, durch die ein Laserstrahl ($\lambda = 488 \text{ nm}$) horizontal hindurch geschickt wird. Wenn der Laserstrahl auf eine Zelle trifft, kommt es zur Lichtstreuung, mit deren Hilfe zwei Parameter gemessen werden, zum einen das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC), zum anderen das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC). Mit Hilfe dieser beiden Parameter lässt sich einerseits eine Aussage über die Zellgröße, andererseits über die Zellgranularität machen. Trägt man beide Größen gegeneinander auf, erhält man graphisch einen so genannten Dot Blot, mit dessen Hilfe man Zellpopulationen identifizieren bzw. vitale Zellen von Zelltrümmern oder toten Zellen differenzieren kann. Über die gewünschte Zellpopulation wurde

graphisch ein Gitter (*gate*) gelegt, so dass bei der Auswertung bzw. Messung nur die Zellen innerhalb dieses Gitters berücksichtigt werden.

Weiterhin kann durch ein Durchflusszytometer Fluoreszenz gemessen werden, wie in diesem Falle die intrazelluläre EGFP-Expression. Durch Bestrahlung der Zellen mit Laserlicht wird EGFP angeregt und emittiert grünes Licht ($\lambda = 509 \text{ nm}$), das wiederum unter Verwendung eines FITC-Filters (Kanal FL1) detektiert wurde.

Für die Auswertung wurde der SSC der gegateten Zellen gegen die Fluoreszenz (FL1) aufgetragen und somit ein Dot Blot generiert, auf dem die Verteilung der grün fluoreszierenden Zellen gegenüber den nicht fluoreszierenden Zellen zu erkennen war. Dieser Dot Blot war wiederum unterteilt in Quadranten, wobei der Quadrant rechts unten (lower right, LR) für die Auswertung von Bedeutung war. Der dort liegende, prozentuale Anteil an Zellen diente als Ausgang für die mathematische Auswertung zur Berechnung der retroviralen Infektiosität.

Folgende mathematische Berechnung wurde durchgeführt:

$$(\text{LR \% gated} / 100) * 150.000 * 2 * 1 = \text{Infektiosität [TU/ml]}$$

150.000 = ausgesäte Zellzahl

2 = Hochrechnen des Volumens auf 1 ml (Vol bei Transduktion = 500 μl)

1 = Verdünnungsfaktor des eingesetzten viralen Überstandes

2.3.11 Untersuchung der Deaminierungsrate der A3-Proteine

An Tag 1 wurden je $8 \cdot 10^5$ HEK-293T-Zellen in die Vertiefung einer Sechsllochplatte eingebracht und ÜN im CO_2 -Inkubator bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Zur Transduktion dienten mit VSV-G pseudotypisierte PERV-EGFP-Partikel, die entweder in Abwesenheit (d.h. Verwendung des Plasmids pcDNA3.1/Zeo(+); Invitrogen) oder Anwesenheit von A3-Proteinen produziert wurden. Die viralen Überstände wurden auf 60 mU RT normiert und vor der Transduktion mit DNaseI-verdaut, um eventuell vorhandene Plasmid-DNA zu entfernen. Dabei wurde zu dem entsprechenden Volumen des viralen Überstandes 1/20 Vol DNaseI (NEB) zugegeben, der Ansatz gemischt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die mit DNaseI verdauten Überstände wurden auf die Zellen gegeben und 10-12 h auf den Zellen belassen. Die Zellen wurden im Anschluss 2x mit DMEM und 3x mit PBS (w/o

Ca/Mg) gewaschen und in PBS (w/o Ca/Mg) durch Auf- und Abpipettieren von den Platten gelöst. Die Zellen wurden pelletiert (3.500 rpm, 5 min, 4 °C, Biofuge fresco, Heraeus) und in 200 µl PBS (w/o Ca/Mg) aufgenommen. Die genomische DNA wurde mit Hilfe des *DNeasy[®] Blood and Tissue Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert (Kapitel 2.2.2.3). Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei OD₂₆₀ bestimmt und je 100 ng für eine PCR verwendet. Dabei wurde die 720 bp umfassende EGFP-Sequenz aus den integrierten PERV-EGFP-Proviren amplifiziert (Kapitel 2.2.13). Die PCR-Produkte wurden wie in Kapitel 2.2.9 beschrieben kloniert, die Plasmide in DH5α transformiert (Kapitel 2.2.1.2) und pro Ansatz je 10 positive Klone zur Sequenzierung geschickt (Kapitel 2.2.7). Die erhaltenen G-zu-A-Mutationen innerhalb der (+)-DNA-Stränge, die durch die untersuchten A3-Proteine verursacht wurden, wurden gezählt, um die Mutationsrate pro 100 Nukleotide für jede einzelne Cytosindeaminase zu erhalten.

Folgende Berechnung zur Ermittlung der Mutationsrate wurde durchgeführt:

$(\text{Anzahl aller mutierter G's in 10 EGFP-Sequenzen} / 7200 \text{ bp}) * 100$

7.200 = Anzahl der Gesamtnukleotide (EGFP (720 bp) * 10 Klone)

2.3.12 Ultrazentrifugation zur Aufkonzentrierung retroviraler Partikel

Die pseudotypisierten Viruspartikel wurden durch transiente Transfektion von HEK-293T-Zellen mit dem PERV/EGFP-Expressionsplasmid und dem Glykoprotein-Expressionsplasmid in An- oder Abwesenheit der A3-exprimierenden Plasmide produziert. Dabei wurde wie in Kapitel 2.3.5 angegeben der Maßstab einer mittelgroßen Zellkulturflasche (T75, Greiner) gewählt. 48 h nach der Transfektion wurde der Zellkultur-Überstand, welcher die Viruspartikel beinhaltete, zentrifugiert (4.000 rpm, 10 min, 4 °C, Varifuge 3.0R, Heraeus), um Zellen und Zelltrümmer zu sedimentieren. Die Überstände wurden sterilfiltriert (0.45 µm Filter, Sartorius) und je 30 ml des Filtrates auf Eis in geeignete Ultrazentrifugationsröhrchen (*Polyallomer Adaptor Tube*, Beckman) überführt. Danach wurde der Überstand mit 5 ml kalter, 20%-iger Sucroslösung unterschichtet und die viralen Vektorpartikel durch Ultrazentrifugation pelletiert (28.000 rpm, 1.5 h, 4 °C, Rotor SW28, OptimaTML-90K Ultracentrifuge, Beckman Counter). Der Überstand wurde verworfen, zu den Pellets

500 µl kaltes PBS (w/o Ca/Mg) gegeben und die Ansätze ÜN stehen gelassen (4 °C). Am folgenden Tag wurden die viralen Vektoren resuspendiert, in ein frisches Ultrazentrifugationsröhrchen überführt, ad 30 ml mit PBS (w/o Ca/Mg) aufgefüllt, wiederum über ein Sucrosekissen zentrifugiert und der ÜN-Lagerungsschritt bei 4 °C wiederholt. Das Pellet wurde in 500 µl PBS (w/o Ca/Mg) resuspendiert, in Aliquots zu je 60 µl abgefüllt und diese bei -80 °C gelagert.

20%-ige Sucroslösung

1 M Tris pH 7.5	1 ml	
3 M NaCl	3.3 ml	
0.5 M EDTA	0.2 ml	
Sucrose	20 g	
Aqua dest.	ad 100 ml	⇒ sterilfiltrieren (0.45 µm Filter, Sartorius)

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Zelllysate wurden ausgehend von konfluent bewachsenen Sechsllochplatten hergestellt. Hierzu wurden die Zellen zunächst 2x mit PBS (w/o Ca/Mg) gewaschen und anschließend mit 1 ml PBS (w/o Ca/Mg) + 1 mM EDTA abgelöst, in ein 2 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und 1 ml PBS (w/o Ca/Mg) zugegeben. Nach Zentrifugation (10 min, 2000 rpm, 4 °C, Biofuge fresco, Heraeus) wurde das Zellpellet nochmals gewaschen, erneut abzentrifugiert und 200 µl Lysepuffer mit 1x PI zugegeben. Nach einstündiger Lyse auf Eis wurde der Ansatz zur Entfernung der Zelltrümmer abzentrifugiert (10 min, 13.000 rpm, 4 °C), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

<u>Lysepuffer</u>		<u>100x PI</u>	
Tris-HCl pH 7.4	20 mM	PMSF	100 M
EDTA	5 mM	Aprotinin	1 mg/ml
NaCl	0.15 M	Leupeptin	1 mg/ml
NP40	1 %	Pepstatin	1 mg/ml

2.4.2 Bradford-Assay

Um die Proteinkonzentration der Zelllysate zu bestimmen, wurde *1x Quick Start™ Bradford Dye Reagent* (Bio-Rad) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Proteinquantifikation dieser Methode beinhaltet die Bindung des Farbstoffes *Coomassie Brilliant Blue G-250* an Proteine (Bradford et al., 1976). Der Farbstoff kommt in drei Formen vor: kationisch (rot), neutral (grün) und anionisch (blau) (Compton and Jones, 1985). Nach Bindung an Proteine erfolgt durch Änderung der Ladung ein Farbumschlag von rot nach blau, welcher bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen werden kann. Dazu wurde das Spektralphotometer *GeneQuant pro* (Amersham Biosciences) verwendet. Anhand der Adsorption und einer mitgeführten Standardreihe war es möglich, die Proteinkonzentration einer jeden Probe zu ermitteln. Die Zelllysate wurden bei Bedarf 1:2 bis 1:10 verdünnt.

2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine in einem Polyacrylamidgel, welches als Molekularsieb wirkt, anhand ihres Molekulargewichtes voneinander getrennt, denn durch vorherige Denaturierung der Proteine lösen sich Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspaltung der Wasserstoffbrücken auf, wodurch die Proteine linearisiert vorliegen. Auch die Eigenladung der Proteine ist unerheblich, da das im Ansatz vorhandene, anionische Detergenz SDS vollständig die Eigenladung der Proteine maskiert (Shapiro et al., 1967).

Die Proben wurden mit 4x SDS-Ladepuffer versetzt, 5 min bei 95 °C aufgekocht und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Für die Elektrophorese wurden diskontinuierliche Gele verwendet, die sich aus einem Sammelgel (5 %) und einem höherprozentigen Trenngel (12.5 %) zusammensetzten. Die Gele wurden in eine *Bio-Rad Mini Protean II chamber* (Bio-Rad) eingespannt und diese mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt. Als Größenstandard wurden 10 µl *Full Range Rainbow™-Marker* (Amersham Biosciences) mitgeführt.

Bei 100 V wurden die Proben ins Gel einlaufen gelassen, bis diese das Trenngel erreicht hatten. Danach wurde die Spannung auf 130 V erhöht, und die Elektrophorese solange durchgeführt, bis die Blaufont das untere Ende des Trenngels erreicht hatte.

Die Ladekontrolle erfolgte entweder über Coomassie-Färbung eines SDS-Gels unter Verwendung des *SimplyBlueTM SafeStain* (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers oder während der Western Blot-Analyse durch Nachweis eines konstitutiv exprimierten Proteins.

<u>Trenngel (12.5 %)</u>		<u>4x SDS-Ladepuffer</u>	
Aqua dest.	2.48 ml	Tris-HCl pH 6.8	0.25 M
Rotiphorese Gel 30 (Roth)	3.15 ml	SDS	4 %
1 M Tris pH 8.8, 0.4 % SDS	1.88 ml	β-Mercaptoethanol	10 %
TEMED	4 µl	Glycerin	20 %
APS (10 %)	75 µl	Bromphenolblau	20 mg/l

<u>Sammelgel (5 %)</u>		<u>4x SDS-Laufpuffer</u>	
Aqua dest.	2.9 ml	Tris-HCl pH 8.3	0.1 M
Rotiphorese Gel 30 (Roth)	0.83 ml	Glycin	0.77 M
1 M Tris pH 6.8, 0.4 % SDS	1.25 ml	SDS	0.4 %
TEMED	3 µl		
APS (10 %)	40 µl		

2.4.4 Western Blot Analyse

Die von Towbin und Mitarbeitern (Towbin et al., 1979) entwickelte Methode dient dazu, in einem Gel zuvor aufgetrennte Proteine über Kapillar- oder Elektrotransfer auf einen geeigneten Träger wie beispielsweise eine Nitrocellulosemembran als genaues Abbild zu übertragen und somit für eine nachfolgende Immundetektion zu immobilisieren.

Um die Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran (*ImmobilonTM-P Transfer Membrane*, Millipore) zu übertragen, wurde eine *Bio-Rad Trans-Blot[®] SD Semi-Dry transfer cell* (Bio-Rad) verwendet. Dabei wurde die in Methanol äquiliibrierte Membran auf in Blotting-Puffer getränkte Filterpapiere (Whatman-3MM, Schleicher & Schuell) gelegt. Darauf wurde das Gel luftblasenfrei

geschichtet, gefolgt von weiteren drei Lagen Whatman-Papier. Das Blotten selbst erfolgte bei 120 mA (konstant) pro Gel über einen Zeitraum von 50 min. Unspezifische Bindungsstellen auf den Membranen wurden durch zweistündige Inkubation in Blocking-Puffer (5 % Magermilchpulver in 1x TBS-T) abgesättigt, um im nachfolgenden Schritt eine spezifische Antikörper-Bindung zu gewährleisten. Die Primärantikörper (Kapitel 2.1.3) wurden nach Angabe des Herstellers entsprechend in Blocking-Puffer verdünnt und ÜN mit den Membranen hybridisiert (4 °C, Taumelschüttler (WT 12, Biometra)). Nach mehreren Waschschritten (3 x 10 min) mit 1x TBS-T wurden die Membranen mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (Kapitel 2.1.3) inkubiert (3 h, RT), der ebenfalls nach Angaben des Herstellers verdünnt wurde. Dabei handelte es sich um mit Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) konjugierte Antikörper, die spezifisch gegen den konstanten Teil des Primärantikörpers gerichtet waren und somit spezifisch an diesen anbinden konnten. Nach nochmaligem Waschen (s. o.) erfolgte der Proteinnachweis unter Zuhilfenahme entsprechender Detektionskits (GE Healthcare). Die β -Aktin-Ladekontrolle wurde unter Zuhilfenahme des *Amersham ECL Detection Reagent* nachgewiesen, während für den A3-Nachweis das *Amersham ECL Plus Western Blotting detection reagent* benutzt wurde. Die verwendeten Kits enthielten ein HRP-Substrat, welches durch die Meerrettich-Peroxidase umgesetzt wird, wodurch bei dieser Reaktion Licht emittiert wird. Dieses Signal kann unter Verwendung entsprechender Chemilumineszenz-Filmen (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) visualisiert werden. Diese wurden auf die mit Substrat inkubierten Membranen abhängig von der Signalintensität 5 sec bis 30 min aufgelegt und danach entwickelt.

<u>Blotting-Puffer</u>		<u>1x TBS-T</u>	
Tris-HCl pH 8.3	25 mM	NaCl	150 mM
Glycin	192 mM	KCl	3 mM
Methanol	20 %	Tris-HCl	25 mM
		Tween	0.5 %
		pH 7.4	

2.4.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Dieser Versuch wurde von Dr. Heidi Kuiper (TiHo Hannover) durchgeführt und ist Bestandteil der Publikation Dörrschuck *et al.* (Dörrschuck *et al.*, 2011).

Für diesen Versuch wurden Phytohämagglutinin (PHA) stimulierte, porzine Blutlymphozyten verwendet. Durch Zugabe von Colcemid [10 µg/ml] (Biochrom) zu den Suspensionszellen 80 min vor der Zellernte kommt es zu einer Arretierung des Zellzyklus in der Metaphase, da das Zellgift die Depolymerisierung des Spindelapparates verursacht, wodurch die Chromatiden der kondensierten Chromosomen nicht mehr voneinander getrennt werden. Die Lymphozyten wurden geerntet (2.500 rpm, 10 min) und das Pellet in hypotoner, 0.75 M KCl-Lösung aufgenommen (20 min, RT). Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen 3x fixiert (1 Vol Eisessig, 3 Vol Methanol) (20 min, RT) und auf entsprechend präparierten Objektträgern (OT) gespreitet. Diese wurden vor der Verwendung durch eine ÜN-Lagerung in 70%-igem Ethanol entfettet, 15 min in ein Ultraschallbad gelegt und bis zur Chromosomenspreitung bei 4 °C in einer mit Aqua dest. gefüllten Kunststoffbox gelagert.

Vor der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurden die Chromosomen GTG gebändert. Dazu wurden die OT bei 38 °C mindestens 24 h lang getrocknet, bevor sie für 3 min in einer Trypsinlösung (6 ml Trypsin (0.25 %, Biochrom) ad 100 ml mit PBS (w/o Ca/Mg)) (Biochrom) gelagert wurden. Anschließend wurden die Chromosomen in einer 7%-igen Giemsa-Lösung (Merck) gefärbt, mit Aqua dest. gespült und bei RT getrocknet. Metaphasespreitungen, die eine gute GTG-Bänderung aufwiesen, wurden unter Verwendung einer CCD-Kamera und der bildverarbeitenden Software IPLab 2.2.3 (Scanalytics, Inc.) photographisch dokumentiert. Die Identifizierung der Chromosomen erfolgte nach Gustavsson (Gustavsson, 1988).

Vor Einsatz der Chromosomenpräparate zum Gennachweis unter Verwendung spezifischer DNA-Sonden wurden die OT in einer absteigenden Alkoholreihe (je 3 min in 96% (2x), 80%, 70%, 50%-igem EtOH) entfettet und entfärbt. Die OT wurden bei RT getrocknet und bei -20 °C gelagert.

Um die Sonde für die Hybridisierung vorzubereiten, wurde 1 µg BAC-DNA (Klonnummer CH242-330G8), welche die komplette Sequenz des porzinen A3-Genlokus enthielt (Kapitel 2.2.18), mit Digoxigenin durch Nick-Translation unter Verwendung eines *Nick-Translation-Mix* (Roche) nach Angaben des Herstellers

markiert. Weiterhin war es vor Einsatz der DNA-Sonde wichtig, die in der Sequenz vorkommenden, repetitiven Bereiche abzusättigen, um bei der Hybridisierung eine spezifische Anbindung der Sonde an den komplementären, chromosomalen Bereich zu ermöglichen. Daher wurde eine Prähybridisierung durchgeführt, bei der 750 ng Digoxigenin-markierte BAC-DNA mit 12 µg porziner Cot1-DNA und 10 µg Lachssperma als Kompetitoren vermischt wurden, bevor der Ansatz einer Alkoholfällung unterzogen wurde. Dabei wurde das 2.5-fache Volumen EtOH (100 %) dazugegeben, die Fällung selbst erfolgte bei -20 °C (30 min). Die DNA wurde pelletiert (13.000 rpm, 30 min, RT), luftgetrocknet und in 24 µl Hybridisol VII (Qbiogene) 2 h lang bei 45 °C gelöst. Nach der DNA-Denaturierung (5 min, 70 °C) erfolgte die Prähybridisierung (30 min, 38 °C). Bis zum Auftragen auf die OT wurde die Sonde bei -20 °C gelagert.

Die Chromosomen wurden ebenfalls vor der Hybridisierung denaturiert. Dazu wurden die OT in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %) je 2 min bei RT dehydriert, bevor der Denaturierungsschritt in 70%-igem Formamid in 2x SSC erfolgte (2 min, 72 °C). Die OT wurden in 70%-iges EtOH (-20 °C) überführt und wieder in einer aufsteigenden Alkoholreihe (-20 °C) dehydriert. Nach einem Trocknungsschritt konnten die OT für die Hybridisierung verwendet werden.

Dazu wurden 10 µl der denaturierten, prähybridisierten Sonde auf jeden OT aufgetragen, mit einem Deckglas abgedeckt und dieses mit Fixo-Gum (Qbiogene) abgedichtet, um ein Eintrocknen der Sonde zu vermeiden. Die Lagerung der OT erfolgte in einer mit feuchten Tüchern ausgelegten Box ÜN bei 38 °C. Am darauf folgenden Tag wurden die OT nach Entfernen des Klebers diversen Waschschritten unterzogen: 3x3 min in 50% Formamid in 2x SSC bei 45 °C, 3x3 min in 2x SSC bei 45 °C und 3 min in Waschpuffer (0.1 M NaH₂PO₄, 0.1 M Na₂HPO₄, 0.1 % Tween20) bei RT.

Die Detektion der Signale erfolgte schließlich unter Verwendung des *Digoxigenin-FITC Detection Kit* (Qbiogene) nach Angaben des Herstellers. Die Chromosomen wurden zusätzlich mit DAPI gegengefärbt. Dazu wurden 100 µl einer DAPI-Färbelösung (0.1 ml DAPI in 40 ml 2x SSC (DAPI-Stammlösung: 1 mg DAPI in 5 ml Aqua dest., aliquotiert, -20 °C)) auf die OT aufgetropft, mit einem Deckglas verschlossen und 10 min im Dunkeln inkubiert. Die Färbelösung wurde mit Aqua dest. abgespült und die OT im Dunkeln getrocknet. Um ein rasches Ausbleichen der Präparate zu verhindern, wurden diese mit 20 µl Propidiumjodid-Antifade (Qbiogene)

eingedeckt. 30 Metaphasen, die zuvor photographiert wurden, wurden nochmals nach der Hybridisierung fluoreszenzmikroskopisch mit einem Zeiss Axioplan 2 Mikroskop (Zeiss) analysiert.

2.5 Statistische Auswertungen

2.5.1 Chi-Quadrat-Test und Adjustierung nach Bonferroni-Holm

Diese statistische Auswertung wurde von Kay-Martin Hanschmann (PEI) durchgeführt und ist Bestandteil der Publikation Dörrschuck *et al.* (Dörrschuck et al., 2011).

Mit diesem Test wurde untersucht, ob die Basen um eine A3-bedingte Mutationsstelle einen Einfluss auf das Auftreten der Mutation an einer bestimmten Position haben. Dabei wurde die Verteilung der vier Nukleotide A, G, C, T in der direkten Umgebung (± 5 bp) einer jeden C-zu-T-Mutation mit der Verteilung der Nukleotide bei jedem vorkommenden C-Nukleotid innerhalb des (-)-DNA-Stranges der untersuchten EGFP-Sequenz zueinander verglichen. Die Auswertung für jede der untersuchten Positionen erfolgte getrennt voneinander mit Hilfe des Chi-Quadrat-Testes. Die Testresultate mit einem p-Wert kleiner als $\alpha = 0.05$ (entspricht 5 %) wurden als statistisch signifikant betrachtet. Für Mehrfachvergleiche wurden die p-Werte nach der Bonferroni-Holm-Methode adjustiert, um die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse auf insgesamt 5 % zu beschränken. Die statistische Analyse wurde mit der SAS[®]/STAT Software, Version 9.2, SAS System für Windows, durchgeführt.

2.5.2 Statistische Auswertung von Trinukleotidpräferenzen

Diese statistische Auswertung wurde von Kay-Martin Hanschmann (PEI) durchgeführt und ist Bestandteil der Publikation Dörrschuck *et al.* (Dörrschuck et al., 2011).

Um favorisierte von nicht favorisierten Umgebungen voneinander zu trennen, wurde berechnet, mit welcher Häufigkeit eine C-zu-T-Mutation in einem bestimmten nnC-Trinukleotid-Kontext auftritt. Bei dieser Analyse wurde ebenfalls die Anzahl der untersuchten Klone eines jeden A3-Proteins mit einbezogen. Damit wird die Tatsache berücksichtigt, dass manche C-zu-T-Mutationen an einer bestimmten Stelle

bei mehreren Klonen vorkommt – also eine Art *hot spot* zu erkennen ist – während manch andere C-Nukleotide nie mutiert wurden. Die relativen Häufigkeiten [%] folgten einer Binomialverteilung und wurden mit 95 % Konfidenzintervallen (nach Clopper-Pearson) graphisch gegen die favorisierten Trinukleotide aufgetragen.

2.5.3 Phylogenetische Untersuchungen

Um einen phylogenetischen Stammbaum für den porzinen A3-Genlocus zu entwickeln, wurde der Großteil der A3Z3-Gensequenz aus verschiedenen Schweinespezies (*Sus scrofa*) amplifiziert: Deutsche Landrasse (= german landrace; Quelle: Zelllinie PK15 und PBMCs aus zwei Individuen der Rasse), Minischwein (= mini pig; Quelle: Zelllinie MAX-T), Wildschwein (= wild pig; Quelle: PBMCs aus drei Individuen der Rasse) und Yucatan-Schwein (= Yucatan pig; PBMCs aus zwei Individuen der Rasse). Zusätzlich wurde genomische DNA der beiden nächsten Verwandten der Schweine in die Studie integriert: Halsbandpekari (= *Pecari tajacu*; Quelle: PBMCs aus zwei Individuen der Rasse) und Kamel (= *Camelus dromedarius*; Quelle: Zelllinie Dubca).

Jeweils 100 ng genomische DNA wurden für eine PCR eingesetzt (35 Zyklen, 30 sec bei 94 °C, 5 sec bei 62 °C, 1 min bei 74 °C), wobei für die Amplifikation die *KOD XL DNA Polymerase* verwendet wurde (Kapitel 2.2.13). Die erste PCR wurde mit dem Primerpaar for_EI_5 und 1r_Ss3F durchgeführt (Kapitel 2.1.7), mit deren Hilfe eine genomische Region von durchschnittlich 1038 bp vervielfältigt wurde (im Falle von MAX-T entspricht dies der Genregion 16.407-17.444 nt). Da jedoch dieses Gensegment bzw. die daraus resultierende Proteinsequenz nicht ausreichend war, um einen phylogenetischen Stammbaum zu generieren, wurde eine zweite PCR (gleiche Parameter wie oben beschrieben) unter Verwendung der Primer f_Intron4_C2 und r_Exon6_C durchgeführt (Kapitel 2.1.7), wobei eine Sequenz von durchschnittlich 1270 bp amplifiziert wurde (im Falle von MAX-T entspricht dies der Genregion 15.170-16.439 nt). Von jedem PCR-Produkt wurden mindestens fünf Klone zur Sequenzierung geschickt. Die Sequenzen – auch die Sequenzen unterschiedlicher Individuen derselben Rasse – wurden miteinander abgeglichen, um eine Konsensussequenz zu erhalten. Aufgrund der beiden durchgeführten PCRs wurde für jede Spezies zwei Konsensussequenzen erhalten, die aufgrund eines überlappenden Sequenzbereiches miteinander verbunden werden konnten. Die so erhaltenen, partiellen A3-Sequenzen wurden für die Erstellung des phylogenetischen Stammbaumes verwendet.

Alle nachfolgenden, statistischen Auswertungen wurden von Dr. Ignacio González Bravo (CSISP, Valencia) durchgeführt und sind Bestandteil der Publikation Dörrschuck *et al.* (Dörrschuck *et al.*, 2011).

Für die Analyse wurden weiterhin A3-Sequenzen – bei denen es sich um Orthologe zum poA3Z3 handelt – verschiedener Säugetier-Spezies (Mammalia) verwendet, die den Datenbanken entnommen wurden. Dabei wurde auf folgende Sequenzen zurückgegriffen: innerhalb der Laurasiatheria: *Sus scrofa*, A3Z2-Z3, C-Terminus (NM_001097446); *Bos taurus*, A3Z2-Z3, C-Terminus (NM_001077845); *Ovis aries*, A3Z2-Z3, C-Terminus (NM_001093784); *Equus caballus*, A3Z3 (FJ532289) *Canis lupus*, A3Z3 (XM_538369) und *Felis silvestris*, A3Z3 (NM_001112710); innerhalb der Euarchontoglires: *Rattus norvegicus*, A3Z2-Z3, C-Terminus (NP_001028875); *Mus musculus*, A3Z2-Z3, C-Terminus (ACH89410); *Homo sapiens*, A3H (NP_861438); *Pan troglodytes*, A3H (XP_525599); *Gorilla gorilla*, A3H (ABD72580); *Pongo pygmaeus*, A3H (Q1WBT4) und *Macaca mulatta*, A3H (XP_001096739). Zusätzlich wurden – wie oben bereits aufgeführt – für diese phylogenetische Untersuchung selbst Sequenzen generiert, und zwar von *Camelus dromedarius* (Kamel), *Pecari tajacu* (Halsbandpekari) und verschiedenen Arten der Gattung *Sus scrofa* (Kapitel 2.6). Alle oben angeführten Daten sind zur Übersicht nochmals tabellarisch im Appendix dargestellt (Kapitel 5.4).

Die Sequenzen wurden auf Aminosäure-Level mit MUSCLE (<http://www.drive5.com/muscle/>) (Edgar, 2004a; Edgar, 2004b) abgeglichen, mit Se-AL visualisiert (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/>), um manuelle Korrekturen vornehmen zu können und mit PAL2NAL (<http://www.bork.embl.de/pal2nal>) (Suyama *et al.*, 2006) in Nukleotidsequenzen zurück übersetzt.

Die phylogenetischen Maximum-Likelihood (ML)-Analysen wurden mit RAxML HPC (Stamatakis *et al.*, 2005; Stamatakis, 2006b) unter dem GTR+ Γ 4 Evolutionsmodell und mit der CAT-Näherung der Heterogenitätsrate (Stamatakis, 2006a) durchgeführt. Die Sequenzanalysen wurden parallel in drei Partitionen durchgeführt, wobei jede Partition einer Codonposition entspricht. Es wurden zwei unabhängige Ketten von jeweils 5.000 Bootstraps durchgeführt und für beide Programmläufe jeweils die finale Baumtopologie optimiert, ohne die CAT-Näherung anzuwenden. Der beste der beiden finalen Stammbäume wurde gewählt (-ln = 5191,168; Alpha-Parameter der Gamma-Funktion einer jeden Codonposition: 1,058; 1,077 and 1,984), allerdings konnten nach einem SH-Test (Shimodaira and Hasegawa, 1999) keine signifikanten

Unterschiede unter den dazugehörigen Wahrscheinlichkeitswerten gefunden werden. Die Bootstrap-Support-Werte für die Knotenpunkte wurden aus einem kombinierten Set aus 10.000 Bäumen erhalten.

Die phylogenetische Bayes-Analyse wurde mit BEAST v1.4.8 (<http://beast.bio.ed.ac.uk>) (Drummond and Rambaut, 2007) unter dem GTR+ Γ 4 - Evolutionsmodel sowohl für die *strict clock* als auch unkorrelierte *relaxed clock* durchgeführt. Die Sequenzen wurden wieder in drei Partitionen unterteilt, wobei jede Partition einer Codonposition entspricht. Für jede Codonposition wurden die evolutionären Parameter unabhängig voneinander optimiert. Zwei unabhängige Ketten aus 50 Millionen Schritten wurden kalkuliert und die Werte alle 1.000 Schritte abgelesen und analysiert, wobei die ersten 10 Millionen Schritte ignoriert wurden. Die Kompatibilität beider Ketten wurde durch Kalkulation des dazugehörigen Bayes-Faktors (Suchard et al., 2001) festgelegt und beide Ketten miteinander zu einer Kette kombiniert. Die kombinierten Ketten der *strict* und *relaxed clock* wurden ebenso durch Kalkulation des Bayesschen Faktors der zugehörigen Wahrscheinlichkeiten verglichen. Es konnte lediglich ein marginal besserer Support (Unterstützung) für die Kalkulationen der relaxierten Uhr festgestellt werden (log Bayes-Faktor = 1,177). Der Maximum-Clade-Credibility (MCC)-Baum (Bayes-Analyse) wurde anhand der kombinierten Kette der relaxierten Uhr gebildet, die dazugehörige Wahrscheinlichkeit unter ML kalkuliert und mit dem besten RAxML-Baum verglichen. Die Topologien des MCC-Baumes (Bayes-Analyse) und des besten Baumes der ML-Schätzung waren identisch.

Die phylogenetische Analyse der Sequenzen, die *Camelidae*, *Tayassuidae* und *Suidae* entstammen, wurde sowohl auf kodierenden als auch nicht-kodierenden Sequenzen durchgeführt. Es wurden vier Partitionen definiert, jeweils eine für die jeweiligen Codonpositionen und eine vierte für die verknüpften Intronbereiche. Die ML- und die Bayes-Analysen wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Es konnte kein Unterschied in den Wahrscheinlichkeitswerten der Bäume festgestellt werden, die unter *strict clock* und unter *relaxed clock* erhalten wurden (log Bayes-Faktor = 0,034). Der beste ML-Stammbaum (-ln = 5820,605; Alpha-Parameter der Gamma-Funktion einer jeden Codonposition: 1,958; 0,312 and 3,856; Alpha-Parameter für die zusammengefügt Introns: 1,490) hatte eine identische Topologie zu dem Stammbaum der MCC der Bayes-Analyse.

Das Referenzkladogramm der Tierspezies, welche alle Arten umfasst, die bei der A3-Analyse integriert wurden, wurde mit Hilfe von TREEPRUNER (<http://www.uni-oldenburg.de/molekularesystematik/33997.html>) auf der Basis der Säugetier-Phylogenie von Bininda-Emonds et al. (Bininda-Emonds et al., 2007) konstruiert. Die Abbildungen wurden mit FigTreev1.1.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>) generiert.

2.6 Datenbankeinträge

Die Nukleotidsequenzen der porzinen cDNA-Sequenzen bzw. die Sequenz für den *poA3*-Genlocus wurden unter den entsprechenden Nummern (in Klammern angegeben) in der Genbank abgelegt: *poA3Z2-Z3* Gen (EU871587), *poA3Z2-Z3* mRNA (EU871586), *poA3Z2-Z3* SVA mRNA (FJ716802), *poA3Z2* mRNA (FJ716801) und *poA3Z3* mRNA (HM347451). Von den großteils amplifizierten *A3Z3*-Gensequenzen, welche zur Erstellung des phylogenetischen Stammbaumes verwendet wurden, wurden ebenfalls Datenbankeinträge angefertigt: *Sus scrofa_german landrace*, *A3Z3* (FJ716803); *Sus scrofa_mini pig*, *A3Z3* (FJ716804); *Sus scrofa_Yucatan pig*, *A3Z3* (FJ716805); *Sus scrofa_wild pig*, *A3Z3* (FJ716806); *Pecari tajacu*, *A3Z3* (FJ716807); *Camelus dromedarius*, *A3Z3* (FJ 716808).

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte untersucht werden, ob die A3-Proteine des Menschen und des Schweins eine antiretrovirale Aktivität gegen porcine endogene Retroviren (PERV) besitzen und somit die Replikation der Viren zumindest *in vitro* inhibieren können und - falls ja - auf welchem Mechanismus dieser restriktive Effekt beruht.

Dazu wurde einerseits auf cDNA-Ebene nach porcinen A3-Transkripten gesucht, deren Funktionalität unter anderem über Proteinexpression untermauert wurde. Weiterhin wurde das Vorkommen von identifizierten poA3-Transkripten durch Ermittlung der porcinen A3-Genstruktur und der damit verbundenen Aufklärung der Exon-Intron-Zusammensetzung des Gens weiter manifestiert, wobei auch die chromosomale Lokalisation des Genlokus näher untersucht wurde.

Um ein geeignetes Testsystem zum Nachweis einer inhibierenden Wirkung der A3-Proteine gegenüber PERV und MLV – letzteres wurde als Kontrolle mitgeführt – aufzubauen, wurden zunächst PERV- und MLV-Expressionsplasmide konstruiert, die in der proviralen Sequenz eine CMV-EGFP-Kassette enthielten. Diese diente zur indirekten Detektion der antiretroviralen Aktivität der experimentell untersuchten Cytosin-Deaminasen, denn die Induktion von Mutationen in die virale Nukleotidsequenz hätte eine Abnahme der intrazellulären EGFP-Fluoreszenzintensität zur Folge.

3.1 Herstellung der PERV- und MLV-Expressionsplasmide

3.1.1 Herstellung von pPERV/EGFP

Als Ausgangskonstrukt diente das Expressionsplasmid pGTe[PERV-B(33)ATG] Δ chrom (Kapitel 5.5.3). Dabei handelt es sich um eine vollständige, provirale PERV-B-Sequenz mit einer Länge von 8918 bp (Kapitel 1.2.5), welche aus dem Moleklarklon pBS_Not[PERV-B(33)ATG] (Czaderna et al., 2000) ausschließlich der dort vorhandenen chromosomalen Flanken mit Hilfe der *Taq*-Polymerase amplifiziert wurde. Anhand durchgeführter Replikationsstudien wurde festgestellt, dass die amplifizierte, provirale PERV-B-Sequenz ihre Replikationskompetenz verloren hatte (persönliche Mitteilung, Nicole Fischer, PEI).

Eine anschließende Sequenzierung dieser PERV-B-Sequenz ergab multiple Basensubstitutionen innerhalb der proviralen Sequenz, bedingt durch die Verwendung der *Taq*-Polymerase, welche über keine 3'-5'-Korrekturlesefunktion verfügt (Daten nicht gezeigt). Die erste Aufgabe bei der Konstruktion des pPERV/EGFP-Expressionsplasmides bestand darin, die Replikationskompetenz des PERV-B wieder herzustellen. Dazu wurde ein Großteil der PERV-B-Sequenz (ca. 6.3 kb) in pGTe[PERV-B(33)ATG] Δ chrom durch die Originalsequenz des Moleklarklons über die einmalig vorhandenen Restriktionsschnittstellen *Mfe*I (*gag*-Bereich, Pos. 1772-1777bp) und *Pac*I (*env*-Bereich, Pos. 8052-8059 bp) ausgetauscht (Abb. 11a).

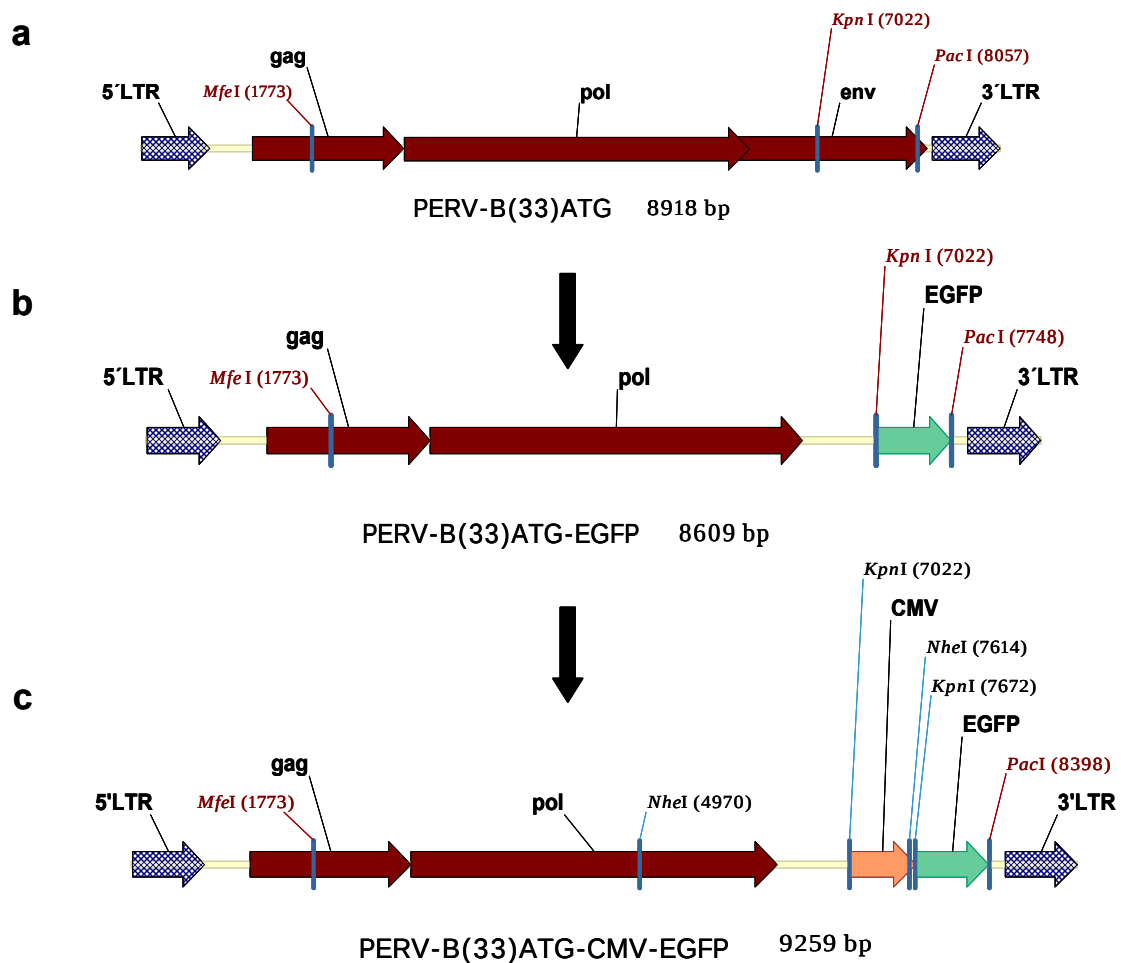


Abb. 11 Insertion einer CMV-EGFP-Kassette in die provirale PERV-Sequenz zur Herstellung des Expressionsplasmides pPERV/EGFP. (a) Um die Replikationskompetenz des PERV-B in pGTe[PERV-B(33)ATG] Δ chrom wieder herzustellen, wurde die provirale Sequenz zwischen den Schnittstellen *Mfe*I und *Pac*I durch die entsprechende Originalsequenz des Moleklarklons ersetzt. (b) Über die Schnittstellen *Kpn*I und *Pac*I wurde eine EGFP-Sequenz in den *env*-Bereich der proviralen Sequenz inseriert. (c) Zur Verstärkung der intrazellulären EGFP-Expression in Säugerzellen wurde ein CMV-Promotor über die Schnittstelle *Kpn*I vorgeschaltet und die Orientierung des integrierten Promotors über eine Restriktion mit *Nhe*I und *Kpn*I überprüft (Restriktionsschnittstellen in rot: einmalig in Sequenz vorkommend, Restriktionsschnittstellen in schwarz: mehrfach in Sequenz vorkommend).

Eine im Anschluss durchgeführte Replikationsstudie über einen Zeitraum von 17 Tagen mit dem sequenzmodifizierten Plasmid pGTe[PERV-B(33)ATG] Δ chromE #11 im Vergleich zum Molekularklon pBS_Not[PERV-B(33)ATG] #7 ergab, dass durch den partiellen Austausch der proviralen Sequenz die Replikationskompetenz des PERV-B rekonstituiert werden konnte (Abb. 12). Es war ebenfalls deutlich zu sehen, dass der Molekularklon eine wesentlich höhere RT-Aktivität aufwies als das rekonstruierte PERV-B-Provirus. Entweder beruht die erhöhte RT-Aktivität des Molekularklons darauf, dass ein Enhancer innerhalb der chromosomalen Flanken die Replikationsrate des PERV beschleunigt. Es wäre jedoch auch möglich, dass noch vorhandene Mutationen innerhalb der rekonstruierten PERV-B-Sequenz einen inhibierenden Einfluss auf die Replikation ausüben könnten.

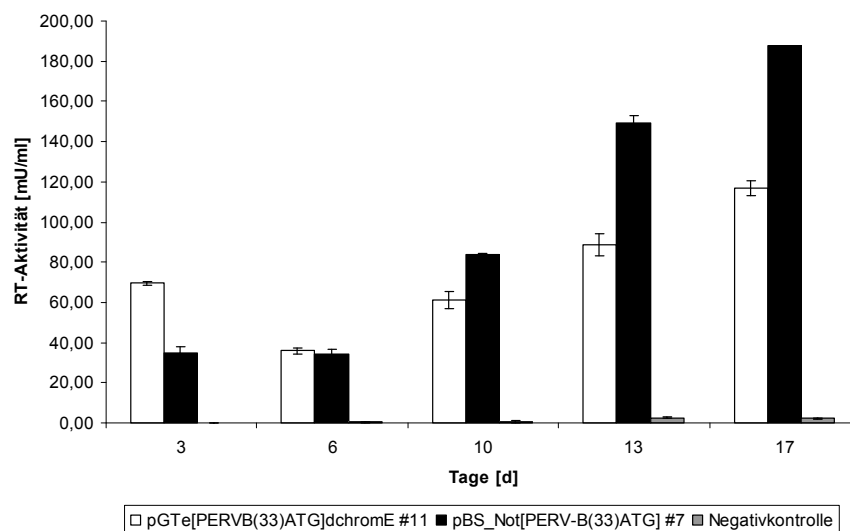


Abb. 12 Replikation des durch das rekonstruierte Plasmid pGTe[PERV-B(33)ATG] Δ chromE kodierte PERV-B in HEK-293T-Zellen. Je 1 μ g pGTe[PERV-B(33)ATG] Δ chromE #11 (weiß) und pBS_Not[PERV-B(33)ATG] #7 (schwarz) wurden in HEK-293T-Zellen transfiziert. Als Negativkontrolle (grau) dienten Überstände nicht transfizierter HEK-293T-Zellen. Über einen Zeitraum von 17 Tagen wurde in regelmäßigen Abständen die RT-Aktivität der viralen Überstände bestimmt.

Nach der Rekonstruktion der Replikationskompetenz wurde über die einmalig im *env*-Bereich der proviralen Sequenz vorkommenden Restriktionsschnittstellen *KpnI* (Pos. 7017-7022 bp) und *PacI* (Pos. 7742-7750) eine EGFP-Sequenz in 5'-3'-Orientierung eingefügt (Abb. 11b), welche zuvor aus dem Plasmid pLEGFP-N1 (Kapitel 5.5.8) über die Primer *KpnI_GFP_For* und *GFP_PacI_Rev* amplifiziert wurde (*Taq*-Polymerase, $T_a = 62^\circ\text{C}$, $t_e = 1\text{ min}$). Bei dem sogenannten *enhanced green fluorescent protein* handelt es sich um eine Codon optimierte Variante des *GFP*, die gegenüber dem Wildtyp eine verbesserte Fluoreszenz sowie eine höhere Expressionsrate in Säugerzellen besitzt. Das entstandene Plasmid pGTe[PERV-

B(33)ATG_EGFP] Δ chromE #11/5 wurde in HEK-293T-Zellen transfiziert, um die intrazelluläre Fluoreszenzintensität zu untersuchen. Wie die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme in Abb. 13 zeigt, war lediglich eine schwache cytoplasmatische EGFP-Fluoreszenz nachweisbar, die nicht ausreichte, um damit eine mögliche Wirkung der A3-Proteine gegenüber PERV quantitativ detektieren zu können (Abb. 13a-c). Da offensichtlich der PERV-Promotor zu schwach ist, um eine geeignete, intrazelluläre EGFP-Expression zu gewährleisten, wurde der EGFP-Sequenz ein CMV-Promotor über die Schnittstelle *KpnI* vorgeschaltet. Der CMV-Promotor wurde ebenfalls aus pLEGFP-N1 unter Verwendung der Oligonukleotide For_*KpnI*_CMV und Rev_CMV_*KpnI* amplifiziert (*Taq*-Polymerase, $T_a = 58^\circ\text{C}$, $t_e = 1$ min). Um die Orientierung des Promotors zu überprüfen, wurden die Konstrukte mit *NheI* und *PacI* restringiert (Abb. 11). Das fertige Konstrukt pPERV/EGFP (Kapitel 5.5.4) wurde wiederum in HEK-293T-Zellen transfiziert. Nun konnte eine starke, cytosolische EGFP-Fluoreszenz detektiert werden, die für die anstehenden Studien ausreichte (Abb. 13d-f).

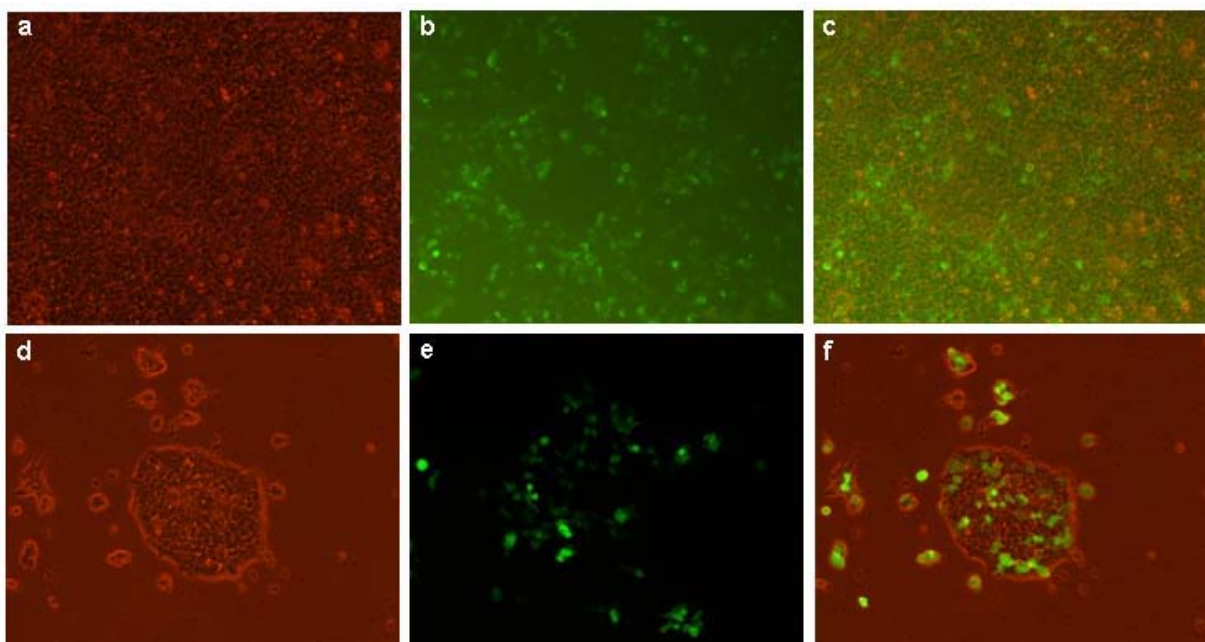


Abb. 13 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen transfizierter HEK-293T-Zellen zur Bestimmung der intrazellulären EGFP-Fluoreszenzintensität. (a)-(c) Nach Insertion der EGFP-Sequenz in die provirale PERV-B-Sequenz konnte zwei Tage nach Transfektion von $1\ \mu\text{g}$ pGTe[PERV-B(33)ATG_EGFP] Δ chromE #11/5 in HEK-293T-Zellen nur eine schwache intrazelluläre EGFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden (Belichtungszeit: 60 sec). (d)-(f) Durch Vorschalten eines CMV-Promotors vor die *EGFP*-Sequenz wurde eine starke, cytosolische EGFP-Expression und damit verbunden eine hohe Fluoreszenz erreicht (Belichtungszeit: 1 sec) (a+d: Durchlicht, Phasenkontrast; b,e: Fluoreszenz; c,f: Überlagerung von a+b bzw. d+e).

3.1.2 Herstellung von pMLV/EGFP

Analog zu pPERV-EGFP wurde das MLV-Expressionsplasmid hergestellt, welches als Kontrolle bei der Retrovirus-A3-Interaktionsstudie mitgeführt werden sollte, weil bereits publizierte Daten für die antiretrovirale Aktivität einiger A3-Proteine gegenüber MLV vorliegen (Bishop et al., 2004; Browne and Littman, 2008; Jern et al., 2007; Kobayashi et al., 2004; Langlois et al., 2009; Mariani et al., 2003). Da aufgrund der Erfahrungen bei der Konstruktion des PERV/EGFP-Expressionsplasmides bereits bekannt war, dass ein vorgeschalteter CMV-Promotor die intrazelluläre EGFP-Expression um ein Vielfaches erhöht, wurde hier direkt die vollständige CMV-EGFP-Kassette (1392 bp) aus pLEGFP-N1 (Kapitel 5.5.8) mit Hilfe der Primer f_Nsi_CMV und GFP_PacI_rev amplifiziert (*Expand High Fidelity PCR System*, $T_a = 63\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t_e = 70\text{ sec}$) und über die universell vorkommenden Restriktionsschnittstellen *NsiI* (Pos. 7486-7491) und *PacI* (Pos. 7829-7836) in den *env*-Bereich der proviralen MLV-Sequenz inseriert (Abb. 14), welches im Plasmid pM91MS vorlag (Kapitel 5.5.1).

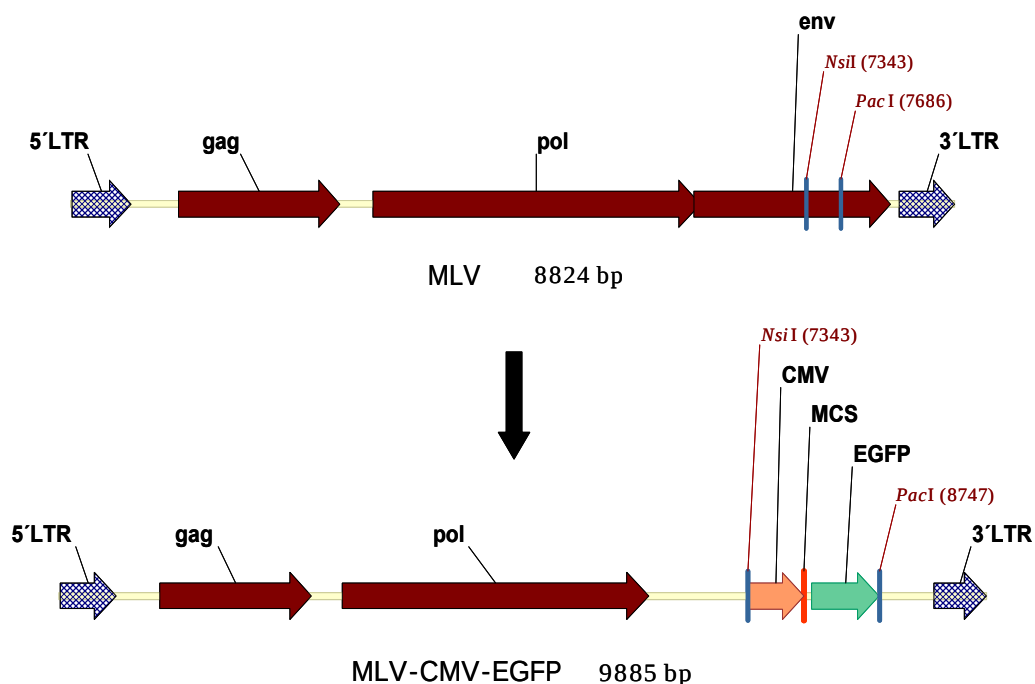


Abb. 14 Herstellung des Expressionsplasmides pMLV-EGFP. Über die Schnittstellen *NsiI* und *PacI* wurde eine CMV/EGFP-Kassette in den *env*-Bereich der proviralen MLV-Sequenz inseriert (Restriktionsschnittstellen in rot: einmalig in Sequenz vorkommend).

Das fertig gestellte pMLV/EGFP (Kapitel 5.5.2) wurde in HEK-293T-Zellen transfiziert, um die cytosolische EGFP-Fluoreszenzintensität zu analysieren. Auch in diesem Falle konnte der Nachweis einer starken, intrazellulären EGFP-Fluoreszenz erbracht werden (Abb. 15).

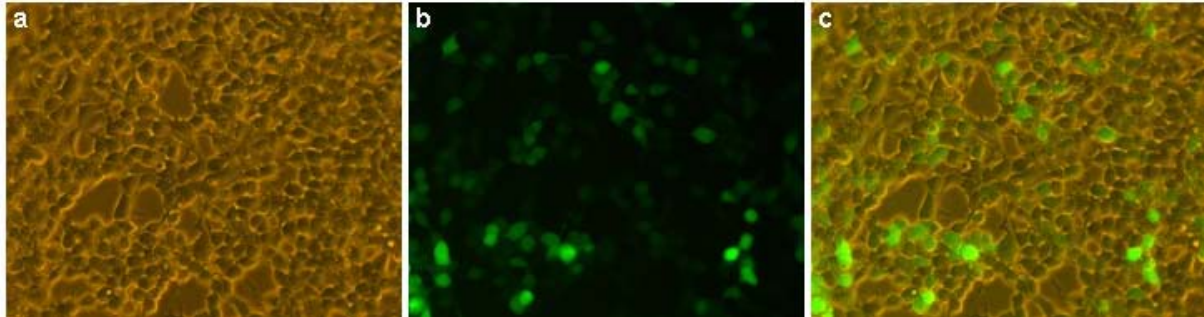


Abb. 15 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von mit pMLV/EGFP transfizierten HEK-293T-Zellen zur Bestimmung der intrazellulären EGFP-Fluoreszenzintensität. (a)-(c) 1 μ g pMLV/EGFP wurde in HEK-293T-Zellen transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion konnte eine starke, intrazelluläre EGFP-Expression nachgewiesen werden (Belichtungszeit: 1 sec) (a: Durchlicht, Phasenkontrast; b: Fluoreszenz; c: Überlagerung von a+b).

