

2 MATERIAL

Die verwendeten Chemikalien und kommerziellen Kits sowie die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen sind im Methodenteil im Zusammenhang mit den entsprechenden Methoden aufgeführt.

2.1 Bakterienstämme

Die zur Vermehrung von Plasmid-DNA sowie zur Expression von rekombinanten Proteinen verwendeten Bakterienstämme wurden von der Firma Stratagene bezogen.

Tabelle 2.1: Bakterienstämme

Bezeichnung	Stamm / Genotyp
Top10 F'	<i>E. coli</i> / F'(lacIq, Tn10(TetR)) <i>mcrA</i> Δ (<i>mrrhsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ m15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galJ</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1nupG</i>
BL21-CodonPlus (DE3)-RP	<i>E. coli</i> / B F- <i>ompThsdS</i> (rB- mB) <i>dcm</i> + Tetr <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA</i> Hte (<i>argJ</i> <i>proL</i> Camr)

2.2 Enzyme

Tabelle 2.2 : Verwendete Enzyme

Bezeichnung	Art des Enzyms	Hersteller
AMPLITAQ GOLD DNA Polymerase	DNA-abhängige DNA-Polymerase	Applied Biosystems
Pfu DNA Polymerase	DNA-abhängige DNA-Polymerase	Fermentas
Reverse Transkriptase	RNA-abhängige DNA-Polymerase	Invitrogen
DNase	Desoxyribonuklease (Hydrolase)	Qiagen
RNase	Ribonuklease (Hydrolase)	Ambion
T7 RNA Polymerase	DNA-abhängige RNA-Polymerase	Ambion
T4 DNA Ligase	Ligase	Roche
BglII	Restriktionsendonuklease	NEB
EcoRI	Restriktionsendonuklease	NEB
NdeI	Restriktionsendonuklease	NEB
SacII	Restriktionsendonuklease	NEB
SalI	Restriktionsendonuklease	NEB
SfiI	Restriktionsendonuklease	NEB
Proteinase K	Serin Endopeptidase (Hydrolase)	Invitrogen
Trypsin	Serin Endopeptidase (Hydrolase)	Sigma

2.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma bezogen. Für die Verwendung in der real-time PCR wurden die Oligonukleotide im Reinheitsgrad „HPLC“, für andere Anwendung im Reinheitsgrad „entsalzt“ bestellt.

