

Aus dem Institut für Virologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

**Genomanalyse verschiedener Isolate des
Bovinen Leukosevirus unter besonderer
Berücksichtigung des serologischen Status
und der geographischen Herkunft des
Rindes**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jana Elwert
Tierärztin aus Tucheim

Berlin 1997
Journal Nr. 2035

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien
Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. K. Hartung

Gutachter: 1. Univ.-Prof. Dr. D. Ebner
2. Univ.-Prof. Dr. H. Ludwig

Tag der Promotion: 10.07.1997

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1. Enzootische Rinderleukose (eRL)	3
2.1.1. Agens der enzootischen Rinderleukose	3
2.1.2. Vorkommen und Verbreitung	3
2.1.3. Epidemiologie und Übertragung	4
2.1.4. Pathogenese und klinisches Bild	7
2.1.5. Prophylaxe und Bekämpfung	10
2.1.6. Bovine Leukosevirus-Infektionen anderer Spezies	12
2.2. Struktur des Bovinen Leukosevirus	13
2.2.1. Morphologie	13
2.2.2. Genom	14
2.2.3. Genomvariationen	17
2.2.4. Proteine	19
2.2.5. Replikation und Expression	22
2.3. Zielzellen	23
2.4. Diagnostische Nachweisverfahren	24
2.4.1. Hämatologischer Nachweis	24
2.4.2. Serologische Nachweisverfahren	25
2.4.3. Direkte Nachweisverfahren	26
2.5. Immunologie	28
2.6. Sequenzierungsmethoden	30
2.6.1. Maxam-Gilbert-Methode	30
2.6.2. Sanger-Methode	31
2.6.3. Modifizierte Sequenzierungsverfahren	32
2.6.4. Direkte Sequenzierung von PCR-Produkten	33
2.6.5. Automatische Sequenzanalyse unter Verwendung Fluoreszenzfarbstoff- markierter Primer	33
3. Material und Methoden	35
3.1. Untersuchungsmaterial	35
3.1.1. Tiermaterial	35
3.1.2. Kontroll-DNA	37

3.2.	Verwendete Puffer und Lösungen	37
3.3.	Chemikalien und Testkits	41
3.4.	DNA-Präparation	42
3.4.1.	Präparation genomischer DNA aus Blut	42
3.4.2.	Minipräparation von Plasmid-DNA (pDNA)	43
3.4.3.	Großpräparation von pDNA	44
3.5.	Isolierung von Einzelstrang-DNA (ssDNA)	44
3.6.	DNA-Quantifizierung und qualitative Charakterisierung	45
3.7.	Reinigung von pDNA	45
3.7.1.	Phenolreinigung	45
3.7.2.	Cäsiumchlorid-Reinigung	45
3.8.	Spaltung von pDNA und Amplifikaten mit Restriktionsendonukleasen	46
3.9.	Agarosegelelektrophorese	46
3.10.	Klonierung von DNA-Fragmenten	46
3.10.1.	Herstellung spezifischer DNA-Fragmente	46
3.10.2.	Isolierung von DNA-Fragmenten	47
3.10.3.	Ligation	47
3.10.4.	Transformation kompetenter Zellen	48
3.11.	Sequenzanalyse	48
3.11.1.	Für die Sequenzierung verwendete Primer und deren Markierung	49
3.11.2.	Sequenzierungsreaktion	49
3.11.3.	Acrylamidgelelektrophorese	51
3.11.4.	Autoradiographie	52
3.12.	Polymerasekettenreaktion	52
3.12.1.	Verwendete Primer	52
3.12.2.	Amplifikationsreaktion	53
3.12.3.	Arbeitsbedingungen	55
3.13.	Leukozytenkurzzeitkultur	55
3.14.	Enzyme linked Immunosorbent Assay	56
3.15.	Western Blot	57
3.15.1.	Probenaufbereitung	57
3.15.2.	Elektrophorese	57
3.15.3.	Elektrotransfer im Semidry-Verfahren	58
3.15.4.	Immunologischer Proteinnachweis mit der Tropix-Methode	58
4.	Ergebnisse	59
4.1.	BLV-Antikörperstatus von 37 untersuchten Rindern im Vergleich mit Ergebnissen aus dem BLV-Provirusnachweis mittels PCR	59
4.2.	Vergleich unterschiedlicher Sequenzierungsmethoden	61

4.3.	Untersuchung der LTR-Region	65
4.3.1.	PCR der BLV-LTR-Region	65
4.3.2.	Restriktionsenzymanalysen klonierter BLV-LTR Fragmente	66
4.3.3.	Sequenzierung von BLV-LTR Fragmenten	68
4.4.	Untersuchung der <i>env</i> -Region des BLV	68
4.4.1.	Restriktionsenzymanalysen klonierter und nicht klonierter PCR <i>env</i> - Fragmente	71
4.4.2.	Darstellung der DNA-Sequenzierungsergebnisse und Vergleich der ermittelten <i>env</i> -Sequenz untersuchter Proviren mit der bekannter BLV- Isolate	74
4.4.3.	Auswirkungen von DNA-Sequenzveränderungen auf die RNA- Sekundärstruktur der BLV- <i>env</i> -Region	79
4.4.4.	Auswirkungen von DNA-Sequenzveränderungen auf die Aminosäure- Sequenz und die Proteinsekundärstruktur der BLV- <i>env</i> -Region	83
4.5.	Untersuchung der <i>pol</i> -Region des BLV	86
4.5.1.	Restriktionsenzymanalysen klonierter <i>pol</i> -Fragmente	86
4.5.2.	Darstellung der DNA-Sequenzierungsergebnisse und Vergleich der ermittelten <i>pol</i> -Sequenz untersuchter Proviren mit der bekannter BLV- Isolate	87
4.5.3.	Einfluß von DNA-Sequenzänderungen auf Spleißdonor-, Spliceakzeptor- und Startcodonsequenzen der BLV- <i>pol</i> -Region	88
4.5.4.	Auswirkungen von DNA-Sequenzveränderungen auf die Aminosäure- Sequenz und die Proteinsekundärstruktur der BLV- <i>pol</i> -Region	89
4.6.	Untersuchung der <i>tax</i> -Region des BLV	91
4.6.1.	Darstellung der DNA-Sequenzergebnisse und Vergleich der ermittelten <i>tax</i> -Sequenz untersuchter Proviren mit der bekannter BLV-Isolate unter besonderer Berücksichtigung von Spliceakzeptorsequenzen der Region	91
4.6.2.	Auswirkungen von DNA-Sequenzänderungen auf die Aminosäure- Sequenz und die Proteinsekundärstruktur der BLV- <i>tax</i> -Region	92
4.6.3.	Sequenzvergleiche sechs verschiedener Klone des gleichen Ausgangsmaterials	94
4.7.	Leukozytenkurzzeitkultivierung	94
5.	Diskussion	97
5.1.	Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis einer BLV-Infektion mittels AGID, ELISA, Leukozytenkurzzeitkultur und PCR	98
5.2.	Die Sequenzierung von DNA	99
5.3.	Untersuchungen in der LTR-Region des BLV	106

5.4.	Untersuchungen von PCR-Produkten aus der <i>env</i> -, <i>pol</i> - und <i>tax</i> -Region des BLV verschiedener Isolate	108
5.5.	Der Einfluß von Nukleotidveränderungen auf die RNA- und Proteinsekundärstruktur des BLV	113
5.6.	Untersuchungen zum Vorkommen von BLV-Provirusmutanten und ihre Beziehung zum serologischen Status und der Herkunft des Wirtstieres	115
6.	Zusammenfassung	119
7.	Summary	121
8.	Literaturverzeichnis	123
9.	Anhang	154
9.1.	DNA-Sequenzvergleich von ausgewählten BLV-Provirusabschnitten der <i>env</i> -Region	154
9.2.	As-Sequenzvergleich von ausgewählten BLV-Provirusabschnitten der <i>env</i> -Region	162
9.3.	DNA-Sequenzvergleich von ausgewählten BLV-Provirusabschnitten der <i>pol</i> -Region	165
9.4.	As-Sequenzvergleich von ausgewählten BLV-Provirusabschnitten der <i>pol</i> -Region	168
9.5.	DNA-Sequenzvergleich von ausgewählten BLV-Provirusabschnitten der <i>tax</i> -Region	169
9.6.	As-Sequenzvergleich von ausgewählten BLV-Provirusabschnitten der <i>tax</i> -Region	172
	Danksagung	173
	Lebenslauf	174

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AB	Antibiotika
Abb.	Abbildung
AG	Antigen
AGID	Agargel-Immunodiffusionstest
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
a.p.	ante partum
APS	Amoniumpersulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
ara	Arabinose
As	Aminosäure
AST	australisches BLV-Isolat
ATP	Adenosintriphosphat
bat	Fledermauslungen-Zelllinie
BEL	belgisches BLV-Isolat
BIV	Bovines Immundefizienz Virus
BLV	Bovines Leukosevirus
BoLA	Bovines Lymphozyten Antigen
bp	Basenpaar
BSV	Bovines Syncytial Virus
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
dTTP	Desoxythymidindtriphosphat
Eagle MEM	Minimal Essential Medium nach Eagle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
env	<i>env</i> -Gen der Retroviren
eRL	enzootische Rinderleukose
FKS	fetales Kälberserum

FLK-BLV	BLV-produzierende fetale Lammnierenzelllinie
G	Guanidin
<i>gag</i>	<i>gag</i> -Gen der Retroviren
GAWATS	genomische Amplifizierung mit Transkript Sequenzierung
gp	Glykoprotein
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HTLV	Humanes T-Zell lymphotropes Virus
HU-Klon	Plasmid mit 8,1 kb BLV (von der 5'LTR bis zum <i>EcoRI</i> -Spaltort vor der 3'LTR) und 2,4 kb der Wirtssequenz
IDT	Agargel-Immunodiffusionstest
JAP	japanisches BLV-Isolat
kb	Kilobasen
KBR	Komplementbindungsreaktion
kDa	Kilo-Dalton
LKK	Leukozytenkurzzeitkultur
LTR	long terminal repeat
M	Marker
M1, M2, M3	BLV-Isolate von Mamoun <i>et al.</i> (1990)
mAK	monoklonale Antikörper
mRNA	Boten-RNA
NA	Nähragar
NaOAc	Natriumazetat
NB	Nährbouillon
NKS	Neonatales Kälberserum
NCR	nicht kodierende Region
Np	Nukleotidposition
n.u.	nicht untersucht
onc	onkogenes Gen
ORF	offener Leserahmen
p	Protein
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pDNA	Plasmid-DNA
PEG	Polyethylenglycol
PL	Persistierende Lymphozytose
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
p.p.	post partum
pXI	synonym <i>tax</i>
pXII	synonym <i>rex</i>

rATP	rekombinantes ATP
rex	Regulatorprotein
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RSV	Rous Sarkom Virus
RT	Raumtemperatur
Sa	Spaltakzeptor
Sd	Spaltdonor
SDS	Natriumlaurylsulfat
ss	einzelsträngig
STLV	Simian T-Zell lymphotropes Virus
T	Thymidin
TAA	Tumor Assoziiertes Antigen
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetate/EDTA Elektrophorese Puffer
tax	Transaktivatorprotein
TBE	Tris-Bor/EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Temed	Tetramethylethyldiamin
Tm	Schmelztemperatur
tRNA	Transfer-RNA
U1-Klon	Plasmid mit 5'LTR und <i>gag</i> -Gen des HU-Klons
ZE	Zellextrakt
ZKÜ	Zellkulturüberstand
ZKÜ-ELISA	ELISA mit ZKÜ von Leukozytenkurzzeitkultur
ZPE	zytopathogener Effekt

1. Einleitung

Das Bovine Leukosevirus (BLV), ein Retrovirus und infektiöses Agens der enzootischen Rinderleukose (eRL) ist in vielen Ländern der Erde von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Der Verlust von Exportmärkten, die BLV-freie Rinder fordern, die Aufwendungen für Diagnose und Behandlungen, stetige Merzung bzw. Tod von Tieren mit Leukose, sowie die Untauglichkeitsbeurteilung von sinnfällig veränderten Schlachtkörpern kennzeichnen die hauptsächlichen Schadens- und Kostenfaktoren.

Die eRL und das BLV sind wesentliche Bestandteile der internationalen Leukämieforschung. Zwei Momente sind dabei von besonderem Interesse: Zum einen hofft man, die Infektion und Krankheit besser kontrollieren zu können und die BLV-Infektion als ein Modell für die Erforschung retroviraler Infektionen anderer Spezies zu sehen. Auf der anderen Seite scheint die Beschäftigung mit dem BLV um so notwendiger, seit bekannt ist, daß humanpathogene Retroviren, wie die Humanen T-Zell lymphotropen Viren (HTLV-I und II), dem BLV strukturell ähneln. Die hohe Sequenzhomologie zwischen dem BLV und dem HTLV weist zumindest theoretisch auf die Möglichkeit der Rekombinantenbildung zwischen diesen beiden Viren hin.

Auf molekularbiologischer Ebene sind bis heute verschiedene Vorgänge, wie Infektion und Zellspezifität, die Regulation der viralen Expression und Tumorbildung sowie die Beeinflussung des Immunsystems des Wirtsorganismus durch das BLV nicht vollständig geklärt. Die Analyse des viralen Genoms verschiedenster Isolate kann bei der Beantwortung dieser offenen Fragen helfen. Die Aufklärung der BLV Sequenz ist auch notwendig, um die Evolution und Verbreitung des Virus besser zu verstehen.

Für das Studium genetischer Variationen innerhalb des BLV sind drei Regionen des Virusgenoms von besonderer Bedeutung:

1. Das *env*-Gen, weil die Envelope-Glykoproteine eine entscheidende Rolle im Replikationszyklus und zellulären Tropismus spielen und ihre Lokalisation an der Virusoberfläche Ziel neutralisierender Antikörper (AK) ist.
2. Die LTR, da sie regulatorische Sequenzen, die in die virale Replikation involviert sind, enthält und ihre U₃ Region eine Bedeutung für die Tumorbildung besitzt.
3. Das *x*-Gen, da es Proteine codiert, die für die Expression der viralen LTR und die Leukämogenese entscheidend sind.

Routineuntersuchungen einheimischer Rinderbestände auf eRL basieren auf dem Nachweis humoraler AK im Serum mittels ELISA sowie AGID. Eigene Untersuchungen sowie Ergebnisse von Fechner (1995) und Mewes (1996) weisen darauf hin, daß diese Tests trotz vorhandener BLV-Infektion negative Befunde ergeben können. Ähnliche Beobachtungen beschrieben Kaaden *et al.* (1982 a,b), Roberts *et al.* (1986) und Kuzmak *et al.* (1993). Sie wiesen insbesondere darauf hin, daß in Abhängigkeit von der Applikationsart sowie der verabreichten Zellmenge und -population neben den typischen Befunden eine BLV-positive Phase ohne nachfolgende AK-Reaktion auftrat, bzw. der AK-Nachweis nur kurzzeitig positiv

verlief und die Tiere niemals eine Persistierende Lymphozytose (PL) oder Tumoren entwickelten. Stille Virusträger stellen insbesondere in leukosefreien Beständen eine potentielle Gefahr für die Weiterverbreitung des BLV dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb:

1. Teile des BLV-Genoms serologisch negativer und positiver Provirussträger sowie von Rindern mit tumoröser Leukose zu amplifizieren und zu sequenzieren,
2. diese Sequenzen mit der Sequenz aus der Literatur bekannter BLV-Proviren zu vergleichen,
3. anhand von theoretischen RNA- und Proteinsekundärstrukturen Folgen von DNA-Sequenzänderungen zu erkennen,
4. die Virusexpression serologisch negativer und positiver Probanden in der Leukozytenkurzzeitkultur zu untersuchen,
5. verschiedene Sequenzierungsmethoden hinsichtlich ihrer Rentabilität und Praktikabilität zu vergleichen.

Die Untersuchungen sollen die Gemeinsamkeiten und Unterschiede verschiedener Provirusisolate zeigen und Zusammenhänge mit dem Infektionsstatus sowie der Herkunft der Wirtstiere darlegen.

2. Literaturübersicht

2.1. Enzootische Rinderleukose (eRL)

2.1.1. Agens der Rinderleukose

Das Bovine Leukosevirus (BLV) ist ein natürlich vorkommendes, exogenes, in Rindern replikationsfähiges Retrovirus und kausales Agens der enzootischen Rinderleukose (Miller *et al.*, 1969; Kenyon und Piper, 1977; Paul *et al.*, 1977a,b; Kettmann *et al.*, 1976, 1978; Burny *et al.*, 1978). Die eRL ist eine neoplastische Proliferation von B-Lymphozyten (Burny *et al.*, 1987). Das Virus ist entwicklungsgeschichtlich, strukturell und biologisch mit den Humanen T-Zell lymphotropen Viren Typ-I und Typ-II (HTLV-I, HTLV-II) und dem Simian T-Zell lymphotropen Virus (STLV) verwandt (Oroszlan *et al.*, 1982; Sagata *et al.*, 1984a,b, 1985a,b) und bildet mit diesen eine Gattung, die HTLV-BLV-Gruppe innerhalb der Familie der Retroviridae (Coffin, 1991). Das BLV hat keinen bevorzugten chromosomalen Integrationsort (Kettmann *et al.*, 1980a,b, 1982; Deschamps *et al.*, 1981; Onuma *et al.*, 1982; Oroszlan *et al.*, 1982). Obwohl das Virus der Rinderleukose kein Onkogen zellulären Ursprungs enthält, ist es in der Lage, Zellen zu transformieren (Onuma *et al.*, 1982; Rhim *et al.*, 1983). Es ist deshalb wahrscheinlich, daß das Virusgenom selbst Sequenzen beherbergt, welche für die zelluläre Transformation und/oder Replikation verantwortlich sind (Sagata *et al.*, 1984b).

2.1.2. Vorkommen und Verbreitung

Mit der Einführung serologischer Untersuchungsverfahren zur Diagnose der eRL in den 70er Jahren mußte man feststellen, daß der Verbreitungsgrad und die Anzahl infizierter Rinder weitaus höher lag, als vermutet (Wittmann, 1993). Heute ist davon auszugehen, daß die eRL in mehr als einem Drittel aller Länder der Erde verbreitet ist. Obwohl die BLV-Infektion weltweit vorkommt, haben einige europäische Länder, wie Deutschland oder Österreich, durch Merzung serologisch positiver Tiere diese Seuche fast ausgerottet (Schramm und Aragon, 1994; Schwartz und Levy, 1994) bzw. sind leukosefrei, wie z.B. die Schweiz und Nordirland. Territoriale Konzentrationen der eRL ergeben sich aus bestimmten Rasseverteilungen, Zentren spezieller Zuchttrichtungen, bestimmten Importgebieten und dem Vorkommen natürlicher Grenzen (Wittmann, 1993). Die eRL kommt in vielen Ländern der Welt endemisch vor (Schwartz und Levy, 1994). In Gebieten hoher Verseuchung weist sie Reagentenquoten von 60% und darüber auf. In Ländern mit geringem Verseuchungsgrad liegt die durchschnittliche Befallsquote z.T. bei <1%, wobei territoriale Befallsraten bis 15% vorliegen können (Ressang *et al.*, 1976; Mammerickx *et al.*, 1978). In Deutschland (alte Bundesländer) nahm die Zahl der Neuausbrüche von Jahr zu Jahr kontinuierlich ab. Die Inzidenz sank nach Lorenz (1990) von 735 (1984) auf 46 (1989). Nach der Wiedervereinigung beider deutscher Staaten kam es zu einem Anstieg der Leukose-Neuausbrüche in den alten Bundesländern auf 205 (Lorenz, 1990). Zur gleichen Zeit waren in den neuen Bundesländern 1.624.000 Kühe mit dem bovinen

Leukosevirus infiziert, ca. 350.000 weniger Tiere als noch 1989. Im Jahr 1995 betrug die Zahl der Neuausbrüche in den alten 157, in den neuen Bundesländern 33.

Der Tatbestand des Neuausbruches gilt als erfüllt, wenn im Rahmen regelmäßig durchgeführter serologischer Bestandsuntersuchungen in einem Bestand mindestens ein positives Tier gefunden wird.

DiGiacomo (1992a) berichtete, daß in Kanada 9,3% der Milchrinder und 40% der Milchviehherden, sowie 0,5% der Fleischrinder und 11-14% der Mastviehherden infiziert waren. Jacobs *et al.* (1995) beschrieben, daß 56,7% von 920 untersuchten Rindern in Ontario AK gegen Retroviren zeigten. Unter den Milchrindern wiesen 5,5% AK gegen das Bovine Imundefizienz-Virus (BIV), 25,7% gegen das BLV und 39,6% AK gegen das Bovine Sycytial-Virus (BSV) auf. In Amerika sind über 1/3 der Milchrindherden befallen, mit einem Verseuchungsgrad bis zu 85%. In Brasilien wurde erst gegenwärtig mit der Ermittlung des eRL-Durchseuchungsgrades begonnen (Cordeiro *et al.*, 1994). So fanden Birgel *et al.*, (1995) eine Gesamtprävalenz der BLV-Infektion von 50%. Die derzeitige Bedeutung der eRL in Costa Rica wird in umfangreichen Veröffentlichungen (Dolz, 1990; Schramm und Aragon, 1994; Jimenez *et al.*, 1995) dargelegt. Dort wird, wie in Großbritannien (Coats, 1995), eine enge Beziehung zwischen dem BLV und BIV vermutet und davon ausgegangen, daß das BIV hinsichtlich seiner epidemiologischen Parameter dem BLV folgen wird (Hidalgo *et al.*, 1995). Meszaros *et al.* (1994) berichteten über eine Holstein-Friesian-Herde mit einem Verseuchungsgrad von 62% in Ungarn. In Polen wiesen in der Region um Warschau 5% der Rinder BLV-Antikörper auf, wobei in einzelnen großen Herden Verseuchungsgrade bis 47 % auftraten (Losieczka und Klimentowski, 1994). Namibia zeigte, in Abhängigkeit von regionalen Besonderheiten, Verseuchungsgrade zwischen 0-52,6% (Kaura und Hubschle, 1994). Die hohe eRL-Durchseuchungsrate vieler Länder gewinnt mit der Zunahme globaler Handelsbeziehungen auch für Deutschland an Bedeutung.

2.1.3. Epidemiologie und Übertragung

Die epidemiologischen Parameter der Infektion mit dem bovinen Leukosevirus kennzeichnet Tabelle 1 (nach DiGiacomo, 1992b,c).

Tab.1: Epidemiologische Faktoren der BLV-Infektion und ihre Bedeutung (nach DiGiacomo, 1992b,c)

epidemiologischer Faktor	charakteristische Merkmale
Produktionstyp	Die Infektion ist bei Milchrindern weiter verbreitet als bei Fleischrindern.
Geschlecht	Es gibt keine geschlechtstypischen Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens der Infektion.

Tab.1: Fortsetzung

epidemiologischer Faktor	charakteristische Merkmale
Rasse	Bei gleichen Aufzucht- und Haltungsbedingungen gibt es zwischen den Milchrindrassen keine signifikanten Unterschiede.
Alter	Bei Jungrindern über sechs Monaten steigt die Häufigkeit der Infektion mit dem Alter und ist am höchsten im Alter von 2-3 Jahren. Ab einem Alter von drei Jahren bleibt die Infektionsrate relativ konstant. Rinder, die in Herden mit hohem Durchseuchungsgrad aufwachsen, bekommen die Infektion mit geringerem Alter.
Muttertier / Vatertier	Der Einfluß des Infektionsstatus der Elterntiere auf die Nachkommenschaft ist nicht eindeutig geklärt. Während die Übertragung über Keimzellen und Embryonen infizierter Elterntiere eher unwahrscheinlich ist, gilt eine <i>in utero</i> Übertragung und eine Infektion durch Milch und Kolostrum als bewiesen. Eventuell werden Resistenz und Empfänglichkeit durch genetische Faktoren bestimmt.
Infektionszeitpunkt	Es gibt kein bestimmtes Saisonmuster des Auftretens der Infektion. Das Ansteckungsrisiko steigt jedoch in den Wintermonaten durch den engen Tierkontakt im Stall.

Das bovine Leukosevirus ist ein zellgebundenes Virus. Als zellfreies Virus ist es nur am Anfang der Infektion oder im sehr späten Stadium, wenn lymphoide Neoplasien zu einer Immundepression geführt haben, nachweisbar. Aus diesem Grunde infizieren sich die meisten Tiere nicht mit zellfreiem Virus, sondern durch die Aufnahme infizierter Lymphozyten (DiGiacomo, 1992c).

Die weitaus größte Bedeutung besitzt die **horizontale Ausbreitung**. Sie unterteilt sich in:

Übertragung durch Kontakt von Tier zu Tier

In Herden mit hoher Tierkonzentration ist die Übertragung durch Kontakt von Tier zu Tier bedeutend (Wilesmith *et al.*, 1980). Eine besondere Prädisposition bietet enger Stallkontakt sowie der gemeinsame Weidegang und die gemeinsame Nutzung des Abkalbestalls infizierter und nicht infizierter Herden. Dabei sind nicht tragende Tiere durch ihr Brunstverhalten besonders gefährdet (Lassauzet *et al.*, 1991).

Übertragung durch Sekrete und Exkrete

Das BLV ist in den zellulären Komponenten der Milch und des Kolostrums infizierter Rinder vorhanden (Miller und Van der Maaten, 1979; Straub 1982, 1984). Dennoch erwies sich vereinzelt auch zellfreie Milch von Tieren mit AK gegen p24 und persistierender Lymphozytose als infektiös (Straub, 1984). Bei 6-16% der Kälber, welche von ihren infizierten

Müttern getrennt, aber unter Verwendung von deren Milch aufgezogen wurden, war im Alter von 6 Monaten eine BLV-Infektion feststellbar (Ferrer und Piper, 1981). Die Zugabe von 10^6 Lymphozyten BLV-infizierter Tiere zu BLV-freiem Kolostrum führte zu einer Infektion der Kälber, während selbst eine Zugabe von 10^9 Lymphozyten infizierter Tiere in das Kolostrum BLV-infizierter Rinder nicht in einer Infektion resultierte. Die Ursache dafür liegt im Vorhandensein virusspezifischer AK in der Milch infizierter Kühe (Van der Maaten *et al.*, 1981).

Verschiedene Untersucher konnten in Einzelfällen die Übertragung des BLV durch Urin, Speichel, Nasensekret und Bronchioalveolaresekret und eine daraus resultierende Infektion diagnostizieren (DiGiacomo, 1992b). In Fäzes und Hautgeschabseln wurde bisher kein BLV nachgewiesen (Ressang *et al.*, 1982; Straub, 1982). Generell stellen jedoch alle mit Blut kontaminierten Sekrete eine Infektionsquelle dar.

Übertragung durch Blut

Die intradermale Inokulation von 10.000 peripheren Leukozyten oder 2.500 Lymphozyten BLV-infizierter Rinder reicht aus, um Kälber erfolgreich zu infizieren (Van der Maaten und Miller, 1978). Die genannte Lymphozytenzahl ist identisch mit einem Vollblutvolumen von 0,5 µl. Die Übertragung virushaltigen Blutes kann beispielsweise während der Blutprobenentnahme (Wilesmith, 1979), während des Enthornungsvorganges (DiGiacomo *et al.*, 1986; Lassauzet *et al.*, 1990) oder durch kontaminierte Vakzinen (Rogers *et al.*, 1988) erfolgen. Die experimentelle rektale Infusion von 2 ml bzw. 500 ml Blut einer BLV-positiven Kuh resultierte in einer Infektion des Rezipienten (Henry *et al.*, 1987; Hopkins *et al.*, 1988). Über die Bedeutung der rektalen Palpation für die Virusübertragung liegen sehr unterschiedliche Ergebnisse vor. Lassauzet *et al.* (1989) und Hopkins *et al.* (1991) stellten keine Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens der BLV-Infektion nach rektaler Untersuchung in Milchrindherden mit hohem Durchseuchungsgrad gegenüber Herden mit geringem Befall bzw. keine Unterschiede in der Infektionsrate nach rektaler Kontrolle mit Handschuhwechsel gegenüber Untersuchungen ohne Wechsel des Handschuhs fest. Nur in einer Versuchsherde war die Infektionsrate nach Wechsel der Handschuhe deutlich geringer (Hopkins *et al.*, 1991). Nach Divers *et al.* (1995) haben Tiere, die nach einem positiven Rind ohne Handschuhwechsel rektal palpiert werden, ein 2,8fach höheres Risiko sich mit BLV zu infizieren. Losieczka und Klimentowski (1994) wiesen nach, daß die Häufigkeit des Auftretens der eRL in Regionen in denen der Tierarzt sowohl große, starkverseuchte Herden als auch kleinere, schwachverseuchte Herden betreute, doppelt so hoch war, wie in anderen Regionen.

Übertragung durch Insekten

Das 2-3 mal häufigere Auftreten von BLV-Infektionen in Herden Taiwans bei Weidehaltung gegenüber Herden mit ganzjähriger Stallhaltung wurde mit der saisonbedingten Aktivität blutsaugender Insekten erklärt (Wang, 1991). Während die experimentelle Übertragung des Virus nach Inokulation von Teilen der Mundhöhle solcher Insekten, die infiziertes Blut

aufgenommen hatten eine BLV-Infektion in Schafen hervorrief, waren Versuche an Rindern weniger erfolgreich (DiGiacomo, 1992b). Bech-Nielsen *et al.* (1978) konnten im Mitteldarm bestimmter Tabanus-Arten die zur Infektion notwendige Dosis von 2500 Lymphozyten nachweisen. Diese Insekten sind von besonderer Bedeutung, da sie ihre Nahrungsaufnahme nach Abwehrreaktionen des befallenen Tieres unterbrechen, um sie gegebenenfalls auf einem anderen Wirt fortzusetzen. Kaaden *et al.* (1982a) gelangen die Übertragung der BLV-Infektion durch *Ixodes rhicinus* auf einen Bullen. Kälber von Mast- und Milchrindrassen sind für die Übertragung des BLV durch blutsaugende Insekten gleichermaßen empfänglich (Hasselschwert *et al.*, 1993).

Damit ist der Übertragungsweg durch blutsaugende Arthropoden potentiell möglich, aber im Gesamtgeschehen der eRL in unseren Breiten nicht überzubewerten (Wittmann, 1993).

Eine weitaus geringere Bedeutung als die beschriebenen horizontalen Übertragungswege besitzt die **pränatale Übertragung** des BLV. Für diesen Weg kommt nur die Infektion *in utero* in Frage. Die Nutzung von Keimzellen und Embryonen infizierter Elterntiere spielt für die Übertragung des BLV keine Rolle. Weder im Rezipienten-Elterntier noch im Neonaten konnte eine Infektion nachgewiesen werden (Miller und Van der Maaten, 1979; Kaja und Olson, 1982; Straub, 1982).

Übertragung in utero

BLV kann plazentar übertragen werden, so daß Kälber infizierter Mütter als BLV-Träger geboren werden (Ferrer *et al.*, 1976; Thurmond und Burrige, 1982; Thurmond *et al.*, 1982, 1983). In einer starkverseuchten Versuchsherde, in der viele Tiere Lymphosarkome entwickelt hatten, betrug die *in utero* Infektionsrate 14-18% (Ferrer *et al.*, 1976; Piper *et al.*, 1979). In geringer verseuchten Herden lag diese Rate nur bei 0,5-8% (Thurmond *et al.*, 1982, 1983). Der AK-Nachweis in Foeten deutete darauf hin, daß sie mindestens nach dem dritten Trächtigkeitsmonat und damit nach Erreichen der Immunkompetenz infiziert wurden (Ferrer *et al.*, 1976, 1977). Die pränatale Infektionsrate ist unabhängig vom Alter und der Anzahl der Trächtigkeiten des Muttertieres (Thurmond *et al.*, 1983).

2.1.4. Pathogenese und klinisches Bild

BLV ist ein transaktivierendes Retrovirus, welches B-Zelltumoren in fast allen infizierten Schafen und bei etwa 5% aller infizierten Rinder hervorruft. Die Krankheit hat eine lange Latenzzeit. Die Infektion entwickelt sich über Jahre mit und ohne persistierender Lymphozytose. PL ist die subklinische Manifestation der BLV-Infektion. Sie ist eine polyklonale Proliferation nicht transformierender B-Zellen. Zwischen 20-43% der Leukozyten von Tieren mit PL beherbergen das BLV als Provirus (Kettmann *et al.*, 1980a,b; Alexandersen *et al.*, 1993; Mirsky *et al.*, 1993).

BLV-induzierte Tumoren sind monoklonal und enthalten pro Zelle bis zu vier Kopien des Provirus (Kettmann *et al.*, 1980a,b, 1982, 1984), die an verschiedenen Stellen des

Wirtsgenoms integriert sind (Kettmann *et al.*, 1983; Gregoire *et al.*, 1984). Ein Viertel dieser Kopien beherbergt Deletionen. Oftmals fehlen in der leukämischen Zelle Teile der 5' Hälfte des viralen Genoms (Kettmann *et al.*, 1982). Allen isolierten Proviren ist gemein, daß sie eine unversehrte X-Region besitzen, was deren Rolle in der Tumorgenese betont (Burny *et al.*, 1988; Van den Broeke *et al.*, 1988).

Während Ishibashi *et al.* (1987) und Bhagavati *et al.* (1988) bei HTLV- infizierten Patienten virale Proteine in Serum und Spinalflüssigkeit, sowie mRNA in frisch isolierten peripheren Lymphozyten nachwiesen, konnten virale Partikel, Proteine oder RNA in unkultivierten Lymphozyten von BLV-Tumortieren lange Zeit nicht entdeckt werden (Kettmann *et al.*, 1980b, 1982; Gupta *et al.*, 1984; Van den Broeke *et al.*, 1988).

Das Vorkommen antiviraler AK in infizierten Rindern ließ jedoch darauf schließen, daß eine Virusexpression *in vivo* stattfinden muß. Der Nachweis **viraler Transkripte** gelang mittels der *in situ*-Hybridisierung (Lagarias und Radke, 1989; Haas *et al.*, 1992; Alexandersen *et al.*, 1993). Jensen *et al.* (1991) und Alexandersen *et al.* (1993) wiesen spezifische **mRNA** mittels Reverser-Transkriptase-PCR aus frisch isolierten Lymphozyten, Poon *et al.* (1993) im Serum serologisch positiver, BLV-infizierter Rinder und Schafe nach. In kultivierten Tumorzellen wurde nur eine geringe bzw. keine Expression beobachtet (Kettmann *et al.*, 1985; Van den Broeke *et al.*, 1988). Nach Isolierung und Kurzzeitkultivierung (2-3 Tage) von Lymphozyten, insbesondere von Tieren mit verändertem weißem Blutbild, wurde die BLV-Expression anhand **viraler Proteine** nachgewiesen (Miller *et al.*, 1969; Cockerell und Rovnak, 1988).

Bei verschiedenen Viren (z.B. Adenoviren, HTLV) ist die Transaktivierung eng mit der Zelltransformation verbunden (Willems *et al.*, 1989). Beim BLV kann man davon ausgehen, daß das komplette Virus für initiale Schritte des Immortalisierungs- und Transformationsprozesses zwingend notwendig ist, später scheint es entbehrlich zu sein (Kettmann *et al.*, 1985; Van den Broeke *et al.*, 1988; Willems *et al.*, 1989). Allein die transiente Expression von p38 kann zu einer permanenten Expression kritischer zellulärer Gene führen (Burny *et al.*, 1987).

Zwei **Möglichkeiten des Transformationsprozesses** müssen gegenübergestellt werden:

- Modifikationen des genetischen Materials (Mutationen, Deletionen, Amplifikationen) machen die Zelle empfänglich für den Übergang in den neoplastischen Status.
- Der Transformationsprozeß beruht vollständig auf Regulationsmechanismen ohne Alteration der DNA. In diesem Falle schalten virale Mechanismen, z.B. mit Hilfe der Transaktivierung durch p38, Funktionseinheiten der Wirtszelle zur Herausbildung von Tumoren an (Willems *et al.*, 1989). Diese Modifikation hält an, auch wenn alle anderen viralen Funktionen bereits abgeschaltet sind.

Zellen BLV-induzierter Tumoren tragen auf ihrer Oberfläche ein **Tumor-Assoziiertes-Antigen** (TAA; Jacobs *et al.*, 1981; Okada *et al.*, 1987; Onuma, 1989). Bicka *et al.* (1993) entdeckten sowohl das TAA, als auch TAA-AK in BLV-infizierten Tieren. BLV-infizierte Tiere bei denen mittels mAK TAA nachgewiesen werden kann, besitzen das Potential, die tumoröse BLV-Form zu entwickeln (Onuma, 1989; Reimacher *et al.*, 1989).

Sowohl im ovinen als auch bovinen Zellgenom wurde ein 366 bp großes **Tumor-Supressor-Gen** beschrieben. Es ist in der Lage ein Protein (p53) zu kodieren (Dequiedt *et al.*, 1995a,b). Fünf von zehn BLV-induzierten bovinen Tumoren wiesen Mutationen im p53-Gen auf, während nur eine von sieben Proben zirkulierender Leukozyten Alterationen des p53 zeigte. Die Untersuchung oviner Tumoren ergab, im Gegensatz zum Rind, keine Veränderungen des Supressor-Gens, was die unterschiedlichen molekularbiologischen Mechanismen in Schafen und Rindern während der BLV-induzierten Pathogenese verdeutlicht (Dequiedt *et al.*, 1995b). Nach Evermann (1992) sind andere Retroviren und das bovine Herpesvirus in der Lage, die Leukämogenese der BLV-Infektion zu beeinflussen. Untersuchungen von Jacobs *et al.* (1995) zeigten, daß 0,9% der untersuchten Tiere gleichzeitig Träger von AK gegen BIV und BLV sind. Etwa 10% der Rinder wiesen gleichzeitig AK gegen BLV und BSV auf. Einen Zusammenhang zwischen BLV und BIV vermuten auch Coats (1995) und Hidalgo *et al.* (1995). Es wird angenommen, daß diese Viren die Entwicklung der PL und die Tumorbildung fördern (Amborski *et al.*, 1989). Die Effekte einer Doppel-Infektion mit beiden Viren (BIV, BSV) sowie ihr Einfluß auf die Entstehung chronischer Mastitiden und Pododermatitiden sind in zukünftigen Untersuchungen abzuklären (Snider *et al.*, 1996). Zu einem gehäuften Auftreten der tumorösen Leukoseformen kann ein Befall mit *Trypanosoma theileri* führen (Wittmann *et al.*, 1993).

- **Verlaufsformen und klinisches Bild**

Die eRL tritt in drei typischen und einer atypischen Verlaufsform auf. Typisch sind die inapparente Form, die persistierende Lymphozytose und die tumoröse Leukose.

Die inapparente Verlaufsform ist am häufigsten zu beobachten (Liebermann *et al.*, 1983). Sie ist durch die polyklonale Integration des BLV in B-Lymphozyten und das Auftreten persistierender BLV-AK charakterisiert (Coulsten *et al.*, 1991). Klinische Erscheinungen werden nicht beobachtet. Diese inapparente Form kann während des gesamten Lebens erhalten bleiben oder in die persistierende Lymphozytose bzw. Tumorform übergehen (Ferrer, 1980).

Die persistierende Lymphozytose ist eine polyklonale Proliferation von B-Zellen. Sie tritt oft als zweite Phase der BLV-Infektion auf. Sie zeigt sich als: absolute Vermehrung der Leukozyten, absolute oder prozentuale Vermehrung der Lymphozyten und dem Auftreten von jugendlichen Lymphozyten. Befallene B-Lymphozyten weisen in der Regel Modifikationen auf, wie: Veränderung der Membranglykosylierung, Zunahme der Zellgröße und Erhöhung der Anzahl der Oberflächen-IgM-Moleküle (Burny *et al.*, 1988). Die PL tritt bei 10-30% aller infizierten Rinder im Alter von drei bis sechs Lebensjahren auf (Murtaugh *et al.*, 1991; Wittmann, 1993), eine familiäre Prädisposition wird angenommen (Abt *et al.*, 1970). Das Bovine-Lymphozyten-Antigen (BoLA) spielt eine entscheidende Rolle für die Empfänglichkeit oder Resistenz zur B-Zell -Proliferation und Lymphozytose (Lewin *et al.*, 1988). Relative Resistenz ist verbunden mit dem BoLA DA7, Empfänglichkeit mit BoLA D12.3 und W8 (Lewin und Bernoco, 1986).

Die PL wird als benigne Phase oder Präleukose der eRL bezeichnet (Wittmann, 1993). Sie führt nicht zu Gesundheitsschäden oder Leistungsminderung der betroffenen Rinder. Zwischen 10 und 30% der Tiere mit PL gehen im Alter von 4-8 Jahren in die tumoröse Phase über (Mussgay und Kaaden, 1978).

Die tumoröse Form entwickelt sich bei Vorhandensein einer PL oder, in etwa 50 % der Fälle, auch ohne solche (aleukämische Leukose). Sie ist die wichtigste Tumorerkrankung des Rindes (Ghysdael *et al.*, 1984; DiGiacomo, 1992a). Klinisch auffällig sind Schwellungen der Lymphknoten. Entsprechend ihrer Lokalisation entwickeln sich typische Erscheinungsbilder, wie: Lahmheit, Schluckbeschwerden, Exophthalmus, Atembeschwerden und leukotische Prozesse innerer Organe (Wittmann, 1993). Schmitz und Seahorn (1994) berichten kürzlich über das Vorkommen eines Tumors in der Vorkammerscheidewand eines Bullen mit eRL. Der Verlauf ist meist subakut bis chronisch, der Tod tritt nach längerer Krankheit (Monate bis Jahre) unter allgemeiner Kachexie ein.

Bei Tieren mit PL oder tumoröser Leukose sind zeitlebens BLV und AK nachweisbar. Sie sind bis zu ihrem Tod Virusausscheider.