3.2 Konstruktion der porzinen A3-Expressionsplasmide

3.2.1 Identifikation porziner A3-Transkripte

Im Zuge dieser Doktorarbeit sollte nicht nur die Frage geklärt werden, ob humane A3-Proteine in der Lage sind, die Replikation von PERV in humanen Zellen zu inhibieren, sondern ob auch orthologe Cytosin-Deaminasen im Schwein existieren, die einen restriktiven Effekt auf diese endogenen Retroviren ausüben. Da zu Beginn dieses Projektes noch kein porzines A3 bekannt bzw. näher analysiert war, wurde in einem ersten Schritt versucht, entsprechende mRNAs des Schweins zu identifizieren. Dazu wurde in den Datenbanken unter Zuhilfenahme humaner A3-cDNA-Sequenzen nach porzinen *expressed sequence tags* (EST) gesucht. Bei einer EST-Sequenz handelt es sich um ein sequenziertes Teilstück einer cDNA-Sequenz, wobei diese cDNA über RT-PCR aus mRNA eines bestimmten Gewebes oder eines bestimmten Zelltyps hergestellt wurde. Diese Datenbanksuche lieferte mehrere Treffer. Die entsprechenden cDNA-Sequenzfragmente wurden unter Zuhilfenahme des *ContigExpress* des Software-Programms *Vector NTI AdvanceTM 9* (Invitrogen) miteinander verglichen, um damit möglicherweise überlappende Sequenzbereiche zu finden und somit einen *open reading frame* (ORF) einer putativen poA3-mRNA zu identifizieren. Dabei ergaben drei EST-Sequenzen (BP170197, DN107667 und

DN107314) aufgrund von Überlappungen eine Sequenz von 1232 bp, die als *BP170197extended* bezeichnet wurde (Abb. 16). Diese Sequenz wurde in *Vector NTI* eingegeben, um mittels der Software nach potentiellen ORFs zu suchen. Auf diesem Wege wurde ein ORF mit einer Länge von 798 bp identifiziert, der für 265 AS kodiert (Namensgebung: poAPO3).

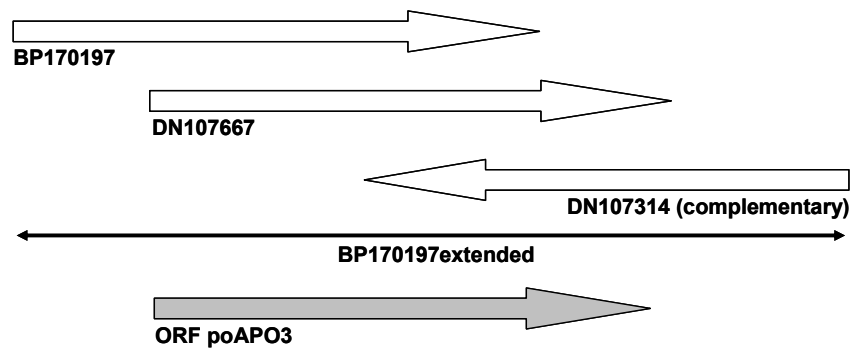


Abb. 16 Identifikation des poAPO3-ORF über porcine EST-Sequenzen. Die drei porcinen EST-Sequenzen BP170197, DN107667 und DN107314 bildeten durch Sequenzüberschneidungen eine Nukleotidsequenz (*BP170197extended*) mit einer Gesamtlänge von 1232 bp, innerhalb derer ein putativer, porciner A3-ORF (798 bp) identifiziert werden konnte, welcher für ein Protein von 265 AS kodiert.

Um nochmals abzusichern, dass es sich wirklich um eine A3-Sequenz handelt, wurde die Proteinsequenz dieses putativen poAPO3 mit den Proteinsequenzen von huA3A, -C und -H im *AlignX*-Programm der *Vector NTI*-Software verglichen, um mögliche homologe bzw. A3-spezifische AS-Motive zu finden. Wie in Abb. 17 zu erkennen ist, war im putativen poAPO3-Protein die für Cytosin-Deaminasen charakteristische Zink-koordinierende Domäne ($\text{HxEx}_{23-28}\text{PCx}_{2-4}\text{C}$) vorhanden.



Abb. 17 AS-Sequenzabgleich von poAPO3 mit huA3A, huA3C und huA3H. Das 265 AS lange, putative poAPO3 wurde mit den drei humanen Eindomänen-Cytosin-Deaminasen auf der Suche nach homologen Bereichen verglichen. Bei allen vier Proteinen war die A3-spezifische, konservierte Zinkkoordinierende Domäne (HxEx₂₃₋₂₈PCx₂₋₄C, rot unterlegt) erkennbar (AS-Bereich: 99-135) (gelb unterlegt = 100%-ige Homologie zwischen allen Sequenzen, blau unterlegt = 100%-ige Homologie zwischen drei und mehr Sequenzen, grün unterlegt = AS gleicher Polarität).

Neben poAPO3 wurde eine weitere, für ein porzines A3 kodierende Sequenz identifiziert. Diese wurde bereits von Conticello und Mitarbeitern (Conticello et al., 2005) publiziert und zwecks phylogenetischer Untersuchungen verwendet. Die entsprechende porzine A3-Sequenz wurde dem *supplementary material* dieser Publikation entnommen (Namensgebung: poA3). Dabei handelte es sich im Gegensatz zu poAPO3 um ein porzines Doppeldomänen-A3 mit einem ORF von 1254 bp, welcher für ein Protein von 418 AS kodiert. Auch hier wurde nochmals ein Sequenzvergleich auf Proteinebene mit den humanen A3-Proteinen huA3B, -F und -G durchgeführt, bei denen es sich ebenfalls um Doppeldomänen-Deaminasen handelt (Abb. 18).

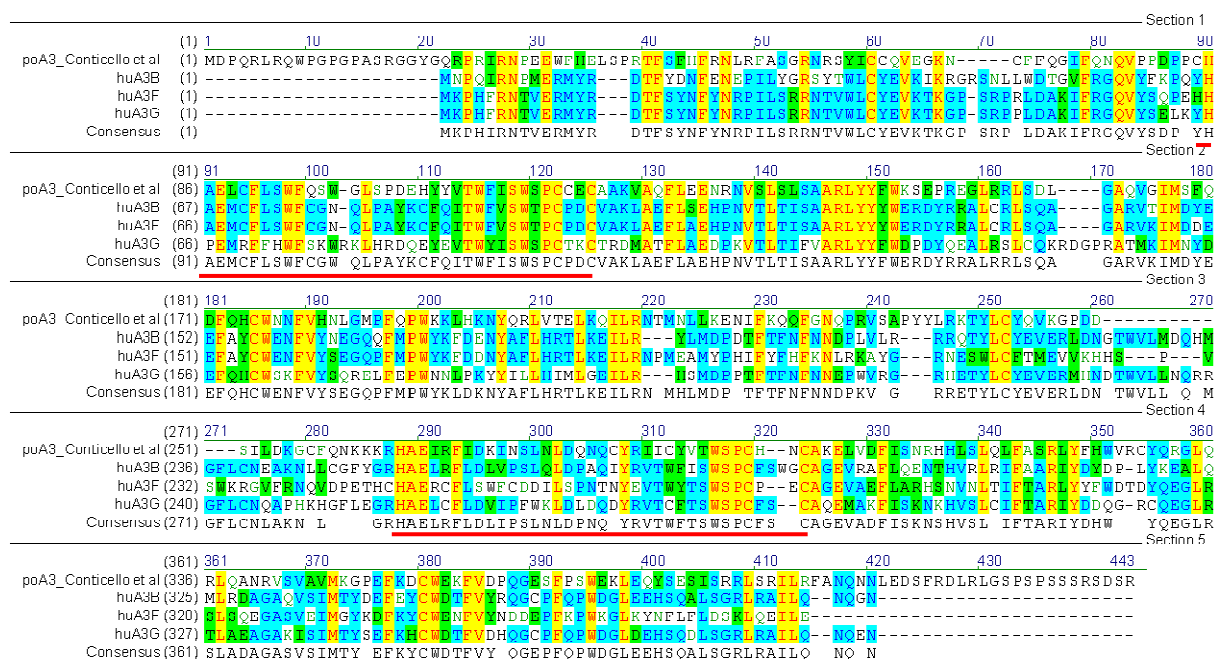


Abb. 18 AS-Sequenzvergleich von poA3 mit huA3B, huA3F und huA3G. Das porcine A3 wurde mit den drei humanen Doppeldomänen-Cytosin-Deaminasen auf der Suche nach homologen Bereichen verglichen. Bei allen vier Proteinen waren die beiden A3-spezifischen, konservierten Zinkkoordinierenden Domänen (HxEx₂₃₋₂₈PCx₂₋₄C, rot unterlegt) erkennbar (AS-Bereich: 90-126 und 288-324) (gelb unterlegt = 100%-ige Homologie zwischen allen Sequenzen, blau unterlegt = 100%-ige Homologie zwischen drei und mehr Sequenzen, grün unterlegt = AS gleicher Polarität).

Beim AS-Sequenzvergleich der beiden putativen, porcinen Cytosin-Deaminasen poAPO3 und poA3 war zu erkennen, dass beide Proteine bis zur AS 209 homolog zueinander sind, sich jedoch im C-terminalen Bereich unterscheiden (Abb. 19).

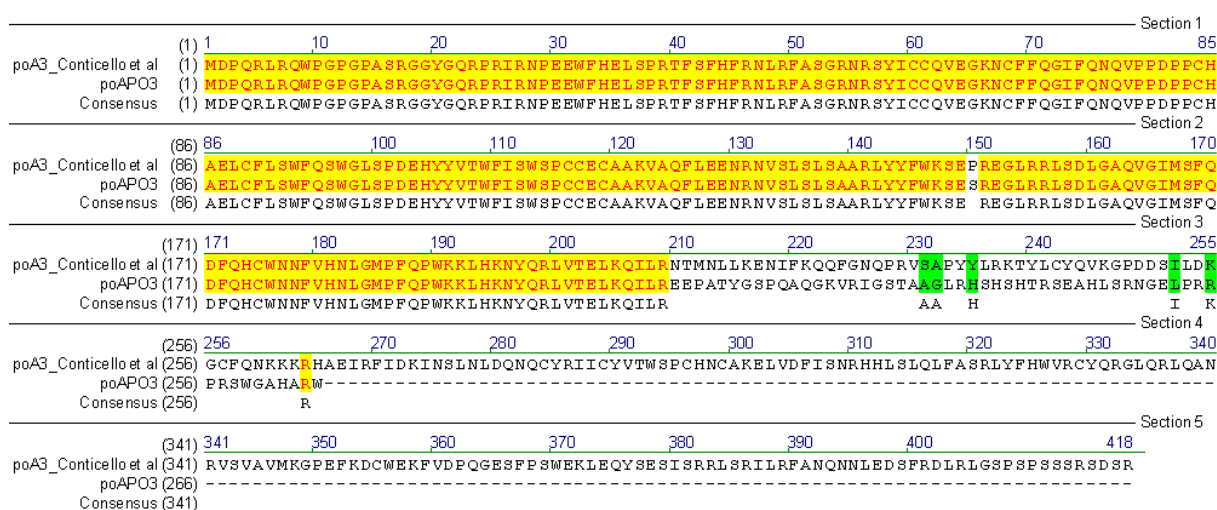


Abb. 19 AS-Sequenzvergleich der beiden putativen porcinen Cytosin-Deaminasen poAPO3 und poA3. Während es sich bei poA3 um ein Doppeldomänen-Protein handelt, besitzt poAPO3 nur eine Zink-koordinierende Domäne. Beide Proteine weisen bis zu AS 209 eine 100%-ige Homologie (gelb unterlegt) auf, unterscheiden sich jedoch im C-terminalen Bereich voneinander (grün unterlegt = AS gleicher Polarität).

Diese beiden porzinen A3-Sequenzen dienten zur Primersynthese, wobei cDNAs aus PK15, MAX-T, L45 und porzinen PBMCs als Matrize für die Suche der porzinen A3-ORFs mittels PCR verwendet wurden. Um die Qualität der hergestellten cDNAs überprüfen zu können, wurde eine Kontroll-PCR durchgeführt, bei der ein Teil der konstitutiv exprimierten, porzinen Glutamin:Fructose-6-Phosphat Amido-Transferase (GFAT) mit den Primern GFAT_for und GFAT_rev amplifiziert wurde.

Zur ersten Annäherung bei der Suche des poAPO3-ORFs wurden die Primerkombinationen 6f_poAPO3/6r_poAPO3 und 7f_poAPO3/7r_poAPO3, welche innerhalb der poAPO3-Sequenz binden, auf cDNA von PK15 und MAX-T angewandt (Abb. 20).

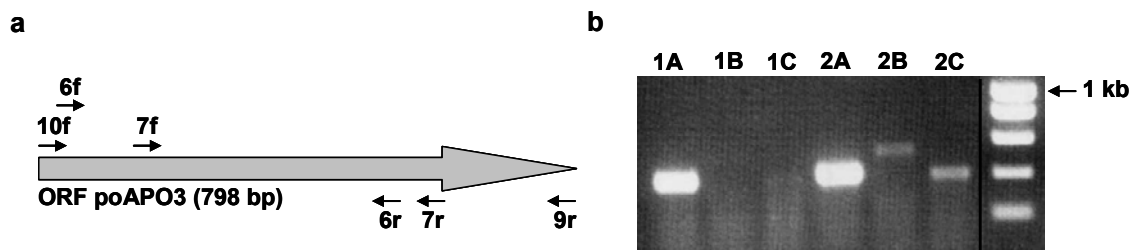


Abb. 20 Suche des putativen poAPO3-ORFs. (a) Position der verwendeten Oligonukleotide innerhalb des poAPO3-ORFs. (b) PCR auf cDNA von PK15 (1A-1C) und MAX-T (2A-2C) unter Verwendung der *AmpliTaq Gold DNA-Polymerase* zum Nachweis einer poAPO3-Expression (1: PK15, 2: MAX-T, A: GFAT (Kontrolle), B: Primerkombination 6f_poAPO3/6r_poAPO3, C: Primerkombination 7f_poAPO3/7r_poAPO3).

Dabei konnten bei MAX-T eindeutig Signale detektiert werden, während bei PK15 lediglich die Kontrolle eine Bande zeigte. Offensichtlich wird das poAPO3 nicht in PK15 exprimiert, was eine Wiederholung der PCR nochmals bestätigte (Daten nicht gezeigt). Die nachfolgende Suche des vollständigen ORFs von poAPO3 mit den Oligonukleotiden 10f_poAPO3/9r_poAPO3 auf MAX-T-cDNA ergab jedoch kein eindeutiges Signal, sondern ein Muster aus drei Banden bei etwa 900bp, 800 bp und 600 bp (Abb. 21a). Eine Wiederholung der PCR auf porziner PBMC-cDNA bestätigte dieses Ergebnis (Abb. 21b).

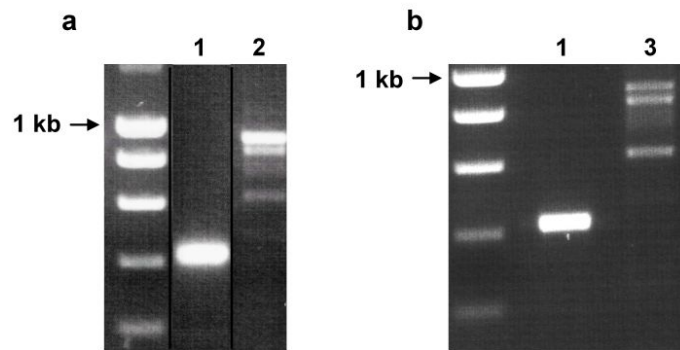


Abb. 21 Amplifikation des putativen poAPO3-ORFs. Die PCR wurde mit den Oligonukleotiden 10f_poAPO3 und 9r_poAPO3 unter Verwendung der *AmpliTaq Gold DNA Polymerase* auf cDNA von MAX-T (a) und porzinen PBMC (b) durchgeführt (1: Positivkontrolle GFAT, 2: MAX-T, 3: poPBMC).

Alle drei Banden wurden ausgeschnitten, kloniert und sequenziert. Auffällig war, dass der reverse-Primer bei beiden PCRs sowohl auf MAX-T als auch auf porziner PBMC cDNA nicht an die Matrize gebunden hat, denn bei der Sequenzanalyse mit *ContigExpress* konnte der zum reverse-Primer komplementäre Sequenzbereich nicht ausfindig gemacht werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die ursprüngliche EST-Sequenz sehr wahrscheinlich im 3'-Bereich fehlerhaft ist. Innerhalb der 900 bp-Bande wurde ein ORF von 843 bp (entspricht 280 AS) gefunden. Bei der 800 bp-Bande konnte ein putativer ORF von 591 bp (entspricht 196 AS) und ein ORF von 789 bp (entspricht 262 AS) identifiziert werden, wobei diese Sequenzen bei zahlreichen durchgeführten Sequenzierungen jeweils nur einmal detektiert werden konnten. Die 600 bp-Bande beinhaltete wiederum einen ORF von 333 bp (entspricht 110 AS). Ein Vergleich der erhaltenen AS-Sequenzen untereinander und mit poAPO3 ließ folgendes erkennen (Abb. 22):

Vergleiche von A3Z2 mit ORF_789 ergaben wiederum, dass es sich bei letzterem eventuell um eine Deletionsmutante zu A3Z2 handeln könnte, da dieser Variante 18 AS fehlten, wovon auch das HAE-Motiv der Zink-kordinierenden Domäne betroffen war. ORF_591 besitzt zwar die vollständige Zink-kordinierende Domäne, weist aber gleichzeitig ein völlig anderes C-terminales Ende auf, welches auch bei ORF_333 vorkam. Eine genauere Analyse der Nukleotidsequenz innerhalb des abweichenden Bereiches zeigte wiederum, dass sowohl ORF_333 als auch ORF_591 im Vergleich zu den restlichen putativen A3-Sequenzen mehr oder weniger große Deletionen aufwiesen, wodurch es zu Leserasterverschiebungen kommt (Daten nicht gezeigt). Dies ist was eine Erklärung für das unterschiedliche C-terminale Ende der Proteinsequenz und wirft gleichzeitig die Frage auf ob es sich bei diesen beiden Sequenzen eher um PCR-Artefakte handelt als um reale ORFs. Aufgrund einer fehlenden Gensequenz konnte jedoch diese Frage zu diesem Zeitpunkt nicht beantwortet werden, weshalb als einziger Hinweis die Proteinexpression *in vitro* diente (Kapitel 3.2.3).

Um die zweite porcine A3-Sequenz (poA3) zu finden, wurden die Primer 1f_Ss3F/1r_Ss3F generiert, die am 5'- bzw. 3'- Ende des Vollängenkonstruktes binden. Die Namensgebung der Oligonukleotide beruhte auf der – zum damaligen Zeitpunkt – noch nicht publizierten Information von Harris und Mitarbeitern (Mai 2006, CSH meeting, New York) (Jonsson et al., 2006). Die Gruppe hatte dieses porcine A3-Protein näher charakterisiert und unter anderem die AS-Sequenz der Zink-kordinierenden Domäne des porcinen A3 mit derjenigen der humanen A3-Proteine verglichen. Dabei zeigte sich die höchste Sequenzhomologie zwischen der porcinen Sequenz und huA3F, wodurch der Name Ss3F (*Sus scrofa* A3F) für das porcine A3 zustande kam. Im Zuge der neuen Nomenklatur (Larue et al., 2009) lautet die Bezeichnung für dieses porcine A3-Protein poA3Z2-Z3.

Die Oligonukleotide 1f_Ss3F/1r_Ss3F wurden auf cDNA von MAX-T und poPBMC verwendet, wobei das Gelbild neben schwachen, unspezifischen Banden nicht nur eine dominante Bande in Höhe der erwarteten 1.3 kb zeigte, sondern auch – im Falle der poPBMC-cDNA – ein weiteres, starkes Signal bei etwa 700 bp (Abb. 24a). Auch eine Wiederholung der PCR auf poPBMC-cDNA bestätigte das Bandenmuster, während bei der mitgeführten L45-cDNA nur ein schwaches Signal bei 700 bp zu erkennen war (Abb. 24b).

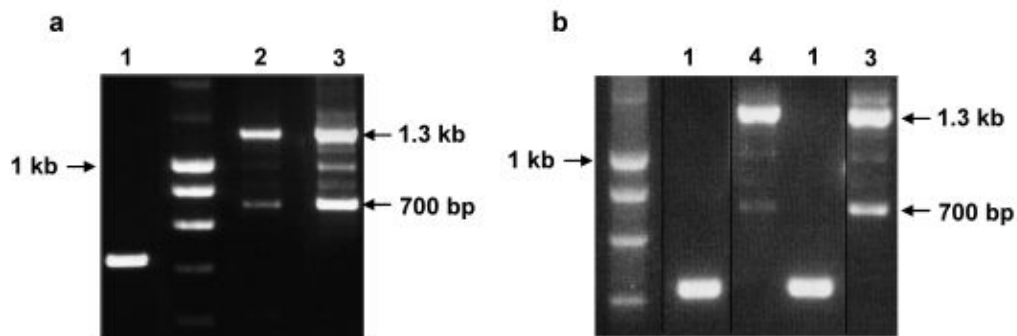


Abb. 24 Amplifikation von zwei weiteren porzinen Transkripten. Die PCR wurde mit den Oligonukleotiden 1f_Ss3F und 1r_Ss3F unter Verwendung der *AmpliTaQ Gold DNA-Polymerase* (a) und der *Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase* (b) durchgeführt. Dabei konnte bei der cDNA von poBMC ein zusätzliches, distinktes Signal bei 700 bp identifiziert werden (1: Positivkontrolle GFAT, 2: MAX-T, 3: poBMC, 4: L45).

Da bei der Wiederholung der PCR als Polymerase die *Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase* (NEB) benutzt wurde, bei der es sich um ein Enzym mit Korrekturlesefunktion handelt, konnten die PCR-Resultate untermauert werden. Die DNA der erhaltenen Banden wurde isoliert, kloniert und sequenziert. Das kürzere Amplifikat (ORF_708) umfasste 708 bp, was einer proteinkodierenden Sequenz von 235 AS entspricht. Für das größere Amplifikat (ORF_1260) ergab sich eine Nukleotidlänge von 1260 bp und eine AS-Sequenz von 419 AS. Damit war dieses amplifizierte Vollängenkonstrukt drei bp länger als erwartet, am C-terminalen Ende des Proteins lag anstatt eines SSS-Motivs ein SSSS-Motiv. Erst später – als sich die Hauptexperimente bereits in der Durchführung befanden – stellte sich heraus, dass diese Trinukleotid-Addition durch eine fehlerhafte Primersequenz eingebaut wurde. Da die identifizierte Sequenz zur Matrize ansonsten homolog war und die Wahrscheinlichkeit, dass diese AS-Addition einen Einfluss auf die enzymatische Aktivität hat, als sehr gering eingeschätzt wurde, wurden die Versuche mit diesem Konstrukt weiter geführt. Zur Sicherheit wurde jedoch zur Entfernung der Mutation nochmals eine Sequenz-Korrektur vorgenommen. Dabei zeigte sich, dass die Mutation weder Einfluss auf die antiretrovirale Aktivität noch auf die Deaminierungsrate hatte (Kapitel 5.1).

Durch Vergleich der AS-Sequenzen von ORF_708 und ORF_1260 zeigte sich, dass es sich bei dem kürzeren Protein um eine Spleißvariante handeln könnte, die sich aus einem kurzen, N-terminalen und einem längeren, C-terminalen Bereich zusammensetzt, während der mittlere Teil des Vollängenkonstruktes fehlte (Abb. 25). Da in dieser Variante die C-terminale, Zink-koordinierende Domäne vorhanden war, erhielt ORF_708 die Bezeichnung poA3Z2-Z3 Spleißvariante A (SVA), während ORF_1260 den Namen poA3Z2-Z3 erhielt.

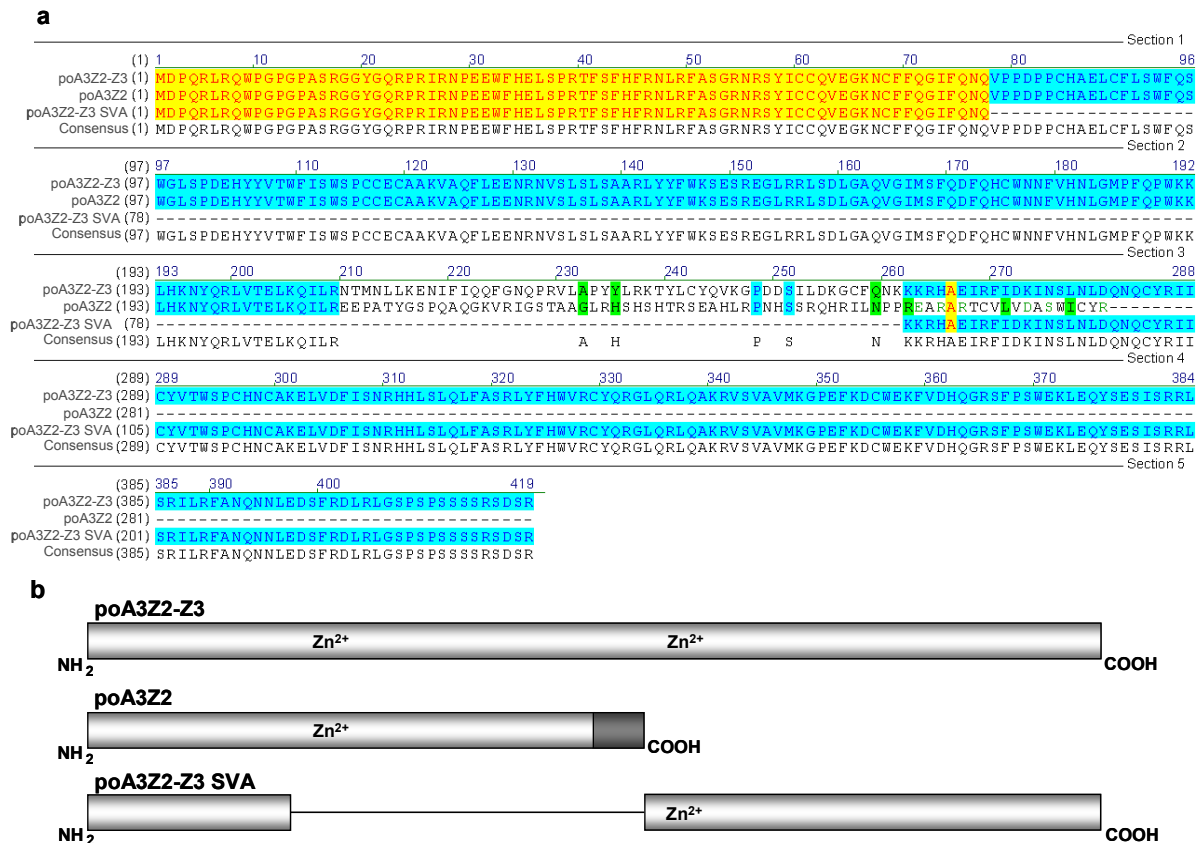


Abb. 25 (a) AS-Sequenzabgleich der putativen porzinen Cytosin-Deaminasen poA3Z2-Z3, poA3Z2 und poA3Z2-Z3 SVA. Bis AS 77 zeigen alle drei Proteine die gleiche AS-Sequenz. Danach bricht A3Z2-Z3 SVA ab und setzt sich erst wieder bei AS 262 des Vollängenkonstruktes A3Z2-Z3 fort. A3Z2 hingegen bleibt zu A3Z2-Z3 homolog bis AS 209, verfügt jedoch über ein alternatives, C-terminales Ende, dessen Sequenz im Vollängenkonstrukt nicht vorkommt (gelb unterlegt: 100%-ige Homologie zwischen allen abgeglichenen, putativen A3-Proteinen, blau unterlegt: 100%-ige Homologie zwischen zwei abgeglichenen, putativen A3-Proteinen, grün unterlegt: AS gleicher Polarität). (b) Schematische Darstellung der drei putativen, porzinen A3-Proteine. Der alternative C-Terminus von A3Z2, der zu keinem Teil des Vollängenkonstruktes A3Z2-Z3 homolog ist, ist dunkelgrau dargestellt (hellgrau = homologer AS-Bereich, Zn^{2+} = Lage der Zink-koordinierenden Domäne(n) innerhalb der Proteine).

Aufgrund der gesammelten Informationen aus Sequenzvergleichen auf Nukleotid- und Proteinebene lag der Schluss nahe, dass die drei Konstrukte A3Z2-Z3, A3Z2 und A3Z2-Z3 SVA wahrscheinlich existieren, während es sich bei ORF_789, ORF_591 und ORF_333 sehr wahrscheinlich um PCR-Artefakte handelt. Der endgültige Nachweis sollte über Proteinexpression erfolgen (Kapitel 3.2.3). Daher wurden abschließend nur die drei putativen poA3-AS-Sequenzen (A3Z2-Z3, A3Z2, A3Z2-Z3 SVA) nochmals miteinander verglichen (Abb. 25a), wobei bisher nicht geklärt werden konnte, warum A3Z2 ein von A3Z2-Z3 abweichendes, C-terminales Ende besaß. Eine endgültige Lösung konnte erst die Aufklärung der porzinen A3-Genstruktur liefern (Kapitel 3.3.1). Zusammenfassend für die Suche der beiden porzinen A3-Sequenzen wurden alle durchgeführten PCRs in nachfolgender Tabelle (Tab. 2) dargestellt.

Tab. 2 Durchgeführte PCR-Reaktionen zur Suche der putativen porzinen A3-ORFs. Vermerkt sind die verwendeten Primerkombinationen, welche cDNA als Template diente und welche Polymerase zum Einsatz kam (T_a = Annealingtemperatur, t_e = Elongationszeit).

Primerkombination	cDNA	T_a [°C]	t_e [min]	Polymerase
GFAT_for GFAT_rev	PK15 L45 MAX-T poPBMC	58	1	Phusion Gold HiFi
6f_poAPO3 6r_poAPO3	PK15 MAX-T	56	1	Gold
7f_poAPO3 7r_poAPO3	PK15 MAX-T	56	1	Gold
10f_poAPO3 r2_SV-N_poAPO3	MAX-T L45	63	1	HiFi
10f_poAPO3 9r_poAPO3	MAX-T poPBMC L45 poPBMC	64	1 1 0.5 0.5	Gold Gold Phusion Phusion
1f_Ss3F 1r_Ss3F	MAX-T poPBMC L45 poPBMC	64	1.5 1.5 0.5 0.5	Gold Gold Phusion Phusion

3.2.2 Umklonierung der poA3-ORFs in pcDNA3.1Zeo(+)

Alle gefundenen porzinen A3-ORFs – auch die vermeintlichen PCR-Artefakte – wurden in das eukaryotische Expressionsplasmid pcDNA3.1Zeo(+) (Invitrogen) über geeignete Schnittstellen einkloniert (Kapitel 5.5.6). Dabei wurde über die zum Einsatz gekommenen Primer 5' der ORFs eine Kozak-Sequenz addiert (gewählte Sequenz: actAUG...; optimale Kozak-Sequenz bei Vertebraten: AnnAUGG), die in Säugerzellen eine Rolle bei der Initiation der Translation spielt. Zum anderen wurde 3' der ORFs ein HA-tag (5'-tatccatatgatgttccagattatgct-3', AS-Sequenz: YPYDVPDYA) angefügt, um die intrazelluläre Proteinexpression in Säugerzellen detektieren zu können (Abb. 26).



Abb. 26 Schema zur Umklonierung der identifizierten, putativen poA3-ORFs. Über den forward-Primer wurde 5' der poA3-Sequenzen neben einer geeigneten Schnittstelle (*NheI* oder *Acc65I*) eine Kozak-Sequenz angefügt, während 3' der Sequenzen ein HA-tag und eine geeignete Klonierungsschnittstelle (*XhoI* oder *NotI*) addiert wurde (♦ = Stopcodon).

Die verwendeten Primer und die spezifischen PCR-Bedingungen sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tab. 3 Durchgeführte PCR-Reaktionen zur Herstellung der poA3-Expressionsplasmide. Vermerkt sind die verwendeten Primerkombinationen, welche cDNA als Template diente, welche Polymerase zum Einsatz kam und wie das fertige Konstrukt bezeichnet wurde (T_a = Annealingtemperatur, t_e = Elongationszeit).

Primer	Template	T_a [°C]	t_e [min]	Polymerase	Konstrukt
f_NheI_K_poAPO3 r_333591_HA_XhoI	ORF_333 ORF_591	56	1	Gold	333_HA 591_HA
f_NheI_K_poAPO3 r_843_HA_XhoI	ORF_789 ORF_843	56	1	Gold	789_HA A3Z2_HA
f_Acc65I_K_708_APO r_708HA_NotI	ORF_708 ORF_1260	56	1	HiFi	A3Z2-Z3 SVA_HA A3Z2-Z3_HA

3.2.3 Test der poA3-Konstrukte auf Proteinexpression

Um nachzuweisen, dass die identifizierten, putativen poA3-Transkripte *in vitro* exprimiert werden, wurden die Expressionsplasmide in HEK-293T-Zellen transfiziert und die Proteinexpression über Western Blot analysiert.

Weder für 333_HA noch für 789_HA konnte ein Signal detektiert werden, so dass gefolgert werden konnte, dass diese beiden Konstrukte nicht exprimiert werden. Dieses Ergebnis war absehbar, da 333_HA über keine Zink-kordinierende Domäne verfügt und 789_HA zumindest eine Deletion in diesem Bereich besitzt. Für alle anderen Konstrukte konnte ein mehr oder weniger starkes Signal auf Proteinebene detektiert werden (Abb. 27).

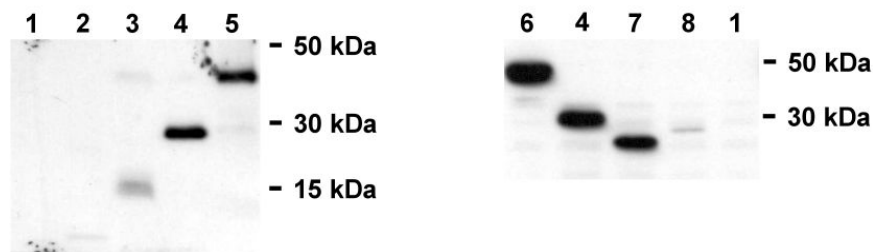


Abb. 27 Proteinexpression der poA3-Transkripte. Je 40 µg Zelllysate pro Spur wurden in einem SDS-Gel (5 % Sammelgel, 12.5 % Trenngel) aufgetrennt. Der Protein-Nachweis erfolgte über monoklonale HA-Antikörper. Die gleichmäßige Beladung wurde durch eine Coomassie-Färbung (Daten nicht gezeigt) der SDS-Gele nachgewiesen (1: Negativkontrolle (HEK-293T), 2: 333_HA, 3: 591_HA, 4: A3Z2, 5: huA3G (Positivkontrolle), 6: A3Z2-Z3, 7: A3Z2-Z3 SVA, 8: 789_HA).

Es bleibt jedoch nach wie vor fraglich, ob es sich bei 591_HA um ein natives poA3-Transkript oder um ein PCR-Artefakt handelt. Das HA-getaggte Konstrukt wird zwar offensichtlich exprimiert, aber die Tatsache, dass (a) diese Sequenz nur einmal bei der PCR-Suche auf cDNA gefunden wurde und (b) das Protein bedingt durch eine Leserasterverschiebung aufgrund weitreichender Deletionen auf cDNA-Ebene eine völlig abweichende Proteinsequenz am C-Terminus – verglichen mit den restlichen poA3-Transkripten – besitzt, sprechen gegen eine biologische Funktion. Diese Frage konnte letztlich erst durch Aufklärung der Exon-Intron-Struktur des porzinen A3-Genlokus geklärt werden (Kapitel 3.3.1).

3.3 Charakterisierung des porzinen A3-Genlokus

3.3.1 Identifizierung der Gensequenz

Da über Proteinexpression nicht vollständig geklärt werden konnte, ob es sich bei den identifizierten, putativen poA3-Transkripten um Spleißvarianten oder PCR-Artefakte handelt, wurde versucht, diese Frage durch die Identifizierung der Exon-Intron-Struktur des porzinen A3-Gens zu klären, wofür zuerst die Gensequenz ermittelt werden musste. Da zu diesem Zeitpunkt kein geeigneter BAC-Klon erhältlich war, der sequenziert werden konnte, wurde eine andere Strategie gewählt.

Zum einen wurde sich an der Exon-Intron-Struktur der Gene *huA3B*, *huA3G* und *huA3F* orientiert (<http://genome.ucsc.edu/>; BLAT search), da diese ebenfalls wie *poA3* für Doppeldomänenproteine kodieren. Während *huA3F* – bezogen auf Start- und Stopcodon des ORFs – aus sieben Exons besteht, setzen sich *huA3B* und *huA3G* aus acht Exons zusammen (Jarmuz et al., 2002). Ein gemeinsames Merkmal der Gene war jedoch, dass diejenigen Exons, welche die kodierende Sequenz für die Zink-kordinierende Domäne erhalten, deutlich länger sind im Vergleich zu den restlichen Exons. Somit waren die ersten Anhaltspunkte, dass das porzine A3-Gen wahrscheinlich aus mindestens sieben Exons besteht, wobei zwei Exons, welche für die Zink-kordinierende Domäne kodieren, länger sein müssten als die restlichen kodierenden Exons. Zum anderen wurde innerhalb des poA3-ORFs nach möglichen Exon-Exon-Übergängen gesucht. Nach Literaturangaben (Strachan et al., 1999; Wessagowit et al., 2005) sind dabei folgende Übergänge möglich: CAG/G, CAG/A, AAG/G und AAG/A (Abb. 28), wobei die Exon-Exon-Übergänge nicht unbedingt konserviert sein müssen, weshalb auch dieser Weg nur eine grobe Annäherung an die Lokalisation möglicher Intronbereiche darstellte.



Abb. 28 Konsensussequenzen für Spleißdonor (SD)- und Spleißakzeptor (SA)-Stellen in Introns komplexer Eukaryoten. Weiterhin dargestellt sind mögliche Exon-Exon-Übergänge. Hervorgehobene Nukleotide sind hoch konserviert und können zur Identifikation der Exon-Intron-Grenzen herangezogen werden. Weiterhin beinhaltet die SA-Stelle eine polypyrimidinreiche Sequenz (Strachan et al., 1999).

Abb. 29 Teilsequenz des porzinen A3-Gens. Die fragmentierte Gensequenz wurde durch Kombination des ORF von poA3Z2-Z3 mit aktuellen Sequenzdaten aus dem Schweinegenom-Sequenzierungsprojekt erhalten (orange: Spleißdonor- bzw. Spleißakzeptorstellen, blaue Großbuchstaben: kodierende Exonbereiche, schwarze Kleinbuchstaben: Intronsequenzen, Zahlen in Klammern: Angabe der Nukleotidposition innerhalb der poA3Z2-Z3 cDNA).

Anhand dieser Daten wurden entlang der poA3Z2-Z3 cDNA-Sequenz *forward*- und *reverse*-Primer in regelmäßigen Abständen synthetisiert und auf genomischer DNA von MAX-T für PCR-Reaktionen eingesetzt. Als Polymerase wurde die *KOD XL DNA Polymerase* (Novagen) verwendet, da sie neben einer effizienten Amplifikationsrate auch sehr akkurat über GC-reiche und lange DNA-Bereiche liest. Falls Amplifikate identifiziert werden konnten, deren Größe über der erwarteten Soll-Größe gemäß der cDNA-Sequenz lag, wurden die Banden ausgeschnitten und die DNA sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden einerseits mit dem ORF von poA3Z2-Z3 abgeglichen, zum anderen wurde nach folgenden, konservierten Intronbereichen gesucht: (a) Spleißdonorstelle (Dinukleotid GT), (b) Spleißakzeptorstelle (Dinukleotid AG) und (c) Polypyrimidintrakt vor der Spleißakzeptorstelle (Abb. 28). Auf diesem Wege wurden die Intronbereiche bzw. die Exon-Intron-Komposition des porzinen A3-Gens zwischen Start- und Stopcodon identifiziert.

Alle PCR-Reaktionen, die dazu beigetragen haben, die Genstruktur zu entschlüsseln, sind in Tab. 4 aufgeführt:

Tab. 4 Durchgeführte PCR-Reaktionen zur Identifikation der porzinen A3-Gensequenz. Vermerkt sind, welche Primerkombinationen verwendet wurden und welche Genbereiche mit einer entsprechenden Kombination amplifiziert wurden. Die Primer-Kombinationen f_Exon2_1/r_EI_3 und f_Exon_2/r_EI_2 wurden in einer *nested*-PCR eingesetzt, um Intron 2 zu amplifizieren (T_a = Annealingtemperatur, t_e = Elongationszeit).

forward-Primer	reverse-Primer	T_a [°C]	t_e [min]	Genbereich [nt]
9f_poAPO3	3r_RH_poAPO3	59	5	1 – 2.370
f_Exon2_1	r_EI_3	64	3	2.226 – 6.054
f_Exon2_2	r_EI_2	64	3	2.294 – 6.001
for_EI_8	7r_poAPO3	59	1	6.030 – 6.585
f_Exon4_3	r_Exon5_2	57	6	6.532 – 14.901
for_EI_7	r_EI_6	62	3	14.893 – 16.084
for_EI_3	3r_Ss3F	64	4	16.058 – 16.547
for_EI_2	2r_Ss3F	64	5	16.163 – 16.934

Das porcine A3-Gen besteht – ausgehend von Start- bis Stopcodon – aus insgesamt 16.971 bp. Verglichen mit der Sequenz der poA3Z2-Z3 cDNA verteilt sich die kodierende Information auf acht Exons, die durch sieben, verschieden lange Introns (von einigen hundert Basenpaaren bis hin zu mehreren Kilobasen) voneinander getrennt sind (Abb. 30a). Bei jedem Intron waren sowohl Spleißdonorstelle, Spleißakzeptorstelle sowie Polypyrimidintrakt (Abb. 28) sehr gut zu erkennen. Die Exons endeten am 3'-Ende gewöhnlich mit CAG oder AAG, während sie mit einem G oder A am 5'-Ende begannen. Eine Ausnahme stellten das vorletzte (3'-Ende = CGT) und das letzte Exon (5'-Ende = T) dar (Abb. 31).

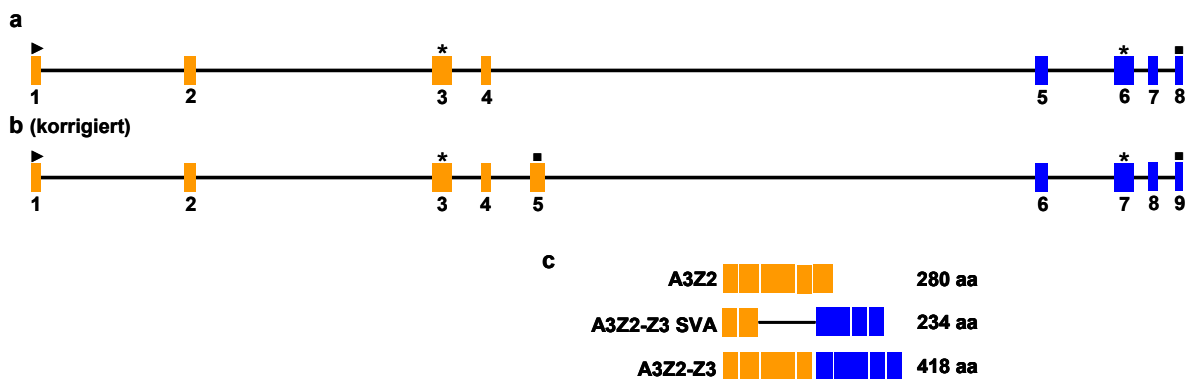


Abb. 30 Exon-Intron-Komposition des porcinen A3-Gens. (a) Genstruktur nach Abgleich der Sequenzdaten mit der Sequenz des porcinen poA3Z2-Z3-Transkriptes. (b) Korrigierte Genstruktur nach zusätzlichem Abgleich der Sequenzdaten mit der Sequenz der A3Z2 cDNA. (c) Exon-Zusammensetzung der porcinen A3-Transkripte A3Z2, A3Z2-Z3 SVA und A3Z2-Z3 inklusive Angabe der Länge des kodierten Proteins (orangefarbenes Rechteck: Exon, das für den N-terminalen Bereich des A3-Proteins kodiert, blaues Rechteck: Exon, das für den C-terminalen Bereich des A3Z2-Z3-Proteins kodiert, schwarze Linie: Intronbereiche (bei a und b) bzw. Verbindungslinie (bei c), Dreieck: Startcodon, Stern: Lage der Nukleotidsequenz, welche für die Zink-koordinierende Domäne kodiert, Quadrat: Stopcodon) (Stand: Herbst 2008).

Anhand der Genstruktur (Abb. 30a und Abb. 31) konnte bewiesen werden, dass es sich bei A3Z2-Z3 SVA, das aller Wahrscheinlichkeit nach bevorzugt in Blutlymphozyten (PBMC) exprimiert wird (3.2.1), tatsächlich um eine Spleißvariante handelt, die sich aus den Exons 1, 2 und den letzten drei Exons des Gens zusammensetzt (Abb. 30c).

Allerdings konnte anhand der bisher erstellten Exon-Intron-Struktur des porcinen A3-Gens (Abb. 30a) noch nicht erklärt werden, warum das A3Z2-Transkript ein anderes 3'-Ende besitzt. Daher wurden die 217 nt des 3'-Endes von A3Z2, welches nicht innerhalb der Sequenz des poA3-Transkriptes zu finden war, mit der Sequenz des Introns 4 verglichen. Tatsächlich wurde eine 100%-ige Übereinstimmung gefunden, wobei auch die Spleißakzeptorstelle sowie der Polypyrimidintrakt im 5'-Bereich vor dem Exon identifiziert werden konnten. Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse konnte

ATGGATCTCTACAGCGCTGAGACAATGGCCAGGCGCGGACCAGCCAGCCGAGGAGGAGGCTACAGGC
CAGAGGCCCAGGATCAGgtaccgccacccgcccacgctgtcccacgaggccccctctctgcagcccttctagggctgtgcctct
gtcctcggtcctcctatccccagagccccgcattcccagcctcttccgttccctctctgtgggtcctctctgcagggccactccctctgtgggtct
tgcctctctgtggggggggagggtgccccactctggttccaaactggccctcctacacctccaccagccccgagggtcctcctgcctgt
cactcggtctgaaagtctgtctgtgggtctggatggtccctccctgctctgtgggtctgcacccctattggtcggaataatctgtgtctta
gcttagaatttgctaagggaggatggaagccgtgggtgaattttgtcaaagcactttgatggtatctctgtagcattaaacagagagactagt
ctctgaggcaagaagataaatctgtcttccaagaatatctccacagttagcagcaaaataaatgccactctcacaaatctggccaaacta
ggtgaccacgcttcagggttataaccaaaccatgaatgggaacttgaggaaagatggggagaaacccctctgtttaaattaagtaggag
ggagtcccattgcgactcagcgggttgtaaccaactagatcatgaggatgcaggttgatccctggcctcactcagtgggtaaggatctg
gcatcacgtgagctgtggtgtgggtcgcagatgtggctcagagccctgtgtgtgtgggtgtaggcccgcagctatagctccgattcgac
ccctagcctgggaacctccatgtatcacaggagcaacctataaaagaaaagaaaaaaaaaattgagaagaaaaccacctccaagg
ctgtccacagctgcaagggtcacatcatggaaaacctggaaatggccttgccctgcaggggacccaggtccatcttactgctcttagagaag
ggcaggctccttgctctctgtgtgtgttctcctctataaagtgggatggctccgcaggatttggggaggaggagatagttcagatacaaa
cacttgggacactagccggagcctgtgaatgtagggtgtaagctgacattaaaaaaaaaaccagaaaaacaaaaaaaaaaccaaggagt
tcccactgtggcacaaggaattgacagtgtcttgggagcgtgggacgcaggttcaatcccagttacctggcacactgggttaaggatcca
gcattgccatggtgtgacttaggtgcaactgtggtcggatctgtatcttggcctgggactccatagtctacaggttgccccaaaaagagaa
ataaataattaattaattaataaaaaatatgcacaagtaaaaaaaaaaaaaagccaacaaacaaacaaacaaacaaactaaaaa
aagagttccccgttggtggcacagtgaagcaaatccaactaggaacctagagtttgcgggttgatccctgctccctgcagggagggttaaggat
ccggcattgccatgagctgtgtgtgtgtaggtgcagacgcactcggatctggcgttgctgtgctgcgcaggtggcgggtggtgcagctgatt
agccccctagcctgggaacctctatgtgccacaggtgtggctctagaaatggcgaagacaaaaaataaaaaaaccaacaaacaaaa
acaaaaacaaatatgcacaagtgaagtcagaagtgaatggaactgcaatattgaaggctctgtgtatttggagtggagagggtttattactctt
atgatatttttctagtgggttgggggatgggtaggcaggcaaaactggagtggaggtgggagtgtctgtggaaggagcagctctgggccctgtg
ggagaagtacccaccccggtgtcccagacccctctccgtcctctccttgcctggaaagcttccagcagggaattctcaaggccaaagtgg
gggttttggctcgtggcgtgtgtcagagggtcagctgggagtaacccaggcaacctatctgtctttcccttttctcttttgggtccagGA
ACCCAGAGGAGTGGTTCCATGAGTTATCTCCCCGAACCTTCTCCTTCCACTTTCGCAACCTGCGC
TTTGCCTCTGGGCGGAACCGCTCCTACATCTGCTGCCAGGTGGAAGGAAAGAACTGTTTCTTCCA
AGGCATCTTCAAACCAAGgtatgggccgatgacaccctaactgtggcgaggctgaatagaggcacagagaggtcccac
atggtgcagcggaaacaaatccaactaggaacctagaggtagcgggtcaattctgtgctcagtcagtggttgaggaaactggcgatcctgt
gagctgtggtgtaggttgagacgcggctcagatctgatattgtgtgtgtgatataggccggcagctgtagctctgattcagccctagcct
gggaacctctgtatgtctgaggggtgcggccctaaaaagcaaaaaaaaaataaaaagaaaaaaaaaagaaaaaaaaaatacttttt
gtttgtttgtttgagtgtcttggacctgcaatctgagaacacagattcaggtgcagcctaattgtgttctgccagaggggtttattggcaattgcg
gaagtttaggagctgtgactaattgtttcccaaagtataattggggatataattcaattgcaattcattggtttcagagtataattgtcaatact
aggaaaaatgcctttgacgtgtgtccggtttttaccaagaatgcagacacaggaggtcccgtcgtgtcagtggttacgaacctgactagtatcc
acgagaatgcaggttaacccctggcctgtcagtggttaaggatctggtgtgtgtgagctgtggtgtgaggtggcagctgcagctccgattc
cattcctaacagggaactccacatgccacaggtttggccctaaaaagtgaagaaaaaataatgtagatagcagcagtgatacat
tctgtcctatgcccttgcccaaagcaatagttcaaactagttcctgtttccaagatgggatgaatttttagccccccaatggaagagatgtgtg
acatatgtataacggaaattactcagcctataaaaaagaacaaataatgccattttgcagcaactggtgtagacacttagagatgatcataaa
gtgacgtgaagtcagagaaagacaaatatcatgatctcatatgtgaactttttttttttgtctttttgtctatttttgggcgctcccgcg
gcatatggagggttccaggctagggttcaatcggagctgtagccactggcctatgccagagccacagcaacgcgggagtcggagccgctgt
gcaacctacaccacagctcacggcaacgcggtatcgttaacccactgagcaagggcagggaccgaacctgcagcttggttcttagtgc
gattcctaaccactgcaccacgacgggaactcccggaactaattttgaaacgatacaaaagaactatttactggaggtccctgtgacctag

[illegible]

aaagtaaccagacagctttaaggctgcatgcttcaagtcaggctctctgtccccggccgggagggcctctgggggcagcgagaccctct
 ctcatctctttcatggaacagtgaggaagcaggaggaaggaacctggccaggctgccaggacagccttcagttctgccatttattgcatgt
 gacctcaagaaagtgcttagcctctctgtgctgacatggaagtgctcaggataatgagtcctccagcttgatgtaacagggggctggg
 gtagcagatggtgactggtatgctcaacgcagggtggtgatgaaatccagagcactgacccccagcctcactttctgctgccagagt
 ctgtcaggatactgaatgacaatgcaggggtagggtggagagggctccagcttgacccccctccacctcggtcgccggccggccccc
 cgccctgccaccgcccagcaggagccagcctctgtccgcactttgcagccagggtctgtccatccccccacttctctggcatcttactttctt
 tcccttgtagtaactttcggtctgacgtgcatcagaggctgagctctgccaagaggggcccaagagaagggtgggtctgagcctgagg
 aagcaaacggcccccaggccctccacccctggtgccaagcaggaaggaggtggggcctccgctgagacggcctgggaggttgctca
 cagataacgggtgtcctaaagcagggtcctggagggaaggaaggcaggccacccatgaccaaaggctgggtgggacaagccttg
 ggggacaaggagctgctcaggactcccgaatctgtaagtaagagccagaggaggagagcagggtgggtctgagagaccaaatt
 caccctaggcatcccgctgcagggtgaccgagggcgggaaggccctctaccactcagctgtaggaggacagtgtagggggacactctcagat
 aagcggcttcccaaggccaaggcagcctagtgagaggaggggcagccagagagccagtgccaggggcaagctgcgacaagcctg
 cagtggaggctggagccaggctgcatggaccaggtattgtctggttctctcttagccggggctctgctccgcctccctctcgtctcagc
 cccgcttctctccctcctggtcctctctctgcaaggcctctctctgctcagggcccccagggtgctctgtcacagctgctctgtctgtc
 gccgaattgagggcgaataaataatcagggtcgtctgtaggaattggtgctcgatataatccctgacagatggccatgggttaagattgtaaaa
 actcagcagacaaacgggccttgctgttggaagattaaacttgaaatacattactttgagttctgctcgccgtcctggttgccgaacccg
 actagatccttgaggacacgggttcggtcctggtcgtcagtggttaaggatccagcgtgcccgtgagctggtatagggtcaaatgac
 atctcagatcccgagggctgtggcataggccggcagctacagttctgattcgacccctagcctggaactacatatgccgaggtgcccctcc
 aaaagacaaaaagacaaaaaaattttttaataaaaataagtttttaaaaaagaaagtaacattgctttacgtcaaatgggaattatccct
 gacatccatttgatggttacccaaagaatgaaagagcgggtgacttaagtcaggggagagaagagcaagaggatcataaaattcgggg
 agcatccccacctctaaatctattggacaaggcgcgatataggtaaactgggcaaggccgctgggaaaaagaactgacatctggacctc
 atgttggtacctgcccctgctcctaagaaataaaaacccctctaaacaatagagaggagactctccctcccagtatctgtgctgggagcgatt
 tgccttgctgtgctgctgctggttcacgaagttcatttggctccgtgaacaagaacccggattctggtaacatcttccggttaacaatccag
 aggcacggccaccaggtctcctaaagcttgggtgcatctccatcctagactttaggcttaaggataactgaagcagttttggagtcagtataa
 aagcacttttttttcttttaataaaggctgcgctgtggcagctggacgttccaggctaggggtgaatcagagctgcagctgccagcttatgc
 cacagacacagccatgcgggatctgagccgcatctgctgctacaagctcggctgtggcacactggtccctaaaccactgagcgagacca
 gggatcgaacccgcatcctcatggacactatgccagggtcctaactgttgagccacaatgggaactcctataaagcattttgaaaatttttta
 aaggcacattctgcaaaaaagattctattctactctgtggaggcacaactgccagagacaagaagaatacgcatttccatgaggacact
 accaattctgaaaaatlaacttctagagttcttctactatacctacaattttagctattcaagggtcagggtcaacatttgctgtgaagataagtc
 tctgtctaaaaatttggaataattctggagtgctggtttcccaggactgggggagtttccagagcatgggaactcagggtctaaatcaggaa
 aattctaggcaaatggggcagtgatcatctatctgtgctgtgagtggttcccttctaactcctaccatgaggggtggccggtggccctaacggg
 gagtgtgaactcaggcaaggctactggcggttaacaaaggccgagtcacaagatggtccttggcgatttctccaaatccatctaaagtt
 ttactaattaggagttccgctgctggcagctggttaacgaatccgactaggaaccatgaggtcgcggttcggtccctgcccctgctcagtggtt
 aaggatccggcggtgctgagctgtggtgtaggtgcagacgcggctcgatcccggtgctgtggtctggcgtaggcggcggtctacagc
 tccattcaacccctagcctgggaacctccatagccgcggaagcagcccaagaatagcaacaataacaacaacaacaacaaca
 aaagacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagtttactaattaacggaggttccattgtggcacagcggcaatgaatctgactgatccatg
 aggatgcaggttccatccctggtgctgtagtggttaaggatccagcgttgcggtgagccgtggtgtaggtcgaagctgtagcttgctctga
 gttgctggtggtgtagtgccggtgagctgcagctccaatcagacccctagcctgggaactccatagccacgagtgccggtcctaaagc
 aaagaaaaataaagtttactaattaacacaagggtatgcagagagaggttccactgatgaacaagggttcgctcaatgagaacaacag
 gtaccggaaggtttcagtcagtggaactggtggtttcagtgagtggtggaagtgaatgagtgagtgaggggtttctggccttcaggaccga
 ggtggtgctccccatggtctggccctgcgggcacccctcgttgattccttattcagatgcaagttccaaggcgcagaggtcaccgcagcctg
 actgctgtcagccaagccacattacctggatggagtgctcagaaggacaactcactggggccatcaagcctcccacgctgttcagctggc
 attggtggtgcatgagtgctcatgtgtggcggttccggccacagggtgcttcacgccccgctgagctgtgagcaggagcctctagttaa
 agccacctactctgtcgccacagagccaacagcattcatcagaagaccctggggagttccgctgctggcacagtggttaatgaatccgact
 aggaaccatgaggtgcaggttcgatccctgcccctgctcagtaggttaacgatccggcgttgcggtgagctgtggtgtaggtgcagacgccc
 tcggatccacattgctgtggtctggtgtaggtggcagctacggtccaattggaccctaccctgggaacctccatagccgcgagagtg
 ccaagaaatggcaaaaagacaaaaaaagaaagaaagaccctggtagctctggttctcacacgagctgggtcacttg
 caatataaatttttttcttttagggccacaccctggcatttgggggttccaggcaagggtcaaatggagctatagctgccggcctacac
 cacagccatagcaatgccagatccgagccgcatctatgacctacacatagctcatggcaatgccggagccttaaccactgatcaaggcca
 gggattgaacctgtggcctatgcatactagtcagattcattttagccatgatgggaactctgcaatataatataaataagaaaaaaccca
 agatccaaaaatggaatactatggagtaacacagttactgggagaaagagctatgtggccatcagcccaagcctctgtcacaacgct
 tcttgggtgacaacagatttctgttcatgtgctctgtgctttgtacagacagaatttcgatacacacagctcagcaaagagcacagactcac
 agggagcaccagcttccatccccctgctccttgaagacaaggattctgacattagccatgggttcagggtgctgtggttctgaatggagg
 agtctggggctcaggtcgaaaatatgagaactgaggagttccctagtggggcagtggttaaggatctggtgctgcgcggtgtggcatgggtt
 gatctttggcctgggaactctgcatgctgtaggcgagccaaaaaaagatgtgcatatttagttctcagggcaggggcctcccaccaac
 ccaggcatcctgctacagtgccctgagtggtggtggtgagagggtctgcccagggtggaggtgggaggtgggagagatcactctcc
 tgtccccgctcctggtgcaacaaagagatgagacctccctaccccttagggccagggtgaacccaagaactgggtctgtggc
 ggagagcctgggtgatgccagaaaacactctccgcagcttcttctccttctgttgacagAAACACAATGAATCTACTAAA
 AGAAAATATATTCTACAAACGTTTGGCAACAGCCCGGGTCTTGGCGCCCTACTATCTAGGA
 AGACCTACTTGTGCTACCAAGTGAAGGGGCCAGTACTCCATTCTTGACAAAGGCTGCTTCAA
 AACAAGgtgccaatgggtcctctgggcacagggcaggcagggtcacctcatccctgcagggaaaatcctgaggctgagtggtggtcc
 acgtgagcccagcatccctggaactctgcatcttctccatcccaggccaccgcaggagccctgcctctagcagagccgtcctctgctccc

ctttgagaagcaaatattccctcctcctccagactcagctcagccagctctgcggggctggggggagccaggggatctcccaaggactgagcc
cctaacctcacctccgagatctccatcccatttcggccttccgcccattctctacctggcctatccctcctcctccctgacacgctcctccattcag
cgtctgcagaccacctcctggatgtgtcccaaggcaggtggcaaagtagtcaggactacgcccctggcggtgtctgtttgacagccccctctc
ggggccctggggccctgatccaattcccgccaactcaggtgcctggggagtggtggaattaacggatgagtgagtgaaaggaattaataagg
aaggaaaggaggttctttctgtctgggtaagttcacttactgaaaagttacaggacagagccttattcttcttttcttaagggtgcaccagc
ggcacatggaagttcccaggttaggggtctaatacagagttgcagctgcgggcctatgccacagcaatgtgggatccaagccacatctgtgacct
aactgcagcttggggcagcaaggaatccttaactcactgagtgaggccagggaggagacccacatcctcatggacacatattgtgggtctta
acccccctgagccacaagggaactcttgccctctgccttctaaccgattcttctcttctgtctgggacctgttcagAAAAAGCGACAT
GCAGAAATTCGTTTTATTGACAAGATCAATTCCTTGAATCCGGACCAGAACCAAGTGCTACAGAATC
ATCTGCTATGTCACCTGGAGCCCTTGCCACAAGTGTGCCAAGGAGCTGGTTGATTTTCATCAGCAA
TCGGCACCACTGAGCCTGCAGCTCTTTGCCTCCCGCCTGTACTTCCACTGGGTCAGGTGTTATC
AGAGGGGTCTGCAGCGTCTGCAGGCAAGCGGGTCTCCGTGGCTGTCATGAAAGGCCAGgtagg
aagacagacagagcctctgggtgagtggtacagctccaagagagagagccaccgagtaggggtggggggcaggtaggtggt
ggcccagctgagaccacaaagtgtgacaccaccgggaaggagaaatccagaggaggaagtggaagggaagggggggacccctgga
ccttgggggtgcatgctacctgttcccctgcccttgggcctgacttggtctcctctctcatctcagAGTTCAAAGACTGCTGGGAAA
AATTTGTGGACCACCAGGGGAGGAGCTTCCCATCCTGGGAGAAGCTGGAGCAATACAGCGAGAG
CATAAGCCGACGGCTCTCAAGGATCCTGCGTgtgagatgctggcgtctcctgcgcaccccccccccaacccctcccag
cttcagcccttctctgtctggcgtcttcttcttctgtctcttgcactgccccccattccttcttttctcatgataccctctttgtctctgtctccagg
ggttccaggttcttcttctctcgttcggagacgctcattagctcgtgggtttgactcgttcttttctgtccagcacttccagcatcactcctc
ctcctttgtctcttcacagtttcccgccaatcaaagcttctcgtgtctctcctcaacagTCGCGAATCAGAATAATTTAGAGGAT
TCCTTCAGAGATTTGCGACTCGGTTCCCCATCACCTTCATCATCAAGAAGTGACTCGAGATGA

Abb. 31 Sequenz des porzinen A3-Genlokus, bestehend aus einer Länge von 16.971 bp, welche sich auf neun Exons (blau) und acht Introns (schwarz) verteilen (hellblau: Exon-Übergang, orange: Spleißdonor- bzw. Spleißakzeptorstelle) (Stand: Herbst 2008).