Tabelle 2.3: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Schnitt- stelle	Referenz
<u>Detektion</u>			
PERV envA for	TGAAAGATTGGCAACAGCG	-	LE TISSIER et al., 1997
PERV envA rev	AGTGATGTTAGGCTCAGTGG	-	LE TISSIER et al., 1997
PERV envB for	TTCTCCTTGTCAATTCCGG	-	LE TISSIER et al., 1997
PERV envB rev	TACTTTATCGGGTCCCCTG	-	LE TISSIER et al., 1997
PERV envC for	CTGACCTGGATTAGAAGTGG	-	TAKEUCHI et al., 1998
PERV envC rev	ATGTTAGAGGATGGTCTGG	-	TAKEUCHI et al., 1998
PERV envC.2 for	GATTAGAAGTGGAAAGCCCAAGTGTCT	-	diese Arbeit
PERV envC.2 rev	TCTGATCCAGAAATTATGTTAGAGGATG GT	-	diese Arbeit
PERV-A VRBF	CCTACCAGTTATAATCAATTTAATTATGG C		WOOD et al., 2004
PERV-C env TMR	CTCAAACCACCCTTGAGTAGTTTCC		WOOD et al., 2004
PERV-C rev	TATGTTAGAGGATGGTCTCTGGTC		MARTIN et al., 2006
PERV pol for	TTGACTTGGGAGTGGGACGGGTAAC	-	CZAUDERNA et al., 2000
PERV pol rev	GAGGGTCACCTGAGGGTGTGGAT	-	CZAUDERNA et al., 2000
PERV gag for	GCGACCCACGCAGTTGCATA	-	PARADIS et al., 1999
PERV gag rev	CAGTTCCTTGCCAGTGTCTCT	-	PARADIS et al., 1999
PERV vor SD for	TGCTGTTTGCATCAAGACCGC	-	KARLAS, 2004
PERV hinter SD rev	ACAGACACTCAGAACAGAGAC	-	KARLAS, 2004
PERV hinter SA rev	ATGGAGGCGAAGCTTAAGGGGA	-	KARLAS, 2004
LTR <i>repeat</i> for	TCTTGGTGACAACATGTCTC		AG Denner
LTR <i>repeat</i> rev	AGTGTGGAGTCG GGACAGCT		AG Denner
<u>real-time-PCR</u>			
PERV real time for	TCCAGGGCTCATAATTTGTC	-	FIEBIG, 2007
PERV real time rev	TGATGGCCATCCAACATCGA	-	FIEBIG, 2007
PERV envC real time for	CACCTATACCAGCTCTGGACA	-	diese Arbeit
PERV envC real time rev	siehe envC rev	-	TAKEUCHI et al., 1998
porz. GAPDH for	CTGCCCTTCTGCTGATGC	-	
porz. GAPDH rev	TCCACGATGCCGAAGTTGTC	-	
porz. GAPDH real for	ACATGGCCTCCAAGGAGTAAGA	-	DUVIGNEAU et al., 2005
porz. GAPDH real rev	GATCGAGTTGGGGCTGTGACT	-	DUVIGNEAU et al., 2005
porz. β-Actin real for	CTCGATCATGAAGTGCGACGT	-	DUVIGNEAU et al., 2005
porz. β-Actin real for	GTGATCTCCTTCTGCATCCTGTC	-	DUVIGNEAU et al., 2005
porz. Cyclophilin real for	TGCTTTCACAGAATAATCCAGGATTTA	-	DUVIGNEAU et al., 2005
porz. Cyclophilin real rev	GACTTGCCACCAGTGCCATTA	-	DUVIGNEAU et al., 2005
porz. HPRT real for	GTGATAGATCCATTCTATGACTGTAGA	-	DUVIGNEAU et al., 2005
porz. HPRT real rev	TGAGAGATCATCTCCACCAATTA	-	DUVIGNEAU et al., 2005

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Schnitt- stelle	Referenz
KoRV-5-for	CTAATAAAAGGGCCCATAGA	-	FIEBIG et al., 2006
KoRV-6-rev	GTTGAACCATCCCTCGTACC	-	FIEBIG et al., 2006
huGAPDH 41	GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC	-	Buscher, 2006
huGAPDH 42	TGGTCCACACCCATGACGA	-	Buscher, 2006
<u>Tagman-Sonden</u>			
PERV gag Sonde		-	FIEBIG, 2007
PERV envC Sonde	HEX- ACCTGACCTGGATTAGAACTGGAAG- BHQ1	-	diese Arbeit
porz. GAPDH Sonde	HEX-CCACCAACCCAGCAAGAGCACGC -BHQ1	-	DUVIGNEAU et al., 2005
porz. β-Actin Sonde	FAM- ATCAGGAAGGACCTCTACGCCAACACGG -BHQ1	-	DUVIGNEAU et al., 2005
porz. Cyclophilin Sonde	Cy5- TGCCAGGGTGGTGACTTCACACGCC -BHQ2a	-	DUVIGNEAU et al., 2005
porz. HPRT Sonde	FAM- ATCGCCCGTTGACTGGTCATTACAGTAG CT-BHQ1	-	DUVIGNEAU et al., 2005
KoRV Sonde	FAM-CCATGGATACAGACCTTAG GGCCC-BHQ1	-	FIEBIG et al., 2006
huGAPDH Sonde	HEX-CTTCACCACCATGGAGAA GGCTGGG-Dabcyl	-	FIEBIG et al., 2006
<u>Klonierung</u>			
PERV-gp70-F1 for	TGAATTCATGCATCCCACGTTAAGCCGG	EcoRI	diese Arbeit
PERV-gp70-F1 rev	TATGTCGACCGTCATTGAGACCGGAGAT TAC	SalI	diese Arbeit
PERV-gp70-F2 for	TGAATTCCTTCGATCAGTAATCCCTGGT	EcoRI	diese Arbeit
PERV-gp70-F2 rev	TATGTCGACCTCGTACATCTTTTTGTACC CG	SalI	diese Arbeit
PERV-gp70-F3 for	TGAATTCTGGCAACAGCGGGTACAAAAA	EcoRI	diese Arbeit
PERV-gp70-F3 rev	TATGTCGACCGGGGTTAGGAGATGGCCT CTG	SalI	diese Arbeit
PERV-gp70-F4 for	TGAATTCATCCAAGAACAGAGGCCATCT	EcoRI	diese Arbeit
PERV-gp70-F4 rev	TATGTCGACCAGAAACCTCAGTAAGGGT AAG	SalI	diese Arbeit
PERV-gp70-F5 for	TGAATTCAAAATAAGCTTACCCTTACT	EcoRI	diese Arbeit
PERV-gp70-F5 rev	TATGTCGACCTCTTTTTGGCCGATTATAT CT	SalI	diese Arbeit
PERV-gp70-pET- SP-for	AGAATTCGAGCCCGAACTCCCATAAACC C	EcoRI	diese Arbeit
PERV-gp70-pET- for	AAAAAACATATGAGCCCGAACTCCCAT AACCC	NdeI	diese Arbeit
PERV-gp70-pET- rev	AAAGTCGACGGCAGCCGTTCTGTTC	SalI	diese Arbeit
PERV-gp-pD-for	AGGCCAGCCGGCCATGCATCCCACGTT AAGCCG	SfiI	diese Arbeit
PERV-gp70-pD- rev	AATATACCGCGTCTTTTTGGCCGATTAT ATCTATAG	SacII	diese Arbeit