Die atypische Form der eRL wurde erstmals von Kaaden *et al.* (1982b) beschrieben. Sie stellten fest, daß unter bestimmten Bedingungen Rinder als Virusträger auftraten, welche nicht in der Lage waren, nachweisbare AK-Mengen zu bilden, bzw. bei denen die AK-Befunde nur über 4-6 Monate positiv verliefen. Roberts *et al.* (1986) fanden heraus, daß die AK-Bildung durch die Applikationsart und die applizierte AG-Menge zu beeinflussen ist. Nur bei geringen Infektionsdosen waren atypische Verlaufsformen zu beobachten (Wittmann *et al.*, 1986, Burkhardt *et al.*, 1988, 1991). Offensichtlich stehen ungewöhnliche Infektionswege, geringe Virusmengen, Reinfektionen, intrauterine Infektionen und eine Infektionen in den ersten Lebenstagen mit dem Auftreten atypischer Infektionsverläufe in Zusammenhang (Wittmann, 1993).

2.1.5. Prophylaxe und Bekämpfung

Mit sehr unterschiedlichem Ergebnis wird seit langem versucht, eine Vakzine zur Vorbeugung gegen die BLV-Infektion zu entwickeln. Drei Antigentypen wurden in solchen Vakzinen verwendet: virale Glykoproteine (insbesondere gp51), inaktivierte Viren und BLV-infizierte Zelllinien. Eine Impfung mit BLV-Glykoprotein (Miller *et al.*, 1983), sowie die Inokulation von lymphoblastischen Zellen (Theilen *et al.*, 1982) führte zu keinem belastungsfähigen Schutz bei den Versuchstieren. Fukuyama *et al.* (1993) beschrieben die erfolgreiche Vakzination von Rindern mit verschiedenen BLV-infizierten Zelllinien. Willems *et al.* (1989) berichteten über die Fähigkeit eines Vaccinia-Virus-Vektor-Systems, BLV-Proteine gp51 und gp30 zu exprimieren und wiesen auf die Bedeutung dieses Systems für die Herstellung einer prophylaktischen Vakzine hin. Auch die Entwicklung von BLV-Derivaten, die sich unabhängig von *tax* und *rex* replizieren, könnte für die Herstellung einer Vakzine gegen Retrovirus-induzierte Krankheiten genutzt werden (Schwartz und Levy, 1994; Boris-Lawerie und Temin, 1995). Hingegen

konnten Patrascu *et al.* (1980) und Parfanovich *et al.* (1983) bis zu 100%igen Schutz bei Verwendung eines Impfstoffes aus inaktiviertem Virus erzielen.

Jede BLV-Vakzine muß dem Impfling die Möglichkeit bieten, die Verbreitung des zellassozierten Virus mittels seiner Immunmechanismen kontrollieren zu können (Portetelle *et al.*, 1989a). Da der AK-Nachweis bei geimpften Tieren die Infektion nicht anzeigt, wird der direkte Virusnachweis nötig.

Zum heutigen Zeitpunkt können nur jährlich mehrmalige Untersuchungen in den Beständen, die Selektion seropositiver Tiere, Maßnahmen zur Verhinderung der Seuchenausbreitung und der Schutz leukosefreier Bestände vor Neueinschleppung zu einer Tilgung der Seuche führen (Wittmann, 1993). Verschiedene Bekämpfungsprogramme dienen der Erreichung dieses Zieles (DiGiacomo, 1992a; Wittmann, 1993).

Das Programm "**Test und Schlachtung**" wird zumeist in Ländern mit geringgradiger Leukoseverseuchung und fast ausschließlich bei mittel- und kleinbäuerlicher Rinderhaltung angewandt. Milchkühe und Jungrinder dieser Haltungsform werden jährlich mindestens zweimal untersucht und nach Vorliegen eines seropositiven Ergebnisses sofort die Schlachtung des Reagenten veranlaßt.

"**Test und Isolation**" ist ein Verfahren, daß insbesondere in stark verseuchten Rinderherden mit einem hohen Konzentrationsgrad zur Anwendung gelangt. Im Rahmen dieses Programms werden seropositive Rinder ausgesondert und räumlich getrennt von der übrigen Herde weiterhin wirtschaftlich genutzt. Liegt der Verseuchungsgrad über 30-60% verbleiben die seropositiven Rinder in ihren Stallungen, die Eindämmung der eRL erfolgt über die Selektion der BLV-freien Nachzucht.

"**Test-Isolation-Schlachtung**" ist ein bisher nur in der Rinderhaltung der ehemaligen DDR durchgeführtes Programm, in welchem der Schwerpunkt darin lag, aus den seronegativen Kälbern seropositiver Mütter mittels veterinärmedizinischer, diagnostischer und organisatorischer Maßnahmen möglichst innerhalb von zwei Jahren eine weitgehend seronegative Jungrinderpopulation heranzuziehen (Wittmann *et al.*, 1993). Zu organisatorisch günstigen Zeitpunkten (z.B. kurz vor einer geplanten Umstellung) wurden alle Tiere serologisch untersucht und seropositive Reagenten in Abhängigkeit von ihrem wirtschaftlichen Nutzungsgrad isoliert bzw. geschlachtet. Außerdem erfolgte generell (oder gruppenweise) die Verfütterung von Kolostrum und Milch seronegativer Mutterkühe an Kälber seropositiver Kühe, um eine Infektion über die Milch zu vermeiden.

In Tabelle 2 werden die Vor- und Nachteile der drei erläuterten Programme gegenübergestellt.

Tab.2: Vor- und Nachteile verschiedener Programme zur Bekämpfung der eRL

Vorteile	Nachteile
Test und Schlachtung	
- die Infektion ist in wenigen Monaten aus der Herde eliminiert	- in Abhängigkeit vom Verseuchungsgrad führt diese Methode zu besonders hohen ökonomischen Verlusten
Test und Isolation	
- die Tiere müssen nicht vorzeitig geschlachtet werden	- erforderlich sind getrennte Anlagen und Unterbringungsmöglichkeiten für infizierte und nicht infizierte Rindergruppen - erforderlich ist eine hohe Untersuchungsfrequenz - in Abhängigkeit vom Verseuchungsgrad kann die Zeitdauer der BLV-Eliminierung mehrere Jahre betragen
Test-Isolation-Schlachtung	
- die Tiere werden nur bei geringem wirtschaftlichen Nutzungsgrad der Schlachtung zugeführt - das Programm ist besonders für Rinderhaltungen mit hohem Konzentrationsgrad und einer intensiven Verflechtung in der Stufenproduktion geeignet	-erforderlich ist ein verändertes Management zur Verhinderung der Ausbreitung der Infektion - erforderlich ist eine der Stufenproduktion angepaßte Untersuchungsfrequenz - in Abhängigkeit vom Verseuchungsgrad kann die Zeitdauer des Aufbaus einer virusfreien Jungrinderherde mehr als zwei Jahre betragen

2.1.6. Bovine Leukosevirus-Infektionen anderer Spezies

Neben dem Rind, als natürlichen Hauptwirt, gelang es, Schafe (Wittmann und Urbaneck, 1969; Burny *et al.*, 1980), Ziegen (Mammerickx *et al.*, 1980, 1981a, 1987), Kaninchen (Singh und Bansal, 1986a,b; Onuma *et al.*, 1990; Willems *et al.*, 1992b), Schweine (Mammerickx *et al.*, 1981), Katzen, Hunde, Ratten, Meerschweinchen (Baumgartener und Olson, 1982) und Affen (Van der Maaten und Miller, 1976) mit dem BLV zu infizieren. Während alle genannten Tierarten auf die experimentelle Infektion mit AK-Bildung reagierten, entwickelten zusätzlich eine Vielzahl der befallenen Schafe (Wittmann und Urbaneck, 1969; Burny *et al.*, 1980, 1987; Mammerickx *et al.*, 1980, 1988; Kenyon *et al.*, 1981) und teilweise auch Hühner (Altanerova *et al.*, 1990) und Ziegen (Olson *et al.*, 1981; Kettmann *et al.*, 1984) Tumoren. Die

Entwicklung maligner Lymphome nach natürlicher Infektion bei Schafen hingegen ist selten (Burny *et al.*, 1980).

Während serologische Untersuchungen von Wildwiederkäuern in Norddeutschland negativ verliefen (Dedek *et al.*, 1987), wurde bei wildlebenden Wasserbüffeln in Taiwan eine natürliche Infektionsrate bis zu 8% beobachtet (Wang, 1991). Auch in Schweden wies man ein Onkovirus (wahrscheinlich BLV) bei Elchen nach. Dieses Virus ruft eine Zehrkrankheit hervor und hat bereits zum Tod von mehr als tausend Elchen geführt (Merza *et al.*, 1994). Burny *et al.* (1985) machten das Bovine Leukosevirus auch für die Zehrkrankheit von Kaninchen verantwortlich.

Die serologische Überprüfung BLV-exponierter Personen, wie Labor- und Schlachthofpersonal, Tierärzte und Landwirte lieferte bislang keine Hinweise für das Vorhandensein BLV-spezifischer AK bei diesen Personengruppen (Gilden *et al.*, 1975; Devare *et al.*, 1976). Wenngleich es keinen Beweis für die intravitale Replikation des BLV in Schimpansen gibt, deutet sowohl ihre AK-Bildung (Van der Maaten und Miller, 1976) als auch die erfolgreiche Infektion humaner embryonaler Zellen (Graves und Ferrer, 1976) auf eine gewisse Interaktion des Virus mit Primatenzellen hin.

2.2. Struktur des Bovinen Leukosevirus

2.2.1. Morphologie

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an kurzzeitkultivierten Lymphozyten BLV-infizierter Rinder sowie von permanent infizierten Zellkulturen zeigten ein sphärisch behülltes Viruspartikel von 100-120 nm Durchmesser. Dieses Partikel besitzt einen Innenkörper (Nukleoid, **Core**) von 60-80 nm, welcher von zwei Membranen umgeben wird (Calafat *et al.*, 1974; Kaaden *et al.*, 1977). Die hexagonal erscheinenden Konturen des Core lassen auf eine ikosaedrische Symmetrie schließen. An die innere, diploide, einzelsträngige 60-70S RNA sind die internen Strukturproteine p12 und p15 gebunden, die gemeinsam mit dem p10 und p24 das Core bilden (Hruskova-Heidingsfeldova, 1995).

Während des Buddings an einer zellulären Membran werden die viralen Partikeln mit einer von der Wirtszelle stammenden Lipiddoppelmembran umgeben. Diese bildet gemeinsam mit den Hüllproteinen gp30 und gp51 die äußere Membran (**Envelope**, Kettmann *et al.*, 1975, 1976; Burny *et al.*, 1978; Ghysdael *et al.*, 1979; Nyakatura *et al.*, 1985). Auf der Envelope erheben sich, wie bei murinen und felines Typ-C-Partikeln, etwa 9 nm lange Protrusionen mit 4 nm hohen Knöpfen (Weiland und Ueberschär, 1976; Nyakatura *et al.*, 1985). Das dimere RNA-Genom wurde elektronenmikroskopisch dargestellt (Dekegel, 1987).

2.2.2. Genom

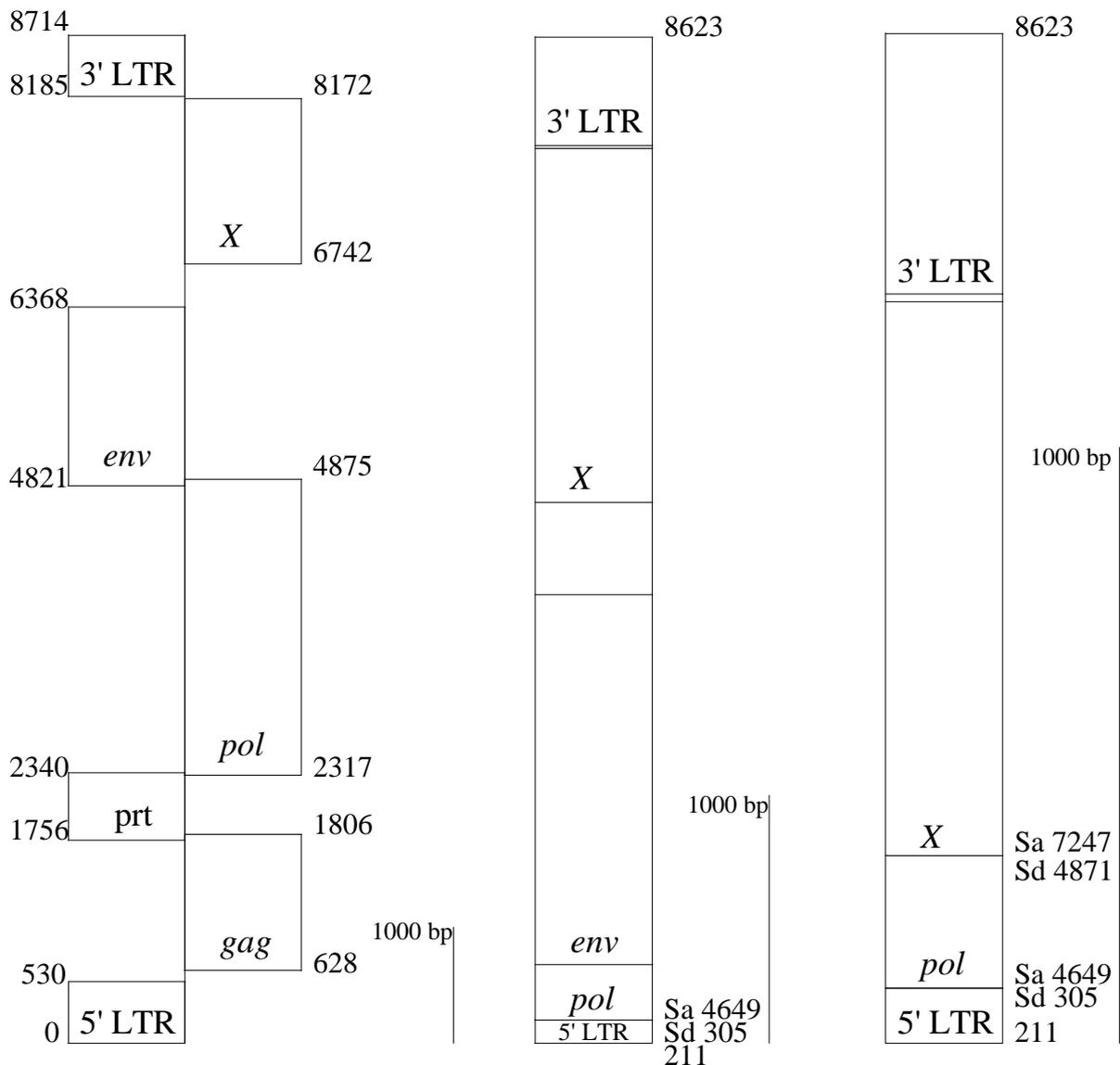
Nach Sagata *et al.* (1985b) besteht das BLV aus 8714 Nukleotiden. Es gliedert sich wie folgt: **5'LTR-gag-prt-pol-env-X-3'LTR** (Rice *et al.*, 1984, 1985; Sagata *et al.*, 1985b; Coulston *et al.*, 1990; Alexandersen *et al.*, 1993). Den Aufbau des kompletten viralen Genoms verdeutlicht Abbildung 1 (s. S.15).

Sagata *et al.* (1985b) beschrieben die komplette Nukleotidsequenz eines BLV, isoliert aus einem bovinen, virusinduzierten Lymphosarkom (Sagata *et al.*, 1983). Ein 8,3 kb *SacI* Fragment aus boviner Tumor-DNA (Deschamps *et al.*, 1981) sequenzierten Couez *et al.* (1984) und Rice *et al.* (1984, 1985), während ein 8,1 kb *EcoRI*-Fragment der proviralen DNA der permanent Virus produzierenden Zelllinie (FLK; Van der Maaten *et al.*, 1974) von Rosenthal *et al.* (1990) sequenziert wurde. Nahezu vollständig analysiert wurde auch die virale DNA, welche Coulsten *et al.* (1990) aus dem Herztumor eines an eRL erkrankten Rindes isolierte. Diesem 8,26 kb *EcoRI*-Fragment fehlen 780 bp einschließlich der 3'LTR. An seinem 5'Ende enthält es 340 bp bovine genomische DNA.

Die Nukleotidsequenz von fünf zusätzlichen BLV-*env*-Genen wurde von Mammoun *et al.* (1990), die von 16 *env*-Klonen eines künstlich infizierten Schafes von Willems *et al.* (1993a) untersucht. Van den Broeke *et al.* (1988) selektierten mittels Restriktionsenzym- und Hybridisierungsanalysen drei Proviren aus BLV-induzierten Tumoren (Provirus 344, 345, 1345). Sequenzanalysen des Provirus 1345 zeigten, daß es eine Deletion, beginnend mit Nukleotid 1022 im p24 des *gag*-Gens bis zum Nukleotid 5332, im *env*-Gen besitzt.

Zwei Long Terminal Repeats (**LTR**) flankieren das BLV-Provirus (s. Abb.1, S.15). Zwischen LTR und Wirtszelle existieren 6 bp lange Wiederholungen der zellulären DNA (Sagata *et al.*, 1984a; Derse *et al.*, 1985). Die LTR ist 530 (Sagata *et al.*, 1984a), 531 (Coulsten *et al.*, 1990) bzw. 535 bp lang (Couez *et al.*, 1984) und umfaßt die Regionen U3 (211 bp), R (228 bp) und U5 (91 bp, Sagata *et al.*, 1984a). Der Startpunkt für die RNA Synthese befindet sich an Nukleotidposition (Np) 211 (*cap-site*). Als Elemente der Transkriptionsregulation fungieren, 30 bzw. 92 bp hinter dem *cap-site*, die "TATAA"-Box und eine "CCAAT"-Box. An Np 445 befindet sich der polyA-site. Die LTR besitzt weiterhin spezifische Enhancersequenzen, die Targetsequenzen für das X-Genprodukt (p38) und Genabschnitte die mit p18 interagieren (Kettmann *et al.*, 1982; Sagata *et al.*, 1984a; Derse *et al.*, 1985; Derse und Casey, 1986; Derse, 1987). An Position 303-311 der R-Region befindet sich eine Spleißdonorsequenz. Diese R-Region ist, wie auch beim HTLV, wesentlich länger als jene anderer bekannter Retroviren (Sagata *et al.*, 1984a).

Die **5'NCR** (non coding region), folgt der 5'LTR und endet mit Beginn des *gag*-Gens. Sie enthält 97 bp (Derse *et al.*, 1985). Der erste offene Leserahmen (ORF) des BLV (Np 628-1806) umfaßt das *gag*-Gen (s. Abb.1, S.15). Es kodiert die inneren Strukturproteine p24, p15, p12 und p10 (Rice *et al.*, 1985; Sagata *et al.*, 1985b; Coulston *et al.*, 1990). Innerhalb des *gag*-Gens befinden sich die für die Enkapsidation entscheidende Regionen (Sommer *et al.*, 1990; Mansky *et al.*, 1995).

Abb.1 : Aufbau des BLV Genoms**Abb.2**: *env*-mRNA des BLV**Abb.3**: pX-mRNA des BLV

Das **prt**-Gen dessen ORF 5´seitig das *gag*-Gen und auf der 3´Seite das *pol*-Gen überragt, umfaßt 584 Nukleotide. Es kodiert die virale Protease (Sagata *et al.*, 1985b).

Die *pol*-Sequenz kodiert die reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase). Die Expression von Protease und Polymerase ist nur als *gag-prt-pol*- oder *gag-prt* Precursor-Protein möglich, wobei sowohl bei der Translation vom *gag*- in den *prt*- als auch vom *prt*- in den *pol*-Rahmen eine minus eins Frameshift notwendig ist. Für die erste Shift ist die Signalsequenz AAAA/AAC (Np 1796-1803) für die zweite die Sequenz TTTA/AAC (Np 1332-1338) entscheidend (Hatfield *et al.*, 1989).

Die *env*-Region des BLV enthält den dritten ORF des BLV (Np 4821-6368) und kodiert 515 As. Dieser Leserahmen überlappt das 3´Ende des *pol*-Gens und enthält 10

Glykosylierungsorte. Eine Spleißakzeptorsequenz befindet sich an Position 4393-4401. Die *env*-Produkte sind die Hüllproteine gp51 und gp30 (Sagata *et al.*, 1985b). Im Gegensatz zu den *gag*- und *pol*-Produkten werden die *env*-Hüllproteine von einer einfach gespleißten *env*-mRNA translatiert (Abb.2, S.15). Dafür wird der **Spleißdonor** in der R-Region der 5'LTR (Sequenz: CAGG/TAAGG; Np: 303-311) und der **Spleißakzeptor** in der *pol*-Region (Sequenz: TCATTTC/AG; Np: 4643-4650) genutzt (Sagata *et al.*, 1985a,b,c).

Nach Aufklärung der Nukleotidsequenz des BLV-Provirus (Sagata *et al.* 1984a,1985b; Rice *et al.* 1985; Coulsten *et al.*, 1990) stellte man fest, daß sich zwischen dem *env*-Gen und der 3'LTR eine zweite, für die X-Proteine kodierende Region, genannt **X (XBL)**, und wiederum eine 12 bp NCR befindet. Die **X-Gen-Region** kommt nur bei Vertretern der HTLV/BLV-Gruppe und bei Lentiviren vor (Rice *et al.*, 1984; Sagata *et al.*, 1985a; Seiki *et al.*, 1985). Der in diesem Genabschnitt des BLV entdeckte große ORF (**X-I; XBL-I; LOR**) beherbergt einen kurzen ORF (**X-II; XBL-II; SOR**) sowie mindestens zwei weitere Leserahmen **XBL-IV** (GIV) und **XBL-III** (RIII; Rice *et al.*, 1984; Sagata *et al.*, 1985a; Alexandersen *et al.*, 1993). Der XBL-Leserahmen beginnt mit dem Triplet an Np 6742-6744, welches keinen Methionininitiator, sondern die Base Alanin kodiert und endet mit dem Nukleotid 8172 (Sagata *et al.*, 1985a,b).

Die Leserahmen XBL-I und XBL-II befinden sich auf einer gemeinsamen X-mRNA (Abb.3, S.15). Die entdeckte 2,1 kb mRNA hybridisiert sowohl mit X-Gen-spezifischen Sonden, als auch mit solchen aus der LTR und der *pol/env*-Region. Dieses Ergebnis beweist das Vorhandensein von Exons und den bereits von Rice *et al.* (1984) vermuteten doppelt gespleißten Charakter der BLV-X-mRNA. Zwei mögliche **Spleißdonoren** befinden sich in der R-Region der 5'LTR (Sequenz: CAGG/TAAGG; Np: 303-311) und direkt strangaufwärts des 3'Endes des *pol*-Gens (Sequenz: ATGG/GTAA; Np: 4868-4875). Potentielle **Spleißakzeptoren** befinden sich 170 bp strangaufwärts des *env*-Gens (Sequenz: TTTCAC/AG; Np: 4643-4650) und am 5'Ende des X-I-Rahmens (Sequenz: TCTTTTAAG/CA; Np: 7238-7248; Sagata *et al.*, 1985a). Die resultierende X-mRNA entsteht damit durch Herausspleißen großer Teile des *env*-Gens, der 3'NCR, der ersten 26 bp des X-II-ORF und des ersten bp des X-I-ORF aus der Verbindung folgender drei Regionen: 100 Nukleotide aus der R-Region der 5'LTR, einem 220 Nukleotide enthaltenden Exon vom 5'Ende des Envelope-Genes und einem 1360 Nukleotide enthaltenden Exon aus dem äußersten 3'Ende des viralen RNA-Genoms (Mamoun *et al.*, 1985; Sagata *et al.*, 1985a,c). Der BLV X-I-Rahmen, der im proviralen Genom kein Start-ATG-Kodon besitzt, nutzt das im zweiten Spleißdonorort befindliche und erhält damit seine funktionelle Form an der gespleißten mRNA. Der resultierende ORF ist in der Lage, ein aus 309 Aminosäuren bestehendes Protein zu synthetisieren. Die X-mRNAs vom HTLV-I, HTLV-II und STLV besitzen ähnliche X-I-Rahmen (Seiki *et al.*, 1985; Wachsmann *et al.*, 1985). Die BLV-X-mRNA enthält ein weiteres Startkodon. Dieses ist das *env*-Startkodon und gleichzeitig Start des X-II-Rahmens. Dadurch erreicht der X-II-ORF seine funktionelle Form, er beginnt an Np 4821 mit 51 Nukleotiden aus der *env*-Region.

Neben der X-mRNA existieren für das BLV mindestens vier weitere, alternativ gespleißte mRNA's. Zwei von ihnen kodieren die bisher unbekannt Proteine GIV und RIII (Alexandersen *et al.*, 1993; Willems *et al.*, 1994). Die GIV-mRNA wurde bei Rindern mit persistierender Lymphozytose und teilweise in Kälbern nach experimenteller Infektion mit dem BLV beschrieben. Für die Bildung der gespleißten RIII-mRNA werden die Spleißakzeptoren an Position 4821 und 7018 sowie die Donoren an Np 4871 und 7098 genutzt. Die GIV-mRNA entsteht aus Teilen der 5'LTR (Np 212-430) und 241 bp aus dem GIV-ORF (Np 7066-7307). Fehlen die RIII- und GIV-Sequenzen in einem ansonsten infektiösen Provirus wird die Virusvermehrung in künstlich infizierten Schafen beeinträchtigt (Willems *et al.*, 1994).

2.2.3. Genomvariationen

RNA-Viren haben eine hohe Rate an Nukleotidsequenzvariationen. Für das Influenzavirus, das Virus der Vesikulären Stomatitis und das Poliomyelitisvirus beträgt sie etwa 10^{-4} Nukleotide pro Replikationszyklus. Insbesondere die Retroviren weisen aufgrund der eingeschränkten Möglichkeiten ihrer viralen Polymerase und dem Fehlen von Korrekturmechanismen eine hohe Variabilität ihres Genoms auf. So beträgt die Substitutionsrate für das *env*-Gen des Simian Immundefizienz Virus 10^{-2} - 10^{-3} Substitutionen pro Platz und Jahr (Johnson *et al.*, 1994). Willems *et al.* (1993b) ermittelten für das BLV-*env*-Gen insgesamt eine Mutationsrate von 0,009 % pro Jahr. Dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) fehlen Mechanismen, um Fehler während der Replikation zu korrigieren, was zu einer Misinkorporation pro Genom und Replikationszyklus führt. Somit unterscheidet sich jedes virale Genom vom anderen. Diese unterschiedlichen Mutanten können durch entscheidende Veränderungen ihrer biologischen Fähigkeiten, wie Zelltropismus, zytopathische Effekte, Replikationsrate und Antigenvariabilität gekennzeichnet sein. Gerade die Antigenvariabilität erlaubt es dem Virus, den Angriffen des Immunsystems des Wirtsorganismus zu widerstehen (Cheng-Meyer *et al.*, 1991). Die genomische Variabilität verschiedener HTLV-Isolate *in vivo* hängt dabei mehr von der geographischen Herkunft der Isolate, als von der Pathologie der untersuchten Individuen ab (Daenke *et al.*, 1990).

Die vollständig bzw. nahezu vollständig sequenzierten BLV-Isolate (Couez *et al.*, 1984; Rice *et al.*, 1984, 1985; Sagata *et al.*, 1985b; Coulston *et al.*, 1990) weisen nur 3% Abweichungen ihrer Sequenzhomologie auf. Dabei ist das australische Virus im untersuchten Bereich von Np 0-7934 (Coulston *et al.*, 1990) um 5 Nukleotide länger (ein Nukleotid davon in der 5'LTR), als das japanische Isolat (Sagata *et al.*, 1985b). Im *pol*- und *env*-Gen traten im Vergleich zu den vorher beschriebenen Isolaten Nukleinsäuresubstitutionen von 4%, im *gag*-Gen von 6% auf. In diesem Bereich ereigneten sich auch 50% der Insertionen und Deletionen, so eine Frameshiftmutation durch die Deletion des Cysteins (C) an Position 1445 und drei weiterer C an den Positionen 1528-1530 im Vergleich zum japanischen Isolat. Die Nukleinsäureveränderungen im *env*-Bereich führten in 0,71% (beim Vergleich vom australischen und japanischen Isolat) bzw. in 0,78% (beim Vergleich vom australischen und belgischen Isolat) zu Aminosäureänderungen. Unbeeinflusst blieben dabei die As an den

Positionen 89-201 und 222-257 der *env*-Sequenz (Coulston *et al.*, 1990). Mammoun *et al.* (1990) untersuchten die Nukleotidsequenzen von sieben BLV-*env*-Genen unterschiedlicher Herkunft. Sie konnten die untersuchten Isolate sowohl anhand der Nukleotid- als auch der Aminosäuresequenzen und unbeachtet ihrer biologischen Herkunft (Tumor, Tier mit persistierender Lymphozytose) in zwei Subgruppen einteilen: die **japanisch-amerikanische- und die europäische Subgruppe**. Innerhalb der europäischen Subgruppe traten signifikant höhere Abweichungen untereinander auf, als in der japanisch-amerikanischen. Alle untersuchten *env*-Gene enthielten einen vollständigen ORF ohne Deletionen, Insertionen, Frameshifts oder Mutationen. Vorkommende Nukleotidsubstitutionen waren mit Ausnahme der Region von Np 4945 bis 5111, in der sich 20% aller Veränderungen befanden, gleichmäßig über das *env*-Gen verteilt. Nach Mammoun *et al.* (1990) erwiesen sich zwei Regionen innerhalb des gp51 als hochkonservativ (As 122-234 und 255-301). Ihnen scheint eine besondere Bedeutung beim Erkennen zellulärer Rezeptoren zuzukommen. Die besonders variablen Regionen (As 34-121 und 235-254) beherbergen die Konformationsepitope F, G und H bzw. das Sequenzepitop B.

Im *XBL*-Gen besteht eine hohe Sequenzhomologie zwischen dem japanischen, australischen und belgischen Isolat (Coulston *et al.*, 1990). Die Bedeutung künstlicher Mutationen in diesem Bereich untersuchte Willems *et al.* (1992c). In Funktionsanalysen wurde bewiesen, daß das Transaktivierungsvermögen aller Mutanten, die von Deletionen bzw. Linkerinsertionen enthaltenden p38-*tax*-Genen kodiert wurden, erloschen ist. Damit ist der geringe Spielraum für strukturelle Variationen, welche die volle Funktionstüchtigkeit des Proteins erlauben, festgelegt. Dennoch konnte eine spezifische, in der Mitte des Proteins (p38) befindliche Region (As 157-197) als Aktivatorregion identifiziert werden. Gleichzeitig sind die As an den Positionen 30, 33, 50 (Cystein) und 53 (Histidin) für die Ausbildung der typischen, für die Funktionsfähigkeit des Proteins erforderlichen Struktur (Bindungspunkte für das in der Mitte des angenommenen Tetraeders liegende Zinkion) notwendig. Mutationen einzelner As können wie beim HTLV-I-*tax*- und HIV-*tat*-Protein durch die Bildung dimerer oder trimerer Formationen ausgeglichen werden (Willems *et al.*, 1992c). In teilweisem Gegensatz dazu stehen Untersuchungen von Sakurai *et al.* (1991). Sie fanden heraus, daß insbesondere die Anfangsregion des *tax*-Proteins (p38) kritisch für die funktionelle Aktivität ist. Aminosäure-Modifikationen im zweiten Drittel des Proteins (insbesondere As 95-145) führten zwar zu geringerer Aktivität des LTR-Promotors, zeigten jedoch, daß die strukturelle Integrität dieser Region weniger für die funktionelle Aktivität von p38 erforderlich ist, als die anderer Regionen. Willems *et al.* (1992a) wiesen nach, daß die Transaktivierung der BLV-LTR und die Transformation bestimmter Zellen voneinander unabhängige Funktionen des p38 sind und von unterschiedlichen Domänen dieses Proteins abhängen.

Wachsmann *et al.* (1985) konnten zeigen, daß eine Mutante des *tax*-Proteins des HTLV-II die Aktivierung des HTLV-II-Promotors durch das dazugehörige Wildtypprotein hemmt. Diese Hemmung konnte auch für das BLV nachgewiesen werden. Sie wird um so stärker, je höher die Anzahl der Mutanten ist (Sakurai *et al.*, 1991). Verschiedene Mechanismen, die zur

Hemmung durch die Mutanten führen, sind denkbar: Die Mutante verbindet sich mit dem Wildtypprotein und bildet so Multimere, die nicht in der Lage sind, den Promotor zu transaktivieren. Sie konkurriert mit dem Wildtyp des p38 bei der Interaktion mit zellulären Proteinen, die für die Transaktivierung essentiell sind. Die Mutante konkurriert um die Bindungsstelle am LTR-Promotor. Die Mutationen demaskieren die autosuppressive Aktivität in der Mutante, die am Wildtypprotein nicht erkannt wird. Mutationsanalysen in bestimmten Regionen des *tax*-Proteins von HTLV-I durch Smith und Green (1990) ergaben, daß die notwendige Lokalisation dieses Proteins im Kern verhindert ist. Transdominante Repressormutanten von viralen Regulationsproteinen, wie des *tat*-Proteins des HIV (Green *et al.*, 1989) und des *rex*-Proteins des HTLV-I (Rimsky *et al.*, 1989), die selbst im Zytoplasma lokalisiert waren, konnten zur Blockierung der Replikation des entsprechenden Virus verwendet werden und stellen damit eine neue Klasse antiviraler Agenzien dar. Von Willems *et al.* (1993a,b) untersuchte Mutanten waren, wie das Wildtypprotein, im Kern lokalisiert und nicht in der Lage, als transdominante Repressoren der Transaktivierung zu wirken. Ihre Funktion als Immortalisierungsprotein blieb erhalten.

2.2.4. Proteine

Das Genom des BLV ist in der Lage vier interne Strukturproteine (p24, p15, p12, p10), zwei Hüllproteine (gp51, gp30), vier regulatorische Proteine (p38, p18, GIV, RIII[?]), die Reverse Transkriptase (p58) und die virale Protease (p14) zu kodieren. Die Nukleotidpositionen der proteinkodierenden Sequenzen zeigt Tabelle 3.

Tab.3.: Nukleotidpositionen der proteinkodierenden Sequenzen des BLV

Region	ORF von - bis	Protein
<i>gag</i>	955-1596	p24
	628-954	p15 (p4, p10)
	1597-1803	p12
<i>pol</i>	2317-4875	p58
	1756-2340	p14
<i>env</i>	4821-5723	gp51
	5724-6365	gp30
<i>XBL</i>	7246-8172	<i>tax</i> (p38)
	7220-7666	<i>rex</i> (p18)
	7044-7307	GIV
	6742-7098	RIII (?)

Interne Strukturproteine

Das **p24** war das zuerst erforschte und ausführlich charakterisierte Strukturprotein (Miller und Olson, 1972; Gilden *et al.*, 1975; Devare *et al.*, 1976; McDonald und Ferrer, 1976; Portetelle *et al.*, 1977). Es ist ein neutrales und mäßig hydrophobes Protein (Oroszlan *et al.*, 1982) und stellt die Hauptkomponente des Viruskapsids dar. Mittels mAK konnten 3 unabhängige Epitope auf dem Molekül separiert werden (Aida *et al.*, 1987a,b; Platzer, 1990; Platzer *et al.*, 1990). Zwischen dem p24 des BLV und p30 des HTLV bestehen signifikante Sequenzhomologien (Oroszlan *et al.*, 1982; Ghysdael *et al.*, 1984; Rice *et al.*, 1985). **P15** ist ein schwach basisches Protein (Kaaden *et al.*, 1977) und das Hauptphosphorprotein des BLV-Genoms (Uckert und Wunderlich, 1979). Von den zwei Untereinheiten des p15 bindet eine an den Lipidanteil der viralen Membran, die andere an die virale RNA (Uckert *et al.*, 1987). Das p15 wird durch die Protease in p10, p4 und ein kurzes Peptid von sieben As gespalten. Das basische **p10** bindet unspezifisch RNA-Fragmente bzw. an ss-DNA, die Funktion von **p4** ist bis heute noch unklar (Ghysdael *et al.*, 1984; Uckert *et al.*, 1984a,b, 1987; Katho *et al.*, 1991). Ein weiteres basisches Protein mit einem hohen Anteil von Glycin- und Prolinresten, welches sich in unmittelbarer Nähe der viralen RNA im BLV-Partikel befindet ist **p12** (Uckert *et al.*, 1987). Dieses bei Vorhandensein von Zinkionen an Nukleinsäure bindende Protein zeigt in seiner Aminosäurekonfiguration 52,5% Übereinstimmung mit dem p15 des HTLV (Rice *et al.*, 1984).

Zwei unabhängig von einander synthetisierte Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 70000 (**Pr 70^{gag}**) und 4500 (**Pr 45^{gag}**) sind die Precursoren für p24, p15, p12 und p10 (Ghysdael *et al.*, 1978,1979; Mamoun *et al.*, 1983a,b). Für Pr 45^{gag} wird die Sequenz NH₂-p15-p24-p12-COOH angenommen (Sagata *et al.*, 1985b).

Hüllproteine

Die viralen Hüllproteine **gp51** und **gp30** werden von einem 72 kDa Precursor-Protein (**gPr 72^{env}**) abgeleitet (Ghysdael *et al.*, 1978; Mamoun *et al.*, 1983a,b). Beide Proteine sind auf der Oberfläche des Virus lokalisiert, essentiell für die Interaktion des Virus mit den Oberflächenstrukturen der Zielzelle (Zajac und Slavikova, 1989) und das natürliche Ziel neutralisierender AK (Mamoun *et al.*, 1990). Das **gp51** besteht aus 268 As. Auf dem gp51-Molekül wurden 8 Epitope nachgewiesen (A-H). Die Determinanten F, G und H sind Formationsepitope, A-E dagegen Sequenzepitope (Bruck *et al.*, 1982a,b, 1984a,b; Portetelle *et al.*, 1989a). Als determinierende Regionen für die Epitope F, G und H wurden die As-Positionen 34-121 bzw. 39-157 (Portetelle *et al.*, 1989a; Mamoun *et al.*, 1990) ermittelt. Das aus 214 As bestehende **gp30** enthält drei, das gp51 acht mögliche Glykosylierungsorte. Die Molekulargewichte sind 24 bzw. 30,5 kDa (Rice *et al.*, 1984). Beide Proteine enthalten verschiedene hydrophobe Sequenzabschnitte. Gp30 wurde in der Envelope des BLV und in der Wand infizierter Zellen nachgewiesen (Burny *et al.*, 1988; Ghysdael *et al.*, 1984). Die Anordnung der Cysteinreste im gp30 und damit die Ausbildung von Disulfidbrücken sowie sein

Hydrophobiemuster zeigen große Ähnlichkeit mit dem Hüllprotein gp21 des HTLV. Ähnliche Übereinstimmungen bestehen zwischen dem gp51 des BLV und gp60 des HTLV (Rice *et al.*, 1984).

Reverse Transkriptase und Virale Protease

Die erstmals von Kaaden *et al.* (1977) identifizierte **Reverse Transkriptase** des BLV wird wie die **Integrase** durch das *pol*-Gen kodiert (Rice *et al.*, 1984; Sagata *et al.*, 1985b; Hruskova-Heidingsfeldova, 1995). Sie hat je nach verwendeter Bestimmungsmethode ein Molekulargewicht von 45-70 kDa (Burny *et al.*, 1978). Das Vorläufermolekül (**Pr 145^{gag-pol}**) dieses Enzyms besitzt ein Molekulargewicht von 145 kDa (Ghysdael *et al.*, 1978,1979) und ist in seiner Aktivität von der RNA als Template und den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten abhängig (Gilden *et al.*, 1975; Kettmann *et al.*, 1975). Sagata *et al.* (1984b) beschrieben den potentiell **Protease** kodierenden Abschnitt zwischen dem *gag*- und *pol*-Gen, dessen Produkt von Yoshinaka *et al.* (1986) als 14 kDa Protein identifiziert wurde. Die BLV-Protease ist extrem thermostabil und kann fast ohne Verlust ihrer Aktivität bis zu 24 h bei 37°C aufbewahrt werden (Zabransky, 1993). Sie ist für die Spaltung verschiedener Precursor-Proteine des BLV verantwortlich, spaltet aber auch HTLV-I *gag*-Precursoren (Andreansky *et al.*, 1991; Menard *et al.*, 1993).

Funktionelle Proteine

Sagata *et al.* (1985b) konnten ein von BLV infizierten Zellen produziertes 38 kDa-Protein (**p38, tax**) nachweisen. Das erkannte Protein ist im Gegensatz zu anderen viralen Proteinen nicht in das Virion inkorporiert. Zum größten Teil befindet es sich im Kern der infizierten Zelle. Es hat eine Halbwertszeit von 5 h und erfährt keine posttranslatorischen Modifikationen, wie Glykosylierung (obwohl dafür zwei potentielle Orte vorhanden sind), Phosphorylierung und Hydrolyse. Möglicherweise ist p38 ein Regulatorprotein, welches im Zellkern bei der Kontrolle viraler und/oder zellulärer Genexpression wirkt. Wie für die X-Gen-Produkte des HTLV wurde ein Einfluß auf die Aktivierung der viralen LTR und die zellulären Kontrollgene nachgewiesen (Slamon *et al.*, 1984). Willems *et al.* (1987b) vermuteten, daß p38 in der Lage ist, die BLV-Leukämogenese zu involvieren und Rattenfibroblasten zu transformieren. In Zusammenarbeit mit spezifischen Onkogenprodukten ist es in der Lage, Tumoren *in vivo* zu induzieren (Willems *et al.*, 1992b). Es gehört damit zur Subgruppe der immortalisierenden Onkogene.

Der **X-II Leserahmen** ist in der Lage, Proteine in einer Größenordnung von 17-21 kDa (beim BLV, HTLV-I, STLV) sowie 3 kDa (HTLV-II) zu produzieren (Ghysdael *et al.* 1979; Yoshinaka und Oroszlan 1985). Es ist phosphoryliert und wie p38 im Zellkern der infizierten Zelle lokalisiert. Man nimmt an, daß das X-II-Produkt des BLV (**p18, rex**) die virale Replikation und/oder zelluläre Transkription unterstützt. Von Derse *et al.* (1985) sowie Ballaun *et al.* (1991) wurde ein "*rex*-responsive element" beschrieben. In Kotransfektionsexperimenten konnten Derse (1988) zeigen, daß p18 für die Akkumulation vollständiger, viraler mRNAs und einfach gespleißter *env*-Transkripte erforderlich ist. Im Gegensatz dazu bleibt die Synthese doppelt gespleißter X-mRNA von der p18 Expression

unbeeinflusst. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß dieses Protein einen Einfluß auf die Reaktionen am 3'Ende der viralen mRNA hat. Die relativen Anteile von p18 und p38 in einer Zelle sind unbekannt (Willems *et al.*, 1989).