Auch die Transkripte ORF_333, ORF_591 und ORF_789 wurden nochmals mit der Gensequenz verglichen. Es konnte dabei festgestellt werden, dass diese PCR-Produkte Deletionen über bestimmte Bereiche aufwiesen. Dabei waren im Falle von ORF_591 und ORF_789 am 3'- bzw. 5'- Ende von Exon 3 Deletionen nachweisbar, während ORF_333 das komplette Exon 3 fehlte (Sequenzabgleich nicht gezeigt). Aufgrund dessen und wegen der schlechten Proteinexpressionen dieser Transkripte wurden diese drei Transkripte von allen weiteren Studien ausgeschlossen.

An dieser Stelle sei erwähnt, dass die derzeitige Exon-Intron-Struktur des porzinen A3-Gens lediglich kodierende Exonbereiche aufzeigt, da das Ziel dieses Projektes darin bestand, zwischen Transkripten, Spleißvarianten und PCR-Artefakten zu unterscheiden, die im Zuge der Suche auf cDNA identifiziert wurden (Kapitel 3.2.1). Nicht weiter untersucht – zumindest nicht zum damaligen Zeitpunkt – wurden die nicht-kodierenden Exonbereiche, die regulatorische Funktionen erfüllen. So ist die 5' *untranslated region* (5'UTR) derjenige Bereich zwischen Capstruktur und Startcodon, der keine proteinkodierende Information enthält, sondern wahrscheinlich für die Stabilität der mRNA verantwortlich ist oder Sequenzen wie Ribosom-Bindestelle und Kozak-Sequenz beinhaltet, welche für eine effiziente Translation der mRNA wichtig sind. Die 3'UTR wiederum ist der Bereich zwischen Stopcodon und polyA-Schwanz.

Dieser Bereich könnte ebenfalls einen Einfluss auf die Stabilität der mRNA besitzen und verfügt über ein Polyadenylierungssignal. Diese Analysen wurden jedoch für die Publikation Dörrschuck *et al.* (Dörrschuck *et al.*, 2011) angeschlossen, nachdem LaRue *et al.* (Larue *et al.*, 2008) Daten zu dem *poA3*-Genlokus und den UTR-Bereichen veröffentlicht hatten (Kapitel 3.3.2).

3.3.2 Reorganisation des *poA3*-Genlokus und Identifizierung der UTRs

In der Veröffentlichung von LaRue und Mitarbeitern (Larue *et al.*, 2008) wurden vor allem die A3-Gene, die daraus resultierenden Transkripte sowie Proteine der Paarhufer – und somit auch des Schweins – näher beschrieben. Aufgrund von RACE-Daten, cDNA- und EST-Sequenzen sowie der chromosomalen Sequenz des porcinen A3-Genlokus kam die Arbeitsgruppe zu dem Schluss, dass das Schwein zwei Einzeldomänen-A3-Gene besitzt (A3Z2 und A3Z3), welche für mindestens drei Proteine kodieren (A3Z2, A3Z3 und A3Z2-Z3) (Abb. 32), wobei die Bildung des Doppeldomänenproteins A3Z2-Z3 auf eine Durchlesetranskription und alternatives Spleißen zurückzuführen ist. Mit dieser Publikation revidierte die Arbeitsgruppe ihre zuvor selbst aufgestellte Aussage, dass es sich beim porcinen A3-Gen um ein einzelnes Gen (A3Z2-Z3) handelt (Jonsson *et al.*, 2006). Bei den aktuellen Studien wurden ebenfalls die UTR-Regionen der beiden Gene näher untersucht (Abb. 32, gekennzeichnet als offene Boxen).

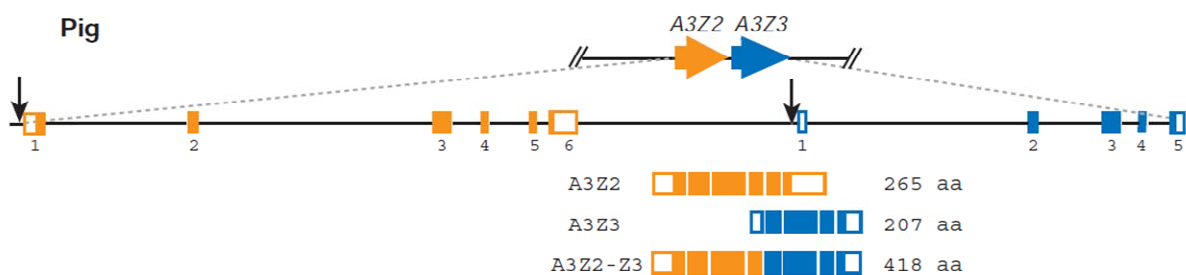


Abb. 32 Schematische Darstellung der porcinen A3-Gene und deren identifizierte Transkripte. Der porcine A3-Genlokus beinhaltet zwei Einzeldomänen-Gene (A3Z2 in orange, A3Z3 in blau), die sich aus sechs bzw. fünf Exons zusammensetzen und für mindestens drei Proteine kodieren (gefüllte Boxen: kodierende Regionen, offene Boxen: UTR-Regionen, Pfeil: mögliche Lage der vermuteten ISREs, schwarze Linie: Introns). Die Abbildung stammt von LaRue *et al.* (Larue *et al.*, 2008).

Bevor die im Zuge dieser Dissertation erhaltenen Resultate zur Veröffentlichung gebracht werden konnten, gerade was die genetischen Aspekte betrifft, war es daher notwendig, die Ergebnisse von LaRue *et al.* (Larue *et al.*, 2008) entweder zu bestätigen oder zu widerlegen, um somit die eigenen Daten für die funktionalen Experimente gegebenenfalls in einen anderen Kontext einbetten zu können. Als Ausgangspunkt diente ein Nukleotidsequenz-Abgleich der selbst identifizierten Gensequenz von *poA3* (Abb. 31) mit einer von LaRue und Mitarbeitern (Larue *et al.*, 2008) publizierten genomischen Sequenz des *poA3*-Genlokus (Datenbanknummer: FJ042939). Mit Hilfe der innerhalb des Datenbankeintrages vermerkten Angaben wurde zuerst die Exon-Intron-Struktur der beiden genomischen Sequenzen miteinander verglichen (Abgleich nicht gezeigt). Abgesehen von kleineren Polymorphismen – vor allem in den Intronbereichen – waren beide Sequenzen identisch.

Ein Vergleich der cDNA-Sequenzen bezüglich der Exon-Intron-Komposition von A3Z2 (Larue *et al.*, 2008) und A3Z2 (Dörrschuck *et al.*, 2011) sowie A3Z3 (Larue *et al.*, 2008) und A3Z2-Z3 SVA (Dörrschuck *et al.*, 2011) ließ Unterschiede erkennen. Bei einer Gegenüberstellung der beiden A3Z2-Sequenzen konnte festgestellt werden, dass vor dem ersten Exon bei LaRue *et al.* (Larue *et al.*, 2008) eine 5'UTR von mindestens 224 bp liegt (Abb. 33). Die 3'-Enden wiederum waren vollkommen konträr zueinander. Während A3Z2 (Dörrschuck *et al.*, 2011) aus fünf Exons besteht, wobei Exon 5 eine Länge von 217 bp aufweist, setzt sich A3Z2 (Larue *et al.*, 2008) aus sechs Exons zusammen. Dabei beginnt Exon 5 von A3Z2 (Dörrschuck *et al.*, 2011) an der gleichen Position wie das entsprechende Exon von A3Z2 (Larue *et al.*, 2008). Letzteres ist jedoch deutlich kürzer (114 bp) und durch ein kurzes Intron (104 bp) von Exon 6 (359 bp) getrennt, wobei Exon 6 zum Großteil aus 3'UTR (301 bp) besteht. Verglich man die Exon/Intron-Übergänge miteinander, so konnte bei A3Z2 (LaRue *et al.*) zwischen Exon 5 und Intron 5 kein passender Übergang (Dinukleotid GT am 5'-Ende des Introns) (Wessagowit *et al.*, 2005) gefunden werden. Des Weiteren fehlte bei der cDNA von A3Z2 (LaRue *et al.*) das p(A)-Signal.

Vergleich man die cDNA-Sequenz von A3Z2 (Larue et al., 2008) mit der Sequenz von ORF poAPO3 (Kapitel 3.2.1), so ließ sich eine hundertprozentige Übereinstimmung finden. Allerdings konnte – wie in Kapitel 3.2.1 ausgeführt – dieses RNA-Transkript bereits bei früheren Experimenten nicht identifiziert werden.

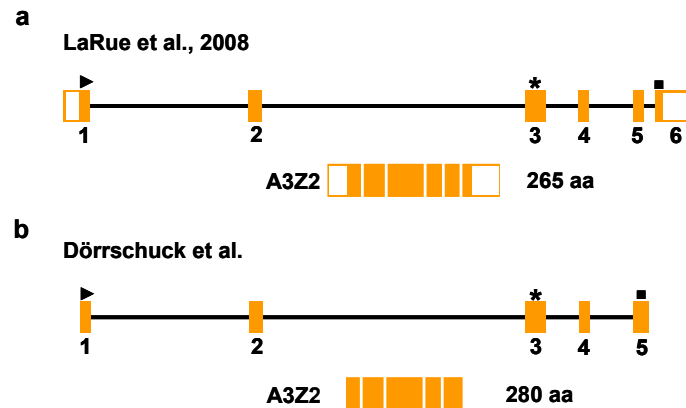


Abb. 33 Schematische Darstellung der Transkripte und der dazugehörigen Genbereiche von A3Z2 (Larue et al., 2008) und A3Z2 (Dörrschuck et al., 2011). (a) cDNA-Sequenz von A3Z2 (Larue et al., 2008) inklusive der UTRs und des entsprechenden Proteins (aus 265 aa bestehend). Die cDNA-Sequenz besitzt eine Länge von 1323 bp, wobei der kodierende Bereich 798 bp (inklusive Stopcodon) umfasst. (b) ORF des Transkriptes A3Z2 (Dörrschuck et al., 2011), welches eine kodierende Nukleotidlänge von 843 bp (inklusive Stopcodon) besitzt und für ein Protein kodiert, welches aus 280 aa besteht. Die UTRs wurden bis dato noch nicht untersucht (orangefarbenes Rechteck: Exon aus dem A3Z2-Genbereich, schwarze Linie: Intronbereiche, Dreieck: Startcodon, Stern: Lage der Nukleotidsequenz, welche für die Zink-koordinierende Domäne kodiert, Quadrat: Stopcodon).

Die größten Unterschiede zeigten sich jedoch bei einem Vergleich der cDNA von A3Z3 mit dem ORF von A3Z2-Z3 SVA. Diese beiden Konstrukte besaßen eine sehr unterschiedliche Exonzusammensetzung, weshalb es sich offensichtlich um zwei vollkommen verschiedene Transkripte handelt (Abb. 34).

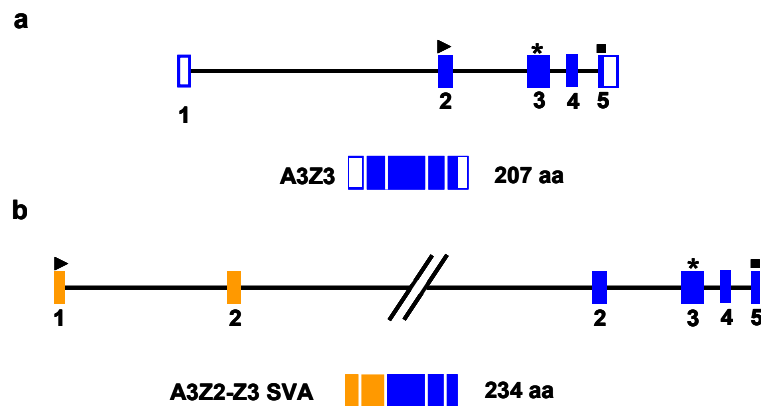


Abb. 34 Schematische Darstellung der Transkripte und der dazugehörigen Genbereiche von A3Z3 und A3Z2-Z3 SVA. (a) cDNA-Sequenz von A3Z3 (Larue et al., 2008) inklusive der UTRs und des entsprechenden Proteins (aus 207 aa bestehend). Die cDNA-Sequenz besitzt eine Länge von 1006 bp, wobei der kodierende Bereich 624 bp (inklusive Stopcodon) umfasst. (b) ORF des Transkriptes A3Z2-Z3 SVA (Dörrschuck et al., 2011), welches eine kodierende Nukleotidlänge von 705 bp (inklusive Stopcodon) besitzt und für ein Protein kodiert, welches aus 234 aa besteht. Die UTRs wurden bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht untersucht (orangefarbenes Rechteck: Exon aus dem A3Z2-Genbereich, blaues Rechteck: Exon aus dem A3Z3-Genbereich, schwarze Linie: Intronbereiche, Dreieck: Startcodon, Stern: Lage der Nukleotidsequenz, welche für die Zink-kordinierende Domäne kodiert, Quadrat: Stopcodon).

Das Ziel dieser Experimente bestand somit nicht nur darin, die cDNA von A3Z3 zu finden, sondern auch zu analysieren, worauf die einzelnen, oben aufgeführten Unterschiede basieren und die von LaRue und Mitarbeitern (Larue et al., 2008) angegebenen UTR-Bereiche zu bestätigen.

Zur Identifikation der 5'UTRs und der 3'UTRs wurde folgendes Vorgehen gewählt: Als Matrize diente mRNA von MAX-T, die mit Hilfe des *mRNA-ONLYTM Eukaryotic mRNA Isolation Kit* (Epicentre Biotechnologies) isoliert wurde. Die cDNA-Synthese und die erforderlichen PCR-Reaktionen zur Amplifikation der 5'UTRs und der 3'UTRs erfolgten unter Verwendung des *5'/3'RACE Kit, 2nd Generation* (Roche Applied Science) und des *Expand High Fidelity PCR System* (Roche Applied Science) in Kombination mit genspezifischen Primern.

Um die 5'- und 3'-Bereiche der einzelnen porzinen A3-mRNA-Transkripte mittels RACE zu untersuchen, wurden entsprechende Primer synthetisiert. Die Oligonukleotidsynthese erfolgte teilweise in Anlehnung an eine entsprechende Tabelle, welche als *additional material* der Veröffentlichung von LaRue et al. beigelegt war (Larue et al., 2008). Allerdings waren hier lediglich diejenigen Primer angegeben, welche bei der 3'RACE zum Einsatz kamen, während die Primer für die

5'RACE nicht beschrieben wurden. Die Primer wurden in angegebener Kombination (Tab. 5 und Tab. 6) für folgende RACE- und PCR-Reaktionen eingesetzt, um die 5'- und 3'-UTR-Bereiche der porzinen A3-Transkripte zu identifizieren:

Bei der 5'RACE wurde für die cDNA-Synthese ein genspezifischer *reverse*-Primer (GSP) verwendet (Tab. 5). Die cDNAs wurden gereinigt, mit einem poly(A)-Schwanz am 3'-Ende versehen und für eine PCR-Reaktion eingesetzt, wobei ein zweiter GSP (*reverse*) in Kombination mit dem im Kit enthaltenen Oligo-dT-Anchor-Primer verwendet wurde. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde eine zweite (*nested*) PCR-Reaktion angeschlossen, bei der ein dritter GSP (*reverse*) zusammen mit dem im Kit mitgelieferten PCR-Anchor-Primer eingesetzt wurde. Die beiden PCR-Reaktionen erfolgten nach Angaben des Herstellers unter Verwendung des *Expand High Fidelity PCR Systems* (Roche Applied Science). Es wurden pro Reaktion 35 Zyklen gewählt, wobei 10 Zyklen normal und die 25 folgenden Zyklen mit Inkrement der Elongationszeit erfolgten (PCR-Bedingungen: $T_a = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 sec; $t_e = 45\text{ sec}$ (A3Z2), 30 sec (A3Z3); Inkrement: 5 sec).

Tab. 5 5'RACE zur Identifikation der 5'UTR-Bereiche der porzinen A3-Transkripte. mRNA der porzinen Nierenzelllinie MAX-T diente als Matrice zur cDNA-Synthese.

5'RACE	
A3Z2	A3Z3
Erststrang-cDNA-Synthese	
1r_Ss3FII	r_Exon5_1
1. PCR-Reaktion	
(5') Oligo-dT-Anchor-Primer	(5') Oligo-dT-Anchor-Primer
(3') r_E1_UTR	(3') r_A3Z3_E2_b
2. PCR-Reaktion	
(5') PCR-Anchor-Primer	(5') PCR-Anchor-Primer
(3') rev_A3Z2-Z3LR	(3') r_5'UTR_A3Z3

Die Synthese der cDNA im Zuge der 3'RACE wurde mit dem im Kit vorhandenen Oligo-dT-Anchor-Primer durchgeführt (Tab. 6). Bei den anschließenden PCR-Reaktionen wurde der PCR-Anchor-Primer mit jeweils einem GSP (*forward*) kombiniert eingesetzt, die PCR-Bedingungen erfolgten wie oben beschrieben mit folgenden Modifikationen: $t_e = 40$ sec; Increment: 20 sec (A3Z3), 5 sec (A3Z2).

Tab. 6 3'RACE zur Identifikation der 3'UTR-Bereiche der porzinen A3-Transkripte. mRNA der porzinen Nierenzelllinie MAX-T diente zur cDNA-Synthese.

3'RACE	
A3Z2	A3Z3
Erststrang-cDNA-Synthese	
Oligo-dT-Anchor-Primer	
1. PCR-Reaktion	
f_EI_8	A3Z2-Z3 outer 3'RACE
PCR-Anchor-Primer	PCR-Anchor-Primer
2. PCR-Reaktion	
f_Exon4_3	A3Z2-Z3 poA3 inner 3'RACE
PCR-Anchor-Primer	PCR-Anchor-Primer

Die Lage der Oligonukleotide innerhalb der Gensequenz zeigt folgende schematische Abbildung (Abb. 35):

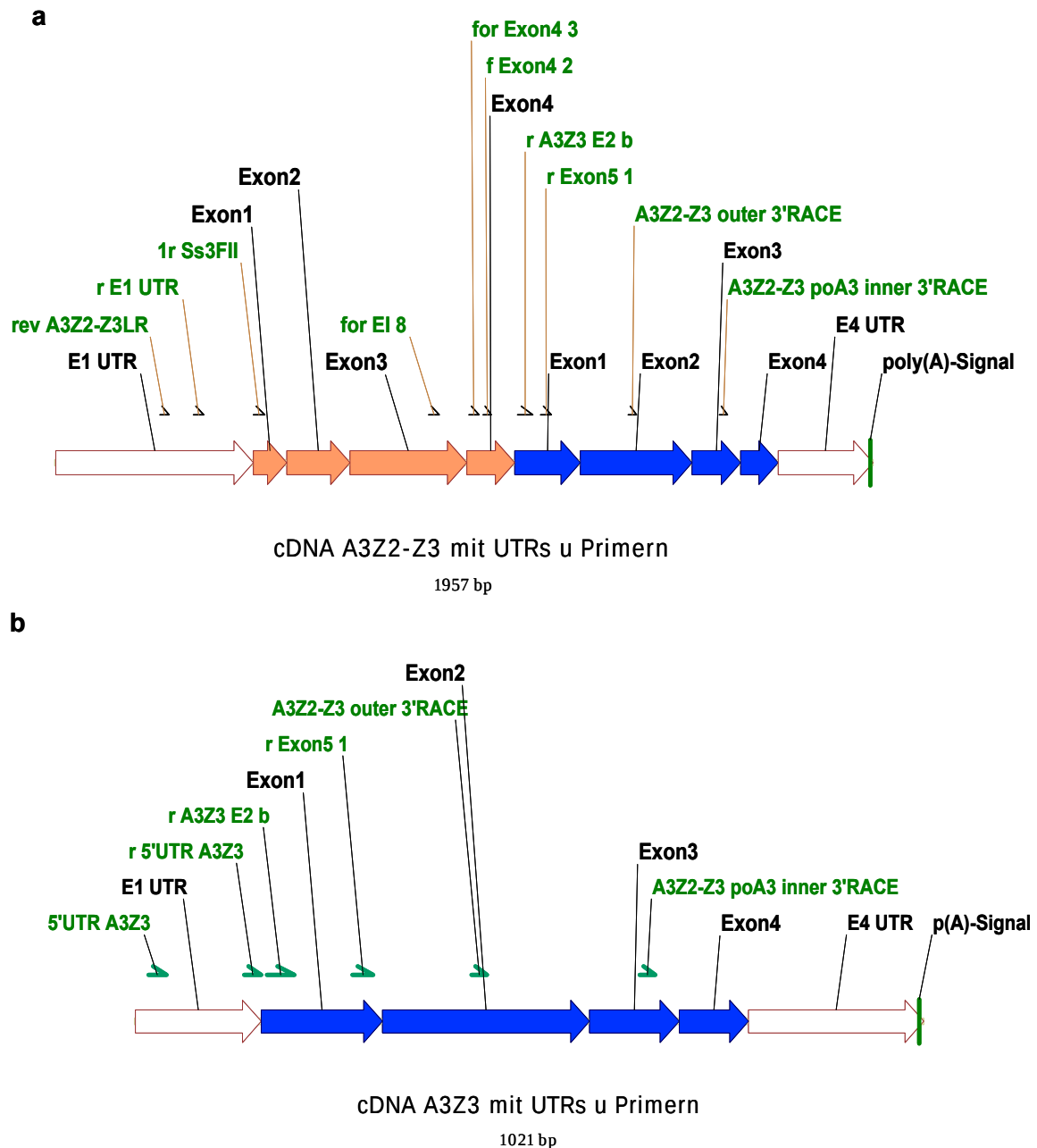


Abb. 35 Lage der Oligonukleotide innerhalb der cDNA-Sequenz von A3Z2-Z3 (a) und A3Z3 (b).

Die erhaltenen Daten zu den UTRs der porzinen A3-Transkripte widersprachen teilweise den publizierten Daten von LaRue *et al.* (Larue et al., 2008). Folgende Resultate wurden bei den durchgeführten Experimenten erhalten:

A) 5'UTR A3Z2 (sowie A3Z2-Z3 und A3Z2-Z3 SVA)

Die 5'UTR ist in Exon 1 lokalisiert und weist eine Länge von maximal 473 bp auf, wobei auch kürzere RACE-Produkte identifiziert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Auf diesen UTR-Bereich folgt das Startcodon (nt-Position 474-476) und der kodierende Bereich von insgesamt 80 nt, wodurch sich für Exon 1 somit eine maximale Gesamtlänge von 553 bp ergibt.

Verglichen mit dem von LaRue *et al.* (Larue et al., 2008) determinierten 5'-Ende konnten mehrere Transkripte detektiert werden, welche 149 bp bzw. 249 bp länger waren (Abb. 36).

Section 1									
	(1)	10	20	30	40	50	60	70	89
L-1_T7 rc	(1)	GAGAAAGCGAGGCGTCTGACCCCGGGGTCCACGCTTTCTCATCACCTCCATTTCATTCACAGGCAGGTACAGAGCAAGAATTGGGTG							
L-4_T7 rc	(1)	GAGAAAGCGAGGCGTCTGACCCCGGGGTCCACGCTTTCTCATCACCTCCATTTCATTCACAGGCAGGTACAGAGCAAGAATTGGGTG							
L-6_T7 rc	(1)	GAGAAAGCGAGGCGTCTGACCCCGGGGTCCACGCTTTCTCATCACCTCCATTTCATTCACAGGCAGGTACAGAGCAAGAATTGGGTG							
M-12_T7 rc	(1)	-----							
M-14_T7 rc	(1)	-----							
M-9_T7 rc	(1)	-----							
cDNA A3Z2-Z3_LaRue	(1)	-----							
Consensus	(1)	-----							
Section 2									
	(90)	100	110	120	130	140	150	160	178
L-1_T7 rc	(90)	CAGATTTGGGC	TTGGGCGCAGGAGGTGGGGGTGCTGAGAGGGCTCCAGCCTGCCCCACTGCCAGTGGGAGCCAGCCTCTGTCCCCCGCTC						
L-4_T7 rc	(90)	CAGATTTGGGC	TTGGGCGCAGGAGGTGGGGGTGCTGAGAGGGCTCCAGCCTGCCCCACTGCCAGTGGGAGCCAGCCTCTGTCCCCCGCTC						
L-6_T7 rc	(90)	CAGATTTGGGC	TTGGGCGCAGGAGGTGGGGGTGCTGAGAGGGCTCCAGCCTGCCCCACTGCCAGTGGGAGCCAGCCTCTGTCCCCCGCTC						
M-12_T7 rc	(1)	-----	TTGGGCGCAGGAGGTGGGGGTGCTGAGAGGGCTCCAGCCTGCCCCACTGCCAGTGGGAGCCAGCCTCTGTCCCCCGCTC						
M-14_T7 rc	(1)	-----	TTGGGCGCAGGAGGTGGGGGTGCTGAGAGGGCTCCAGCCTGCCCCACTGCCAGTGGGAGCCAGCCTCTGTCCCCCGCTC						
M-9_T7 rc	(1)	-----	TTGGGCGCAGGAGGTGGGGGTGCTGAGAGGGCTCCAGCCTGCCCCACTGCCAGTGGGAGCCAGCCTCTGTCCCCCGCTC						
cDNA A3Z2-Z3_LaRue	(1)	-----	TTGGGCGCAGGAGGTGGGGGTGCTGAGAGGGCTCCAGCCTGCCCCACTGCCAGTGGGAGCCAGCCTCTGTCCCCCGCTC						
Consensus	(90)		TTGGGCGCAGGAGGTGGGGGTGCTGAGAGGGCTCCAGCCTGCCCCACTGCCAGTGGGAGCCAGCCTCTGTCCCCCGCTC						
Section 3									
	(179)	179	190	200	210	220	230	240	250
L-1_T7 rc	(179)	TTTGCAGCCAGGGGCTGTCCATCCTCCCTCTTCCCTCTGGCATCTTTACTTTCTCTTCCCTTTGTGTAAC	ATTGGGTCCTGCTGCTCG						
L-4_T7 rc	(179)	TTTGCAGCCAGGGGCTGTCCATCCTCCCTCTTCCCTCTGGCATCTTTACTTTCTCTTCCCTTTGTGTAAC	ATTGGGTCCTGCTGCTCG						
L-6_T7 rc	(179)	TTTGCAGCCAGGGGCTGTCCATCCTCCCTCTTCCCTCTGGCATCTTTACTTTCTCTTCCCTTTGTGTAAC	ATTGGGTCCTGCTGCTCG						
M-12_T7 rc	(79)	TTTGCAGCCAGGGGCTGTCCATCCTCCCTCTTCCCTCTGGCATCTTTACTTTCTCTTCCCTTTGTGTAAC	ATTGGGTCCTGCTGCTCG						
M-14_T7 rc	(79)	TTTGCAGCCAGGGGCTGTCCATCCTCCCTCTTCCCTCTGGCATCTTTACTTTCTCTTCCCTTTGTGTAAC	ATTGGGTCCTGCTGCTCG						
M-9_T7 rc	(79)	TTTGCAGCCAGGGGCTGTCCATCCTCCCTCTTCCCTCTGGCATCTTTACTTTCTCTTCCCTTTGTGTAAC	ATTGGGTCCTGCTGCTCG						
cDNA A3Z2-Z3_LaRue	(1)	-----	ATTGGGTCCTGCTGCTCG						
Consensus	(179)	TTTGCAGCCAGGGGCTGTCCATCCTCCCTCTTCCCTCTGGCATCTTTACTTTCTCTTCCCTTTGTGTAAC	ATTGGGTCCTGCTGCTCG						

Abb. 36 Alignment der A3Z2-Z3 cDNA von LaRue *et al.* (Larue et al., 2008) mit den ermittelten Sequenzen, die bei der 5'RACE für A3Z2 erhalten wurden. Der Sequenzabgleich ergab, dass längere mRNA-Transkripte als von LaRue und Mitarbeitern (Larue et al., 2008) angegeben existieren (gelb unterlegt: Sequenzhomologie zum 5'-Ende der cDNA A3Z2-Z3 von LaRue *et al.* (Larue et al., 2008); blau unterlegt bzw. nicht unterlegt: neu identifizierte 5'UTR-Bereiche für A3Z2, A3Z2-Z3 und A3Z2-Z3 SVA).

Bei einem Abgleich der Nukleotidsequenz des längsten Transkriptes mit der Sequenz des porzinen BAC-Klons AC2 (Abb. 37) konnte an der Abbruchstelle eine Spleißakzeptorstelle – bestehend aus einem Exon/Intronübergang (Sequenz AG/G) sowie einem 5' gelegenen Polypyrimidintrakt – identifiziert werden (Strachan et al., 1999).

											Section 68
	(6232)	6232	6240	6250	6260	6270	6280	6290	6300	6310	6324
AC2_komplett	(6232)	GTAAGAGAACTTCTGGCAAGCACACCTCTCTGCCCCAGGAAGGCTGTGGGGACTCTTGCAGAGGACCAAGCGCAGAAGTAAGATGCAAA									
L-1_T7 rc	(1)	-----									
L-4_T7 rc	(1)	-----									
L-6_T7 rc	(1)	-----									
Consensus	(6232)	-----									
											Section 69
	(6325)	6325	6330	6340	6350	6360	6370	6380	6390	6400	6417
AC2_komplett	(6325)	GCACATCTGCCCTTACTTCCGGCTGTGCCAGGAGAGAAAGCGAGGCGTCTTGACCCCGGGGTCCACGCTTTCTCATCACCTCCATTTCATTCAA									
L-1_T7 rc	(1)	GAGAAAGCGAGGCGTCTTGACCCCGGGGTCCACGCTTTCTCATCACCTCCATTTCATTCAA									
L-4_T7 rc	(1)	GAGAAAGCGAGGCGTCTTGACCCCGGGGTCCACGCTTTCTCATCACCTCCATTTCATTCAA									
L-6_T7 rc	(1)	GAGAAAGCGAGGCGTCTTGACCCCGGGGTCCACGCTTTCTCATCACCTCCATTTCATTCAA									
Consensus	(6325)	GAGAAAGCGAGGCGTCTTGACCCCGGGGTCCACGCTTTCTCATCACCTCCATTTCATTCAA									
											Section 70
	(6418)	6418	6430	6440	6450	6460	6470	6480	6490	6500	6510
AC2_komplett	(6418)	CAGGCAGGTACAGAGCAAGAATTGGGTGCAGATTGGGCTGGGCGCAGGAGGTGGGGGTGCTGAGAGGGCTCCAGCCTGCCCACTGCCAGT									
L-1_T7 rc	(61)	CAGGCAGGTACAGAGCAAGAATTGGGTGCAGATTGGGCTGGGCGCAGGAGGTGGGGGTGCTGAGAGGGCTCCAGCCTGCCCACTGCCAGT									
L-4_T7 rc	(61)	CAGGCAGGTACAGAGCAAGAATTGGGTGCAGATTGGGCTGGGCGCAGGAGGTGGGGGTGCTGAGAGGGCTCCAGCCTGCCCACTGCCAGT									
L-6_T7 rc	(61)	CAGGCAGGTACAGAGCAAGAATTGGGTGCAGATTGGGCTGGGCGCAGGAGGTGGGGGTGCTGAGAGGGCTCCAGCCTGCCCACTGCCAGT									
Consensus	(6418)	CAGGCAGGTACAGAGCAAGAATTGGGTGCAGATTGGGCTGGGCGCAGGAGGTGGGGGTGCTGAGAGGGCTCCAGCCTGCCCACTGCCAGT									

Abb. 37 Alignment der längsten UTR-Sequenzen, die der 5'RACE-Analyse entstammen, mit dem BAC-Klon AC2 (gelb unterlegt: 5'-Ende der 5'UTR von A3Z2 und A3Z2-Z3; rot umrandet: Exon/Intron-Übergang AG/G).

B) 3'UTR von A3Z2

Die 3'UTR ist Bestandteil des Exons 5, welches eine Gesamtlänge von 583 bp (nt 1100-1682) besitzt. Das Stopcodon befindet sich bei nt 1314-1316, gefolgt von dem UTR-Bereich, welcher eine Länge von 366 nt besitzt. Abgesehen von der unterschiedlichen Exon/Intron-Komposition wiesen beide A3Z2-mRNAs ein identisches 3'-Ende auf, wobei die 3'UTR von A3Z2 (Dörrschuck et al., 2011) sechs Basenpaare länger war als das 3'-Ende von A3Z2 (Larue et al., 2008) und die Hexanukleotid-Sequenz ACTAAA enthielt (Abb. 38). Laut Beaudoin und Mitarbeitern (Beaudoin et al., 2000) handelt es sich hierbei um ein sehr seltenes Polyadenylierungssignal, welches bei 0.6 % aller untersuchten mRNAs zu finden ist. Somit untermauerten die erworbenen 3'RACE-Daten die im Zuge dieser Arbeit identifizierte Sequenz A3Z2 (Dörrschuck et al., 2011), während die A3Z2-mRNA von LaRue *et al.* (Larue et al., 2008) nicht bestätigt werden konnte (Abb. 33).

											Section 13
	(1093)	1093	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1183
cDNA LaRue A3Z2 (844)		TTCTCAGGGAGGAACCTGCAACCTATGGAAGTCCCCAGGCCAGGGAAAGGTTGCAATCGGATCTACAGCTGCTGGCCCTACGCCACAGCCA									
cDNA A3Z2_1 (1093)		TTCTCAGGGAGGAACCTGCAACCTATGGAAGTCCCCAGGCCAGGGAAAGGTTGCAATCGGATCTACAGCTGCTGGCCCTACGCCACAGCCA									
Consensus (1093)		TTCTCAGGGAGGAACCTGCAACCTATGGAAGTCCCCAGGCCAGGGAAAGGTTGCAATCGGATCTACAGCTGCTGGCCCTACGCCACAGCCA									
											Section 14
	(1184)	1184	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1274
cDNA LaRue A3Z2 (835)		CAGCCACACCAGATCCGAGGCTCATCTGAG									
cDNA A3Z2_1 (1184)		CAGCCACACCAGATCCGAGGCTCATCTGAG									
Consensus (1184)		CAGCCACACCAGATCCGAGGCTCATCTGAG									
											Section 15
	(1275)	1275	1280	1290	1300	1310	1320	1330	1340	1350	1365
cDNA LaRue A3Z2 (865)		CCGCAATGGGGAACCTCCCTAGACGCCCAAGATCTTTGGGGTGCTCACGC									
cDNA A3Z2_1 (1275)		ACCTGCGTCCCTCGTGGATGCTAGTTGGATTGTGTACCGCTGAG									
Consensus (1275)		CCGCAATGGGGAACCTCCCTAGACGCCCAAGATCTTTGGGGTGCTCACGC									
											Section 16
	(1366)	1366	1380	1390	1400	1410	1420	1430	1440	1456	
cDNA LaRue A3Z2 (1013)		CAGGTGGTGAGCTCAGGTCTTCCCATCTGTCTCTTGGCGCTCTCCCTAGAACGCCAAGATCAAGGCGTTGGCCGGTTGGGCTTCTCCTG									
cDNA A3Z2_1 (1366)		CAGGTGGTGAGCTCAGGTCTTCCCATCTGTCTCTTGGCGCTCTCCCTAGAACGCCAAGATCAAGGCGTTGGCCGGTTGGGCTTCTCCTG									
Consensus (1366)		CAGGTGGTGAGCTCAGGTCTTCCCATCTGTCTCTTGGCGCTCTCCCTAGAACGCCAAGATCAAGGCGTTGGCCGGTTGGGCTTCTCCTG									
											Section 17
	(1457)	1457	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1547	
cDNA LaRue A3Z2 (1104)		CCATCTCCCTCCTTGGCTCATATACTGCTGCCTTCTCCCTCTGTCTCTCAGGAGGCTTTCTTGGTGCAAGATCCCGGGGAACCCCTGGCG									
cDNA A3Z2_1 (1457)		CCATCTCCCTCCTTGGCTCATATACTGCTGCCTTCTCCCTCTGTCTCTCAGGAGGCTTTCTTGGTGCAAGATCCCGGGGAACCCCTGGCG									
Consensus (1457)		CCATCTCCCTCCTTGGCTCATATACTGCTGCCTTCTCCCTCTGTCTCTCAGGAGGCTTTCTTGGTGCAAGATCCCGGGGAACCCCTGGCG									
											Section 18
	(1548)	1548	1580	1570	1580	1590	1600	1610	1620	1638	
cDNA LaRue A3Z2 (1195)		TCCTCTGTGGGTCCAGTTTGTCTTCTCACAAGGACATCAGTCCGATTGGATTAAAGACTCATTCTAAGAGCCTCCTCTTACTGCAGTGA									
cDNA A3Z2_1 (1548)		TCCTCTGTGGGTCCAGTTTGTCTTCTCACAAGGACATCAGTCCGATTGGATTAAAGACTCATTCTAAGAGCCTCCTCTTACTGCAGTGA									
Consensus (1548)		TCCTCTGTGGGTCCAGTTTGTCTTCTCACAAGGACATCAGTCCGATTGGATTAAAGACTCATTCTAAGAGCCTCCTCTTACTGCAGTGA									
											Section 19
	(1639)	1639	1650	1660	1670	1682					
cDNA LaRue A3Z2 (1286)		CCTCTTTAAAGGCACTACCTCAAATACAGTCCTGAGGA									
cDNA A3Z2_1 (1639)		CCTCTTTAAAGGCACTACCTCAAATACAGTCCTGAGGA									
Consensus (1639)		CCTCTTTAAAGGCACTACCTCAAATACAGTCCTGAGGA									

Abb. 38 Alignment der 3'-Bereiche der cDNA-Sequenzen A3Z2 (Dörrschuck et al., 2011) und A3Z2 (LaRue et al, 2008) (rot unterstrichen: poly(A)-Signal).

C) 5'UTR von A3Z3

Die 5'UTR von A3Z3 umfasst eine maximale Länge von 170 bp, wobei wie bei der 5'RACE von A3Z2 ebenso kürzere Produkte identifiziert werden konnten. Das Startcodon der A3Z3-mRNA befindet sich an der nt-Position 171-173 in Exon 2. Somit besteht Exon 1 der A3Z3-mRNA komplett aus UTR-Region (Abb. 39).

		(1) 1	10	20	30	40	50	60	70	83	Section 1
A3Z3-S-18_T7	(1)	-----	AGACGGCCTGGGAGGTTGCTCACAGATAACGGGCTGTCC	TAAAGCAGGGC	CTCTGGGAGGGGAAAAGAA						
A3Z3-S-24_T7	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	CTCTGGGAGGGGAAAAGAA		
UTR-A3Z3-12_T7	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	CTCTGGGAGGGGAAAAGAA		
UTR-A3Z3-2_T7	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	CTCTGGGAGGGGAAAAGAA		
UTR-A3Z3-10_T7	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	CTCTGGGAGGGGAAAAGAA		
cDNA_A3Z3 mit UTRs u Primern	(1)	GTGGGGCCTCCGCTG	AGACGGCCTGGGAGGTTGCTCACAGATAACGGGCTGTCC	TAAAGCAGGGC	CTCTGGGAGGGGAAAAGAA						
UTR-A3Z3-8_T7	(1)	GTGGGGCCTCCGCTG	AGACGGCCTGGGAGGTTGCTCACAGATAACGGGCTGTCC	TAAAGCAGGGC	CTCTGGGAGGGGAAAAGAA						
cDNA LaRue A3Z3 (SV-C)	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	CTCTGGGAGGGGAAAAGAA		
Consensus	(1)	-----	AGACGGCCTGGGAGGTTGCTCACAGATAACGGGCTGTCC	TAAAGCAGGGC	CTCTGGGAGGGGAAAAGAA						
		(84) 84	90	100	110	120	130	140	150	166	Section 2
A3Z3-S-18_T7	(89)	GGCAGGGCACCCATGACCAAAGGCTGGGCTGGGACAAGCCTTGGGGGACAAGGAGTCTGCCTCAGGACTCCCGGAATCTG	AAA								
A3Z3-S-24_T7	(19)	GGCAGGGCACCCATGACCAAAGGCTGGGCTGGGACAAGCCTTGGGGGACAAGGAGTCTGCCTCAGGACTCCCGGAATCTG	AAA								
UTR-A3Z3-12_T7	(63)	GGCAGGGCACCCATGACCAAAGGCTGGGCTGGGACAAGCCTTGGGGGACAAGGAGTCTGCCTCAGGACTCCCGGAATCTG	---								
UTR-A3Z3-2_T7	(63)	GGCAGGGCACCCATGACCAAAGGCTGGGCTGGGACAAGCCTTGGGGGACAAGGAGTCTGCCTCAGGACTCCCGGAATCTG	---								
UTR-A3Z3-10_T7	(61)	GGCAGGGCACCCATGACCAAAGGCTGGGCTGGGACAAGCCTTGGGGGACAAGGAGTCTGCCTCAGGACTCCCGGAATCTG	---								
cDNA_A3Z3 mit UTRs u Primern	(84)	GGCAGGGCACCCATGACCAAAGGCTGGGCTGGGACAAGCCTTGGGGGACAAGGAGTCTGCCTCAGGACTCCCGGAATCTG	AAA								
UTR-A3Z3-8_T7	(84)	GGCAGGGCACCCATGACCAAAGGCTGGGCTGGGACAAGCCTTGGGGGACAAGGAGTCTGCCTCAGGACTCCCGGAATCTG	---								
UTR-A3Z3-2_T7	(70)	GGCAGGGCACCCATGACCAAAGGCTGGGCTGGGACAAGCCTTGGGGGACAAGGAGTCTGCCTCAGGACTCCCGGAATCTG	---								
cDNA LaRue A3Z3 (SV-C)	(89)	GGCAGGGCACCCATGACCAAAGGCTGGGCTGGGACAAGCCTTGGGGGACAAGGAGTCTGCCTCAGGACTCCCGGAATCTG	AAA								
Consensus	(84)	GGCAGGGCACCCATGACCAAAGGCTGGGCTGGGACAAGCCTTGGGGGACAAGGAGTCTGCCTCAGGACTCCCGGAATCTG									
		(167) 167	180	190	200	210	220	230	249		Section 3
A3Z3-S-18_T7	(152)	CACAAATGAATCTACTAAAAAGAAAAATATTCATACACAG	-----								
A3Z3-S-24_T7	(102)	CACAAATGAATCTACTAAAAAGAAAAATATTCATACACAG	-----								
UTR-A3Z3-12_T7	(143)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
UTR-A3Z3-2_T7	(143)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
UTR-A3Z3-10_T7	(141)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
cDNA_A3Z3 mit UTRs u Primern	(167)	CACAAATGAATCTACTAAAAAGAAAAATATTCATACACAGTTTGGCAACAGCCCCGGGCTTGGCGCCCTACTATCTGAGGA									
UTR-A3Z3-8_T7	(164)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
UTR-A3Z3-2_T7	(150)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
cDNA LaRue A3Z3 (SV-C)	(152)	CACAAATGAATCTACTAAAAAGAAAAATATTCATACACAGTTTGGCAACAGCCCCGGGCTTGGCGCCCTACTATCTGAGGA									
Consensus	(167)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		

Abb. 39 Alignment der A3Z3 cDNA von LaRue *et al.* (Larue *et al.*, 2008) mit den ermittelten Sequenzen, die bei der 5'RACE für A3Z3 (Dörrschuck *et al.*, 2011) erhalten wurden. Der Sequenzabgleich ergab, dass längere mRNA-Transkripte als von LaRue und Mitarbeitern (Larue *et al.*, 2008) angegeben existieren (gelb unterlegt: Sequenzhomologie zum 5'-Ende der cDNA A3Z2-Z3 von LaRue *et al.* (Larue *et al.*, 2008); blau unterlegt bzw. nicht unterlegt im 5'-Bereich: neu identifizierte 5'UTR-Bereiche für A3Z3-cDNA; rot unterstrichen: Startcodon von A3Z3-cDNA).

D) 3'UTR von A3Z3 (sowie A3Z2-Z3 und A3Z2-Z3 SVA)

Das Exon 5 von A3Z3 besitzt eine Länge von 317 nt, wobei dieses innerhalb der mRNA von nt-Position 705-1021 reicht. Das Stopcodon befindet sich an Position 792-794, gefolgt von dem 3'UTR-Bereich mit einer Länge von 227 bp. Als Polyadenylierungssignal wurde am 3'Ende der 3'UTR das Hexanukleotid ATTAAA identifiziert. Dabei handelt es sich nach Lehrbuch- und Fachliteraturangaben im Vergleich zum üblicherweise vorkommenden poly(A)-Signal AATAAA um ein alternatives Polyadenylierungssignal (Knippers, 1995), welches laut Beaudoin *et al.* (Beaudoin *et al.*, 2000) bei etwa 15 % aller mRNAs zu finden ist.

Aufgrund der 3'RACE-Resultate konnte gefolgert werden, dass die 3'UTR von A3Z3 um 100 bp länger war als die publizierten Daten (Larue *et al.*, 2008) (Abb. 40).

										Section 21
	(1621)	1621	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690	1701
cDNA A3Z2-Z3_LaRue (1372)		GGCTCTCAAGGATCCTGCGTTTCGCGAATCAGAATAATTTAGAGGATTCCTTCAGAGATTTCGCACTCGGTTCCCATCAC								
n3R-11_T7 (32)		GGCTCTCAAGGATCCTGCGTTTCGCGAATCAGAATAATTTAGAGGATTCCTTCAGAGATTTCGCACTCGGTTCCCATCAC								
cDNA_A3Z2-Z3 mit UTRs u Primern (1621)		GGCTCTCAAGGATCCTGCGTTTCGCGAATCAGAATAATTTAGAGGATTCCTTCAGAGATTTCGCACTCGGTTCCCATCAC								
n3R-14_T7 (32)		GGCTCTCAAGGATCCTGCGTTTCGCGAATCAGAATAATTTAGAGGATTCCTTCAGAGATTTCGCACTCGGTTCCCATCAC								
Consensus (1621)		GGCTCTCAAGGATCCTGCGTTTCGCGAATCAGAATAATTTAGAGGATTCCTTCAGAGATTTCGCACTCGGTTCCCATCAC								
										Section 22
	(1702)	1702	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1782
cDNA A3Z2-Z3_LaRue (1453)		CTTCATCATCAAGAAGTGACTCGAGATGACAGACAGTTTCCTGGGGTATCTCAGCGCTGACTCGTAGGAAC CAGGAACAAGC								
n3R-11_T7 (113)		CTTCATCATCAAGAAGTGACTCGAGATGACAGACAGTTTCCTGGGGTATCTCAGCGCTGACTCGTAGGAAC CAGGAACAAGC								
cDNA_A3Z2-Z3 mit UTRs u Primern (1702)		CTTCATCATCAAGAAGTGACTCGAGATGACAGACAGTTTCCTGGGGTATCTCAGCGCTGACTCGTAGGAAC CAGGAACAAGC								
n3R-14_T7 (113)		CTTCATCATCAAGAAGTGACTCGAGATGACAGACAGTTTCCTGGGGTATCTCAGCGCTGACTCGTAGGAAC CAGGAACAAGC								
Consensus (1702)		CTTCATCATCAAGAAGTGACTCGAGATGACAGACAGTTTCCTGGGGTATCTCAGCGCTGACTCGTAGGAAC CAGGAACAAGC								
										Section 23
	(1783)	1783	1790	1800	1810	1820	1830	1840	1850	1863
cDNA A3Z2-Z3_LaRue (1534)		TCCACGGGCGAGCCTTGACCCCTTGCCCAAGTCAAGGGACCTTTCTTCCCTCTTTCATTTTGCTCTTTTCTAAGTGG								
n3R-11_T7 (194)		TCCACGGGCGAGCCTTGACCCCTTGCCCAAGTCAAGGGACCTTTCTTCCCTCTTTCATTTTGCTCTTTTCTAAGTGG								
cDNA_A3Z2-Z3 mit UTRs u Primern (1783)		TCCACGGGCGAGCCTTGACCCCTTGCCCAAGTCAAGGGACCTTTCTTCCCTCTTTCATTTTGCTCTTTTCTAAGTGG								
n3R-14_T7 (194)		TCCACGGGCGAGCCTTGACCCCTTGCCCAAGTCAAGGGACCTTTCTTCCCTCTTTCATTTTGCTCTTTTCTAAGTGG								
Consensus (1783)		TCCACGGGCGAGCCTTGACCCCTTGCCCAAGTCAAGGGACCTTTCTTCCCTCTTTCATTTTGCTCTTTTCTAAGTGG								
										Section 24
	(1864)	1864	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1944
cDNA A3Z2-Z3_LaRue (1809)		ATTTTATAATTGAAAAAATAACTTGAACGCGCTGTAAACTTCCATTCTTGCAATTGCTTTCTGAAAGGGGAATCAGGTCT								
n3R-11_T7 (275)		ATTTTATAATTGAAAAAATAACTTGAACGCGCTGTAAACTTCCATTCTTGCAATTGCTTTCTGAAAGGGGAATCAGGTCT								
cDNA_A3Z2-Z3 mit UTRs u Primern (1864)		ATTTTATAATTGAAAAAATAACTTGAACGCGCTGTAAACTTCCATTCTTGCAATTGCTTTCTGAAAGGGGAATCAGGTCT								
n3R-14_T7 (275)		ATTTTATAATTGAAAAAATAACTTGAACGCGCTGTAAACTTCCATTCTTGCAATTGCTTTCTGAAAGGGGAATCAGGTCT								
Consensus (1864)		ATTTTATAATTGAAAAAATAACTTGAACGCGCTGTAAACTTCCATTCTTGCAATTGCTTTCTGAAAGGGGAATCAGGTCT								
										Section 25
	(1945)	1945	1957							
cDNA A3Z2-Z3_LaRue (1809)		TTCCAACATTAAA								
n3R-11_T7 (356)		TTCCAACATTAAA								
cDNA_A3Z2-Z3 mit UTRs u Primern (1945)		TTCCAACATTAAA								
n3R-14_T7 (356)		TTCCAACATTAAA								
Consensus (1945)		TTCCAACATTAAA								

Abb. 40 Alignment der A3Z2-Z3-cDNA von LaRue *et al.* (Larue *et al.*, 2008) mit den ermittelten Sequenzen, die bei der 3'RACE für A3Z3 erhalten wurden. Der Sequenzabgleich ergab, dass die 3'UTR der beiden porzinen Transkripte länger ist als von LaRue und Mitarbeitern (Larue *et al.*, 2008) angegeben (gelb unterlegt: Sequenzhomologie zum 5'-Ende der cDNA A3Z2-Z3 von LaRue *et al.* (Larue *et al.*, 2008); blau unterlegt: neu identifizierter 3'UTR-Bereich für die cDNA von A3Z2-Z3; rot unterstrichen: poly(A)-Signal).