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Schnitt- stelle	Referenz
PERV-gp85-pD- rev	AATATACCGCGGAGGAGACCTGTTGAAC CATCCC	SacII	diese Arbeit
KoRV-gp70-pET- SP-for	AGAATTCGAACCCCTACCAACCCATGAC TC	EcoRI	diese Arbeit
KoRV-gp70-pET- for	AAAAAACATATGAACCCTACCAACCCAT GACTC	NdeI	diese Arbeit
KoRV-gp70-pET- rev	AAAGTCGACGGCGGTGAGCCGGTACC	SalI	diese Arbeit
KoRV-gp-pD-for	ATAAGATCTATGCTTCTCATCTCAAACCC	BglII	diese Arbeit
KoRV-gp70-pD- rev	ATAGTCGACTCTTTGTTTCTAGAGTGGG G	SalI	diese Arbeit
KoRV-gp85-pD- rev	ATAGTCGACGGGGGAACGGTTGAACC	SalI	diese Arbeit
Fibritin 1 for	ATAGTCGACATTCTGAGGCTCCCAGGG ACGCCAGGCCTAC	SalI	diese Arbeit, basierend auf LETAROV et al., 1999
Fibritin rev	ATAGTCGACTTACAGGAAGGTGCTGAGC AGCACC	SalI	diese Arbeit, basierend auf LETAROV et al., 1999
Fibritin 3 for	AATATACCGCGGATTCTGAGGCTCCCA GGGACGGCCAGGCCTAC	SacII	diese Arbeit, basierend auf LETAROV et al., 1999
Sonstiges			
T7 promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	-	AG Denner
T7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCG G	-	AG Denner
M13 for	GTA AACGACGGCCAGT	-	AG Denner
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC	-	AG Denner

2.4 Plasmide

Im folgenden sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmid aufgeführt. Alle Plasmide sind im Anhang detailliert mit Vektorkarte dargestellt (siehe Anhang).

Tabelle 2.4: Verwendete Plasmide

Plasmid	Art des Plasmids	Hersteller / Quelle
pCL-VSV-G	VSV-G-Hüllprotein-exprimierender Vektor → lentivirale Vektoren	Prof. D. Trono
psPAX2	Verpackungsvektor → lentivirale Vektoren	Prof. D. Trono
pLVTHM	Transfervektor, für shRNA-Expression → lentivirale Vektoren	Prof. D. Trono
pGEX-5X-T	prokaryontischer Expressionsvektor	Stratagene
pET-22b(+)	prokaryontischer Expressionsvektor	Novagen
pDisplay	eukaryontischer Expressionsvektor	Invitrogen

2.5 Plasmidkonstrukte

Im folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Plasmidkonstrukte kurz beschrieben. Weitere Erläuterungen zu den inserierten Sequenzen finden sich im Ergebnisteil.