Das **GIV**-Protein hat eine hypothetische Größe von 105 As bei einem Gesamtgewicht von 11,6 kDa. Es besitzt keine potentiellen Glykosylierungsorte. Möglicherweise spielt dieses Protein eine Rolle in der zellulären und viralen Transkription und eventuell auch bei der Tumorgenese. Die **RIII**-mRNA könnte ein Protein mit 44 As und einem theoretischen Molekulargewicht von 5,5 kDa kodieren. Es besitzt einen Phosphorylierungsort. Sequenzhomologien mit dem *rex* ermöglichen die Bindung von RIII an das "*rex-responsive element*". Somit könnte dieses hypothetische Protein als transdominanter Repressor für *rex* agieren (Alexandersen *et al.*, 1993).

2.2.5. Replikation und Expression

Wenngleich die **Replikation** des BLV in vielen Stufen noch unbekannt ist, so beinhaltet sie die für Retroviren typischen Schritte: Anheftung des Virions an einen zellspezifischen Rezeptor, Eindringen des Virusinnenkörpers in die Zelle, reverse Transkription des viralen RNA-Genoms über einen RNA-DNA-Hybriden in eine dsDNA-Kopie, Transport der dsDNA zum Zellkern und Integration als Provirus in die DNA der Wirtszelle (Wittmann, 1993).

Während die Replikationsschritte fast ausschließlich durch das Virion selbst gesteuert werden, wird die **Expression** des BLV-Gens durch verschiedene, auch zelluläre Faktoren reguliert. Gupta und Ferrer (1982) bzw. Gupta *et al.* (1984) beschrieben einen im Plasma BLV-infizierter Rinder vorkommenden "**plasma blocking factor**", der in der Lage war, die virale Expression in Lymphozytenkulturen und verschiedenen Fibroblastenkulturen zu unterdrücken. Dieser Faktor stellt sich als nicht immunogenes Protein dar und gehört nicht zur Gruppe der Interferone. Cantor *et al.* (1993) wiesen die Inhibierung der BLV-Expression und der Aktivität der reversen Transkriptase durch Ribozym nach.

Von besonderer Bedeutung ist die transkriptionelle Kontrolle mit Hilfe viruskodierter trans-acting Faktoren und cis-acting Zielsequenzen (Derse, 1987; Katoh *et al.*, 1989, Kisstoth und Unk, 1994) sowie die posttranskriptionelle Beeinflussung vollständiger und gespleißter genetischer Transkripte.

Der retrovirale **Promotor** ist Bestandteil der proviralen LTR. Derse *et al.* (1987) konnten nachweisen, daß die Expression von p38 notwendig und ausreichend ist, um die Transaktivierung des BLV-Promotors hervorzurufen. Eine 75-bp enthaltende LTR-Region (180 bp strangaufwärts des RNA-Startpunktes) besitzt die auf das Protein ansprechenden Elemente und funktioniert als p38-abhängiges Verstärkerelement (Derse und Cassey, 1986, Derse, 1987). Innerhalb dieser Region konnten an den Positionen 148 und 123 bp strangaufwärts des RNA-Startpunktes zwei kurze Wiederholungen gezeigt werden, die eine besondere Rolle für die Transaktivierungsfunktion spielen. Ein drittes dazu in Beziehung stehendes Element befindet sich 48 bp strangaufwärts des cap sites. Alle diese Elemente besitzen eine gemeinsame Sequenz (TGACGTCA), die als zyklisches AMP- (cAMP)

abhängiges Element oder als Bindungsstelle zellulärer Transkriptionsfaktoren bekannt ist (Katoh *et al.*, 1989). Das *tax*-Protein des HTLV-Systems ist selbst nicht in der Lage, an diese bestimmten DNA-Positionen zu binden. Es nutzt zelluläre Proteine, die die Sequenzen erkennen können (Jeang *et al.*, 1988; Nyborg *et al.*, 1988; Giam und Xu, 1989; Nyborg und Dynan, 1990).

Das zweite in der X-Region kodierte Protein (p18) ist für die Aktivierung des viralen Promotors nicht erforderlich (Derse, 1987). Dieses Protein scheint, genau wie seine Analoga des HTLV-I und HTLV-II, für die Stabilität der Schleifenbildung am 3' Ende der mRNA verantwortlich zu sein. Diese Formation ist erforderlich, um das Polyadenylationssignal (AATAAA) und den Poly(A)-Ort einander zu nähern (Seiki *et al.*, 1983; Sagata *et al.*, 1984a). Eine entscheidende Rolle in der Regulation der viralen Expression in BLV-infizierten Tieren spielt das von Willems *et al.* (1992a) beschriebene, **cAMP-Responsive DNA-Binding Protein (CREB2)**. Gemeinsam mit der cAMP-abhängigen Proteinkinase-A ist es in der Lage, die *tax*-induzierte Transaktivierung der BLV-LTR zu steigern. Das unphosphorylierte CREB2 dagegen wirkt *in vitro* als Inhibitor der Transaktivierung. CREB2 und cAMP sind als zelluläre Faktoren, auch in Abwesenheit des *tax*-Transaktivators, in der Lage die Expression der BLV-LTR zu induzieren. Ihnen könnte damit eine Bedeutung für das Frühstadium der viralen Infektion zufallen (Willems *et al.*, 1992a; Adam *et al.*, 1994, 1996).

Die HTLV-I-LTR kann durch Proteinkinase-A und -C abhängige Wege beeinflusst werden. Untersuchungen von Kerkhofs *et al.* (1996) hingegen zeigten, daß die BLV-Expression nicht mit der PKA-Aktivität korreliert und durch cAMP gehemmt wird.

Der biologische Zweck der beschriebenen Regulationswege ist noch nicht vollständig aufgeklärt, da über die BLV-Expression *in vivo* zu wenig bekannt ist. Möglicherweise führen sie zu einem rapiden Anstieg der Virusproduktion nach einem bestimmten initialen Ereignis (Derse, 1988). So könnte kurz nach einer Induktion die Transkription doppelt gespleißter pX-mRNA vorherrschen, weil sie unabhängig von p18 ist. Die Translation dieser Botschaft und die stetige Ansammlung von p38 und p18 würden zu einer Verstärkung der Virustranskription und zu einem Anschalten von Prozessen, die die Expression viraler Strukturgene hervorrufen, führen (Willems *et al.*, 1987b).

2.3. Zielzellen

Bis vor wenigen Jahren nahm man an, daß der B-Lymphozyt die einzige Ziellzelle des BLV sei. Diese Vermutung stützte sich auf die starke zeitweilige bzw. permanente Erhöhung der Zahl der B-Lymphozyten im Blut, dem Vorkommen dieser Zellen in BLV-induzierten Tumoren (Burny *et al.*, 1985; Onuma *et al.*, 1979), die Expression viralen Antigens nach *in vitro* Kultivierung von Lymphozyten (Paul *et al.*, 1977b) und der Bildung von Synzytien nach Kokultivierung empfänglicher Zellen mit B-Lymphozyten (Paul *et al.*, 1977a). Die ersten BLV-Provirusnachweise in Zellpopulationen mit hohem B-Lymphozytenanteil, wie in Tumorzellen (Kettmann *et al.*, 1982, 1983; Onuma *et al.*, 1982) bzw. in Blutleukozyten von Tieren mit PL

oder Lymphosarkomen (Kenyon und Piper, 1977; Kettmann *et al.*, 1979, 1980a,b), verstärkten die Annahme des B-Zelltropismus des BLV.

Der Anstieg der T-Lymphozyten in aleukämischen Tieren bzw. Tieren mit PL gab den Ausschlag für die genauere Differenzierung der bovinen Leukozytenpopulation mittels spezifischer monoklonaler AK (Williams *et al.*, 1988a). Williams *et al.* (1988b) wiesen BLV-Provirus in Kulturen, in denen die T-Lymphozyten angereichert wurden, nach. Die beiden Hauptpopulationen innerhalb von T-Lymphozytenkulturen waren nachweislich provirus tragende T-Helferzellen (CD4) und T-Supressorzellen bzw. zytotoxische T-Zellen (CD8). Die Integration des Provirus in T-Zellen erfolgt willkürlich und an verschiedenen Orten (Stott *et al.*, 1991; Bembridge *et al.*, 1995). Murakami *et al.* (1994a) hingegen konnten weder in T-Zellen gesunder Schafe noch in T-Zellen von Schafen mit Lymphosarkomen integriertes BLV-Provirus nachweisen. Obgleich in während der eRL entstehenden Neoplasien CD4- und CD8-Zellen nachgewiesen wurden (Dimmock *et al.*, 1990; Murakami *et al.*, 1994a; Chiba *et al.*, 1995), sind B-Zellen die am häufigsten in tumorösen Lymphknoten vorkommenden Zellen (Dimmock *et al.*, 1990; Heeney und Valli, 1990). Phänotypisch sind dabei zwei Populationen, die IgM⁺- und IgM⁻-B-Zelllinien, zu unterscheiden (Aida *et al.*, 1994). Die neoplastischen B-Zellen von BLV-induzierten Tumoren der Schafe sind vom CD5⁻- (Murakami *et al.*, 1994a,b) bzw. CD5⁺-Typ (Birkebak *et al.*, 1994), während beim Rind bisher nur CD5⁺-Zellen beschrieben wurden (Murakami *et al.*, 1994a).

Von Levkut *et al.* (1995) wurde ein signifikanter Anstieg eosinophiler Zellen im Blut und in Lymphknoten BLV-infizierter Rinder beschrieben, ohne jedoch diese Zellen auf das Vorhandensein von BLV zu testen. Untersuchungen von Heeney *et al.* (1992) zeigten, daß auch Makrophagen Zielzellen des BLV sein können.

Buehring *et al.* (1994) wiesen die virale Infektion und Expression des BLV in Epithelzellen der Milchdrüse leukosepositiver Rinder nach.

2.4. Diagnostische Nachweisverfahren

2.4.1. Hämatologischer Nachweis

Die Ermittlung einer PL mittels hämatologischer Untersuchungen erfolgt auf Basis der

- absoluten Zahl der Leukozyten und des Lymphozytenprozentsatzes oder
- der absoluten Lymphozytenzahl pro μ l Blut (Wittmann, 1993).

Mittels eines hämatologischen Diagnoseverfahrens, dem "Leukoseschlüssel", wurden anhaltend hohe Werte von Lymphozyten bzw. Leukozyten eingeordnet und festgestellt, ob eine PL vorliegt. Da viele Tiere keine persistierende Lymphozytose entwickeln und ohne diese in die tumoröse Leukoseform übergehen können, ist eine Tilgung der eRL durch die Selektion hämatologisch positiver Reagenten nicht zu erzielen (Ferrer *et al.*, 1974, 1975; Ferrer, 1980; Mammerickx *et al.*, 1977).

2.4.2. Serologische Nachweisverfahren

Die folgenden serologischen Verfahren dienen dem Nachweis der Antikörperbildung als Antwort auf eine BLV-Infektion beim Rind:

Agar-Gel-Immunodiffusionstest (AGID)

Das Prinzip des AGID ist eine unter den Bedingungen einer feuchten Kammer und bei Zimmertemperatur für 48-72 h erfolgende Präzipitation zwischen Antigen (AG) und dem Antikörper (AK) (Baumgartener *et al.*, 1975; Miller *et al.*, 1977; Straub, 1978; Wittmann *et al.*, 1983).

Miller und Olson (1972) berichteten erstmals über den Nachweis präzipitierender BLV-AK mittels des aus Leukozytenkurzzeitkulturen einer BLV-positiven Kuh gewonnenen BLV-AG p24. Da mit diesem Test nicht alle BLV-AK-Träger erkannt wurden, demonstrierten Miller und Van der Maaten (1977) die bessere Eignung des BLV-Hüllproteins gp51 zum Nachweis BLV-AK-positiver Kühe im AGID. Die Reaktionen wurden als serologisch-leukosepositiv, -schwachpositiv, -leukosenegativ und -zweifelhaft eingeordnet. Die in vielen Ländern mit dem AGID durchgeführten Untersuchungen zeigten, daß dieser Test in seiner diagnostischen Wertigkeit und Sicherheit ausreichend ist, um eine Diagnose BLV-infizierter Rinder im Rahmen der Bekämpfung der eRL vorzunehmen (Kaaden *et al.*, 1977; Miller, 1980; Thurmond *et al.*, 1982; Wittmann *et al.*, 1983).

Die Mitgliedsstaaten der Europäischen Gemeinschaft (EG) sind nach der Richtlinie 88/406/EWG des Rates der EG vom 14. Juni 1988 dazu verpflichtet, ein Programm zur Einstufung ihrer Bestände als frei von eRL durchzuführen. In diesem Rahmen haben sie ihre Bestände einem in der Anlage G der Richtlinie 64/432/EWG genannten Test (AGID oder ELISA) zu unterziehen.

Enzym-linked-Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA beruht auf der Reaktion eines AK mit einem spezifischen AG und dem anschließenden Nachweis dieser Reaktion mit Hilfe eines enzymmarkierten Immunreagenz. Dabei ist einer der Reaktionspartner als Target an eine feste Phase (Mikrotiterplatte aus Polyvinylchlorid oder Polystyrol) gebunden (Wittmann, 1993).

Für den Nachweis des BLV wurde dieser Test erstmals von Ressang *et al.* (1976) eingesetzt. In einer Vielzahl von Untersuchungen zeigte sich, daß der ELISA eine 20% höhere **Sensitivität** als der AGID hat. Gleichzeitig konnten nach einer natürlichen bzw. experimentellen Infektion seropositive Reagenten um 3-37 Wochen eher entdeckt werden, als im AGID (Burridge *et al.*, 1982; Perlberg *et al.*, 1984; Nguyen und Maes, 1993) und abklingende AK-Titer über einen längeren Zeitraum verfolgt werden. Den genannten Einschätzungen stehen aber auch Befunde gegenüber, die von einer diagnostisch gleichen Wertigkeit beider Verfahren ausgehen (Ressang *et al.*, 1978, 1981).

Die **Spezifität** des ELISA entspricht weitgehend der des AGID (Mammerickx *et al.*, 1985b; Miko *et al.*, 1987; Molloy *et al.*, 1990; Klintevall *et al.*, 1991). Falsch positive ELISA-

Ergebnisse treten vor allem bei nicht exakter Durchführung des Tests, fehlerhaften technischen Systemen und der Verwendung von Kolostralmilch auf (Forschner und Heiseke, 1988; Klintevall *et al.*, 1991).

Trotz aller Diskussionen hat der ELISA gegenüber dem AGID den **Vorteil** des:

- geringeren Antigenbedarfs
- der höheren Empfindlichkeit
- der schnelleren Verfügbarkeit der Ergebnisse
- und der Möglichkeit einer objektiven Bewertung

Von **Nachteil** sind der höhere Aufwand an Reagenzien, Arbeitszeit und Geräteausrüstung sowie die damit verbundenen Kosten (Wittmann, 1993). Den genannten Mängeln wird durch die Möglichkeit der Verwendung von Sammelmilchproben im ELISA entgegengewirkt. Nach Anlage G der EG-Richtlinie 64/432/EWG kann das ELISA Verfahren bei einer Milchprobe angewandt werden, die der Milchsammlung aus einem Betrieb entnommen worden ist (Milchpool), die mindestens ein Drittel laktierende Rinder umfaßt. Die Probe muß sich auf Milch beziehen, die von weniger als 50 Kühen stammt.

Neben Serum und Milch soll, im Gegensatz zu den Erkenntnissen von Klintevall *et al.* (1994), nach Carli *et al.* (1993) auch Rinderurin für den Nachweis von BLV-AK gegen gp51 mit dem ELISA Verfahren geeignet sein.

Weitere indirekte Nachweisverfahren

Serologische Tests wie die Komplementbindungsreaktion (KBR), der Radioimmunoassay (RIA) und verschiedene Neutralisationstests sind aufgrund der gegenüber dem ELISA wesentlich geringeren Rentabilität und Praktikabilität nicht für die Routineuntersuchungen geeignet und wissenschaftlichen Untersuchungen vorbehalten (Wittmann., 1993).

Von Walker *et al.* (1987) wurde erstmals das Western-Blot-Verfahren zum Nachweis von BLV-AK beschrieben. Bedingt durch den hohen materiell-technischen- und Arbeitsaufwand fand es für die Routinediagnostik keine Bedeutung. Veröffentlichungen von Heeney *et al.* (1988), Dolz (1990), Kuzmak *et al.* (1993b) und Bunger *et al.* (1994) zeigten die Bedeutung dieses Verfahrens in der experimentellen BLV-Analytik.

2.4.3. Direkte Nachweisverfahren

Seit Mitte der 70er Jahre gibt es verschiedene Bestrebungen, das BLV anhand seiner Enzyme, zytopathogen Eigenschaften bzw. seines Genoms direkt nachzuweisen. Erwähnenswert sind dabei:

- der Revertasetest (Graves *et al.*, 1977; Rössler *et al.*, 1980)
- der Synzytientest (Diglio und Ferrer, 1976; Kaaden und Frenzel, 1980; Liebermann *et al.*, 1983; Grundboeck *et al.*, 1994; Klintevall *et al.*, 1994)
- der Tierversuch (Burny *et al.*, 1978; Ferrer, 1980; Burkhardt *et al.*, 1991)

- verschiedene Hybridisierungstechniken, z.B. Southern-Blot (Kettmann *et al.*, 1980a,b; Cockerell und Rovnak, 1988; Naif *et al.*, 1990; Jacobs *et al.*, 1992), Northern-Blot (Sambrook *et al.*, 1989), Spot-Blot (Naif *et al.*, 1990) und *in situ*-Hybridisierung (Lagarias und Radke, 1989; Okada *et al.*, 1991; Albrecht, 1996)
- die Polymerasekettenreaktion (PCR, Mullis *et al.*, 1986; Naif *et al.*, 1990; Fechner, 1995)

Die genannten direkten Nachweisverfahren werden bzw. wurden fast ausschließlich in der experimentellen Leukoseforschung eingesetzt. Eine Ausnahme bildet dabei die sicher weiter an Bedeutung gewinnende PCR.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR stellt eine *in vitro*-Methode dar, bei der ein spezifisches Fragment einer Target-DNA-Sequenz exponentiell vervielfältigt wird (Mullis *et al.*, 1986; Mullis und Faloona, 1987). Die Entdeckung und Beschreibung der PCR durch Kary Mullis (1986) wurde als Meilenstein in der Geschichte der Molekularbiologie und als bedeutendster technischer Fortschritt auf dem Gebiet der molekularen Genetik in den achtziger Jahren bezeichnet (Eisenstein, 1990). Trotz enormer Forschungsaufwendungen kam ihre Integration in die Laborroutine nur langsam und zögernd zustande (Engelbert und Eisenstein, 1992). Heute jedoch sind aus der komplizierten "Hightech-Methode" einfache und kostengünstige Verfahren von bisher nicht bekannter Sensitivität und Spezifität hervorgegangen, die in jedem Labor durchgeführt werden können (Quirke, 1992). Der prinzipielle Ablauf der PCR besteht aus:

1. Hitzedenaturierung
2. Primerannealing
3. DNA-Synthese.

Dieser Zyklus wird i.d.R. 25-40 mal wiederholt (Erlich *et al.*, 1988; Saiki *et al.*, 1988; Poon *et al.*, 1993).

PCR Untersuchungen zum Nachweis des BLV-Provirus wurden erstmals von Naif *et al.* (1990) bei Rindern, Brandon *et al.* (1991) bei Schafen und Wyatt *et al.* (1989) bei Kaninchen durchgeführt.

Die höhere **Sensitivität** der PCR gegenüber serologischen Tests zum BLV-AK Nachweis wurde mehrfach nachgewiesen. Verschiedene Untersucher zeigten, daß unter 20 AGID-negativen Rindern (Naif *et al.*, 1990), 38 AGID- und ELISA-präkolostral negativen Kälbern (Agresti *et al.*, 1993) bzw. 34 ELISA-negativen Rindern (Jacobs *et al.*, 1992) 5-8,8% Provirusträger ermittelt werden konnten. Unter optimalen Bedingungen ist es möglich eine einzige Template-DNA in 10^5 - 10^6 Zellen nachzuweisen (Saiki *et al.*, 1988). Popov *et al.* (1993) wiesen 600 Kopien des BLV-Provirus in 150.000 Zellen nach. Auf der anderen Seite gab es jedoch auch Beobachtungen, bei denen mit dem AGID oder ELISA BLV-AK nachgewiesen wurden, der BLV-Provirusnachweis mit der PCR jedoch negativ verlief (Murtaugh *et al.*, 1991; Jacobs *et al.*, 1992; Kuzmak *et al.*, 1993a; Klintevall *et al.*, 1994). Agresti *et al.* (1993) bewiesen die höhere **Spezifität** der PCR gegenüber dem ELISA. Sie konnten bei 5,5% von 36 BLV-Provirus negativen, neugeborenen Kälbern im AGID und

ELISA BLV-AK bestimmen. Das negative PCR-Ergebnis ließ darauf schließen, daß es sich dabei um falsch positive Resultate bzw. den Nachweis maternaler AK handelte.

Die enorme Empfindlichkeit der PCR macht eine absolut korrekte Arbeitsweise erforderlich, damit unerwünschte DNA-Sequenzen (**Kontaminationen**) nicht vervielfältigt werden und das Resultat verfälschen (Weber und Wehrle, 1994). Kwok und Higuchi (1989) haben die Kontaminationsproblematik anschaulich in einem Vergleich dargestellt: Werden nach abgeschlossener Amplifikation 100 µl PCR-Lösung in ein Schwimmbad gegeben, das Wasser durchmischt und anschließend wieder 100 µl entnommen, dann ist darin immer noch mehr als einen Kopie des Amplifikates enthalten.

Da sich dieses Kontaminationsrisiko im Routinebetrieb trotz sorgfältiger Arbeit nicht mit ausreichender Sicherheit vermeiden läßt, kann ein Reaktionsschritt zwischengeschaltet werden, der bereits vor der eigentlichen PCR-Reaktion vorhandenes Amplifikat zerstört und damit eine Dekontamination gewährleistet. Im Gegensatz zur natürlichen DNA (Probenmaterial) wird für die PCR anstelle der Base Thymin Uracil eingesetzt. Das im PCR-Reaktionsmix enthaltene Enzym Uracil-N-Glycosylase katalysiert bei einer Temperatur 37 °C für 30 min vor Beginn der PCR-Zyklen den Abbau Uracil-haltiger Amplifikate, die Thymin-haltige DNA stellt jedoch kein Substrat für dieses Enzym dar. Bei den für die PCR erforderlichen hohen Temperaturen wird die Uracil-N-Glycosylase inaktiviert, so daß neu gebildete Amplifikate nicht abgebaut werden (Weber und Wehrle, 1994).

In der Humanmedizin haben kommerzielle PCR-Testkits für den Nachweis einer Vielzahl bakterieller und viraler DNA Einzug in die Laborroutine gefunden (z.B. Amplicor-Kits der Fa. Roche, GEN-ETIK-Kits der Fa. Sorin, BACU-Kits der Fa. BfGA). Sie erlauben die hochspezifische, hochempfindliche Detektion der gewünschten DNA, bei minimalem Arbeitsaufwand und idealer Kontaminationsprophylaxe. Bleibt zu hoffen, daß ein solches System in der Zukunft für den Nachweis des BLV zur Verfügung steht.

2.5. Immunologie

Die Bildung humoraler AK ist die Primärantwort des Rindes auf die BLV-Infektion (Wittmann, 1993). Den Hauptreiz für die AK-Bildung bildet das **gp51** mit seinen acht Epitopen (A-H). Die Epitope A, B, D und E sind auch am denaturierten gp51 erkennbar und werden aus diesem Grund als Sequenzepitope bezeichnet.

Die AK des Rindes sind vor allem gegen die Epitope F, G und H gerichtet, während die AK des Schafes wesentlich mehr AG-Determinanten erkennen können (Bruck *et al.*, 1984a,b). Die Präsentation der Epitope F, G und H ist von der nativen, dreidimensionalen Struktur des gp 51 abhängig. Sie werden deshalb als Konformationsepitope bezeichnet (Bruck *et al.*, 1984b; Portetelle *et al.*, 1989a). Sie befinden sich auf einem schwach glykosylierten, proteolytischen Fragment am NH₂-Ende des gp51 (Bruck *et al.*, 1982a,b; Portetelle *et al.*, 1989a,b). Genauere Untersuchungen der As-Sequenz der Epitope F, G, und H von vier verschiedenen BLV-Isolaten (FLK-BLV, T15-2, LB 285, VdM 7628) führten zur Einteilung des BLV in

unterschiedliche Phänotypen (Portetelle *et al.*, 1989a,b). Tabelle 4 beschreibt die Isolate, zeigt die Positionen der As-Abweichungen zum gp51 der FLK- BLV und benennt die veränderten As.

Tab.4: Veränderte As Positionen im *env*-Bereich eines amerikanischen und zweier belgischer BLV-Isolate im Vergleich mit der FLK-BLV und Darstellung des Phänotyps

Isolat	Herkunft	Aminosäureposition							Phänotyp
		15	25	40	41	49	62	88	
FLK- BLV	USA (PL)	A	S	A	K	S	Q	R	F ⁺ G ⁺ H ⁺
T15-2	Belgien (T)	T		P	R	F		H	F ⁺ G ⁻ H ⁺
LB 285	Belgien (T)	T	A	P	R	F		H	F ⁺ G ⁻ H ^{+/-}
VdM 7628	USA (PL)						K		F ⁻ G ⁺ H ⁺

T: Isolat aus einem Tier mit leukotischen Tumoren

PL: Isolat aus einem Tier mit persistierender Lymphozytose

+: Epitop vorhanden

-: Epitop nicht vorhanden

+/-: Vorhandensein des Epitops zweifelhaft

Mamoun *et al.*, 1990 zeigten, daß die As-Abweichungen der verschiedenen Isolate zur FLK-BLV sehr begrenzt sind. Weder potentielle Glykosylierungsorte noch Cysteinreste ließen Veränderungen erkennen. Bei keinem der Isolate führten Abweichungen in der Sequenz zum Verlust aller drei untersuchten Epitope. Ein F⁻G⁻H⁻ -Virus wäre wahrscheinlich nicht in der Lage, sich im Wirt zu vermehren und würde das Ende der viralen Evolution bedeuten (Portetelle *et al.*, 1989a,b). Platzter (1990) konnte vier weitere Epitope I, K, L und M des BLV-gp51 bestimmen und lokalisieren.

Neben dem gp51 werden AK gegen das Core-Protein p24, das Membranprotein gp30, sowie gegen p15, p12, p10, das *tax*- und *rex*-Protein und gegen die Präkursorproteine Pr70^{gag}, gPr72^{env} und Pr44^{gag} gebildet (Miller und Olson, 1972; Kaaden *et al.*, 1977; Yoshinaka und Oroszlan, 1985; Beier *et al.*, 1987; Willems *et al.*, 1987a; Heeney *et al.*, 1988). Das p24 besitzt drei Epitope, von denen zwei eine stimulierende Wirkung auf CD4(+) T-Lymphozyten besitzen (Platzter *et al.*, 1990a; Mager *et al.*, 1994).

Der Nachweis von **BLV-AK** ist bereits 0-14 Tage nach der Infektion möglich, wobei entweder zuerst gp51 oder p24 bzw. beide gleichzeitig gebildet werden (Wittmann, 1993). Johnson *et al.* (1994) entdeckten 3 Wochen nach der artifizialen Infektion von Schafen BLV-AK, welche über den gesamten Untersuchungszeitraum von 120 Wochen nachweisbar waren. Infolge der experimentellen Infektion von Kälbern mit 1,2x10⁵ FLK-BLV-Zellen bzw. Lymphozyten konnten Rulka *et al.* (1994a,b) 14 bzw. 28 Tage post infectionem BLV-AK im ELISA nachweisen. Dabei war der AK-Titer nach Infektion mit Lymphozyten 20fach höher als der nach Inokulation von FLK-Zellen.

Die gebildeten AK sind Vertreter der Klassen IgG und IgM, selten IgA. Batmaz *et al.* (1995) zeigten, daß BLV-AK-positive Rinder auch insgesamt einen höheren IgG1- und einen

niedrigeren IgM-Titer haben, als serologisch negative Tiere. Gleichzeitig besteht eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der Lymphozyten und dem IgG1-Spiegel dieser Tiere. Nach Wittmann (1993) sind die IgM-AK im Titer höher und bleiben über einen längeren Zeitraum auf höherem Niveau als die vom IgG-Typ.

Die AK haben *in vitro* eine hemmende Wirkung auf die Virusinfektiosität (Zavada *et al.*, 1978), die Virusfreisetzung aus Blutlymphozyten oder Zellkulturen und auf die durch BLV induzierbare Synzytienbildung (Diglio und Ferrer, 1976; Bruck *et al.*, 1982a,b, 1984b). Sie weisen eine komplementabhängige Zytotoxizität gegen virusproduzierende Zellen auf (Portetelle *et al.*, 1978; Ristau und Weppe, 1984). Nur das Epitop G wird auf der Oberfläche BLV-produzierender Zellen präsentiert und kann damit Angriffspunkt der zytotoxischen Abwehr sein (Bruck *et al.*, 1982a). AK können die Ausbreitung des Virus im Organismus nicht verhindern und schützen nicht vor Tumorbildung (Burny *et al.*, 1980).

Weitere humorale Faktoren mit regulatorischer Funktion sind der **plasma blocking factor** (Gupta und Ferrer, 1982; Gupta *et al.*, 1984), welcher in der Lage ist, die virale Expression zu unterdrücken. Sein Gegenpart ist der **platelet-derived factor** (Burny *et al.*, 1988). Beide könnten Hauptregulatoren der BLV-Expression in peripheren Blutlymphozyten sein (Wittmann, 1993).

2.6. Sequenzierungsmethoden

Verschiedene Methoden, die der Analyse des Genoms poly- und eukaryotischer Zellen dienen, wurden beschrieben. Durchgesetzt haben sich Restriktionsenzymanalysen, Oligonukleotidhybridisierungen und die Sequenzierungsmethoden nach Maxam und Gilbert (1977; chemische Methode) bzw. Sanger (1977; enzymatische Methode).

2.6.1. Maxam-Gilbert-Methode

Die Maxam-Gilbert-Technik wird auch als chemische DNA-Sequenzierung bezeichnet, da sie auf vier verschiedenen, mehr oder weniger basenspezifischen Spaltungen mit Hilfe von organischen Reagenzien beruht (Maxam und Gilbert, 1977). Wichtige Voraussetzung für die Sequenzierung ist die einseitige Markierung der zu sequenzierenden ss- oder dsDNA, entweder an ihrem 3'- oder 5'-Ende. Das markierte Ende stellt den Fixpunkt dar, von dem aus die Sequenzierung beginnt. Die basenspezifische Spaltung des zu sequenzierenden DNA-Moleküls verläuft in drei Schritten. Im ersten Schritt wird eine Base der DNA chemisch modifiziert. Dabei sind die Reaktionsbedingungen so gewählt, daß im statistischen Mittel jedes DNA-Molekül nur einmal angegriffen wird. Im zweiten Schritt wird die modifizierte Base abgespalten und anschließend im dritten Reaktionsschritt der DNA-Strang genau an jener Stelle gespalten, an der die Base entfernt wurde. Man unterscheidet G-, (G+A)-, (T+C)- und C-spezifische Reaktionen. Die bei den vier Spaltungsreaktionen entstandenen, für die Ermittlung der DNA-Sequenz relevanten DNA-Fragmente haben ein gemeinsames, fixiertes, markiertes Ende und enden, je nach verwendeter Spaltungsreaktion, entweder mit A, C, G

oder T. Diese Fragmente werden in einem Sequenzgel elektrophoretisch voneinander getrennt. Nach der Autoradiographie des Gels bzw. der Detektion einer Fluoreszenzreaktion läßt sich die Basensequenz der DNA direkt ermitteln. Ob bei den (G+A)-, bzw. (T+C)-spezifischen Reaktionen jeweils die eine oder die andere Base reagiert hat, erkennt man durch Vergleich mit der jeweiligen G-, bzw. C-spezifischen Reaktion. Inzwischen gibt es zahlreiche Modifikationen und alternative Reaktionen der ursprünglich von Maxam und Gilbert (1977) beschriebenen Methode.

2.6.2. Sanger-Methode

Kettenabbruch-Methode

Atkinson *et al.* (1969) zeigten, daß 2',3'-Dideoxythymidintriphosphat (ddTTP) anstelle von Desoxythymidintriphosphat (dTTP) durch Polymerase in die wachsende Oligonukleotidkette eingebaut werden kann. Da aber ddTTP keine 3'-Hydroxylgruppe enthält, kann die Kettensynthese nicht weitergeführt werden. Genau an dieser Position kommt es zum Syntheseabbruch. Inkubiert man Primer und Template mit DNA-Polymerase bei Vorhandensein einer Mischung aus ddTTP und dNTP's, entstehen Fragmente, die alle das gleiche 5'-Ende und ddTTP an ihrem 3'-Ende besitzen. Die Erkenntnisse lassen sich auf die anderen Nukleotide erweitern. Bei separater Inkubation und separatem Gellauf kann die Sequenz des interessierenden DNA-Fragmentes exakt ermittelt werden. Als Syntheseinhibitoren können neben den Desoxyderivaten Arabinosenukleotide (ara) verwendet werden. Arabinose ist ein Stereoisomer von Ribose an der die 3'-Hydroxylgruppe in trans-Position zur 2'-Hydroxylgruppe angeordnet ist. Jeweils am Ort des Einbaus von Arabinose in die DNA-Kette kommt es zum Abbruch der Synthese.

Die von Sanger *et al.* (1977) beschriebene Kettenabbruch-Methode erfordert drei Reaktionsschritte. Zuerst erfolgt die Verbindung von Template und Primer. Diesem schließt sich die Inkubation der vier separaten Ansätze mit DNA Polymerase, dNTP's und ddNTP's an. Dem dritten Schritt, der Zugabe markierter dATP's (chase), folgt das Auftragen der Reaktionsansätze auf ein Sequenzgel. Die Auswertung der Autoradiographie kann frühestens nach achtstündiger Expositionszeit, ca. 80 Nukleotide vom 5'Ende des Primers entfernt beginnend, vorgenommen werden.

Die **Vorteile** der Kettenabbruch-Methode gegenüber der von Sanger und Coulsen (1975) beschriebenen Plus-Minus-Methode sind vielfältig: eine vorausgehende Verlängerung des Primers ist nicht nötig, es kann kommerziell erhältliche Polymerase verwendet werden, das Resultat ist eindeutiger, d.h. mit weniger Artefakten behaftet und es kann in einem einzelnen Versuchsansatz ein größerer DNA-Abschnitt sequenziert werden. Generell ist es möglich, Sequenzen 15-200 bp beginnend vom Primer Bindungsort zu lesen. Beobachtete Artefakte sind größtenteils auf Kontaminationen des Fragments zurückzuführen.

2.6.3. Modifizierte Sequenzierungsverfahren

Cycle-sequencing

Eines der modernsten Verfahren zur direkten Sequenzierung doppelsträngiger DNA, das Cycle-sequencing, beruht auf einer Kombination von PCR-typischen Zyklen (Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation) mit der Kettenabbruch-Methode nach Sanger. Durch die Verwendung der aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammenden Hot-Tub-Polymerase kann die Sequenzreaktion nicht nur bei hohen Temperaturen erfolgen, sondern auch in einer thermozyklisch verlaufenden Reaktion in einem PCR-Thermocycler (Srivastava *et al.*, 1992). Sie hat bei 95°C eine Halbwertszeit von 90 min und ein Temperaturoptimum zwischen 60-75°C. Ihre Polymerisationsrate beträgt bis zu 40 Basen pro Sekunde, bei fehlender Endo- und Exonukleaseaktivität.

Das Cycle-sequencing ist einfach durchzuführen, die Probenvorbereitung unkompliziert und es ist möglich, auch geringste DNA-Mengen (<40 fmol dsDNA, bzw. 10 fmol ssDNA) zu sequenzieren sowie DNA mit geringem Reinheitsgrad zu amplifizieren (Sears, 1992)

Cycle-sequencing unter Verwendung degenerierter Primer

Die Sequenzierung unbekannter DNA's stellt oftmals ein Problem dar, da auch die Oligonukleotidsequenz für die zu verwendenden Primer unbekannt ist (Compton, 1990). Um die Länge der spezifischen Primersequenzen zu reduzieren, werden sogenannte Desoxyribonukleosinmonophosphat enthaltende, degenerierte Primer hergestellt. Das Cycle-sequencing mit degenerierten Primern verläuft in zwei Schritten. Zuerst wird der degenerierte, Inosin enthaltende Primer verlängert und an seinem 5'Ende markiert. Diese Verlängerung wird unter limitierenden Bedingungen ausgeführt: Paßgenauigkeit, geringe dNTP-Konzentration und suboptimale Temperaturen für die Polymerisierung, so daß nur ein Annealing spezifischer Primer gefördert wird. Im zweiten Schritt werden bei gesteigerter Annealing- und Elongationstemperatur ddNTP's zugeführt. Insbesondere von hochdegenerierten Primern ist eine hohe Konzentration erforderlich, um spezifische Ergebnisse zu erzielen (Lee und Caskey, 1990; Kwon und Snisky, 1995).

Genomische Amplifizierung mit Transkript-Sequenzierung

Die genomische Amplifizierung mit Transkript-Sequenzierung (GAWTS) ist ein Verfahren, bei dem während der Amplifizierung ein PCR-Primer eingesetzt wird, welcher mit einem T7-Promotor gekoppelt ist. Die Geschwindigkeit der Sequenzierung steigt dabei auf das Fünffache (Stoflet *et al.*, 1988). Aufgrund der Komplexität des menschlichen und tierischen Genoms enthält die amplifizierte und transskribierte Sequenz auch Genomsegmente, die durch Kreuzhybridisierung der Primer entstanden sind. Das Ergebnis sind nicht interpretierbare Sequenzen. Die Spezifität kann durch Verwendung eines Oligonukleotidprimers für reverse Transkriptase, welcher sich in der interessierenden Region befindet, gewährleistet werden. Die reverse Transkriptase wird anschließend für die Sequenzierung nach der Didesoxymethode genutzt. Im Gegensatz zu herkömmlichen Sequenzierungsmethoden werden bei der GAWAT's

drei Primer benötigt, von denen der reverse-Transkriptase-Primer endmarkiert ist. Diese Methode kann auch dann angewandt werden, wenn von der Ausgangs-DNA weniger als ein Nanogramm vorhanden ist (Stoflet *et al.*, 1988).

2.6.4. Direkte Sequenzierung von PCR-Produkten

Versuche von Leitner *et al.* (1993) zeigen, daß die direkte Sequenzierung von PCR-Produkten weder in Bezug auf Sensitivität noch Sensibilität Nachteile gegenüber klonierten Produkten aufweist. Der traditionelle Weg um heterogene Populationen zu analysieren, besteht in der Isolierung vieler einzelner Klone gefolgt von einer Large Scale Sequenzierung (Demolis *et al.*, 1995). Diese Prozedur hat viele Nachteile gegenüber der Direktsequenzierung. Die Klonierung ist aufwendig und zeitraubend, eine Quantifizierung kann nur in indirekter Weise erfolgen. Werden klonierte PCR-Fragmente untersucht, kann nicht unterschieden werden, ob es sich bei Mutationen um natürliche Variationen oder um Fehler der PCR-Polymerase handelt. Die direkte Sequenzierung ist für automatische Sequenziergeräte anwendbar und eröffnet große Möglichkeiten bei der Analyse komplexer viraler oder heterologer genomischer Populationen. Aber auch die direkte Sequenzierung von PCR-Produkten enthält kritische Schritte: die Reinheit der PCR-Produkte (Kontamination mit PCR-Primern) und die Überwindung der sofortigen Renaturierung (Casanova *et al.*, 1990). Durch **asymmetrische PCR** (ein Primer liegt in hundertfach höherer Konzentration gegenüber dem anderen vor) kann das Renaturierungs-Problem umgangen werden. Die Zugabe von DMSO oder Mn-Puffer zur Verbesserung des Leseerfolges verändern die Reaktionsbedingungen nicht.

2.6.5. Automatische Sequenzanalysen unter Verwendung Fluoreszenzfarbstoff-markierter Primer

Smith *et al.* (1985,1986) und Prober *et al.* (1987) beschrieben erstmals eine auf dem Sanger-Prinzip beruhende Methode für die partielle, automatische Sequenzanalyse. Diese Technik basiert auf der Messung fluoreszierender Strahlung, welche von DNA-Fragmenten während ihrer elektrophoretischen Auftrennung ausgesandt wird. Der Fluoreszenzfarbstoff ist an das 5'Ende des Oligonukleotidprimers gebunden. Werden vier, mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Primer mit jeweils einem ddNTP gepaart, so können die A-, C-, G- und T-Reaktionen kombiniert und in einer gemeinsamen Bande auf dem Sequenzgel aufgetragen werden. Gleiches gilt für die Verwendung unterschiedlich markierter ddNTP. Die letztere Methode hat den Vorteil, völlig unabhängig von den verwendeten Sequenzprimern zu sein und nur wirkliche Kettenabbruch-Ergebnisse sichtbar zu machen. Die emittierte Strahlung wird von einem Argon-Laser gemessen, in einer Sammellinse fokussiert und gefiltert, um sie anschließend in einem Fotomodul in digitale Signale umzuwandeln und einem Computer zur Interpretation zuzuführen.

Die verwendeten **Fluoreszenzfarbstoffe müssen folgende Kriterien erfüllen**: 1. Ihr Absorptionsspektrum muß mit einem gewöhnlichen Laser eingefangen werden können und darf nicht mit anderer Fluoreszenzstrahlung des Gels interferieren. 2. Die Emissionsmaxima der

Fluoreszenzfarbstoffe müssen sich deutlich voneinander unterscheiden. 3. Die Fluoreszenzintensität sollte adäquat der Sensitivität des Lasers sein. 4. Die Farbstoffe dürfen weder die Reaktion des Primers mit der zu sequenzierenden DNA beeinflussen, noch die Elektrophorese behindern. Diese Bedingungen werden von Tetramethylrhodamin-Farbstoffen (Tamara) erfüllt (Connell *et al.*, 1987).