Die Verifizierung der Resultate der 5'- und 3'-RACE-Experimente wurde auf cDNA-Ebene mittels PCR nochmals bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die von publizierten cDNA-Sequenzen (Larue et al., 2008) sowie die durch diese Experimente erhaltenen Sequenzen werden in nachfolgender Tabelle zusammengefasst (Tab. 7):

Tab. 7 Auflistung der von LaRue *et al.* (Larue et al., 2008) und im Zuge dieser Experimente identifizierten A3-Transkripte. Neben den Datenbanknummern sind die Nukleotidlänge (bp) der cDNAs und ORFs sowie die Proteinlänge (aa) angegeben.

Name mRNA	Datenbank-nummer	Länge cDNA (bp)	Länge ORF (bp)	Länge Protein (aa)
A3Z2-Z3 (Larue et al., 2008)	FJ042939	1608	1257	418
A3Z2-Z3	EU871586	1957	1257	418
A3Z3 (Larue et al., 2008)	FJ042939	906	624	207
A3Z3	HM347451	1021	624	207
A3Z2 (Larue et al., 2008)	FJ042939	1323	798	265
A3Z2	FJ716802	1682	843	280
A3Z2-Z3 SVA	FJ716801	1405	705	234

Das nachfolgende Schaubild soll nochmals zur Übersicht der Genstruktur und der cDNA-Transkripte von LaRue *et al.* und im Zuge dieser Experimente erhaltenen Resultate dienen (Abb. 41):

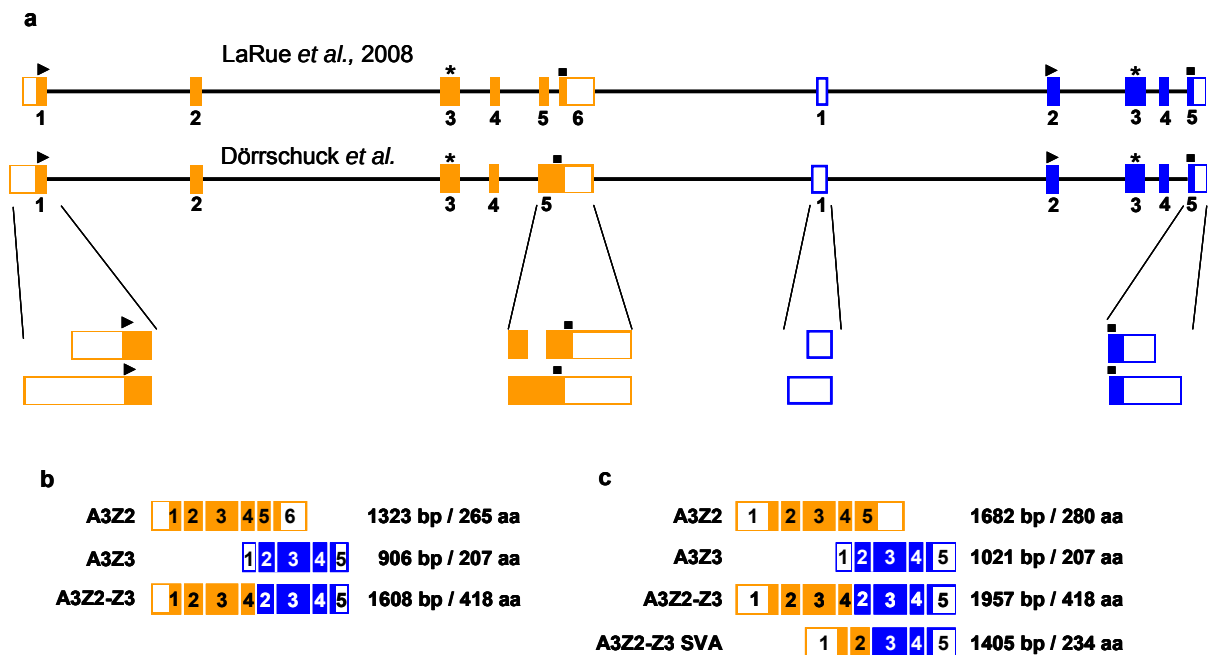


Abb. 41 Exon-Intron-Komposition des porzinen A3-Genlokus. (a) Genstruktur basierend auf den Daten von LaRue *et al.* (Larue *et al.*, 2008) (oben) und im Zuge dieses Projekts erhaltenen Resultaten (unten) (Dörrschuck *et al.*, 2011), wobei die abweichenden Bereiche vergrößert dargestellt sind. Identifizierte cDNA-Transkripte von LaRue *et al.* (Larue *et al.*, 2008) (b) sowie anhand der experimentell erhaltenen Daten (c) inklusive Angabe der Nukleotidsequenz und der AS-Länge des jeweils translatierten Proteins (orangefarbenes Rechteck: Exon aus dem A3Z2-Genbereich, blaues Rechteck: Exon aus dem A3Z3-Genbereich, offene Box: UTR-Bereich des Exons, schwarze Linie: Intronbereiche, Dreieck: Startcodon, Stern: Lage der Nukleotidsequenz, welche für die Zinkkoordinierende Domäne kodiert, Quadrat: Stopcodon).

Aufgrund der experimentell erhaltenen RACE-Daten wurde die Sequenz des porzinen A3-Genbereiches entsprechend um die UTR-Sequenzen erweitert (Abb. 42):

[illegible]

[illegible]

112

[illegible]

Abb. 42 Sequenz des porzinen A3-Genlokus (Datenbanknummer: EU871587), der für zwei A3-Gene (A3Z2 und A3Z3) kodiert und aus insgesamt 10 Exons (blau) und acht Introns (schwarz) zusammengesetzt ist (blaue Großbuchstaben: kodierende Exonbereiche, blaue Kleinbuchstaben: nicht kodierende Exonbereiche (UTR), hellblau: Exon-Übergang, orange: Spleißdonor- bzw. Spleißakzeptorstelle, pink: Polyadenylierungssignal).

3.3.3 Bestimmung der Anzahl der A3-Genkopien im Schweinegenom

Innerhalb der Placentalia gibt es relativ große Unterschiede bezüglich der Anzahl der A3-Gene im jeweiligen Genom. Während Primaten für sieben Gene (A3A-A3H) kodieren (Harris and Liddament, 2004; Holmes et al., 2007; Jarmuz et al., 2002), besitzen Katzen vier Gene (Münk et al., 2008), Hunde zwei (Münk et al., 2008) und Mäuse lediglich ein A3-Gen (Mariani et al., 2003) (Abb. 43). Daher sollte im Zuge der Charakterisierung der porcinen A3-Gene geklärt werden, ob im Schweinegenom ein oder mehrere A3-Genloci existieren.

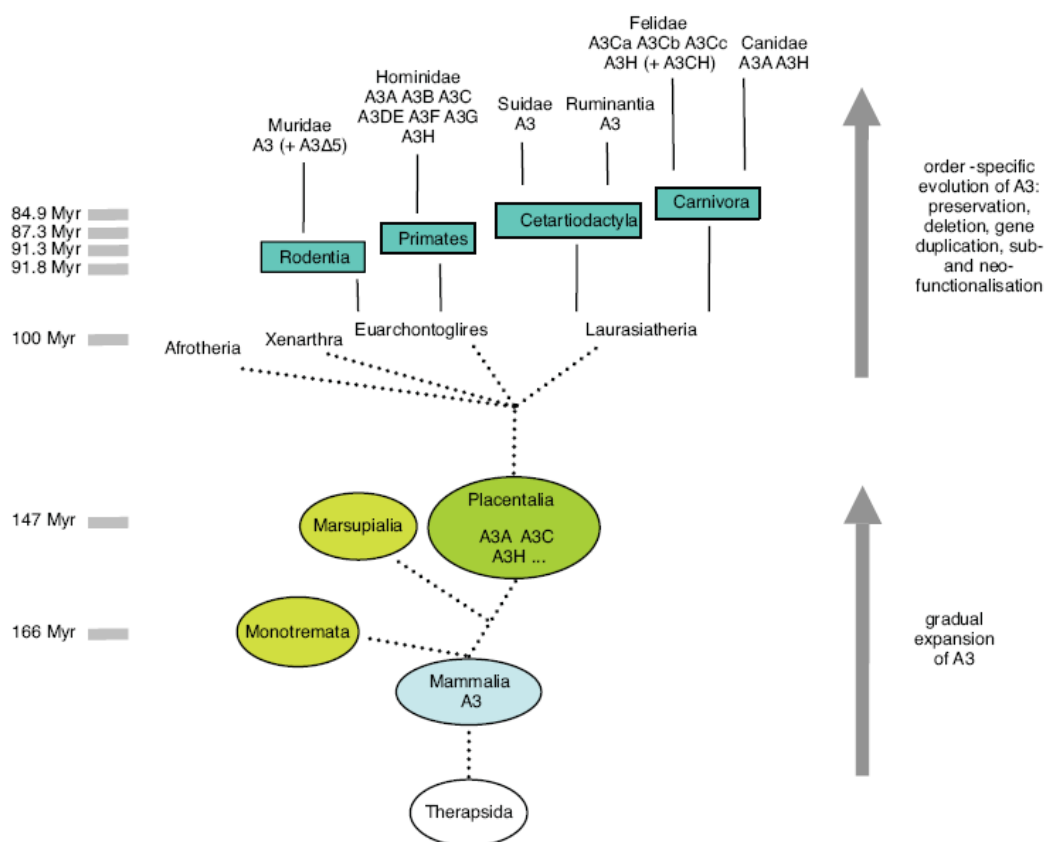


Abb. 43 Modell zur A3-Genevolution in Säugetieren (Mammalia). Das Modell schlägt vor, dass in der Ordnung der Placentalia ursprünglich mehrere A3-Gene existierten, die durch aufeinander folgende Duplikation eines ursprünglichen A3-Gens in Mammalia entstanden sind, bevor sich die Ordnung der Placentalia in die Überordnungen Afrotheria, Xenarthra, Euarchontoglires und Laurasiatheria aufspaltete. Während beispielsweise die Taxa Rodentia und Primates zu den Euarchontoglires gehören, zählen die Taxa Cetartiodactyla und Carnivora zu den Laurasiatheria, wobei diese beiden Überordnungen vor etwa 85-95 Millionen Jahren (Myr = million years ago) den letzten, gemeinsamen Vorfahren hatten. Nach phylogenetischen Untersuchungen der heute noch vorhandenen A3-Gene kam es im Zuge der frühen Evolution der A3-Gene (unter anderem bedingt durch Gendeletion oder -duplikation) zu einer Expansion der A3-Gene oder zu einer Reduktion der ursprünglich vorhandenen A3-Genkopien auf ein bis zwei Gene je nach Familie (Münk et al., 2008).

Um diese Frage zu klären, wurde eine Southern Blot-Analyse durchgeführt. Dafür wurde genomische DNA von Schwein, Kamel, Mensch, Schaf und Kuh eingesetzt und zwei verschiedene Sonden ausgetestet.

Die erste Sonde (773 bp), die als Sonde N bezeichnet wurde, reichte vom 5'-Bereich des Exons 3 bis zum 3'-Ende des Exons 4 des Gens A3Z2. Die zweite Sonde (Sonde C), welche von Exon 3 bis zum Stopcodon in Exon 5 des Gens A3Z3 ging, besitzt eine Länge von 1038 bp. Zur Restriktion der genomischen DNA wurde auf die Enzyme *EcoRI* und *BglII* zurückgegriffen: *EcoRI* schneidet zweimal im porzinen A3Z2-Gen (Abb. 44a) (Erkennungssequenzen bei nt 2.579 und 5.540) und restringiert in beiden Fällen 5' vor der Sonde N. Somit sollten sowohl bei Einsatz von Sonde N als auch von Sonde C ein oder mehrere Signale detektierbar sein, die – unabhängig davon, welche Sonde verwendet wurde – das gleiche Bandenmuster auf dem entwickelten Film hervorrufen sollten. *BglII* wiederum schneidet dreimal innerhalb des porzinen A3-Genlokus (Abb. 44b) (Erkennungsstellen bei nt 3.034, 7.858 und 15.763). Zwei Schnittstellen umrahmen die Hybridisierungsstelle von Sonde N, so dass eine distinkte Bande bei 3 kb auf dem durchgeführten Southern Blot erscheinen sollte. Eine weitere Schnittstelle liegt direkt 5' vor der Hybridisierungsstelle von Sonde C, so dass auch in diesem Fall eine Bande detektierbar sein sollte, deren Größe sich jedoch nicht vorhersagen ließ, da der chromosomale 3'-Bereich jenseits des A3-Genlokus unbekannt war.

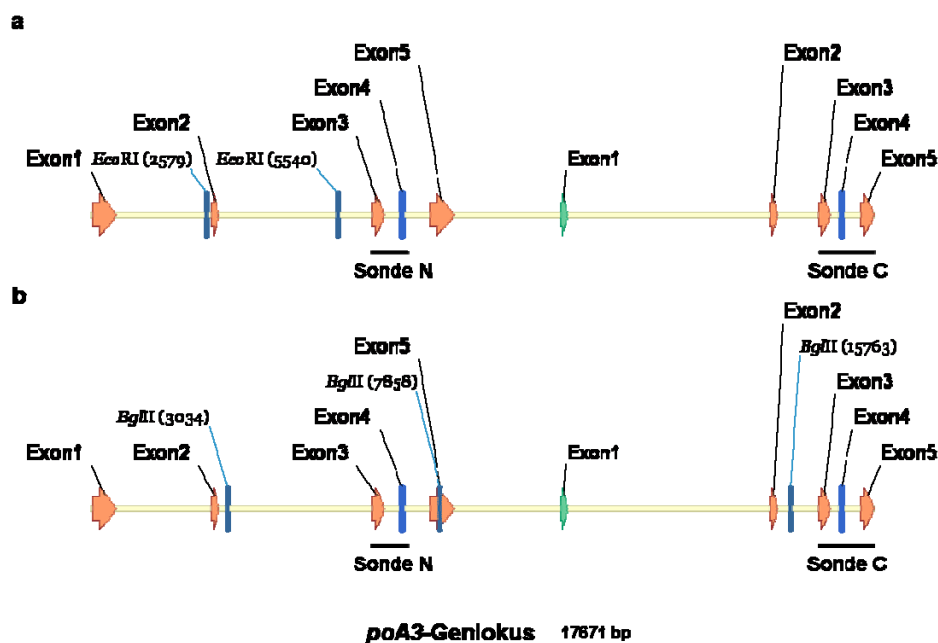


Abb. 44 Schematische Darstellung des porzinen A3-Genlokus. (a) Restriktionsschnittstellen für *EcoRI*. (b) Restriktionsschnittstellen für *BglII*. Weiterhin ist vermerkt, an welche komplementäre Genbereiche Sonde N bzw. Sonde C hybridisieren.

Bei Anwendung der Sonde N konnte kein spezifisches Signal detektiert werden, vielmehr wurde in diesem Falle die Spur mit der restringierten MAX-T-DNA komplett markiert, weil die Sonde unspezifisch an die porcine DNA hybridisierte (Daten nicht gezeigt). Da die Verwendung der Sonde N kein eindeutiges Resultat erbrachte, wurde der Versuch mit Sonde C wiederholt, da diese Sonde aufgrund ihres größeren Exonanteils spezifischer binden sollte. In diesem Fall konnten allerdings die erwarteten Bandengrößen nicht vorhergesagt werden, da nicht bekannt war, wo die nächste Schnittstelle für *EcoRI* und *BglII* im chromosomalen 3'-Bereich jenseits des porcinen A3-Genlokus liegt. Da jedoch innerhalb der Gensequenz die *EcoRI*-Schnittstelle an nt-Position 5.540 etwa 10 kb weiter entfernt von der Bindestelle der Sonde C liegt als diejenige von *BglII* (nt-Pos. 15.763) und dieses Enzym wiederum offenbar etwas häufiger im Schweinegenom schneidet als *EcoRI*, sollte ein Signal im Falle der *EcoRI*-Restriktion größer sein als dasjenige bei der *BglII*-Restriktion.

Diese Hypothese konnte durch den Southern Blot bestätigt werden, da mit Einsatz der Sonde C in beiden Spuren mit genomischer DNA des Schweins je ein Signal detektiert werden konnte. Bei der *EcoRI*-Restriktion war ein Signal bei 15 kb zu erkennen, bei Einsatz von *BglII* konnte eine Bande bei 5 kb detektiert werden (Abb. 45, Spur 3). Anhand dieser Resultate lässt sich sagen, dass zumindest das porcine A3Z3-Gen nur einmal im Schweinegenom vorkommt. Aufgrund der Daten lässt sich allerdings nicht ausschließen, dass das Gen A3Z2 in mehrfacher Kopie im Schweinegenom vorliegt.

Zusätzlich konnte im Falle der *EcoRI*-Restriktion der Kamel-DNA im Southern Blot ebenfalls ein spezifisches Signal bei einer Größe von etwa 8 kb detektiert werden (Abb. 45, Spur 2, linke Blot-Seite). Somit war Sonde C in der Lage, an homologe Genbereiche innerhalb dieser Spezies zu binden. Dies ist nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, dass nach evolutionsbiologischen Aspekten das Kamel ein naher Verwandter des Schweins ist (Bininda-Emonds et al., 2007). Somit besitzt das Kamel aller Voraussicht nach ebenfalls ein A3Z3-Gen. Allerdings konnte kein Signal bei der Kamel-Probe nach *BglII*-Restriktion gefunden werden. Eine spätere Analyse der A3Z3-Sequenz des Kamels (FJ716808) innerhalb dieses Genbereiches ergab, dass *BglII* beim Kamel innerhalb der Hybridisierungssequenz der Sonde C schneidet (Daten nicht gezeigt).

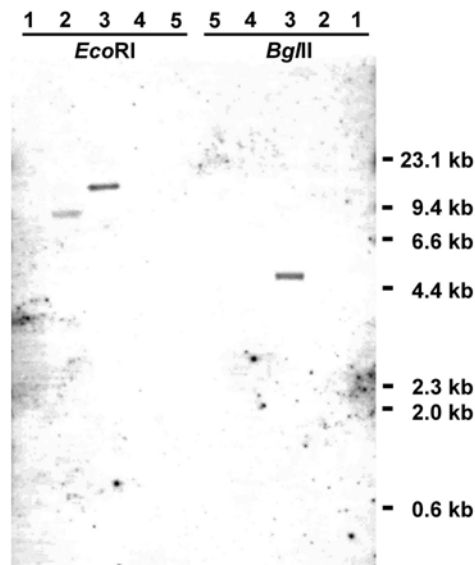


Abb. 45 Southern Blot zur Bestimmung der Anzahl der A3-Genkopien im Schweinegenom. Genomische DNA verschiedener Spezies wurden 3 h lang mit *EcoRI* und *BglII* restringiert und die Fragmente in einem 0.8%-igen Agarosegel voneinander getrennt. Nach dem Blotten wurde die Membran ÜN mit der [α -P32]dCTP-markierten Sonde C hybridisiert. Der Film wurde vier Tage lang bei -80 °C exponiert. Als Größenstandard diente λ -HindIII-Marker (1: Mensch, 2: Kamel, 3: Schwein, 4: Schaf, 5: Kuh).

3.3.4 Bestimmung der chromosomalen Lokalisation des porzinen A3-Genlokus

Um die chromosomale Lokalisation eines Gens zu bestimmen, wird häufig das *radiation hybrid (RH)-mapping* verwendet. Dabei handelt es sich um eine Methode, die auf dem Prinzip der Kopplungsanalyse basiert, um biologische Genkarten anzufertigen oder – wie in diesem Fall – anhand einer statistischen Auswertung von PCR-Ergebnissen und bereits existierender Kartierungen ein bestimmtes Gen chromosomal zu lokalisieren. Um die Wahrscheinlichkeit der Kopplung zweier Loci (Gene, Allele, Marker) abschätzen zu können, bedient man sich eines statistischen Verfahrens. Mit dessen Hilfe wird der Quotient der Wahrscheinlichkeit (*odds ratio*) bestimmt, ob zwei Loci im Zuge einer Rekombination gemeinsam, also gekoppelt weiter gegeben werden, oder ob das Ereignis auf freier Rekombination beruht. Eine Kopplung liegt vor bzw. ist sehr wahrscheinlich, wenn der Quotient 1000:1 beträgt, was einem logarithmisch angegebenen LOD-Wert (*logarithm of the odds*) von 3 entspricht. Dieser Wert bedeutet, dass eine genetische Kopplung 1000x wahrscheinlicher ist als eine zufällige Segregation. Mit dieser Methode lässt sich auch der relative Abstand zweier Loci bestimmen, der in centi-Morgan [cM] angegeben wird. Dabei sind zwei Loci 1 cM voneinander entfernt, wenn die

Rekombinationswahrscheinlichkeit zwischen diesen beiden Loci 1% pro Meiose beträgt, d.h. durchschnittlich ein Rekombinationsereignis (*crossing over*) in 100 Meiosen auftritt.

Beim RH-mapping erfolgt die Kartierung jedoch nicht anhand natürlicher Rekombinationsereignisse. Hier werden die Chromosomenbrüche künstlich unter Einsatz letaler Dosen ionisierender Strahlung – bevorzugt Röntgenstrahlung – induziert. Daher werden auch in diesem Falle die relativen Abstände zwischen zwei Loci nicht in cM angegeben, sondern in centi-Ray [cR].

Der porcine A3-Genlocus wurde unter Zuhilfenahme des INRA-University of Minnesota porcine Radiation Hybrid (IMpRH)-Panel kartiert (Hawken et al., 1999; Milan et al., 2000; Yerle et al., 1998) (<https://www-lgc.toulouse.inra.fr/pig/RH/IMpRH.htm>). Dieses Experiment wurde durch Dr. Andreas Spötter (TiHo Hannover) durchgeführt, um die Resultate des Southern Blots zu manifestieren und um auszuschließen, dass im Laufe der Evolution nicht doch zumindest ein Teil des Genlocus (A3Z2 oder A3Z3) dupliziert wurde.

Das Panel selbst besteht aus 118 Hybridklonen, die durch Bestrahlung von porzinen Blutlymphozyten mit 7000 Rad (*radiation absorbed dose*) und anschließender Fusion mit Hamsterzellen hergestellt und selektioniert wurden. Die DNA eines jeden Klon wurde in PCR-Reaktionen unter Verwendung der spezifischen Primerpaare f_Intron1_1/r_Exon2_2 und f_Exon5_1/r_Intron5_1 eingesetzt.

Tab. 8 Resultate aus dem durchgeführten RH-mapping. Zwei verschiedene Primerpaare wurden benutzt, um den *poA3*-Genlocus mit Hilfe des IMpRH-Panels zu kartieren. Die Retentionsfrequenz gibt den prozentuellen Anteil derjenigen Klone an, die PCR-positiv waren. In beiden Fällen war eine signifikante Kopplung des *poA3*-Genlocus mit den Markern ACO2 und SW1482 zu erkennen, die beide wiederum eine Kopplungsgruppe auf SSC5p bilden. Die Abstände geben den chromosomalen Zwischenraum zwischen dem Marker und dem *poA3*-Genlocus an. Ein LOD-Wert > 3 dient als Indikator für eine Genkopplung (cR = centi-Ray, LOD = logarithm of the odds) (Dieses Experiment wurde von Dr. Andreas Spötter (TiHo Hannover) durchgeführt und ist Bestandteil der Publikation Dörrschuck et al. (Dörrschuck et al., 2011)).

Primer	Retentionsfrequenz	Marker 1 Marker 2	Chromosom	Abstand [cR]	LOD-Wert
f_Intron1_1 + r_Exon2_2	33 %	ACO2	5p	66	5.88
		SW1482	5p	92	3.44
f_Exon5_1 + r_Intron5_1	37 %	ACO2	5p	51	8.23
		SW1482	5p	65	5.98

In beiden Fällen (Tab. 8) zeigte die Zweipunktanalyse eine signifikante Kopplung (LOD-Werte > 3) des porzinen A3-Genlokus mit dem Mikrosatellitenmarker SW1482 und dem Gen *ACO2* (*Aconitase 2*), wobei diese beiden Marker eine Kopplungsgruppe auf dem kurzen Arm des porzinen Chromosoms 5 (SSC5p, *Sus scrofa*) nahe des Telomers bilden (Hawken et al., 1999; Rettenberger et al., 1996) (Abb. 46).

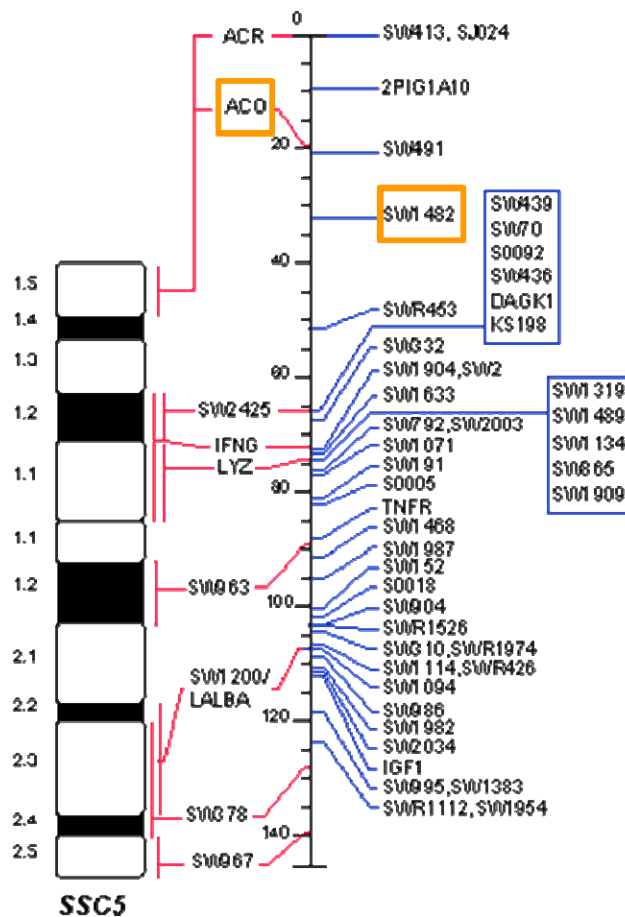


Abb. 46 Chromosomenkarte von SSC5. Die Marker *ACO2* und *SW1482* liegen auf dem kurzen Arm in der Nähe des Telomers (SSC5p1.5) (Quelle: <http://www.animalgenome.org/pigs/maps/srchmarcmap/ssc05.html>).

Aufgrund dieser Resultate wurde gefolgert, dass der porzine A3-Genlokus ebenfalls dieser chromosomalen Region zuzuordnen ist. Durch Vergleich von Karten humaner und porziner Chromosomen (Goureau et al., 1996; Rink et al., 2002) (<http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/compare/compare.htm>) konnten diese Ergebnisse untermauert werden, denn es konnte gezeigt werden, dass die genomische Region von SSC5p14-p_{ter} (ter = Telomer) syntän zu HSA22q12-q_{ter} (*homo sapiens*) ist. Dabei enthält genau diese chromosomale Region auf HSA22 das humane A3-Gencluster, welches in der Region HSA22q13.1 lokalisiert ist (<http://www.genome.ucsc.edu/>).

Neben den eindeutigen Signalen für SSC5p konnte bei beiden Auswertungen ebenfalls ein, wenn auch weniger signifikantes Signal (LOD-Wert von durchschnittlich 2.3), für das akrozentrische SSC14 detektiert werden. Die Ambivalenz der Daten kann damit erklärt werden, dass für HSA22 sowohl auf SSC5 als auch auf SSC14 syntäne Bereiche existieren (Rink et al., 2002). Dabei befindet sich dieser chromosomale Bruch auf dem langen Arm von HSA22 (HSA22q), sehr wahrscheinlich in der Nähe des humanen A3-Genclusters, da nach Rink und Mitarbeitern (Rink et al., 2002) SSC14q21-23 der humanen Chromosomenregion HSA22q11-13.1 entspricht, was mit der Region HSA22q12-q_{ter}, welche wiederum syntän ist zu SSC5p14-p_{ter}, teilweise überlappt. Genau dieser chromosomale Bruchpunktbereich ist noch nicht sicher kartiert (persönliche Mitteilung von Dr. Andreas Spötter), weshalb die Ergebnisse nicht eindeutig sind. Des Weiteren werden normalerweise bei einem RH-mapping mehrere Marker bei der Suche nach einem Genlokus angezeigt und nicht – wie in diesem Falle geschehen – nur zwei Marker (persönliche Mitteilung von Dr. Andreas Spötter), was ebenso für eine unzureichende Kartierung in diesem Bereich spricht. Es wäre sogar möglich, dass ein Marker in solch einer Region falsch kartiert wurde.

Um sicher zu stellen, dass die Kartierung mittels RH-mapping fehlerfrei ist und um die chromosomale Lokalisation zu visualisieren, wurde zusätzlich eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) durch Dr. Heidi Kuiper (TiHo Hannover) durchgeführt. Dazu wurde ein mit Digoxigenin-markierter BAC-Klon, welcher den gesamten *poA3*-Genokus enthielt, mit porzinen Metaphasechromosomen hybridisiert. Bei der darauffolgenden Fluoreszenzmikroskopie wurden zwei Signale detektiert (Abb. 47), welche anhand der Chromosomenbänderung dem chromosomalen Bereich SSC5p1.5 zugeordnet werden konnten.

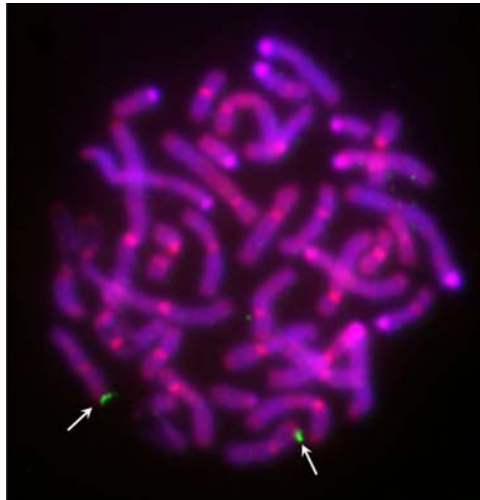


Abb. 47 Chromosomale Lokalisierung des *poA3*-Genlokus durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Der mit Digoxigenin markierte BAC-Klon CH242-330G8, welcher den gesamten *poA3*-Genlokus enthält, wurde mit GTG-gebänderten, in der Metaphase arretierten Schweinechromosomen hybridisiert. Die Signale (grün; markiert durch weiße Pfeile) sind auf dem kurzen Arm von Chromosom 5 nahe des Telomers (SSC5p1.5) zu detektieren. Die Chromosomen wurden mit DAPI und Propidiumjodid gegengefärbt (Dieses Experiment wurde von Dr. Heidi Kuiper (TiHo Hannover) durchgeführt und ist Bestandteil der Publikation Dörrschuck *et al.* (Dörrschuck *et al.*, 2011)).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Hilfe des RH-mapping und einer anschließenden FISH-Analyse der porcine A3-Genlokus eindeutig der Telomerregion des kurzen Arms des porcinen Chromosoms 5 (SSC5p1.5) zugeordnet werden konnte. Da keine Signale auf anderen Chromosomen erhalten wurden, kann daraus mit großer Wahrscheinlichkeit geschlossen werden, dass die Gene *A3Z2* und *A3Z3* nur einmal im Schweinegenom vorkommen.

3.4 Interaktion der humanen und porcinen A3-Proteine mit PERV

Für die bisher am besten untersuchte Cytosin-Deaminase huA3G ist bekannt, dass dieses Protein seine antiretrovirale Aktivität erst in der vom Virus (beispielsweise HIV-1 Δ *vif*) neu infizierten Zelle ausübt. Dieser Mechanismus impliziert, dass huA3G vor der Ausübung seiner restriktiven Aufgabe in die neu entstehenden Viruspartikel inkorporiert wird (Mariani *et al.*, 2003; Stopak *et al.*, 2003). Dazu wird die Cytosin-Deaminase der virusproduzierenden Zelle durch Interaktion mit der NC-Region des Gag-Polypeptids in das Kapsid der neu entstehenden Viren verpackt (Alce and Popik, 2004; Cen *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2004), wobei dieser Schritt sehr wahrscheinlich von der viralen RNA abhängig ist (Burnett and Spearman, 2007; Khan *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2007; Schafer *et al.*, 2004; Soros *et al.*, 2007; Svarovskaia

et al., 2004; Zennou et al., 2004). Nach Infektion der Zielzelle entfalten die A3-Proteine während der reversen Transkription ihre antiretrovirale Aktivität, wo sie innerhalb des einzelsträngigen (-)-DNA-Stranges Cytosin zu Uracil deaminieren, was zu einer G-zu-A-Hypermutation der proviralen dsDNA-Sequenz führt und dadurch die Infektiosität der Viren stark reduziert wird (Yu et al., 2004b). Diese Deaminierung der Cytosine erfolgt allerdings nicht nach dem Zufallsprinzip. Vielmehr scheinen die A3-Proteine gezielt ihre Funktion auszuüben, indem sie – neuesten Erkenntnissen zufolge – eine Trinukleotidpräferenz aufweisen, wodurch manche Cytosine innerhalb der proviralen Sequenz für den Deaminierungsschritt eindeutig favorisiert werden (Armitage et al., 2008; Jern et al., 2007; Jonsson et al., 2006; Yu et al., 2004a; Yu et al., 2004b).

Sowohl die porzinen A3-Proteine als auch die humanen Vertreter sollten auf all diese Eigenschaften hin – Verpackung, antiretrovirale Aktivität, Deaminierung und Nukleotidpräferenz – unter Verwendung des Moleklarklons PERV-B(33) (Czaderna et al., 2000) untersucht werden.

3.4.1 Verpackung der A3-Proteine in PERV-Virionen

Um herauszufinden, ob und welche A3-Proteine in PERV verpackt werden, wurde eine Drei-Plasmid-Transfektion von HEK-293T-Zellen durchgeführt. Dabei wurden mit VSV-G pseudotypisierte PERV-Partikel in An- und Abwesenheit der porzinen A3-Proteine A3Z2-Z3, A3Z2, A3Z3 und A3Z2-Z3 SVA hergestellt, wobei huA3G als Positivkontrolle mitgeführt wurde. Die transfizierten Zellen wurden lysiert und die viralen Überstände aufkonzentriert, bevor die intrazelluläre A3-Expression bzw. die A3-Verpackung in PERV-Partikel über Western Blot nachgewiesen wurde.

Anhand der Zelllysate ließ sich erkennen, dass alle untersuchten A3-Proteine annähernd gleich stark exprimiert wurden (Abb. 48a). Vergleich man die Verpackungseffizienz der einzelnen A3-Proteine (Abb. 48b), so ließ sich feststellen, dass poA3Z2-Z3, poA3Z3 sowie huA3G besonders effizient in die PERV-Partikel verpackt wurden. Dagegen wurde poA3Z2 nur schwach inkorporiert, während für poA3Z2-Z3 SVA keine Verpackung in die Viren nachgewiesen werden konnte.

Anhand der erhaltenen Resultate lässt sich folgern, dass PERV keinen Mechanismus entwickelt hat, um die Verpackung der wirtseigenen A3-Proteine poA3Z2-Z3 und poA3Z3 zu verhindern. Warum A3Z2 nur schwach bzw. poA3Z2-Z3 SVA nicht verpackt wurde, lässt sich nicht genau festlegen. Entweder können die retroviralen Partikel die Verpackung aktiv inhibieren, oder die A3-Proteine besitzen keine Enkapsidierungsdomäne.

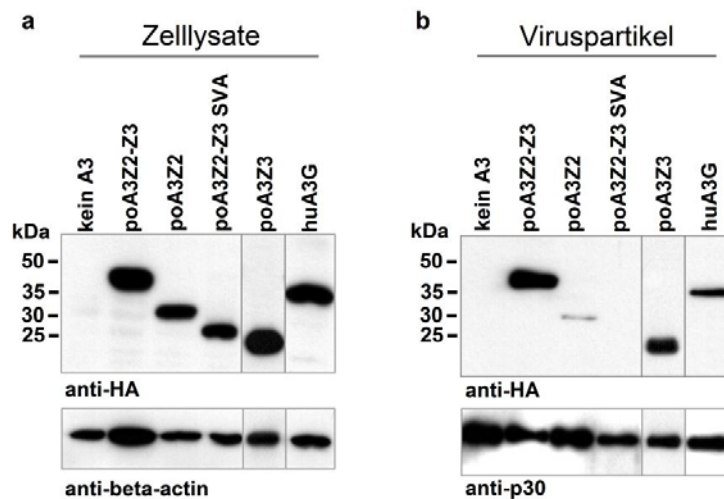


Abb. 48 Verpackung der A3-Proteine in PERV. Western Blot-Ergebnisse (a) der HEK-293T-Zellen nach Transfektion zum Nachweis der intrazellulären A3-Expression (20 µg Zelllysate pro Spur) und (b) der produzierten PERV-Partikel zum Nachweis einer Verpackung der A3-Proteine (400 mU pro Spur). Die Proteine wurden über HA-Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle wurde entweder (a) β -Aktin oder (b) p30 (Kapsidprotein von PERV) nachgewiesen. Als Negativkontrolle dienten Zelllysate von lediglich mit PERV/EGFP-Expressionsplasmid und VSV-G transfizierten HEK-293T-Zellen bzw. aufkonzentrierte Viruspartikel.

3.4.2 Antiretrovirale Aktivität der A3-Proteine gegen PERV

Um zu untersuchen, ob die Replikation von PERV durch A3-Proteine *in vitro* inhibiert werden kann, wurde nicht nur der Einfluss der poA3-Proteine (poA3Z2, -Z3, -Z2-Z3 und -Z2-Z3 SVA) analysiert, sondern es wurden sowohl das murine A3 (muA3) als auch die meisten Vertreter der humanen APOBEC-Familie (huAID, huA1, huA2, huA3A, -B, -C, -F, -G und -H) mitgeführt. Zur Kontrolle sollte die antiretrovirale Aktivität dieser A3-Proteine ebenfalls gegen MLV getestet werden. Zum einen handelt es sich bei MLV genauso wie bei PERV um ein γ -Retrovirus, wobei ein Abgleich der proviralen Sequenzen von PERV-B(33) (Datenbanknummer: AJ133816) (Czuderna et al., 2000) und MLV (Datenbanknummer: AF033811) eine Homologie von etwa 60 % aufwies, weshalb die Resultate beider Interaktionsstudien miteinander vergleichbar sein sollten. Zum anderen gibt es bereits mehrere Publikationen zum Wirkmechanismus verschiedener A3-Proteine gegen MLV. So konnte beispielsweise

gezeigt werden, dass huA3G sehr effektiv die MLV-Replikation inhibieren kann, während MLV wiederum gegen den restriktiven Einfluss des wirtseigenen muA3-Proteins resistent ist (Mariani et al., 2003). Anhand der bereits publizierten Daten konnten die erhaltenen Ergebnisse mehrerer, mitgeführter Kontrollen überprüft werden.

An dieser Stelle kamen die PERV- und MLV-Expressionsplasmide (Kapitel 3.1) zum Einsatz. Diese kodieren für das retrovirale *gag* und *pol*, jedoch nicht für *env*, da die *env*-Sequenz gegen eine CMV-EGFP-Kassette ausgetauscht wurde, weshalb es notwendig war, die Partikel mit VSV-G zwecks Zelleintritt zu pseudotypisieren. Dabei diente die EGFP-Fluoreszenz als Reporter für die antiretrovirale A3-Aktivität. Denn durch die restriktive Wirkung der Cytosin-Deaminasen und die dadurch induzierten G-zu-A-Hypermutationen innerhalb der proviralen Sequenzen sollte nicht nur die Virusinfektiosität, sondern auch die Fluoreszenz betroffen sein. Zum einen wird durch die enzymatische Aktivität der A3-Proteine die *EGFP*-Sequenz innerhalb der proviralen Sequenz direkt mutiert, zum anderen werden zahlreiche mutierte (-)-DNA-Stränge, in denen Uracile anstelle von Cytosinen auftreten, durch zelluläre Reparaturenzyme erkannt und abgebaut (Schröfelbauer et al., 2005; Yang et al., 2007). Deswegen sollte bereits die Anzahl der integrationskompetenten Proviren in Folge dieses Prozesses stark reduziert sein. Die Konsequenz einer restriktiven A3-Aktivität gegen die untersuchten Retroviren sollte sich also in einer Reduktion der Fluoreszenz äußern, welche über FACS-Messungen von transduzierten Zellen detektiert werden konnte.

3.4.2.1 Versuchsoptimierung

Vor Beginn der Interaktionsstudien musste das Verhältnis ermittelt werden, mit dem das PERV/EGFP- bzw. das MLV/EGFP-Expressionsplasmid mit dem VSV-G exprimierenden Verpackungsplasmid pMD.G2 transfiziert werden muss, um eine optimierte, äquimolare Proteinexpression der viralen Bestandteile und daraus resultierend eine effektive Virusproduktion zu erhalten. Dabei soll hier nur die Optimierung anhand von PERV beschrieben werden, da beide Ansätze zu dem gleichen Ergebnis führten. Es wurden HEK-293T-Zellen im Sechsllochformat mit verschiedenen Konzentrationen der Plasmide unter Einsatz von *Lipofectamine* (Invitrogen) transfiziert: Das PERV/EGFP-Expressionsplasmid wurde in einer Konzentration von 0.5/1.0/1.5 µg verwendet, ebenso das Plasmid pcDNA3.1Zeo(+). Letzteres wurde mitgeführt, um den DNA-Gehalt und den möglichen Einfluss dieses

Plasmids auf die Virusproduktion zu berücksichtigen, da bei den nachfolgenden Interaktionsstudien die APOBEC-exprimierenden Plasmide, welche auf pcDNA3.1Zeo(+) basieren, mit transfiziert wurden. Das Hüllproteinkonstrukt wiederum wurde in geringerer Konzentration eingesetzt (0.1-0.5 µg), da eine Überexpression von VSV-G eine zytotoxische Wirkung aufgrund übermäßiger Synzytienbildung zur Folge hat. Die Virusproduktion wurde zwei Tage nach Transfektion durch Bestimmung der RT-Aktivität [mU/ml] im Zellkulturüberstand ermittelt.

Die Verwendung von 0.1 µg pMD.G2 führte zu den besten Virustitern, wobei der Einsatz von je 1 µg der beiden anderen Plasmide ausreichte, um eine effektive Virusproduktion zu gewährleisten (Abb. 49). Somit scheint ein Plasmidkonzentrationsverhältnis von 1:1:0.1 (PERV/EGFP-Plasmid:APOBEC-Plasmid:Hüllproteinkonstrukt) für eine effiziente Virusproduktion optimal zu sein.

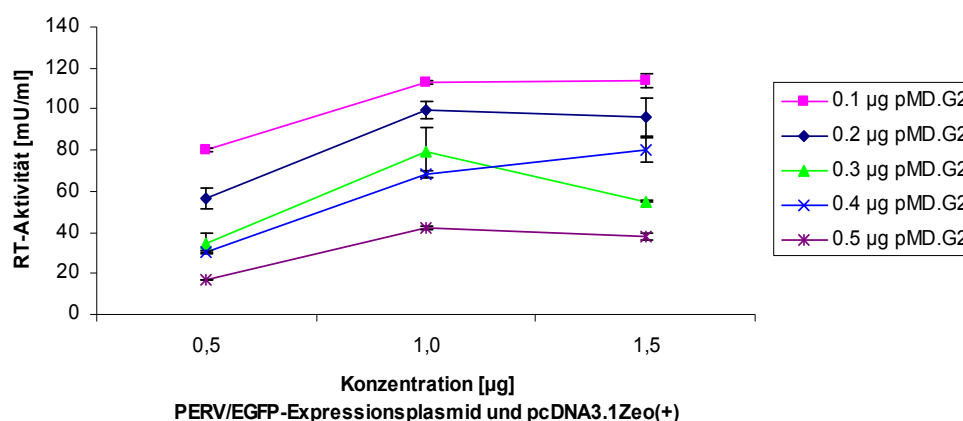


Abb. 49 Optimierung der Virusproduktion durch Modifikation der Plasmid-Konzentrationen. HEK-293T-Zellen wurden mit dem PERV/EGFP-Expressionsplasmid, dem nicht kodierenden Plasmid pcDNA3.1Zeo(+) und dem Hüllproteinkonstrukt pMD.G2 in verschiedenen Verhältnissen unter Verwendung von Lipofectamine transfiziert. Die Produktion pseudotypisierter PERV-Partikel wurde durch Messung der RT-Aktivität [mU/ml] in den Zellkulturüberständen indirekt bestimmt.

Dieses Plasmidverhältnis wurde nochmals transfiziert, zum einen unter Verwendung von Lipofectamine, zum anderen unter Einsatz einer Kombination aus Lipofectamine und PLUS-Reagenz (Invitrogen), um zu überprüfen, ob die Virusproduktion durch Variation der Transfektionsmethode nochmals gesteigert werden konnte. Die Virus-Überstände wurden dabei nicht mehr für eine RT-Messung eingesetzt, sondern gleiche Mengen der viralen Überstände (je 500 µl) direkt für eine Transduktion verwendet, um über eine FACS-Messung den prozentualen Anteil an positiven, also

grün fluoreszierenden Zellen zu bestimmen. Dabei zeigte sich, dass bei einem Plasmidverhältnis von 1:1:0.1 und Einsatz von Lipofectamine/PLUS eine wesentlich höhere Transduktionsrate (52 %) im Vergleich zur Lipofectamine-Transfektion (30 %) erzielt werden konnte (Abb. 50), was auf einen höheren Virustiter im Zellkulturüberstand zurückzuführen ist. Eine Steigerung der Plasmidkonzentrationen des PERV/EGFP-Expressionsplasmides bzw. des Plasmides pcDNA3.1Zeo(+) führte auch in diesem Falle nicht zu einer Erhöhung, sondern zu einer Reduktion der Virusproduktion.

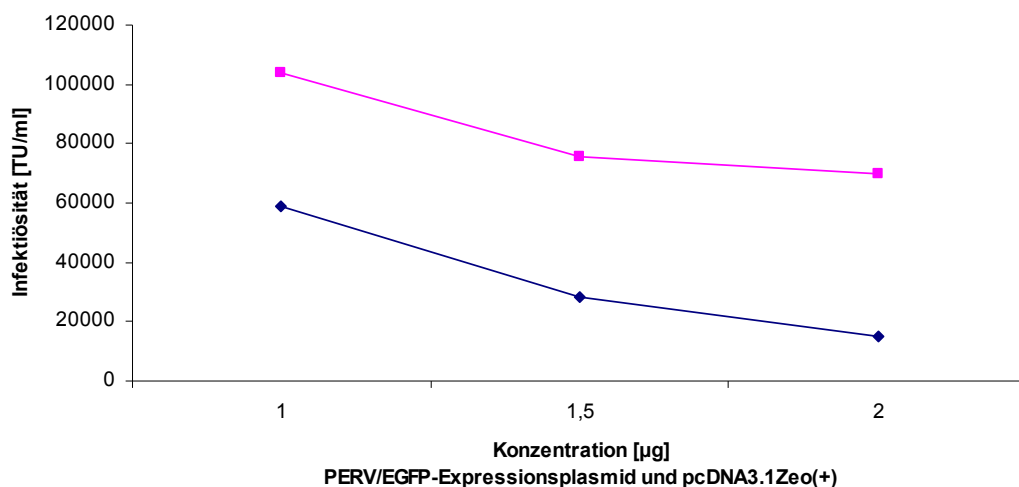


Abb. 50 Optimierung der Virusproduktion durch Modifikation der Transfektionsmethode. Die Drei-Plasmid-Transfektion wurde unter Verwendung von Lipofectamine (blaue Linie) bzw. einer Kombination aus Lipofectamine und PLUS-Reagenz (pinkfarbene Linie) durchgeführt. Je 500 µl der viralen Überstände wurden zwei Tage nach Transfektion zur Transduktion von HEK-293T-Zellen benutzt und die Zellen nach drei Tagen für eine FACS-Messung verwendet. Die Infektiosität [TU/ml] der viralen Überstände wurde indirekt über die Anzahl grün fluoreszierender Zellen bestimmt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Drei-Plasmid-Transfektion im Verhältnis 1:1:0.1 und unter Verwendung von Lipofectamine in Kombination mit PLUS-Reagenz einen optimierten Virustiter lieferte.

Im nächsten Schritt galt es zu ermitteln, wie viel RT-Aktivität [mU] bei einer Transduktion eingesetzt werden musste, um bei der in den nachfolgenden Experimenten mitgeführten Positivkontrolle (= pseudotypisierte Partikel, die in Abwesenheit von A3 generiert wurden) einen genügend hohen Prozentsatz grün fluoreszierender Zellen zu erhalten, damit bei einer späteren FACS-Messung eine Reduktion der Fluoreszenz und damit einhergehend ein Einfluss der A3-Proteine besser detektiert werden konnte. Um diese Fragestellung zu lösen, wurden

verschiedene RT-Mengen pseudotypisierter PERV (60/70/80/90 mU) und MLV (30/50/70 mU) gemäß Protokoll transduziert. Eine darauf folgende FACS-Messung ergab, dass eine Transduktion von 80 mU PERV und 50 mU MLV etwa 40 % grün fluoreszierende Zellen zur Folge hatten, wobei diese beiden RT-Werte für die anschließenden Interaktionsstudien verwendet wurden (Daten nicht gezeigt).

3.4.2.2 Untersuchung der A3-Proteine auf ihre antiretrovirale Aktivität gegen PERV

Um den Effekt der A3-Proteine auf die virale Infektiosität zu untersuchen, wurden in HEK-293T-Zellen VSV-G pseudotypisierte PERV/EGFP-Partikel in Ab- oder Anwesenheit humaner und porziner A3-Proteine (huA3A, -B, -C, -F, -G, -H, poA3Z2, -Z3, -Z2-Z3 und -Z2-Z3 SVA) untersucht. Weiterhin wurden die Expressionsplasmide für huAID, huA1 und huA2 mit einbezogen. Zur Kontrolle sollte die antiretrovirale Aktivität dieser A3-Proteine ebenfalls gegen MLV getestet werden, da bereits Veröffentlichungen zur MLV-A3-Interaktion existieren. Allerdings gibt es nach wie vor widersprüchliche Daten innerhalb der Literatur hinsichtlich der Sensitivität des MLV gegen das wirtseigene A3-Protein (Bishop et al., 2004; Browne and Littman, 2008; Jern et al., 2007; Kobayashi et al., 2004; Langlois et al., 2009; Mariani et al., 2003) weshalb auch die Klärung dieses Punktes im Zuge dieser Experimente von Interesse war.

Dazu wurde gemäß der Optimierung eine Drei-Plasmid-Transfektion durchgeführt und die nach zwei Tagen erhaltenen, viralen Überstände, welche in Ab- bzw. Anwesenheit der entsprechenden Cytosin-Deaminasen produziert wurden, RT-normiert für eine Transduktion verwendet (Kapitel 3.4.2.1). Die transduzierten HEK-293T-Zellen wurden nach drei Tagen für eine FACS-Messung eingesetzt, um anhand des prozentualen Anteils grün fluoreszierender Zellen auf die Infektiosität der pseudotypisierten PERV- und MLV-Partikel bzw. den restriktiven Einfluss der APOBEC-Proteine auf die beiden untersuchten Retroviren schließen zu können. Dabei wurde der Prozentsatz positiver Zellen derjenigen Probe, bei der die viralen Partikel in Abwesenheit der A3-Proteine generiert wurden, auf 100 % Infektiosität normalisiert, um die restlichen Ansätze relativ dazu vergleichen zu können.

Wie erwartet ist der antiretrovirale Effekt der A3-Proteine für PERV und MLV sehr ähnlich (Abb. 51a+b) mit der signifikanten Ausnahme, dass muA3 nicht in der Lage ist, die Infektiosität von MLV zu reduzieren. Die PERV-Replikation wird sehr effizient durch huA3B (32-fach), huA3G (38-fach) sowie muA3 (19-fach) inhibiert (Abb. 51a). Die porzinen A3-Proteine reduzierten die PERV-Infektiosität ebenfalls sehr stark. So zeigte A3Z2-Z3 eine Inhibierung um Faktor 65, A3Z2 um Faktor 38 und A3Z3 um Faktor 17 (Abb. 51a). Neben den humanen A3-Proteinen wurden auch huAID, huA1 und huA2 bei den Interaktionsstudien mitgeführt mit dem erwarteten Resultat, dass keines der drei Proteine einen antiretroviralen Einfluss auf die Infektiosität von PERV und MLV nimmt, da diese Enzyme - zumindest soweit dies bekannt ist - andere physiologische Aufgaben übernehmen (Mehta et al., 2000; Muramatsu et al., 1999; Muramatsu et al., 2000; Teng et al., 1993). Die restlichen A3-Proteine (huA3A, -C, -F, -H und poA3Z2-Z3 SVA) wiesen lediglich eine geringe, hemmende Wirkung um Faktor 2 bis Faktor 9 auf. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die A3-Proteine im Zuge dieses artifiziellen Reportersystems stark überexprimiert in den transfizierten Zellen vorliegen, dürfte dieser Effekt *in vivo* als marginal einzustufen sein, da die endogene Proteinexpression wesentlich schwächer ist und die Cytosin-Deaminasen infolgedessen *per se* keinen Einfluss auf die retrovirale Replikation haben sollten. Des Weiteren soll darauf hingewiesen werden, dass die angegebenen Signifikanzen nicht immer konform mit dem Reduktionsfaktor sind, der durch die A3-Proteine hervorgerufen wird. Diese Abweichungen sind auf hohe Standardabweichungen der zwei unabhängigen, miteinander verrechneten Versuchsansätze zurückzuführen.

Die zu diesem Experiment korrespondierenden Western Blots zeigen, dass alle getesteten APOBEC-Vertreter mit Ausnahme von huA3H annähernd gleich stark exprimiert wurden (Abb. 51c). Die schwache Expression von huA3H ist auf seine geringe Halbwertszeit zurückzuführen, wodurch diese Cytosindeaminase instabil ist (OhAinle et al., 2006).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die humanen A3-Proteine vergleichbare antiretrovirale Aktivitäten gegenüber PERV und MLV nachgewiesen werden konnten. Die porzinen A3-Proteine zeigten ebenso ähnliche, inhibitorische Effekte gegenüber den beiden endogenen Retroviren, wobei hierbei A3Z2-Z3 SVA die geringste Hemmwirkung aufwies. MLV zeigte wie in der Literatur beschrieben eine Resistenz gegenüber seinem wirtseigenen Protein muA3 (Bishop et al., 2004; Browne and Littman, 2008; Jern et al., 2007; Kobayashi et al., 2004; Langlois et al., 2009; Mariani et al., 2003), während PERV sensitiv für die meisten poA3-Proteine war. Somit können die meisten humanen und porzinen A3s sowie muA3 die PERV-Replikation inhibieren.