Tabelle 2.5 : Generierte Plasmidkonstrukte

Bezeichnung	Ursprungsvektor	Kurzbeschreibung
pGEX-PERV-gp70-Frag1	pGEX-5X-1	Insertion der PERV-gp70-Fragment 1 Sequenz über EcoRI / SalI
pGEX-PERV-gp70-Frag2	pGEX-5X-1	Insertion der PERV-gp70-Fragment 2 Sequenz über EcoRI / SalI
pGEX-PERV-gp70-Frag3	pGEX-5X-1	Insertion der PERV-gp70-Fragment 3 Sequenz über EcoRI / SalI
pGEX-PERV-gp70-Frag4	pGEX-5X-1	Insertion der PERV-gp70-Fragment 4 Sequenz über EcoRI / SalI
pGEX-PERV-gp70-Frag5	pGEX-5X-1	Insertion der PERV-gp70-Fragment 5 Sequenz über EcoRI / SalI
pGEX-PERV-gp70-Frag123	pGEX-5X-1	Insertion der PERV-gp70-Fragment 123 Sequenz über EcoRI / SalI
pET-PERV-p52	pET22b(+)	Insertion der PERV-p52-Sequenz über NdeI / SalI
pET-PERV-p52-sp	pET22b(+)	Insertion des PERV-p52-Sequenz über EcoRI/ SalI, Signalpeptid des Vektors blieb erhalten
pET-KoRV-p52	pET22b(+)	Insertion des KoRV-p52-Sequenz über NdeI / SalI
pET-KoRV-p52-sp	pET22b(+)	Insertion des KoRV-p52-Sequenz über EcoRI/ SalI, Signalpeptid des Vektors blieb erhalten
pDis-PERV-gp70-Fib	pDisplay	Insertion der PERV-gp70-Sequenz über SfiI / SacII sowie der Fibrin-Sequenz über SacII
pDis-PERV-gp85-Fib	pDisplay	Insertion der PERV-gp85-Sequenz über SfiI / SacII sowie der Fibrin-Sequenz über SacII
pDis-KoRV-gp70-Fib	pDisplay	Insertion der KoRV-gp70-Sequenz über BglII / Sal I sowie der Fibrin-Sequenz über Sal I
pDis-KoRV-gp85-Fib	pDisplay	Insertion der KoRV-gp70-Sequenz über BglII / Sal I sowie der Fibrin-Sequenz über Sal I

2.6 Antikörper

Die Antikörper und Antisera wurden in den in der folgenden Tabelle aufgeführten Verdünnungen eingesetzt.

Tabelle 2.6: Verwendete Antikörper und Antisera

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
anti- β -Aktin, monoklonal Klon AC-74	1 :500	Sigma-Aldrich
Kaninchen anti-Ziege IgG FITC-Konjugat	1:2000	Sigma-Aldrich
Kaninchen anti-Ratte IgG, polyklonal Peroxidase-Konjugat	1:1000	DakoCytomation
Ziege anti-p15E (PERV) Ziegenserum 16	1:250	hergestellt in der PG Denner, RKI Fiebig et al., 2003
Ziege anti-p27 Gag (PERV) Ziegenserum 14	1:250	hergestellt in der PG Denner, RKI Irgang et al., 2003
Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Ziege anti-gp70 Frag123+5 (PERV) Ziegenserum 52	1:250	hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
Ziege anti-p52 (PERV) Ziegenserum 62	1:250	hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
Ziege anti-p52 (KoRV) Ziegenserum 61	1:250	hergestellt im Rahmen dieser Arbeit

2.7 DNA- und Protein-Längenstandards

Tabelle 2.7: Verwendete Längenstandards

Standard	Hersteller
O'GENERULER™ DNA LADDER MIX	Fermentas
1 KB+ DNA LADDER	Invitrogen
PAGERULER™ PRESTAINED PROTEIN LADDER	Fermentas

2.8 Eukaryontische Zellen

Die verwendeten Zelllinien, primären Zellen und Medien sind im Folgenden aufgeführt:

Tabelle 2.8: Verwendete Zelllinien und primäre Zellen

Bezeichnung	Spezies	Zelltyp	Besonderheit	Herkunft	Medium
HEK 293	Mensch	Embryonale Nierenzelllinie		ATCC CRL-1573	DMEM
HEK 293T	Mensch	Embryonale Nierenzelllinie	SV40 large T antigen	Invitrogen	DMEM
HEK 293- PERV-5°	Mensch	Embryonale Nierenzelllinie	infiziert mit PERV A/C, 5. Passage		DMEM
293-PERV-B	Mensch	Embryonale Nierenzelllinie	infiziert mit PERV- B		DMEM
HeLa	Mensch				DMEM
PK15	Schwein	Nierenzelllinie		ATCC CCL-33	DMEM
PFF P1 F10	Schwein	primäre foetale Fibroblasten		Prof. Niemann, Institut für Tierzucht, Neustadt	DMEM
PFF F2 P6	Schwein	primäre foetale Fibroblasten		Prof. Niemann	DMEM
SE101	Schwein	primäre foetale Fibroblasten		Prof. Niemann	DMEM
SE105	Schwein	primäre foetale Fibroblasten		Prof. Niemann	DMEM
PBMC	Schwein	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes			RPMI- 1640
Lungen- Metastasen- Zelllinie 007	Schwein	abgeleitet von Lungenmetastase (Melanom)		Prof. Wanke	DMEM

2.9 Versuchstiere

Die verwendeten Versuchstiere wurden vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin bezogen. Die Unterbringung der Ziegen erfolgte in Stallungen des BfRs. Die Ratten wurden zum Teil im BfR und zum Teil in der Tierhaltungsanlage des Robert Koch-Institutes gehalten. Von den beschriebenen Münchner Miniatur Schweine Troll wurde ausschließlich Probenmaterial erhalten.

Tabelle 2.9 Versuchstiere

Tiere	Bezugsquelle / Kommentar
Wistar-Ratten	Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin
Ziegen	Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin
MMS Troll-Schweine	Zur Etablierung eines Tiermodells wurde an der Universität München eine Zuchtherde dieser Tiere gegründet, die seit 1986 als geschlossene Kolonie besteht (WANKE et al., 1998). Die Gründertiere leiten sich vom Bestand Troll ab, der sich aus den Rassen Hanford und Kolumbischen Miniatur Schwein entwickelt hat (SAMBRAUS, 1987).

2.10 Hersteller

Im Folgenden sind die Firmensitze der kontaktierten Firmen / Bezugsquellen aufgeführt.

Tabelle 2.10 Hersteller

Firma	Firmensitz
Ambion	Huntingdon, Großbritannien
American National Can	Menasha, WI, USA
Applied Biosystems	Forster City, CA, USA
Becton Dickinson	Heidelberg, Deutschland
Biorad	München, Deutschland
Biochrom	Berlin, Deutschland
Biozym	Hess. Oldendorf, Deutschland
Cavidi	Upsala, Schweden
Dako Cytomation	Glostrup, Dänemark
DNA Star	Madison, WI, USA
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Fermentas	St.Leon-Roth, Deutschland
Fujifilm	Düsseldorf, Deutschland
GE Healthcare	München, Deutschland
Greiner Bio One	Frickenhausen, Deutschland
Hoefer	San Francisco, CA, USA
Invitek	Berlin, Deutschland
Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Millipore	Schwalbach, Deutschland
Miltenyi	Bergisch Gladbach
Novagen	Darmstadt, Deutschland
New Brunswick Scientific	Nürtingen, Deutschland
New England Biolabs	Frankfurt, Deutschland
Nunc	Wiesbaden, Deutschland
Oligoengine	Seattle, WA, USA
PAA	Pasching, Österreich
Peqlab	Erlangen, Deutschland
Pierce	Bonn, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
Roche	Mannheim, Deutschland
Roth	Karlsruhe, Deutschland
Serva	Heidelberg, Deutschland
Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Stratagene	Amsterdam, Niederlande
USB Corporation	Cleveland, OH, USA
Tecan	Crailsheim, Deutschland
TPP	Trasadingen, Schweiz
Wheaton	Millville, NJ, USA
Zeiss	Göttingen, Deutschland