3. Material und Methoden

3.1. Untersuchungsmaterial

3.1.1. Tiermaterial

Die Untersuchung umfaßte 37 Rinder unterschiedlichsten Alters aus sechs von einander unabhängigen Beständen der Bundesländer Berlin, Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern, Baden-Württemberg und Sachsen-Anhalt. Von ihnen konnten, mit Ausnahme des Tieres 15313, in den Jahren 1992-1995 Blutproben entnommen werden. Die Blutprobenentnahme erfolgte aus der Vena jugularis oder Vena subcutanea abdominis im Herkunftsbestand bzw. auf dem Schlachthof. Das Blut wurde mit den Antikoagulantien Heparin sodium (5 IE/ml Blut), 50 mM EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) oder 4%iger Natriumzitratlösung (10 ml/40 ml Blut) versetzt und bei -20°C gelagert. Eine Blutserumgewinnung erfolgte durch Zentrifugation geronnenen Blutes bei 2500 U/min (K23, Fa. Janetzki) für 10 min. Bestandsnummer, Herkunft und Kennzeichnung der Probanden sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

Tab.5: Bestandsnummer, Herkunft und Kennzeichnung der untersuchten 37 Rinder

Bestand	Herkunft	Anzahl der Tiere	Tiernummer
1	Sachsen-Anhalt	12	32, 58, 68, 92, 134, 159, 356, 370, 374, 376, 527, 574,
2	Sachsen-Anhalt	17	3, 44, 145, 149, 153, 155, 167, 216, 237, 268, 273, 282, 324, 590, 599, 607, 615
3	Brandenburg	4	5, 6, 7, 41335
4	Mecklenburg-Vorpommern	1	15313
5	Brandenburg	1	45
6	Berlin	1	6869
7	Baden-Württemberg	1	2

- Besonderheiten einzelner Bestände

Bestand 1:

Die Milchviehherde des Bestandes 1 ist seit 1986 im BLV-AGID negativ. Im Jahre 1992 wurden bei einer zugekauften Färsen ein BLV-AK-Titer festgestellt. Diesem Befund folgte die sofortige Eliminierung des betroffenen Tieres. 1985 und 1986 mußte je ein Tier des Bestandes aufgrund tumoröser Veränderungen, deren Ursache nicht abgeklärt wurde, gemerzt werden. Das 1993 zugekaufte Tier 159 entstammte einem BLV-saniertem Bestand.

Bestand 2:

Seit 1990 wurden in diesem Bestand keine BLV-AK festgestellt (ELISA-Untersuchung anhand von Milchproben im 10er-Pool). Die erste Probenentnahme für die eigenen Untersuchungen erfolgte 1993. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Probanden zwei Monate post partum (p.p.). Sie standen seit einem Monat ante partum (a.p.) in einer Gruppe. Das Tier 44 wurde bei einer Routinekontrolle zwei Monate p.p. als BLV-AK Träger entdeckt und gemerzt. Tier 590 entwickelte 3 Monate p.p. multiple Lymphknotenschwellungen, zeigte starke Abmagerung und Leistungsminderung und mußte daraufhin der Krankschlachtung zugeführt werden.

Bestand 3:

Bei den Tieren 5, 6, und 7 handelte es sich um im AGID und ELISA BLV-seropositive Färsen eines eRL-Sanierungsbestandes. Das Tier 41335 war ein BLV-ELISA positives Milchrind eines bereits sanierten Bestandes. Es wurde nach der Isolierung aus dem Heimatbestand als Versuchstier der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Wusterhausen eingestellt.

Bestand 4:

Das über Jahre im AGID und ELISA BLV-positive Tier 15313 wies eine persistierende Lymphozytose auf und verstarb 1980 an tumoröser Leukose. Es war Eigentum des Friedrich-Löffler-Instituts für Tierseuchenforschung, Insel Riems.

Bestand 5:

Das Tier 45 entstammt einem eRL-Sanierungsbestand und erwies sich 1993 in einer ELISA-Routineuntersuchung als BLV-AK Träger.

Bestand 6:

Das Rind 6869 der Chirurgischen Tierklinik der Freien Universität Berlin zeigte bei der routinemäßigen Untersuchung mittels ELISA BLV-AK.

Bestand 7:

Das Tier 2 wurde 1979 geboren, infizierte sich wahrscheinlich horizontal mit dem BLV und ist seit dem 18. Lebensmonat im ELISA und AGID serologisch positiv. Es ist hämatologisch unauffällig und wies am Tag der Blutentnahme (1995) einen Hämatokrit von 32% und 5025 Lymphozyten/ μ l auf. Das Rind befindet sich im Besitz der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Wusterhausen.

Blutproben der untersuchten Tiere aus den Beständen 3 und 7 wurden uns von Frau Dr. Dagmar Beier von der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere Wusterhausen zur Verfügung gestellt.

3.1.2. Kontroll-DNA

Die für DNA-Präparationen verwendeten Zelllinien stammten aus der Stammhaltung des Institutes für Virologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin.

Als Negativkontrolle stand DNA von BLV-Provirus negativen Rindern unterschiedlichster Herkunft und die DNA der nicht BLV-infizierter Fledermauslungen-Zelllinie (bat) zur Verfügung.

Als Positivkontrolle diente sowohl das Plasmid pBLV12, ein in das Trägerplasmid pBR 322 integriertes, von Sagata *et al.* (1985a) isoliertes 8714 bp großes Provirus, als auch die präparierte DNA der permanent BLV-produzierenden Fetalen Lammnierenzelllinie (FLK-BLV) von Van der Maaten und Miller (1976). Diese FLK-BLV wurde dem Friedrich-Löffler-Institut für Tierseuchenforschung, Insel Riems 1986 von Prof. Burny (Brüssel) in der 66. Passage übergeben und anschließend dem Institut für Virologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin zur Verfügung gestellt

Als weitere Positivkontrolle diente der λ -BLV HU1-Klon (HU-Klon). Dieser Klon beherbergt 8.1 kb viraler DNA-Sequenz (Nyakatura *et al.*, 1985). Die Sequenzierung des *tax*-Bereiches der FLK-BLV erfolgte unter Verwendung des Plasmides pNSV4313 (enthält das *HindIII*-*EcoRI* Fragment des HU-Klons). Der für Sequenzanalysen des LTR-Bereiches verwendete U1-Klon enthält 5'LTR und *gag*-Gens des HU-Klons.

3.2. Verwendete Puffer und Lösungen

Verwendete Puffer und Lösungen werden nur einmal, an der Stelle ihrer Ersterwähnung beschrieben.

zu Punkt 3.4. DNA-Präparation

Lösung I: 25 mM Tris HCl (pH 7,5); 10 mM EDTA (pH 8,0); 15% Saccharose

Lösung II: 0,2 M NaOH; 1% SDS

Lysepuffer I: 0,32 M Saccharose; 5 mM MgCl₂; 1% Triton X-100; 10 mM Tris HCl (pH 7,5)

Lysepuffer II: 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0); 0,4 ml 10% SDS; 0,88 ml 5 M NaClO₄

SDS-K-Puffer: 1 μ l 1 M Tris HCl (pH 7,8); 1 μ l 0,5 M EDTA; 5 μ l 10% SDS; 90,5 μ l Aqua bidest.; 2,5 μ l Proteinase K Lösung (Stammlösung: 20 mg/ml)

TE-Puffer (pH 8): 10 mM Tris HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH 8,0)

Tween-K-Puffer: 0,5 μ l Tween 20; 0,5 μ l Proteinase K; 99 μ l Aqua bidest.

zu Punkt 3.5. Isolierung von ssDNA

NaCl/PEG (Polyethylen-Glycol) -Lösung: 20 % PEG 6000; 2,5 M NaCl

Spezialbouillon: 200 μ g Ampicillin, 125 μ g Kanamycin und 0,05 μ g Thiamin pro ml NB-I

(s. 3.10.)

zu Punkt 3.9. Agarosegelelektrophorese

Ladepuffer mit Bromphenolblau: 0,25% Bromphenolblau; 40% [w/v] Glukose in Aqua bidest.

Ladepuffer mit Orange G: 0,5 ml Orange G (2,5% [w/v] in Aqua bidest.); 2,5 ml Glycerin;

TAE 50x: 242 g Tris; 57,1 ml Eisessig in 800 ml Aqua bidest. lösen; pH 7,0 mit 10 N NaOH einstellen; Aqua bidest. ad 1 l

zu Punkt 3.10. Klonierung

Elutionspuffer: 1 M NaCl, 20 mM Tris HCl (pH8), 1 mM EDTA, 1 µg tRNA/20 µl

Nährbouillon-I (NB-I): 25 mg NB-I-Trockensubstanz; 1 g D(+)-Glukose; 4,33 ml gesättigte MgCl₂-Lösung; 1 l Aqua bidest.; sofort nach Herstellung autoklavieren

Nähragar-I (NA-I): 36 g NAI-Trockensubstanz auf 1 l Aqua bidest.; sofort nach Herstellung autoklavieren

zu Punkt 3.11. Sequenzanalyse

Acrylamid-Stammlösung 40%: 95 g Aa; 5 g NN`Methylenbisacrylamid; Aqua bidest. ad 250 ml

Acrylamid-Arbeitslösung 5%: 168 g Harnstoff; 48 ml Acrylamid-Stammlösung; 80 ml TBE 10x; Aqua bidest. ad. 400 ml (vor Gebrauch filtrieren, kühl lagern)

Ammoniumpersulfat (APS) 10%: 350 mg APS in 3,15 ml Aqua bidest. lösen und kühl lagern

Bindesilan: 10 ml Ethanol (96%); 2,5 ml Essigsäure 10%; 37,5 µl Bindesilan (bis zum Gebrauch mindestens 20 h bei 8°C lagern)

Gellösung: 50 ml Acrylamid-Arbeitslösung (5%); 400 µl Ammoniumpersulfat (10%); 40 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin)

TBE 10x: 121,1 g Tris; 51,35 g Borsäure (kristallin); 3,72 g EDTA; Aqua bidest. ad 1 l

dNTP-Arbeitsmixe: siehe Tabelle 6

Tab.6: Zusammensetzung von dNTP-Arbeitsmischen

Arbeitsmix				
	A	C	G	T
0,5 mM dATP	1	20	20	20
0,5 mM dCTP	20	1	20	20
0,5 mM dGTP	20	20	1	20
0,5 mM dTTP	20	20	20	1

Angaben in µl

ddNTP-Arbeitsverdünnungen: siehe Tabelle 7

Tab.7: Zusammensetzung von ddNTP-Arbeitsverdünnungen

Arbeitsverdünnung	Stammlösung 10 mM	Aqua bidest.
ddATP	3	197
ddCTP	15	600
ddGTP	2	398
ddTTP	5	95

Angaben in μ l

zu Punkt 3.13. Leukozytenkurzzeitkultur

Antibiotika (AB)-Stammlösung (Penicillin/Streptomycin): 2 Mio IE Penicillin; 1 g Streptomycin; PBS-Gebrauchslösung (steril) ad 20 ml

Dulbecco-modified-Minimal-Essential-Medium: 92,5 Dulbecco-modified-Minimal-Essential-Medium; 18,5 g NaHCO_3 ; Aqua bidest. ad 5 l; vor Gebrauch Zugabe von 3 ml AB-Stammlösung/l und 10% Neonatalem Kälberserum (NKS)

Leibowitz Medium: 70,6 g Leibowitz Medium; Aqua bidest. ad 5 l; vor Gebrauch Zugabe von 3 ml AB-Stammlösung/l und 10% NKS

Minimal-Essential-Medium: 53,2 g Eagle Minimal-Essential-Medium; 1,75 g NaHCO_3 in Aqua bidest. lösen; Aqua bidest. ad 5 l; vor Gebrauch Zugabe von 3 ml AB-Stammlösung/l und 10% NKS

(alle Medien wurden sterilfiltriert; Sartoriusfilter 0,15 bzw. 0,2 μ m Porengröße)

PBS-Stammlösung (20x): 320,0 g NaCl; 8,0g KCl; 8,0 g KH_2PO_4 ; 54,0 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; Aqua bidest. ad 2 l (autoklavieren)

PBS-Gebrauchslösung (pH7,2): 50,0 ml sterile PBS Stammlösung 20x; Aqua bidest. ad 1 l (autoklavieren)

zu Punkt 3.14. ELISA

Coatingpuffer pH 9,6: der Lösung 1 Lösung 2 zuführen bis pH 9,6 erreicht ist

Lösung 1: 5,3 g Na_2CO_3 in 1 l Aqua bidest.

Lösung 2: 4,2 g NaHCO_3 in 1 l Aqua bidest.

PBS-Tween: PBS; 0,05% Tween

Substratlösung: Phosphat-Zitrat Puffer 0,05 M Na_2PO_4 ; 0,1 M Na-Zitrat (pH 5); 0,04% Ortho-Phenylendiamin; 0,03% H_2O_2

zu Punkt 3.15. Westernblot

- Gellösungen

Acrylamidlösung: Acrylamidlösung 30%; Bisacrylamid 0,8% in 100 ml Aqua bidest. lösen, filtrieren, bei 4°C dunkel lagern

Ammoniumpersulfat 10%: 40 mg in 400 µl Aqua bidest. lösen

Tris-HCl/SDS 4x (pH 6,8): 6,05 g Trisbase; 0,4 g SDS in 40 ml Aqua bidest. lösen, mit HCl auf pH 6,8 einstellen; Aqua bidest auf 100 ml auffüllen, filtrieren, bei 4°C lagern

Tris-HCl/SDS 4x (pH 8,8): 91 g Trisbase; 2 g SDS in 300 ml Aqua bidest. lösen; mit HCl auf pH 8,8 einstellen; Aqua bidest auf 500 ml auffüllen, filtrieren, bei 4°C lagern

- Gelmischungen

Sammelgel 5% Acrylamid (für 10 ml): 1,3 ml Aa.; 2,5 ml 4xTris-Cl/SDS (pH 6,8); 6,1 ml Aqua bidest.; 0,01 ml TEMED; 0,05 ml APS

Sockelgel 12% (Endvolumen 8 ml): 3,0 ml Aa.; 1,875 ml 4xTris-Cl/SDS (pH 8,8); 3,125 ml Aqua bidest.; 0,01 ml TEMED; 0,05 ml APS 10% (erst kurz vor dem Gebrauch zugeben)

Trenngel: siehe Tabelle 8

Tab.8: Zusammensetzung von 5 bzw. 10%igen Trenngelen

Trenngel	prozentualer Anteil an Acrylamid	
	5%	10%
Stammlösung in ml		
Aa.	2,5	5
4xTris-Cl/SDS (pH 8,8)	3,75	3,75
Aqua bidest.	8,75	6,25
TEMED	0,01	0,01
APS 10%	0,05	0,05

- Lysepuffer für Zellen RIPA I

RIPA-Detergenz (10x): 10% Triton X-100; 10% (w/v) Natriumdesoxycholat; 1% SDS

RIPA-Salze (10x): 1,5 ml NaCl; 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5)

RIPA-I Puffer: 10 ml RIPA-Detergenz (10x); 10 ml RIPA-Salze (10x); PMSF-Stammlösung 0,1 M in Isopropanol oder Ethanol; Gelatine 0,1%; Aqua bidest. ad 100 ml

Endkonzentration der Reagenzien im RIPA-I-Puffer: 1% Triton X-100; 1% Natriumdesoxycholat; 0,1% SDS; 0,15 M NaCl; 0,05 M Tris/HCl pH 7,5; 0,001 M PMSF; 0,1% Gelatine

Kathodenpuffer: 0,025 M Tris; 0,192 M Glycin; 0,1% SDS; pH 8,3

Anodenpuffer: 0,025 M Tris; pH 8,3

- Probenpuffer 2,5x für 10 ml: 0,0756 g Tris; 0,2 g SDS 2%; 1 ml Glycerin 10%; pH 6,8 mit HCl einstellen; β-Mercaptoethanol 5%; 0,01 g Bromphenolblau 1%

- SDS-Transferpuffer 10x: 30,2 g Tris; 144 g Glycin; 5 g SDS; Methanol 20%

3.3. Chemikalien und Testkits

Tab.9: Herkunft von Chemikalien und Testkits

Chemikalien bzw. Testkits	Hersteller- bzw. Vertriebsfirma
1 kb Leiter	Gibco BRL
Acrylamid	Serva
Agarose	Serva
Ammoniumpersulfat	Serva
Ampicillin	Jenapharm
AutoRead™ Sequencing Kit	Pharmacia Biotech
Bindesilan	LKB Prod. Bromma
Borsäure	VEB Laborchemie Appolda
Bromphenolblau	Serva
Cäsiumchlorid	Reachim, Serva
Chloroform	Berlin Chemie Adlershof
D(+) Glukose	Serva
Dulbeco-modified-Minimal-Essential-Medium	Serva
dNTPs	Boehringer
Eagle Minimal-Essential-Medium	Institut für Immunpräparate und Nährmedien, Berlin-Weißensee
EDTA	Roth
Essigsäure	VEB Laborchemie Appolda
Ethidiumbromid	Serva
Formamid Farblösung	LKB Prod. Bromma
Heparin sodium	Weddel
Hot Tube sequencing system	Amersham Life Science
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Merck
Kinase	Amersham
Kinasepuffer	Amersham
Konjugat: Pferde-Anti-Rind-IgG-POD	Sigma
Leibowitz Medium	Biochrom KG
Ligationspuffer	Boehringer
Lysozym	Serva
Magic™ PCR Purification System	Promega
NA-I	Institut für Immunpräparate und Nährmedien, Berlin-Weißensee

Tab.9: Fortsetzung

Chemikalien bzw. Testkits	Hersteller- bzw. Vertriebsfirma
NB-I	Institut für Immunpräparate und Nährmedien, Berlin-Weißensee
NN Methylenebisacrylamid	Gibco BRL
Octanol	Merck
Orange G	Serva
PCR Primer	MWG, Roth
Penicillin	Jenapharm
Plasmid ZF 11	Promega
Primer	MWG Biotech
Proteinase K	Boehringer
Rainbow coloured molecular weight protein marker	Amersham
rATP	Stratargene
Reaktionspuffer 10x	Boehringer, Promega
Reppelsilan	LKB Prod. Bromma
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Promega
RNase	Boehringer
Sequenzprimer	Promega
SS phage DNA kit	Dianova
Streptomycin	Heyl
T4-Ligase	Promega
T7Sequencing™ Kit	Pharmacia Biotech
<i>Taq</i> -Polymerase, PCR Reaktionspuffer 10x	Perkin Elmer, Promega, Roth
TEMED	Gibco BRL, Stratargene
Triton X 100	Serva
T-Vector System	Promega
Western-Light Protein Detection Kit	Serva

3.4. DNA-Präparation

3.4.1. Präparation genomischer DNA aus Blut

Chloroform-Oktanol Präparation

10 ml Zitratblut wurden mit 40 ml Lysepuffer I versetzt, 2-3 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend in der Zentrifuge K23 (Fa.Janetzki) 20 min bei 3500 U/min und 4°C zentrifugiert. Das gewonnene Sediment wurde in 2 ml 0,9%iger NaCl-Lösung resuspendiert und dann mit Lysepuffer-II versetzt. Nach 2-3 minütigem leichten Schwenken erfolgte die Zugabe von 1 Volumen Chloroform/1-Oktanol (24:1). Dem 10 minütigen Schütteln folgte eine

Zentrifugation bei 3600 U/min und 4°C für 20 min. Die visköse Oberphase wurde abgenommen und 1:1 mit Chloroform vermischt, anschließend 10 min leicht geschüttelt und bei 3600 U/min und 4°C für 20 min zentrifugiert (bis zum Verschwinden der Interphase mußte dieser Schritt wiederholt werden). Aus der gewonnenen, mit einem Volumen Isopropanol versetzten Oberphase konnte die ausgefällte DNA auf einen Glasstab gewickelt werden. Nach dem Waschen mit 70%igem kalten Ethanol mußte die aufgewickelte DNA bis zur Lösung in 1 ml Aqua bidest. bei RT solange gelagert werden, bis der Alkohol vollständig verdunstet war.

Schnellpräparation unter Verwendung von Proteinase K

- Variante nach Kawasaki (1990)

50 µl Zitratblut wurden mit 0,5 ml TE-Puffer (pH 8,0) versetzt, kräftig geschüttelt und anschließend 10 s bei 14000 rpm Tischzentrifuge (5415 C; Fa. Eppendorf) zentrifugiert. Dem Dekantieren des Überstandes folgte die mindestens zweimalige Reinigung des Sedimentes mit 2x 0,5 ml TE-Puffer. Das letztgewonnene, in 100 µl Tween-K-Puffer resuspendierte Pellet, wurde 45 min bei 56°C und anschließend 10 min bei 95°C inkubiert.

Schnellpräparation ohne Verwendung von Proteinase K

20 µl heparinisertes Blut oder Zitratblut ist, abgefüllt in ein 1,7 ml Reaktionsgefäß, unter Verwendung der Tischzentrifuge wie folgt bearbeitet worden:

- Zusatz von 1 ml TE-Puffer pH 8, kräftig schütteln
- zentrifugieren für 15 s bei 14000 rpm, dekantieren des Überstandes
- Zusatz von 1 ml TE-Puffer pH 8 zum Sediment, vollständige Resuspension
- zentrifugieren für 15 s bei 14000 rpm, dekantieren des Überstandes
- lösen des Sediments in 50 µl Aqua bidest.
- erhitzen der Proben im Thermomixer 5436 (Fa. Eppendorf) für 10 min auf 95°C

Nach vollständigem Durchfrieren der Proben bei -20°C konnten sie für weitere Untersuchungen (insbesondere PCR) genutzt werden.

3.4.2. Minipräparation von Plasmid-DNA (pDNA)

Für ca. 16 Stunden bei 37°C auf NA-I mit 200 µg Ampicillin (Amp)/ml selektierte Bakterienkolonien (E.coli, Stamm DH5) wurden mit sterilen Holzszahnstochern abgepickt und in 5 ml NB-I (200 µg Amp/ml) bei 37°C und 275 U/min für ca. 16 Stunden auf einem Bakterien-schüttler (Fa. Infors AG) angezogen. Nach Abkühlung der Zellsuspension für mindestens 10 min auf Eis wurden die Zellen bei 3000 U/min und 4°C über 20 min pelletiert. Dem Suspendieren des Zellpellets in 150 µl Lösung I schloß sich der Zusatz von 30 µl Lysozym-Stammlösung und eine Inkubation bei RT für 10 min an. Nach Zugabe von 430 µl Lösung-II und gründlicher Durchmischung wurde der Ansatz 5 min im Eisbad gekühlt und nachfolgend 320 µl 3 M NaOAc (pH 4,6) zugegeben. Der sich anschließenden Durchmischung auf dem Schüttler (Vibrofix VF 1, Fa. Janke und Kunkel) folgte eine 20 minütige Inkubation

auf Eis. Durch Zentrifugation bei 5000 U/min und 4°C für 20 min konnte der Reaktionsansatz geklärt werden. Dem in 1,7 ml Reaktionsgefäße dekantierten Überstand wurden 550 µl Isopropanol zugegeben und die pDNA und bakterielle RNA bei RT innerhalb 20 min ausgefällt. Die gefällten Nukleinsäuren konnten bei 14000 rpm (Tischzentrifuge) innerhalb von 10 min pelletiert werden. Das mit 500 µl ca. 8°C kaltem, 70%tigem Ethanol gewaschene, 5 min zentrifugierte (14000 rpm) und luftgetrocknete Pellet wurde in 80 µl TE mit 0,2 µg RNase gelöst und anschließend bei 37°C für 20 min inkubiert. Nach Abzentrifugation nicht gelöster Bestandteile war der Überstand für weitere Untersuchungen einsetzbar.

3.4.3. Großpräparation von pDNA

Bakterienkolonien für pDNA-Großpräparationen wurden in 500 ml NB-I Medium angezogen. Die DNA-Präparation erfolgte wie unter Punkt 3.4.2. beschrieben, aber mit 100fachem Volumen der Reagenzien. Der DNA-Isolation schloß sich eine Reinigung mittels Cäsiumchloridgradienten an (s. 3.7.2., S.45).

3.5. Isolierung von Einzelstrang-DNA

Die Isolierung von Einzelstrang-DNA (ssDNA) erfolgte unter Verwendung des E.coli-Stammes GM 1674 und des Bakteriophagen M13K07, die uns das Institut für Biochemie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin zur Verfügung stellte. Zu 180 µl kompetenter GM 1674 Zellen wurden 1 µl Plasmid-DNA (Konzentration 100-500 ng/µl) und 19 µl Aqua bidest. pipettiert. Nach Kühlung des Ansatzes für 30 min im Eisbad, Erhitzung auf 42°C für 2 min, nochmaliger Abkühlung für 5 min und einstündiger Inkubation bei 37°C mit 800 µl NB-I, konnten unterschiedliche Volumina (10, 50, 200 µl) auf NA-I-Agarplatten (200 µg Amp/ml Agar) ausgestrichen werden. Nach ca. 16 h erfolgte die Überführung von Einzelkolonien in 1 ml NB-I (200 µg Amp/ml Bouillon) und deren Anzucht bei 37°C und 270 U/min auf dem Schüttler. Weitere zwei Stunden später wurden 50 µl Phagenstock M13K07 hinzugegeben und für eine Stunde bei 37°C und 150 U/min geschüttelt. Nach Überführung des Ansatzes in 4 ml Spezialbouillon und einer Wachstumszeit von 16-18 h bei 37°C und 300 U/min auf dem Bakterien-schüttler konnte die ssDNA der rekombinanten Phagen wie folgt präpariert werden. Der 10 minütigen Inkubation auf Eis folgten 5 min Zentrifugation bei 3000 U/min (Zentrifuge K23, Fa. Janetzki) und nach Überpipettierung der Überstände in neue Reaktionsgefäße eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 5000 U/min. Zu jeweils 4 ml klarem Überstand wurde 1 ml NaCl/PEG-Lösung gegeben, gemischt, die ssDNA 10 min bei RT gefällt, anschließend 10 min bei 4°C und 5000 U/min zentrifugiert und das Pellet in 80 µl TE gelöst. Die Reinigung der ssDNA erfolgte mit Hilfe des "SS phage DNA kit" nach Anweisung des Herstellers. Die im speed vac concentrator Jet 1000 (Fa. Fröbel) getrockneten Pellets wurden in 20 µl Aqua bidest. gelöst und waren nach Abzentrifugieren der Glasmilch für die Sequenzierung einsetzbar.

3.6. DNA-Quantifizierung und qualitative Charakterisierung

Die Bestimmung von DNA-Konzentrationen erfolgte durch Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem Specord M 40 (Fa. Carl Zeiss Jena). Dabei entsprachen $1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ } \mu\text{g ds-DNA/ml}$ Lösungsmittel (Sambrook *et al.*, 1989). War diese Konzentrationsmessung aufgrund geringer DNA-Mengen nicht möglich, erfolgte eine Auftrennung im Agarosegel und ein direkter Vergleich mit der 1 kB Leiter (5 μl Leiter entsprechen 1 μg DNA).

Die Einschätzung der Reinheit der DNA bzw. pDNA erfolgte durch Bestimmung des Quotienten E_{260}/E_{280} , der zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte.

3.7. Reinigung von pDNA

3.7.1. Phenolreinigung

Die mit 1 Volumen equilibriertem Phenol versetzte pDNA wurde nach gründlicher Durchmischung 5 min bei 14000 rpm (Tischzentrifuge) zentrifugiert und die entstandene Oberphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) vermischt und wie im vorhergehenden Reaktionsschritt zentrifugiert. Die neu entstandene Oberphase wurde mit 1 Volumen Chloroform versetzt und nochmals 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Bis zum völligen Verschwinden der Interphase mußte die Prozedur wiederholt werden. Es schloß sich die Fällung der DNA aus der letztgewonnenen Oberphase mittels 2fachem Volumen Ethanol an.

3.7.2. Cäsiumchlorid-Reinigung

Die Reinigung von pDNA, insbesondere aus Großpräparationen, erfolgte mittels CsCl_2 -Gradientenzentrifugation. Nach Mischung von 4,5 g CsCl_2 , 4,08 ml gelöste pDNA und 0,42 ml Ethidiumbromidlösung, sowie dem Einbringen des Gemisches in Quick-seal-tubes (Volumen 5 ml, Fa. Beckmann) und exaktem gegeneinander Austarieren, wurden die Tubes verschlossen und bei RT im VTi 80 Rotor (Fa. Beckmann) bei 65000 U/min für 22 Stunden in einer Beckmann-Ultrazentrifuge (L8-M) zentrifugiert. Nach dieser Zeit waren unter UV-Licht im Zentrum des Gradienten zwei Banden sichtbar. Die untere, zirkuläres Plasmid enthaltende Bande, wurde mit Hilfe einer Einwegspritze mit aufgesetzter Kanüle abgesaugt und in ein steriles Reagenzglas überführt. Die Zugabe eines doppelten Volumen Isoamylalkohol zu der DNA-Lösung diente dem Auswaschen von Ethidiumbromid. Dem Durchmischen des Ansatzes schloß sich eine Inkubation für 20-30 min bei RT an. Unter Verwerfen der jeweils oberen Phase wurde die Prozedur so lange wiederholt, bis die untere Phase farblos erschien. Zu 1 ml der gereinigten DNA-Lösung wurde ein gleiches Volumen Aqua bidest. und 8 ml 96%iger Ethanol (20°C) gegeben und die DNA über Nacht bei RT ausgefällt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 5000 U/min und 4°C (K23, Fa. Janetzki). Das gewonnene

pDNA-Pellet wurde 2-3 mal mit 70%igem Ethanol (4°C) gewaschen und nach dem Trocknen in 500-1000 µl TE (pH 8) gelöst.

3.8. Spaltung von pDNA und Amplifikaten mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von pDNA und PCR-Amplifikaten erfolgte unter Verwendung der nachfolgend erwähnten Restriktionsendonukleasen und den von den Herstellern empfohlenen Puffern (10x; A, B, M oder H) bei 37°C für 60-90 min (in Ausnahmefällen bis zu 15 Stunden). Es wurde folgender 20 µl-Ansatz pipettiert:

0,5-1,0 µg DNA
2,0 µl Puffer (10x Reaktionspuffer)
1,0-3,0 Unit/µg Restriktionsendonuklease
Aqua bidest. ad 20µl

verwendete Restriktionsendonukleasen:

AatII, BamHI, BclI, BglI, DraI, HindIII, PstI, PvuI, PvuII, SacI, SacII,

3.9. Agarosegelelektrophorese

Die Spalt- (siehe Punkt 3.8.) oder PCR-Reaktionsansätze (siehe 3.12.) wurden mit 2,5 µl Orange G- oder Bromphenolblau-Gel-Ladepuffer vermischt und auf ein Agarosegel (0,8-1,5 g Agarose und 50-100 µg Ethidiumbromid /100 ml TAE) aufgetragen. Hatten die erwarteten Restriktionsfragmente eine Größe kleiner 500 bp, erfolgte die Herstellung hochprozentiger (1,2-1,5%) Gele, für größere Fragmente die 0,8-1,0%iger Gele. Als Marker diente die 1 kB DNA-Leiter. Die bei 50-80 Volt mit dem Gene Power Supply GPS 200/400 (Fa. Pharmacia) aufgetrennten DNA-Fragmente konnten mit dem Transilluminator (Fa. Hoefer) sichtbar gemacht werden.

3.10. Klonierung von DNA-Fragmenten

3.10.1. Herstellung spezifischer DNA-Fragmente

Die Herstellung spezifischer DNA-Fragmente erfolgte mittels PCR (s. 3.12., S.52) aus genomischer DNA bzw. durch Spaltung vorhandener pDNA (s. 3.8., S.46).

3.10.2. Isolierung von DNA-Fragmenten

Isolierung mittels NA-45 Membranen

Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente bzw. des PCR-Ansatzes wurde quer zur Laufrichtung vor der gewünschten Bande ein der Größe der Bande entsprechendes, mindestens 30 min in Eluationspuffer getauchtes Stück NA-45 Membran (Fa. Schleicher & Schüll) inseriert. Die Elektrophorese erfolgte solange, bis das Fragment vollständig auf die Membran aufgelaufen war. Die Membran wurde anschließend mit 180 µl Eluationspuffer, dem 1 µl tRNA Stammlösung zugesetzt war, 20 min bei 56°C inkubiert. Nach dem Überführen der Flüssigkeit in ein neues 1,7 ml Reaktionsgefäß erfolgte der Zusatz von zwei Volumenteilen eiskaltem, 96%igem Ethanol. Durch die Lagerung bei -20°C für mindestens zwei Stunden fällte die DNA aus. Sie konnte anschließend durch Zentrifugation, 15 min bei 14000 rpm (Tischzentrifuge), pelletiert und mit 70%igem, 4°C kaltem Ethanol gewaschen werden. Die Lösung des getrockneten Pellets erfolgte in 50-80 µl TE bzw. Aqua bidest..

Fragmentgewinnung mittels Magic PCR Preps DNA Purification System for Rapid Purification of DNA Fragments (Fa. Promega)

100 µl Purification-Puffer und 50-150 µl PCR-Reaktionsansatz wurden in ein 1,7 ml Reaktionsgefäß gegeben und vermischt. Dieser Mischung wurden 1 ml Magic PCR Preps Resin zugegeben, 3x innerhalb einer Minute gemischt und der Ansatz in eine „Magic Minicolumn“ überführt. Es schloß sich die Waschung mit 1 ml 80 %igem Isopropanol und, nach Umsetzung auf ein Eppendorf-Reaktionsgefäß, eine Zentrifugation für 20 s bei 14000 rpm (Tischzentrifuge) an. Dem Überführen der Säule auf ein neues Reaktionsgefäß und dem Zusatz von 20-30 µl Aqua bidest. folgte nach einer Minute Wartezeit eine erneute Zentrifugation für 20 s bei 14000 rpm. Die eluierte DNA war sofort für weitere Untersuchungen einsatzbereit oder konnte bei -20°C gelagert werden.

3.10.3. Ligation

Die Ligation von Vektor und Fragment erfolgte unter Verwendung des gespaltenen und dephosphorylierten Vektors Zf 11, T4-Ligase, Ligationspuffer und rATP bzw. unter Nutzung des T-Vector-Systems. Als Ausgangsfragment diente gereinigtes, in Aqua bidest. gelöstes PCR-Produkt oder im PCR-Reaktionsansatz befindliches Amplifikat.

Es wurde folgender Ligationsansatz pipettiert:

-0,5-2,0 µg Fragment
-1,0 µl rATP
-2,0 µl Ligationspuffer
-1,0 µl Vektor (50 ng/µl)
-1,0 µl Ligase
-Aqua bidest. ad 20 µl

Die Inkubation erfolgte 8-18 h bei 8°C.

3.10.4. Transformation kompetenter Zellen

Der Ligationsansatz wurde mit 180 µl Suspension kompetenter Zellen (E.coli, Stamm DH5) vermischt, 30 min im Eisbad, 2 min bei 42°C und nochmals 5 min im Eisbad inkubiert. Der Zugabe von vier Volumen NB-I-Medium schloß sich eine einstündige Inkubation bei 37°C an. Anschließend wurde die Zellsuspension in unterschiedlichen Volumina (20 µl, 200 µl, 680 µl) auf NB-I-Agarplatten (200 µg Amp/ml) ausgestrichen und für mindestens 16 h im Brutschrank (37°C) inkubiert.

3.11. Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse erfolgte unter modifizierter Anwendung der bei Sanger *et al.* (1975, 1977) beschriebenen Kettenabbruchmethode.

Generell besteht die Möglichkeit der Einzel- oder Doppelstrangsequenzierung unter Verwendung von radioaktiven bzw. fluoreszierenden Markern. Das Ausgangsmaterial lag entweder als Fragment (nicht kloniert) oder in einen Vektor ligiert und vermehrt (kloniert) vor (siehe 3.10.2.). Es wurde generell zwischen vier Verfahren unterschieden:

1. Methode nach Sommer (1992)
2. Hot Tub DNA-Sequencing
3. T7-Sequencing
4. AutoRead-Sequencing

Die nachfolgende Abbildung 4 gibt einen Überblick über die durchgeführten Sequenzierungsmethoden.

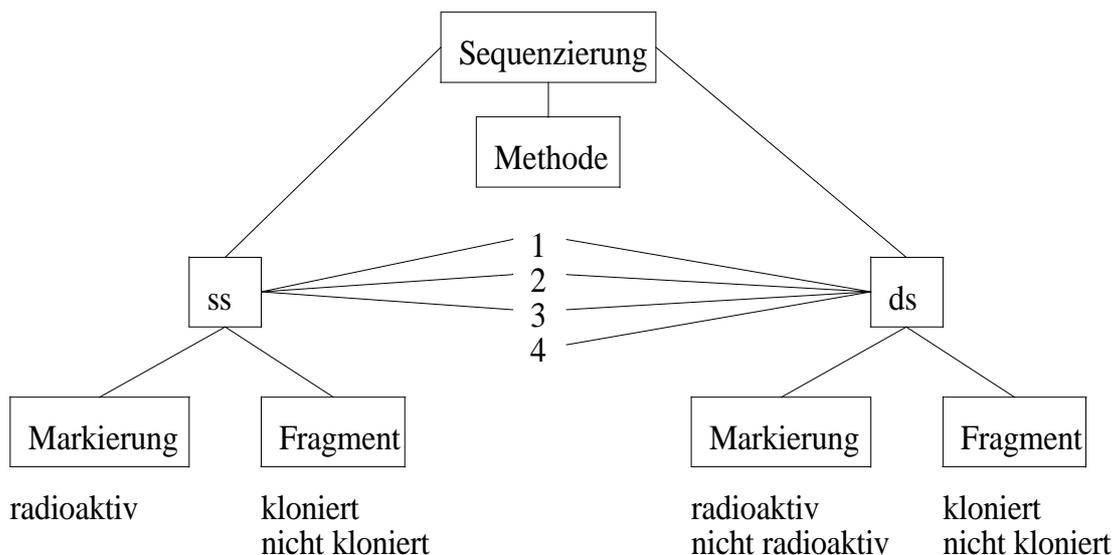


Abb.4: Durchgeführte Sequenzierungsmethoden im Überblick

3.11.1. Für die Sequenzierung verwendete Primer und deren Markierung

Für die Sequenzierungsreaktion wurden folgende Sequenzprimer verwendet:

Tab.10: Sequenzprimer, ihre Abkürzung und Sequenz

Primer	Abkürzung	Sequenz
-pUC/M13 forward (-40) 17mer	M13fw short	5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'
-pUC/M13 reverse 17mer	M13rev short	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
-pUC/M13 forward (-47) 24mer	M13fw long	5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'
-pUC/M13 reverse 22mer	M13rev long	5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'
-SP6 Promotor 19mer	SP6	5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3'
-T7 Promotor 22mer	T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

Außer den in Tabelle 10 aufgeführten Primern kamen die in Tabelle 11 (s. S.53) zusammengestellten Primer zur Anwendung.

Kinierungsreaktion

Für die Kinierungsreaktion wurden 2 µl Primer mit 1 µl Kinasepuffer, 4,5 µl Wasser, 2 µl ³²PγATP und 0,5 µl Kinase 45 min bei 37°C inkubiert und anschließend 2 min gekocht.

3.11.2. Sequenzierungsreaktion

• Reaktionsansatz bei Verwendung des Hot Tub DNA sequencing systems (Fa. Amersham)

Für die Sequenzierungsreaktion wurden die Reagenzien des Hot Tube DNA sequencing systems verwendet. Für jede Probe galt folgender Präreaktionsmix:

- 0,6-1 µg DNA
- 1,5 µl Primer (kiniert)
- 0,5 µl Puffer
- 0,7 µl Hot Tub DNA Polymerase
- Aqua bidest. ad 10 µl

Nach Verteilung dieses Mixes zu gleichen Teilen auf je 2,5 µl der vier "dideoxy terminations"-Mixe wurde die Sequenzierungsreaktion im Thermocycler (Fa. Perkin Elmer) gestartet. Die Temperaturen waren abhängig von der Schmelztemperatur des jeweils verwendeten Primers. Die Reaktion enthielt aber in jedem Falle die folgenden sechs Schritte:

1. Denaturierung der DNA bei 84-88°C für 3-7 min
2. Denaturierung bei 84°C für 1 min
3. Annealing der Primer für 30 s
4. Synthesereaktion für 1,15 min
5. Abkühlung des Ansatzes auf 4°C
6. Beendigung der Reaktion durch Zugabe von 4 µl Formamid Stopplösung und Lagerung der Ansätze bis zur weiteren Bearbeitung im Tiefkühlschrank

Die Schritte **2-4** wiederholten sich 12-20 mal.

• Reaktionsansatz bei Anwendung der Methode nach Sommer

Die Herstellung der dNTP-Arbeitsmische und ddNTP-Arbeitsverdünnungen bei Verwendung von radioaktiv markierten Primern (siehe 3.2.) erfolgte nach Hinweisen von Herrn Dr. G. Sommer, Institut für Biochemie des Fachbereiches Veterinärmedizin (Standort Mitte) der Freien Universität Berlin. Die dNTP-Arbeitsmische und ddNTP-Arbeitsverdünnungen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und sind im Folgenden als "Buchstabenmix" bezeichnet.

Es wurde folgender Präreaktionsmix hergestellt:

- 0,5-1,0 µg in Aqua bidest. gelöste DNA
- 2,0 µl Puffer 10x Taq (Mg frei)
- 1,2 µl MgCl₂ -Lösung (6 µl MgCl₂ / 100 µl Aqua bidest.)
- 1,5 µl Primer (kiniert, siehe 3.11.1)
- Aqua bidest. ad 10 µl

Der Präreaktionsmix wurde für 15 min bei 56°C inkubiert, 1,0 µl verdünnte Taq-Polymerase (0,25 µl Taq und 0,75 µl Taq-Puffer) hinzugegeben und anschließend auf vier Eppendorf Reaktionsgefäße, in denen sich je 2,0 µl Buchstabenmix befand, verteilt. Es schloß sich eine nochmalige Inkubation für 5 min bei 56°C an. Die Zugabe von 2 µl Chaise Mixes (enthält 0,125 mM jedes der vier dNTP's) und die Inkubation des gesamten Ansatzes für 15 min bei 56°C mit anschließendem Eisbad beendete die Reaktion. Die Reaktionsgemische wurden daraufhin 10-15 min im Speedvac concentrator (Jet 1000) eingedampft und in 4 µl Formamid-Farblösung gelöst.