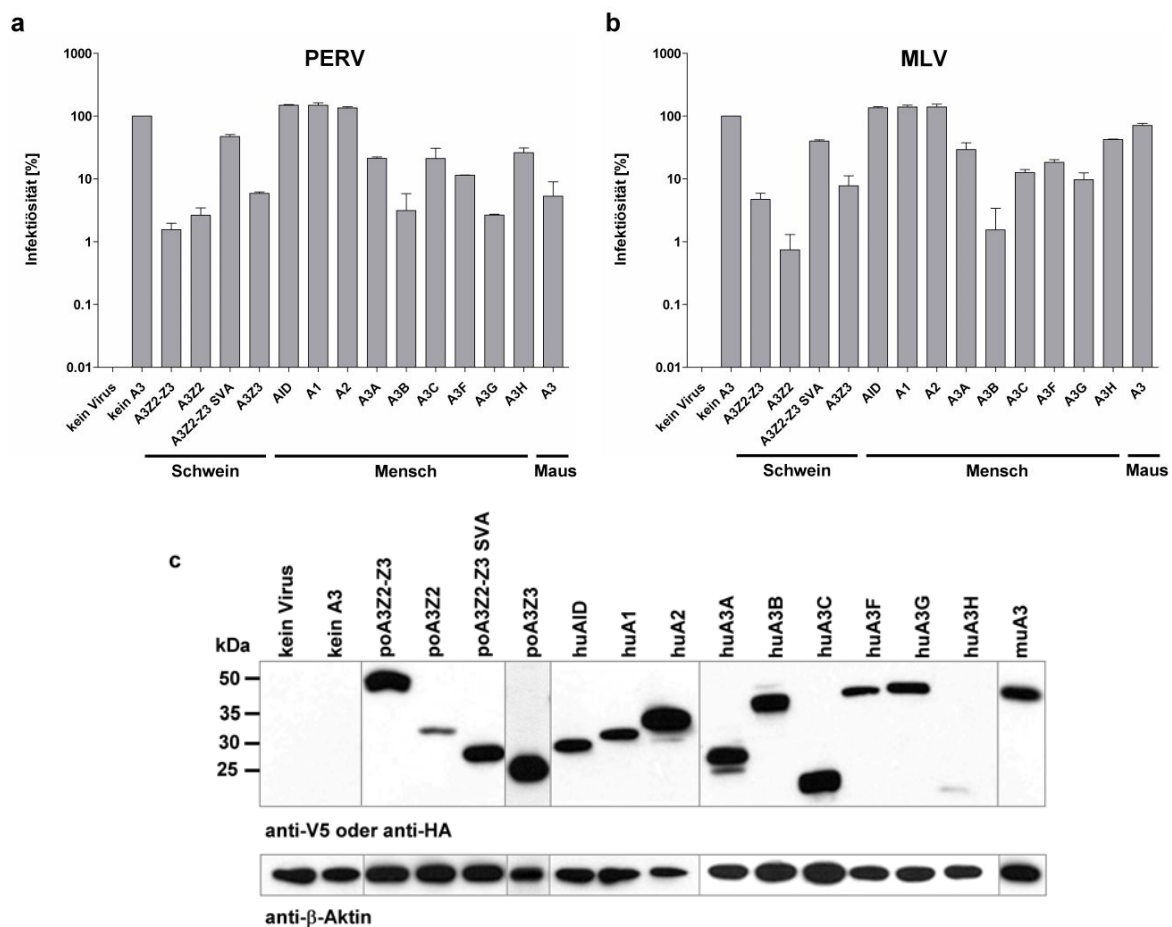


Abb. 51 Antiretrovirale Aktivität der APOBEC-Proteine gegen PERV und MLV. HEK-293T-Zellen wurden mit (a) PERV- oder (b) MLV-Partikeln transduziert, wobei diese in Ab- oder Abwesenheit der APOBEC-Proteine generiert wurden. Die Infektivität wurde indirekt durch FACS-Messung der intrazellulären EGFP-Fluoreszenz drei Tage nach Transduktion bestimmt. Es wurden je zwei unabhängige Experimente durchgeführt und die Werte miteinander verrechnet (logarithmischer Auftrag). (c) Western Blot-Ergebnisse zur intrazellulären APOBEC-Expression zwei Tage nach Transfektion der HEK-293T-Zellen. Pro Spur wurden 20 µg Zelllysate aufgetragen. Der Nachweis der APOBEC-Expression erfolgte über V5-Antikörper (huAID, huA1, huA2) oder HA-Antikörper, als Ladekontrolle wurde β-Aktin nachgewiesen (kein Virus = Zelllysate von HEK-293T-Zellen; kein A3 = transfizierte HEK-293T-Zellen zur Produktion pseudotypisierter PERV in Abwesenheit von APOBEC).

Um die virusneutralisierende Wirkung der porzinen A3-Proteine und des huA3G, welches als Positivkontrolle mitgeführt wurde, auf ihre Dosisabhängigkeit hin zu untersuchen, wurde die Drei-Plasmid-Transfektion mit dem PERV-Reportersystem wiederholt, wobei die A3-Expressionsplasmide in steigenden Konzentrationen verwendet wurden. Es reichten bereits Konzentrationen unter 1 μg aus, um eine sichtbare Reduktion der PERV-Infektiosität zu erhalten (Abb. 52). Bereits bei Plasmidkonzentrationen von 0.2 μg war ein antiretroviraler Effekt zu erkennen: so zeigten huA3G, poA3Z2, -Z3 und -Z2-Z3 eine inhibitorische Wirkung um Faktor 5, 19, 7 und 6, während poA3Z2-Z3 SVA so gut wie keinen Effekt aufwies. Interessanterweise zeigte poA3Z3 keine dosisabhängige Wirkung, da bereits bei 0.6 μg eine Sättigung erreicht wurde, denn ab dieser Konzentration war keine weitere Reduktion der PERV-Infektiosität erkennbar.

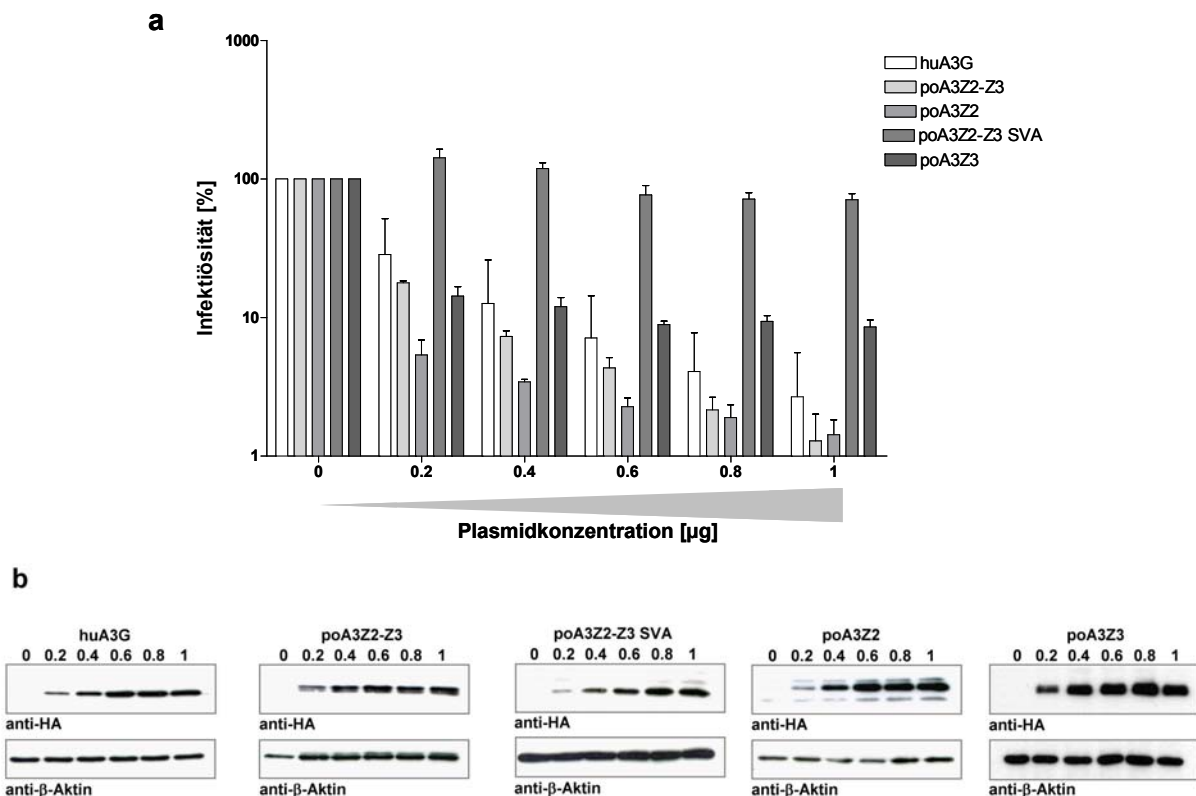


Abb. 52 Dosisabhängige Wirkung der A3-Proteine gegen PERV. (a) HEK-293T-Zellen wurden mit pseudotypisierten PERV transduziert, wobei die A3-kodierenden Plasmide in ansteigenden Konzentrationen verwendet wurden (0-1 μg). Die Infektiosität der Viren wurde durch FACS-Messung der intrazellulären EGFP-Fluoreszenz drei Tage nach Transduktion bestimmt. Pro Virus wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt und die Werte miteinander verrechnet. Es wurde ein logarithmischer Auftrag gewählt. (b) Western Blot-Ergebnisse zur intrazellulären, ansteigenden A3-Expression nach Drei-Plasmid-Transfektion der HEK-293T-Zellen. Die Zellen wurden lysiert und 20 μg Zelllysate pro Spur aufgetragen. Der Nachweis der A3-Expression erfolgte über HA-Antikörper, als Ladekontrolle wurde β -Aktin nachgewiesen.

Um zu untersuchen, ob die A3-Proteine ebenfalls in der Lage sind, die PERV-Replikation über einen längeren Zeitraum zu unterdrücken bzw. ob PERV nicht doch einen Mechanismus besitzt, um längerfristig der antiretroviralen Aktivität der A3-Proteine zu entgehen, wurden stabil A3-exprimierende HEK-293T-Zellen hergestellt. Dabei lag der Fokus auf den nachgewiesenermaßen restriktiven Cytosin-Deaminasen poA3Z2, -Z3 und -Z2-Z3, wobei die humanen Doppeldomänen-Proteine huA3B, -F und -G als Kontrollen mitgeführt wurden. Allerdings ist es nicht gelungen, eine stabil huA3G-exprimierende Zelllinie herzustellen, was den Schluss nahe legt, dass huA3G bei Überexpression zytotoxisch wirkt (Daten nicht gezeigt). Die restlichen, stabilen Zelllinien wurden anschließend mit dem Plasmid pBS-Not[PERV-B(33)ATG] (Czuderna et al., 2000) transfiziert, welches für das replikationskompetente PERV-B(33) kodiert. Die PERV-Replikation wurde insgesamt 30 Tage lang beobachtet, wobei der Nachweis durch Messung der RT-Aktivität in den Zellkultur-Überständen erfolgte.

Die Proteine huA3B, poA3Z2 und poA3Z2-Z3 inhibierten sehr effektiv und über den gesamten Zeitraum andauernd die PERV-Replikation, während huA3F und überraschenderweise poA3Z3 keinen restriktiven Effekt aufzeigten (Abb. 53a). Warum letztlich huA3F und poA3Z3 in der Lage sind, bei einem „single-round“-Assay die PERV-Infektiosität zu inhibieren (Abb. 51a), jedoch über einen längeren Zeitraum eine ausbreitende PERV-Infektion nicht verhindern können, ist unklar. Die Resultate entsprechen aber kürzlich gemachten Beobachtungen zu huA3F und HIV-1 (Miyagi et al., 2010). Um sicher zu stellen, dass die bei diesem Versuch mitgeführten A3-Proteine über den gesamten Zeitraum konstant exprimiert wurden, wurden zu Beginn (Tag 0) und am Ende (Tag 30) der Replikationskurve Zelllysate angefertigt und diese für einen Western Blot verwendet mit dem Resultat, dass alle A3-Proteine während des gesamten Untersuchungszeitraumes stabil exprimiert wurden (Abb. 53b+c).

Dieses Experiment zeigt, dass PERV auch über mehrere Infektionszyklen nicht in Zellen repliziert, welche huA3B, poA3Z2 oder poA3Z2-Z3 stabil exprimieren. Allerdings bedarf es längerer Beobachtungszeiträume, um gänzlich auszuschließen, dass PERV beispielsweise durch adaptive Mutationen *in vivo* Mechanismen entwickeln könnte, um dem restriktiven Einfluss der A3 Proteine entgegenzuwirken.

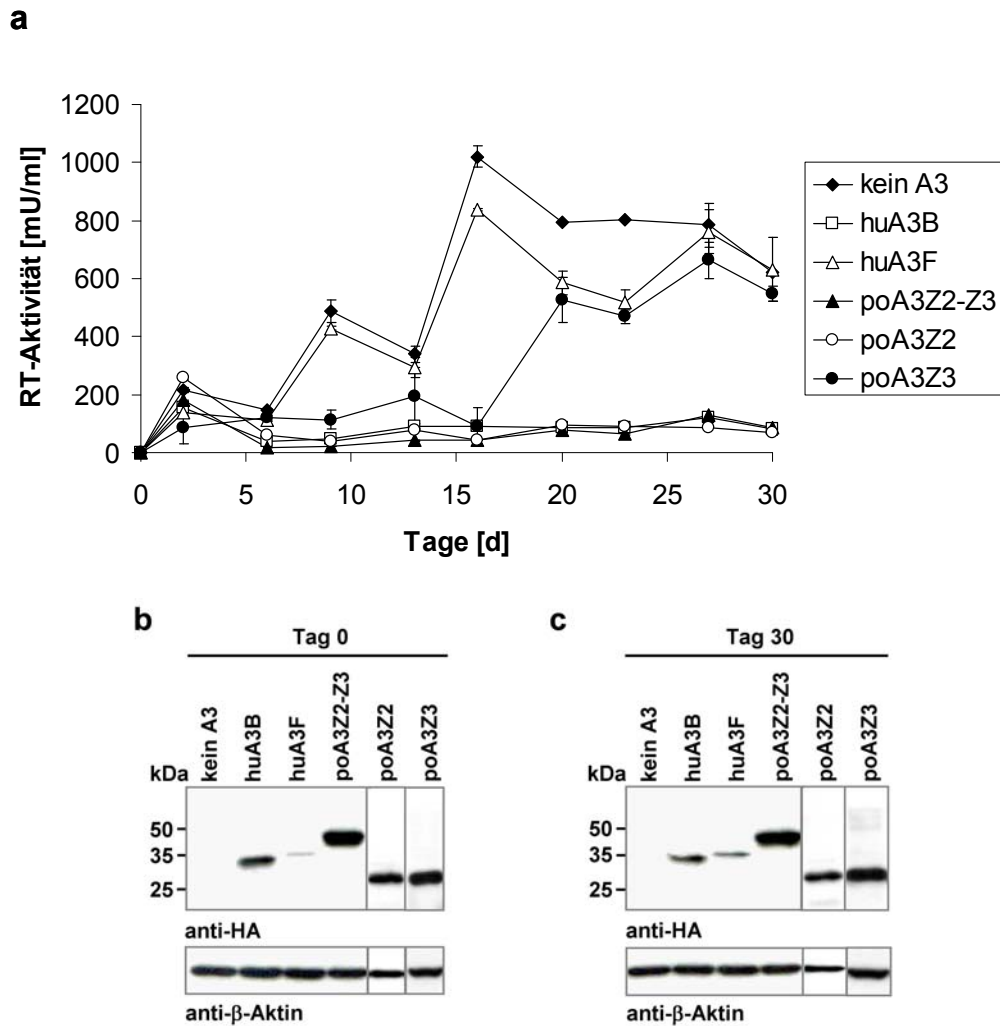


Abb. 53 (a) Replikationskurve von PERV-B(33) auf stabil A3-exprimierenden HEK-293T-Zellen (huA3B, huA3F, poA3Z2, -Z3 und -Z2-Z3). Die Zellen wurden mit dem für PERV-B(33) kodierenden Plasmid pBS-Not[PERV-B(33)ATG] transfiziert und über einen Zeitraum von insgesamt 30 Tagen alle 3-4 Tage die viralen Überstände abgenommen. Die Produktion der replikationskompetenten PERV-Viren wurde durch Messung der RT-Aktivität [mU/ml] in den Überständen indirekt bestimmt. (b+c) Western Blot-Ergebnisse zur intrazellulären A3-Expression der stabil transfizierten HEK-293T-Zelllinien an Tag 0 (b) und Tag 30 (c) der Replikationskurve. Die Zellen wurden lysiert und 20 µg Zelllysate pro Spur aufgetragen. Der Nachweis der A3-Expression erfolgte über HA-Antikörper, als Ladekontrolle wurde β-Aktin nachgewiesen (kein A3 = Zellen wurden mit dem Plasmid pcDNA3.1Zeo(+)) transfiziert).

3.4.3 Deaminierung der proviralen PERV-Sequenzen durch die A3-Proteine

Aufgrund der bisher durchgeführten Experimente konnte die Verpackung einiger A3-Proteine sowie deren effiziente PERV-Restriktion nachgewiesen werden. Nun sollte analysiert werden, ob die antiretrovirale Aktivität der A3-Proteine auf der Cytosin-Deaminierung der proviralen PERV-Sequenzen begründet liegt. Um diesen Mechanismus nachzuweisen, wurde genomische DNA aus HEK-293T-Zellen präpariert, welche zuvor mit pseudotypisierten PERV/EGFP-Viren (welche in Ab- bzw. Anwesenheit von A3-Proteinen produziert wurden) transduziert worden waren. Die genomische DNA wurde anschließend für eine PCR verwendet, bei der die EGFP-Sequenz der integrierten Proviren amplifiziert und sequenziert wurde. Falls der antiretrovirale Mechanismus der A3-Proteine auf Deaminierung beruht, sollte dies zu einer Umwandlung von Cytidin zu Uridin im viralen (-)-DNA-Strang während der reversen Transkription führen, was in einem G-zu-A-Austausch im viralen (+)-DNA-Strang resultiert. Neben den porzinen A3-Proteinen (poA3Z2-Z3, poA3Z2, poA3Z3 und poA3Z2-Z3 SVA) wurden als Kontrollen huA3B, -F, und -G sowie muA3 mitgeführt.

Erwartungsgemäß induzierten alle A3-Proteine, bei denen bereits eine effiziente, antiretrovirale Aktivität gegen PERV nachgewiesen werden konnte, ebenfalls G-zu-A-Mutationen innerhalb der proviralen Sequenz (Abb. 54). Besonders aktiv waren die Cytosin-Deaminasen huA3G und muA3, die eine Mutationsrate von 1.17 % bzw. 1.50 % hervorriefen, während huA3B und huA3F eine geringere Mutationsrate von 0.35 % und 0.61 % induzierten. Für die porzinen A3-Proteine poA3Z2-Z3, poA3Z2 und poA3Z3 konnten Mutationsraten von 0.81 %, 0.67 % und 0.21 % ermittelt werden, während poA3Z2-Z3 SVA erwartungsgemäß wegen der fehlenden antiretroviralen Aktivität und der fehlenden Verpackung in PERV-Virionen keine Deaminierung aufwies (Abb. 54).

Daraus konnte geschlossen werden, dass die A3-Proteine die PERV-Replikation hauptsächlich durch Hypermutation des retroviralen Genoms restringieren.

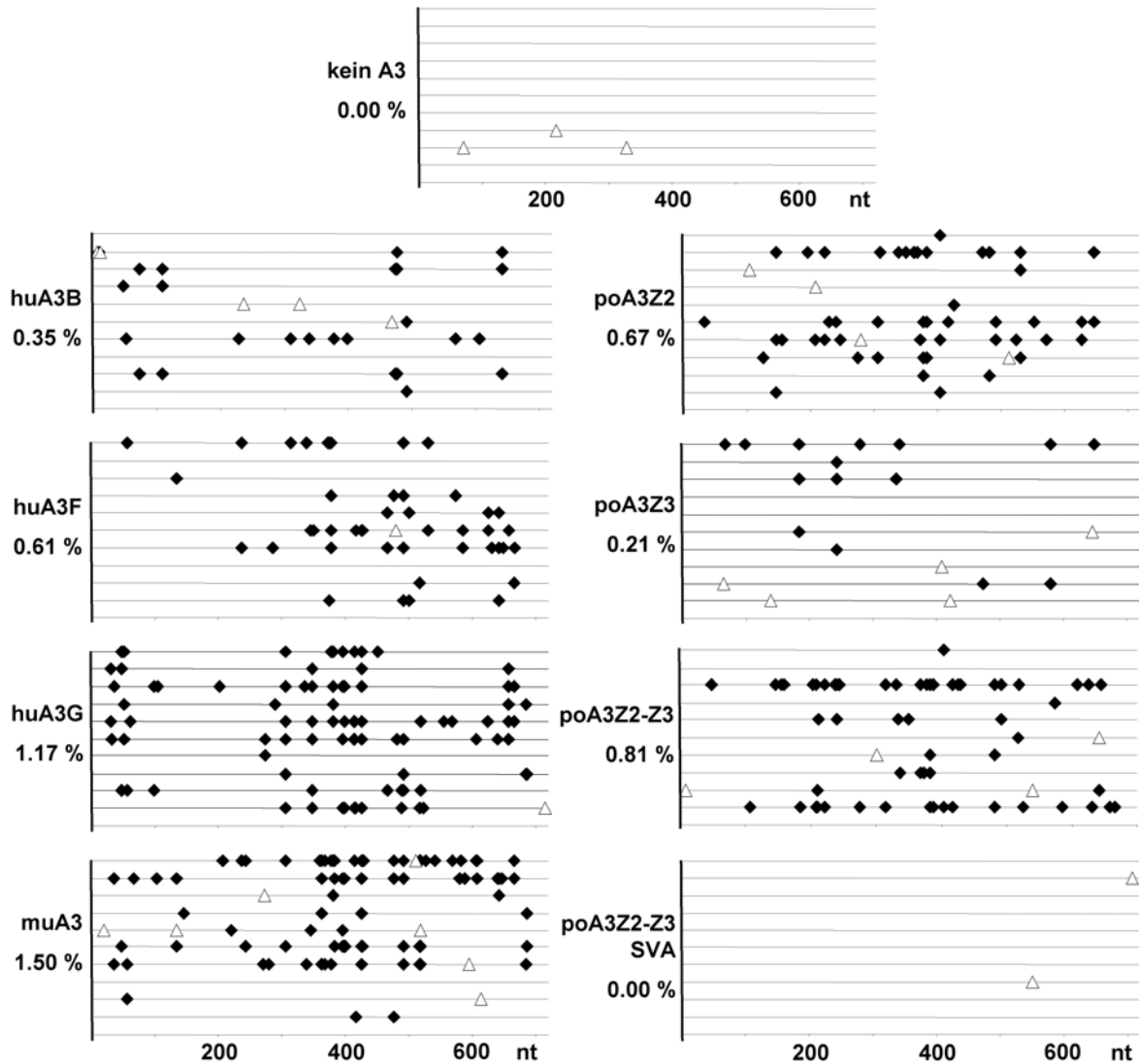


Abb. 54 Antiretroviral aktive A3-Proteine induzieren G-zu-A-Mutationen innerhalb des (+)-DNA-Stranges des PERV-Genoms. HEK-293T-Zellen wurden mit pseudotypisierten PERV-EGFP-Partikeln transduziert, die in Abwesenheit oder in Anwesenheit der dargestellten A3-Proteine hergestellt wurden. 10 h nach Transduktion wurde die genomische DNA der Zellen präpariert und für eine PCR eingesetzt, bei der die 720 bp langen EGFP-Sequenzen der integrierten PERV-Proviren amplifiziert und 10 Klone pro Ansatz sequenziert wurden. Jede horizontale Linie repräsentiert einen sequenzierten Klon. Die Position jeder nicht-G-zu-A-Mutation (weißes Dreieck) und jeder G-zu-A-Mutation (schwarze Raute) ist dargestellt und die Mutationsfrequenz für jede untersuchte Cytosin-Deaminase angegeben ($\text{G-zu-A-Mutationsfrequenz [\%]} = (\text{Anzahl aller mutierter G in 10 EGFP-Sequenzen} / 7200) \times 100$).

3.4.4 Gerichtete Deaminierung aufgrund einer Trinukleotidpräferenz der A3-Proteine

Im vorangegangenen Experiment konnte gezeigt werden, dass die antiretroviral aktiven A3-Proteine Mutationen in das retrovirale Genom einfügen. Nun sollte untersucht werden, ob diese Mutationen zufällig oder innerhalb bestimmter Nukleotidkontexte erfolgten. Dazu wurde die Verteilung der Nukleotide 5 Basen *upstream* und 5 Basen *downstream* (+5/-5 Basen) aller C-zu-T-Mutationsstellen innerhalb des (-)-DNA-Stranges verglichen. Die gesammelten Daten wurden statistisch analysiert und graphisch aufgetragen, wodurch die Nukleotidverteilung um die Mutationsstellen erhalten wurde (Abb. 55). Die statistische Analyse erfolgte durch Kay-Martin Hanschmann (PEI).

Obwohl die nachfolgende Darstellung lediglich einen Überblick über die Nukleotidverteilung geben sollte, ist anhand dieser Analysen und der vermerkten Signifikanzlevel bereits eine Di- oder Trinukleotidpräferenz für alle untersuchten A3-Proteine zu erkennen (Abb. 55). Interessanterweise scheinen nicht nur die beiden Nukleotide direkt vor der Mutationsstelle bei einem Deaminierungsereignis von Bedeutung zu sein. Vielmehr sieht es so aus – und zwar für die meisten der in dieser Studie integrierten A3-Proteine –, dass auch die +4-Position *downstream* zur Mutationsstelle eine Rolle spielt, wobei im Falle von huA3G, huA3B, muA3 und poA3Z2 ein Pyrimidin zu finden ist (A bei huA3G, T bei huA3B, muA3 und poA3Z2). Speziell bei huA3G scheint es, als ob sich die Nukleotidpräferenz über den gesamten, analysierten Nukleotidkontext erstreckt, da fast jede Nukleotidposition im Bereich +5/-5-Basen aufgrund der p-Werte ein signifikantes Vorkommen mit einer C-zu-T-Mutation aufzeigt.

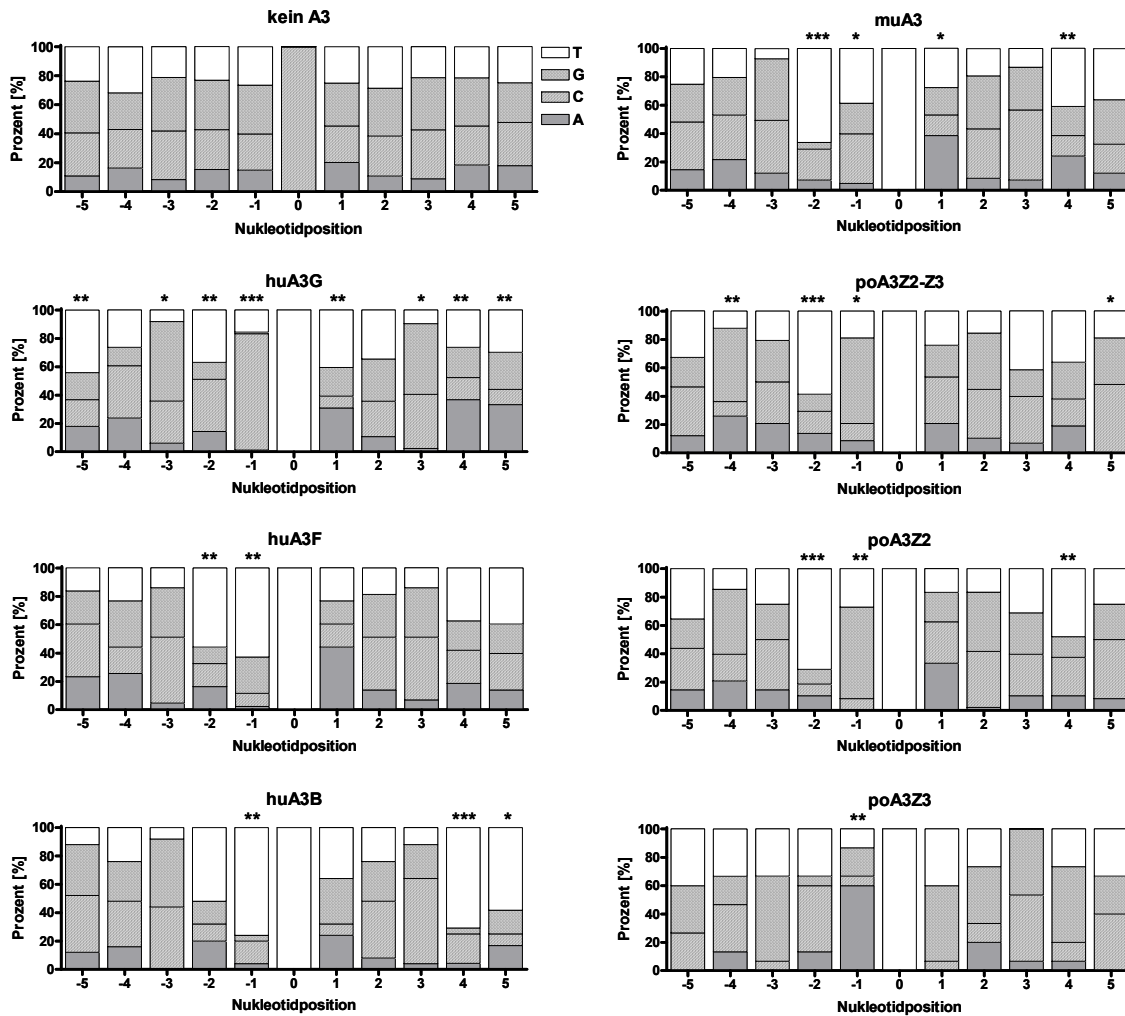


Abb. 55 Nukleotidpräferenz der untersuchten A3-Proteine. Gezeigt ist die Verteilung der Nukleotide an jeder Stelle (+5/-5 Basen) um eine Mutationsstelle (C-zu-T) auf dem proviralen (-)-DNA-Strang von PERV-B. Die Nummerierung beginnt an der deaminierten Stelle. Unterschiede zwischen den Verteilungen innerhalb der durch A3 mutierten EGFP-Sequenzen im Vergleich zu der unmutierten EGFP-Sequenz wurden mittels Chi-Quadrat-Test (adjustiert nach Bonferroni-Holm) bewertet (Signifikanzlevel α : * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.0001$). Die Unterteilungen innerhalb einer Säule geben den prozentualen Anteil der Nukleotide T (weiß), G (gepunktet), C (schraffiert) und A (grau) an (Die statistische Auswertung erfolgte durch Kay-Martin Hanschmann und ist Bestandteil der Publikation Dörrschuck *et al.* (Dörrschuck *et al.*, 2011)).

Abb. 55 gibt eine Übersicht, welche benachbarten Nukleotide durch die A3-Proteine favorisiert werden, wodurch die Wahrscheinlichkeit, dass ein entsprechendes C-Nukleotid innerhalb des (-)-DNA-Stranges der proviralen PERV-Sequenz in einem solchen Kontext mutiert wird, stark erhöht ist.

Die Daten wurden nochmals analysiert, wobei der Fokus auf einer möglichen Trinukleotidpräferenz der jeweiligen untersuchten A3-Proteine lag. Anhand der relativen Mutationshäufigkeit wurden abschließend die vorkommenden Trinukleotide graphisch dargestellt, angefangen vom meist favorisierten zum weniger favorisierten Trinukleotid (Abb. 56).

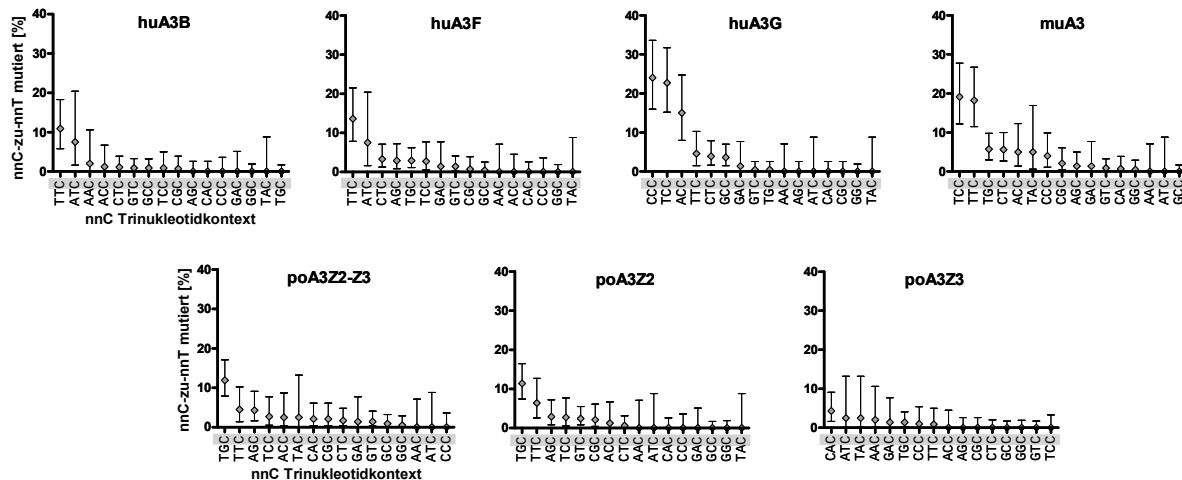


Abb. 56 Trinukleotidpräferenzen der untersuchten A3-Proteine. Für jedes getestete und deaminierungsaktive A3-Protein wurde jede aufgetretene C-zu-T-Mutation innerhalb der 10 sequenzierten Klone in einem nnC-zu-nnT-Kontext betrachtet und die relativen prozentualen Häufigkeiten der Mutationsarten graphisch dargestellt, angefangen bei der höchsten hin zu der weniger favorisierten Trinukleotidpräferenz. Die Fehlerbalken repräsentieren 95 % Konfidenzintervalle, die auf einer binomialen Verteilung basieren (exakte Clopper-Pearson-Konfidenzintervalle) (n = beliebiges Nukleotid) (Die statistische Auswertung erfolgte durch Kay-Martin Hanschmann und ist Bestandteil der Publikation Dörrschuck *et al.* (Dörrschuck *et al.*, 2011)).

Durch die beiden graphischen Darstellungen (Abb. 55 und Abb. 56) ließ sich erkennen, dass jede Cytosin-Deaminase eine oder sogar zwei Trinukleotidkontexte erkennt und modifiziert. Im Falle von huA3G wurden 5'T/CC₂ favorisiert, wohingegen muA3 5'TT/CC₂ bevorzugt. Für huA3F und huA3B wurde eine Trinukleotidpräferenz für 5'T/ATC₂ demonstriert. Damit entsprechen die mit diesem Test ermittelten Daten bereits publizierten (Armitage *et al.*, 2008; Jern *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2004a; Yu *et al.*, 2004b). Für die porzinen A3-Proteine (poA3Z2-Z3 und poA3Z2) wurde eine eindeutige Trinukleotidpräferenz für 5'TGC₂ (und in geringerem Maße 5'TTC₂ für poA3Z2) erhalten. Im Gegensatz dazu scheint poA3Z3 eine Präferenz für das Trinukleotid 5'CA₂ zu besitzen und unterscheidet sich somit von allen anderen getesteten Cytosin-Deaminasen. Während die Trinukleotidpräferenz 5'TGC₂ für poA3Z2-Z3 bereits identifiziert werden konnte (Jonsson *et al.*, 2006), sind die Daten für poA3Z2 und poA3Z3 bisher einzigartig.

Die für huA3B und poA3Z3 eindeutig aufgezeigte Trinukleotidpräferenz (Abb. 56) war zuvor (Abb. 55) aufgrund eines fehlenden Signifikanzlevels nicht erkennbar. Dies ist auf die geringe Datenmenge für die beiden A3-Proteine zurückzuführen, denn diese Cytosin-Deaminasen besaßen die geringste Mutationsrate im Vergleich zu den anderen mitgeführten A3-Proteinen.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass die A3-Proteine die Cytosine innerhalb einer proviralen Sequenz nicht zufällig mutieren, sondern zumindest eine Trinukleotidpräferenz innerhalb der viralen Genome favorisieren, wobei sich diese Präferenzen innerhalb der A3-Proteine unterscheiden.

4 Diskussion

Im Zuge einer Xenotransplantation (XTx) stellen nicht nur die immunologischen Barrieren und die damit verbundenen Abstoßungsreaktionen ein Problem dar. Auch die potentielle Übertragung porziner Erreger auf den Menschen und dadurch bedingt die mögliche Entwicklung einer Zoonose sind ein ernstzunehmendes Risiko. Im Fokus der Risikoabschätzung steht – letzteren Punkt betreffend – vor allem die mögliche Transmission porziner endogener Retroviren (PERV) auf den Menschen. Da diese Retroviren im Schweinengenom als Proviren integriert vorliegen und ebenfalls in den Keimzellen zu finden sind, sind diese potentiellen Erreger allein durch Züchtung nicht aus den Schweinen zu entfernen. Das Risiko einer Zoonose ist insofern gegeben, seit gezeigt werden konnte, dass PERV zumindest *in vitro* in der Lage sind, humane Zelllinien zu infizieren (Akiyoshi et al., 1998; Le Tissier et al., 1997; Patience et al., 1997; Wilson et al., 1998). Daher ist eine intensive Risikoabschätzung im Vorfeld einer praktischen Anwendung der XTx notwendig. Ein Aspekt, um dieses Risiko besser abschätzen zu können, stellt die Beantwortung der Frage dar, ob innerhalb einer menschlichen oder porzinen Zelle natürliche Mechanismen existieren, welche in der Lage sind, eine retrovirale Infektion zu inhibieren. Bei diesem Projekt war die Konzentration auf die APOBEC3 (A3)-Familie gerichtet, deren Mitglieder Teil der intrinsischen Immunität sind und für die bereits eine restriktive Funktion gegen Retroviren nachgewiesen werden konnte (Chiu and Greene, 2008). Daher sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht werden, ob humane und porcine A3-Proteine antiretrovirale Eigenschaften gegen PERV aufweisen und auf welchem Mechanismus die entsprechende Restriktion beruht. Der erste Schritt bestand in der Identifikation porziner A3-Transkripte, deren Existenz durch Expressionsstudien und Abgleich mit der Exon-Intron-Struktur des porzinen, chromosomalen A3-Genlokus untermauert wurde, wobei dafür ebenso der *poA3*-Genlokus charakterisiert wurde. Zur Analyse der antiretroviralen Aktivität der porcinen und humanen A3-Proteine wurden HEK-293T-Zellen mit Hilfe eines Drei-Plasmid-Systems transfiziert. Hierfür wurde die Sequenz des replikationskompetenten PERV-B(33) so modifiziert, dass ein Großteil des *env*-Gens durch eine CMV-EGFP-Indikatorkassette ausgetauscht wurde, um über eine Reduktion der Fluoreszenz Rückschlüsse auf die Aktivität der A3-Proteine gegen PERV ziehen zu können. Aufgrund der *env*-Deletion wurde die Bildung viraler Partikel über

Pseudotypisierung mit VSV-G gewährleistet, wobei die Virionen in An- bzw. Abwesenheit der A3-Proteine produziert wurden. Die Aktivität der A3-Proteine wurde nicht nur mit Hilfe eines transienten Systems über eine kurze Zeit hinweg untersucht. Es wurden zusätzlich Studien zur Konzentrationsabhängigkeit der A3-Proteine sowie zu deren restriktiver Kapazität gegenüber PERV über einen längeren Zeitraum hin durchgeführt. Schlussendlich wurde analysiert, ob der antiretrovirale Mechanismus auf Deaminierung der proviralen Sequenz beruht und ob diese Deaminierung in einem bestimmten Nukleotidkontext erfolgt.

4.1 Identifikation des porcinen A3-Genlokus und der poA3-mRNAs

Im Zuge dieser Doktorarbeit wurden der chromosomale A3-Genlokus und die dazugehörigen mRNAs im Schwein untersucht. Zum größten Teil stimmen die hier erlangten Daten mit denen früherer, publizierter Resultate überein (Jonsson et al., 2006; Larue et al., 2008). So konnte bestätigt werden, dass der Genlokus aus zwei Genen (A3Z2 und A3Z3) besteht, wodurch nicht nur die beiden gleichnamigen Transkripte kodiert werden. Vielmehr beinhalten die beiden Gene auch die genetische Information für die mRNA A3Z2-Z3, welche mittels Durchlesetranskription gebildet wird und für ein Doppeldomänenprotein kodiert (Jonsson et al., 2006). Andere, hier dargestellte Ergebnisse weichen jedoch von den veröffentlichten Daten in mehreren Punkten ab.

So konnte zum Einen ein zweites Durchlesetranskript – A3Z2-Z3 SVA – identifiziert werden, welches sich aus den Exons 1-2 von A3Z2 sowie den Exons 3-5 von A3Z3 zusammensetzt und dessen Expression bisher nur in porcinen PBMCs nachgewiesen werden konnte. Somit kodieren zwei Gene mit Hilfe der Durchlesetranskription für mindestens vier verschiedene A3-Proteine, wodurch die Ausstattung einer Zelle an A3-Proteinen um ein Vielfaches erhöht werden kann. Während es beim Menschen auf chromosomaler Ebene mit Hilfe von Rekombinationsereignissen zu einer Multiplikation auf sieben Gene und sieben Proteine (A3A-A3H) kam, werden bei der Maus über alternatives Spleißen zwei Transkripte (muA3 und muA3 Δ 5) durch ein Gen kodiert (Browne and Littman, 2008;

Jarmuz et al., 2002; Larue et al., 2008; Mariani et al., 2003; Okeoma et al., 2009). Neben diesen neuen Resultaten gibt es zum Zweiten konträre Ergebnisse bezüglich der Exonzusammensetzung der A3Z2-mRNA. Durch Abgleich der Gensequenz mit der mRNA-Sequenz konnte kein Intron zwischen den zuvor determinierten Exons 5 und 6 (Larue et al., 2008) identifiziert werden, weshalb das durch diese Experimente gefundene A3Z2-Gen und das dazugehörige mRNA-Transkript aus fünf anstelle von sechs Exons besteht (Kapitel 3.3.2).

Zur Festlegung der chromosomalen Lokalisation sowie zur Erstellung eines phylogenetischen Stammbaumes wurde aus experimentellen Gründen das Vorgehen auf das A3Z3-Gen ausgerichtet. Die Analysen ergaben, dass dieses Gen einmalig im Schweinengenom als einzelner Genlokus auf dem kurzen Arm von SSC5 (SSC5p) vorkommt. Die Richtigkeit dieser Resultate kann dadurch untermauert werden, dass der A3-Lokus bei den bisher untersuchten Mammalia ebenfalls nur einmal vorkommt (Jarmuz et al., 2002; Larue et al., 2008; Münk et al., 2008) und dass es sich bei SSC5 um einen syntenen Bereich des langen Arms des humanen Chromosoms 22 (HSA22q) handelt (Rink et al., 2002).

Eine phylogenetische Untersuchung des A3Z3-Gens ergab, dass die evolutionäre Entwicklung des Gens der Phylogenie der Tiere entspricht (Kapitel 5.2) (Bininda-Emonds et al., 2007; Murphy et al., 2001; Murphy et al., 2004; Murphy et al., 2007). Des Weiteren konnten für das A3Z3-Gen zwei Allele identifiziert werden, wobei die Sequenzunterschiede auf Polymorphismen innerhalb der nichtkodierenden Bereiche beruhen. Die Erstellung eines phylogenetischen Stammbaumes für A3Z2 schlug dahingehend fehl, dass für die Spezies Kamel und Pekari kein PCR-Produkt erhalten wurde. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die Primer wegen der unterschiedlichen Evolution der beiden Arten und dadurch hervorgerufener, fehlender Sequenzhomologien nicht an die entsprechenden Genbereiche binden konnten. Pekaries verfügen jedoch über die Cytosin-Deaminase A3Z2, denn bei LaRue und Mitarbeitern war diese Gattung im dargestellten Stammbaum zur phylogenetischen Entwicklung der Zink-kordinierenden Domänen Z1, Z2 und Z3 integriert (Larue et al., 2008).

4.2 Die porzinen A3-Transkripte und deren Expression

Beim Vergleich der durch diese Experimente erhaltenen UTR-Sequenzen der porzinen mRNAs mit den von LaRue und Mitarbeitern publizierten Daten (Larue et al., 2008) waren ebenso Abweichungen erkennbar. So konnte durch die Untersuchung der Transkriptionsstartpunkte festgestellt werden, dass einige identifizierte 5'UTR-Sequenzen länger waren als die zuvor postulierten (Larue et al., 2008), wodurch Exon 1 von A3Z2 und A3Z3 anhand der neuen Daten entsprechend verlängert werden konnte (Kapitel 3.3.2). Analog zur huA3G-mRNA konnte innerhalb der Promotorregionen der porzinen Transkripte weder eine TATA-Box noch eine CCAAT-Box gefunden werden (Jarmuz et al., 2002; Muckenfuss et al., 2007). Dabei ist die Abwesenheit dieser Promotorelemente oftmals mit multiplen Transkriptionsstartpunkten assoziiert (Azizkhan et al., 1993; Gross and Oelgeschlager, 2006; Jarmuz et al., 2002; Muckenfuss et al., 2007; Swick et al., 1989). Dementsprechend konnten anhand dieser Studien im Einklang zu LaRue und Mitarbeitern (Larue et al., 2008) ebenso kleinere 5'UTR-Sequenzen detektiert werden. Somit wurde gefolgert, dass die beiden porzinen A3-Gene wie bei huA3G bereits beobachtet (Jarmuz et al., 2002; Muckenfuss et al., 2007) zahlreiche Transkriptionsstartpunkte besitzen.

Eine Bekräftigung der Daten, dass es sich um zwei unabhängige Gene handelt, erfolgte durch LaRue und Mitarbeiter (Larue et al., 2008). Durch Sequenzanalysen wurde innerhalb der Promotorregionen jeweils etwa 230 bp vom Startkodon für A3Z2 sowie A3Z3 entfernt ein putatives *interferon stimulated response element* (ISRE) nachgewiesen, welche beide eine starke Homologie zu den ISRE-Sequenzen von huA3D, huA3F und huA3G aufwiesen (Larue et al., 2008). Es konnte im Besonderen für huA3G gezeigt werden, dass die Transkriptionsrate durch Interferon alpha (IFN- α) in Hepatozyten und Makrophagen hoch reguliert wurde (Bonvin et al., 2006; Peng et al., 2006; Tanaka et al., 2006). Auch für huA3B und huA3F konnten mittels IFN- α Stimulation leichte Erhöhungen im Expressionslevel nachgewiesen werden, allerdings blieben diese weit hinter der für huA3G ermittelten Erhöhung zurück (Bonvin et al., 2006). Muckenfuss et al. konnten die Interferon bedingte Erhöhung der Transkriptionsrate von huA3G in Hepatozyten bestätigen, allerdings konnte unter gleichen Bedingungen in T-Zellen keine Erhöhung der basalen Transkriptionsrate des huA3G durch mitogene oder IFN- α Stimulation festgestellt werden (Muckenfuss

et al., 2007). Im Zuge dieser Studien gelang es weiterhin, innerhalb der Promotorregion eine GC-Box zu identifizieren, welche als Bindestelle für die *specificity protein* (Sp) Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 fungiert und essentiell für die basale Aktivität des huA3G-Promotors ist (Muckenfuss et al., 2007). Inwieweit die endogene Expression der porcinen A3-Transkripte reguliert werden kann und ob eine Stimulation mit IFN- α eine Erhöhung der basalen Transkriptionsrate induzieren würde, ist bisher noch ungeklärt und daher ein guter Ansatzpunkt für Promotorstudien. Denn anhand der bisher publizierten Daten scheint die durch IFN- α bedingte Stimulation des Promotors für huA3G vom Zelltyp und vom Aktivierungsstatus der Zellen abhängig zu sein (Bonvin et al., 2006; Chen et al., 2006; Muckenfuss et al., 2007; Peng et al., 2006; Tanaka et al., 2006).

Eine umfassende Studie von Refsland *et al.* (Refsland et al., 2010) hinsichtlich der Expression aller humaner A3-Gene in zahlreichen Geweben ergab, dass vor allem in PBMCs – mit Ausnahme des huA3B – hohe Expressionsraten nachgewiesen werden konnten, wobei durch mitogene oder auch IFN- α Stimulation die intrazellulären mRNA-Konzentrationen nochmals erhöht werden konnten. Die Analyse hinsichtlich der A3-Expression in humanen Geweben zeigte, dass hohe A3-Transkriptionsraten bei lymphoiden Organen wie Thymus und Milz detektiert werden konnten, während immunprivilegierte Organe wie Gehirn und Hoden keine A3-Expression aufwiesen (Refsland et al., 2010). Lunge und Niere zeigten eine eher schwache bis mediane A3-Expression, während das Herz eine relativ hohe A3-Expression besaß (Refsland et al., 2010).

Expressionsstudien für die porcinen Transkripte A3Z2, A3Z3, A3Z2-Z3 und A3Z2-Z3 SVA (Dörrschuck et al., 2011) zeigten ähnliche Resultate wie die von Refsland und Mitarbeitern publizierten Daten (Refsland et al., 2010). Bei den hier mitgeführten porcinen Geweben (Herz, Lunge, Niere, Milz, Eierstock, Leber und PBMCs) wiesen alle porcinen Transkripte eine mehr oder weniger starke Expression auf, die einer Rate von etwa 0.5-4 % im Vergleich zu β -Aktin als mitgeführte Expressionskontrolle entsprach. Dabei zeigten sich vergleichsweise hohe Expressionen von A3Z2, A3Z3 und A3Z2-Z3 in Milz, Herz und PBMCs. Die Expressionsraten für A3Z2-Z3 SVA hingegen sind bei allen untersuchten Geweben sehr gering, wobei für die PBMCs die höchste Transkriptionsrate von 0.01 % detektiert werden konnte. Somit scheint es

sich bei der Expression der Spleißvariante um ein sehr seltenes Ereignis zu handeln. Aber anhand der spezifischen Primer ist es zumindest gelungen, die Existenz dieses Transkriptes zu bestätigen und somit die erlangten Daten im Zuge der Identifikation porziner A3-mRNAs zu untermauern (Kapitel 3.2.1). Von den für die XTX in Frage kommenden porzinen Organe zeigten, wie bei Refsland und Mitarbeitern für die humanen A3-mRNAs ebenso festgestellt (Refsland et al., 2010), Lunge und Niere eine eher schwache bis mediane A3-Expression, während das Herz eine relativ hohe A3-Expression besaß (Dörrschuck et al., 2011).

Inwiefern die porzine A3-Expression mit der exprimierten Proteinmenge korreliert, ist bisher noch nicht untersucht worden. Refsland *et al.* postulierten, dass bei den humanen A3-Vertretern eine direkte Relation zwischen der mRNA- und der daraus resultierenden Proteinkonzentration besteht (Refsland et al., 2010), wobei die Aussage auf Western Blot-Ergebnissen für huA3F und huA3G in der nicht permissiven Zelllinie CEM-SS und primären CD4⁺ T-Lymphozyten beruht. Ob diese Korrelation für alle A3-Proteine gilt, ist fraglich, da von einem hohen mRNA-Level nicht automatisch auf einen hohen Proteinlevel geschlossen werden kann, da auch die Halbwertszeit der Proteine eine wichtige Rolle spielt. So konnten beispielsweise OhAinle *et al.* für huA3H zeigen, dass diese Cytosin-Deaminase eine geringe Stabilität aufgrund eines schnellen proteasomalen Abbaus aufweist (OhAinle et al., 2006). Es kann also lediglich bei Annahme einer gleichen Transkriptionsrate, verbunden mit einer ähnlichen Halbwertszeit der Enzyme davon ausgegangen werden, dass die Vergleichbarkeit hinsichtlich der mRNA- und Proteinkonzentration bei den poA3s zutrifft.

Inwieweit die endogene Expression der humanen und porzinen A3-Proteine wiederum ausreicht, um einer PERV-Infektion *in vivo* effektiv entgegen wirken zu können, und inwiefern eine Immunsuppression Auswirkungen auf die A3-Aktivität haben könnte, bleibt spekulativ. Des Weiteren ist es fraglich, ob eine schwache, endogene A3-Expression nicht sogar eine positive Selektion für die retrovirale PERV-Infektion bedeuten könnte. So konnte für HIV-1 gezeigt werden, dass durch eine geringe Aktivität der Cytosin-Deaminasen nicht-letale Mutationen in das retrovirale Genom eingefügt werden können und somit nicht nur die Sequenzvariation erhöht wurde, sondern das Virus sogar eine Resistenz gegen antivirale Medikamente

entwickeln konnte (Jern et al., 2009; Mulder et al., 2008). Somit bedarf es hinsichtlich einer Risikoabschätzung im Zuge der XTx weiterer Untersuchungen, um letztlich eine Aussage treffen zu können, in welchen Geweben die porzinen A3s nicht nur auf mRNA-, sondern auch auf Proteinebene exprimiert werden. Weiterhin bedarf es einer Analyse, ob diese endogene Proteinexpression ausreicht, um effektiv eine PERV-Replikation *in vivo* zu inhibieren und ob der endogene A3-Gehalt durch Immunsuppressiva reduziert wird, wodurch das Virus aufgrund einer reduzierten G-zu-A-Mutationsrate im Sinne einer Sequenzvariation eventuell sogar Vorteile hätte.

4.3 Verpackung der porzinen und humanen A3-Proteine in PERV-Partikel

Es ist bekannt, dass Viren im Zuge ihrer Evolution Mechanismen entwickelt haben, um dem destruktiven Einfluss der wirtseigenen Cytosin-Deaminasen zu entgehen. So bedient sich beispielsweise HIV-1 seines akzessorischen Proteins Vif, um eine Hypermutation seines retroviralen Genoms zu verhindern. Dabei bindet Vif an huA3G und induziert den proteasomalen Abbau der Cytosin-Deaminase (Marin et al., 2003; Sheehy et al., 2003; Stopak et al., 2003; Yu et al., 2003). Aber auch einfache Viren wie das γ -Retrovirus MLV, welches über keine akzessorischen Proteine verfügt, entwickelten einen Mechanismus, um sich vor dem wirtseigenen A3 zu schützen. Bisher ist noch ungeklärt, wie sich MLV der antiviralen Aktivität des muA3 entziehen kann. Es gibt dazu verschiedene Modelle, die derzeit diskutiert werden. Eines besagt, dass muA3 aus den reifenden MLV-Virionen ausgeschlossen und somit die Verpackung verhindert wird (Doehle et al., 2005). Ein anderes Modell wiederum stützt sich darauf, dass muA3 nach der Inkorporation in das Kapsid durch die retrovirale Protease degradiert wird (Abudu et al., 2006).

Studien zu der bisher am besten untersuchten Cytosin-Deaminase huA3G demonstrierten, dass das Enzym seine antiretrovirale Aktivität erst in der neu infizierten Zelle im Zuge der reversen Transkription ausübt. Dies setzt voraus, dass die A3-Proteine in die neu entstehenden Viruspartikel inkorporiert werden (Mariani et al., 2003; Stopak et al., 2003). Aus Experimenten zu huA3G ist bekannt, dass in der virusproduzierenden Zelle die A3-Proteine durch Interaktion mit der NC-Region des

Gag-Polypeptides in das Kapsid der neu entstehenden Viren verpackt werden (Alce and Popik, 2004; Cen et al., 2004; Luo et al., 2004). Laut Xu *et al.* werden etwa 7 ± 4 A3G-Moleküle in das Kapsid eines HIV-1 Δ vif-Partikels inkorporiert, wobei diese Menge offenbar ausreicht, um in den neu infizierten Zellen während der reversen Transkription die Infektion zu inhibieren (Xu et al., 2007). Dabei ist der Schritt der Verpackung wahrscheinlich von der Anwesenheit der viralen RNA abhängig, wobei dieser Punkt kontrovers diskutiert wird (Browne and Littman, 2008; Burnett and Spearman, 2007; Khan et al., 2005; Schafer et al., 2004; Soros et al., 2007; Stauch et al., 2009; Svarovskaia et al., 2004; Zennou et al., 2004). Die Inkorporation scheint aktiv über eine innerhalb der Proteinsequenz vorhandene Verpackungsdomäne, welche mit der NC-Region interagiert, vonstatten zu gehen. Bei den humanen Doppeldomänen-A3s scheint diese in der N-terminalen Cytosin-Deaminase-Domäne (CDD1) zu liegen (Iwatani et al., 2006; Navarro et al., 2005; Newman et al., 2005), während diese bei muA3 und poA3Z2-Z3 höchstwahrscheinlich in der C-terminalen Cytosin-Deaminase-Domäne (CDD2) lokalisiert ist (Browne and Littman, 2008; Jonsson et al., 2006).

Im Zuge dieser Arbeit durchgeführte Verpackungsstudien für die porzinen A3-Proteine ergaben, dass trotz der gleichmäßigen, intrazellulären Expression der HA-getaggten A3s Unterschiede beim Grad der Verpackung detektiert werden konnten (Kapitel 3.4.1). Während wie erwartet das als Positivkontrolle mitgeführte huA3G sowie A3Z2-Z3 effizient verpackt wurden, zeigten sich immense Unterschiede bei der Verpackung der porzinen Eindomänenproteine. Während A3Z3 in annähernd gleicher Menge wie A3Z2-Z3 in die Viruspartikel inkorporiert wurde, zeigten A3Z2 nur sehr geringe und A3Z2-Z3 SVA keine Verpackung.

Hinsichtlich der guten Verpackung von A3Z3 und A3Z2-Z3 lässt sich folgern, dass PERV offensichtlich keinen Mechanismus entwickelt hat, um die Inkorporation zumindest dieser beiden porzinen Cytosin-Deaminasen aktiv zu umgehen. Aufgrund der sehr effektiven Verpackungsrate werden die Daten von Jonsson *et al.* bestätigt, dass bei A3Z2-Z3 das Verpackungssignal in CDD2 liegt (Jonsson et al., 2006), da A3Z3 eine genauso gute Verpackung wie das Doppeldomänenprotein zeigt. Im Gegensatz zu A3Z3 und A3Z2-Z3 wiesen die Eindomänenproteine A3Z2 kaum und A3Z2-Z3 SVA keine nachweisbare Verpackung auf, wobei letzteres jedoch nicht bedeutet, dass nicht vielleicht doch eine Inkorporation in die PERV-Partikel

stattgefunden hat und dass diese eventuell unterhalb der Nachweisgrenze des Western Blots liegen könnte. Die beiden ineffizienten Verpackungen könnten zweierlei Gründe haben. Zum Einen wäre es möglich, dass PERV einen Mechanismus entwickelt hat, um die Inkorporation der Enzyme in das Viruskapsid deutlich zu reduzieren bzw. zu unterbinden. Zum Anderen wäre es aber auch möglich, dass beide A3-Proteine über ein ineffizientes (im Falle von A3Z2) oder über kein Verpackungssignal (im Falle von A3Z2-Z3 SVA) verfügen.

Besonders interessant ist der Vergleich der erhaltenen Daten zur Verpackung von A3Z2-Z3, A3Z3 und A3Z2-Z3 SVA. Allen drei Konstrukten gemein sind die Exons 3-5 des Gens A3Z3, während sie sich in der Exon-Zusammensetzung im 5'-Bereich voneinander unterscheiden (Kapitel 3.3.2). Würde das Verpackungssignal in diesem homologen Exonbereich liegen, müssten alle drei Konstrukte in gleichem Maße in die PERV-Virionen inkorporiert werden. Diese Annahme setzt voraus, dass die geänderte Exon-Zusammensetzung von A3Z2-Z3 SVA nicht zu einer derart veränderten Proteinstruktur führt, dass die Verpackungsdomäne maskiert und somit die Interaktion mit der NC-Domäne sterisch behindert wäre. A3Z3 und A3Z2-Z3 verfügen im Gegensatz zu A3Z2-Z3 SVA über das Exon 2 von A3Z3. Somit wäre es möglich, dass die Verpackungsdomäne von diesem Genbereich kodiert wird.

Weiterhin sollte erwähnt werden, dass die A3-Proteine nicht nur als Monomere verpackt werden können, sondern auch als (Hetero-) Dimere oder gar als Multimere (Bulliard et al., 2009; Khan et al., 2009; Opi et al., 2006; Stauch et al., 2009). Stauch et al. konnten zeigen, dass beispielsweise die antiretrovirale Aktivität von huA3C eine Dimerisierung voraussetzt (Stauch et al., 2009). Das Protein ist jedoch nicht mehr antiretroviral aktiv, wenn es als Monomer in die Virionen verpackt wird, während diese Eigenschaft bei huA3G nicht zutrifft (Opi et al., 2006; Stauch et al., 2009). Des Weiteren wurde festgestellt, dass huA3G in unterschiedlichen, physiologischen Zuständen im Cytoplasma vorliegen kann: entweder in einem enzymatisch inaktiven *high molecular mass* (HMM) Ribonukleoprotein-Komplex oder in einem enzymatisch aktiven *low molecular mass* (LMM) Komplex, wobei die Zelle wahrscheinlich mit Hilfe von Zytokinen und Mitogenen zwischen diesen beiden Zuständen regulieren kann (Chiu et al., 2005).

Um letztendlich den Grund für die unterschiedlichen Verpackungseffizienzen der poA3s zu finden, bedarf es weiterer Experimente. Dabei sollte nicht nur die Verpackungsdomäne lokalisiert werden, sondern auch von Interesse sein, ob die Inkorporation der poA3s in die PERV-Partikel RNA-abhängig ist und welche RNA dabei eine Rolle spielt. Die Studien sollten weiterhin dazu dienen, um die Fragen zu klären, ob die poA3s als Monomere oder Multimere verpackt werden und ob die Cytosin-Deaminasen ebenfalls als LMM und HMM in der Zelle vorliegen.

4.4 Antiretrovirale Aktivität der porzinen und humanen A3-Proteine gegen PERV

Eine gute Verpackung bedeutet nicht zwangsläufig, dass die A3-Proteine auch antiretrovirale Aktivität gegen das Virus aufzeigen. So wurde für MLV bewiesen, dass selbst nach Inkorporation des muA3 in die retroviralen Partikel keine Deaminase-Aktivität nachgewiesen werden konnte, wobei der Grund dafür noch unbekannt ist (Browne and Littman, 2008). Somit bestand der nächste Schritt darin, die Aktivität der porzinen und humanen A3s gegen PERV zu untersuchen.

Nahezu alle humanen A3-Proteine waren in der Lage, die PERV-Infektiosität signifikant zu reduzieren (Kapitel 3.4.2.2). Aber auch die porzinen A3-Proteine mit Ausnahme von A3Z2-Z3 SVA konnten die PERV-Replikation signifikant inhibieren und dies bereits bei geringen Konzentrationen. Ähnliche Resultate konnten bei der mitgeführten MLV-Kontrolle gewonnen werden (Kapitel 3.4.2.2). Das neu identifizierte Transkript A3Z2-Z3 SVA zeigte bei Überexpression nur eine schwache Aktivität gegen PERV und MLV und keine nachweisbare Verpackung in die PERV-Virionen (Kapitel 3.4.1). Fraglich ist, ob die geringe Aktivität darauf beruht, dass die Spleißvariante nicht in die viralen Partikel verpackt wird, oder ob A3Z2-Z3 SVA an sich keinen Tropismus für die beiden γ -Retroviren besitzt. Da dieses A3-Protein jedoch spezifisch in porzinen PBMCs exprimiert wird (Kapitel 3.2.1 und 4.2), wird es wahrscheinlich eine andere physiologische Aufgaben erfüllen. Daher bedarf dieses Konstrukt weiterer Untersuchungen, um die Frage zu klären, ob diese Spleißvariante eine andere Funktion besitzt als die Restriktion der beiden untersuchten Retroviren.

Wie bereits erwähnt zeigten die porzinen Proteine A3Z2, A3Z3 und A3Z2-Z3 im Gegensatz zu A3Z2-Z3 SVA eine konzentrationsabhängige, effektive Reduktion der retroviralen Infektiosität während einer transienten Infektionsstudie, und zumindest A3Z2 und A3Z2-Z3 blockierten die PERV-Replikation über einen längeren Zeitraum, wie die Replikationsstudie über 30 Tage ergab (Kapitel 3.4.2.2). Konträr dazu fallen die Ergebnisse für A3Z3 aus, welches wie huA3F keinen Langzeit-Inhibitor für PERV darstellt, obwohl bei der transienten Infektionsstudie für beide Cytosin-Deaminasen eine signifikante, antiretrovirale Aktivität detektierbar war (Kapitel 3.4.2.2). Kürzlich wurde das gleiche Phänomen für stabil in HeLa-Zellen exprimiertes huA3F beobachtet, denn auch hier wies das A3-Protein ebenfalls keinen inhibitorischen Effekt gegen HIV-1 Δ vif auf (Miyagi et al., 2010). Trotz der offensichtlich fehlenden, antiviralen Aktivität konnten Miyagi und Mitarbeiter in den proviralen Sequenzen eine schwache G-zu-A-Mutationsrate detektieren, welche für huA3F typischerweise in einem GA-Kontext erfolgte, wobei die Mutationsrate jedoch im subletalen Bereich zu liegen schien (Armitage et al., 2008; Miyagi et al., 2010). Bei den beiden A3-Proteinen poA3Z3 und huA3F scheint zuzutreffen, dass ihre antiretrovirale Aktivität stark konzentrationsabhängig ist. Die transiente Proteinexpression ist um ein Vielfaches höher als die Expression in stabilen Zelllinien, bei denen sich im Laufe der Zeit ein Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese und -degradation einstellt, welches von der Zelle toleriert wird (Miyagi et al., 2007; Miyagi et al., 2010). Anhand der im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Western Blots konnte ebenfalls festgestellt werden, dass eine durch transiente Transfektion erhaltene A3-Proteinexpression stärker war als die auf einer stabilen Transfektion beruhende A3-Proteinexpression (Kapitel 3.4.2.2).

Die Resultate hinsichtlich der Langzeit-Aktivität von A3Z2-Z3 stehen wiederum im Gegensatz zu einer zuvor erstellten Studie von Jonsson und Mitarbeitern (Jonsson et al., 2007), welche beschreibt, dass PERV resistent gegen dieses wirtseigene Protein ist. Möglicherweise ist der Grund für diese konträren Ergebnisse in Abweichungen hinsichtlich der experimentellen Durchführung zu finden. Während im Zuge dieser Arbeit humane HEK-293T-Zellen stabil porzine und humane A3-Proteine exprimierten, analysierten Jonsson et al. die PERV-Replikation in porzinen PK15-Zellen, welche endogene Konzentrationen des porzinen A3Z2-Z3 exprimieren (Jonsson et al., 2007). Es ist möglich, dass die geringe Expressionsrate des

endogenen A3 oder auch die durch Sequenzvergleich detektierten Sequenzvariationen des in PK15 exprimierten A3Z2-Z3 (Jonsson et al., 2007) die detektierte PERV-Replikation in PK15-Zellen erklären könnten.

4.5 Deaminase-abhängige Funktion und Nukleotidpräferenz der A3-Proteine

Schlussendlich wurde die Deaminierungsrate der antiretroviral fungierenden A3-Proteine (huA3B, -F, -G, muA3, poA3Z2, -Z3, -Z2-Z3 und -Z2-Z3 SVA) untersucht mit dem Ergebnis, dass erwartungsgemäß alle analysierten A3s bis auf A3Z2-Z3 SVA eine mehr oder weniger stark ausgeprägte G-zu-A-Mutationsrate innerhalb der proviralen PERV-Sequenz induzierten (Kapitel 3.4.3). Dabei erfolgte die Deaminierung nicht zufällig, sondern in bestimmten, von jedem A3-Protein präferierten Sequenzkontext (Kapitel 3.4.4), wobei die erhaltenen Daten für huA3G (5'T/CCC), muA3 (5'TT/CC), huA3F (5'T/ATC), huA3B (5'T/ATC) und poA3Z2-Z3 (5'TGC) der Literatur entsprachen (Armitage et al., 2008; Jern et al., 2007; Jonsson et al., 2006; Yu et al., 2004a; Yu et al., 2004b). Erstmalig neu gezeigt sind die Nukleotidpräferenzen für poA3Z2 (5'TG/TC) und poA3Z3 (5'CAC), wobei sich letzteres A3-Protein hinsichtlich der Präferenz völlig konträr zu den restlichen untersuchten Cytosin-Deaminasen verhält. In diesem Zusammenhang ist der Vergleich der porzinen A3-Proteine A3Z2, A3Z3 und A3Z2-Z3 hinsichtlich ihrer jeweiligen Trinukleotidpräferenz interessant. A3Z2-Z3 bevorzugt die gleichen Deaminierungsstellen wie A3Z2, während keine Übereinstimmungen zu der Präferenz von A3Z3 gefunden werden konnte. Somit lässt sich folgern, dass innerhalb des Doppeldomänenproteins die N-terminale Zink-koordinierende Domäne (CDD1) für die Deaminierungsaktivität zuständig ist, was mit der Aussage von Jonsson und Mitarbeitern übereinstimmt (Jonsson et al., 2006), wobei deren Erkenntnis auf Versuchen mit Mutanten des porzinen A3Z2-Z3 beruht, bei denen durch Sequenzveränderungen innerhalb der CDD1 und CDD2 ein Funktionsverlust des aktiven Zentrums induziert wurde.

Aufgrund der erhaltenen Daten hinsichtlich des Deaminierungsmusters für die porzinen A3-Proteine wäre eine Sequenzanalyse der im Schweinengenom integrierten PERV-Sequenzen interessant, um zu kontrollieren, inwieweit die porzinen A3-Proteine *in vivo* einen Effekt hinsichtlich einer Etablierung der endogenen Retroviren im Wirtsgenom hatten und ob sie nach wie vor zu einer Inhibition der PERV-Replikation im Schwein beitragen könnten. Bisher liegen noch keine Informationen hinsichtlich der An- oder Abwesenheit von G-zu-A-Hypermutationen in endogenen PERV-Sequenzen vor, wobei diese Untersuchung nach Abschluss der Schweinengenom-Sequenzierung erfolgen könnte. Bei Proviren der humanen endogenen Retroviren (HERV) sowie der endogenen MLVs bei Mäusen wurden bereits untersucht, ob sie Anzeichen einer Cytosin-Deaminierung besitzen, die auf eine A3-Aktivität zurückführbar wären. Jern und Mitarbeiter fanden heraus, dass in den beiden endogenen polytropen und modifizierten polytropen MLV-Subgruppen, jedoch nicht bei den xenotropen Subgruppen, hohe G-zu-A Mutationsraten im proviralen Genom vorliegen (Jern et al., 2007). Da diese im Nukleotidkontext 5'TTC auftraten, konnten die Mutationen eindeutig der Aktivität der wirtseigenen A3-Proteine zugeordnet werden (Jern et al., 2007). Ebenso ist es gelungen, bei zwei Varianten der HERV-K (HML2)-Familie eine A3-bedingte Hypermutation des proviralen Genoms festzustellen (Armitage et al., 2008; Lee et al., 2008). Aufgrund dieser Resultate liegt die Überlegung nahe, dass es durch die A3-bedingte Deaminierung zu einem Funktionsverlust und somit zu einer Endogenisierung der retroviralen Sequenzen im Genom der jeweiligen Wirtsspezies kam, wobei nicht außer Acht gelassen werden sollte, dass sehr wahrscheinlich noch weitere Mechanismen existieren, welche zu einer Inaktivierung der Proviren führten.

Des Weiteren könnte eine weiterführende Untersuchung der Nukleotidpräferenzen in einem an die Mutationsstellen angrenzenden Sequenzbereich sowie mit einer größeren Datenmenge von Vorteil sein, um letztlich detaillierte Einblicke hinsichtlich einer möglichen Signifikanz aller benachbarter Nukleotide zu erhalten. Erste Hinweise geben die hier durchgeführten Studien zur Verteilung der Nukleotide 5 Basen *upstream* und 5 Basen *downstream* um die C-zu-T-Mutationstelle (Kapitel 3.4.4). Denn bei größeren Datenmengen war zu erkennen, dass nicht nur die Nukleotidpositionen -1 und -2 bei der Sequenzerkennung der A3-Proteine eine Rolle spielen, sondern auch die Nukleotidposition +4. Bei huA3G schien sogar der

komplette, untersuchte Sequenzkontext bei der Sequenzerkennung der Cytosin-Deaminase von Bedeutung zu sein (Kapitel 3.4.4). Nach diesen Resultaten zu urteilen, verfügen die A3-Proteine wahrscheinlich über einen weiter reichenden Sequenz-Erkennungsbereich als zuvor angenommen.

Trotz dieser Resultate bezüglich der Deaminase-abhängigen Restriktion von PERV durch die humanen und porzinen A3-Proteine sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass diese Enzyme ebenfalls einen Deaminase-unabhängigen Mechanismus gegen das porzine γ -Retrovirus ausüben könnten. Für huA3G ist gezeigt worden, dass das Protein trotz einer Mutation in CDD2 und somit trotz Verlustes der Deaminierungsaktivität in der Lage ist, die Infektiosität von HIV-1 Δ vif zu reduzieren. Dabei scheint CDD1 des Doppeldomänenproteins für diesen nicht-enzymatischen Mechanismus die entscheidende Rolle zu spielen, welche möglicherweise mit einer sterischen Hemmung der Reversen Transkriptase zusammenhängt (Bishop et al., 2006; Guo et al., 2006; Newman et al., 2005). Andere mögliche Mechanismen könnten die Bildung aberranter viraler DNA-Enden während der reversen Transkription oder die Störung des Importes des Präintegrationskomplexes in den Zellkern sein (Luo et al., 2007; Mbisa et al., 2007). Kürzlich wurde publiziert, dass beispielsweise transient exprimiertes huA3F die virale DNA-Integration inhibiert (Mbisa et al., 2010). Daher wäre in Folge zukünftiger Untersuchungen interessant, die porzinen A3-Proteine – insbesondere A3Z3, welches experimentell betrachtet ähnliche Eigenschaften wie huA3F aufweist – hinsichtlich dieser putativen Deaminase-unabhängigen Funktion zu analysieren.

Im Zuge dieser Arbeit konnte weiterhin nach Transfektion der HEK-293T-Zellen mit den verschiedenen humanen und porzinen A3s bei der Virusernte festgestellt werden, dass bei manchen Proben (vor allem bei huA3B, huA3F und den poA3s) die RT-Aktivität im Überstand eine drastische Reduktion aufwies (Daten nicht gezeigt). Die erste Überlegung zu dieser Beobachtung war, dass die artifizielle Überexpression der A3s für die Zellen zytotoxisch sein könnte. Es konnte zwar beobachtet werden, dass die Zellkonfluenz im Vergleich zur Negativkontrolle zwei Tage nach transienter Transfektion prozentual geringer war, allerdings zeigte sich nur eine leichte Wachstumsverzögerung (Daten nicht gezeigt). Bei der durchgeführten stabilen Transfektion konnte nur für huA3G eine zytotoxische

Wirkung nachgewiesen werden, da es nicht möglich war, stabil huA3G-exprimierende HEK-293T-Zellen herzustellen. Alle anderen verwendeten A3s wiederum zeigten keinen derartigen Phänotyp. Die zweite Überlegung zur Erklärung dieser Beobachtungen wäre, dass diese A3s gegenüber PERV als *postentry block* wirken könnten. Möglich wäre ein Deaminase-unabhängiger Mechanismus, welcher sich störend auf die virale Replikation und die Bildung zahlreicher Nachkommenviren auswirken könnte. Experimenteller Ansatzpunkt für die Untersuchung dieser Hypothese wäre eine Studie mit den PERV produzierenden Zellen. Hier könnte die Quantität der viralen RNA im Cytoplasma in An- und Abwesenheit der A3s mittels qRT-PCR untersucht werden, um zu analysieren, ob die verminderte Virusproduktion auf einem putativen *postentry block* der A3s beruht. Die möglicherweise zytotoxische Wirkung durch die Überexpression der A3-Proteine ließe sich wiederum mit Hilfe eines Toxizitätstestes näher untersuchen.

4.6 Intrinsische Immunität, PERV und XTx

Aus den im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Studien zur Untersuchung der antiretroviralen Aktivität der A3-Proteine gegen PERV (Kapitel 4.4 und 4.5) konnten mehrere Erkenntnisse gewonnen werden: es konnte gezeigt werden, dass PERV nicht nur empfindlich gegenüber den spezieeigenen, porzinen A3s reagiert, sondern dass dieses γ -Retrovirus ebenfalls durch muA3 und einen Großteil der humanen A3-Proteine effektiv restringiert wird. Die Inhibition der PERV-Infektiosität durch die A3-Proteine beruht dabei auf Cytosin-Deaminierung, welche in präferierten Nukleotidkontexten erfolgt. Aufgrund dieser Resultate lassen sich einerseits Schlussfolgerungen zur PERV-Wirt-Interaktion ziehen, andererseits tragen die Erkenntnisse dazu bei, das Risiko einer zoonotischen PERV-Infektion besser abschätzen zu können.

Die Cytosin-Deaminasen des Menschen – zumindest huA3G und huA3B – könnten eine Barriere für eine mögliche PERV-Transmission nach XTx bilden. Die im Schwein exprimierten A3-Proteine wiederum – hier vor allen Dingen poA3Z2 und poA3Z2-Z3 – könnten ebenfalls zur Reduktion des Übertragungsrisikos sowie zur Senkung der Integration proviraler PERV-Sequenzen in das menschliche Genom beitragen. Es darf jedoch trotz der durch die Experimente erhaltenen, vielversprechenden

Resultate nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich bei den Studien um ein artifizielles *in vitro* System handelt mit einer durch Transfektion bedingten Überexpression der A3-Proteine. Wie bereits zuvor erwähnt können anhand der experimentellen Daten keine direkten Rückschlüsse auf die *in vivo* Situation erfolgen, da die endogene Proteinexpression meist schwächer ausfällt und die gewebespezifische Expression ebenfalls berücksichtigt werden muss. Bisher konnten allerdings auch *in vivo* keine PERV-Infektionen beobachtet werden, weder bei präklinischen Studien mit nicht-menschlichen Primaten (Elliott et al., 2000; Garkavenko et al., 2004; Martin et al., 2000b; Martin et al., 2002; Simon et al., 2003; Switzer et al., 2001; Winkler et al., 2005) noch bei Patienten, die bereits porcine Transplantate erhalten haben (Garkavenko et al., 2004; Goto et al., 2004; Heinene et al., 2001; Irgang et al., 2003; Paradis et al., 1999; Sauer et al., 2003; Tacke et al., 2001). Es scheinen somit natürliche Mechanismen zu existieren, um die Ausbreitung des retroviralen Erregers zu inhibieren, wobei in diesem Zusammenhang geklärt werden müsste, in welchem Maße die A3-Proteine an der Restriktion der retroviralen Infektiosität beteiligt sind.

Neben den A3-Proteinen existieren wie bereits in der Einleitung erwähnt (Kapitel 1.3.2) weitere Proteine, welche Bestandteil der intrinsischen Immunität sind und nachgewiesenermaßen eine Funktion gegen Retroviren aufweisen: TRIM5 α und Tetherin. Auch diese Proteine wurden hinsichtlich ihrer Aktivität gegen PERV untersucht. Wood und Mitarbeiter konnten feststellen, dass PERV resistent gegen verschiedene TRIM5 α -Proteine ist (Wood et al., 2009). Im Gegensatz dazu wurde festgestellt, dass humanes und porcines Tetherin in der Lage sind, die Freisetzung von PERV aus den virusproduzierenden Zellen zu unterbinden (Mattiuzzo et al., 2010). Somit kann Tetherin als zweiter Kandidat angesehen werden, um die PERV-Produktion einerseits in porcinen Xenografts, andererseits in möglicherweise infizierten, humanen Zellen zu unterdrücken.

Dass die Übertragung eines artfremden Retrovirus auf den Menschen eine reelle Gefahr darstellen kann, lehrt nicht nur HIV-1, sondern auch das kürzliche entdeckte *Xenotropic murine leukemia virus-related virus* (XMRV). Bei XMRV handelt es sich um ein γ -Retrovirus, dessen Vorkommen bei Patienten mit Prostatakarzinom und mit der neurologischen Erkrankung des chronischen Erschöpfungssyndroms (CFS,

chronic fatigue syndrome) detektiert werden konnte (Lombardi et al., 2009; Schlaberg et al., 2009; Urisman et al., 2006). Bisher wird kontrovers diskutiert, ob und in welchem Maße XMRV an der Ausbildung der Krankheitsbilder beteiligt ist und wie weit verbreitet das Virus ist (Dolgin, 2010). Vor kurzem wurden bei einer Studie MLV-Sequenzen aus CFS-Patientenproben identifiziert. Die Vergleiche ergaben, dass diese größere Sequenzhomologien zu polytropen MLVs zeigen als zu XMRV, wobei bisher ungeklärt ist, wie γ -Retroviren murinen Ursprungs in das humane Genom kamen (Lo et al., 2010). Mit dem Hintergrundwissen, dass die Aktivität humaner A3-Proteine effizient die PERV-Replikation unterdrücken können, ist es verwunderlich, wie XMRV *in vivo* im Menschen ohne die Expression akzessorischer Proteine überleben kann. Ähnlich zu den Resultaten aus den hier erhaltenen PERV-A3-Interaktionsstudien, bei denen gezeigt werden konnte, dass PERV durch huA3F und huA3G um Faktor 9 bzw. 38 inhibiert wurde (Kapitel 3.4.2.2), konnte auch für XMRV gezeigt werden, dass das Virus durch huA3G effektiv und durch huA3F schwächer supprimiert wird (Groom et al., 2010; Paprotka et al., 2010; Stieler and Fischer, 2010).

Wenn humane und porcine A3-Proteine sowie Tetherin beider Spezies *in vivo* ähnlich effektive Restriktionen gegen die PERV-Infektiosität aufweisen wie in den *in vitro* erhaltenen Studien, kann geschlussfolgert werden, dass hinsichtlich einer möglichen Schwein-auf-Mensch-XTx sowohl in den Spender- als auch in den Empfängerzellen natürliche Mechanismen existieren, welche einen Block gegen eine PERV-Infektion bilden könnten. Anhand der hier gewonnen Daten, kombiniert mit Resultaten aus nicht-klinischen Studien mit nicht-menschlichen Primaten und bereits erfolgter Schwein-auf-Mensch-Xenotransplantationen, bei denen keine PERV-Transmission detektiert werden konnte, scheint es, dass das Risiko einer Übertragung der porcinen Viren auf den Menschen kalkulierbar ist. Sinnvoll ist auch die Verwendung von Schweinen für die Züchtung, welche nur geringe Mengen oder keine PERV-Partikel freisetzen, um das Risiko einer Zoonose weiter zu minimieren. Falls die XTx nach erfolgreichem Züchten humanisierter, transgener Schweine zur Überwindung der immunologischen Barrieren in den kommenden Jahren zur klinischen Anwendung kommen sollte, bedarf es hinsichtlich der potentiellen Infektionsgefahr durch PERV einer strikten Überwachung der Xenograft-Empfänger, um eine Infektion und möglicherweise Adaptation des Virus auf den Menschen verfolgen zu können und

um somit Szenarien wie einer Epidemie oder Pandemie gegebenenfalls frühzeitig vorbeugen zu können.

Schlussendlich lässt sich sagen, dass das Risiko einer möglichen PERV-Transmission auf den Menschen im Zuge einer XT_x nicht auszuschließen ist. Mit geeigneten Maßnahmen wie *in vivo* Experimenten vor der klinischen Zulassung und strengen Kontrollen können jedoch diese in einen kalkulierbaren Rahmen gestellt werden. Natürlich könnte das Risiko einer PERV-Übertragung auf Null reduziert werden, wenn genügend humane Organe für die Allotransplantation aller Patienten zur Verfügung stehen würden. Dies würde allerdings ein Umdenken in der Bevölkerung oder gar eine Änderung des deutschen Transplantationsgesetzes seitens der Regierung, wie in Österreich bereits erfolgt, erfordern – weg von der erweiterten Zustimmungsregelung, hin zur Widerspruchsregelung.

5 Appendix

5.1 Korrektur der kodierenden Sequenzen für poA3Z2-Z3 und poA3Z2-Z3 SVA

Aufgrund eines fehlerhaften 3'-Primers bei der Suche nach porzinen A3-Transkripten mit verschiedenen porzinen cDNAs als Matrize wurde ein Serin-Rest (Trinukleotid TCA) an die C-Termini von poA3Z2-Z3 und der porzinen A3-Variante poA3Z2-Z3 SVA addiert. Die auf diese Weise modifizierten Sequenzen bzw. dazugehörigen Expressionsplasmide wurden für die experimentellen Untersuchungen eingesetzt. Um im Nachhinein auszuschließen, dass die Aminosäure-Addition keinen Einfluss auf die Funktionalität der beiden Cytosin-Deaminasen nimmt, wurde eine Sequenzkorrektur vorgenommen, bei der mit Hilfe einer PCR die Serin-Addition unter Verwendung eines geeigneten 3'-Primers rückgängig gemacht wurde (Tab. 9).

Tab. 9 Durchgeführte PCR-Reaktionen zur Entfernung der Serin-Addition aus poA3Z2-Z3 und poA3Z2-Z3 SVA. Vermerkt sind die verwendeten Primerkombinationen, welche Plasmide als Template dienten, welche Polymerase zum Einsatz kam sowie die Bezeichnung des PCR-Produktes (T_a = Annealingtemperatur, t_e = Elongationszeit).

Primer	Template	T_a [°C]	t_e [min]	Polymerase	Konstrukt
f_Acc65l_K_708_APO r_pA3_HA_NotIrc	pc[1260_HA] #5	68	1	HiFi	poA3Z2-Z3_SSS
f_Acc65l_K_708_APO r_pA3_HA_NotIrc	pc[708_HA] #2	68	1	HiFi	poA3Z2-Z3 SVA_SSS

Nach Entfernung der Serin-Addition – was durch eine Sequenzierung kontrolliert wurde – wurde das Konstrukt über die Restriktionsschnittstellen *Acc65I* und *NotI* in das Expressionsplasmid pcDNA3.1Zeo(+) (Invitrogen) einkloniert und die Proteinexpression über Western Blot nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Um die antiretrovirale Aktivität der Enzyme poA3Z2-Z3_SSS und poA3Z2-Z3 SVA_SSS gegen PERV zu untersuchen, wurde wie in Kapitel 3.4.2.2 eine Drei-Plasmid-Transfektion durchgeführt und die daraus resultierenden, viralen Überstände auf 80 mU RT normiert und für eine Transduktion eingesetzt. Die transduzierten HEK-293T-Zellen wurden nach drei Tagen für eine FACS-Messung verwendet mit dem Resultat, dass nach Entfernung des Serin-Restes und somit Rekonstruktion der natürlichen poA3Z2-Z3-Sequenz keine Änderungen in der antiretroviralen Eigenschaft erkennbar

waren (Abb. 57a). Sowohl poA3Z2-Z3 als auch poA3Z2-Z3_SSS zeigten eine gleichermaßen stark inhibierende Wirkung (Faktor 20) auf die PERV-Infektiosität, während poA3Z2-Z3 SVA_SSS genauso wie poA3Z2-Z3 SVA keinen signifikanten Einfluss auf den Replikationszyklus von PERV ausübte (Faktor 2) (Abb. 57b).

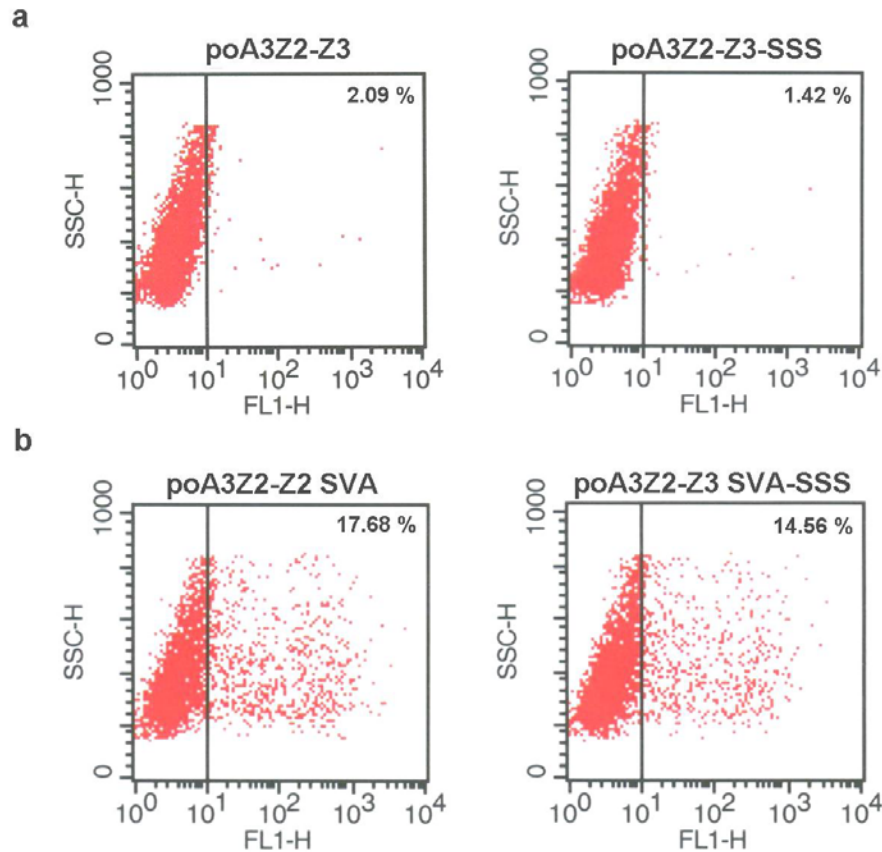


Abb. 57 Antiretrovirale Aktivität der A3-Proteine (a) poA3Z2-Z3 und poA3Z2-Z3_SSS sowie (b) poA3Z2-Z3 SVA und poA3Z2-Z3 SVA_SSS gegen PERV. HEK-293T-Zellen wurden mit 80 mU pseudotypisierten PERV transduziert, wobei die Partikel in Anwesenheit der angegebenen A3-Proteine generiert und die Infektiosität durch FACS-Messung der intrazellulären EGFP-Fluoreszenz drei Tage nach Transduktion bestimmt wurden. Die Prozentangabe entspricht der prozentualen Anzahl EGFP-exprimierender Zellen. Die Positivkontrolle zeigte einen Mittelwert von 34.3 % grün fluoreszierender Zellen (Daten nicht gezeigt).

Durch eine Untersuchung der Deaminierungsaktivität wurde nochmals bestätigt, dass die antiretrovirale Aktivität von poA3Z2-Z3_SSS auf der Deaminierung der proviralen PERV-Sequenz beruht (Daten nicht gezeigt). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass das SSSS-Motiv an den C-Termini von poA3Z2-Z3 und poA3Z2-Z3 SVA einen Einfluss auf die biologische Funktion der Cytosin-Deaminasen ausübt.

5.2 Evolution des porzinen A3-Genlokus

Um einen genaueren Einblick in die Evolution des *poA3*-Genlokus zu erhalten, wurde eine phylogenetische Analyse durchgeführt. Dabei sollte nicht nur die A3-Evolution des Minischweins – aus dem die Zelllinie MAX-T abgeleitet ist und deren genomische DNA zur Identifikation der Sequenz des *poA3*-Genlokus verwendet wurde – analysiert werden. Vielmehr wurden verschiedene Schweinerassen (Minischwein, Yucatan Schwein, Deutsche Landrasse und Wildschwein) (Ordnung: Artiodactyla, Unterordnung: Suina, Familie: *Suidae*) untersucht, um möglicherweise Divergenzen in der phylogenetischen Entwicklung der einzelnen Rassen zu detektieren. Zusätzlich wurden die beiden nächsten Verwandten des Schweins – Pekari (Ordnung: Artiodactyla, Unterordnung: Suina, Familie: *Tayassuidae*) und Kamel (Ordnung: Artiodactyla, Unterordnung: Thylopoda, Familie: *Camelidae*) – ebenfalls zur Erstellung eines Stammbaumes herangezogen, wobei die statistische Auswertung durch Dr. Ignacio González Bravo (CSISP, Valencia, Spanien) erfolgte.

Um die phylogenetischen Untersuchungen durchführen zu können, wurde mit Hilfe zweier PCR-Reaktionen (Abb. 58) der Großteil des A3Z3-Gens amplifiziert, wobei die beiden Amplifikate in einem Bereich innerhalb des Exons 3 überlappen und die beiden ermittelten Konsensussequenzen einer jeden Rasse über diesen Bereich miteinander verbunden werden konnten. Dieser Genbereich wurde gewählt, da die Exons aufgrund relativ kurzer Intronbereiche nahe beieinander liegen, weshalb in einem kurzen Genfragment ein recht hoher Anteil kodierender Sequenz vorliegt, welche für die phylogenetischen Untersuchungen der Cytosin-Deaminasen innerhalb der Laurasiatheria und Euarchontoglires (Abb. 61) benötigt wurde. Die Sequenz des gesamten amplifizierten Genbereiches wurde wiederum für die Erstellung des phylogenetischen Stammbaumes – bestehend aus den drei Familien *Suidae*, *Tayassuidae* und *Camelidae* – verwendet (Abb. 59). Es wurde ebenso versucht, einen phylogenetischen Stammbaum für das porzine Gen A3Z2 zu erstellen. Leider war es nicht möglich, mit den ausgewählten Oligonukleotiden ein PCR-Produkt für Pekari und Kamel zu erhalten, weshalb der Versuch verworfen wurde (Daten nicht gezeigt).

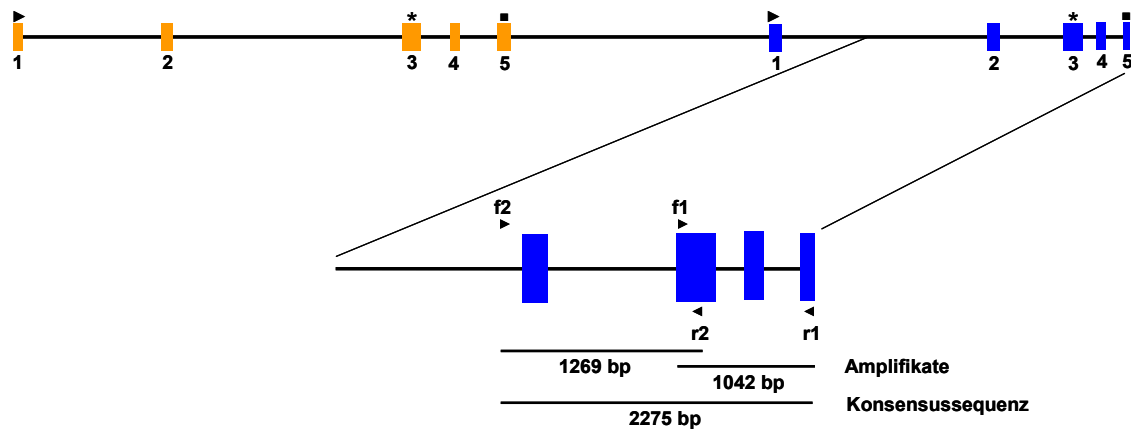


Abb. 58 Primerpositionen der verwendeten Oligonukleotide innerhalb des *poA3Z3*-Gens. oben: schematische Darstellung der Exon-Intron-Komposition des *poA3Z2-Z3*-Genlokus. unten: Ausschnitt des amplifizierten Genbereiches zwecks phylogenetischer Analyse des *A3Z3*-Gens. Die Konsensussequenz verfügt über einen Exonanteil von 631 bp (Dreiecke im unteren Teil der Abbildung: Primerpositionen; f1 = for_EI_5; r1 = 1r_Ss3F; f2 = f_Intron4_1; r2 = r_Exon6_1).

Vergleicht man die phylogenetische Entwicklung der drei Familien *Camelidae*, *Tayassuidae* und *Suidae* miteinander (Abb. 59), kann aufgrund von publizierten Daten (Bininda-Emonds et al., 2007; Murphy et al., 2004; Murphy et al., 2007) und anhand des berechneten Maximum Likelihood (ML)-Baumes geschlossen werden, dass sich die *Camelidae* zuerst – sehr wahrscheinlich vor etwa 65 Millionen Jahren – abgespalten haben während die *Tayassuidae* und die *Suidae*, welche beide zu der Unterordnung Suina zusammengefasst werden, eine Tochtergruppe bilden und sich sehr wahrscheinlich vor etwa 50 Millionen Jahren voneinander trennten. Innerhalb der verschiedenen, untersuchten Schweinerassen ließ sich zusätzlich eine Auftrennung in zwei Äste erkennen, was auf die Existenz zweier Allele des *poA3Z3*-Gens hindeutet. Diese beiden Allele scheinen sich aus evolutionsbiologischen Gesichtspunkten erst in neuerer Zeit gebildet zu haben. Betrachtet man die Astlängen des Stammbaumes und geht davon aus, dass unter *strict molecular clock*-Bedingungen, d.h. unter Annahme einer gleichbleibenden Evolutionsgeschwindigkeit, die Astlänge zwischen *Tayassuidae* und *Suidae* einem Zeitraum von 50 Millionen Jahren entspricht, so lässt sich berechnen, dass die genetische Variation des *poA3Z3*-Gens innerhalb der Gattung *Sus* vor etwa vier Millionen Jahren entstanden sein müsste. Aufgrund der Größe (100/1) der an den Knotenpunkten vermerkten *Bootstrap-Support*-Werten bzw. der *Bayesschen posterior probability*-Werte lässt sich daraus schließen, dass die Lage der Knotenpunkte höchst wahrscheinlich ist.

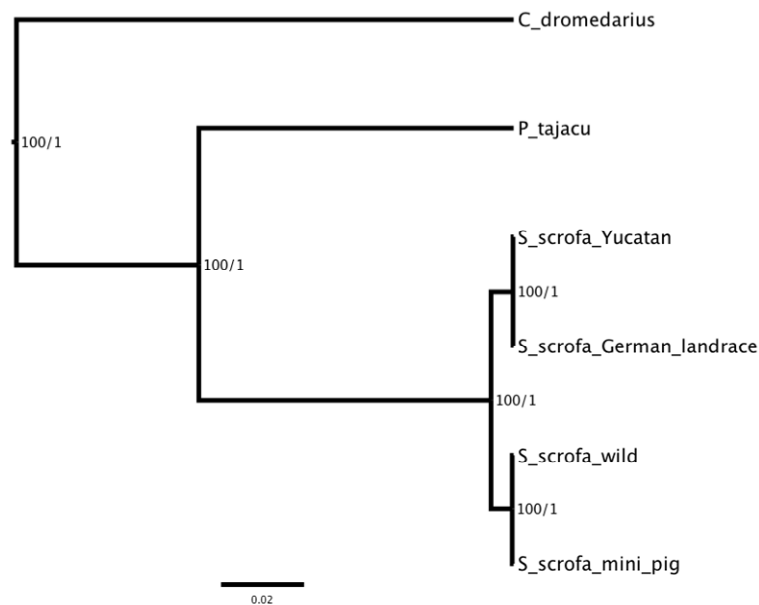


Abb. 59 Bester Maximum Likelihood (ML)-Baum der A3Z3-Gene, welche von *Camelidae*, *Tayassuidae* und *Suidae* kodiert werden. Die Werte an den Knoten geben den Bootstrap-Support nach zwei kombinierten und aus je 5.000 RAxML Bootstrap-Zyklen bestehenden / die Bayessche posterior probability nach zwei kombinierten und aus 50 Millionen Schritten bestehenden Ketten einer mit BEAST durchgeführten Analyse für eine relaxed clock an. Für die Berechnungen wurde der gesamte, amplifizierte Genbereich (Exon- und Intronsequenzen) verwendet. Die Skala zeigt die Substitutionen pro Position an (Die statistische Auswertung wurde von Dr. Ignacio González Bravo durchgeführt und ist Bestandteil der Publikation Dörrschuck *et al.* (Dörrschuck *et al.*, 2011)).

Ein Abgleich der zu dem amplifizierten Genbereich gehörigen AS-Sequenz der drei analysierten Familien lässt erkennen, dass sich die A3Z3-Sequenzen der Deutschen Landrasse und des Yucatan-Schweins wesentlich ähnlicher sind als im Vergleich dazu die entsprechenden Sequenzen der beiden anderen untersuchten Schweinerassen (Abb. 60). Dem gegenüber unterscheiden sich Pekari und Kamel relativ stark in ihrer A3Z3-Sequenz von den vier Schweinerassen.

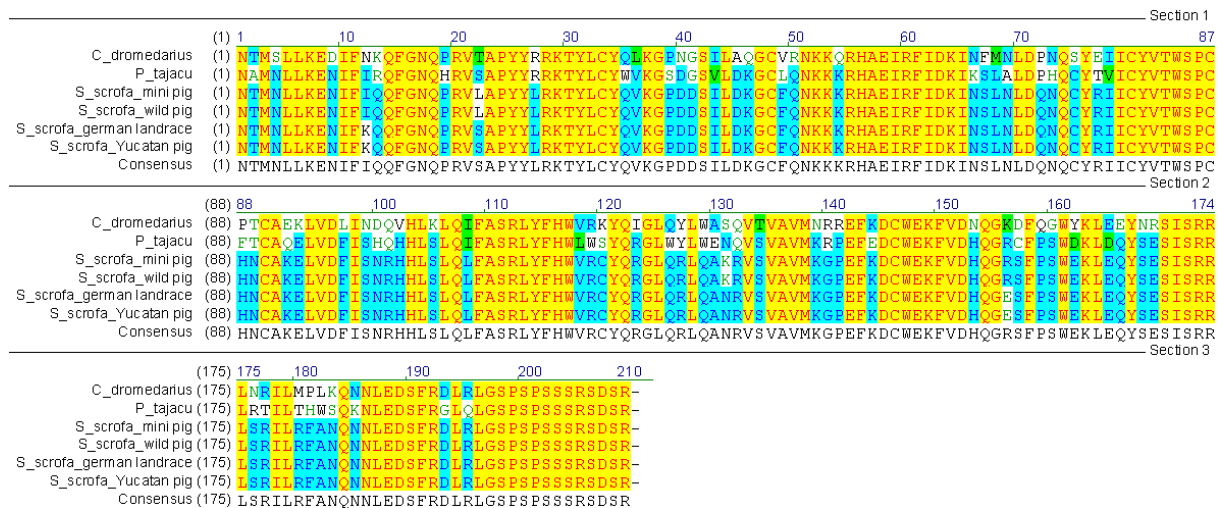


Abb. 60 AS-Abgleich der partiellen A3Z3-Proteinsequenz aus der Familie der *Camelidae*, *Tayassuidae* und *Suidae* (gelb unterlegt: 100%-ige Homologie zwischen allen abgeglichenen A3-Sequenzen, blau unterlegt: 100%-ige Homologie zwischen drei bis fünf abgeglichenen A3-Sequenzen, grün unterlegt: AS gleicher Polarität).

Um die Evolution des A3Z3-Gens vor dem Hintergrund der phylogenetischen Entwicklung des Gens innerhalb der Laurasiatheria und Euarchontoglires zu betrachten, wurde die ML- und die Bayes-Analyse unter Addition der entsprechenden A3H- bzw. orthologen A3Z3-Sequenzen verschiedener Vertreter der beiden Überordnungen verglichen, wobei für die Kalkulationen nur die kodierende Gensequenz verwendet wurde. Eine genaue Auflistung der im phylogenetischen Stammbaum integrierten Spezies (Abb. 61) – inklusive deren Taxonomie – ist in den nachfolgenden Kapiteln 5.3 und 5.4 aufgelistet.

In diesem Stammbaum (Abb. 61) lässt sich anschaulich die Aufspaltung in Euarchontoglires – mit den beiden hier integrierten Ordnungen Nagetiere (Rodentia) und Primaten (Primates) – und Laurasiatheria – mit Fokus auf die Ordnungen Raubtiere (Carnivora), Unpaarhufer (Perissodactyla) und Paarhufer (Artiodactyla) – erkennen. Vergleicht man die Evolution der A3H- bzw. der orthologen A3Z3-Genbereiche der untersuchten Spezies mit bereits vorhandenen, phylogenetischen Stammbäumen, so lässt sich sagen, dass die Evolution der analysierten A3Z3-Gene die bis dato akzeptierte Evolutionsgeschichte der Tiere widerspiegelt (Bininda-Emonds et al., 2007; Murphy et al., 2001; Murphy et al., 2004; Murphy et al., 2007). Die Topologien, die nach der ML- und der Bayes-Methode erhalten wurden, waren weitestgehend kongruent.

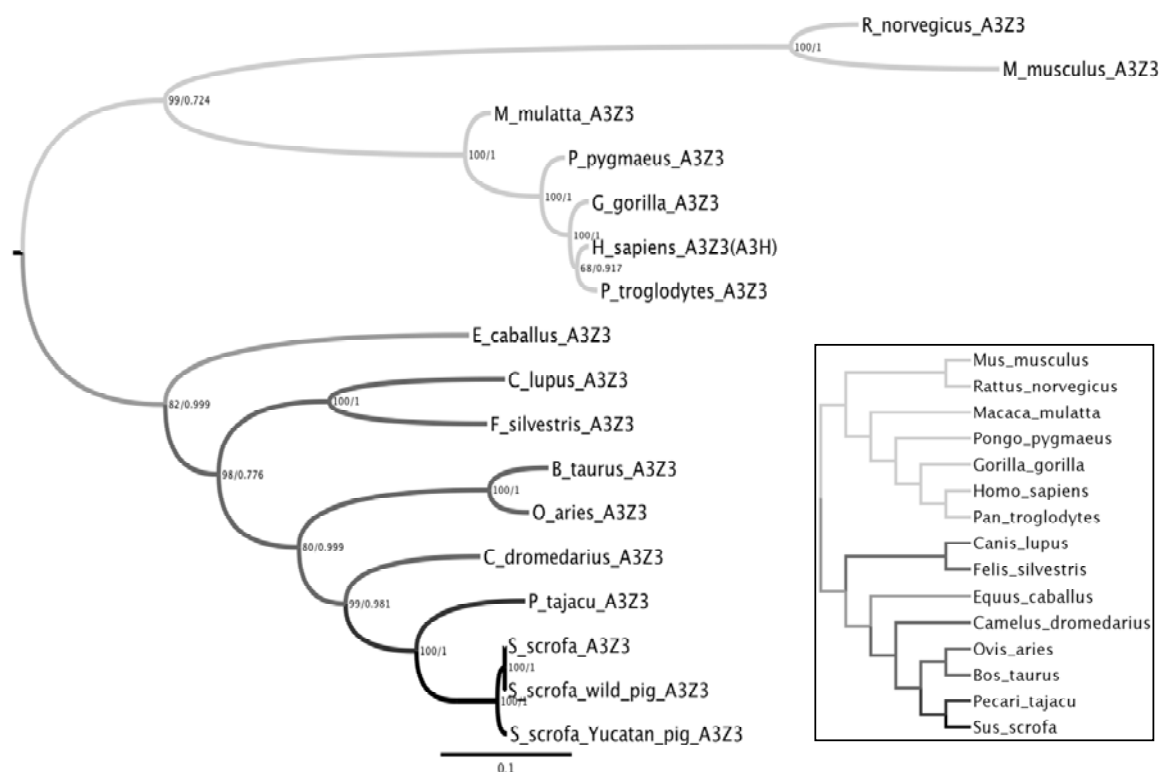


Abb. 61 Bester Maximum Likelihood (ML)-Baum der A3Z3-Gene, welche von Laurasiatheria und Euarchontoglires kodiert werden. Die Werte an den Knoten geben den Bootstrap-Support nach zwei kombinierten und aus je 5.000 RAxML Bootstrap-Zyklen bestehenden / die Bayessche posterior probability nach zwei kombinierten und aus 50 Millionen Schritten bestehenden Ketten einer mit BEAST durchgeführten Analyse für eine relaxed clock an. Für die Berechnungen wurden die kodierenden Nukleotidsequenzen verwendet. Die Skala zeigt die Substitutionen pro Position an. Kleiner Stammbaum: aktuell angenommene Phylogenie der Mammalia (nach (Bininda-Emonds et al., 2007)) (Die statistische Auswertung wurde von Dr. Ignacio González Bravo durchgeführt und ist Bestandteil der Publikation Dörrschuck et al. (Dörrschuck et al., 2011)).

5.3 Phylogenetische Begriffe und deren Definition

Die Begriffe, die für die phylogenetische Analyse von Bedeutung sind, sollen nachfolgend und in chronologischer Reihenfolge (Klasse, Unterklasse, Überordnung, Ordnung, usw.) erklärt werden.

Mammalia

= Säugetiere, Klasse der Wirbeltiere; zu dieser Klasse gehören die Unterklassen Eierlegende Säugetiere (Prototheria) Beutelsäuger (Metatheria) und Höhere Säugetiere/Plazentatiere (Eutheria).

Eutheria

= Höhere Säugetiere, Plazentatiere (Placentalia), Unterklasse der Säugetiere (Mammalia); Entstehung vor etwa 70-100 Millionen Jahren, wobei sich diese Unterklasse aus insgesamt 18 Ordnungen zusammensetzt, die wiederum in sechs Überordnungen eingeteilt werden können: Euarchontoglires, Laurasiatheria, Xenarthra (Nebengelenktiere), Afrotheria (aus Afrika stammend), Marsupialia (Beuteltiere) und Monotremata (Kloakentiere).

Boreoeutheria

= Stamm innerhalb der Eutheria, der sich aus den Schwestertaxa Laurasiatheria und Euarchontoglires zusammensetzt.

Euarchontoglires

= molekulargenetisch festgelegte Überordnung der Höheren Säugetiere, auch als Supraprimates bezeichnet, die etwa 2744 Arten umfasst. Wahrscheinlich haben sich die Euarchontoglires vor 85-95 Millionen Jahren in der späten Kreidezeit im heutigen Eurasien entwickelt. Die Überordnung setzt sich aus den beiden Stämmen Glires und Euarchonta zusammen. Zu den Glires zählen die Nagetiere (Rodentia) und Hasenartige (Lagomorpha), zu den Euarchonta gehören die Ordnungen Riesengleiter (Dermoptera), Spitzhörnchen (Scandentia) und Primaten (Primates).

Laurasiatheria

= molekulargenetisch festgelegte Überordnung der Eutheria, die etwa 2100 Arten umfasst. Wahrscheinlich haben sich die Laurasiatheria vor 85-95 Millionen Jahren in der späten Kreidezeit auf dem früheren, nördlichen Superkontinent Laurasia (Nordamerika + Eurasien) entwickelt. Diese Gruppe setzt sich aus den Ordnungen Insektenfresser (Eulipothyphla), Fledertiere (Chiroptera), Raubtiere (Carnivora), Schuppentiere (Pholidota), Unpaarhufer (Perissodactyla), Paarhufer (Artiodactyla) und Wale (Cetacea) zusammen.

Cetartiodactyla

= Taxon innerhalb der Laurasiatheria, das sich aus den beiden Ordnungen Paarhufer (Artiodactyla) und Wale (Cetacea) zusammensetzt. Die ältesten, fossilen Funde stammen aus dem Eozän (55.8-33.9 Millionen Jahre) und sind etwa 55 Millionen Jahre alt.

Artiodactyla

= Ordnung der Paarhufer

Zu den Artiodactyla gehören die Unterordnungen Wiederkäuer (Ruminantia) Schweineartige (Suina) und Schwielensohler (Tylopoda). Die ältesten, fossilen Funde stammen ebenfalls aus dem Eozän (55.8-33.9 Millionen Jahre) und sind etwa 55 Millionen Jahre alt.

Suina

= Schweineartige; Unterordnung der Paarhufer

Zu den Suina zählen insgesamt 22 Arten, die sich in die Familie der Echten Schweine (Suidae) und der Nabelschweine (Tayassuidae) unterteilen lassen, wobei die Spezies Pekari zu letzterer Familie gehört.