• Reaktionsansatz bei Verwendung des T7-Sequencing Kit (Fa. Pharmacia)

In Abwandlung des vom Hersteller empfohlenen Reaktionsablaufes erfolgte die Sequenzierung mit dem T7-Sequencing Kit in folgender Weise:

10 µl DNA Lösung (ca. 1,5-2.0 µg)
 + 2 µl 2M NaOH/2mM EDTA
 + 8 µl Aqua bidest.
 → 5 min RT
 + 2 µl 2M NH₄Ac, pH 4,6
 + 60 µl 96% Ethanol
 → mischen

→ 20 min bei 4°C zentrifugieren
 → Überstand absaugen und verwerfen
 + 80 µl 80% Ethanol
 → 5 min bei 4°C und 12000 rpm zentrifugieren
 → Überstand absaugen und verwerfen
 → Pellet trocknen lassen und in 10 µl Aqua bidest. lösen

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Herstellung des Präreaktionsmixes: 10 µl DNA-Lösung + 2 µl Annealing Puffer, + 2 µl Primer → kurz anzentrifugieren → 10 min 55°C → 10 min 37°C → 10 min RT | <ul style="list-style-type: none"> Herstellung des Label-Prämixes: 3 µl Labelmix dATP + 1 µl (= 10 µCi) S³⁵αATP + 1 µl DMSO |
|--|---|

14 µl Präreaktionsmix
 + 4 µl Labeling-Prämix
 + 2 µl T7-Polymerase (1,5 U/µl)
 → 5 min RT
 + je 4,5 µl zu den vorgelegten 2,5 µl Abbruchmischen
 → 5 min 37°C
 + 5 µl Formamid-Stopplösung
 → 2 min 80°C

- Reaktionsansatz bei Verwendung des AutoRead Sequencing Kit (Fa. Pharmacia)

Die Nutzung des AutoRead Sequencing Kit erfolgte streng nach Anweisung des Herstellers unter Anwendung der Prozedur B (Quick Annealing of Primer to ds-Template).

3.11.3. Acrylamidgelelektrophorese

Präparation des Acrylamidgels

Für die Herstellung der keilförmigen, 20 x 55 cm großen Agarosegele kamen die Bestandteile des LKB 2010 Macrophor Sequencing Systems (Fa. Pharmacia LKB Biotechnologie) zur Anwendung. Als erster Schritt erfolgte die Reinigung der Ohrenplatte mit 96%igem Ethanol unter Verwendung eines fusselreien Tuches. Anschließend wurde mit einem zweiten Tuch ca. 3 ml Bindsilanlösung über die Oberfläche verteilt. Nach ein bis zwei Minuten Trocknung konnte überflüssiges Bindsilan mit Alkohol entfernt werden. Der Platzierung der Thermostatierplatte auf dem Macromould-Gelbereitungstisch schloß sich die Reinigung in der für die Ohrenplatte beschriebener Weise an. Sie wurde mit 2 ml Reppelsilan dünn eingerieben und anschließend mit Hilfe einer Wasserwaage waagrecht eingerichtet. Die 0,1-0,6 mm dicken

Abstandhalter konnten aufgelegt und an unterschiedlichen Positionen festgeklemmt werden. Eine Aussparung an ihrem unteren Ende diente der vollständigen Abdichtung der Platte mit der unteren Elektrodenkammer. Nun konnte ca. 50 ml Gellösung auf die Thermostatierplatte gegeben und die Ohrenplatte unter Vermeidung des Eindringens von Luftblasen aufgelegt werden. Mit den bereits vorher positionierten Klemmen wurden beide Platten aufeinandergedrückt und der Kamm (36 bzw. 22 Zähne) an der Oberkante des Gels eingefügt. Nach einer Polymerisationsdauer von mindestens einer Stunde war das Gel für die weitere Verwendung bereit.

Gellauf

Mit den Wasseranschlüssen an der linken Oberkante wurde die Plattenkonstruktion in die Macrophor-Elektrophoreseeinheit gestellt und die Thermostatierplatte an die Thermostateinrichtung (Multi Temp II, Fa. Pharmacia LKB Biotechnologie) angeschlossen. Über einen Zeitraum von 20 min erfolgte der Vorlauf bei eingeschalteter Elektrophorese- und Thermostateinrichtung. Mit einer Glaspipette (0-3 µl, Fa. Dumond) wurden die für 2 min bei 100°C denaturierten Proben in Volumina von 1,8-2,3 µl aufgetragen. Während des 180-200 minütigen Laufes lag bei konstanter Leistungsaufnahme von 50 Watt eine Spannung von ca. 2200 V an. Die Einrichtung wurde während der Laufzeit auf 45°C temperiert. Die Fragmenttrennung war zumeist dann beendet, wenn Bromphenolblau aus der unteren Gelkante heraustrat. Anschließend wurde das Gel für 20 min in einer Lösung aus 10% Essigsäure / 10% Methanol fixiert, unter fließendem Wasser ca. 3 min abgespült und 1 h bei 80°C getrocknet.

3.11.4. Autoradiographie

Die in Frischhaltefolie eingeschlagenen Sequenzgele wurden bei RT für mindestens 16 h autoradiographiert. Als Filmmaterial fanden die Planfilme HS-11 (Fa. ORWO), XB-90 (Fa. Fotochemische Werke GmbH), Hyperfilm-MP und Hyperfilm-βmax (jeweils Fa. Amersham) Verwendung. Sie wurden mit dem Entwickler G150 (Fa. Agfa) und dem Fixierer G350 (Fa. Agfa) fertiggestellt.

3.12. Polymerasekettenreaktion

3.12.1. Verwendete Primer

Die in den Untersuchungen verwendeten Primer, ihre Nukleotidposition im BLV-Genom und ihre Schmelztemperatur sind in Tabelle 11 aufgelistet. Die Schmelztemperatur bezieht sich auf eine Salzkonzentration von 50 mM und eine Oligonukleotid-Konzentration von 1 µM. Die Kennzeichnung "i" bedeutet invers und weist auf die 3´-5´ Leserichtung des Primers (bezogen auf seine Sequenz) hin.

Tab.11: PCR Primer, ihre Sequenz, Np im BLV-Genom und Schmelztemperatur

Primer		Nukleotidsequenz	Position	Tm°C
LTR ₁		5'-TGTATGAAAGATCATGCCGACCTAG-3'	1-25	56,3
LTR ₄₂	*	5'-GTAAACCAGACAGAGACGTCAGCTG-3'	42-64	56,1
LTR _{304i}	*	5'-TCCATTCCGTTTCGTGCCAA-3'	304-322	56,3
LTR _{478i}		5'-GAAGGAGAGAGCGCGGGC-3'	478-495	57,2
LTR _{506i}	*	5'-GGTCTCTCCTGGCCGCTAGA-3'	506-522	55,8
<i>gag</i> ₁₀₂₇		5'-GAAATTGAAAATAAGGCACCGG-3'	1027-1048	56,4
<i>prt</i> _{1858i}		5'-GCATTCTAATTCGGCCTCACTAA-3'	1858-1880	56,3
<i>prt</i> _{2103i}	*	5'-TTAGAGCCAGGGTCAGAGG-3'	2103-2122	53,2
<i>pol</i> ₄₁₁₁		5'-TGCCAAAAGCTTAATCCAAGTGG AGGAGGAGGA-3'	4111-4140	69,1
<i>pol</i> ₄₈₁₀	*	5'-AAAGCCTTCAAATGCCTAAA-3'	4810-4829	50,9
<i>env</i> _{4870i}	+	5'-AGAGTGAGAGTGAGACTTACCC-3'	4870-4892	48,0
<i>env</i> _{4987i}		5'-AGTATTTGGTCAATGGAGATGG-3'	4987-5008	52,0
<i>env</i> ₅₀₃₂	<	5'-TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA-3'	5032-5053	55,9
<i>env</i> ₅₀₉₉	+	5'-CCCACAAGGGCGGCGCCGGTTT-3'	5099-5120	74,1
<i>env</i> _{5521i}	+	5'-GCGAGGCCGGGTCCAGAGCTGG-3'	5521-5542	71,3
<i>env</i> _{5608i}	<	5'-ACAACAACCTCTGGGAAGGGT-3'	5608-5629	57,4
NCR _{6410i}	*	5'-ACACTGACTACTCCACTAAGCCA-3'	6410-6432	52,1
pX-III ₆₉₇₈	*	5'-GATGCTCGGGTCCAAGTGTGCA-3'	6978-6999	63,8
<i>tax</i> _{7975i}	#	5'-GTTAGGAATAGGTCGATCGC-3'	7975-7994	50,3
LTR _{8201i}	*	5'-GCGGGGTGGCGGCTCCTAGGTCGG-3'	8201-8022	70,9

Tm: Schmelztemperatur

* Primer wurden von Frau Dr. P. Blankenstein, Institut für Virologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin bzw. Frau Dr. A. Bondzio und Herrn Dr. G. Sommer, Institut für Biochemie des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin zur Verfügung gestellt.

Primersequenz wurde anhand der Hinweise von Herrn Dr. A. Kurg (1992), Institut für Molekular- und Zellbiologie der Universität Tartu (Estland) erstellt.

< Primer wurden von Herrn H. Fechner und Herrn G. Mewes, Institut für Virologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin zur Verfügung gestellt.

+ Primer wurden entsprechend der von Naif *et al.* (1990) ermittelten Sequenz hergestellt.

3.12.2. Amplifikationsreaktion

Die Amplifikationsreaktionen wurden in Reaktionsansätzen von insgesamt 30 oder 50 µl unter Verwendung von 0,1-0,5 µg DNA folgendermaßen durchgeführt.

	<u>Ansatz 50 µl:</u>	<u>Ansatz 30 µl</u>
10x PCR-Reaktionspuffer	5,0 µl	3,0 µl
Magnesiumchlorid (25 mM)	3,0 µl	3,0 µl
dNTP (5 mM)	3,25 µl	3,0 µl
Primer (10 pmol/µl)	je 1,0-1,5 µl	je 1,0 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,25- 0,3 µl	0,25 µl
Aqua bidest.	ad 50 µl	ad 30 µl

Nach dem Pipettieren der Komponenten in 0,5 ml Amp Tubes (Fa. Perkin Elmer), oft als Reaktionsmix für mehrere zu amplifizierende DNA's und nachfolgender Aufteilung, wurden sie mit zwei Tropfen Öl überschichtet und kurz anzentrifugiert. In einem zweiten Raum erfolgte die Zugabe der präparierten DNA. Die Polymerisationsreaktion wurde mit folgendem Programm durchgeführt. Die Annealingtemperatur (mit x gekennzeichnet) wurde entsprechend der Schmelztemperatur der verwendeten Primer variiert.

•Vorheizen		72°C 2 min
•Denaturierung		94°C 2 min
•5 Zyklen:	Denaturierung	95°C 30 s
	Annealing	x 30 s
	Extension	72°C 75 s
•30 Zyklen	Denaturierung	95°C 30 s
	Annealing	x 30 s
	Extension	72°C 60 s
•5 Zyklen	Denaturierung	95°C 30 s
	Annealing	x 30 s
	Extension	72°C 75 s
•4 min 72°C		
•Kühlung auf 4°C		

Die folgende Tabelle 12 gibt die, für die jeweils genannte Primerkombination berechnete und während des Annealingschrittes eingestellte Temperatur an.

Tab.12: PCR-Primerkombination und zugehörige Annealingtemperatur.

Primerkombination	Annealingtemperatur
LTR ₁ -LTR _{478i}	58°C
LTR ₁ -LTR _{506i}	58°C
LTR _{42-prt} _{2103i}	54°C
LTR ₄₂ -LTR _{478i}	58°C
LTR ₄₂ -LTR _{506i}	58°C

Tab.12:Fortsetzung

Primerkombination	Annealingtemperatur
<i>gag</i> ₁₀₂₇ - <i>prt</i> _{1858i}	57°C
<i>env</i> ₅₀₃₂ - <i>env</i> _{5608i}	62°C
<i>env</i> ₅₀₉₉ - <i>env</i> _{5521i}	70°C
<i>pol</i> ₄₁₁₁ - <i>pol</i> _{4870i}	58°C
<i>pol</i> ₄₁₁₁ - <i>env</i> _{4897i}	60°C
pX-III ₆₉₇₈ -LTR _{8201i}	62°C
pX-III ₆₉₇₈ - <i>tax</i> _{7975i}	68°C

Eine Einfach-PCR wurde mit 50 Zyklen durchgeführt. In den meisten Fällen erfolgte jedoch eine PCR mit zweimal 40 Reaktionszyklen (Doppel-PCR). Dazu wurde 1 µl des nach 40 Zyklen erhaltenen Reaktionsansatzes anstelle der Matrizen-DNA in einen frischen bzw. eingefrorenen Reaktionsansatz überführt, das fehlende Volumen durch Aqua bidest. ergänzt und für weitere 40 Zyklen bearbeitet.

Die beschriebenen *env*-Primer kamen für eine Nested-PCR zum Einsatz, wobei das Paar *env*₅₀₃₂-*env*_{5608i} die äußere, in den ersten 40 Zyklen verwendete Primerkombination und das Paar *env*₅₀₉₉-*env*_{5421i} die innere Primerkombination darstellte. Der Reaktionsablauf entspricht dem der Doppel-PCR. In analoger Weise wurden die Primerpaare pX-III₆₉₇₈/LTR_{8201i} und pX-III₆₉₇₈/*tax*_{7975i}, sowie die LTR Primer LTR₁-LTR_{506i}/LTR₄₂-LTR_{478i} für eine Nested-PCR verwandt.

Bei der generell als Einfach-PCR durchgeführten asymmetrischen PCR lagen die beiden Primer in unterschiedlichen Konzentrationen vor (1:20 bis 1:100).

3.12.3. Arbeitsbedingungen

Zur Vermeidung von Kontaminationen erfolgte die Pippettierung des Reaktionsansatzes (ohne DNA), die Zugabe der zu amplifizierenden DNA und die PCR in getrennten Räumen. Die Arbeitsplätze, Arbeitsbekleidung, Gerätschaften und Lösungen wurden vor und nach der Nutzung mit UV-Licht bestrahlt.

3.13. Leukozytenkurzzeitkultur

Für die Leukozytenkurzzeitkultur (LKK) wurden maximal 18 Stunden bei 4°C gelagerte, heparinisierte Blutproben verwendet und als Doppelansatz folgendermaßen bearbeitet:

Zu 60,0 ml Blut wurden 120 ml kaltes Aqua bidest. gegeben und beides für 30 s geschüttelt. Es erfolgte die Zugabe von 30 ml Natriumchloridlösung (4,5%ig) und ein weiteres Schütteln für 30 s. Der gesamte Ansatz konnte nun für 20 min bei 800 U/min (Sepatech, Fa. Hereus) und 4°C zentrifugiert werden. Anschließend wurde er 3x mal mit 60 ml PBS gewaschen und das letzte Sediment in 5 ml Medium (Leibowitz-/Dulbeco-Modified-Minimal-Essential-

Medium oder Minimal-Essential-Medium) aufgenommen und in 2 Müllerflaschen mit je 10 ml Medium eingesät. Der Kultivierungsansatz inkubierte 60 h bei 37°C, alle 24 Stunden erfolgte je nach Bedarf die Zugabe frischen Mediums.

Von einer Flasche des Doppelansatzes wurde der ZKÜ mit in Suspension befindlichen Zellen und dem abgeschabten Zellpellett von der anderen nur der ZKÜ mit suspendierten Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 800 U/min und 4°C für 20 min zentrifugiert. Das entstandene, in 100 µl RIPA-Puffer aufgenommene Sediment konnte in gleicher Weise, wie der nach dem Zentrifugieren erhaltene Überstand, bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert werden.

Zu Flaschen mit dem noch anhaftenden Zellrasen wurden je 10 ml frisches Medium gegeben und diese für weitere 10 Tage inkubiert.

3.14. Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der catch-ELISA wurde in Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten durchgeführt. Die Beschichtung der Platten erfolgte mit monoklonalen Antikörpern (gp51/05 oder gp51/22) gegen das Epitop M und B des gp51 (Bruck *et al.*, 1982a; Platzer *et al.*, 1990b). Der ELISA wurde für jede Probe als Doppelbestimmungen in folgender Weise durchgeführt:

- Vorbeschichtung der Mikrotiterplatten mit 100-200 ng mAK / Kavität, verdünnt in 100 µl Coating Puffer (pH 9,6)
- Kältebindung für ca. 16 h bei 4°C
- 3x3 min Waschen mit PBS-Tween
- Auftragen von je 100 µl des in PBS-Tween + 10% Pferdeserum verdünnten BLV-AG (Zellkulturüberstand der FLK-BLV)
- Inkubation 1 h bei 37°C
- 3x3 min waschen mit PBS-Tween
- Auftragen der mit PBS-Tween + 10% Pferdeserum 1:40 verdünnten Proben- und Kontrollseren
- Inkubation 1 h bei 37°C
- 3x3 min waschen mit PBS-Tween
- Auftragen von je 100 µl Meerrettichperoxidase markiertem Pferde-Anti-Rind-IgG Konjugat (1:2000 verdünnt in PBS-Tween + 10% Pferdeserum)
- Inkubation 1 h 37°C
- 3x3 min waschen mit PBS-Tween
- Auftragen von je 100 µl Substratlösung
- Inkubation 20 min bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß
- Abstoppen der Enzym-Substrat-Reaktion mit je 50 µl 4N H₂SO₄
 - Messung der Extinktion mit dem SLT-Reader bei einer Wellenlänge von 490 nm
-

Die Einstufung der Meßwerte erfolgte mittels des Diskriminierungswertes (cut off). Der cut off wurde als zweifacher Mittelwert aus den Extinktionen der Negativkontrollserien ermittelt. Eine Probe wurde dann als positiv bewertet, wenn ihr Extinktionswert mindestens den Wert des cut off betrug. Probenextinktionen, die das 1,5-fache des arithmetischen Mittels der Negativextinktionen betragen wurden als fraglich eingestuft.

Bei der Testung von ZKÜ der LKK auf ihren AG-Gehalt, entfielen die Arbeitsschritte 2 und 3, die unverdünnten Überstände wurden direkt auf die mit mAK beschichtete Platte aufgetragen. Mit konjugierten mAK wurde gebundenes AG nachgewiesen und mit Hilfe eines Standardseriens quantitativ bestimmt.

3.15. Western-Blot

Die Durchführung der Proteinelektrophorese erfolgte unter Verwendung der Vertikalelektrophoreseapparatur SE 600 (Fa. Biometra) und ihrer Zubehörteile.

3.15.1. Probenaufbereitung

Der Zellrasen von zweimal mit Phosphat-Puffer gespülten, gut abgetropften Müllerflaschen wurde mit 100 µl RIPA-Puffer lysiert, dreimal gefroren und getaut, mit einem Zellschaber zusammengekratzt und mit einer Pipette vereinzelt. In 1,7 ml Eppendorfreaktionsgefäßen erfolgte eine Zentrifugation für 4 min bei 14000 rpm (Tischzentrifuge). Der Überstand wurde mit Probenpuffer (2,5x) versetzt, der gesamte Ansatz 5 min bei 95°C gekocht und anschließend anzentrifugiert.

Bei der Untersuchung von LKK wurde das nach der Zentrifugation des Zellkulturüberstandes mit den in Suspension befindlichen Zellen gewonnene Pellet mit 100 µl RIPA-Puffer lysiert und anschließend mit Probenpuffer verdünnt.

3.15.2. Elektrophorese

Vor Beginn der Untersuchung wurden die Glasplatten mit Ethanol gereinigt, die Spacer dünn mit Cello Seal eingerieben und auf die untere Platte gelegt. Nach dem Auflegen der Deckplatte erfolgte das Feststellen der 1-2 mm über dem unteren Rand angebrachten Seitenklammern. Die Unterkante der Platten wurde dünn mit Cello Seal eingerieben und die Plattenkonstruktion in den Gelgießständer gestellt. Mit Sockelgel wurde bis auf eine Höhe von 1-2 cm ein Sockel gegossen. Nach dessen Polymerisation konnte Trenngel bis etwa 1 cm unterhalb der Kammtaschen aufgefüllt werden. Um ein gleichmäßiges Auspolymerisieren zu gewährleisten, wurde diese Gelschicht mit Wasser überdeckt, welches später mit Filterpapier abgesaugt werden konnte. Im Anschluß an das Einhängen der Kämme erfolgte das Gießen des Sammelgels, und nach der Polymerisation das Auftragen der Proben. Die Slots wurden vorsichtig mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt, der Elektrophoresetank aufgesetzt, die untere Elektrophoresekammer mit 1,5 l Anodenpuffer gefüllt und der Aufsatz mit den Gelen in die Elektrophoresekammer gehängt. Nach Auffüllen mit 750 ml Elektrophoresepuffer wurde für den Probenlauf im Sammelgel eine Spannung von 80 V, im Trenngel von 30 V angelegt.

Als Farbmarder diente der Rainbow coloured protein molecular weight marker 14.3-200 kD. Nach 16 h Lauf bei 30-35 V konnten die Gele entnommen, Sammel- und Sockelgel abgetrennt und Färbe- bzw. Transferschritte angeschlossen werden.

3.15.3. Elektrotransfer Semidry-Verfahren

Die der Größe des Blotters (Fa. Biometra) angepaßten Gele wurden in Transferpuffer eingelegt und 15 min im Taumler äquilibriert. PVDF-Membranen (ImmobilonTM-P-Membran) wurden 1-3 s in Methanol, 5-10 min in Aqua bidest. und 10-30 min in Transferpuffer getaucht (Taumler). Der Aufbau von Gel, Membran und Filter auf dem Blotter erfolgte nach dem Sandwichprinzip:

1. dickes Filter (0,3 mm)
2. dünnes Fiter (0,2 mm)
3. Polyacrylamidgel
4. PVDF-Membran
5. dünnes Filter
6. dickes Filter

Entsprechend der Gelgröße wurde eine Stromstärke von 1 mA/cm² eingestellt. Die Übertragungszeit betrug etwa 1,5 h.

3.15.4. Immunologischer Proteinnachweis mit der Tropix-Methode

Der immunologische Proteinnachweis erfolgte unter Zuhilfenahme des Western-Light Protein Detection Kit. Aus dem Blotter entnommene Membranen wurden für 2x5 min mit 80 ml Tropix-light Waschpuffer auf dem Schüttler gereinigt, 1 h mit 100 ml Blockingpuffer behandelt (Schüttler), auf einer Gaze aufgerollt und mit 8-10 ml entsprechender mAK-Verdünnung (1:1000 bei gp51, 1:2000 bei p24) für 1 h bei 35°C im Ofen hybridisiert. Nach Blockung der Reaktion mit 80 ml Blockingpuffer für 3x10 min erfolgte ein erneutes Aufrollen und die Zugabe von einem Zweitantikörper (Anti mouse conjugated with alkaline phophatase) in einer Verdünnung von 1:20000. Nach 30 min Hybridisierung wurde die Blockungsprozedur wiederholt und die Membran 2x5 min mit 50 ml Assaypuffer gewaschen und anschließend 5 min in CSPD-Substrat (1:200 in Assaypuffer) geschwenkt. Es folgte das Einpacken der Membran in Klinkfilm und das Einlegen mit einem Hyperfilm-ECL Film. Nach 20 s bis 30 min Belichtungszeit konnte der Film unter Sichtkontrolle entwickelt und ca. 15 min fixiert werden.

4. Ergebnisse

Alle im folgenden angegebenen Nukleotidpositionen beziehen sich, wenn nicht extra vermerkt, auf die von Sagata *et al.* (1985a) veröffentlichte BLV-Sequenz. Für Vergleiche und Strukturanalysen wurden die Computerprogramme DNASIS® und DNASIS® for Windows® verwandt.

4.1. BLV-Antikörperstatus von 37 untersuchten Rindern im Vergleich mit Ergebnissen aus dem BLV-Provirus Nachweis mittels PCR

Alle unter 3.1. vorgestellten Tiere wurden im ELISA auf BLV-Antikörper und mittels der *env*-PCR auf BLV-Provirus untersucht. Zusätzlich erfolgte die Kontrolle einzelner Probanden mittels AGID sowie LTR-, *pol*- und *tax*-PCR. Die Western-Blot-Ergebnisse der Leukozytenkurzzeitkulturen werden getrennt betrachtet (s. 4.7., S.94).

Die folgende Tabelle 13 zeigt die Gegenüberstellung von AGID-, ELISA- und PCR Ergebnissen. Anhand dieser Resultate erfolgte gleichzeitig eine Einteilung der Probanden in vier Gruppen. Das Auftreten unspezifischer Banden in der PCR ist durch in Klammersetzung hervorgehoben.

Tab.13: Einteilung von 37 Rindern in vier Gruppen anhand von ELISA-, AGID- und PCR-Ergebnissen zum Nachweis von BLV-Antikörpern bzw. BLV-Provirus

Tier-Nr.	AGID	ELISA	<i>env</i> -PCR	LTR-PCR	<i>pol</i> -PCR	<i>tax</i> -PCR
Gruppe 1: serologisch positive Provirussträger						
2	+	+	+	(+)	n.u.	n.u.
5	+	+	+	n.u.	n.u.	+
6	+	+	-	(+)	+	+
7	+	+	+	n.u.	-	+
44	+	+	+	n.u.	n.u.	n.u.
45	+	+	+	(+)	n.u.	n.u.
58	+	+	+	-	-	-
6869	+	+	+	(+)	+(+)	+
15313	+	+	+	(+)	+(+)	+
41335	+	+	+	(+)	+	+(+)
Gruppe 2: serologisch fragliche Provirussträger						
134	-	+/-*	+	(+)	-	-
159	-	+/-	+	(+)	n.u.	-
590	-	+/-	+	(+)	-	+

Fortsetzung :Tab. 13

Tier	AGID	ELISA	<i>env</i> -PCR	LTR-PCR	<i>pol</i> -PCR	<i>tax</i> -PCR
Gruppe 3: serologisch negative Provirussträger						
32	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.
68	-	-	+	(+)	+(+)	+
92	-	-	+	(+)	+	n.u.
145	n.u.	-	+	-	n.u.	-
149	n.u.	-	+	(+)	-	-
155	n.u.	-	+	-	n.u.	-
167	-	-	+	(+)	-	-
527	-	-	+	n.u.	n.u.	n.u.
574	-	-	+	(+)	+(+)	+(+)
615	n.u.	-	+	-	-	-
Gruppe 4: serologisch und Provirus negative Tiere						
4	-	-	-	n.u.	n.u.	-
153	n.u.	-	-	-	n.u.	-
216	n.u.	-	-	-	n.u.	-
237	n.u.	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
268	n.u.	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
273	n.u.	-	-	-	n.u.	-
282	n.u.	-	-	n.u.	n.u.	-
324	n.u.	-	-	-	n.u.	-
356	n.u.	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
370	n.u.	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
374	n.u.	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
376	n.u.	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
599	n.u.	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
607	n.u.	-	-	-	n.u.	-

+ : Provirus nachgewiesen

- : kein Provirus nachgewiesen

(+) : das entstandene Fragment wies nach Sequenzanalysen keine >40%ige Homologie mit bekannten BLV-Proviren auf

+(+) : es entstanden sowohl BLV spezifische als auch unspezifische Fragmente

* : die Untersuchung 1996 erbrachte eindeutig positive Befunde

n.u. : nicht untersucht

Die Tabelle 13 (s. S.59) zeigt, daß bei 10 der 37 untersuchten Rinder sowohl im AGID als auch ELISA BLV-AK nachgewiesen werden konnten. Die Tiere 134, 159 und 590 wiesen im AGID negative und im ELISA fragliche Ergebnisse auf. Mit Ausnahme des Tieres 6 konnte von allen serologisch positiven bzw. fraglichen Tieren mittels *env*-PCR BLV-Provirus nachgewiesen werden. 14 von 23 in der LTR-PCR untersuchten Rinder zeigten nach der Agarosegelelektrophorese LTR-Amplifikate in BLV-spezifischer Größe. In der nachfolgenden Sequenzanalyse erwies sich keines der LTR-Amplifikate als mit dem BLV komplementär. In der *pol*-PCR zeigten die Rinder 6, 68, 92, 574, 6869, 15313 und 41335 BLV-spezifische Fragmente. Die Rinder 4, 6, 7, 68, 574, 590, 6869, 15313 und 41335 mit einem positivem Ergebnis in der *tax*-PCR gehören, mit Ausnahme des Rindes 6, auch zu den in der *env*-PCR und serologisch positiven Tieren.

Die Tabelle 13 zeigt auch, daß 14 von 37 untersuchten Rindern weder BLV-AK noch BLV-Provirus aufwiesen (Gruppe 4). Jeweils 10 von 37 Rindern sind zur Gruppe der serologisch positiven (Gruppe 1) bzw. serologisch negativen (Gruppe 3) Provirussträger zuzuordnen. Da die Tiere 134, 159 und 590 im AGID negative und im ELISA fragliche Ergebnisse zeigten, ist ihr serologischer Status insgesamt als fraglich einzustufen. Sie gehören somit zur Gruppe 2 (s. Tab.13, S.59).

4.2. Vergleich unterschiedlicher Sequenzierungsmethoden

Die beschriebenen Sequenzierungsmethoden beruhen ausschließlich auf der von Sanger *et al.* (1977) publizierten Kettenabbruch-Methode.

Folgende Sequenzierungsmethoden kamen zur Anwendung:

- 1. Methode nach Sommer (1992)**
- 2. Hot Tub DNA-Sequencing**
- 3. T7-Sequencing**
- 4. AutoRead-Sequencing**

Um die vier verschiedenen Methoden miteinander vergleichen zu können, wurden die in Tabelle 14 beschriebenen Parameter: Zeitaufwand, Auswertbarkeit der Ergebnisse, Reproduzierbarkeit, universeller Primereinsatz, Anzahl der sequenzierten Basen, Kostenfaktor und radioaktive Gefährdung in einem Punktsystem von 1-5 bewertet.

Der genannte minimale Zeitaufwand berücksichtigt den Zeitpunkt vom Beginn der Sequenzreaktion bis zum Vorliegen des Ergebnisses.

Tab.14: Bewertung der die Sequenzierungsmethode beeinflussenden Parameter in einem Punktsystem mit den Punktwerten 1-5

Parameter	Punktwert 5	Punktwert 4	Punktwert 3	Punktwert 2	Punktwert 1
Zeitaufwand in h	<6	<12	< 18	<24	>24
Auswertbarkeit der Ergebnisse	absolut eindeutig	sehr eindeutig	eindeutig	wenig eindeutig	nicht eindeutig
Reproduzierbarkeit	generell möglich	meistens möglich	möglich	selten möglich	unmöglich
universeller Primereinsatz	generell möglich	meistens möglich	möglich	selten möglich	unmöglich
Anzahl der sequenzierten Basen in bp	>400	>300	>200	>100	<100
Kostenfaktor	sehr niedrig	niedrig	mittelmäßig	hoch	sehr hoch
radioaktive Gefährdung	keine	gering	mittelmäßig	relativ hoch	sehr hoch

Die o.g. Methoden: Methode nach Sommer, Hot *Tub* DNA Sequencing, T7-Sequencing und AutoRead-Sequencing werden in der folgenden Tabelle 15 entsprechend des in Tabelle 14 beschriebenen Punktsystems bewertet.

Tab.15: Bewertung von vier beschriebenen Sequenzierungsmethoden nach den angegebenen Parametern, unter Verwendung des in Tabelle 14 beschriebenen Punktsystems

Methode / Parameter	Methode nach Sommer	Hot <i>Tub</i> DNA-Sequencing	T7-Sequencing	AutoRead-Sequencing
Zeitaufwand	2	1	2	5
Auswertbarkeit der Ergebnisse	3	3	4	2
Reproduzierbarkeit	5	5	5	3
universeller Primereinsatz	3	2	4	3
Anzahl der sequenzierten Basen	4	4	5	3
Kostenfaktor	4	3	3	1
radioaktive Gefährdung	1	1	4	5
Gesamtpunktzahl	22	20	27	22

Die Tabelle 15 zeigt die Überlegenheit der Sequenzierungsmethode mit dem **T7-Sequencing** - System (Methode 3), sie wurde mit der Gesamtpunktzahl 27 bewertet. Außerdem bietet diese

Methode den Vorteil des universellen Primereinsatzes. Insgesamt ist das System gegenüber Temperatur- und Konzentrationsschwankungen weniger empfindlich. Der Reaktionsansatz kann entsprechend der Halbwertszeit der Radioaktivität bei -18°C gelagert werden. Ein mehrmaliges Auftragen, wie es bei fehlerhaftem Gellauf nötig sein kann, ist ohne Einbußen möglich. Die Verwendung von ^{35}S anstelle ^{32}P erleichtert durch die Entstehung klarerer, schmalere Banden die Auswertung des Röntgenfilmes. Ohnehin stellt radioaktiv markierter Schwefel ein geringeres gesundheitliches Risiko dar. Die längere Halbwertszeit ermöglicht eine flexiblere Arbeitseinteilung.

Dennoch bietet das **AutoRead-Sequencing-Verfahren** (Methode 4) mit einer Gesamtpunktzahl von 22 (s. Tab.15, S.62) verschiedene Vorzüge gegenüber den anderen Verfahren. Ein besonderer Vorteil besteht im geringeren Zeitaufwand und dem gänzlichen Verzicht auf radioaktive Substanzen. Diese Methode ist ideal für die Sequenzierung klonierter Fragmente mit kommerziellen Primern. Da diese Primer weit außerhalb des Multicloningsites binden (ca. 80-100 bp), kommt es zur Einschränkung der Anzahl sequenzierbarer Nukleotide. Jeder Reaktionsansatz muß sofort verwendet werden und wird daher nur für eine Auftragung angesetzt. Ein weiterer Nachteil ist der ungleich höhere Anschaffungspreis der Ausrüstung und der verwendeten Testkits.

Das **Hot Tub DNA-Sequencing-Verfahren** (Methode 2) erhielt die Gesamtpunktzahl 19. Es soll die Sequenzierung geringster DNA-Mengen ermöglichen. In eigenen Untersuchungen war ein Minimum von $0,25\ \mu\text{g}$ Ausgangs-DNA erforderlich. Für Routineuntersuchungen ist der finanzielle und zeitliche Mehraufwand, bei gleich hoher radioaktiver Gefährdung und gleichem quantitativem Ergebnis, gegenüber der Methode nach Sommer nicht gerechtfertigt.

Für die **Methode nach Sommer** (Methode 1) sind vielfältige Vorarbeiten erforderlich, da die benötigten Lösungen, sowie die dNTP- und ddNTP-Arbeitsmixe selbst hergestellt werden müssen. Damit steigt bei geringerem Kostenaufwand (Punktwert 4, s. Tab.15, S.62) der Zeit-, Organisations- und Gesamtkostenaufwand um ein Vielfaches.

Für die eigenen Untersuchungen erwies sich die Methode 3 als die geeignetste.

Die direkte Sequenzierung von PCR-Fragmenten ist sowohl hinsichtlich des geringen zeitlichen Aufwandes (der 2-3 Tage andauernde Klonierungsschritt entfällt) als auch wegen der hohen Spezifität der ermittelten Sequenz anzustreben. Sie wurde parallel zur Sequenzierung klonierter Fragmente durchgeführt. Zur Anwendung kamen dabei die Methoden: Hot Tub DNA-Sequencing und T7-Sequencing. Mittels direkter Sequenzierung konnten PCR-*env*-Fragmente der Tiere 6, 68, 134, 159 und 15313 sowie der FLK-BLV analysiert werden. Die Anzahl der sequenzierten Nukleotide lag mit maximal 230 bp deutlich unter den Ergebnissen, die mit klonierter DNA erzielt wurden. In eigenen Untersuchungen war diese Methode insbesondere bei Verwendung von hochkonzentriertem und hochgereinigtem PCR-Ausgangsmaterial erfolgreich (s. Abb.5b, S.64).

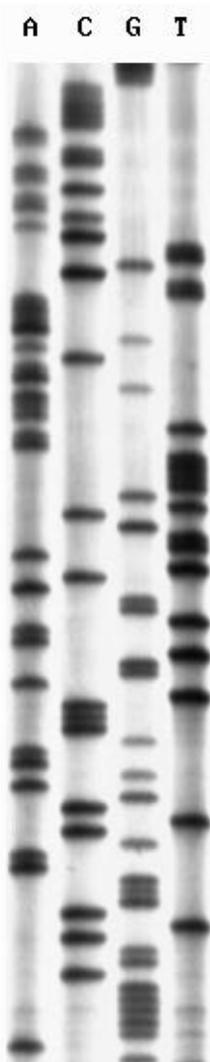


Abb.5a: Ausschnitt aus der *tax*-Sequenz der FLK-BLV (Ausgangsmaterial Fragment aus asymmetrischer PCR; Exposition auf Hyperfilm MP für 36 h)

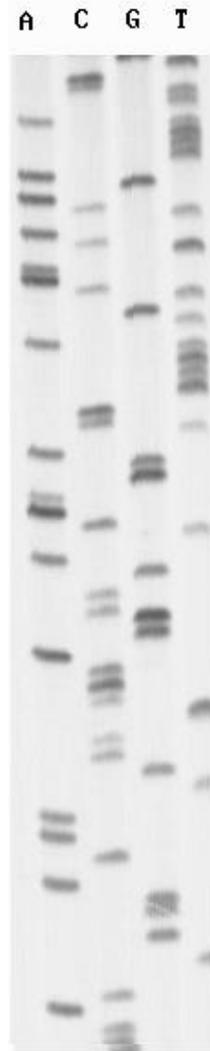


Abb.5b: Ausschnitt aus der *env*-Sequenz der FLK-BLV (Ausgangsmaterial PCR-Fragment; Exposition auf Hyperfilm β max für 18 h)

Die Sequenzierung einzelsträngiger PCR-Produkte (hergestellt durch asymmetrische PCR) erbrachte nur für einen Teil der Proben auswertbare Ergebnisse. Von den mit diesem Verfahren untersuchten LTR- und *tax*-Fragmenten der Tiere 68, 574, 6869 und der FLK-BLV konnte nur für die *tax*-Region der FLK-BLV eine über 400 bp deutlich lesbare Sequenz ermittelt werden (s. Abb.5a). Die Anzahl analysierter Nukleotide lag dabei deutlich über der Anzahl an Nukleotiden, die aus herkömmlichen ds-Fragmenten sequenziert werden konnten.

Die Nutzung einzelsträngiger Plasmid-DNA (s. 3.5., S.44) als Template ergab für die radioaktive Sequenzierung mit den Methoden 1 und 2 keinerlei Vorteile gegenüber der Verwendung von ds-Plasmid-DNA.

Einen besonderen Einfluß auf die Auswertbarkeit der Autoradiographien hatte das verwendete **Filmmaterial**. Die besten Ergebnisse wurden mit dem **Hyperfilm- β max** erzielt. Dieser Film ermöglichte bei relativ kurzer Expositionszeit (18 h bei Verwendung von S^{35} , 12 h bei P^{32}) die

Entstehung schmaler kräftiger Banden und verhinderte die Schwärzung des Hintergrundes durch Streustrahlung (s. Abb.5a und 5b, S.64).

4.3. Untersuchung der LTR-Region des BLV

Für die folgenden Ausführungen gelten nachstehende Bezeichnungen bzw. deren Abkürzungen:

Quelle der Sequenz	Bezeichnung des Isolates)	Abkürzung
Sagata <i>et al.</i> (1985)	japanisches	JAP
Rice <i>et al.</i> (1984,1985)	belgisches	BEL
Coulsten <i>et al.</i> (1990)	australisches	AST
Mamoun <i>et al.</i> (1990)	FLKM	M1
Mamoun <i>et al.</i> (1990)	LB59	M2
Mamoun <i>et al.</i> (1990)	LB285	M3

4.3.1. PCR der BLV-LTR Region

Die Synthese von LTR-Fragmenten erfolgte unter Verwendung der Primerpaare LTR_{1/506i}, LTR_{42/304i} und LTR_{42/478i} als einfache, doppelte bzw. nested PCR (s. 3.12., S.52). Die Ergebnisse unter Verwendung des Primerpaares LTR_{1/506i} nach 40 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 58°C sind in Abbildung 6 dargestellt. Als Marker (M) wurde die **1 kb Leiter** verwendet.

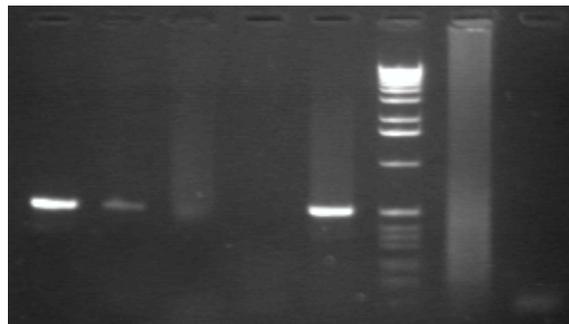


Abb.6: LTR-PCR mit Primerpaar LTR_{1/506i} nach 40 Zyklen, Spur 1: Tier 68; Spur 2: Tier 6869; Spur 3: Tier 159; Spur 4: Tier 58; Spur 5: Tier 15313; Spur 6: Negativkontrolle, DNA aus Heringssperma; Spur 7: Aqua bidest.

Die Proviren der Tiere **68**, **6869** und **15313** (Spuren 1, 2 und 5) wiesen die nach Verwendung des Primerpaares LTR_{1/506i} in einer Größe von 520 bp erwartete Bande auf. Die Tiere 159 und 58 (Spuren 3 und 4) zeigten dagegen kein spezifisches Amplifikat. Eine anschließende Nested-PCR mit dem Primerpaar LTR_{42/304i} (40 Zyklen, bei 58°C) führte zur Entstehung von Banden in einer Größe von ca. 350 bp bei den untersuchten Tieren. Zusätzlich erschienen beim Tier 6869 schwache Banden im Bereich von Np 500-1700 bp. Den Tieren 68, 6869 und 15313 analoge Ergebnisse zeigten die BLV-Proviren der Tiere **134**, **149**, **574** und **590**.