Quellen:

(Benton and Donoghue, 2007; Bininda-Emonds et al., 2007; Murphy et al., 2001; Prasad et al., 2008)

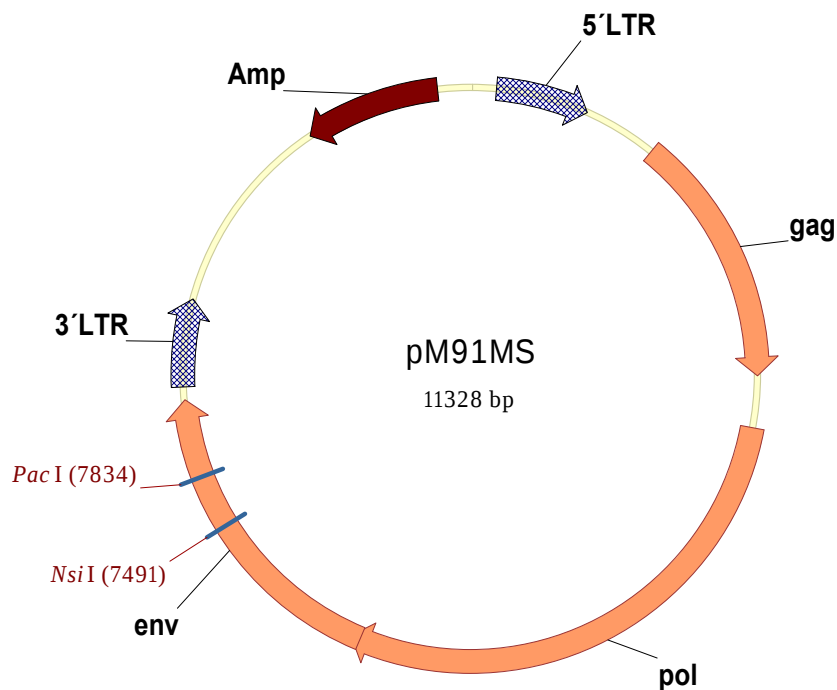
5.4 Taxonomie der phylogenetisch untersuchten Tiere

Tab. 10 Auflistung der für die phylogenetische Analyse des A3Z3-Gens verwendeten Spezies. Neben der lateinischen Bezeichnung (binominale Nomenklatur), welche sich aus Gattungs- und Artnamen zusammensetzt, sind die deutsche Bezeichnung sowie die Systematik einer jeden Tierart von Klasse bis Gattung angegeben (Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>)

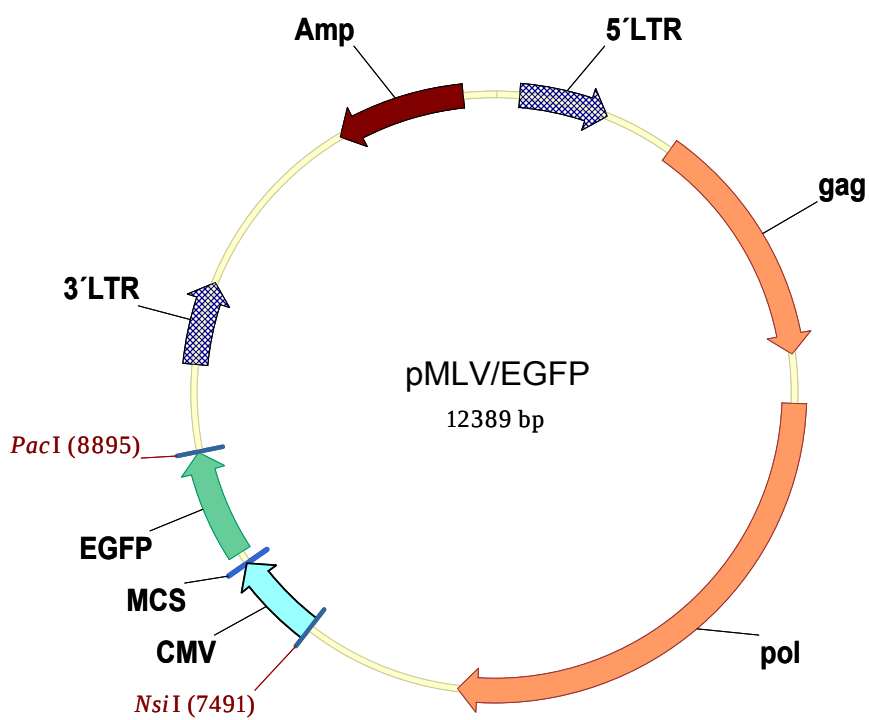
Binominale Nomenklatur	Deutsche Bezeichnung	Klasse → Unterklasse → Überordnung → Ordnung → (Unterordnung) → Familie → Gattung
<i>Rattus norvegicus</i>	Ratte	Mammalia → Eutheria → Euarchontoglires → Rodentia → (Sciurognathi) → Muridae → Rattus
<i>Mus musculus</i>	Maus	Mammalia → Eutheria → Euarchontoglires → Rodentia → (Sciurognathi) → Muridae → Mus
<i>Macaca mulatta</i>	Rhesusaffe	Mammalia → Eutheria → Euarchontoglires → Primates → (Haplorrhini) → Cercopithecidae → Macaca
<i>Pongo pygmaeus</i>	Orang-Utan	Mammalia → Eutheria → Euarchontoglires → Primates → (Haplorrhini) → Hominidae → Pongo
<i>Gorilla gorilla</i>	Gorilla	Mammalia → Eutheria → Euarchontoglires → Primates → (Haplorrhini) → Hominidae → Gorilla
<i>Homo sapiens</i>	Mensch	Mammalia → Eutheria → Euarchontoglires → Primates → (Haplorrhini) → Hominidae → Homo
<i>Pan troglodytes</i>	Schimpanse	Mammalia → Eutheria → Euarchontoglires → Primates → (Haplorrhini) → Hominidae → Pan
<i>Equus caballus</i>	Pferd	Mammalia → Eutheria → Laurasiatheria → Perissodactyla → Equidae → Equus
<i>Canis lupus</i>	Hund	Mammalia → Eutheria → Laurasiatheria → Carnivora → (Caniformia) → Canidae → Canis
<i>Felis silvestris</i>	Katze	Mammalia → Eutheria → Laurasiatheria → Carnivora → (Feliformia) → Felidae → Felis
<i>Bos taurus</i>	Rind	Mammalia → Eutheria → Laurasiatheria → Artiodactyla → (Ruminantia) → Bovidae → Bos
<i>Ovis aries</i>	Schaf	Mammalia → Eutheria → Laurasiatheria → Artiodactyla → (Ruminantia) → Bovidae → Ovis
<i>Camelus dromedarius</i>	Dromedar	Mammalia → Eutheria → Laurasiatheria → Artiodactyla → (Thylopoda) → Camelidae → Camelus
<i>Pecari tajacu</i>	Halsbandpekari	Mammalia → Eutheria → Laurasiatheria → Artiodactyla → (Suina) → Tayassuidae → Pecari
<i>Sus scrofa</i>	Wildschwein	Mammalia → Eutheria → Laurasiatheria → Artiodactyla → (Suina) → Suidae → Sus

5.5 Plasmidkarten

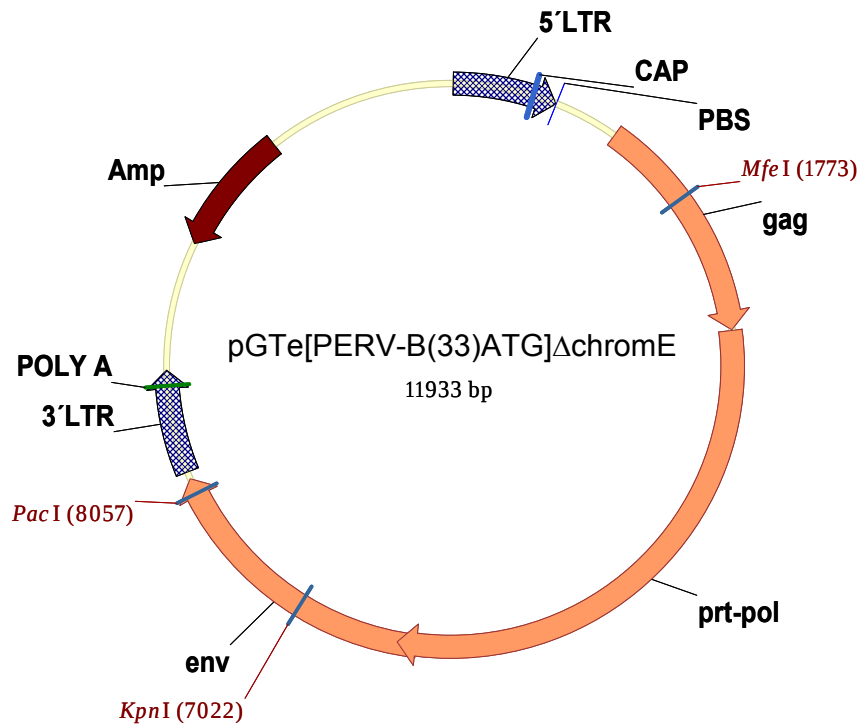
5.5.1 Plasmidkarte von pM91MS



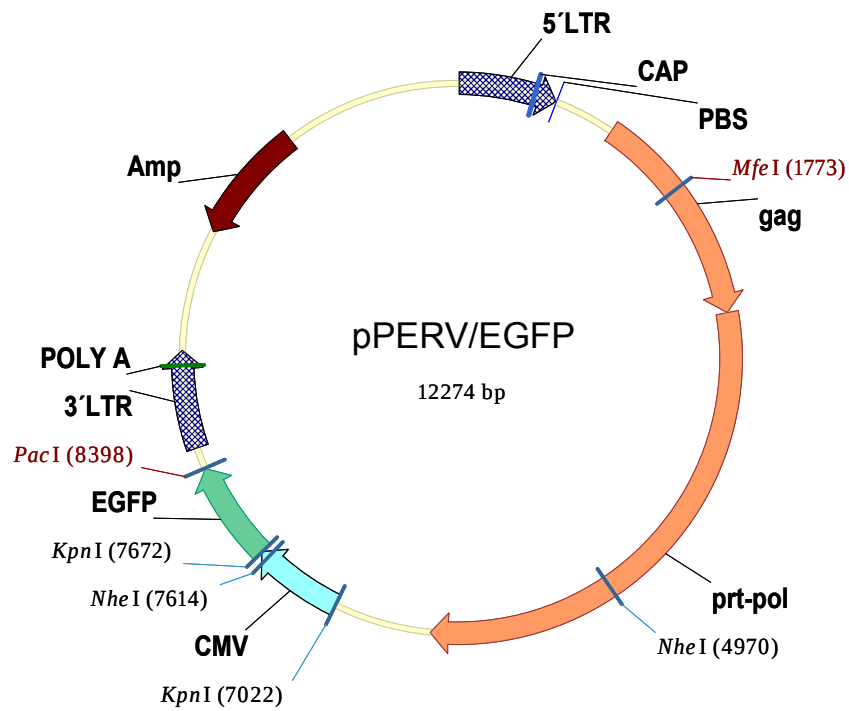
5.5.2 Plasmidkarte von pMLV/EGFP



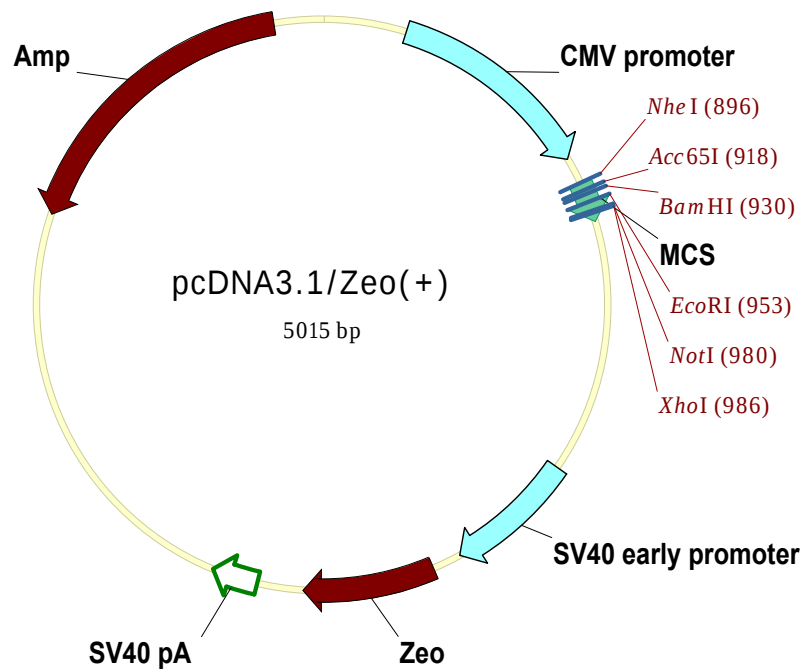
5.5.3 Plasmidkarte von pGTe[PERV-B(33)ATG] Δ chromE



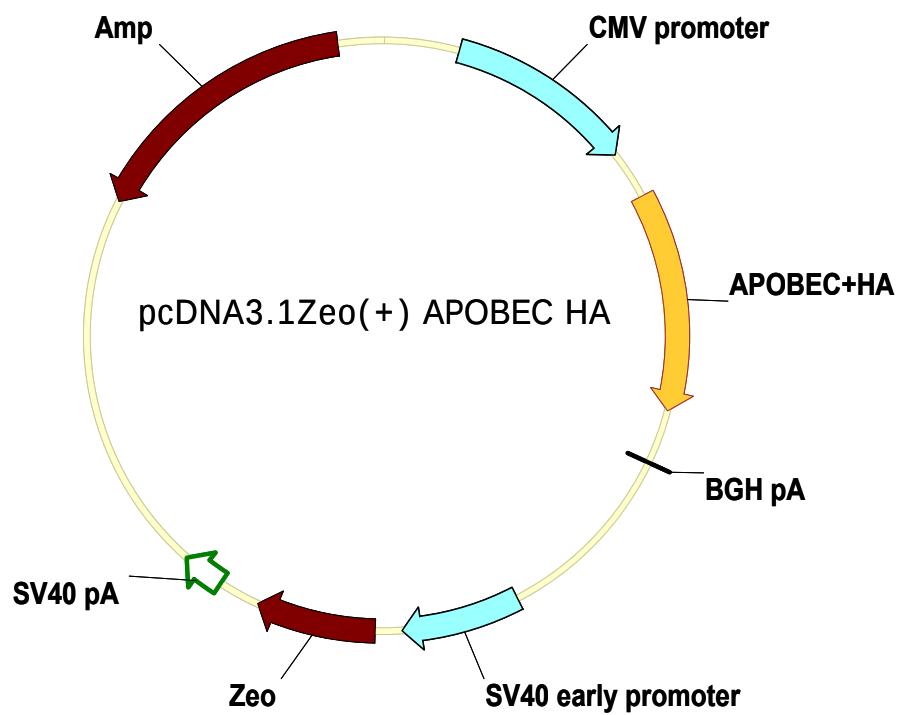
5.5.4 Plasmidkarte von pPERV/EGFP



5.5.5 Plasmidkarte von pcDNA3.1Zeo(+)



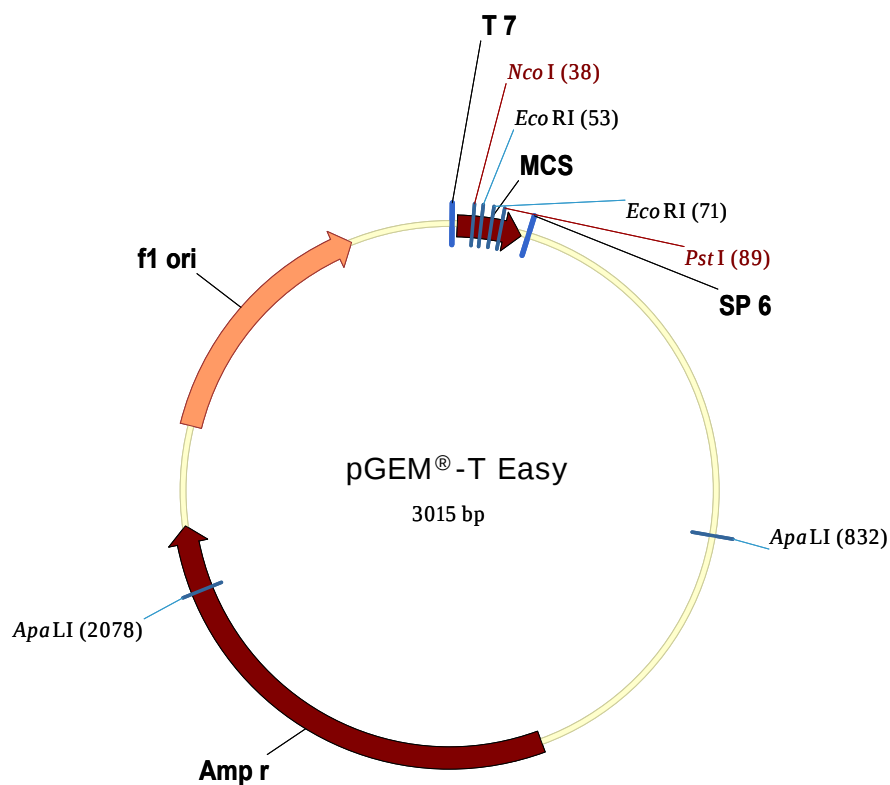
5.5.6 Plasmidkarte von pcDNA3.1Zeo(+)_APOBEC3_HA



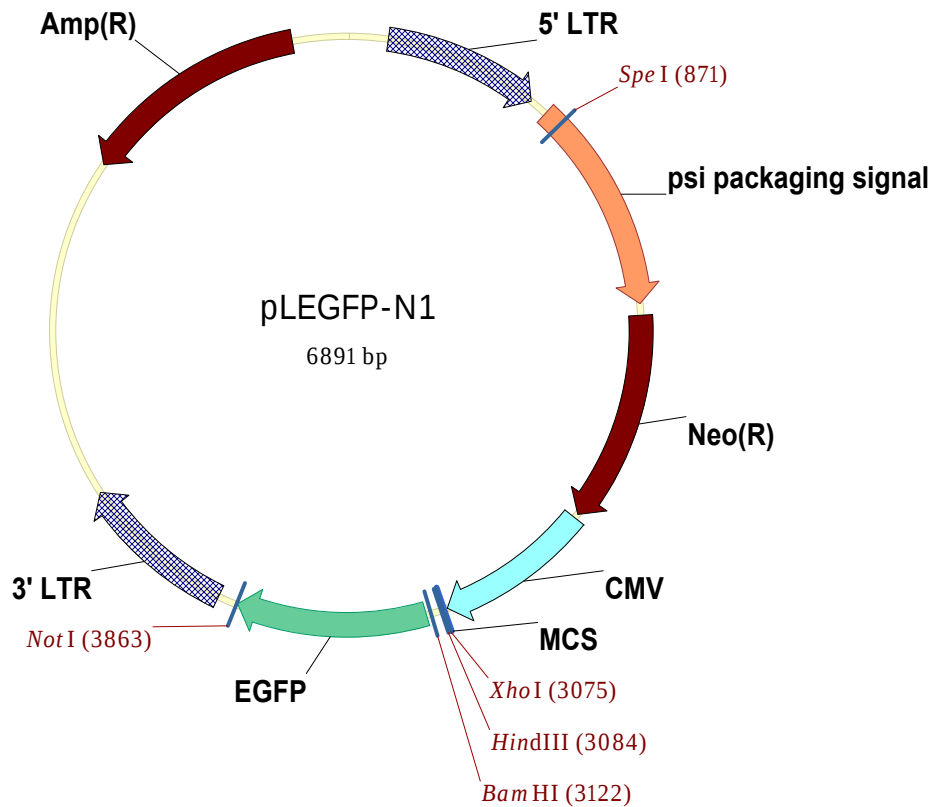
Bei dieser Plasmidkarte handelt es sich lediglich um eine schematische Zeichnung für die verschiedenen, APOBEC3-kodierenden Expressionsplasmide, weshalb keine Plasmidgröße angegeben ist. Die Größen der einzelnen, verwendeten Plasmide sind nachfolgend angegeben:

pcDNA3.1Zeo(+)_huA3A_HA	5696 bp
pcDNA3.1Zeo(+)_huA3B_HA	6191 bp
pcDNA3.1Zeo(+)_huA3C_HA	5615 bp
pcDNA3.1Zeo(+)_huA3F_HA	6164 bp
pcDNA3.1Zeo(+)_huA3G_HA	6197 bp
pcDNA3.1Zeo(+)_huA3H_HA	5591 bp
pcDNA3.1Zeo(+)_poA3Z2-Z3_HA	6247 bp
pcDNA3.1Zeo(+)_poA3Z2-Z3_SV-N_HA	5804 bp
pcDNA3.1Zeo(+)_poA3Z2-Z3_POA3Z2-Z3 SVA_HA	5695 bp
pcDNA3.1Zeo(+)_poA3Z2-Z3_SSS_HA	6244 bp
pcDNA3.1Zeo(+)_poA3Z2-Z3_POA3Z2-Z3 SVA_SSS_HA	5695 bp
pcDNA3.1Zeo(+)_A3Z3_HA	5614 bp

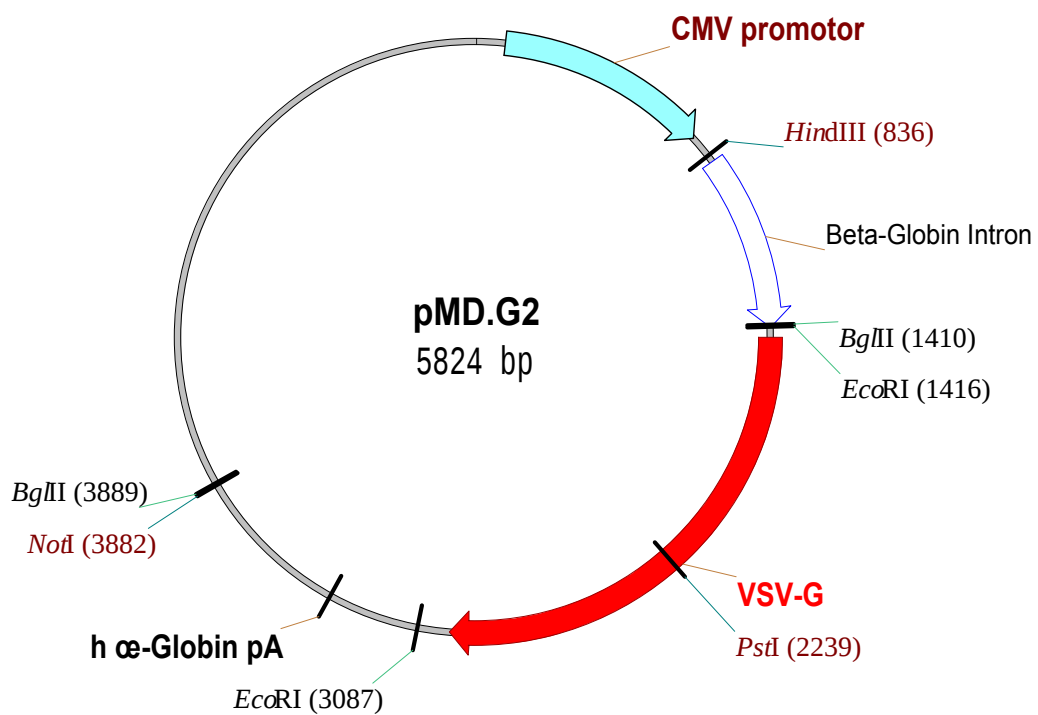
5.5.7 Plasmidkarte von pGEM®-T Easy



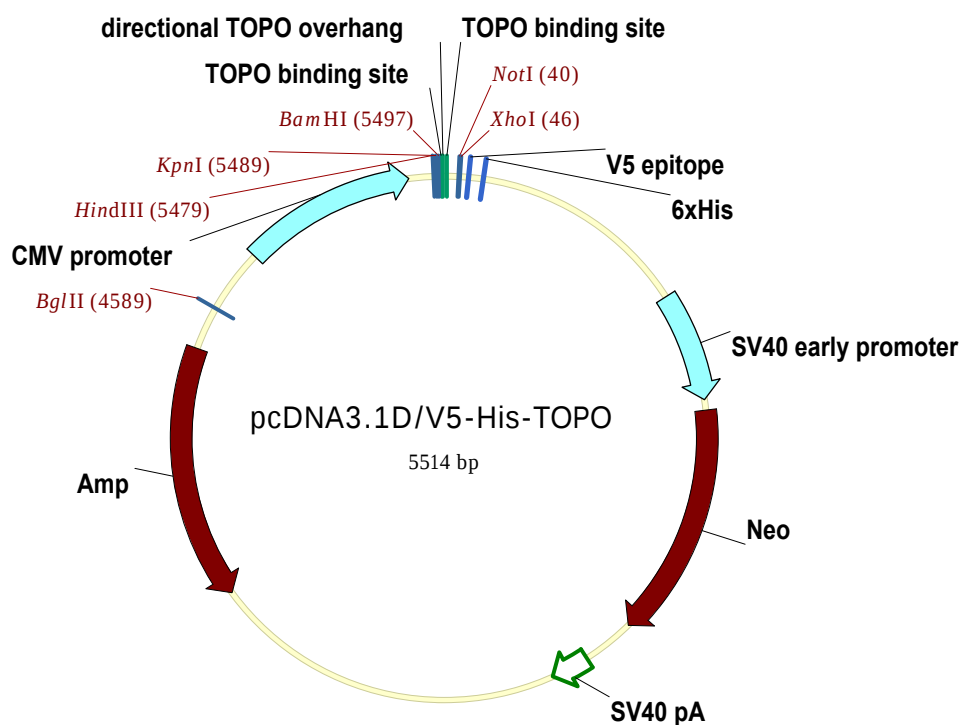
5.5.8 Plasmidkarte von pLEGFP-N1



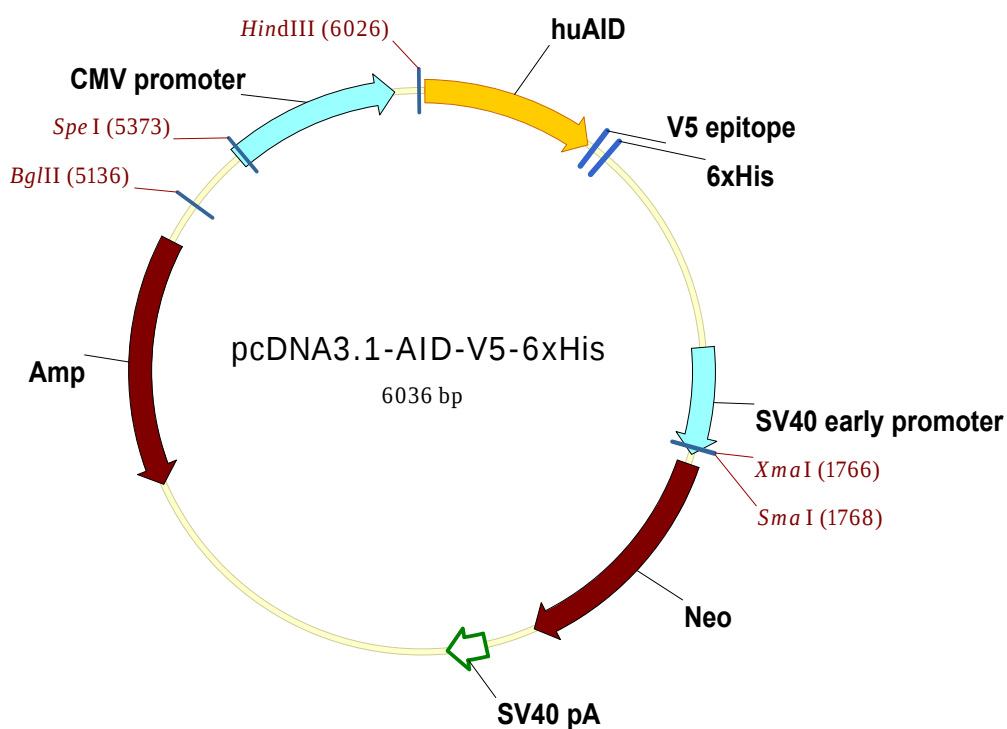
5.5.9 Plasmidkarte von pMD.G2



5.5.10 Plasmidkarte von pcDNA3.1D/V5-His-TOPO



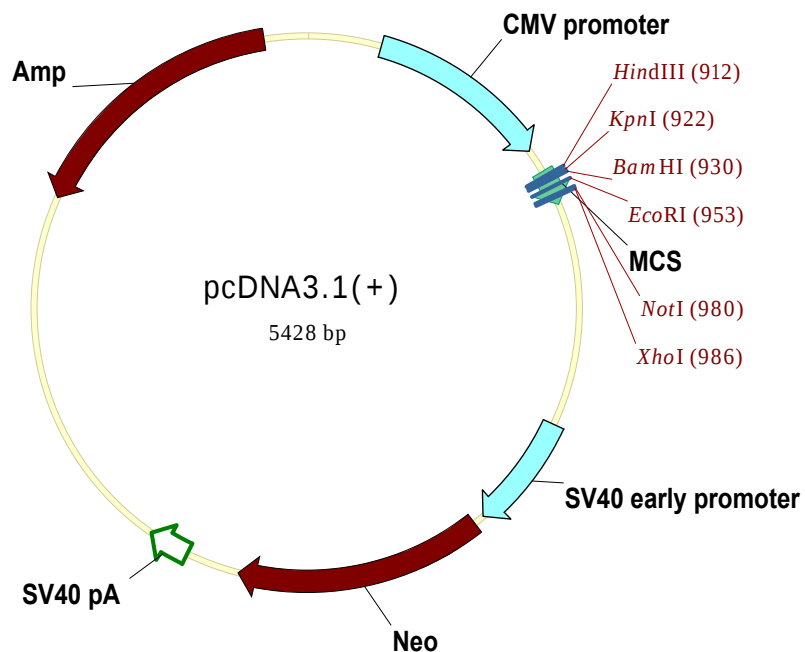
5.5.11 Plasmidkarte von pcDNA3.1D-AID-V5-His-TOPO



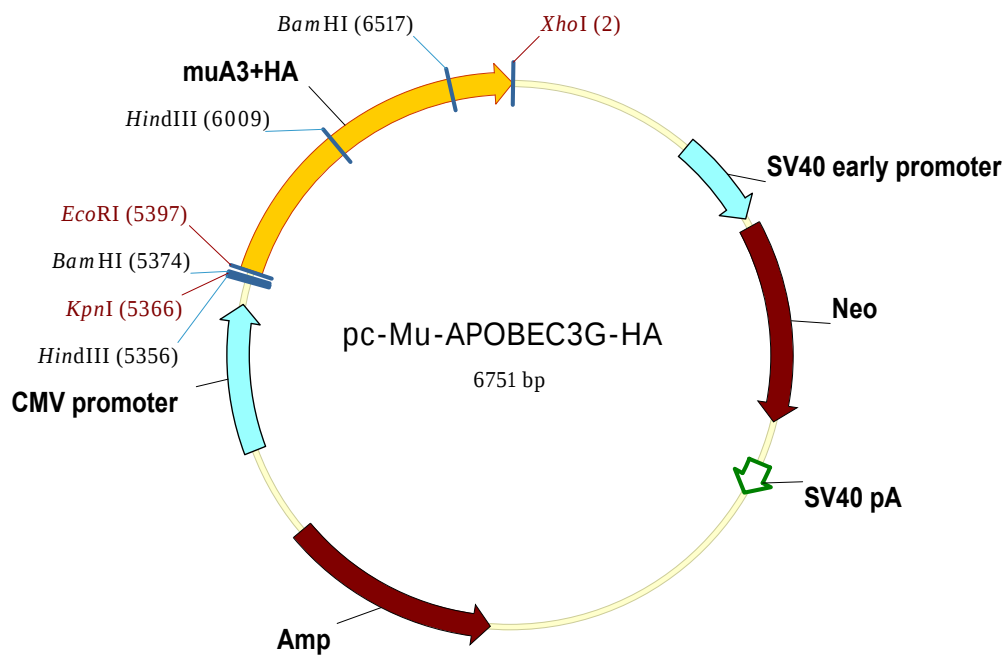
Zur Veranschaulichung wurde die Plasmidkarte des humanen AID-exprimierenden Plasmides dargestellt. Die Expressionsplasmide für huAID, huA1 und huA2 unterscheiden sich in ihrer Größe voneinander, sind jedoch identisch aufgebaut. Die Größen der drei Plasmide sind nachfolgend angegeben:

pcDNA3.1-huAID-V5-6xHis	6036 bp
pcDNA3.1-huA1-V5-6xHis	6150 bp
pcDNA3.1-huA2-V5-6xHis	6114 bp

5.5.12 Plasmidkarte von pcDNA3.1(+)



5.5.13 Plasmidkarte von pc-Mu-APOBEC3G-HA



6 Literaturverzeichnis

Abudu,A., Takaori-Kondo,A., Izumi,T., Shirakawa,K., Kobayashi,M., Sasada,A., Fukunaga,K., and Uchiyama,T. (2006). Murine retrovirus escapes from murine APOBEC3 via two distinct novel mechanisms. *Curr. Biol.* 16, 1565-1570.

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

Alce,T.M. and Popik,W. (2004). APOBEC3G is incorporated into virus-like particles by a direct interaction with HIV-1 Gag nucleocapsid protein. *J. Biol. Chem.* 279, 34083-34086.

Armitage,A.E., Katzourakis,A., de Oliveira,T., Welch,J.J., Belshaw,R., Bishop,K.N., Kramer,B., McMichael,A.J., Rambaut,A., and Iversen,A.K. (2008). Conserved footprints of APOBEC3G on Hypermutated human immunodeficiency virus type 1 and human endogenous retrovirus HERV-K(HML2) sequences. *J. Virol.* 82, 8743-8761.

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

Azizkhan,J.C., Jensen,D.E., Pierce,A.J., and Wade,M. (1993). Transcription from TATA-less promoters: dihydrofolate reductase as a model. *Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 3, 229-254.

Bach,F.H., Fishman,J.A., Daniels,N., Proimos,J., Anderson,B., Carpenter,C.B., Forrow,L., Robson,S.C., and Fineberg,H.V. (1998). Uncertainty in xenotransplantation: individual benefit versus collective risk. *Nat. Med.* 4, 141-144.

Bach,F.H., Robson,S.C., Ferran,C., Winkler,H., Millan,M.T., Stuhlmeier,K.M., Vanhove,B., Blakely,M.L., Van der Werf,W.J., and Hofer,E. (1994). Endothelial cell activation and thromboregulation during xenograft rejection. *Immunol. Rev.* 141, 5-30.

Bach,F.H., Robson,S.C., Winkler,H., Ferran,C., Stuhlmeier,K.M., Wrighton,C.J., and Hancock,W.W. (1995). Barriers to xenotransplantation. *Nat. Med.* 1, 869-873.

Bach,F.H., Turman,M.A., Vercellotti,G.M., Platt,J.L., and Dalmaso,A.P. (1991). Accommodation: a working paradigm for progressing toward clinical discordant xenografting. *Transplant. Proc.* 23, 205-207.

Bailey,L.L., Nehlsen-Cannarella,S.L., Concepcion,W., and Jolley,W.B. (1985). Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate. *JAMA* 254, 3321-3329.

Baumann,J.G. (2006). Intracellular restriction factors in mammalian cells--An ancient defense system finds a modern foe. *Curr. HIV. Res.* 4, 141-168.

- Beaudoing,E., Freier,S., Wyatt,J.R., Claverie,J.M., and Gautheret,D. (2000). Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes. *Genome Res.* 10, 1001-1010.
- Benton,M.J. and Donoghue,P.C. (2007). Paleontological evidence to date the tree of life. *Mol. Biol. Evol.* 24, 26-53.
- Bieniasz,P.D. (2004). Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack. *Nat. Immunol.* 5, 1109-1115.
- Bininda-Emonds,O.R., Cardillo,M., Jones,K.E., MacPhee,R.D., Beck,R.M., Grenyer,R., Price,S.A., Vos,R.A., Gittleman,J.L., and Purvis,A. (2007). The delayed rise of present-day mammals. *Nature* 446, 507-512.
- Bishop,K.N., Holmes,R.K., and Malim,M.H. (2006). Antiviral potency of APOBEC proteins does not correlate with cytidine deamination. *J. Virol.* 80, 8450-8458.
- Bishop,K.N., Holmes,R.K., Sheehy,A.M., Davidson,N.O., Cho,S.J., and Malim,M.H. (2004). Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Curr. Biol.* 14, 1392-1396.
- Bishop,K.N., Verma,M., Kim,E.Y., Wolinsky,S.M., and Malim,M.H. (2008). APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts. *PLoS. Pathog.* 4, e1000231.
- Blin,N. and Stafford,D.W. (1976). A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 3, 2303-2308.
- Bogerd,H.P., Tallmadge,R.L., Oaks,J.L., Carpenter,S., and Cullen,B.R. (2008). Equine infectious anemia virus resists the antiretroviral activity of equine APOBEC3 proteins through a packaging-independent mechanism. *J. Virol.* 82, 11889-11901.
- Bonvin,M., Achermann,F., Greeve,I., Stroka,D., Keogh,A., Inderbitzin,D., Candinas,D., Sommer,P., Wain-Hobson,S., Vartanian,J.P., and Greeve,J. (2006). Interferon-inducible expression of APOBEC3 editing enzymes in human hepatocytes and inhibition of hepatitis B virus replication. *Hepatology* 43, 1364-1374.
- Breckpot,K., Aerts,J.L., and Thielemans,K. (2007). Lentiviral vectors for cancer immunotherapy: transforming infectious particles into therapeutics. *Gene Ther.* 14, 847-862.
- Breese,S.S.Jr. (1970). Virus-like particles occurring in cultures of stable pig kidney cell lines. Brief report. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 30, 401-404.
- Browne,E.P. and Littman,D.R. (2008). Species-specific restriction of apobec3-mediated hypermutation. *J. Virol.* 82, 1305-1313.
- Buhler,L., Awwad,M., Treter,S., Chang,Q., Basker,M., Alwayn,I.P., Teranishi,K., Ericsson,T., Moran,K., Harper,D., Kurilla-Mahon,B., Huang,C.A., Sackstein,R., Sykes,M., White-Scharf,M.E., Sachs,D.H., Down,J.D., and Cooper,D.K. (2002a). Pig hematopoietic cell chimerism in baboons conditioned with a nonmyeloablative regimen and CD154 blockade. *Transplantation* 73, 12-22.

- Buhler,L.H., Spitzer,T.R., Sykes,M., Sachs,D.H., Delmonico,F.L., Tolkoff-Rubin,N., Saidman,S.L., Sackstein,R., McAfee,S., Dey,B., Colby,C., and Cosimi,A.B. (2002b). Induction of kidney allograft tolerance after transient lymphohematopoietic chimerism in patients with multiple myeloma and end-stage renal disease. *Transplantation* 74, 1405-1409.
- Bulliard,Y., Turelli,P., Rohrig,U.F., Zoete,V., Mangeat,B., Michielin,O., and Trono,D. (2009). Functional analysis and structural modeling of human APOBEC3G reveal the role of evolutionarily conserved elements in the inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection and Alu transposition. *J. Virol.* 83, 12611-12621.
- Burnett,A. and Spearman,P. (2007). APOBEC3G multimers are recruited to the plasma membrane for packaging into human immunodeficiency virus type 1 virus-like particles in an RNA-dependent process requiring the NC basic linker. *J. Virol.* 81, 5000-5013.
- Byrne,G.W., McCurry,K.R., Martin,M.J., McClellan,S.M., Platt,J.L., and Logan,J.S. (1997). Transgenic pigs expressing human CD59 and decay-accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement-mediated damage. *Transplantation* 63, 149-155.
- Cen,S., Guo,F., Niu,M., Saadatmand,J., Deflassieux,J., and Kleiman,L. (2004). The interaction between HIV-1 Gag and APOBEC3G. *J. Biol. Chem.* 279, 33177-33184.
- Chapman,L.E., Folks,T.M., Salomon,D.R., Patterson,A.P., Eggerman,T.E., and Noguchi,P.D. (1995). Xenotransplantation and xenogeneic infections. *N. Engl. J. Med.* 333, 1498-1501.
- Chen,K., Huang,J., Zhang,C., Huang,S., Nunnari,G., Wang,F.X., Tong,X., Gao,L., Nikisher,K., and Zhang,H. (2006). Alpha interferon potently enhances the anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of APOBEC3G in resting primary CD4 T cells. *J. Virol.* 80, 7645-7657.
- Chen,R.H., Naficy,S., Logan,J.S., Diamond,L.E., and Adams,D.H. (1999). Hearts from transgenic pigs constructed with CD59/DAF genomic clones demonstrate improved survival in primates. *Xenotransplantation.* 6, 194-200.
- Chiu,Y.L. and Greene,W.C. (2008). The APOBEC3 cytidine deaminases: an innate defensive network opposing exogenous retroviruses and endogenous retroelements. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 317-353.
- Chiu,Y.L., Soros,V.B., Kreisberg,J.F., Stopak,K., Yonemoto,W., and Greene,W.C. (2005). Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature* 435, 108-114.
- Coffin,J.M., Hughes,S.H., and Varmus,H.E. (1997). *Retroviruses.* Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Conticello,S.G., Harris,R.S., and Neuberger,M.S. (2003). The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBEC3G. *Curr. Biol.* 13, 2009-2013.

- Conticello, S.G., Thomas, C.J., Petersen-Mahrt, S.K., and Neuberger, M.S. (2005). Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases. *Mol. Biol. Evol.* 22, 367-377.
- Cooper, D.K., Koren, E., and Oriol, R. (1993). Genetically engineered pigs. *Lancet* 342, 682-683.
- Cowan, P.J., Aminian, A., Barlow, H., Brown, A.A., Chen, C.G., Fisicaro, N., Francis, D.M., Goodman, D.J., Han, W., Kurek, M., Nottle, M.B., Pearce, M.J., Salvaris, E., Shinkel, T.A., Stainsby, G.V., Stewart, A.B., and d'Apice, A.J. (2000). Renal xenografts from triple-transgenic pigs are not hyperacutely rejected but cause coagulopathy in non-immunosuppressed baboons. *Transplantation* 69, 2504-2515.
- Cozzi, E., Masroor, S., Soin, B., Vial, C., and White, D.J. (2000). Progress in xenotransplantation. *Clin. Nephrol.* 53, suppl-8.
- Cozzi, E. and White, D.J. (1995). The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nat. Med.* 1, 964-966.
- Cullen, B.R. (2006). Role and mechanism of action of the APOBEC3 family of antiretroviral resistance factors. *J. Virol.* 80, 1067-1076.
- Czauderna, F., Fischer, N., Boller, K., Kurth, R., and Tönjes, R.R. (2000). Establishment and characterization of molecular clones of porcine endogenous retroviruses replicating on human cells. *J. Virol.* 74, 4028-4038.
- d'Apice, A.J. and Cowan, P.J. (2009). Xenotransplantation: the next generation of engineered animals. *Transpl. Immunol.* 21, 111-115.
- D'Souza, V. and Summers, M.F. (2005). How retroviruses select their genomes. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 643-655.
- Dai, Y., Vaught, T.D., Boone, J., Chen, S.H., Phelps, C.J., Ball, S., Monahan, J.A., Jobst, P.M., McCreath, K.J., Lamborn, A.E., Cowell-Lucero, J.L., Wells, K.D., Colman, A., Polejaeva, I.A., and Ayares, D.L. (2002). Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat. Biotechnol.* 20, 251-255.
- Dieckhoff, B., Kessler, B., Jobst, D., Kues, W., Petersen, B., Pfeifer, A., Kurth, R., Niemann, H., Wolf, E., and Denner, J. (2009). Distribution and expression of porcine endogenous retroviruses in multi-transgenic pigs generated for xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 16, 64-73.
- Doehle, B.P., Schafer, A., Wiegand, H.L., Bogerd, H.P., and Cullen, B.R. (2005). Differential sensitivity of murine leukemia virus to APOBEC3-mediated inhibition is governed by virion exclusion. *J. Virol.* 79, 8201-8207.
- Dolgin, E. (2010). Chronic controversy continues over mysterious XMRV virus. *Nat. Med.* 16, 832.
- Dor, F.J., Tseng, Y.L., Cheng, J., Moran, K., Sanderson, T.M., Lancos, C.J., Shimizu, A., Yamada, K., Awwad, M., Sachs, D.H., Hawley, R.J., Schuurman, H.J., and Cooper, D.K. (2004). alpha1,3-Galactosyltransferase gene-knockout miniature swine produce natural cytotoxic anti-Gal antibodies. *Transplantation* 78, 15-20.

- Dörrschuck,E., Fischer,N., Bravo,I.G., Hanschmann,K.M., Kuiper,H., Spötter,A., Möller,R., Cichutek,K., Münk,C., and Tönjes,R.R. (2011). Restriction of porcine endogenous retrovirus by porcine APOBEC3 cytidine deaminases. *J. Virol.* 85, 3842-3857.
- Drummond,A.J. and Rambaut,A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC. Evol. Biol.* 7, 214.
- Edgar,R.C. (2004a). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC. Bioinformatics.* 5, 113.
- Edgar,R.C. (2004b). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792-1797.
- Ellermann,V. and Bang,O. (1908). Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig.* 46, 595-609.
- Elliott,R.B., Escobar,L., Garkavenko,O., Croxson,M.C., Schroeder,B.A., McGregor,M., Ferguson,G., Beckman,N., and Ferguson,S. (2000). No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of encapsulated porcine islet xenografts. *Cell Transplant.* 9, 895-901.
- Elliott,R.B., Escobar,L., Tan,P.L., Muzina,M., Zwain,S., and Buchanan,C. (2007). Live encapsulated porcine islets from a type 1 diabetic patient 9.5 yr after xenotransplantation. *Xenotransplantation.* 14, 157-161.
- Ericsson,T.A., Takeuchi,Y., Templin,C., Quinn,G., Farhadian,S.F., Wood,J.C., Oldmixon,B.A., Suling,K.M., Ishii,J.K., Kitagawa,Y., Miyazawa,T., Salomon,D.R., Weiss,R.A., and Patience,C. (2003). Identification of receptors for pig endogenous retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 6759-6764.
- Evans,D.T., Serra-Moreno,R., Singh,R.K., and Guatelli,J.C. (2010). BST-2/tetherin: a new component of the innate immune response to enveloped viruses. *Trends Microbiol.* 18, 388-396.
- Fan,H. (1990). Influences of the long terminal repeats on retrovirus pathogenicity. *Sem. Virol.* 1, 165-174.
- FDA. Guidance for Industry: public health issues posed by the use of nonhuman primate xenografts in humans. 1-7. 1999. U.S.Department of Health and Human Services; Food and Drug Administration; Center for Biologics Evaluation and Research (CBER).
Ref Type: Pamphlet
- Fischer,A. and Cavazzana-Calvo,M. (2005). Integration of retroviruses: a fine balance between efficiency and danger. *PLoS. Med.* 2, e10.
- Fischer,N., Krach,U., Niebert,M., and Tönjes,R.R. (2003). Detection of porcine endogenous retrovirus (PERV) using highly specific antisera against Gag and Env. *Virology* 311, 222-228.
- Fishman,J.A. (1997). Xenosis and xenotransplantation: addressing the infectious risks posed by an emerging technology. *Kidney Int. Suppl* 58, S41-S45.

- Fishman, J.A. (1998). Infection and xenotransplantation. Developing strategies to minimize risk. *Ann N Y Acad Sci* 862, 52-66.
- Freed, E.O. and Martin, M.A. (2007). HIVs and their replication. In Field's Virology, D.M. Knipe and Howley P.M., eds. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins), pp. 2107-2186.
- Fuchimoto, Y., Huang, C.A., Yamada, K., Gleit, Z.L., Kitamura, H., Griesemer, A., Scheier-Dolberg, R., Melendy, E., White-Scharf, M.E., and Sachs, D.H. (2001). Induction of kidney allograft tolerance through mixed chimerism in miniature swine. *Transplant. Proc.* 33, 77.
- Gabuzda, D.H., Lawrence, K., Langhoff, E., Terwilliger, E., Dorfman, T., Haseltine, W.A., and Sodroski, J. (1992). Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4⁺ T lymphocytes. *J. Virol.* 66, 6489-6495.
- Galili, U., Macher, B.A., Buehler, J., and Shohet, S.B. (1985). Human natural anti-alpha-galactosyl IgG. II. The specific recognition of alpha (1----3)-linked galactose residues. *J. Exp. Med.* 162, 573-582.
- 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., and Hahn, B.H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature* 397, 436-441.
- Garkavenko, O., Croxson, M.C., Irgang, M., Karlas, A., Denner, J., and Elliott, R.B. (2004). Monitoring for presence of potentially xenotic viruses in recipients of pig islet xenotransplantation. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5353-5356.
- Goto, M., Maeda, A., Elfman, L., Suling, K.M., Wood, J.C., Patience, C., Groth, C.G., and Wennberg, L. (2004). No transmission of porcine endogenous retrovirus after transplantation of adult porcine islets into diabetic nude mice and immunosuppressed rats. *Xenotransplantation.* 11, 340-346.
- Goureau, A., Yerle, M., Schmitz, A., Riquet, J., Milan, D., Pinton, P., Frelat, G., and Gellin, J. (1996). Human and porcine correspondence of chromosome segments using bidirectional chromosome painting. *Genomics* 36, 252-262.
- Grimm, H. (2003a). Strategien zur Züchtung transgener Schweine für Xenotransplantate. In *Xenotransplantation: Grundlagen - Chancen - Risiken*, Schattauer GmbH Stuttgart), pp. 32-41.
- Grimm, H. (2003b). Xenogene porcine endogene Retroviren: Genetik und Wirtszellspezifität. In *Xenotransplantation: Grundlagen - Chancen - Risiken*, pp. 213-226.
- Groom, H.C., Yap, M.W., Galao, R.P., Neil, S.J., and Bishop, K.N. (2010). Susceptibility of xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) to retroviral restriction factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107, 5166-5171.
- Gross, P. and Oelgeschlager, T. (2006). Core promoter-selective RNA polymerase II transcription. *Biochem. Soc. Symp.* 225-236.

Groth,C.G., Korsgren,O., Tibell,A., Tollemar,J., Moller,E., Bolinder,J., Ostman,J., Reinholt,F.P., Hellerstrom,C., and Andersson,A. (1994). Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. *Lancet* 344, 1402-1404.

Groth,C.G., Korsgren,O., Wennberg,L., Song,Z., Wu,G., Reinholt,F., and Tibell,A. (1998). Pig-to-human islet transplantation. *Transplant. Proc.* 30, 3809-3810.

Guo,F., Cen,S., Niu,M., Saadatmand,J., and Kleiman,L. (2006). Inhibition of formula-primed reverse transcription by human APOBEC3G during human immunodeficiency virus type 1 replication. *J. Virol.* 80, 11710-11722.

Gustavsson,I. (1988). Standard karyotype of the domestic pig. Committee for the Standardized Karyotype of the Domestic Pig. *Hereditas* 109, 151-157.

Harari,A., Ooms,M., Mulder,L.C., and Simon,V. (2009). Polymorphisms and splice variants influence the antiretroviral activity of human APOBEC3H. *J. Virol.* 83, 295-303.

Harris,R.S. and Liddament,M.T. (2004). Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 868-877.

Harris,R.S., Petersen-Mahrt,S.K., and Neuberger,M.S. (2002). RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators. *Mol. Cell* 10, 1247-1253.

Hartl,I., Schneider,R.M., Sun,Y., Medvedovska,J., Chadwick,M.P., Russell,S.J., Cichutek,K., and Buchholz,C.J. (2005). Library-based selection of retroviruses selectively spreading through matrix metalloprotease-positive cells. *Gene Ther.* 12, 918-926.

Hatziioannou,T., Cowan,S., Goff,S.P., Bieniasz,P.D., and Towers,G.J. (2003). Restriction of multiple divergent retroviruses by Lv1 and Ref1. *EMBO J.* 22, 385-394.

Hatziioannou,T., Perez-Caballero,D., Yang,A., Cowan,S., and Bieniasz,P.D. (2004). Retrovirus resistance factors Ref1 and Lv1 are species-specific variants of TRIM5alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 10774-10779.

Hatziioannou,T., Princiotta,M., Piatak,M., Jr., Yuan,F., Zhang,F., Lifson,J.D., and Bieniasz,P.D. (2006). Generation of simian-tropic HIV-1 by restriction factor evasion. *Science* 314, 95.

Hawken,R.J., Murtaugh,J., Flickinger,G.H., Yerle,M., Robic,A., Milan,D., Gellin,J., Beattie,C.W., Schook,L.B., and Alexander,L.J. (1999). A first-generation porcine whole-genome radiation hybrid map. *Mamm. Genome* 10, 824-830.

Heinene,W., Switzer W.M., Soucie J.M., Evatt B.L., Shanmugam V., Rosales G.V., Matthews A., Sanstrom P., and Folks T.M. (2001). Evidence of porcine endogenous retroviruses in porcine factor VIII and evaluation of transmission to recipients with hemophilia. *J. Infect. Dis.* 183, 648-652.

Herniou,E., Martin,J., Miller,K., Cook,J., Wilkinson,M., and Tristem,M. (1998). Retroviral diversity and distribution in vertebrates. *J. Virol.* 72, 5955-5966.

Hirsch,M.S., Phillips,S.M., Solnik,C., Black,P.H., Schwartz,R.S., and Carpenter,C.B. (1972). Activation of leukemia viruses by graft-versus-host and mixed lymphocyte reactions in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 69, 1069-1072.

Holmes,R.K., Malim,M.H., and Bishop,K.N. (2007). APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing? *Trends Biochem. Sci.* 32, 118-128.

Irgang,M., Sauer,I.M., Karlas,A., Zeilinger,K., Gerlach,J.C., Kurth,R., Neuhaus,P., and Denner,J. (2003). Porcine endogenous retroviruses: no infection in patients treated with a bioreactor based on porcine liver cells. *J. Clin. Virol.* 28, 141-154.

Iwatani,Y., Takeuchi,H., Strebel,K., and Levin,J.G. (2006). Biochemical activities of highly purified, catalytically active human APOBEC3G: correlation with antiviral effect. *J. Virol.* 80, 5992-6002.

Jarmuz,A., Chester,A., Bayliss,J., Gisbourne,J., Dunham,I., Scott,J., and Navaratnam,N. (2002). An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics* 79, 285-296.

Jern,P., Russell,R.A., Pathak,V.K., and Coffin,J.M. (2009). Likely role of APOBEC3G-mediated G-to-A mutations in HIV-1 evolution and drug resistance. *PLoS. Pathog.* 5, e1000367.

Jern,P., Stoye,J.P., and Coffin,J.M. (2007). Role of APOBEC3 in genetic diversity among endogenous murine leukemia viruses. *PLoS. Genet.* 3, 2014-2022.

Jonsson,S.R., Hache,G., Stenglein,M.D., Fahrenkrug,S.C., Andresdottir,V., and Harris,R.S. (2006). Evolutionarily conserved and non-conserved retrovirus restriction activities of artiodactyl APOBEC3F proteins. *Nucleic Acids Res.* 34, 5683-5694.

Jonsson,S.R., Larue,R.S., Stenglein,M.D., Fahrenkrug,S.C., Andresdottir,V., and Harris,R.S. (2007). The Restriction of Zoonotic PERV Transmission by Human APOBEC3G. *PLoS. ONE.* 2, e893.

Khan,M.A., Goila-Gaur,R., Kao,S., Miyagi,E., Walker,R.C., Jr., and Strebel,K. (2009). Encapsidation of APOBEC3G into HIV-1 virions involves lipid raft association and does not correlate with APOBEC3G oligomerization. *Retrovirology.* 6, 99.

Khan,M.A., Goila-Gaur,R., Opi,S., Miyagi,E., Takeuchi,H., Kao,S., and Strebel,K. (2007). Analysis of the contribution of cellular and viral RNA to the packaging of APOBEC3G into HIV-1 virions. *Retrovirology.* 4, 48.

Khan,M.A., Kao,S., Miyagi,E., Takeuchi,H., Goila-Gaur,R., Opi,S., Gipson,C.L., Parslow,T.G., Ly,H., and Strebel,K. (2005). Viral RNA is required for the association of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleoprotein complexes. *J. Virol.* 79, 5870-5874.

Klymiuk,N., Aigner,B., Brem,G., and Wolf,E. (2010). Genetic modification of pigs as organ donors for xenotransplantation. *Mol. Reprod. Dev.* 77, 209-221.

Knippers,R. (1995). Spleißen und Prozessieren. In *Molekulare Genetik*, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York), pp. 379-401.

- Kobayashi,M., Takaori-Kondo,A., Shindo,K., Abudu,A., Fukunaga,K., and Uchiyama,T. (2004). APOBEC3G targets specific virus species. *J. Virol.* 78, 8238-8244.
- Kolber-Simonds,D., Lai,L., Watt,S.R., Denaro,M., Arn,S., Augenstein,M.L., Betthausen,J., Carter,D.B., Greenstein,J.L., Hao,Y., Im,G.S., Liu,Z., Mell,G.D., Murphy,C.N., Park,K.W., Rieke,A., Ryan,D.J., Sachs,D.H., Forsberg,E.J., Prather,R.S., and Hawley,R.J. (2004). Production of alpha-1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 7335-7340.
- Krach,U., Fischer,N., Czauderna,F., and Tönjes,R.R. (2001). Comparison of replication-competent molecular clones of porcine endogenous retrovirus class A and class B derived from pig and human cells. *J Virol* 75, 5465-5472.
- Kuwaki,K., Tseng,Y.L., Dor,F.J., Shimizu,A., Houser,S.L., Sanderson,T.M., Lancos,C.J., Prabharasuth,D.D., Cheng,J., Moran,K., Hisashi,Y., Mueller,N., Yamada,K., Greenstein,J.L., Hawley,R.J., Patience,C., Awwad,M., Fishman,J.A., Robson,S.C., Schuurman,H.J., Sachs,D.H., and Cooper,D.K. (2005). Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat. Med.* 11, 29-31.
- Lai,L., Kolber-Simonds,D., Park,K.W., Cheong,H.T., Greenstein,J.L., Im,G.S., Samuel,M., Bonk,A., Rieke,A., Day,B.N., Murphy,C.N., Carter,D.B., Hawley,R.J., and Prather,R.S. (2002). Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295, 1089-1092.
- Langford,G.A., Yannoutsos,N., Cozzi,E., Lancaster,R., Elsome,K., Chen,P., Richards,A., and White,D.J. (1994). Production of pigs transgenic for human decay accelerating factor. *Transplant. Proc.* 26, 1400-1401.
- Langlois,M.A., Kemmerich,K., Rada,C., and Neuberger,M.S. (2009). The AKV murine leukemia virus is restricted and hypermutated by mouse APOBEC3. *J. Virol.* 83, 11550-11559.
- Larue,R.S., Andresdottir,V., Blanchard,Y., Conticello,S.G., Derse,D., Emerman,M., Greene,W.C., Jonsson,S.R., Landau,N.R., Löchelt,M., Malik,H.S., Malim,M.H., Münk,C., O'Brien,S.J., Pathak,V.K., Strebel,K., Wain-Hobson,S., Yu,X.F., Yuhki,N., and Harris,R.S. (2009). Guidelines for naming nonprimate APOBEC3 genes and proteins. *J. Virol.* 83, 494-497.
- Larue,R.S., Jonsson,S.R., Silverstein,K.A., Lajoie,M., Bertrand,D., El Mabrouk,N., Hotzel,I., Andresdottir,V., Smith,T.P., and Harris,R.S. (2008). The artiodactyl APOBEC3 innate immune repertoire shows evidence for a multi-functional domain organization that existed in the ancestor of placental mammals. *BMC. Mol. Biol.* 9, 104.
- Le Tissier,P., Stoye,J.P., Takeuchi,Y., Patience,C., and Weiss,R.A. (1997). Two sets of human-tropic pig retrovirus. *Nature* 389, 681-682.
- Lecossier,D., Bouchonnet,F., Clavel,F., and Hance,A.J. (2003). Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science* 300, 1112.