4.3.2. Restriktionsenzymanalysen klonierter BLV-LTR Fragmente

Die isolierten 520 bp-Fragmente der Tiere 68, 149, 574 und 15313 (Primerpaar LTR_{1/506i}) sowie 8 µl des Reaktionsansatzes der Tiere 574 und 134 aus der PCR mit Primerpaar LTR_{42/304i} wurden mit dem pGemT-Vektor ligiert. Aus dem Restriktionsmuster des japanischen Isolates abgeleitete Bandengrößen nach Spaltung der klonierten Amplifikate bzw. des Vektors ohne Insert zeigt Tabelle 16.

Tab.16: Nukleotidposition der Spaltorte verschiedener Restriktionsenzyme (abgeleitet aus dem Restriktionsmuster des japanischen Isolates) in LTR-Amplifikaten (synthetisiert mit den Primern LTR_{42/304i} und LTR_{1/506i}) sowie im pGemT-Vektor und daraus berechnete Spaltfragmentgrößen

Enzym	Np der Spaltorte		entstehende Spaltfragmente in bp			
	Provirus	Vektor	Primerpaar 42/304i		Primerpaar 1/506i	
			mit Insert	ohne Insert	mit Insert	ohne Insert
<i>Pst</i> I	-	73	3270	3000	3520	3000
<i>Dra</i> I	-	1261,1280, 1972	n.u.	n.u.	2820/700	2300/700
<i>Bgl</i> II	-	39, 1515, 2836	1760/1320/200	1480/1320/200	n.u.	n.u.
<i>Pvu</i> II	61, 86	326, 2893	2570/500/ 210	2550/450	n.u.	n.u.

Jede Minipräparations-DNA wurde zuerst mit *Pst*I gespalten. Zeigten sich Bandengrößen von 3270 bzw. 3520 bp folgten weitere Spaltungen. Die Ergebnisse der Restriktionsenzymanalysen mit *Dra*I zeigen die Abbildungen 7a-b. Klone aus der Ligation des 520 bp großen LTR-Fragmentes in den Spuren 2, 4 (Tier **149**, s. Abb.7a) und 7 (Tier **574**, s. Abb.7b) wiesen die erwarteten Banden in einer Größe von 2800 und 700 bp auf. Klone in den Spuren 1 und 5 (s. Abb.7a) sowie 6 (s. Abb.7b) zeigten ein eindeutig negatives Spaltmuster. Der Klon in Spur 3 (s. Abb.7a) dagegen hatte neben dem negativem Restriktionsmuster zusätzliche Banden in einer Größe von bei 1300 und 6000 bp. Unter jeweils 36 Klonen, die aus dem Ligationsansatz der Tiere 68, 6869 und 15313 stammten, erwies sich keiner als inserthaltig.

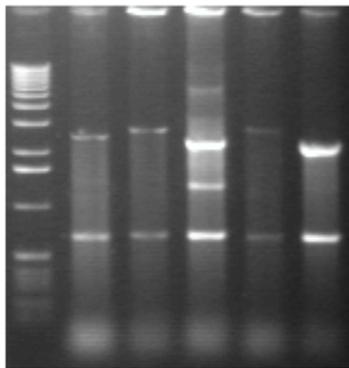


Abb.: 7a (Erläuterung S. 67)

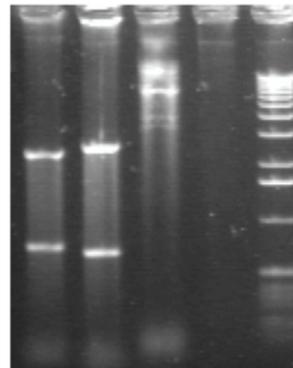


Abb.: 7b (Erläuterung S. 67)

Abb.7a und 7b: *DraI*-Spaltergebnisse 520 bp großer, mit dem pGemT-Vektor ligierter BLV-LTR-Fragmente (Primerpaar LTR_{1/506i}), Spuren 1, 3, 5 und 6: Klone ohne Insert bzw. mit nicht erwarteten Bandenmustern, Spur 2: Klon des Tieres 149 mit Insert, Spuren 4 und 7: inserthaltige Klone des Tieres 574, Spuren 8 und 9: ungespaltene Klone

Die Ergebnisse der Analysen klonierter, mit den Enzymen *PstI*, *PvuII* und *BglII* gespaltener, 270 bp großer Fragmente (aus PCR mit Primerpaar LTR_{42/304i}) der Tiere **134** und **574** zeigen die Abbildungen 8 a-c.

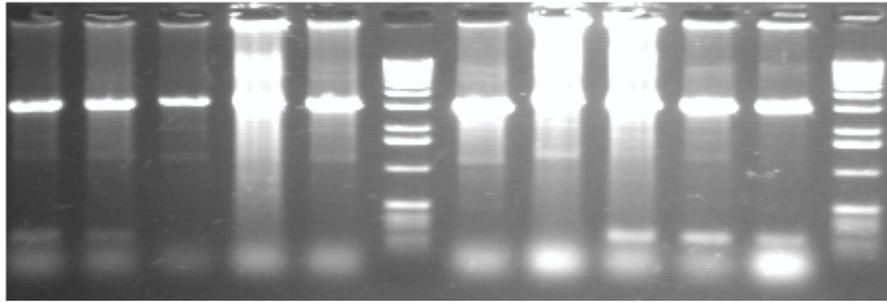


Abb.8a: *PstI*-Spaltergebnisse 270 bp großer, mit dem pGemT-Vektor ligierter BLV-LTR-Fragmente (Primerpaar LTR_{42/304i}), Spuren 1, 2, 8, 9 und 10: inserthaltige Klone des Tieres 574; Spuren 3, 4 und 7 inserthaltige Klone des Tieres 134; Spur 5: Klon mit 100 bp Insert; Spur 6: Klon ohne Insert

Die *PstI*-Spaltung (Abb.8a) wies in den Spuren 1, 2 und 8-10 (alle Klone des Tieres 574) Banden in einer Größe von 3000 und ca. 270 bp auf. Die Klone des Tieres 134 in den Spuren 3, 4 und 7 hingegen zeigten die erwartete Bande in einer Größe von ca. 3270 bp. Das *PstI*-Spaltfragment in den Spuren 5 und 6 hatte eine Größe von ca. 3100 bzw. 3000 bp. Der Klon in Spur 6 enthält damit kein Insert.

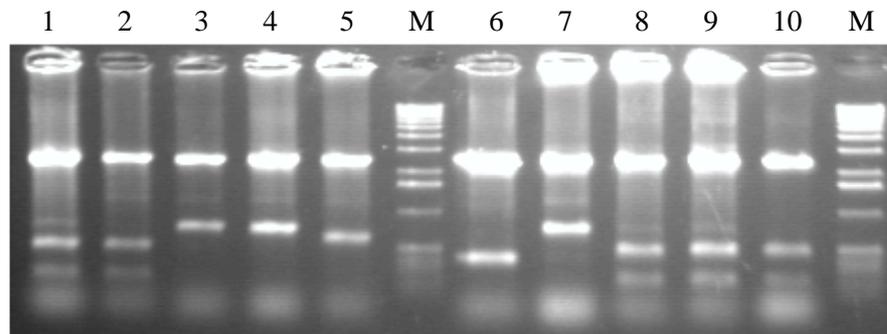


Abb.8b: *PvuII*-Spaltergebnisse 270 bp großer, mit dem pGemT-Vektor ligierter BLV-LTR-Fragmente (Primerpaar LTR_{42/304i}), Spuren 1, 2, 8, 9 und 10: inserthaltige Klone des Tieres 574; Spuren 3, 4 und 7 inserthaltige Klone des Tieres 134; Spur 5: Klon mit 100 bp Insert; Spur 6: Klon ohne Insert

Die Klone in den Spuren 1, 2 sowie 8-10 (Tier 574) zeigten, wie nach dem Restriktionsmuster des japanischen Isolats erwartet (s. Tab.16, S.66), Banden in einer Größe von ca. 210, 500 und 2570 bp. Den Klonen in den Spuren 3, 4 und 7 (Tier 134) fehlte der *PvuII*-Spaltort im LTR-Fragment. Dadurch kam es zur Entstehung von nur zwei Banden in einer Größe von ca. 2570 und ca. 700 bp.

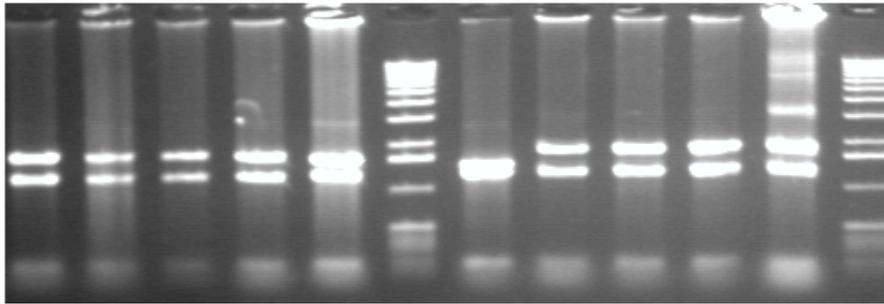


Abb.8c: *BglI*-Spaltergebnisse 270 bp großer, mit dem pGemT-Vektor ligierter BLV-LTR-Fragmente (Primerpaar LTR_{42/304i}), Spuren 1,2,8,9 und 10: inserthaltige Klone des Tieres 574; Spuren 3, 4 und 7 inserthaltige Klone des Tieres 134; Spuren 5: Klon mit 100 bp Insert; Spur 6: Klon ohne Insert

Die Klone in den Spuren 7 (Tier 134) sowie 8-10 (Tier 574) wiesen für die *BglI*-Spaltung erwarteten Banden in einer Größe von 1750, 1320 und 220 bp auf (s. Tab.16, S.66). Bei einem Klon des Tieres 574 (Spur 10) entstand zusätzlich eine Bande in einer Größe von ca. 3280 bp. Während der Klon in Spur 6 eindeutig negativ war, das heißt ohne Insert vorlag, enthielt der Klon in Spur 5 ein Insert von ca. 100 bp Größe.

4.3.3. Sequenzierung von BLV-LTR Fragmenten

Die Sequenzierung klonierter LTR-Fragmente erfolgte sowohl mit PCR-Primern als auch mit den Sequenzprimern der pUC/M13-Serie sowie mit dem SP6- und T7-Promotor (s. 3.11.1., S.49). Um die Spezifität der Primer LTR₁ und LTR_{506i} für die Sequenzanalyse des BLV-Genoms zu kontrollieren und optimale Reaktionsbedingungen zu erstellen, wurden diese Oligonukleotide am U1-Klon getestet. Dieser Klon enthält ein LTR/*gag*-Fragment des Humboldt-Klons (s. 3.1.2., S.37). Die Autoradiographie des mit dem Primer LTR₁ und LTR_{506i} getesteten U1-Klons ergab saubere, in einem Bereich von Np 60-450 bp gut lesbare Sequenzen, die bis auf Substitutionen an den Np 216 und 315 mit dem japanischen Klon übereinstimmten. In Abbildung 9 (s. S.69) ist die RNA-Sekundärstruktur der BLV-LTR von Np 170-440 dargestellt. Die Pfeile kennzeichnen die Nukleotidabweichungen der FLK-BLV zum japanischen Isolat. Es ist zu erkennen, daß die veränderten Nukleotide für die Ausbildung der Sekundärstruktur nicht (Np 216) bzw. wenig (Np 315) bedeutsam sind.

Zusätzlich erfolgte eine Sequenzierung des *gag*-Bereiches dieses Klons von der Np 1097-1897 mit den Primern *gag*₁₀₂₇ und *gag*_{1858i}. Der Vergleich der ermittelten Sequenz mit dem japanischen Isolat ergab Nukleotidsubstitutionen des Triplets an der Np 1204-1206 (in Übereinstimmung mit dem australischen Isolat) sowie an den Np 1314 und 1342.

Die Sequenzierung des 270 bp LTR-Fragmentes (amplifiziert mit dem Primerpaar LTR_{42/304i}) der Tiere 134 und 574 mit dem PCR-Primer LTR₄₂ erbrachte eine über 200 bp gut lesbare, jedoch mit der BLV-LTR bekannter Isolate nicht übereinstimmende Sequenz. Die aus den Analysen unter Verwendung der Sequenzprimer M13fw short und Promotor Sp6 ermittelten Sequenzen ließen sich, bis auf die ersten 19 bp, welche dem Primer LTR_{304i} entsprechen (s.

Abb.10a, S.70, Primer LTR_{304i} ist fett und kursiv gekennzeichnet), weder einem der bekannten BLV-Isolate noch dem BIV und der RSV-LTR zuordnen.

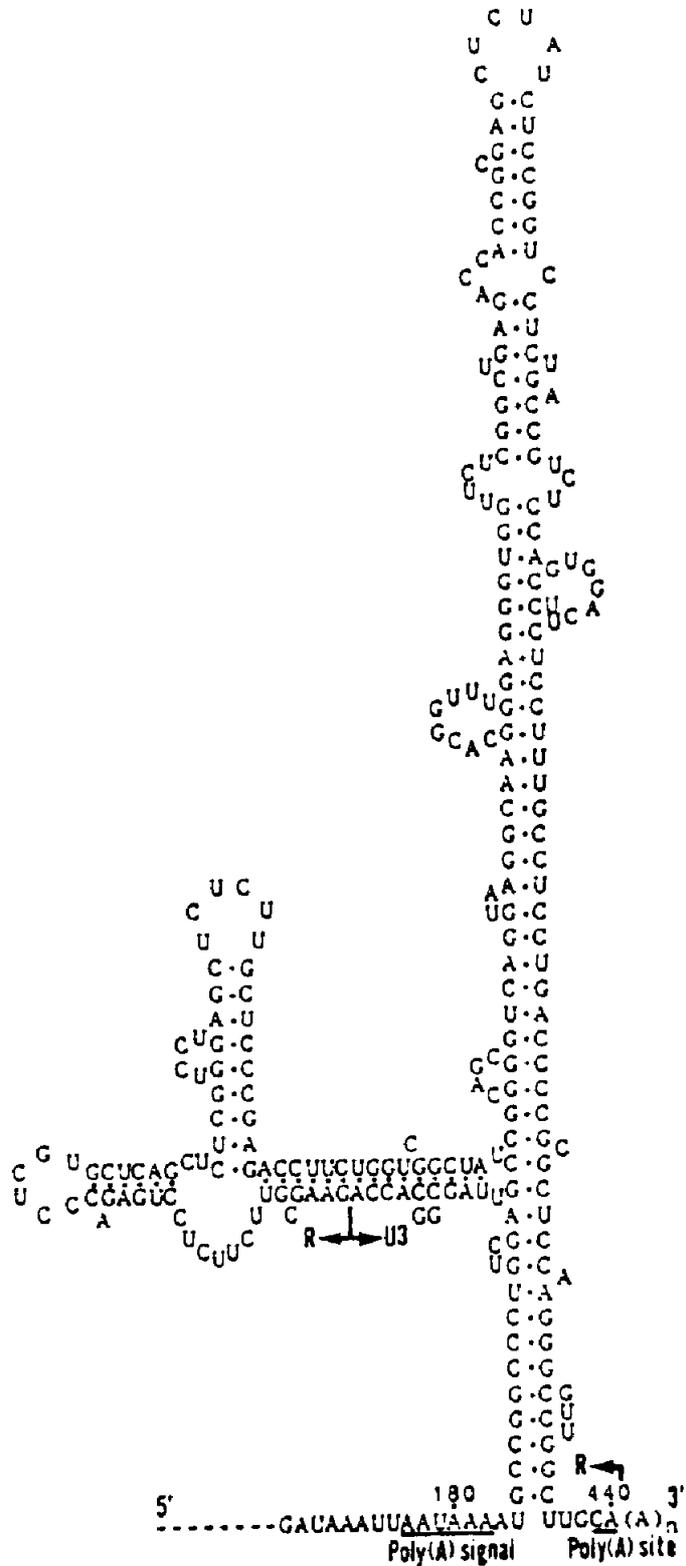


Abb.9: RNA-Sekundärstruktur der BLV-LTR im Bereich von Np 170 bis 440 (sogenannte Haarnadelstruktur; nach Sagata *et al.*, 1984a); die Pfeile kennzeichnen die Nukleotidabweichungen der untersuchten FLK-BLV zum japanischen Isolat

Np 322	Np 304
<i>ACCGTGCTTGCCTTACCT</i> TATACTCAGGGTGAAATAGAGGCAGAGGATGGATTGGG	
TTTAAGAATACAGATCTGGGATTGACACATATAGACTATTCGACTATT	

Abb.10a: 100 Nukleotide aus der LTR-Sequenz des Tieres 574; Primer LTR_{304i} ist kursiv und fett dargestellt

Die klonierten 520 bp Fragmente der Tiere 149 und 574 wurden mit den Primern LTR₁, LTR_{506i} und LTR_{478i} (als internem Primer) sequenziert. Die Analyse unter Verwendung des Primers LTR₁ ergab eine eindeutig lesbare, aber weder mit dem BLV noch mit BIV oder der RSV-LTR homologe Sequenz (s. Abb.10b).

TTATGGA	ACTATGGT	CTTGAG	CCAACCC	GGTAAG	ACACG	ACTTGAT	GCACAG	CTA
GGCAGG	CAAGCC	ACTGGA	ACAGG					

Abb.10b: 75 Nukleotide aus der Sequenzierung des Tieres 574 mit dem Primer LTR₁

Bei Verwendung des Primers LTR_{506i} entstanden nicht auswertbare Sequenzen. Die Autoradiographien erschienen wie Überlagerungen mehrerer Sequenzen. Dieses Ergebnis deutet auf einen Mischklon hin. Einen Ausschnitt der ca. 80 bp hinter dem genannten Primer beginnenden BLV-Sequenz des Tieres 574 zeigt die Abbildung 11.

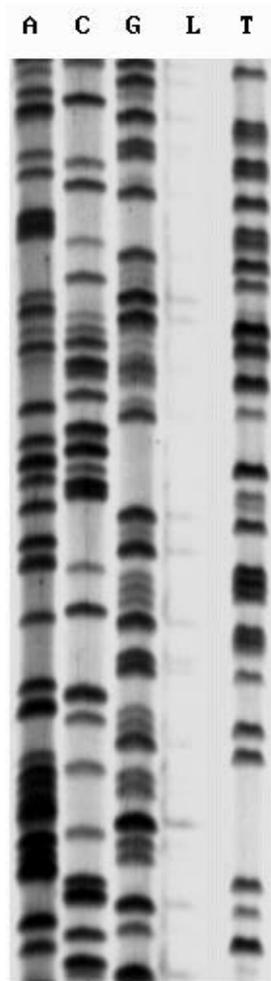


Abb.11: Autoradiographie der BLV-LTR Sequenz des Tieres 574 nach Sequenzierung mit dem Primer LTR_{506i} (L: Leerspür)

Die in Abbildung 11 (s. S.70) dargestellte Sequenz konnte nicht ausgewertet werden, Da sich Banden auf gleicher Höhe nebeneinander in mehreren Spuren befanden.

4.4. Untersuchung der *env*-Region des BLV

Für Untersuchungen der *env*-Region des BLV wurden mittels PCR bzw. Nested-PCR Fragmente aus dem Bereich von Np 5099 bis 5542 des BLV amplifiziert und anschließend sequenziert. Die BLV-*env*-Fragmente der Tiere 2, 7, 45, 68, 134, 159, 167, 574, 6869, 15313, 41335 sowie der FLK-BLV 44 konnten teilweise direkt und zusätzlich nach Klonierung in den pGemT-Vektor analysiert werden. Die Sequenzierung eines weiteren FLK-BLV 44 Amplifikates (amplifiziert unter Verwendung der PCR-Primer *pol*₄₈₁₀ und *NCR*_{6410i}) erfolgte im Bereich von Np 4810-5099 und 6209-6410. Als Vergleichsmöglichkeiten für eigene Untersuchungsergebnisse standen die von Rice *et al.* (1984), Sagata *et al.* (1985), Coulston *et al.* (1990) und Mamoun *et al.* (1990) veröffentlichten BLV-Sequenzen zur Verfügung.

Die *env*-Fragmente mehrerer Klone eines Tieres waren, mit Ausnahme der Klone 14 und 18 des Tieres 68, identisch. In den folgenden Ausführungen werden diese Klone als 68-14 und 68-18 bezeichnet.

4.4.1. Restriktionsenzymanalyse klonierter und nicht klonierter PCR *env*-Fragmente

Angaben über die Position der Spaltorte verschiedener Restriktionsenzyme im *env*-Fragment (Np 5099-5542) und pGemT-Vektor (Größe: 3003 bp) sowie rein rechnerisch ermittelte Fragmentgrößen sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tab.17: Nukleotidpositionen der Spaltorte im *env*-Bereich (Np 5099-5542) verschiedener Restriktionsenzyme im japanischen, belgischen und australischen BLV-Isolat sowie im pGemT-Vektor und daraus berechnete Fragmentgrößen klonierter *env*-Amplifikate

Enzym	Np der Spaltorte im Provirus und pGemT-Vektor				entstehende Spaltfragmente in bp		
	JAP	BEL	AST	pGemT	JAP	BEL	AST
<i>Bam</i> HI	5226	-	5227	-	3447	-	3447
<i>Bcl</i> II*	5219, 5323	5323	5324	-	104, 120, 219	222, 224	220, 224
<i>Dra</i> I	5425	5425	5426	1261, 1280, 1972	20, 692, 1328 (1200), 1407 (1535)	20, 692, 1328 (1200), 1407 (1535)	20, 692, 1329 (1201), 1406 (1534)
<i>Pvu</i> II	-	5378	-	326, 2893	880, 2567	440(553), 439(326), 2567	880, 2567
<i>Pst</i> I	-	-	-	73	3547	3547	3547

-: kein Spaltort

*: die Angabe zu *Bcl*II gelten für das unklonierte PCR-Fragment (5099-5542)

Die in Klammern stehenden Fragmentgrößen ergaben sich bei inversem Einbau des Insertes.

Die folgenden Bilder (s. Abb. 12-15, S.72-73) zeigen einige ausgewählte, in den pGemT-Vektor klonierte und mit unterschiedlichen Enzymen gespaltene *env*-Fragmente (5099-5542) der Tiere 167 und 41335.

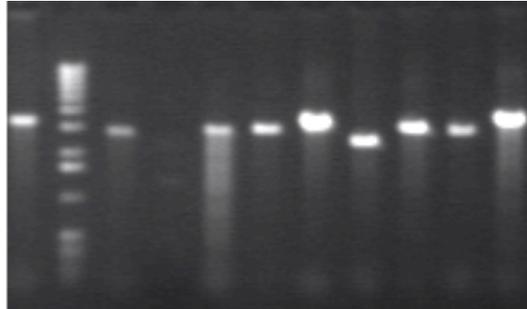


Abb.12: *PstI*-Spaltung in den pGemT-Vektor ligierter PCR-*env*-Fragmente (Np 5099-5542); Spur 1: inserthaltiger Klon des Tieres 41335; Spuren 6 und 10: inserthaltige Klone des Tieres 167; Spuren 2, 4, 5, 8 und 9: Vektor ohne Insert; Spur 3: leer; Spur 7: bei 2500 bp linearisierter Vektor

Die *PstI*-Spaltung (Abb. 12) in den Spuren 1 (inserthaltiger Klon des Tieres 41335) sowie 6 und 10 (inserthaltige Klone des Tieres 167) ergab eine Linearisierung des gespaltenen, inserthaltigen Vektors bei 3547 bp.

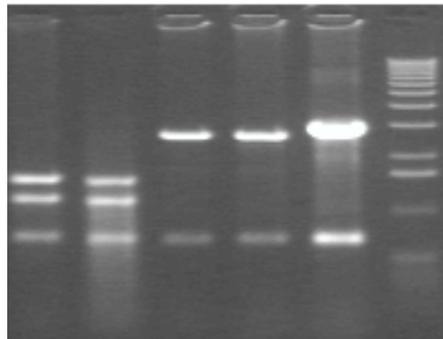


Abb.13: *DraI*-Spaltung in den pGemT-Vektor ligierter PCR-*env*-Fragmente (Np 5099-5542); Spuren 1 und 2: inserthaltige Klone des Tieres 167; Spuren 3, 4 und 5: inserthaltige Klone des Tieres 41335

Abweichend zu den in Tabelle 17 angegebenen Erwartungen zeigt sich das *DraI*-Spaltmuster des Tieres **41335**. In Abbildung 13 (Spuren 3-5) ist ersichtlich, daß nur zwei Fragmente (Größe ca. 700 und 2700 bp) entstehen, was auf ein Fehlen des Spaltortes an der Np 5425 und damit ein Erhaltenbleiben des 2700 bp Fragmentes anstelle der Zerlegung in 1500 und 1200 bp Fragmente schließen läßt. Im Gegensatz dazu sind bei den Klonen in den Spuren 1-2 (Tier **167**) die drei in Tabelle 17 (s. S.71) dargestellten Spaltprodukte in der Größe von 700, 1200 und 1500 bp erkennbar.

Das Ergebnis der Restriktion des Provirus des Tieres **41335** (s. Abb.14a, S.73) mit dem Enzym *PvuII* zeigt in den Spuren 1, 4 und 6 die Entstehung von drei Fragmenten (Größe 2570, 550

und 330 bp) und damit das Vorhandensein des nur für das belgische Isolat beschriebenen *PvuII*-Spaltortes an Position 5378. Die inserthaltigen Klone des Probanden **167** (s. Abb.14b) spalteten, wie nach dem Restriktionsmuster des japanischen Isolates erwartet (s. Tab.17, S.71), in Fragmente von 880 und 2567 bp Größe.

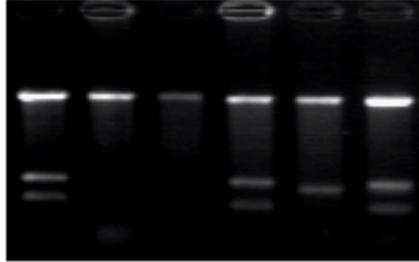


Abb.14a: *PvuII*-Spaltung von Klonen des Tieres 41335 nach Ligation des pGemT-Vektors mit dem PCR *env*-Fragment (Np 5099-5542); Spuren 1, 4 und 6: inserthaltige Klone; Spur 5: Klon ohne Insert; Spuren 2 und 3: deletierter Vektor

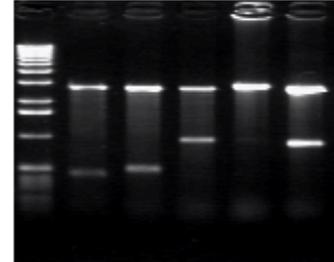


Abb.14b: *PvuII*-Spaltung von Klonen des Tieres 167 nach Ligation des pGemT-Vektors mit dem PCR *env*-Fragment (Np 5099-5542); Spuren 3 und 5: inserthaltige Klone; Spuren 1, 2 und 4: Klone ohne bzw. mit unspezifischem Insert

Ein dem *PvuII*-Spaltbild des Tieres 41335 analoges Muster zeigten die Provirus tragenden Tiere **6869** und **15313**. Die BLV-Proviren der Probanden **2, 45, 68, 134** und **574** stimmten in ihrem *PvuII*-Spaltmuster mit dem des Tieres 167 überein.

Die folgende Abbildung 15 zeigt das Ergebnis einer *BclI*-Spaltung des PCR-*env*-Fragmentes (Np 5099-5542) der BLV-Proviren der Tiere 159, 167, 615 und 41335.

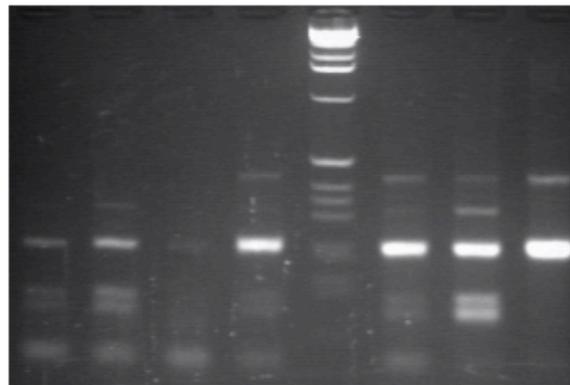


Abb.15: *BclI*-Spaltung der nichtklonierten *env*-PCR-Fragmente (Np 5099-5542) Spuren 1 und 4: Tier 159; Spuren 2 und 5: Tier 167; Spuren 3 und 6: Tier 615; Spur 7: Tier 41335

Die *BclI*-Spaltung des BLV *env*-Fragmentes (Np 5099-5542) des Tieres **41335** (Spur 7) zeigt das Fehlen des *BclI*-Spaltortes an Np 5219 (s. Abb.15). Die Entstehung einer Doppelbande in einer Größe von 220 bp verdeutlicht die Übereinstimmung dieses Spaltergebnisses mit dem des belgischen Isolates (s. Tab.17, S.71). Das Spaltmuster (Banden in einer Größe von 104, 120 und 219 bp) des PCR-*env*-Fragmentes (Np 5099-5542) der Tiere **167** (Spuren 2 und 5), **159**

(Spuren 1 und 4) sowie **615** (Spuren 3 und 6) stimmt mit dem des japanischen Isolats überein (s. Tab.17, S.71).

Dem Nachweis der Übereinstimmung von ermittelten Spalt- und Sequenzierungsergebnissen für die *BclI*-, *DraI*- und *PvuII*-Spaltprodukte dient die nachfolgende Tabelle 18. Von besonderem Interesse erschien der *BclI*-Spaltort an der Np 5219, der *DraI*-Spaltort an der Np 5425 und der *PvuII*-Spaltort an der Np 5378. Die Erkennungssequenz des Enzyms und die Sequenz der beschriebenen bzw. untersuchten Isolate sind gegenübergestellt. Der Spaltort selbst ist durch (*) gekennzeichnet.

Tab.18: Gegenüberstellung der Erkennungssequenz verschiedener Enzyme mit der Nukeotidsequenz der BLV-Provirusisolate der Tiere 167 und 41335

Erkennungssequenz des Enzyms	<i>BclI</i> Np 5219-5224	<i>DraI</i> Np 5423-5428	<i>PvuII</i> Np 5376-5381
Sequenz des Isolates	T*GATCA	TTT*AAA	CAG*CTG
JAP	T*GATCA	TTT*AAA	CAGTTG
BEL	CGATCA	TTT*AAA	CAG*CTG
41335	CGATCA	TTTTAA	CAG*CTG
167	T*GATCA	TTT*AAA	CAGTTG

Die Homologie von Spalt- und Provirussequenz ist für das Tier 41335 an den Np 5219 und 5426 nicht gewährleistet, was ein Ausbleiben der *BclI*- (s. Abb.15, S.73) und *DraI*-Spaltung (s. Abb.13, S.72) erklärt. Ebenso erklärt die von der Erkennungssequenz des Enzyms *PvuII* abweichende Nukleotidfolge des japanischen Isolates und des Tieres 167 an der Np 5379 ein Ausbleiben der erwarteten *PvuII*-Spaltung beider Isolate (Tier 167, Spuren 3 und 5, s. Abb.14b, S.73).

4.4.2. Darstellung der DNA-Sequenzierungsergebnissen und Vergleich der ermittelten *env*-Sequenz untersuchter Proviren mit der bekannter BLV-Isolate

Die DNA Sequenzen des analysierten *env*-Bereiches der verschiedenen Isolate (BLV-Provirus tragende Rinder bzw. BLV-FLK) wurden im Anhang 9.1. (s. S.154) den aus der Literatur bekannten Sequenzen (japanisches, belgisches und australisches Isolat) gegenübergestellt.

Die Tabelle 19 (S.75) gibt die Positionen der Nukleotidabweichungen nach Vergleich mit dem japanischen Isolat an. Alle bekannten Isolate besitzen eine Abweichung an der Np 5183. Die BLV-*env*-Sequenz der Tiere 7, 68 (Klon 14), 159, 167 und 574 stimmt vollständig überein. Die BLV-Proviren der Tiere 2, 6869 und 41335 besitzen zehn identische Nukleotidabweichungen zum japanischen Isolat. Diese drei Probanden weisen zusätzlich hohe Sequenzgemeinschaften mit dem Tier 15313 auf.

Die Anzahl der Basenabweichungen beim gegenseitigen Vergleich verschiedener BLV Isolate in der *env*-Region (Np 5099-5542) ist in Tabelle 20 (s. S.76) sowie Abbildung 16 (s. S.77) dargestellt.

Tab.19: Nukleotidpositionen von DNA-Sequenzabweichungen im *env*-Bereich von Np 5099-5442 verschiedener BLV-Proviren in Bezug zum japanischen Isolat

Isolat	Nukleotidposition																	x
	5182	5183	5219	5228	5265	5267	5303	5345	5346	5372	5375	5379	5429	5435	5523	5524	5537	
BEL	+	+	+	+			+	+	+#	+	+	+		+	+		+	
AST		+	+															1
M1		+	+			+							+					
M2	+	+	+	+			+	+		+	+	+		+#		+	+	3
M3	+	+	+	+			+	+		+	+	+		+			+	2
FLK		+	+			+							+					
2	+	+	+				+	+			+	+		+				2
7*		+																
45		+	+			+							+					
68-14		+																
68-18		+																1
134		+	+		+	+												
159*		+																
167		+																
574		+																
6869	+	+	+	+			+	+		+	+	+		+				
15313	+	+					+	+#	+	+	+	+		+				1
41335	+	+	+	+	+#		+	+		+	+	+		+				2

*: Tiere wurden im angegebenen Bereich nicht vollständig sequenziert

x: Anzahl weiterer Abweichungen im Untersuchungsbereich

#: Np der Veränderung weicht um +/- 2 bp ab

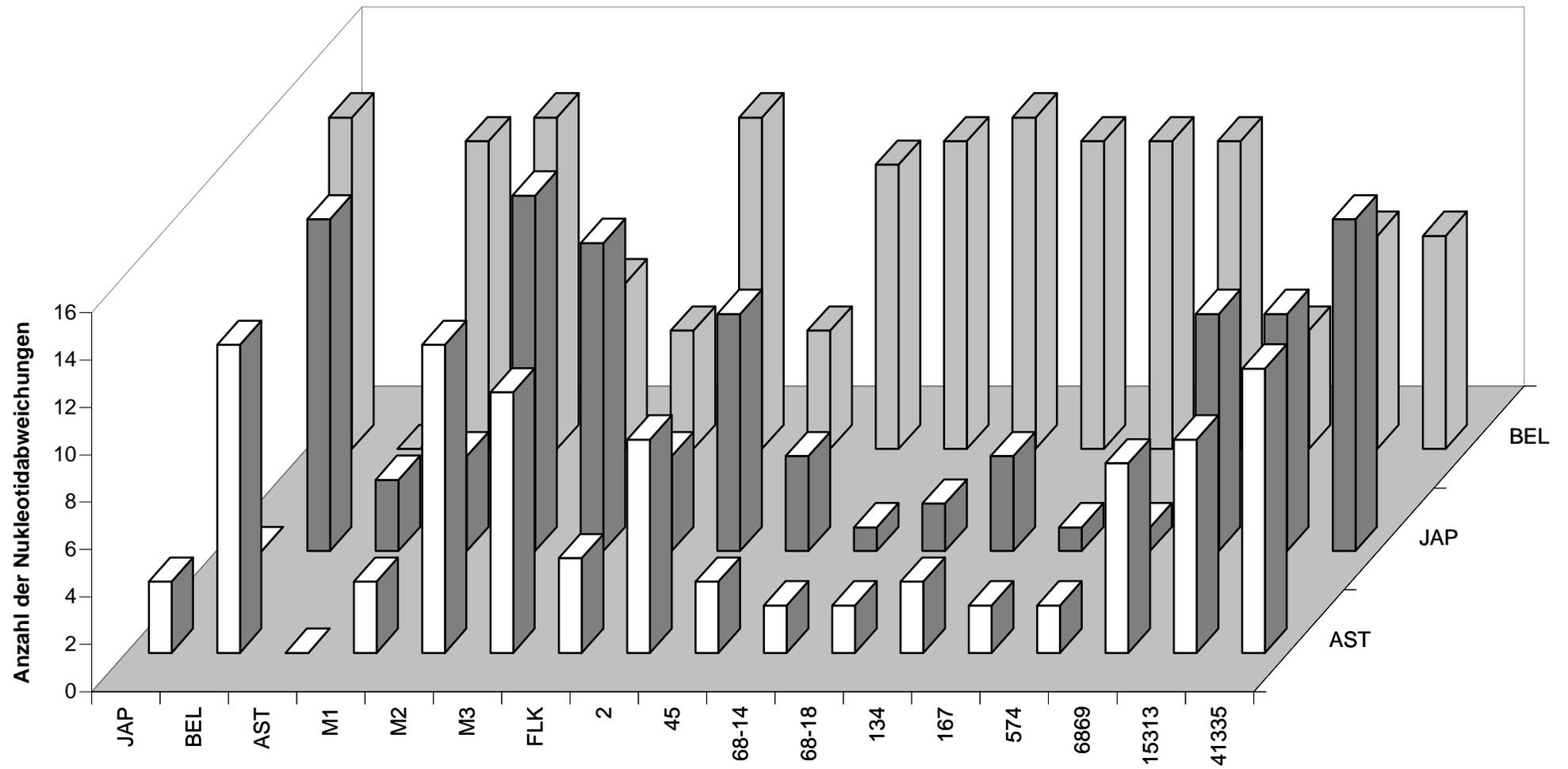
Tab.20: Anzahl der DNA-Sequenzabweichungen im Vergleich der *env*-Fragmente (Np 5099-5442) verschiedener BLV-Provirus-Isolate

Isolat	JAP	BEL	AST	M1	M2	M3	FLK	2	7*	45	68-14	68-18	134	159*	167	574	6869	15313	41335
JAP	-	14	3	4	15	13	4	10	1	4	1	2	4	1	1	1	10	10	14
BEL	14	-	13	14	7	5	14	6	-	12	13	14	13	-	13	13	5	9	9
AST	3	13	-	3	13	11	4	9	-	3	2	3	3	-	2	2	8	9	12
M1	4	14	3	-	14	12	-	10	1	-	3	4	2	-	3	3	9	11	12
M2	15	7	13	14	-	6	15	9	1	15	14	15	15	1	14	14	5	11	9
M3	13	5	11	12	6	-	12	8	1	13	12	13	13	1	12	12	3	9	8
FLK	4	14	4	-	15	12	-	10	-	-	2	3	2	-	3	3	10	9	13
2	10	5	9	10	9	8	10	-	1	10	9	10	10	1	9	9	4	7	8
7*	1	-	-	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1
45	4	12	3	-	15	13	-	10	-	-	3	4	2	-	3	3	10	12	14
68-14	1	13	2	3	14	12	2	9	-	3	-	1	3	-	-	-	9	9	13
68-18	2	14	3	4	15	13	3	10	-	4	1	-	4	-	1	1	10	10	14
134	4	13	3	2	15	13	2	10	-	2	3	4	-	-	3	3	10	12	14
159*	1	-	-	-	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1
167	1	13	2	3	14	12	3	9	-	3	-	1	3	-	-	-	9	9	13
574	1	13	2	3	14	12	3	9	-	3	-	1	3	-	-	-	9	9	13
6869	10	5	8	9	5	3	10	4	1	10	9	10	10	1	9	9	-	6	4
15313	10	9	9	11	11	9	9	7	1	12	9	10	12	1	9	9	6	-	10
41335	14	9	12	12	9	8	13	8	1	14	13	14	14	1	13	13	4	10	-

-: keine Basenabweichungen zwischen den einzelnen Fragmenten

*: Fragmente wurden in einem Bereich von Position 5169-5260 sequenziert und verglichen

Abb.19: Graphische Darstellung der Anzahl von Nukleotidabweichungen zwischen verschiedenen BLV-Isolaten im env-Bereich von Np 5099-5542



Die untersuchten Provirusisolate verschiedener Rinder und der FLK-BLV (s. Tab.19, S.75) ließen sich nach Vergleich mit dem japanischen Isolat in drei Gruppen einteilen. (Die Tiere 7 und 159 werden aufgrund des geringen Analysenumfanges hier nicht berücksichtigt.)

Tab.21: Gruppeneinteilung verschiedener BLV-Isolate anhand der Anzahl der Nukleotidabweichungen in der *env*-Sequenz (Np 5099-5442) gegenüber dem japanischen Isolat

	Anzahl der Nukleotidabweichungen in der <i>env</i>-Sequenz (Np 5099-5442) gegenüber dem japanischen Isolat	Isolat des Tieres bzw. der Zelllinie
Gruppe 1	>9	2, 6869, 15313, 41335
Gruppe 2	3-4	45, 134, FLK-BLV
Gruppe 3	1-2	68 (Klone 14 und 18), 167, 574

Die Tiere der Gruppe 1 sind BLV-seropositive Reagenten (s. Tab.13, S.59) deren Provirus mehr als 9 Abweichungen in der *env*-Sequenz (Np 5099-5442) gegenüber dem japanischen Isolat (s. Tab.20, S.76) besaß. Untereinander wiesen die Proviren dieser Gruppe eine hohe DNA-Sequenzhomologie auf (s. Tab.19, S.75).

Die Gruppe 2 enthält sowohl serologisch-fragliche als auch seropositive Tiere (s. Tab.13, S.59) deren Provirus 3-4 Nukleotidabweichungen gegenüber der *env*-Sequenz des japanischen Isolats (s. Tab.20, S.76) aufwies. Die Nukleotidsequenz des FLK-BLV-Provirus dieser Gruppe stimmt mit der BLV-Provirussequenz des Probanden 45 überein. Das zur gleichen Gruppe gehörende Tier 134 hingegen zeigte an Np 5429 keine Abweichung, dafür jedoch eine zusätzliche an der Np 5265 (s. Tab.19, S.75).