- Lee,Y.N., Malim,M.H., and Bieniasz,P.D. (2008). Hypermutation of an ancient human retrovirus by APOBEC3G. *J. Virol.* 82, 8762-8770.
- Levy,J.A., Datta,S.K., and Schwartz,R.S. (1977). Recovery of xenotropic virus but not ecotropic virus during graft-versus-host reaction in mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 7, 262-268.
- Limjoco,T.I., Dickie,P., Ikeda,H., and Silver,J. (1993). Transgenic Fv-4 mice resistant to Friend virus. *J. Virol.* 67, 4163-4168.
- Liu,B., Yu,X., Luo,K., Yu,Y., and Yu,X.F. (2004). Influence of primate lentiviral Vif and proteasome inhibitors on human immunodeficiency virus type 1 virion packaging of APOBEC3G. *J. Virol.* 78, 2072-2081.
- Lo,S.C., Pripuzova,N., Li,B., Komaroff,A.L., Hung,G.C., Wang,R., and Alter,H.J. (2010). Detection of MLV-related virus gene sequences in blood of patients with chronic fatigue syndrome and healthy blood donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Lombardi,V.C., Ruscetti,F.W., Das,G.J., Pfof,M.A., Hagen,K.S., Peterson,D.L., Ruscetti,S.K., Bagni,R.K., Petrow-Sadowski,C., Gold,B., Dean,M., Silverman,R.H., and Mikovits,J.A. (2009). Detection of an infectious retrovirus, XMRV, in blood cells of patients with chronic fatigue syndrome. *Science* 326, 585-589.
- Luo,K., Liu,B., Xiao,Z., Yu,Y., Yu,X., Gorelick,R., and Yu,X.F. (2004). Amino-terminal region of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid is required for human APOBEC3G packaging. *J. Virol.* 78, 11841-11852.
- Luo,K., Wang,T., Liu,B., Tian,C., Xiao,Z., Kappes,J., and Yu,X.F. (2007). Cytidine deaminases APOBEC3G and APOBEC3F interact with human immunodeficiency virus type 1 integrase and inhibit proviral DNA formation. *J. Virol.* 81, 7238-7248.
- Madani,N. and Kabat,D. (1998). An endogenous inhibitor of human immunodeficiency virus in human lymphocytes is overcome by the viral Vif protein. *J. Virol.* 72, 10251-10255.
- Mangeat,B., Turelli,P., Caron,G., Friedli,M., Perrin,L., and Trono,D. (2003). Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424, 99-103.
- Mariani,R., Chen,D., Schröfelbauer,B., Navarro,F., König,R., Bollman,B., Münk,C., Nymark-McMahon,H., and Landau,N.R. (2003). Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* 114, 21-31.
- Marin,M., Rose,K.M., Kozak,S.L., and Kabat,D. (2003). HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat. Med.* 9, 1398-1403.
- Martin,U., Kiessig,V., Blusch,J.H., Haverich,A., von der,H.K., Herden,T., and Steinhoff,G. (1998). Expression of pig endogenous retrovirus by primary porcine endothelial cells and infection of human cells. *Lancet* 352, 692-694.
- Martin,U., Tacke,S.J., Simon,A.R., Schroder,C., Wiebe,K., Lapin,B., Haverich,A., Denner,J., and Steinhoff,G. (2002). Absence of PERV specific humoral immune

response in baboons after transplantation of porcine cells or organs. *Transpl. Int.* 15, 361-368.

Martin,U., Winkler,M.E., Id,M., Radecke,H., Arseniev,L., Groteluschen,R., Simon,A.R., and Steinhoff,G. (2000a). Transmission of pig endogenous retrovirus to primary human cells. *Transplant. Proc.* 32, 1157.

Martin,U., Winkler,M.E., Id,M., Radeke,H., Arseniev,L., Takeuchi,Y., Simon,A.R., Patience,C., Haverich,A., and Steinhoff,G. (2000b). Productive infection of primary human endothelial cells by pig endogenous retrovirus (PERV). *Xenotransplantation.* 7, 138-142.

Mattiuzzo,G., Ivol,S., and Takeuchi,Y. (2010). Regulation of porcine endogenous retrovirus release by porcine and human tetherins. *J. Virol.* 84, 2618-2622.

Mbisa,J.L., Barr,R., Thomas,J.A., Vandegraaff,N., Dorweiler,I.J., Svarovskaia,E.S., Brown,W.L., Mansky,L.M., Gorelick,R.J., Harris,R.S., Engelman,A., and Pathak,V.K. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 cDNAs produced in the presence of APOBEC3G exhibit defects in plus-strand DNA transfer and integration. *J. Virol.* 81, 7099-7110.

Mbisa,J.L., Bu,W., and Pathak,V.K. (2010). APOBEC3F and APOBEC3G inhibit HIV-1 DNA integration by different mechanisms. *J. Virol.* 84, 5250-5259.

McGregor,C.G., Davies,W.R., Oi,K., Teotia,S.S., Schirmer,J.M., Risdahl,J.M., Tazelaar,H.D., Kremers,W.K., Walker,R.C., Byrne,G.W., and Logan,J.S. (2005). Cardiac xenotransplantation: recent preclinical progress with 3-month median survival. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 130, 844-851.

Mehle,A., Goncalves,J., Santa-Marta,M., McPike,M., and Gabuzda,D. (2004). Phosphorylation of a novel SOCS-box regulates assembly of the HIV-1 Vif-Cul5 complex that promotes APOBEC3G degradation. *Genes Dev.* 18, 2861-2866.

Mehta,A., Kinter,M.T., Sherman,N.E., and Driscoll,D.M. (2000). Molecular cloning of apobec-1 complementation factor, a novel RNA-binding protein involved in the editing of apolipoprotein B mRNA. *Mol. Cell Biol.* 20, 1846-1854.

Menoret,S., Plat,M., Blancho,G., Martinat-Botte,F., Bernard,P., Karam,G., Tesson,L., Renaudin,K., Guillouet,P., Weill,B., Chereau,C., Houdebine,L.M., Soullillou,J.P., Terqui,M., and Anegon,I. (2004). Characterization of human CD55 and CD59 transgenic pigs and kidney xenotransplantation in the pig-to-baboon combination. *Transplantation* 77, 1468-1471.

Meyer,T., Hocht,B., and Ulrichs,K. (2008). Xenogeneic islet transplantation of microencapsulated porcine islets for therapy of type I diabetes: long-term normoglycemia in STZ-diabetic rats without immunosuppression. *Pediatr. Surg. Int.* 24, 1375-1378.

Michaels,M.G., Jenkins,F.J., St George,K., Nalesnik,M.A., Starzl,T.E., and Rinaldo,C.R., Jr. (2001). Detection of infectious baboon cytomegalovirus after baboon-to-human liver xenotransplantation. *J. Virol.* 75, 2825-2828.

- Michaels,M.G., McMichael,J.P., Brasky,K., Kalter,S., Peters,R.L., Starzl,T.E., and Simmons,R.L. (1994). Screening donors for xenotransplantation. The potential for xenozoonoses. *Transplantation* 57, 1462-1465.
- Milan,D., Hawken,R., Cabau,C., Leroux,S., Genet,C., Lahbib,Y., Tosser,G., Robic,A., Hatey,F., Alexander,L., Beattie,C., Schook,L., Yerle,M., and Gellin,J. (2000). IMpRH server: an RH mapping server available on the Web. *Bioinformatics*. 16, 558-559.
- Miyagi,E., Brown,C.R., Opi,S., Khan,M., Goila-Gaur,R., Kao,S., Walker,R.C., Jr., Hirsch,V., and Strebel,K. (2010). Stably expressed APOBEC3F has negligible antiviral activity. *J. Virol.* 84, 11067-11075.
- Miyagi,E., Opi,S., Takeuchi,H., Khan,M., Goila-Gaur,R., Kao,S., and Strebel,K. (2007). Enzymatically active APOBEC3G is required for efficient inhibition of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 81, 13346-13353.
- Miyauchi,K., Kim,Y., Latinovic,O., Morozov,V., and Melikyan,G.B. (2009). HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. *Cell* 137, 433-444.
- Moalic,Y., Blanchard,Y., Felix,H., and Jestin,A. (2006). Porcine endogenous retrovirus integration sites in the human genome: features in common with those of murine leukemia virus. *J. Virol.* 80, 10980-10988.
- Modrow,S., Falke,D., and Truyen U. (2003). Retroviren. In *Molekulare Virologie*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg · Berlin), pp. 390-448.
- Muckenfuss,H., Hamdorf,M., Held,U., Perkovic,M., Löwer,J., Cichutek,K., Flory,E., Schumann,G.G., and Münk,C. (2006). APOBEC3 proteins inhibit human LINE-1 retrotransposition. *J. Biol. Chem.* 281, 22161-22172.
- Muckenfuss,H., Kaiser,J.K., Krebil,E., Battenberg,M., Schwer,C., Cichutek,K., Münk,C., and Flory,E. (2007). Sp1 and Sp3 regulate basal transcription of the human APOBEC3G gene. *Nucleic Acids Res.* 35, 3784-3796.
- Mulder,L.C., Harari,A., and Simon,V. (2008). Cytidine deamination induced HIV-1 drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 5501-5506.
- Mullis,K.B. and Faloona,F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350.
- Münk,C., Beck,T., Zielonka,J., Hotz-Wagenblatt,A., Chareza,S., Battenberg,M., Thielebein,J., Cichutek,K., Bravo,I.G., O'Brien,S.J., Löchelt,M., and Yuhki,N. (2008). Functions, structure, and read-through alternative splicing of feline APOBEC3 genes. *Genome Biol.* 9, R48.
- Muramatsu,M., Kinoshita,K., Fagarasan,S., Yamada,S., Shinkai,Y., and Honjo,T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553-563.
- Muramatsu,M., Sankaranand,V.S., Anant,S., Sugai,M., Kinoshita,K., Davidson,N.O., and Honjo,T. (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase

(AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J. Biol. Chem.* 274, 18470-18476.

Murphy,W.J., Eizirik,E., Johnson,W.E., Zhang,Y.P., Ryder,O.A., and O'Brien,S.J. (2001). Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. *Nature* 409, 614-618.

Murphy,W.J., Pevzner,P.A., and O'Brien,S.J. (2004). Mammalian phylogenomics comes of age. *Trends Genet.* 20, 631-639.

Murphy,W.J., Pringle,T.H., Crider,T.A., Springer,M.S., and Miller,W. (2007). Using genomic data to unravel the root of the placental mammal phylogeny. *Genome Res.* 17, 413-421.

Nakayama,E.E., Miyoshi,H., Nagai,Y., and Shioda,T. (2005). A specific region of 37 amino acid residues in the SPRY (B30.2) domain of African green monkey TRIM5alpha determines species-specific restriction of simian immunodeficiency virus SIVmac infection. *J. Virol.* 79, 8870-8877.

Naldini,L., Blomer,U., Gallay,P., Ory,D., Mulligan,R., Gage,F.H., Verma,I.M., and Trono,D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-267.

Navarro,F., Bollman,B., Chen,H., König,R., Yu,Q., Chiles,K., and Landau,N.R. (2005). Complementary function of the two catalytic domains of APOBEC3G. *Virology* 333, 374-386.

Neil,S.J., Sandrin,V., Sundquist,W.I., and Bieniasz,P.D. (2007). An interferon-alpha-induced tethering mechanism inhibits HIV-1 and Ebola virus particle release but is counteracted by the HIV-1 Vpu protein. *Cell Host. Microbe* 2, 193-203.

Neil,S.J., Zang,T., and Bieniasz,P.D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451, 425-430.

Newman,E.N., Holmes,R.K., Craig,H.M., Klein,K.C., Lingappa,J.R., Malim,M.H., and Sheehy,A.M. (2005). Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity. *Curr. Biol.* 15, 166-170.

Niebert,M., Rogel-Gaillard,C., Chardon,P., and Tönjes,R.R. (2002). Characterization of chromosomally assigned replication-competent gamma porcine endogenous retroviruses derived from a large white pig and expression in human cells. *J. Virol.* 76, 2714-2720.

Niebert,M. and Tönjes,R.R. (2005). Evolutionary spread and recombination of porcine endogenous retroviruses in the suiformes. *J. Virol.* 79, 649-654.

OhAinle,M., Kerns,J.A., Malik,H.S., and Emerman,M. (2006). Adaptive evolution and antiviral activity of the conserved mammalian cytidine deaminase APOBEC3H. *J. Virol.* 80, 3853-3862.

Okeoma,C.M., Petersen,J., and Ross,S.R. (2009). Expression of murine APOBEC3 alleles in different mouse strains and their effect on mouse mammary tumor virus infection. *J. Virol.* 83, 3029-3038.

- Opi,S., Takeuchi,H., Kao,S., Khan,M.A., Miyagi,E., Goila-Gaur,R., Iwatani,Y., Levin,J.G., and Strebel,K. (2006). Monomeric APOBEC3G is catalytically active and has antiviral activity. *J. Virol.* 80, 4673-4682.
- Osoegawa,K., Woon,P.Y., Zhao,B., Frengen,E., Tateno,M., Catanese,J.J., and de Jong,P.J. (1998). An improved approach for construction of bacterial artificial chromosome libraries. *Genomics* 52, 1-8.
- Paprotka,T., Venkatachari,N.J., Chaipan,C., Burdick,R., Delviks-Frankenberry,K.A., Hu,W.S., and Pathak,V.K. (2010). Inhibition of xenotropic murine leukemia virus-related virus by APOBEC3 proteins and antiviral drugs. *J. Virol.* 84, 5719-5729.
- Paradis,K., Langford,G., Long,Z., Heneine,W., Sandstrom,P., Switzer,W.M., Chapman,L.E., Lockey,C., Onions,D., and Otto,E. (1999). Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. *Science* 285, 1236-1241.
- Patience,C., Switzer,W.M., Takeuchi,Y., Griffiths,D.J., Goward,M.E., Heneine,W., Stoye,J.P., and Weiss,R.A. (2001). Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species. *J. Virol.* 75, 2771-2775.
- Patience,C., Takeuchi,Y., and Weiss,R.A. (1997). Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat. Med.* 3, 282-286.
- Peng,G., Lei,K.J., Jin,W., Greenwell-Wild,T., and Wahl,S.M. (2006). Induction of APOBEC3 family proteins, a defensive maneuver underlying interferon-induced anti-HIV-1 activity. *J. Exp. Med.* 203, 41-46.
- Perez-Caballero,D., Hatzioannou,T., Yang,A., Cowan,S., and Bieniasz,P.D. (2005). Human tripartite motif 5alpha domains responsible for retrovirus restriction activity and specificity. *J. Virol.* 79, 8969-8978.
- Perkovic,M., Schmidt,S., Marino,D., Russell,R.A., Stauch,B., Hofmann,H., Kopietz,F., Kloke,B.P., Zielonka,J., Strover,H., Hermle,J., Lindemann,D., Pathak,V.K., Schneider,G., Löchelt,M., Cichutek,K., and Münk,C. (2009). Species-specific inhibition of APOBEC3C by the prototype foamy virus protein bet. *J. Biol. Chem.* 284, 5819-5826.
- Perron,M.J., Stremlau,M., Song,B., Ulm,W., Mulligan,R.C., and Sodroski,J. (2004). TRIM5alpha mediates the postentry block to N-tropic murine leukemia viruses in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 11827-11832.
- Phelps,C.J., Koike,C., Vaught T.D., Boone J., Wells K.D., Chen S.H., Ball S., Specht S.M., Polejaeva I.A., Monahan J.A., Jobst P.M., Sharma S.B., Lamborn A.E., Garst A.S., Moore M., Demetris A.J., Rudert W.A., Bottino R., Bertera S., Trucco M., Starzl T.E., Dai Y., and Ayares D.L. (2003). Production of α 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 299, 411-414.
- Platt,J.L., Fischel,R.J., Matas,A.J., Reif,S.A., Bolman,R.M., and Bach,F.H. (1991). Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model. *Transplantation* 52, 214-220.

- Prasad,A.B., Allard,M.W., and Green,E.D. (2008). Confirming the phylogeny of mammals by use of large comparative sequence data sets. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1795-1808.
- Preuss,T., Fischer,N., Boller,K., and Tönjes,R.R. (2006). Isolation and characterization of an infectious replication-competent molecular clone of ecotropic porcine endogenous retrovirus class C. *J Virol* 80, 10258-10261.
- REEMTSMA,K., MCCRACKEN,B.H., SCHLEGEL,J.U., PEARL,M.A., PEARCE,C.W., DEWITT,C.W., SMITH,P.E., HEWITT,R.L., FLINNER,R.L., and CREECH,O., Jr. (1964). Renal heterotransplantation in man. *Ann. Surg.* 160, 384-410.
- Refsland,E.W., Stenglein,M.D., Shindo,K., Albin,J.S., Brown,W.L., and Harris,R.S. (2010). Quantitative profiling of the full APOBEC3 mRNA repertoire in lymphocytes and tissues: implications for HIV-1 restriction. *Nucleic Acids Res.* 38, 4274-4284.
- Rettenberger,G., Bruch,J., Fries,R., Archibald,A.L., and Hameister,H. (1996). Assignment of 19 porcine type I loci by somatic cell hybrid analysis detects new regions of conserved synteny between human and pig. *Mamm. Genome* 7, 275-279.
- Rink,A., Santschi,E.M., Eyer,K.M., Roelofs,B., Hess,M., Godfrey,M., Karajusuf,E.K., Yerle,M., Milan,D., and Beattie,C.W. (2002). A first-generation EST RH comparative map of the porcine and human genome. *Mamm. Genome* 13, 578-587.
- Rogozin,I.B., Basu,M.K., Jordan,I.K., Pavlov,Y.I., and Koonin,E.V. (2005). APOBEC4, a new member of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases predicted by computational analysis. *Cell Cycle* 4, 1281-1285.
- Rous,P. (1911). A SARCOMA OF THE FOWL TRANSMISSIBLE BY AN AGENT SEPARABLE FROM THE TUMOR CELLS. *J. Exp. Med.* 13, 397-411.
- Sachs,D.H. (2000). Mixed chimerism as an approach to transplantation tolerance. *Clin. Immunol.* 95, S63-S68.
- Saiki,R.K., Scharf,S., Faloona,F., Mullis,K.B., Horn,G.T., Erlich,H.A., and Arnheim,N. (1992). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Biotechnology* 24, 476-480.
- Sakai,H., Shibata,R., Sakuragi,J., Sakuragi,S., Kawamura,M., and Adachi,A. (1993). Cell-dependent requirement of human immunodeficiency virus type 1 Vif protein for maturation of virus particles. *J. Virol.* 67, 1663-1666.
- Sambrook,J., Fritsch E.F., and Maniatis T. (1989). Analysis and Cloning of Eucaryotic Genomic DNA. In *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, p. 9.14-9.19.
- Sauer,I.M., Kardassis,D., Zeillinger,K., Pascher,A., Gruenwald,A., Pless,G., Irgang,M., Kraemer,M., Puhl,G., Frank,J., Muller,A.R., Steinmuller,T., Denner,J., Neuhaus,P., and Gerlach,J.C. (2003). Clinical extracorporeal hybrid liver support--phase I study with primary porcine liver cells. *Xenotransplantation.* 10, 460-469.

- Sawyer,S.L., Wu,L.I., Emerman,M., and Malik,H.S. (2005). Positive selection of primate TRIM5alpha identifies a critical species-specific retroviral restriction domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 2832-2837.
- Schafer,A., Bogerd,H.P., and Cullen,B.R. (2004). Specific packaging of APOBEC3G into HIV-1 virions is mediated by the nucleocapsid domain of the gag polyprotein precursor. *Virology* 328, 163-168.
- Schaller,T., Hue,S., and Towers,G.J. (2007). An active TRIM5 protein in rabbits indicates a common antiviral ancestor for mammalian TRIM5 proteins. *J. Virol.* 81, 11713-11721.
- Scheef,G., Fischer,N., Krach,U., and Tönjes,R.R. (2001). The number of a U3 repeat box acting as an enhancer in long terminal repeats of polytropic replication-competent porcine endogenous retroviruses dynamically fluctuates during serial virus passages in human cells. *J. Virol.* 75, 6933-6940.
- Schlaberg,R., Choe,D.J., Brown,K.R., Thaker,H.M., and Singh,I.R. (2009). XMRV is present in malignant prostatic epithelium and is associated with prostate cancer, especially high-grade tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 16351-16356.
- Schmoeckel,M., Nollert,G., Shahmohammadi,M., Young,V.K., Chavez,G., Kasper-Konig,W., White,D.J., Muller-Hocker,J., Arendt,R.M., Wilbert-Lampen,U., Hammer,C., and Reichart,B. (1996). Prevention of hyperacute rejection by human decay accelerating factor in xenogeneic perfused working hearts. *Transplantation* 62, 729-734.
- Schröfelbauer,B., Yu,Q., Zeitlin,S.G., and Landau,N.R. (2005). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces the degradation of the UNG and SMUG uracil-DNA glycosylases. *J. Virol.* 79, 10978-10987.
- Sebastian,S. and Luban,J. (2005). TRIM5alpha selectively binds a restriction-sensitive retroviral capsid. *Retrovirology*. 2, 40.
- Shao,Q., Wang,Y., Hildreth,J.E., and Liu,B. (2010). Polyubiquitination of APOBEC3G is essential for its degradation by HIV-1 Vif. *J. Virol.* 84, 4840-4844.
- Shapiro,A.L., Vinuela,E., and Maizel,J.V., Jr. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 815-820.
- Sheehy,A.M., Gaddis,N.C., Choi,J.D., and Malim,M.H. (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418, 646-650.
- Sheehy,A.M., Gaddis,N.C., and Malim,M.H. (2003). The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat. Med.* 9, 1404-1407.
- Shimodaira,H. and Hasegawa,M. (1999). Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Mol. Biol. Evol.* 16, 1114-1116.

- Simon,A.R., Templin,C., Schröder,C., Laaff,G., Tessmann,R., Winkler,M.E., Tacke,S., Denner,J., Lapin,B., Chikobava,M., Patience,C., Steinhoff,G., Agrba,V.Z., Haverich,A., and Martin,U. (2003). No evidence for productive PERV infection of baboon cells in in vivo infection model. *Ann. Transplant.* 8, 24-34.
- Simon,J.H., Gaddis,N.C., Fouchier,R.A., and Malim,M.H. (1998). Evidence for a newly discovered cellular anti-HIV-1 phenotype. *Nat. Med.* 4, 1397-1400.
- Solez,K., Axelsen,R.A., Benediktsson,H., Burdick,J.F., Cohen,A.H., Colvin,R.B., Croker,B.P., Droz,D., Dunnill,M.S., Halloran,P.F., and . (1993). International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int.* 44, 411-422.
- Song,B., Javanbakht,H., Perron,M., Park,D.H., Stremlau,M., and Sodroski,J. (2005). Retrovirus restriction by TRIM5alpha variants from Old World and New World primates. *J. Virol.* 79, 3930-3937.
- Soros,V.B., Yonemoto,W., and Greene,W.C. (2007). Newly synthesized APOBEC3G is incorporated into HIV virions, inhibited by HIV RNA, and subsequently activated by RNase H. *PLoS. Pathog.* 3, e15.
- Sova,P. and Volsky,D.J. (1993). Efficiency of viral DNA synthesis during infection of permissive and nonpermissive cells with vif-negative human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 67, 6322-6326.
- Stamatakis,A. (2006a). Poster: Phylogenetic models of rate heterogeneity: a high performance computing perspective. IPDPS 2006, Rhodos (Greece).
- Stamatakis,A. (2006b). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics.* 22, 2688-2690.
- Stamatakis,A., Ludwig,T., and Meier,H. (2005). RAxML-III: a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. *Bioinformatics.* 21, 456-463.
- Starzl,T.E., MARCHIORO,T.L., PETERS,G.N., KIRKPATRICK,C.H., WILSON,W.E., PORTER,K.A., RIFKIND,D., OGDEN,D.A., HITCHCOCK,C.R., and WADDELL,W.R. (1964). RENAL HETEROTRANSPLANTATION FROM BABOON TO MAN: EXPERIENCE WITH 6 CASES. *Transplantation* 2, 752-776.
- Stauch,B., Hofmann,H., Perkovic,M., Weisel,M., Kopietz,F., Cichutek,K., Münk,C., and Schneider,G. (2009). Model structure of APOBEC3C reveals a binding pocket modulating ribonucleic acid interaction required for encapsidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 12079-12084.
- Stieler,K. and Fischer,N. (2010). Apobec 3G efficiently reduces infectivity of the human exogenous gammaretrovirus XMRV. *PLoS. ONE.* 5, e11738.
- Stopak,K., de Noronha,C., Yonemoto,W., and Greene,W.C. (2003). HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol. Cell* 12, 591-601.

- Stoye, J.P. and Coffin, J.M. (1995). The dangers of xenotransplantation. *Nat. Med.* **1**, 1100.
- Strachan, T., Read, A., and National Center for Biotechnology Information (U.S.) (1999). RNA processing. In *Human Molecular Genetics 2* [electronic resource], New York: Wiley-Liss, ed. BIOS Scientific).
- Strebel, K., Daugherty, D., Clouse, K., Cohen, D., Folks, T., and Martin, M.A. (1987). The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* **328**, 728-730.
- Stremlau, M., Owens, C.M., Perron, M.J., Kiessling, M., Autissier, P., and Sodroski, J. (2004). The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* **427**, 848-853.
- Stremlau, M., Perron, M., Lee, M., Li, Y., Song, B., Javanbakht, H., Diaz-Griffero, F., Anderson, D.J., Sundquist, W.I., and Sodroski, J. (2006). Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 5514-5519.
- Stremlau, M., Perron, M., Welikala, S., and Sodroski, J. (2005). Species-specific variation in the B30.2(SPRY) domain of TRIM5alpha determines the potency of human immunodeficiency virus restriction. *J. Virol.* **79**, 3139-3145.
- Suchard, M.A., Weiss, R.E., and Sinsheimer, J.S. (2001). Bayesian selection of continuous-time Markov chain evolutionary models. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 1001-1013.
- Suggs, S.V., Wallace, R.B., Hirose, T., Kawashima, E.H., and Itakura, K. (1981). Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **78**, 6613-6617.
- Suspene, R., Sommer, P., Henry, M., Ferris, S., Guetard, D., Pochet, S., Chester, A., Navaratnam, N., Wain-Hobson, S., and Vartanian, J.P. (2004). APOBEC3G is a single-stranded DNA cytidine deaminase and functions independently of HIV reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res.* **32**, 2421-2429.
- Suyama, M., Torrents, D., and Bork, P. (2006). PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. *Nucleic Acids Res.* **34**, W609-W612.
- Svarovskaia, E.S., Xu, H., Mbisa, J.L., Barr, R., Gorelick, R.J., Ono, A., Freed, E.O., Hu, W.S., and Pathak, V.K. (2004). Human apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) is incorporated into HIV-1 virions through interactions with viral and nonviral RNAs. *J. Biol. Chem.* **279**, 35822-35828.
- Swick, A.G., Blake, M.C., Kahn, J.W., and Azizkhan, J.C. (1989). Functional analysis of GC element binding and transcription in the hamster dihydrofolate reductase gene promoter. *Nucleic Acids Res.* **17**, 9291-9304.
- Switzer, W.M., Michler, R.E., Shanmugam, V., Matthews, A., Hussain, A.I., Wright, A., Sandstrom, P., Chapman, L.E., Weber, C., Safley, S., Denny, R.R., Navarro, A., Evans, V., Norin, A.J., Kwiatkowski, P., and Heneine, W. (2001). Lack of cross-species

transmission of porcine endogenous retrovirus infection to nonhuman primate recipients of porcine cells, tissues, or organs. *Transplantation* 71, 959-965.

Sykes,M. and Sachs,D.H. (1988). Mixed allogeneic chimerism as an approach to transplantation tolerance. *Immunol. Today* 9, 23-27.

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

Takahagi,Y., Fujimura,T., Miyagawa,S., Nagashima,H., Shigehisa,T., Shirakura,R., and Murakami,H. (2005). Production of alpha 1,3-galactosyltransferase gene knockout pigs expressing both human decay-accelerating factor and N-acetylglucosaminyltransferase III. *Mol. Reprod. Dev.* 71, 331-338.

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

Tanaka,Y., Marusawa,H., Seno,H., Matsumoto,Y., Ueda,Y., Kodama,Y., Endo,Y., Yamauchi,J., Matsumoto,T., Takaori-Kondo,A., Ikai,I., and Chiba,T. (2006). Anti-viral protein APOBEC3G is induced by interferon-alpha stimulation in human hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341, 314-319.

Teng,B., Burant,C.F., and Davidson,N.O. (1993). Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein. *Science* 260, 1816-1819.

Tibell,A., Groth,C.G., Moller,E., Korsgren,O., Andersson,A., and Hellerstrom,C. (1994). Pig-to-human islet transplantation in eight patients. *Transplant. Proc.* 26, 762-763.

Todaro,G.J., Scolnick,E.M., Parks,W.P., Livingston,D.M., and Aaronson,S.A. (1973). Detection of type C viruses in normal and transformed cells. *Johns. Hopkins. Med. J. Suppl* 2, 231-244.

Tönjes,R.R. (1999). Xenogene porcine endogene Retroviren: Genanalysen und Replikationsverhalten. *Transplantationsmedizin* 11, 208-216.

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

Tönjes,R.R. and Niebert,M. (2003). Relative age of proviral porcine endogenous retrovirus sequences in *Sus scrofa* based on the molecular clock hypothesis. *J. Virol.* 77, 12363-12368.

Towbin,H., Staehelin,T., and Gordon,J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76, 4350-4354.

Urisman,A., Molinaro,R.J., Fischer,N., Plummer,S.J., Casey,G., Klein,E.A., Malathi,K., Magi-Galluzzi,C., Tubbs,R.R., Ganem,D., Silverman,R.H., and DeRisi,J.L.

- (2006). Identification of a novel Gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant. *PLoS. Pathog.* 2, e25.
- Van Damme N., Goff,D., Katsura,C., Jorgenson,R.L., Mitchell,R., Johnson,M.C., Stephens,E.B., and Guatelli,J. (2008). The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host. Microbe* 3, 245-252.
- von Schwedler,U., Song,J., Aiken,C., and Trono,D. (1993). Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *J. Virol.* 67, 4945-4955.
- Wessagowit,V., Nalla,V.K., Rogan,P.K., and McGrath,J.A. (2005). Normal and abnormal mechanisms of gene splicing and relevance to inherited skin diseases. *J. Dermatol. Sci.* 40, 73-84.
- White,D. (1996). Alteration of complement activity: a strategy for xenotransplantation. *Trends Biotechnol.* 14, 3-5.
- Wiegand,H.L., Doehle,B.P., Bogerd,H.P., and Cullen,B.R. (2004). A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *EMBO J.* 23, 2451-2458.
- Wilkinson,D.A., Mager,D.L., and Leong,J.C. (1994). Endogenous human retroviruses. In *The Retroviridae*, Levy J.A.ed, ed. New York: Plenum Press), pp. 465-535.
- Williams,G.M., ter Haar,A., Parks,L.C., and Krajewski,C.A. (1973). Endothelial changes associated with hyperacute, acute, and chronic renal allograft rejection in man. *Transplant. Proc.* 5, 819-822.
- Wilson,C.A., Wong,S., Muller,J., Davidson,C.E., Rose,T.M., and Burd,P. (1998). Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *J. Virol.* 72, 3082-3087.
- Wilson,C.A., Wong,S., van Brocklin,M., and Federspiel,M.J. (2000). Extended analysis of the in vitro tropism of porcine endogenous retrovirus. *J Virol* 74, 49-56.
- Winkler,M.E., Winkler,M., Burian,R., Hecker,J., Loss,M., Przemeck,M., Lorenz,R., Patience,C., Karlas,A., Sommer,S., Denner,J., and Martin,U. (2005). Analysis of pig-to-human porcine endogenous retrovirus transmission in a triple-species kidney xenotransplantation model. *Transpl. Int.* 17, 848-858.
- Wolfe,L.S., Stanley,B.J., Liu,C., Eliason,W.K., and Xiong,Y. (2010). Dissection of the HIV Vif interaction with human E3 ubiquitin ligase. *J. Virol.* 84, 7135-7139.
- Wood,A., Webb,B.L., Bartosch,B., Schaller,T., Takeuchi,Y., and Towers,G.J. (2009). Porcine endogenous retroviruses PERV A and A/C recombinant are insensitive to a range of divergent mammalian TRIM5alpha proteins including human TRIM5alpha. *J. Gen. Virol.* 90, 702-709.
- Xu,H., Chertova,E., Chen,J., Ott D.E., Roser J.D., Hu W.S., and Pathak,V.K. (2007). Stoichiometry of the antiviral protein APOBEC3G in HIV-1 virions. *Virology* 360, 247-256.

- Yang,B., Chen,K., Zhang,C., Huang,S., and Zhang,H. (2007). Virion-associated uracil DNA glycosylase-2 and apurinic/apyrimidinic endonuclease are involved in the degradation of APOBEC3G-edited nascent HIV-1 DNA. *J. Biol. Chem.* 282, 11667-11675.
- Yang,Y.G. and Sykes,M. (2007). Xenotransplantation: current status and a perspective on the future. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 519-531.
- Yannoutsos,N., Langford,G.A., Cozzi,E., Lancaster,R., Elsome,K., Chen,P., and White,D.J. (1995). Production of pigs transgenic for human regulators of complement activation. *Transplant. Proc.* 27, 324-325.
- Yap,M.W., Nisole,S., Lynch,C., and Stoye,J.P. (2004). Trim5alpha protein restricts both HIV-1 and murine leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 10786-10791.
- Yap,M.W., Nisole,S., and Stoye,J.P. (2005). A single amino acid change in the SPRY domain of human Trim5alpha leads to HIV-1 restriction. *Curr. Biol.* 15, 73-78.
- Yerle,M., Pinton,P., Robic,A., Alfonso,A., Palvadeau,Y., Delcros,C., Hawken,R., Alexander,L., Beattie,C., Schook,L., Milan,D., and Gellin,J. (1998). Construction of a whole-genome radiation hybrid panel for high-resolution gene mapping in pigs. *Cytogenet. Cell Genet.* 82, 182-188.
- Ylinen,L.M., Keckesova,Z., Webb,B.L., Gifford,R.J., Smith,T.P., and Towers,G.J. (2006). Isolation of an active Lv1 gene from cattle indicates that tripartite motif protein-mediated innate immunity to retroviral infection is widespread among mammals. *J. Virol.* 80, 7332-7338.
- Yonezawa,A., Masuda,S., Katsura,T., and Inui,K. (2008). Identification and functional characterization of a novel human and rat riboflavin transporter, RFT1. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 295, C632-C641.
- Yu,Q., Chen,D., König,R., Mariani,R., Unutmaz,D., and Landau,N.R. (2004a). APOBEC3B and APOBEC3C are potent inhibitors of simian immunodeficiency virus replication. *J. Biol. Chem.* 279, 53379-53386.
- Yu,Q., König,R., Pillai,S., Chiles,K., Kearney,M., Palmer,S., Richman,D., Coffin,J.M., and Landau,N.R. (2004b). Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 435-442.
- Yu,X., Yu,Y., Liu,B., Luo,K., Kong,W., Mao,P., and Yu,X.F. (2003). Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* 302, 1056-1060.
- Yu,Y., Xiao,Z., Ehrlich,E.S., Yu,X., and Yu,X.F. (2004c). Selective assembly of HIV-1 Vif-Cul5-ElonginB-ElonginC E3 ubiquitin ligase complex through a novel SOCS box and upstream cysteines. *Genes Dev.* 18, 2867-2872.
- Zennou,V., Perez-Caballero,D., Gottlinger,H., and Bieniasz,P.D. (2004). APOBEC3G incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles. *J. Virol.* 78, 12058-12061.

Zhang,H., Yang,B., Pomerantz,R.J., Zhang,C., Arunachalam,S.C., and Gao,L. (2003). The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* 424, 94-98.

Zheng,Y.H., Irwin,D., Kurosu,T., Tokunaga,K., Sata,T., and Peterlin,B.M. (2004). Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication. *J. Virol.* 78, 6073-6076.

Zielonka,J., Bravo,I.G., Marino,D., Conrad,E., Perkovic,M., Battenberg,M., Cichutek,K., and Münk,C. (2009). Restriction of equine infectious anemia virus by equine APOBEC3 cytidine deaminases. *J. Virol.* 83, 7547-7559.

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A3	APOBEC3
ACO2	Aconitase 2
AID	<i>activation induced deaminase</i>
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APOBEC	<i>apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
AHXR	<i>acute humoral xenograft rejection</i>
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CA	<i>capsid</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDD	Cytosin-Deaminase-Domäne
cDNA	<i>copy DNA</i>
CFS	<i>chronic fatigue syndrome</i>
CMV	Cytomegalievirus
CHORI	<i>Children's Hospital Oakland Research Institute</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
CSH	Cold Spring Harbor
CSISP	<i>Centre for Public Health Research</i>
CTLA4-Ig	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 immunoglobulin</i>
CXR	<i>cellular xenograft rejection</i>
DAF	<i>decay accelerating factor</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dsDNA	doppelsträngige DNA
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
EC	<i>endothelial cell</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-N,N,N,N-Tetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
env	<i>envelope</i>
ERV	endogenes Retrovirus
EST	<i>expressed sequence tag</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , US-amerikanische Behörde für Lebensmittel- und Arzneimittelsicherheit
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
Fv	<i>Friend virus susceptibility</i>
G	Guanin
Gal	Galaktose
gag	<i>group specific antigen</i>
GFAT	Glutamin:Fructose-6-Phosphat Amidotransferase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GLB	<i>gel loading buffer</i>
GSH	Georg-Speyer-Haus
GSP	genspezifischer Primer
GT	Galactosyltransferase
GTC	Guanidinisothiocyanat
h	<i>hour</i>
HA	Hämagglutinin
HAR	<i>hyperacute rejection</i>
h.c.	<i>high concentration</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i>

HERV	<i>Human Endogenous Retrovirus</i>
HiFi	<i>High Fidelity PCR System</i>
HIV-1	<i>Human Immunodeficiency Virus 1</i>
HMM	<i>high molecular mass</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSA	<i>homo sapiens</i>
hu	human
HuPAR	<i>human PERV-A receptor</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IFN- α	Interferon alpha
IgG	Immunglobulin G
IN	Integrase
ISRE	<i>interferonstimulated response element</i>
K	Kozak
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KO	<i>knock-out</i>
LB	Luria Bertani
LMM	<i>low molecular mass</i>
LOD	<i>logarithm of the odds</i>
LR	<i>lower right</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MA	Matrixprotein
MAC	<i>membrane attack complex</i>
MCC	<i>maximum clade credibility</i>
MCP	<i>membrane cofactor protein</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
min	Minute
ML	<i>maximum likelihood</i>
MLV	<i>Murine Leukemia Virus</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mu	murin
Myr	<i>million years ago</i>
NEA	<i>non essential amino acids</i>

Nef	<i>negative factor</i>
NC	<i>nucleocapsid</i>
NK	natürliche Killerzellen
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
ORI	<i>origin of replication</i>
OT	Objektträger
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
p(A)-Signal	Polyadenylierungssignal
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
PERV	<i>Porcine Endogenous Retrovirus</i>
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Proteaseinhibitor
po	porzin
poA3	porzines APOBEC3
poly(A)-Signal	Polyadenylierungssignal
pol	<i>polymerase</i>
PP	Polypropylen
PR	Protease
qRT-PCR	<i>quantitative real-time PCR</i>
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RAD	<i>radiation absorbed dose</i>
Rev	<i>regulator of expression of virion proteins</i>
RFT	<i>riboflavin transporter</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase (erschließt sich aus dem Zusammenhang)

s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sp	<i>specificity protein</i>
SP	Penicillin/Streptomycin
SPF	steril und pathogenfrei
SSC	<i>side scatter</i> oder <i>sus scrofa chromosome</i> (erschließt sich aus dem Zusammenhang)
SU	<i>surface unit</i>
T	Thymin
TAE	Tris/Acetat/EDTA
Tat	<i>transactivator of transcription</i>
TB	Terrific Broth
TBE	Tris/Borat/EDTA
t _e	Elongationszeit
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethyldiamin
ter	Telomer
T _a	Annealingtemperatur
T _m	Schmelztemperatur
TiHo	Tierärztliche Hochschule
TM	<i>transmembrane</i>
TRIM	<i>tripartite interaction motif</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TU	<i>transduction unit</i>
U	<i>unit</i> oder Uracil
ÜN	über Nacht
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	ultraviolett
Vif	<i>viral infectivity factor</i>
V _{max}	maximales Volumen
Vol	Volumen
Vpr	<i>viral protein rapid</i>
Vpu	<i>viral protein out</i>
VSV-G	Vesikuläres Stomatitis Virus Glykoprotein

v/v	<i>volume per volume</i>
w/o	<i>without</i>
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl- β -D-Thiogalaktosid
XMRV	<i>Xenotropic murine leukemia virus-related virus</i>
XNA	<i>xenoreactive natural antibodies</i>
XTx	Xenotransplantation

Aminosäuren:

A	Alanin
C	Cystein
D	Aspartat
E	Glutamat
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Thryptophan
Y	Tyrosin

8 Zusammenfassung (deutsch)

Die Xenotransplantation (XTx) porziner Zellen, Gewebe und Organe könnte den Mangel an humanen Spenderorganen überwinden. Problematisch für die Schwein-auf-Mensch-XTx ist die Existenz porziner endogener Retroviren (PERV), da PERV-A und PERV-B *in vitro* humane embryonale Nierenzellen infizieren können, weshalb es *in vivo* zu einer Zoonose kommen könnte. Hier wurde untersucht, ob porzine und humane APOBEC3 (A3)-Proteine eine PERV-Infektion inhibieren können, denn diese Familie der Cytosin-Deaminasen gehört zur zellulären intrinsischen Immunität und dient als effektiver Block gegen Retroviren und Retrotransposons. Die erhaltenen Daten zeigen, dass der *poA3*-Genlokus auf Chromosom 5 aus den Genen *A3Z2* und *A3Z3* besteht und für mindestens vier verschiedene mRNAs (*A3Z2*, *A3Z3*, *A3Z2-Z3* und *A3Z2-Z3 SVA*) kodiert. Die porzinen A3s *A3Z2*, *A3Z3* und *A3Z2-Z3* wurden in PERV-Partikel verpackt und inhibierten die PERV-Replikation dosisabhängig. Für *A3Z2* und *A3Z2-Z3* konnte dabei ein Langzeiteffekt nachgewiesen werden. Der antiretrovirale Effekt war auf eine G-zu-A-Hypermuation zurückzuführen und erfolgte in einem Trinukleotidkontext (5'TGC für *A3Z2* und *A3Z2-Z3*, 5'CAC für *poA3Z3*). Ebenso wiesen fast alle humanen A3-Proteine eine antiretrovirale Aktivität gegen PERV auf. Aufgrund dieser Resultate ist es möglich, dass humane und porzine A3s auch *in vivo* die PERV-Replikation inhibieren könnten, wodurch sich das Risiko einer PERV-Infektion im Zuge einer Schwein-auf-Mensch-XTx deutlich reduziert wäre.

9 Zusammenfassung (englisch)

Xenotransplantation (XTx) of porcine cells, tissues and organs shows great promise to surmount the shortage of human donor material. One barrier for pig-to-human XTx is the existence of *porcine endogenous retroviruses* (PERV). Two classes PERV-A and PERV-B are able to infect human embryonic kidney cells *in vitro* suggesting that a xenozoonosis *in vivo* could occur. To assess the capacity of human and porcine cells to counteract PERV infections, we analyzed human and porcine APOBEC3 (A3) proteins. This family of cytidine deaminases contributes to the cellular intrinsic immunity and acts as potent inhibitor of retroviruses and retrotransposons. Our data show that the porcine A3 gene locus on chromosome 5 consists of the two single-domain genes A3Z2 and A3Z3. The two A3 genes encode for at least four different mRNAs: A3Z2, A3Z3, A3Z2-Z3 and A3Z2-Z3 SVA. Porcine and human A3s have been tested towards their antiretroviral activity against PERV using novel single-round reporter viruses. The porcine A3s A3Z2, A3Z3 and A3Z2-Z3 were packaged into PERV particles and inhibited PERV replication in a dose-dependent manner. The antiretroviral effect correlated with editing by the porcine A3s with a trinucleotide preference for (5'TGC for A3Z2 and A3Z2-Z3, 5'CACC for poA3Z3). These results strongly implicate that human and porcine A3s could inhibit PERV replication *in vivo*, thereby possibly reducing the risk of infection of human cells by PERV in the context of pig-to-human XTx.

10 Übersicht zu den durchgeführten Arbeiten

Hier ist nochmals detailliert aufgeführt, welche Personen in welchem Umfang an dieser Arbeit mitgewirkt haben:

ED: Eva Dörrschuck, NF: Nicole Fischer, AS: Andreas Spötter, HK: Heidi Kuiper, RM: Ronny Möller, KMH: Kay-Martin Hanschmann, IGB: Ignacio González Bravo

3.1 Herstellung der PERV- und MLV-Expressionsplasmide	→ ED
3.1.1 Herstellung von pPERV/EGFP	→ ED
3.1.2 Herstellung von pMLV/EGFP	→ ED
3.2 Konstruktion der porzinen A3-Expressionsplasmide	→ ED
3.2.1 Identifikation porziner A3-Transkripte	→ ED
3.2.2 Umklonierung der poA3-ORFs in pcDNA3.1Zeo(+)	→ ED
3.2.3 Test der poA3-Konstrukte auf Proteinexpression	→ ED
3.3 Charakterisierung des porzinen A3-Genlokus	→ ED
3.3.1 Identifizierung der Gensequenz	→ ED
3.3.2 Reorganisation des poA3-Genlokus und Identifizierung der untranslatierten Regionen (UTR)	→ ED + NF
3.3.3 Bestimmung der Anzahl der A3-Genkopien im Schweingenom	→ ED
3.3.4 Bestimmung der chromosomalen Lokalisation des porzinen A3-Genlokus	→ AS + HK
Präparation der Sonden-DNA für FISH	→ RM
3.4 Interaktion der humanen und porzinen A3-Proteine mit PERV	
3.4.1 Verpackung der A3-Proteine in PERV-Virionen	→ ED
3.4.2 Antiretrovirale Aktivität der A3-Proteine gegen PERV	→ ED
- Versuchsoptimierung	→ ED
- Infektionsstudie	→ ED
- dosisabhängige Wirkung	→ ED
- Herstellung stabiler Zellen und Replikationskurve	→ ED

3.4.3 Deaminierung der proviralen PERV-Sequenzen durch

- die A3-Proteine → ED + KMH
- Zellkultur und molekularbiologische Arbeitsschritte → ED
- Sequenzanalysen zur Bestimmung der Mutationsrate
und der Verteilung der Nukleotide um die Mutations-
stellen (+5/-5 Basen) → ED
- statistische Auswertung der (Tri-)Nukleotidpräferenz → KMH

Alle Versuche zu A3Z3 wurden von NF durchgeführt.

5.1 Korrektur der kodierenden Sequenzen für poA3Z2-Z3 und

poA3Z2-Z3 SVA → ED

5.2 Evolution des porzinen A3-Genlokus

- Präparation der genomischen DNAs, PCRs → ED
- Sequenzanalysen, Konsensussequenzen → ED
- Erstellung der phylogenetischen Stammbäume → IGB

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen Menschen bedanken, die dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit zustande gekommen ist:

Herrn Prof. Dr. Johannes Löwer und Prof. Dr. Klaus Cichutek für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Paul-Ehrlich-Institut, wo ich unter besten Arbeitsbedingungen meine Promotion durchführen konnte.

Herrn Prof. Dr. Ralf Tönjes für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in seiner Arbeitsgruppe, die Vergabe des Themas, die praktische Betreuung sowie die stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft in wissenschaftlichen Belangen. Ich danke dir ebenfalls für dein in mich gesetztes Vertrauen und dafür, dass du trotz der Forschung nie vergessen hast, auch den Menschen hinter dem Naturwissenschaftler zu sehen. Ach ja, und ich werde deinen Heringsstipp bei der Freitags-Kochgruppe wirklich vermissen.

Herrn Prof. Dr. Carsten Münk für seine exzellente, fachliche Betreuung, den konstruktiven Besprechungen und seiner stetigen Hilfsbereitschaft. Du hattest immer Zeit für mich, egal, ob du gerade in New York auf Kongress oder auf Urlaub in China warst. Ich konnte mich stets auf dich verlassen: vielen Dank für die wirklich gute Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Manfred Schmitt für die offizielle Betreuung an der Universität des Saarlandes, für sein Interesse an meiner Arbeit sowie seiner Hilfsbereitschaft, die sich nicht nur auf die Promotionszeit bezieht, sondern bis in die Studienanfänge hineinreicht.

All meinen Kooperationspartnern – Kay-Martin Hanschmann, Dr. Ignacio González Bravo, Dr. Heidi Kuiper und Dr. Andreas Spötter – für die tolle Zusammenarbeit, die stetige Diskussionsbereitschaft und die fachlich kompetenten mit bislang sehr lustigen Besprechungen, Telefonate und Email-Schlachten.

Nicole Fischer danke ich ganz herzlich für das perfekte Teamwork, die konstruktiven Besprechungen, bei denen die Köpfe qualmten, für die gemeinsame Zeit, die wir miteinander arbeiten durften und dafür, dass wir trotz der vielen Arbeit und des zeitweise sehr hektischen Laboralltages nie vergessen haben, uns über viele Dinge schräg zu lachen. Ich bin froh, dass ich dich nicht nur als tolle Kollegin hatte, sondern dass ich dich zu meinen besten Freundinnen zählen darf.

Dem Zoo Wuppertal danke ich für die Spende des Pekari-Blutes und Dr. Roland Plesker für den Transport.

Allen ehemaligen und aktuellen Kollegen der Abteilung 6 und insbesondere der Arbeitsgruppe 6/4 für die schöne Zeit und ein außergewöhnlich gutes Arbeitsklima. Stellvertretend möchte ich hier Andreas Jungmann, Meike Gratz, Thomas Preuß, Kristina Sawallisch, Sabrina Kneissl geb. Funke, Gundula Braun, Martin Selbert und Marion Battenberg nennen, für alle würde der Platz nicht reichen. Ebenso möchte ich mich namentlich bei Jörg Zielonka, Mario Perkovic und Henning Hofmann für die praktischen Hilfestellungen und die Diskussionsbereitschaft rund um APOBEC bedanken. Weiterhin möchte ich ein „Danke“ in Richtung meiner ehemaligen Azubis Carolin Runge, Laura Schollbach geb. Sandner und Angela Zeiler aussprechen, die motiviert und enthusiastisch mitgearbeitet haben.

Ein herzliches Dankeschön an alle „Undinen“, mit denen ich den Stress und Druck während der Schreibphase wegrudern und weglachen konnte. Aline Kammel danke ich für die zahlreichen Schlafgelegenheiten, die mir ein problemloses Weiterarbeiten am PEI ermöglichten. Sabine Cappel danke ich dafür, dass sie immer für mich da war, auch wenn bei ihr selbst die Zeiten stressig waren. Sabine Heidmeier danke ich für die unglaublich lustigen Begebenheiten, die wir miteinander erleben durften.

Allen Korrekturlesern ein „merci beaucoup“ für die Arbeit, die sie sich gemacht haben sowie die konstruktiven Vorschläge von ihrer Seite.

Ralph Stoltz, Ralf Muth, Wolfgang Türk und insbesondere Andreas Hoffmann („meine“ Computerspezialisten) dafür, dass ich ihr Fachwissen anzapfen konnte, ich durch ihre Hilfe einen schönen Arbeitsplatz im neuen Heim bekam und für ihre Geduld, mir die unendlichen Weiten der Hardware und Software zu erklären (auch wenn es ein nahezu hoffnungsloses Unterfangen war).

Meiner Familie danke ich für die finanzielle und moralische Unterstützung und für ihr Verständnis gerade in den letzten Monaten, in denen ich zwangsläufig die Scheuklappen anhatte und auf jede Frage nur noch mit einem genervten „nach der Doktorarbeit, ok?“ reagiert habe. Dahingehend wollte ich mich vor allem bei meinem kleinen Bruder Nico bedanken, da er mich kaum zu Gesicht bekam und trotzdem nie böse auf mich war. Ein von ganzem Herzen kommendes Dankeschön auch an meine „Mam“, ohne deren Hilfe und Zuspruch ich es sicherlich nicht gepackt hätte.

Diese Arbeit wurde finanziert durch ein Projekt der Europäischen Union (Brüssel, Belgien) unter der Nummer QLK2-CT-2002-70785 sowie durch die Förderung TO 117/1 der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Bonn, Deutschland).

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Eva Amarant Dörrschuck
Geburtsdatum: 21.10.1978
Geburtsort: Zweibrücken
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung

08/1985-06/1989 Grundschule Am Eisenberg in St. Ingbert-Hassel
08/1989-06/1998 Albertus-Magnus-Gymnasium in St. Ingbert
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Note: 2.1

Studium

10/1998-10/2000 Studium der Biologie an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz
Abschluss: Vordiplom, Notendurchschnitt: „sehr gut“
10/2000-02/2005 Studium der Biologie mit dem Schwerpunkt Humangenetik und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken
03/2004-01/2005 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manfred Schmitt, Fachrichtung Molekular- und Zellbiologie, Universität des Saarlandes, Saarbrücken
Thema der Diplomarbeit:
Konstruktion der PTS1-tragenden Katalase T-Varianten Ctt1p^{cmyp-SKL} und Ctt1p^{GFP-SKL} und Phänotypanalyse in Hefen mit defektem Mitochondrien-Targeting von Katalase A
05/2005 Übergabe der Diplom-Urkunde
Abschluss: Diplom-Biologin
Note: „sehr gut“ mit dem Prädikat „mit Auszeichnung“ (1.1)

Promotion

02/2005-04/2009 Doktorarbeit am Paul-Ehrlich-Institut, Abteilung
Medizinische Biotechnologie, Fachgebiet Xenogene
Zelltherapeutika unter der Leitung von Prof. Dr. Ralf
Tönjes , Langen
Thema der Dissertation:
Untersuchungen zur Interaktion der antiretroviral wirkenden porzinen
und humanen A3-Proteine mit porzinen endogenen Retroviren
(PERV) und Charakterisierung des porzinen A3-Genlokus

seit 02/2006 Eingeschriebene Promotionsstudentin der Naturwissen-
schaftlich-Technischen Fakultät III der Universität des
Saarlandes, Saarbrücken

Beruflicher Werdegang

seit 04/2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Pädiatrischen
Kardiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Hashim Abdul-
Khaliq, Universitätsklinikum des Saarlandes,
Homburg/Saar

13 Publikationen

Originalartikel

Dörrschuck E., Fischer N., Bravo I.G., Hanschmann K.M., Kuiper H., Spötter A., Möller R., Cichutek K., Münk C., Tönjes R.R. (2011). Restriction of *porcine endogenous retrovirus* by porcine APOBEC3 cytidine deaminases. *J. Virol.* 85 (8), 3842-3857.

Dörrschuck E., Krämer M., Tönjes R.R. (2010). Cellular interaction of functional porcine endogenous retrovirus. *Xenotransplantation* 17 (2), 119.

Tönjes R., Dörrschuck E., Hofmann B., Krämer M. (2008). Virus and host factors in pathogenesis. *Xenotransplantation* 15 (5), 304.

Dörrschuck E., Münk C., Tönjes R.R. (2008). APOBEC3 proteins and porcine endogenous retroviruses. *Transplant. Proc.* 40 (4), 959-961.

Jungmann A., Dörrschuck E., Tönjes R.R. (2007). Cellular interaction and retrotransposition of porcine endogenous retrovirus. *Xenotransplantation* 14 (4), 372.

Beiträge auf Kongressen

11th Minisymposium Xenotransplantation of the German Working Group Xenotransplantation (DAX) in Berlin, 05.-06.06.2008:

Dörrschuck E., Hoffmann B, Tönjes RR: Virus and Host Factors in Pathogenesis

Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution (SMBE) in Barcelona, 05.-08.06.2008:

Bravo IG, Zielonka J, Dörrschuck E., Münk C: Evolution of antiretroviral APOBEC3 proteins: gene duplication, gene loss and subfunctionalisation events

16. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft in Mainz, 11.-13.10.2007:

Dörrschuck E., Jungmann A, Tönjes RR: Infectious risk upon xenotransplantation – Cellular interaction, recombination and retrotransposition of porcine endogenous retroviruses

Third European Congress of Virology in Nürnberg, 01.-05.09.2007:

Dörrschuck E., Cichutek K, Münk C, Tönjes RR: Impact of Human and Porcine APOBEC3 Proteins on Replication of Porcine Endogenous Retrovirus

Retroviruses in Cold Spring Harbor (New York, USA), 22.-27.05.2007:

Dörrschuck E., Cichutek K, Münk C, Tönjes RR: Restriction of Porcine Endogenous Retroviruses (PERV) by Human and Porcine APOBEC3 Proteins