Bei den Tieren der Gruppe 3 handelte es sich um serologisch negative, Provirus tragende Tiere (Tab.13, S.59) mit hoher Provirus-homologie zum japanischen Isolat (maximal 2 Abweichungen, s. Tab.21). Im Vergleich zum belgischen Isolat jedoch, zeigten sie deutlich mehr Sequenzabweichungen, als die Mitglieder der anderen Gruppen. Die Veränderungen zum australischen Isolat betragen maximal fünf Basen (s. Tab.20, S.76).

Das Provirus der über einen größeren *env*-Bereich untersuchten permanent Virus produzierenden Zelllinie (FLK-BLV 44) zeigte auch an den Np 4830 und 6234 Abweichungen gegenüber dem japanischen Isolat (s. Anhang 9.1., S.154). Die in Tabelle 21 getroffene Gruppeneinteilung bestätigt sich bei der Bildung von Mutantengruppen anhand der BLV-*env*-Sequenz. Insgesamt konnten anhand der DNA-Sequenzanalysen jeweils zwei BLV-Mutanten serologisch negativer bzw. serologisch fraglicher Provirus-träger sowie vier verschiedene BLV-Mutanten serologisch positiver Provirus-träger ermittelt werden (s. Tab.22, S.79). Das Provirus des Tieres 45 läßt sich nicht in die gebildeten Mutantengruppen einordnen. Aufgrund der serologischen Befunde müßte es in die Gruppe der BLV-D⁺-Mutanten, anhand seines Sequenzmusters in die Gruppe der BLV-D^{+/-}-Mutanten eingeordnet werden.

Tab.22: Einordnung verschiedener BLV-Isolate in BLV-Mutantengruppen

Mutantengruppe		Isolat des Tieres bzw. der Zelllinie
BLV-D⁺	BLV-Mutante serologisch positiver Provirussträger	2, 6869, 15313, 41335
BLV-D^{+/-}	BLV-Mutante serologisch fraglicher Provirussträger	134, FLK-BLV
BLV-D⁻	BLV-Mutante serologisch negativer Provirussträger	68 (Klone 14 und 18), 167, 574

D: Deutschland

4.4.3. Auswirkungen von DNA-Sequenzveränderungen auf die RNA-Sekundärstruktur der BLV-*env*-Region

Mit Hilfe des Computerprogrammes DNASIS® for Windows® wurde der Einfluß von DNA-Sequenzänderungen auf die RNA-Sekundärstruktur untersucht. Der verwendete Zucker-Stiegler-Algorithmus addiert ein Nukleotid nacheinander an das andere und kalkuliert dabei die Energie möglicher Konformationen der wachsenden Struktur. Die Struktur mit der geringsten Energie wird selektiert, ein weiteres Nukleotid an das 3'Ende angelagert und die Energien neu berechnet. Die für die Kalkulation verwendeten Energie-Values sind RNA-Values, wenngleich anstelle des „U“ (Uracil) ein „T“ (für das nur in der DNA vorkommende Thymidin) in den Abbildungen 17a-c vermerkt ist (Anonym, 1994b).

Für die Untersuchungen der RNA-Sekundärstruktur wurde der Bereich von Np 5171-5460 (290 bp) des *env*-Fragmentes ausgewählt. Die Strukturen der *env*-RNA der Tiere 41335 und 134 im angegebenen Bereich wurden auf den folgenden Seiten 80-82 dargestellt (s. Abb.17a-c).

Die RNA-Strukturen des japanischen Isolates (s. Abb.17a, S.80) und des Tieres 134 (s. Abb.17b, S.81) wiesen eine hohe Übereinstimmung auf. Obgleich sich die DNA- und damit auch RNA-Sequenzen an den Np 5183, 5192, 5265 und 5267 unterschieden, führten nur die drei letztgenannten Abweichungen zu einer Änderung der Sekundärstruktur. Ab der Position 48 in Abbildung 17b (entspricht Np 5192 des *env*-Bereiches) wurde die Schleife, aufgrund der dort vom japanischen Isolat abweichenden DNA-Sequenz, größer. Die Nukleinsäureveränderungen an den Positionen 95 und 97 (s. Abb.17b, S.81, entsprechen der Np 5265 und 5267 des *env*-Bereiches) führten zur Verkleinerung der, auch im japanischen Isolat vorhandenen Schleife, bei gleichzeitiger Neuausbildung einer Haarnadelbiegung in diesem Bereich (s. Abb.17a-b, S.80f.). Aus den dargestellten Ergebnissen kann geschlußfolgert werden, daß nicht jede Nukleotidabweichung zu einer Veränderung der Sekundärstruktur führt. Die BLV-RNA-Sekundärstruktur des Tieres 41335 weist ab Position 28 (durch Pfeil gekennzeichnet, s. Abb.17c, S.82) ein stark vom japanischen Isolat (s. Abb.17a, S.80) abweichendes Muster auf. Dieses Bild ist Ausdruck der sehr unterschiedlichen Nukleotidsequenzen beider Isolate.

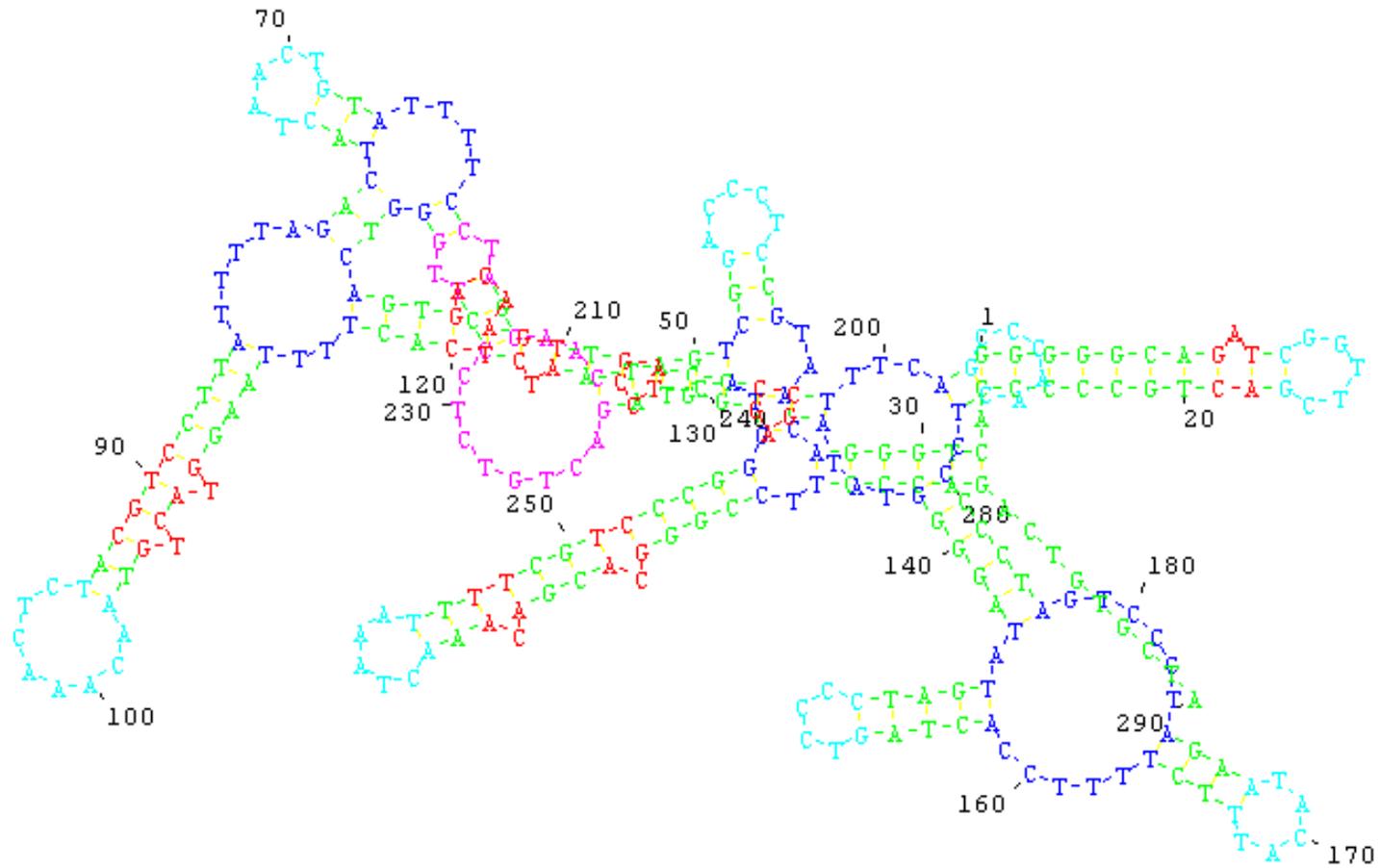


Abb.17a: BLV-RNA-Struktur des japanischen Isolates im *env*-Bereich von Np 5171-5460

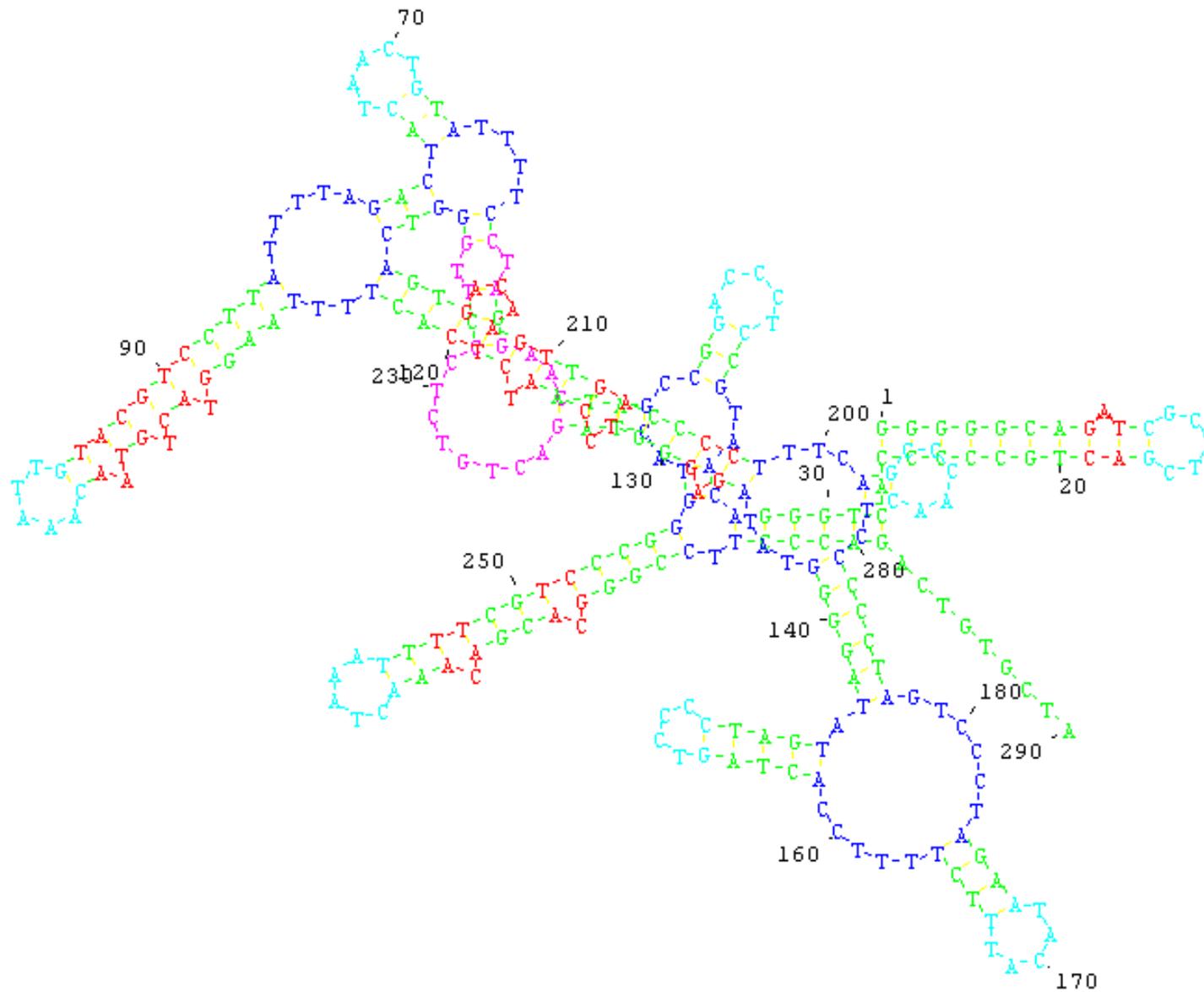


Abb.17b: BLV-RNA-Sekundärstruktur des Tieres 134
im *env*-Bereich von Np 5171-5460

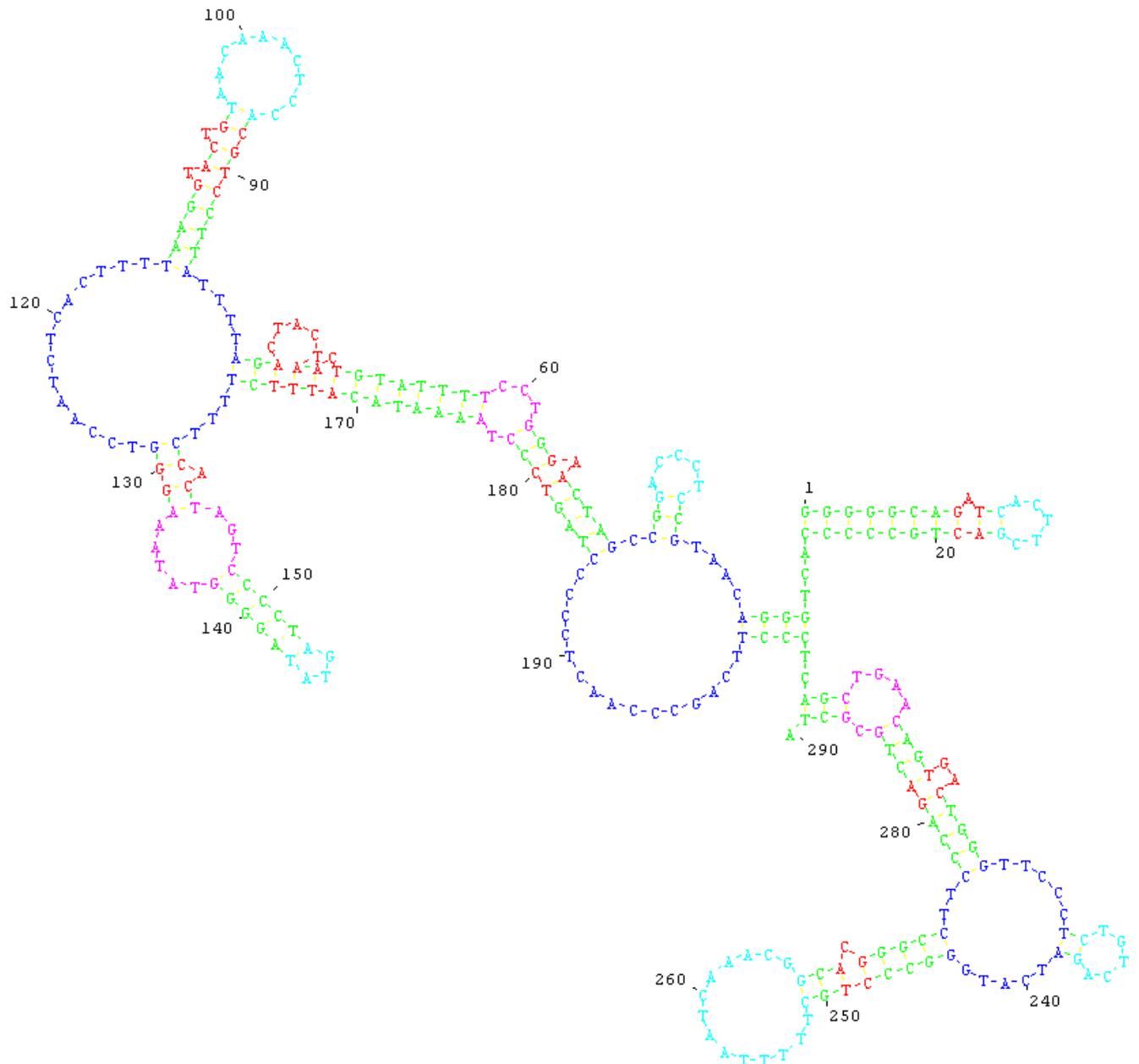


Abb.17c: BLV-RNA-Sekundärstruktur des Tieres 41335 im *env*-Bereich von Np 5171-5460
 der Pfeil kennzeichnet Position 28 (Erläuterung siehe Text, S.79)

4.4.4. Auswirkungen von DNA-Sequenzveränderungen auf die Aminosäuresequenz und die Proteinsekundärstruktur der BLV-*env*-Region

Nach Ermittlung der DNA-Provirussequenz wurde diese mit Hilfe des Computerprogrammes DNASIS® for Windows® in die zugehörige Aminosäuresequenz umgeschrieben. Insgesamt 61 von 64 möglichen Kodons stehen für die Synthese der 20 As bereit. Nur Tryptophan und Methionin werden durch ein einmaliges Triplet kodiert. Für die generelle Zuordnung zu bestimmten As sind die ersten beiden Basen entscheidend. XYU und XYC kodieren immer die gleichen As. Daraus ist ersichtlich, dass eine Sequenzveränderung nicht in jedem Falle eine Änderung der zu kodierenden As bewirken muß. In nachfolgender Tabelle 23 sind die Anzahl der Basenabweichungen (n) einzelner Proviren im Vergleich zum japanischen Isolat der Anzahl daraus resultierender As-Abweichungen (m) gegenübergestellt.

Tab.23: Gegenüberstellung der Anzahl von Nukleotid- und As-Abweichungen im *env*-Bereich (Np 5099-5542) verschiedener BLV-Isolate in Bezug zum japanischen Isolat

Isolat	n	m
BEL	14	1
AST	3	-
M1	4	-
M2	15	2
M3	13	2
FLK-BLV	4	-
2	9	3
45	4	-
68 (Klon 14)	1	-
68 (Klon 18)	2	1
134	4	1
167	1	-
574	1	-
6869	10	1
15313	10	2
41335	14	2

n: Anzahl der Nukleotidabweichungen in Bezug zum japanischen Isolat

m: Anzahl der As-Abweichungen in Bezug zum japanischen Isolat

-: keine As-Veränderung

Diese Gegenüberstellung in Tabelle 23 zeigt, daß nur ein geringer Teil der Nukleotidabweichungen (n) auch zur Veränderung der Aminosäuresequenz (m) führte.

Die Tabelle 24 (S.84) beschreibt die Position des Nukleotides im BLV, welches zu einer Änderung der kodierten As führte und benennt die veränderte As sowie eine eventuelle Änderung der Hydrophobie.

Tab.24: Position veränderter Nukleotide in verschiedenen BLV-Isolaten im Vergleich zum japanischen Isolat, die einen As-Austausch bewirken, Angabe der Position des veränderten Nukleotides im Kodon, Darstellung des hydrophoben Verhaltens

Isolat	Np	Np im Kodon	As in JAP	AS	Hydrophobie-änderung
BEL	5182/83	2/3	Arginin	Histidin	-
M1	5182/83	2/3	Arginin	Histidin	-
M2	5182/83	2/3	Arginin	Histidin	-
2	5182/83	2/3	Arginin	Histidin	-
	5241	1/3	Asparagin	Aspartin	-
	5421	1/3	Leucin	Phenylalanin	-
68-18	5133	1/3	Methionin	Valin	-
6869	5182/83	2/3	Arginin	Histidin	-
15313	5182/83	2/3	Arginin	Histidin	-
	5394	2/3	Valin	Isoleucin	-
41335	5182/83	2/3	Arginin	Histidin	-
	5426	2/3	Leucin	Phenylalanin	-

Generell bewirkte ein verändertes Nukleotid an erster oder zweiter Position im Kodon die Synthese einer vom japanischen Isolat abweichenden As. Die Neusynthese führte in keinem Fall zu einer Änderung des hydrophoben Verhaltens an der entsprechenden Position im Protein.

Im *env*-Bereich von Np 5171-5460 wurde die Proteinsekundärstruktur erstellt. Unter Verwendung des *Chou-Fasman* Algorithmus konnte für jede einzelne As die Möglichkeit zur Bildung unterschiedlicher Sekundärstrukturen kalkuliert werden. Die ermittelten Rohwerte wurden dann unter Beachtung des Einflusses von Nachbaraminosäureresten modifiziert (Anonym, 1994b). Dadurch ließ sich die Proteinsekundärstruktur in vier Strukturelemente untergliedern:

α -Helix, β -Strukturen (sog. Faltblätter), **Turn** (Windung) und **Coil** (Spirale).

Die untersuchten Isolate konnten anhand ihrer Proteinsekundärstruktur (s. Abb.18a-b, S.85) in zwei Gruppen eingeteilt werden.

Gruppe 1: JAP, AST, FLK-BLV, 45, 68-14, 68-18, 134, 159, 167, 574

Gruppe 2: BEL, M1, M2, 2, 7, 6869, 15313, 41335,

Unter den Probanden der Gruppe 1 befinden sich ausschließlich serologisch negative bzw. serologisch fragliche BLV-Provirus tragende Tiere (s. Tab.13, S.59) sowie das japanische und

australische BLV-Isolat. Gruppe 2 enthält nur seropositiven Reagenten und das belgische Isolat.

Damit zeigten, unter Berücksichtigung der nach 4.4.2. (s. S.74) getroffenen Einteilung, die Provirusmutanten BLV-D⁻ und BLV-D^{+/-} (s. Abb.18a) die gleiche Proteinsekundärstruktur und unterschieden sich deutlich von der Provirusmutante BLV-D⁺(s. Abb.18b).

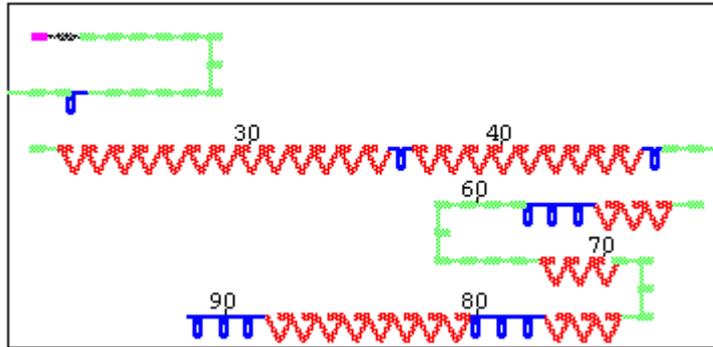


Abb.18a: BLV-Proteinsekundärstruktur von Vertretern der Gruppe 1 (Provirusmutanten BLV-D⁻ und BLV-D^{+/-}) im *env*-Bereich von Np 5171-5460

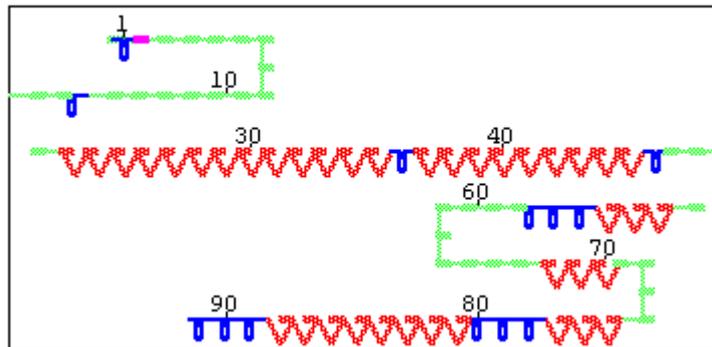
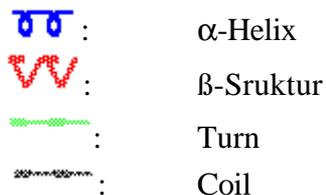


Abb.18b: BLV-Proteinsekundärstruktur von Vertretern der Gruppe 2 (Provirusmutante BLV-D⁺) im *env*-Bereich von Np 5171-5460



Die Gruppen 1 und 2 unterscheiden sich durch die Schleifenbildung bei As 4. Dieser Schleifenbildung ist zu entnehmen, daß nur die DNA-Sequenzabweichung im verantwortlichen Triplet an Position 5182 und die daraus resultierende As-Abweichung, zu einer Proteinsekundärstrukturveränderung in der Gruppe 2 im Vergleich zu den Vertretern der Gruppe 1 führte (s. Abb.18a-b). Alle anderen in Tabelle 24 (s. S.84) bezeichneten As-Veränderungen blieben ohne Einfluß auf die Proteinstruktur.

4.5. Untersuchung der *pol*-Region des BLV

4.5.1. Restriktionsenzymanalysen klonierter PCR-*pol*-Fragmente

Für die Herstellung von Amplifikaten aus dem 3'Ende der *pol*-Region wurde eine Einfach- oder Doppel-PCR unter Verwendung des Primerpaares *pol*₄₁₁₁/*env*_{4870i} durchgeführt. Es gelang, von den Proviren der Tiere 68, 574, 15313 und der FLK-BLV ein Amplifikat zu synthetisieren. Die folgende Abbildung 19 zeigt das Resultat einer Einfach-PCR nach 50 Zyklen.

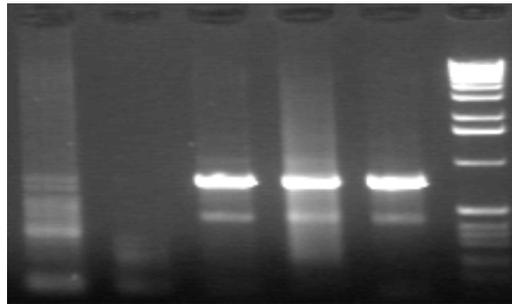


Abb.19: *pol*-PCR Ergebnis nach 50 Zyklen unter Verwendung des Primerpaares *pol*₄₁₁₁/*env*_{4870i}; Spur 1: Tier 6869; Spur 2: Tier 159; Spur 3: Tier 68; Spur 4: Tier 15313; Spur 5: Tier 574

Bei Erhöhung der Anzahl der PCR-Zyklen von 40 auf 50 in der Einfach-PCR mit dem Primerpaar *pol*₄₁₁₁/*env*_{4870i} (s. Abb.19) entstanden bei Tier **6869** (Spur 1) neben der erwarteten Bande in einer Größe von 750 bp eine Vielzahl unspezifischer Banden. Die Probanden **68**, **574** und **15313** (Spuren 3-5) entwickelten eine zusätzliche Bande in einer Größe von ca. 450 bp. Das Tier **159** (Spur 2) zeigte kein PCR-Amplifikat.

Die Kontrolle der Minipräparations-DNA klonierter *pol*-Fragmente erfolgte u.a. durch Restriktionsenzymanalysen mit *Pst*I, *Sac*I und *Pvu*II. Diese Enzyme besitzen im angegebenen Kontrollbereich (Np 4111-4892) in keinem der bekannten Isolate einen Restriktionsort, spalten jedoch im pGemT-Vektor. Der Restriktionskarte des pGemT-Vektors entsprechend, sind folgende, in Tabelle 25 gezeigte Fragmentgrößen zu erwarten.

Tab.25: Spaltorte ausgewählter Enzyme im pGemT-Vektor und erwartete Fragmentgrößen nach Ligation des Vektors mit dem *pol*-PCR-Amplifikat (4111-4892)

Enzym	n	Fragmentgröße in bp
<i>Pst</i> I	1	3782
<i>Sac</i> I	1	3782
<i>Pvu</i> II	2	2567, 1216

n: Anzahl der Restriktionsorte im pGemT-Vektor

Die folgende Abbildung 20 (s. S.87) zeigt die Ergebnisse der *Pvu*II-Spaltung des pGemT-Vektors nach Ligation mit den BLV-*pol*-Fragmenten (Np 4111-4892) der Tiere 68 und 15313.

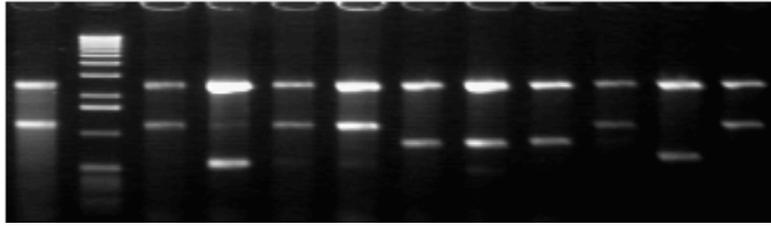


Abb.20: *PvuII*-Spaltung des pGemT-Vektors nach Ligation mit dem *pol*-Fragment (Np 4111-4892); Spuren 1, 2, 4, 5: Tier 68 mit 780 bp Insert; Spuren 6-8: Tier 15313 mit ca. 450 bp Insert; Spuren 9, 11: Tier 15313 mit 780 bp Insert; Spuren 3, 10 pGemT- Vektor ohne Insert

Die Ergebnisse der *PvuII*-Spaltung in den Spuren 1, 2, 4 und 5 (Tier **68**) wiesen die nach den Berechnungen in Tabelle 20 erwarteten Bandengrößen bei 2570 und 1200 bp auf. Die Spaltergebnisse der Klone in den Spuren 9 und 11 (Tier **15313**) zeigten ebenfalls das nach Tabelle 25 (s. S.86) erwartete Muster. Die BLV-*pol*-Fragmente des Tieres 15313 bildeten jedoch auch Klone, deren Insertgröße nur etwa 450 bp betrug (Spuren 6-8). Bei diesen Klonen entstanden *PvuII*-Fragmente in der Größe von ca. 2550 und 850 bp.

4.5.2. Darstellung der DNA-Sequenzierungsergebnisse und Vergleich der ermittelten *pol*-Sequenz untersuchter Proviren mit der bekannter BLV-Isolate

Als Vergleichsmöglichkeiten für eigene Untersuchungsergebnisse standen die von Rice *et al.* (1984), Sagata *et al.* (1985) und Coulsten *et al.* (1990) veröffentlichten Virussequenzen zur Verfügung. Das BLV-*pol*-Gen des Tieres 15313 wurde im Bereich von Np 4182-4430 und 4467-4892, das des Tieres 68 im Bereich von Np 4111-4330 und 4646-4832 sequenziert. Die DNA-Sequenz der untersuchten Proviren und bekannten Isolate ist im Anhang 9.3. (s. S. 165) wiedergegeben.

Die DNA-Sequenzabweichungen des Tieres **68** im Vergleich zum belgischen, australischen und japanischen Isolat ließen keinerlei Übereinstimmung mit denen des Tieres **15313** erkennen. 11 von 23 Nukleotidabweichungen des Tieres 15313 zum japanischen Isolat sind mit denen des belgischen, 7 mit denen des australischen Isolates identisch. Folglich ähnelt das *pol*-Gen des Rindes 15313, im Gegensatz zu dem des Tieres 68, eher dem des belgischen als dem des japanischen Isolat.

Damit ist anhand der Nukleotidsequenz des untersuchten *pol*-Bereiches ein deutlicher Unterschied zwischen der Sequenz eines seronegativen (Tier 68) und -positiven (Tier 15313) Provirussträgers zu erkennen. So ist auch für diesen Bereich eine Unterscheidung von **BLV-D⁻**- und **BLV-D⁺**-Provirusmutanten möglich.

Die Anzahl der Nukleotidabweichungen im *pol*-Bereich von Np 4111-4892 nach Vergleich der Isolate untereinander zeigt Tabelle 26 (s. S.88).

Tab.26: Anzahl von Nukleotidabweichungen im BLV-*pol*-Gen (Np 4111-4892) der Tiere 68 und 15313 nach Vergleich mit bekannten Provirusisolaten

Isolat	JAP	BEL	AST	68*	15313 ⁺
JAP	-	29	29	5	23
BEL	29	-	23	23	12
AST	29	23	-	19	31
68*	5	23	19	-	16
15313⁺	23	12	31	16	-

*: Tier 68 wurde im Bereich von Np 4111-4330 und Np 4646-4832 verglichen

+: Tier 15313 wurde im Bereich von Np 4182-4430 und Np 4467-4892 verglichen

Es wird ersichtlich, daß das Provirus des Tieres 68 im untersuchten Bereich 5 Nukleotidabweichungen im Vergleich zum japanischen-, 23 zum belgischen- und 19 Abweichungen im Vergleich zur BLV-Sequenz des Tieres 15313 aufwies. Der untersuchte BLV-Bereich des Tieres 15313 dagegen zeigte 23 Nukleotidveränderungen beim Vergleich zum japanischen-, 12 zum belgischen- und 31 zum australischen Isolat.

Die BLV-Proviren der Tiere 15313 und 574 sowie der FLK-BLV mit dem etwa 450 bp großen Insert wurden in gleicher Weise sequenziert und verglichen. Mit keinem bekannten BLV-Isolate ließen sich Sequenzhomologien von >40% ermitteln. Ebenfalls weniger als 40% Übereinstimmung ergab die Gegenüberstellung mit dem Bovinen Immundefizienz-Virus.

4.5.3. Einfluß von DNA-Sequenzveränderungen auf Spleißdonor, -akzeptor und Startkodonsequenzen der BLV-*pol*-Region

In der untersuchten *pol*-Region befinden sich für die Synthese von Regulator- und Hüllproteinen entscheidende Sequenzen. Von besonderer Bedeutung sind der an Position 4649 befindliche Spleißakzeptor, das *env*- und XII-Startkodon (Np 4821), das XI-Startkodon (Np 4886) und der Spleißdonor (Np 4871). Betrachtet man im Anhang 9.3. (s. S.165) einen 10 bp umfassenden Bereich um die genannten Spleißorte, fällt eine absolute Sequenzhomologie aller untersuchten Isolate auf.

In unmittelbarer Nähe des *env*- und damit gleichzeitig des XII-ATG's an Position 4821 hingegen zeigten das belgische Isolat und das Provirus des Tieres 15313 eine Basenabweichung (Np 4826) im Vergleich zum japanischen Isolat. Die Auswirkungen dieser Veränderung auf die RNA-Sekundärstruktur im Bereich 4800 bis 4832 verdeutlichen die Abbildungen 21a-b (s. S.89). Das *env*-ATG befindet sich an den Positionen 21-23 der jeweiligen Abbildung und ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

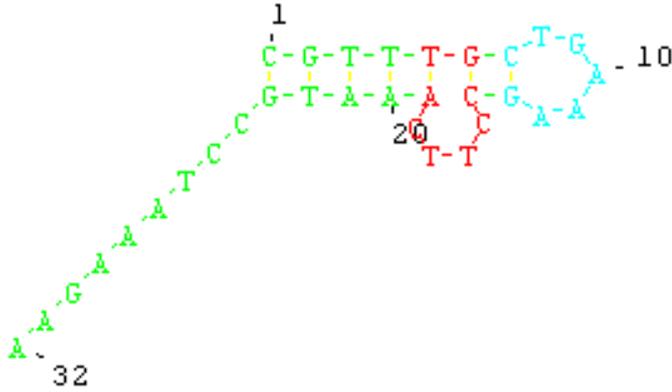


Abb.21a: BLV-RNA-Sekundärstruktur im *pol*-Gen (Np 4800-4832) des Tieres 15313 und des belgischen Isolates

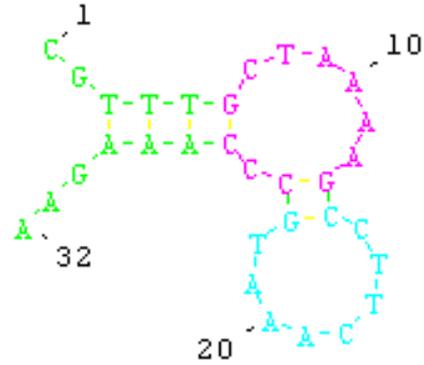


Abb.21b: BLV-RNA-Sekundärstruktur im *pol*-Gen (Np 4800-4832) des Tieres 68, des japanischen und australischen Isolates

Der Pfeil kennzeichnet das Startkodon des *env*- und damit gleichzeitig des XII-Leserahmens an Position 4821.

Die Abbildungen 21a-b zeigen, daß das unterschiedliche Nukleotid an Position 26 (Np 4826 des BLV) zu einer Veränderung der RNA-Sekundärstruktur in diesem Bereich führt.

4.5.4. Auswirkungen von DNA-Sequenzveränderungen auf die Aminosäuresequenz und die Proteinsekundärstruktur der BLV-*pol*-Region

Die As-Sequenz der untersuchten Isolate wurde im Anhang 9.4. (s. S.168) dargestellt. Aus den 5 Nukleotidabweichungen des Provirus des Tieres 68 im Vergleich zum japanischen Isolat (s. Tab.26, S.88) ergeben sich 3 Abweichungen der Aminosäuresequenz. Das Provirus des Tieres 15313 besitzt 8 As-Abweichungen im Vergleich zum japanischen Isolat. Die Tabelle 27 gibt die veränderten As mit den zugehörigen Positionen der Nukleotidabweichung an und beschreibt eine eventuell auftretende Änderung der Hydrophobie.

Tab.27: Darstellung von Aminosäureveränderungen der BLV-Providiren im *pol*-Gen der Tiere 68 und 15313 im Vergleich zum japanischen Isolat, Angabe der veränderten Nukleotidposition der veränderten Aminosäure

Klon	Np	As im Jap	vAs	Hydrophobie- änderung
68	4125	Asparagin	Lysin	-
	4143	Lysin	Asparagin	-
	4693/4694	Leucin	Lysin	-
15313	4301	Threonin	Methionin	+
	4378/79	Thyrosin	Isoleucin	+
	4468/68	Asparagin	Valin	-
	4498	Leucin	Valin	-
	4660	Threonin	Alanin	-
	4693/4694	Leucin	Lysin	-
	4777	Aspartat	Asparagin	-
4826	Leucin	Prolin	+	

vAs: veränderte As

Den in Tabelle 27 (s. S. 89) dargestellten Ergebnissen ist zu entnehmen, daß im jeweiligen Untersuchungsbereich keine der Aminosäureveränderungen im BLV-Provirus des Tieres 68, im Gegensatz zu denen des Tieres 15313, zugleich mit einer Veränderung des hydrophoben Verhaltens der entsprechenden Aminosäure einhergeht.

Die BLV-Proteinsekundärstruktur der Tiere 68 und 15313 sowie die des japanischen und belgischen Isolates (im Bereich von Np 4650-4832) ist in den Abbildungen 22a-b wiedergegeben. Es ist ersichtlich, daß das japanische Provirusisolat in seiner Proteinsekundärstruktur vollkommen mit der des Tieres 68, das belgische mit der des Tieres 15313 übereinstimmt. Damit verkörpert die Abbildung 22a das Bild der Proteinsekundärstruktur einer BLV-D⁻-Mutante und die Abbildung 22b das Bild einer BLV-D⁺-Provirusmutante.

Die BLV-D⁺-Provirusmutante zeigte gegenüber der BLV-D⁻-Provirusmutante eine Änderung der α -Helix in die Coil-Struktur an As-Position 58 des untersuchten Bereiches. Dieser Strukturwandel ist auf die unterschiedliche Nukleinsäuresequenz der Isolate an der Np 4826 (s. Anhang 9.3., S.165) und der daraus resultierenden As-Änderung zurückzuführen.

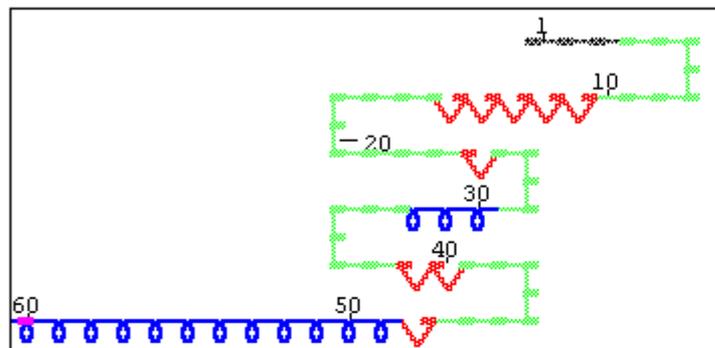


Abb.22a: BLV-Proteinsekundärstruktur des japanischen Isolates und Tieres 68 im *pol*-Bereich von Np 4650-4832

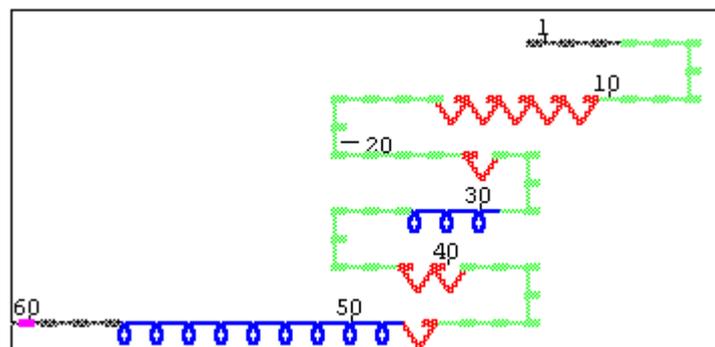


Abb.22b: BLV-Proteinsekundärstruktur des belgischen Isolates und Tieres 15313 im *pol*-Bereich von 4650-4832



Im *env*-Leserahmen bewirkt die Änderung der Nukleinsäuresequenz an Position 4826 keine Veränderung der As-Sequenz und hat damit keinen Einfluß auf die Proteinsekundärstruktur.

4.6. Untersuchung der *tax*-Region des BLV

4.6.1. Darstellung der DNA-Sequenzierungsergebnisse und Vergleich der ermittelten *tax*-Sequenz untersuchter Proviren mit der bekannter BLV-Isolate unter besonderer Berücksichtigung von Spleißakzeptorsequenzen der Region

In der *tax*-Region des BLV wurden die Proviren der Rinder 6, 574 und 15313 sowie die FLK-BLV und das Plasmid pSVN4313 untersucht. Die Tabelle 28 bezeichnet den sequenzierten Bereich der verschiedenen Proviren.

Tab.28: sequenzierter Bereich aus der *tax*-Region verschiedener BLV-Isolate

Isolat	Np des untersuchten Bereichs
6	7007-7433; 7699-7949
574	7064-7369; 7762-7949
15313	7049-7252; 7792-7949
FLK-BLV	7017-7306; 7830-7949
pSVN4313	7031-7223; 7772-7950

Die Ergebnisse des Sequenzvergleiches im Bereich von Np 6690-7987 der angegebenen Proben mit dem des japanischen, belgischen und australischen Isolat zeigt Anhang 9.5 (s. S.169). Die Sequenz des australischen Isolats liegt nur bis zur Np 7933 vor (Coulsten *et al.*, 1990).

Die folgende Tabelle 29 dokumentiert die Positionen der Nukleotidabweichungen der einzelnen Isolate gegenüber dem japanischen Isolat

Tab.29: Position der Nukleotidabweichungen verschiedener BLV-Isolate in Bezug zum japanischen Isolat im *tax*-Bereich (Np 7000-8000)

Isolat	Nukleotidposition der Abweichung
BEL	7030, 7096, 7353, 7409, 7433, 7434, 7571, 7632, 7732, 7738, 7752, 7782, 7835, 7899, 7903, 7907, 7914, 7940, 7941
AST	6995-6999, 7030, 7053, 7085, 7096, 7118, 7136, 7189, 7278, 7353, 7409, 7433, 7571, 7620, 7625, 7632, 7674, 7677, 7707, 7713, 7719, 7747, 7752, 7782, 7785* , 7788, 7845, 7856
6	7030, 7032, 7045, 7096, 7147, 7193, 7353, 7409, 7732, 7788, 7903, 7914, 7940, 7941
574	7940, 7941
15313	7084, 7096, 7830, 7903
FLK-BLV	7833, 7843, 7844, 7882, 7883, 7884, 7885, 7937
pSVN4313	keine

*: zwischen Np 7785 und 7786 befindet sich ein Baseneinschub im australischen Isolat

Die Tabelle 29 (s. S.91) verdeutlicht die geringradig höhere Übereinstimmung des BLV-Provirus vom Tier **6** mit dem belgischen Isolat (12 Abweichungen) gegenüber dem japanischen Isolat (15 Abweichungen). Dabei weisen sowohl das belgische Isolat als auch das Provirus des Tieres 6 neun adäquate Unterschiede zum japanischen Isolat auf. Das Provirus des Rindes 15313 besitzt dagegen nur 4 Abweichungen im Vergleich zum japanischen und 5 zum belgischen Isolat. Auffallend ist die im vorderen Sequenzbereich (ca. 7000-7300 bp) auftretende 100%ige Übereinstimmung des Tieres **574**, der **FLK-BLV** und des untersuchten Plasmides **pSVN4313** mit dem japanischen Isolat. Die zwei Abweichungen des Provirus vom Tier 574 gegenüber dem japanischen Isolat (Np 7940/7941) sind auch im BLV-Isolat des Probanden 6, nicht jedoch in dem des Probanden 15313 zu finden. Die Proviren der seropositiven Tiere 15313 und 6 weisen zwei gemeinsame Unterschiede zum japanischen Isolat auf (Np 7096 und 7903).

Die untersuchten Proviren lassen sich somit in die Gruppen **BLV-D⁺**- (Probanden 6 und 15313, belgisches Isolat) und **BLV-D⁻**-Provirusmutanten (Proband 574, FLK-BLV, japanisches Isolat) einteilen.

Von besonderem Interesse ist der Baseneinschub im australischen Isolat zwischen Position 7785 und 7786 (s. Tab.29, S.91). Die **Spleißakzeptoren** der Region (Np 7018, 7066, 7157, 7247) werden von den ermittelten Sequenzabweichungen nicht berührt.

4.6.2. Auswirkungen von DNA-Sequenzveränderungen auf die Aminosäuresequenz und die Proteinsekundärstruktur der BLV-*tax*-Region

Die aus der DNA-Sequenz abgeleitete As-Sequenz des *tax*-Proteins der untersuchten BLV-Proviren ist im Anhang 9.6. (s. S.172) der Sequenz bekannter Isolate (JAP, BEL, AST) gegenübergestellt.

Von den sequenzierten Bereichen der verschiedenen BLV-Isolate wurde die Aminosäuresequenz ermittelt. Die Tabelle 30 zeigt die Anzahl der Nukleotid- und As-Sequenzabweichungen im Vergleich zum japanischen Isolat.

Tab.30: Anzahl der Nukleotid- und Aminosäureabweichungen verschiedener BLV-Klone zum japanischen Isolat im jeweilig untersuchten *tax*-Bereich (vergleiche Tab.28)

Isolat	n	m
BEL	18	11
AST	28	10*
6	16	6
574	2	1
15313	5	3
FLK-BLV	7	3
pSVN4313	0	0

*: das australische Isolat wurde bis zur Position des Baseneinschubes (7786) verglichen
n: Anzahl der Nukleotidabweichungen; m: Anzahl der As-Abweichungen

Für den als Teil des *XBLI*-Leserahmens fungierenden Nukleotidbereich 7699-7949 wurde die BLV-Proteinsekundärstruktur des japanischen und belgischen Isolates sowie die des Probanden 6 erstellt (s. Abb.23a-c).

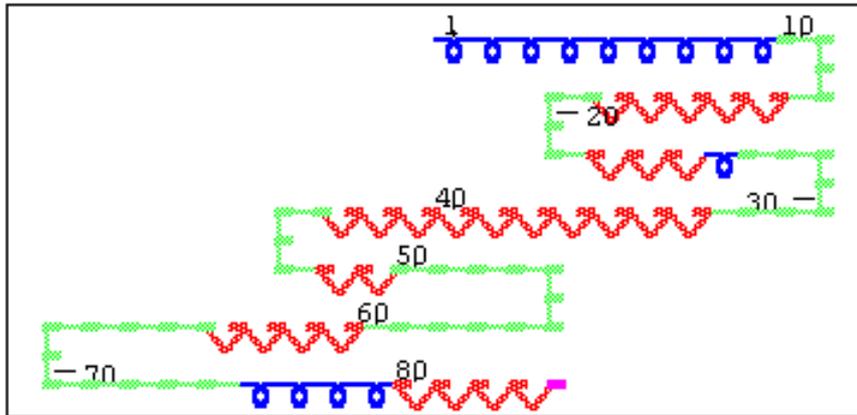


Abb.23a: BLV-Proteinsekundärstruktur des japanischen Isolates im *XBLI*-Bereich 7699-7949

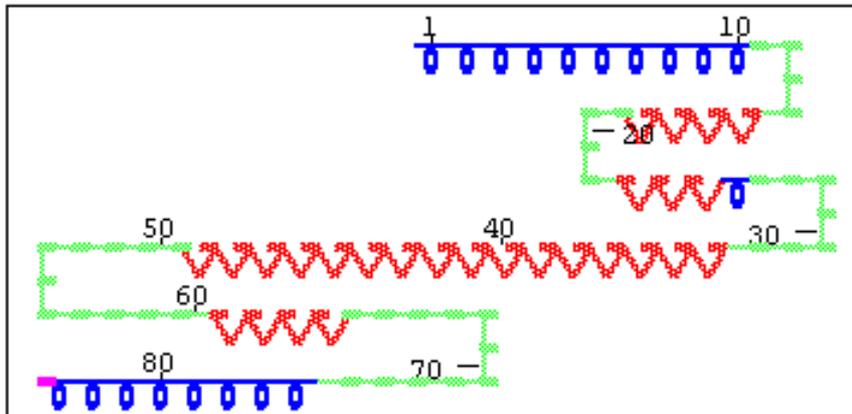


Abb.23b: BLV-Proteinsekundärstruktur des belgischen Isolates im *XBLI*-Bereich 7699-7949

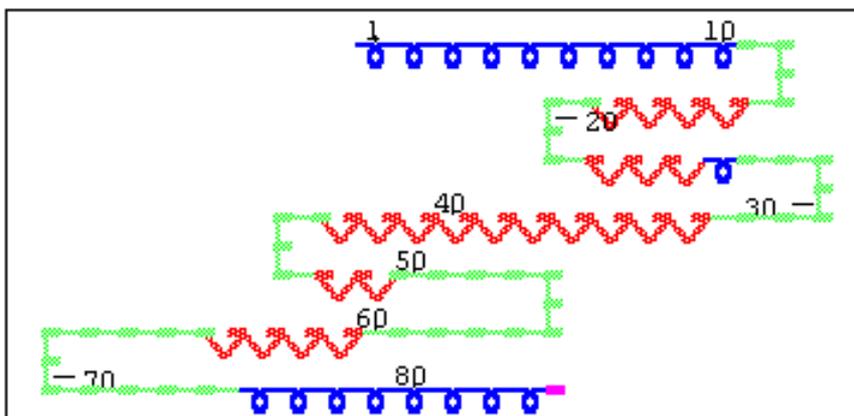


Abb.23c: BLV-Proteinsekundärstruktur des Tieres 6 im *XBLI*-Bereich 7699-7949

- | | | | | | |
|---|---|-----------------|---|---|-------------------|
|  | : | α -Helix |  | : | β -Struktur |
|  | : | Turn |  | : | Coil |

Die Aminosäureunterschiede der verschiedenen Isolate (s. Anhang 9.6., S.172) spiegeln sich in unterschiedlichen Proteinsekundärstrukturen wieder (s. Abb.23a-c, S.93). Insbesondere ab As-Position 40 des untersuchten Bereiches (entspricht Np 7699-7949 des BLV) sind in den Abbildungen 23a-c deutliche Veränderung der Proteinstruktur erkennbar. Die an Position 7835 vorhandene Nukleotidabweichung (s. Anhang 9.5., S.169 und Tab. 29, S.81) des belgischen Isolates gegenüber dem japanischen Isolat führt neben der As-Änderung (Alanin wird zu Valin, womit gleichzeitig das hydrophobe Verhalten geändert wird) zur Entstehung einer β -Struktur anstelle des im japanischen Isolat und dem Provirus des Tieres 6 vorhandenen Turns. In Übereinstimmung mit dem belgischen Isolat zeigt das Provirus des Tieres 6 ab As-Position 80 (s. Abb.23c, S.93) des untersuchten Bereiches eine α -Helix anstelle der β -Struktur des japanischen Klones (s. Abb.23a, S.93). Ursächlich verantwortlich sind dafür die Nukleotidabweichungen an den Positionen 7940/41 (s. Anhang 9.5., S.169). Sie bewirken eine Umwandlung der As Prolin zu Leucin, bei gleichzeitiger Veränderung des hydrophoben Charakters. Das Provirus des Tieres 15313 stimmt an dieser Position mit dem des belgischen Isolats und dem des Tieres 6 überein.

4.6.3. Sequenzvergleiche sechs verschiedener *tax*-Klone gleichen Ausgangsmaterials

Nach Ligation des *tax*-Fragmentes (Np 6978-7994) des Tieres 6 mit dem pGemT-Vektor wurden 18 Klone selektiert, angezogen und die DNA nach der Minipräparationsmethode (s. 3.4.2., S.43) aufgearbeitet. Sechs dieser Klone erwiesen sich nach Restriktionsenzymkontrolle als inserthaltig und wurden mit den PCR-Primern pXII₆₉₇₈ und *tax*₇₉₇₅ sequenziert. Auffallend war die hohe Konzentration der präparierten DNA von 6,8-8,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Jeder Klon konnte im Bereich von 7034-7317 sowie 7699-7949 analysiert werden. Insgesamt wurden 533 Nukleotide jedes Klons miteinander verglichen. Dabei zeigten die sechs Klone des Tieres 6 hundertprozentige Übereinsimmung ihres Sequenzmusters.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse nach Selektion und Sequenzierung zweier positiver BLV-Klone (14 und 18) mit *env*-Insert (5099-5442) des Tieres 68 (s. Anhang 9.1., S.154). Sie wiesen an einer Position (Np 5133) unterschiedliche Basen auf. Der Vergleich von insgesamt 886 bp ergibt damit eine Abweichung. Eine Gegenüberstellung verschiedener, das *env*-Amplifikat enthaltener BLV-Klone der Tiere 2, 167, 574, 6869, 15313, 41335 und der FLK-BLV zeigte hundertprozentige Homologie.

4.7. Leukozytenkurzzeitkultivierung

Von allen Tieren des Bestandes 1 und 2, sowie des Tieres 2 (Bestand 7), 41335 (Bestand 4) und 45 (Bestand 5, s. 3.1., S.35) wurden LKK im Doppelansatz (Probe 1 und 2) angelegt. Da nach dreitägiger Kultivierung einige Zellen angeheftet waren, wurden in Probe 1 alle Zellen geerntet und nach Zentrifugation der ZKÜ für die ELISA-Bestimmung, das Zellpellet für den Western-Blot zur Bestimmung von gp51 gewonnen. Der Zellrasen in Probe 2 hingegen blieb

insgesamt 10 Tage in Kultur. Danach wurde er mit PBS gewaschen, pelletiert und in RIPA-Puffer für die Western-Blot-Untersuchung aufgenommen. 100 µl zellfreier ZKÜ diente der ELISA-Bestimmung. Ausgewählte Zellkulturen am dritten Kultivierungstag, vor und nach Entfernung des zellhaltigen Überstandes, zeigen die nachfolgenden Abbildungen 24a-b.

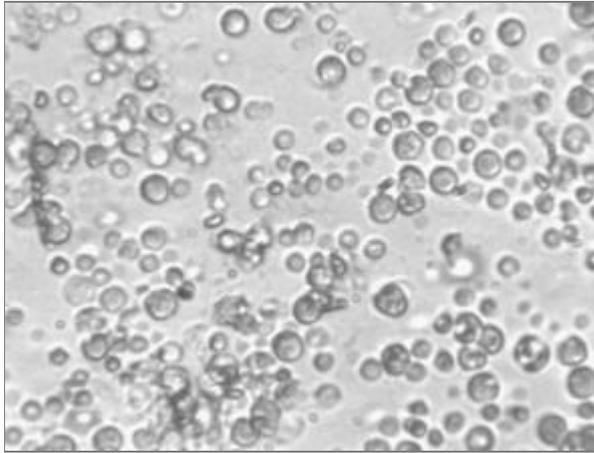


Abb.24a: LKK des Tieres 607 am dritten Kultivierungstag (Suspensionskultur)



Abb.24b: LKK des Tieres 216 am dritten Kultivierungstag (beginnender Zellrasen)

Mittels ELISA konnte in den Zellkulturüberständen der Tiere 41335 und 45 das gp 51 nachgewiesen werden. Der ZKÜ des Tieres 2 wurde in der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen mittels IDT untersucht. Es konnte keine AG-Expression nachgewiesen werden (Straub, 1996).

Für die Western-Blot-Untersuchungen wurde in der Regel 60 µl in RIPA-Puffer gelöstes Zellpellet der Probe 1 und 25 µl der Probe 2 eingesetzt. Der mit 2 µl eingesetzte positive Zellextrakt enthielt 6,77 µg Gesamteiweiß, bzw. 0,2 ng gp51 pro µl. Die Nachweisgrenze lag bei 0,1 ng gp51. Das Ergebnis der Untersuchungen ist in Tabelle 31 dargestellt.

Tab.31: Ergebnisse des ZKÜ-ELISA und der Western-Blot-Untersuchungen nach Leukozytenkurzzeitkultivierung

Tiere	ZKÜ-ELISA	Western-Blot
32, 58, 68, 92, 134, 159, 356, 370, 374, 376, 527, 574	-	-
3, 44, 145, 149, 153, 155, 167, 216, 237, 268, 282, 590, 599, 607, 615	-	-
273, 324	-	-/+
2	*	n.u.
41335	+	+
45	+	+

* : Tier 2 im AGID negativ (s.o.)

+/- : fragliches Ergebnis

Alle in der LKK untersuchten Tiere der Bestände 1 und 2 zeigten serologisch und im Western-Blot negative bzw. fragliche (Tiere 273, 324) Ergebnisse. Die Spezifität der bei den beiden letztgenannten Tieren auftretenden schwachen Banden in einer Größe von 51 kDa konnte nicht geklärt werden, da sich Banden gleicher Intensität auch an anderen Positionen ausbildeten. Die LKK der Tiere 45 und 41335 dagegen zeigten spezifische positive Signale auf der Höhe der gp51- und p24-Banden.

Die LKK des Tieres 324 wies nach 10tägiger Kultivierung einen massiven Trypanosomenbefall auf. Die Spezies wurde nicht näher klassifiziert, da nach Rommel (1992) in Europa vorkommende Trypanosomen des Rindes apathogen sind.

5. Diskussion

Über zwei Jahrzehnte schienen serologische Methoden allein notwendig und zugleich ausreichend zu sein, eine BLV-Infektion bei Rindern nachzuweisen und auf ihrer Grundlage weitreichende Bekämpfungsprogramme zu entwickeln. Die BLV-AK des klassisch infizierten Tieres waren sowohl im AGID als auch im ELISA nachzuweisen.

Zunehmend wurde jedoch in den letzten Jahren über das Auftreten serologisch negativer Provirussträger berichtet (Cockerell und Rovnak, 1988; Naif *et al.*, 1990; Coulsten *et al.*, 1991; Agersti *et al.*, 1993; Eaves *et al.*, 1994; Fechner, 1995; Blankenstein, 1996).

Andererseits gab es auch Untersucher, die bei bestimmten Rindern mittels ELISA oder AGID BLV-AK nachweisen konnten, bei denen der BLV-Provirusnachweis mittels PCR jedoch negativ verlief (Murtaugh *et al.*, 1991; Jacobs *et al.*, 1992; Popov *et al.*, 1993; Blankenstein, 1996).

Während immer wieder festgestellt wurde, daß beim BLV Antigenvarianten und daraus resultierende AK-Serotypen nicht auftreten (Zajac *et al.*, 1980; Burny *et al.*, 1985; Kassabow *et al.*, 1991), ist es heute denkbar, daß sich beim BLV verschiedene Serovarianten entwickelt haben und daß sich im Verlauf der Selektion auf BLV-freie Bestände nur solche Provirusmutanten durchsetzen konnten, die entweder wenig immunogen wirken oder aber AK induzieren, die mit herkömmlichen, diagnostischen BLV-Antigenen der über zwei Jahrzehnte permanent BLV-produzierenden fetalen Lammnieren-Zelllinien (Van der Maaten und Miller, 1976), nicht mehr nachgewiesen werden können.

Aus diesem Grund wurden Teile der Nukleotidsequenz verschiedener BLV-Isolate und die daraus resultierende Aminosäuresequenz mit dem Ziel ermittelt:

- die genetische Distanz verschiedener Isolate in Bezug auf ihre geographische Herkunft zu vergleichen,
- die genetische Distanz verschiedener Isolate in Bezug zum serologischen Status des Wirtstieres zu setzen,
- jene Nukleotide besonders zu betrachten, die direkt als Spleißdonor bzw. -akzeptor oder Startkodon in wesentliche virale Regulationsmechanismen involviert sind und
- die Bedeutung von Nukleotid- bzw. As-Veränderungen für die RNA- und Proteinsekundärstruktur darzustellen.

Aufgrund des hohen Arbeits- und Kostenaufwandes sind der Ermittlung von Nukleotidsequenzen viraler Gene für die Klärung verschiedenster Problemstellungen in der Veterinärmedizin Grenzen gesetzt. Ziel der Arbeit sollte es daher auch sein, verschiedene auf dem Sanger-Prinzip (Sanger *et al.*, 1977) basierende Sequenzierungsmethoden hinsichtlich ihrer Praktikabilität und Rentabilität miteinander zu vergleichen.

5.1. Die Sequenzierung von DNA

Unter den verschiedenen, in den letzten Jahren entwickelten Methoden zur Sequenzierung von DNA haben sich zwei als besonders schnell, zuverlässig und einfach erwiesen: die Sequenzierung endmarkierter DNA durch basenspezifische chemische Spaltung (chemische Methode; Maxam und Gilbert, 1977) und die enzymatische DNA-Sequenzierung (enzymatische Methode, Kettenabbruch-Verfahren; Sanger *et al.*, 1977). Während Sagata *et al.* (1985) und Rice *et al.* (1984, 1985) für die komplette bzw. nahezu vollständige Sequenzierung des BLV-Genoms die Methode nach Maxam und Gilbert (1977) anwandten, sequenzierten Coulsten *et al.* (1990) nach dem Sanger-Verfahren.

Eigene DNA-Sequenzanalysen wurden aufgrund der an unserem Institut vorhandenen technischen Möglichkeiten ausschließlich nach dem Sanger-Verfahren (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Eine Voraussetzung für die Anwendung des Kettenabbruchverfahrens ist die Bereitstellung von ssDNA (Sanger *et al.*, 1977; Ibelgaufits, 1990; Singer und Berg, 1992; Smith und Fuller, 1996). Da sich die Isolierung und Reinigung von ssDNA trotz kommerziell erhältlicher Phagen und spezieller Kits als zeit- und arbeitsaufwendig erwies (s. 3.5., S.44; Meeker *et al.*, 1993), wurde versucht, diesen Schritt durch chemische- bzw. Hitze-Denaturierung des ds-Templates zu umgehen (s. 3.11.2., S.49). Während Hersteller kommerzieller Sequencing-Kits (Anonym, 1991,1992,1994a) die Verwendung von ssPhagen-DNA (s. 3.5., S.44) für reproduzierbarere und gleichmäßigere Ergebnisse empfehlen, zeigten die eigenen Untersuchungen keine Unterschiede bei der Anwendung von ss- oder dsDNA. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß die Denaturierung des ds-Templates eine echte, Zeit und Kosten sparende Alternative zur ssDNA-Gewinnung darstellt. Für Untersuchungen mit dem T7-Sequencing-System und bei der automatischen Sequenzierung konnten so ausschließlich ds-Templates, die erst kurz vor der eigentlichen Sequenzreaktion denaturiert wurden, mit Erfolg eingesetzt werden (s. 4.2., S.61).

Die Anzahl der pro Reaktionsansatz **ablesbaren Nukleotide** ist eine Frage der Auflösung, d.h. der Möglichkeit, Moleküle der Kettenlänge n und $n+1$ während der Elektrophorese voneinander zu trennen (Wink und Wehrle, 1994). Während Sanger *et al.* (1977) maximal Ketten mit einer Länge von 300 Nukleotidresten sequenzieren konnte, erlauben die heute gängigen Elektrophoresetechniken die Analyse von weit über 300 Nukleotiden (Singer und Berg, 1992). In eigenen Untersuchungen konnten 200->400 Nukleotide mit einer Auftragung voneinander getrennt werden (s. Tab.15, S.62). Ein versetzt angeordnetes Auftragen der Proben und die Entwicklung besonders langer, schräggestellter oder keilförmiger Gele steigert dabei die Anzahl der Basen, die von einem einzigen Gel gelesen werden können, erhöht jedoch auch die Schwierigkeiten und Kosten bei der Herstellung des Gels (Ibelgaufits, 1990; Wink und Wehrle, 1994). Insgesamt erwies sich ein 55 cm langes, vertikales, keilförmiges (0,1-0,6 mm) Gel für die Auftrennung von bis zu 450 radioaktiv markierten Nukleotiden innerhalb von ca. 4 h als geeignet (s. 3.11.2., S.49; Tab.14, S.62). Ein Gel dieser Größe ließ sich nach einer gewissen

Einarbeitungszeit problemlos herstellen. Die Anzahl der mit einer Auftragung identifizierbaren Nukleotide (s.o.) lag damit über (Sagner, 1993) bzw. in der von anderen Untersuchern (Singer und Berg, 1992; Schröder, 1993) erreichten Größenordnung.

Mit dem ALF DNA-Sequenzierautomaten (Fa. Pharmacia) wurden ca. 250 bp sicher prozessiert (s. Tab.15, S.62). Damit ließen sich im Vergleich mit den radioaktiven Sequenzierungsmethoden zwar bis zu 200 bp weniger analysieren, ein besonderer Vorteil der automatischen Sequenzierungsmethode lag jedoch in der einfachen Übernahme der Daten in das angeschlossene EDV-System. Im Gegensatz dazu bietet die Anwendung der autoradiographischen Methoden trotz des Vorhandenseins digitaler Bildscanner (Singer und Berg, 1992) weniger Möglichkeiten des computergestützten Einlesens der Sequenz.

Die **Menge der einzusetzenden DNA** hängt von verschiedenen Faktoren ab: der Größe des Fragmentes, der Anzahl der Reaktionsschritte und der Erfahrung des Experimentators (Ibelgauf, 1992). Etwa 1,5 -2,0 µg dsDNA waren sowohl bei der Methode nach Sommer (1992) als auch für die Sequenzierung mit dem T7-Sequencing-Kit (Anonym, 1994c) ideal (s. 4.2., S.61). Nach Angaben des Testkit-Herstellers reichen für das DNA Cycle-Sequencing mit dem Hot Tub-System 40 fmol dsDNA (= 0,088 µg PUC Vektor, bzw. 0,1 µg pGemT-Vektor mit *env*-Insert) oder 10 fmol ssDNA für ein exaktes Ergebnis (Anonym, 1991). In eigenen Untersuchungen konnten jedoch erst ds-Quantitäten ab 0,25 µg erfolgreich eingesetzt werden. Diese Ergebnisse liegen auch über der nach Erkenntnissen von Smith und Fuller (1996) erforderlichen ds-Template-Menge von 0,05 µg bzw. 0,08 µg PCR-Produkt (Barnard *et al.*, 1994). Als mögliche Ursache dieser Diskrepanz kommen z.B. störende Zusätze im Ausgangsmaterial und suboptimale Reaktionsbedingungen in Frage.

Der Einsatz des ALF-Sequenzautomaten (Fa. Pharmacia) macht mindestens 5-10 µg DNA-Template erforderlich (Anonym, 1994a). Seine Anwendung setzt damit in den meisten Fällen eine vorherige Vermehrung des zu sequenzierenden Materials voraus. Sowohl bei dieser Methode als auch beim T7-Sequencing-System zeigte sich jedoch, daß der DNA-Konzentration nach oben kaum Grenzen gesetzt sind.

Die größten **Schwierigkeiten** bereiten bei der Auswertung von Sequenzgelen die sogenannten "pile-ups" (Bandenzusammenballungen), die durch Schleifenbildung der DNA und daraus resultierender Basenpaarung hervorgerufen werden. Auf dem Röntgenfilm ist dann anstelle von beispielsweise vier separaten aufeinanderfolgenden Guanins an gleicher Position eine dicke Bande sichtbar (Ibelgauf, 1990; Schröder, 1993; Anonym 1994a,c). Aus diesem Grund wurden alle Reaktionsgemische vor dem Auftragen auf das Polyacrylamid-Sequenzgel in Gegenwart von Formamid für 2 min auf 100°C erhitzt, um intermolekulare Hybride aus Primer-Extensionsprodukten und Template-Strang zu denaturieren. Neben diesen intermolekularen Hybriden kann auch die Ausbildung intramolekularer Hybride das elektrische Laufverhalten stören und zu einer Bandenkompression führen (Wink und Wehrle, 1994). Diesem Problem wurde durch den Zusatz von Harnstoff zum Polyacrylamid-Sequenzgel (Ansorge *et al.*, 1978) und der Verwendung von einer während des Gellaufes auf 45°C

temperierten Glasplatte (Ambartsumyan und Mazo, 1980) entgegengewirkt. Der Hersteller des *Taq*-Polymerase Sequencing-Kits (Firma Stratagene, Anonym, 1991) betont die Überlegenheit dieses Enzyms gegenüber der T7-Polymerase beim Lesen schwieriger G- und C-reicher Template-Regionen und Palindromsequenzen. Wenn auch der G- und C-Reichtum des BLV in keinem Verhältnis zu dem anderer Viren steht (z.B. Herpes-Viren, Schröder, 1993), so konnten jedoch innerhalb des untersuchten *env*-Fragmentes kaum Unterschiede beim Lesen dieser schwierigen Regionen zwischen den Enzymen *Taq*-Polymerase (z.B. Methode nach Sommer [1992], s. 3.11.2., S.49) und T7-Polymerase (T7-Sequencing-Verfahren, s. 3.11.2., S.49) festgestellt werden (s.Tab.15, S.62).

Die **Spezifität**, die mit der Sanger-Methode erreicht wird, soll generell geringer als mit der Maxam-Gilbert-Methode sein, dennoch können geübte Leser eine Sequenz bis zu 200 bp und Sequenzierungsautomaten eine Sequenz von bis zu 350 bp mit 99%iger Genauigkeit lesen (Elder *et al.*, 1986; Koop *et al.*, 1993). Die Fehlerraten beim Lesen eines Stranges nach der Sanger-Analyse hängen mit sequenzabhängigen Variationen der Kettenabbruch-Frequenz, Bandenzusammenballungen und der Entstehung künstlicher Banden zusammen (Ibelgauf, 1990). Alle Ergebnisse wurden deshalb durch die Sequenzierung des komplementären Stranges (Problemzonen an einem Strang waren auf der Gegenseite oft klar zu lesen) bzw. Mehrfachsequenzierung überprüft. Dabei konnte festgestellt werden, daß die Fehlerrate beim Lesen weitaus geringer lag als die von Elder *et al.* (1986) publizierte. Es ist denkbar, daß die Verwendung besonders hochauflösender Filme (s. 4.2., S.61; Abb.5a-b, S.64) die Auswertbarkeit steigerten.

Entscheidend für die Auswahl der Sequenzierungsmethode ist neben den bereits diskutierten Parametern auch, gerade in der Veterinärmedizin, der notwendige **Zeitaufwand** und die zu erwartenden **Kosten**. Bei einem Vergleich der Kostenhöhe steht die automatische Sequenzierungsmethode mit Abstand an oberster Stelle. Das ist zum Großteil auf die Anschaffungskosten der Apparatur (ca. 150.000,- DM für den ALF DNA-Sequencer der Firma Pharmacia Biotech) und den höheren Preis des AutoRead Sequencing-Kits zurückzuführen. Das LKB 2010 Macrophor Sequencing-System (Preis ca. 8000,- DM) konnte universell für die beschriebenen radioaktiven Sequenzierungsmethoden genutzt werden. Der höhere Zeitaufwand (definiert als Zeitraum vom Beginn der Sequenzierungsreaktion bis zum Vorliegen eines Ergebnisses) bei den angewandten radioaktiven Verfahren ergab sich in erster Linie aus der Wartezeit während der Exposition des Filmes (Ansorge *et al.*, 1987), die bei dem durchgeführten automatischen, mit Fluoreszenzstoff-markierten Primern arbeitenden Verfahren vollständig entfiel. Aus rein materieller Sicht scheint sich damit die Anschaffung eines Sequenzierungsautomaten nur dann zu lohnen, wenn entweder Untersuchungsergebnisse nach kürzester Zeit zur Verfügung stehen müssen oder aber gewährleistet ist, daß dieser Automat gut ausgelastet wird.

Der entscheidende Vorteil fluorimetrischer Sequenzierungsmethoden ist der vollständige Verzicht auf jegliche **Radioaktivität** und potentielle radioaktive Gefährdung. In eigenen

Untersuchungen wurden hauptsächlich ^{35}S und ^{32}P als radioaktive Marker angewandt (s. 3.11.2., S.49). Dabei ist sowohl nach den Erkenntnissen von Autoren, wie Biggin *et al.* (1983) und Barnard *et al.* (1994), als auch nach den eigenen Erfahrungen, der Verwendung von radioaktiv-markiertem Schwefel Vorrang zu gewähren, denn es entstehen schmalere, klarere und eindeutiger Banden. Desweiteren stellt radioaktiv-markierter Schwefel aufgrund der geringeren Eindringtiefe seiner Strahlung ein eher vertretbares gesundheitliches Risiko dar. Seine Anwendung erlaubte, wegen der im Vergleich zu ^{32}P wesentlich längeren Halbwertszeit, eine flexiblere Arbeitseinteilung. Die Verwendung von Hyperfilm α max anstelle von Hyperfilm MP (s.3.11.4., S.52) ermöglichte auch für ^{35}S die relativ kurze Expositionszeit von nur 18 h bei eindeutigem Ergebnis (s. 4.2., S.61; Abb.5a-b, S.64).

Versuche von Leitner *et al.* (1993) zeigten, daß die **direkte Sequenzierung von PCR-Produkten** weder in Bezug auf Sensitivität noch Sensibilität Nachteile gegenüber klonierten Produkten aufweist. Der traditionelle Weg, um heterogene Genome zu analysieren, besteht in der Synthese spezifischer Fragmente, der Ligation dieser Genomabschnitte in standardisierte Vektoren, der Vermehrung dieser Plasmide in kompetenten Zellen, der Isolierung möglichst vieler, positiver, einzelner Klone und der anschließenden Analyse des Inserts unter Verwendung kommerzieller Sequenzprimer (Innes *et al.*, 1988; Leitner *et al.*, 1993). Diese Prozedur zeigte Nachteile gegenüber der Direktsequenzierung, denn jede Klonierung war aufwendig und zeitraubend. Die sogenannte "Direktsequenzierung" hat den großen Vorteil, daß hier die potentielle Fehlerrate gegenüber klonierten PCR-Produkten deutlich geringer ist (Innes *et al.*, 1988; Leitner *et al.*, 1993). Werden die PCR-Fragmente vor ihrer Sequenzierung kloniert, so besteht die Möglichkeit, bei der anschließenden DNA-Präparation gerade einen jener Klone zu treffen, dessen DNA eine PCR induzierte DNA-Mutation (die *Taq*-DNA-Polymerase weist eine durchschnittliche Fehlerrate von ca. 1:10.000 bzw. 3:10.000 auf [Eckert und Kunkel, 1991; Willems *et al.*, 1993]) enthält. Wird jedoch die Gesamtmenge der Amplifikationsprodukte als Template für die Sequenzreaktion eingesetzt, so werden die während der PCR-Reaktion zufällig falsch eingebauten Nukleotide, statistisch gesehen ausverdünnt und sind im anschließenden Sequenzgel nicht mehr sichtbar (Wink und Wehrle, 1994). Diese allgemeinen Beobachtungen bestätigten sich bei der Sequenzierung verschiedener BLV-*env*-Klone des Rindes 68. Wie aus Anhang 9.1. (s. S.154) und Tabelle 19 (s. S.75) zu entnehmen ist, wiesen die Klone 14 und 18 des Rindes 68 eine unterschiedlich Sequenzabweichung im Vergleich zum japanischen Isolat auf. Da das *env*-Insert beider Klone aus der gleichen PCR stammt, kann die Ursache der unterschiedlichen Base an Position 5133 ein *Taq*-Polymerasefehler sein. Hingegen zeigte der Vergleich von jeweils 533 Nukleotiden sechs verschiedener, das *tax*-Fragment (Np 6978-7944) enthaltender Klone des Tieres 6, eine hundertprozentige Übereinstimmung zwischen den Klonen (s. 4.6.3., S.94). Neben der reduzierten Fehlerrate profitierte die Direktsequenzierung von Amplifikationsprodukten auch von den allgemeinen Vorteilen der PCR-Reaktion (Rosenthal *et al.*, 1993) wie: geringer Zeit- und Materialaufwand, hohe Reinheit (die Amplifikationsprodukte sind frei von störendem

zellulärem Material), Reproduzierbarkeit (konstante Reaktionsbedingungen liefern Amplifikationsprodukte in gleichbleibender Qualität) und hoher Quantität der spezifischen Sequenz. In eigenen Untersuchungen konnten maximal Nulkeotidketten von 230 bp direkt sequenziert werden. Es ist denkbar, daß die Konzentration des Amplifikates zu gering war und/oder nicht verbrauchte Nukleotide und PCR-Primer auch durch die Reinigung der Fragmente (s. 3.10.2., S.47) nicht vollständig entfernt wurden und störend wirkten.

Um die Schwierigkeiten bei der Sequenzierung von doppelsträngiger PCR-Produkte zu umgehen, wurde die von Gyllenstein und Ehrlich (1988) beschriebene asymmetrische PCR durchgeführt. Die Sequenz des in Abbildung 5a (s.S.64) gezeigten, nach asymmetrischer PCR gewonnenen *tax*-Fragmentes war über einen Bereich von 400 bp, die des "normalen" PCR *env*-Fragmentes (s. Abb.5b, S.64) nur über einen Abschnitt von 230 bp lesbar. Somit konnte die Vermutung von Wink und Wehrle (1994), daß ein höherer Anteil einzelsträngiger Templates, bei insgesamt verringerter PCR-Ausbeute, für die direkte Sequenzierung von PCR-Produkten von Vorteil zu sein scheint, bestätigt werden. Damit ist die asymmetrische PCR die Methode der Wahl, wenn PCR-Produkte direkt sequenziert werden sollen. Aus molekularbiologischer Sicht stellt die direkte Sequenzierung von PCR-Produkten insgesamt den rationellsten und sicher auch schnellsten Weg zwischen der Präparation von Template-DNA und dem Auswerten des daraus abgeleiteten Sequenzgels dar (Bevan *et al.*, 1992).

In einem Punktsystem nach Tabelle 14 (S.62) wurden verschiedene Sequenzierungsmethoden (Methode nach Sommer [1992], Hot Tub DNA-Sequencing-Verfahren, T7-Sequencing, AutoRead-Sequencing) hinsichtlich Zeitaufwand, Auswertbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, Anzahl sequenzierter Basen, Kostenfaktor und radioaktiver Gefährdung miteinander verglichen (s. Tab.15, S.62). Die Verwendung des T7-Sequencing-Kit (Fa. Pharmacia) mit radioaktiv markiertem Schwefel erwies sich für die eigenen Sequenzanalysen als am besten geeignet. Von besonderer Bedeutung war dabei, daß das T7-Sequencing-System unabhängig von den verwendeten Sequenzprimern einsetzbar war. Alle einmal ermittelten Ergebnisse konnten reproduziert werden, die Kosten dieses Verfahrens waren im Vergleich mit den anderen Methoden relativ gering. Die Anwendung des Hot Tub DNA-Sequencing-Systems erwies sich durch den großen zeitlichen Aufwand und die relativ hohe radioaktive Gefährdung (s. Tab.15, S.62) als ungeeignet für die Untersuchungen. Dieses Sequenzverfahren sollte dem Einsatz bei geringster Menge an Ausgangstemplate vorbehalten bleiben. Die Methode nach Sommer (1992) erfordert vielfältige Vorarbeiten für die Herstellung der Arbeitslösungen (s. 3.2., S.37). Der dafür notwendige Zeit- und Organisationsaufwand scheint unter den gegenwärtigen Verhältnissen antiquiert. Das AutoRead-Sequencing-Verfahren erwies sich bei aller Eleganz, geringstem zeitlichen Aufwand und fehlender radioaktiver Gefährdung (s. Tab.15, S.62) als zu empfindlich gegenüber schwankender Konzentration und Reinheit des Ausgangsmaterials. Die vom Hersteller des Kits geforderte DNA-Konzentration von mindestens 1 µg/µl ist im Vergleich mit den anderen Kits 5-10fach höher (s. 3.11.2., S.49; Anonym 1992, 1994a,c). Die ungenügende Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des AutoRead-

Sequencing-Verfahren (Punktwert 3 in Tab.15, S.62) kann ihre Ursache in der zu geringen Quantität bzw. Qualität der Template-DNA einerseits und der Empfindlichkeit des Systems gegenüber universellem Primereinsatz andererseits haben. Dennoch bleibt die automatisierte Sequenzierung von DNA aufgrund des geringen personellen Aufwandes und der Möglichkeit einer schnellen und korrekten Umwandlung der ermittelten Sequenz in digitale Signale insbesondere für „large-scale“-Sequencing-Projekte (Ansorge *et al.*, 1987; Innes *et al.*, 1988; Koop *et al.*, 1993) die zukunftssträchtigste Methode.

Anhand der geschilderten Ergebnisse läßt sich zusammenfassend feststellen, daß

- sich das T7-Sequencing-Verfahren hinsichtlich Rentabilität und Praktikabilität für die eigenen Untersuchungen als das geeignetste erwies (bei relativ geringem Material- und Kostenaufwand konnten Primer universell eingesetzt werden und somit die verschiedenen Abschnitte des BLV-Genoms mit 100%iger Reproduzierbarkeit analysiert werden),
- die direkte Sequenzierung asymmetrischer PCR-Produkte aus molekularbiologischer Sicht den rationellsten und sicher auch schnellsten Weg zwischen der Präparation von Template-DNA und dem Auswerten der daraus abgeleiteten Sequenz darstellt,
- eine automatisierte Sequenzierung von DNA die Methode der Zukunft sein wird.

5.2. Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis einer BLV-Infektion mittels AGID, ELISA, Leukozytenkurzzeitkultur und PCR

Die Tabelle 13 (S.59) zeigt eine Gegenüberstellung der AGID-, ELISA- und PCR-Ergebnisse zum Nachweis von BLV-AK bzw. BLV-Provirus von 37 Rindern deutscher Herkunft. Diese Tiere konnten anhand ihres **serologischen Status und Provirusgehaltes** in vier Gruppen eingeteilt werden (Tab.13, S.59). Drei Probanden (8%) zeigten, bei ständig negativem AGID, im ELISA fragliche Ergebnisse. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Rindern um schwache Seroreagenten, deren AK-Spiegel an der Sensitivitätsgrenze des ELISA liegt. Derartige Fälle wurden auch von Straub *et al.* (1980) beschrieben. Insbesondere das Tier 134 war schon im Vorfeld der Untersuchungen durch fragliche und positive ELISA-Resultate hervorgetreten (Blankenstein, 1996; Mewes, 1996). Für diese Problemtiere erwies sich die PCR als geeignet, fragliche serologische Befunde abzuklären.

Die Tabelle 13 (S.59) verdeutlicht, daß von 24 der 37 untersuchten Rinder (65%) übereinstimmende Ergebnisse der serologischen Untersuchung und des Provirusnachweises mittels PCR vorlagen (davon 14 Tiere [38%] übereinstimmende negative, 10 Tiere [27%] übereinstimmende positive Ergebnisse). Weitere 10 Probanden (27%) wiesen im ELISA und soweit untersucht auch im AGID negative, in der PCR jedoch positive Resultate auf. Dieses Ergebnis liegt über den Erkenntnissen anderer Untersucher, die 6,5% (Jacobs *et al.*, 1992), 5% (Agresti *et al.*, 1993) bzw. 11,4% differente Befunde erhielten. Eine mögliche Ursache für die gegenüber den anderen Untersuchern ermittelte höhere Diskrepanz ist in der Auswahl des

Tiermaterials zu sehen. Alle seronegativen Provirussträger (s. Tab.13, S.59; s. 3.1.1., S.35) entstammten Beständen, in denen seit 1986 (Bestand 1) bzw. 1990 (Bestand 2) keine BLV-AK mehr nachgewiesen werden konnten bzw. Tiere nach einem positiven AK-Befund sofort gemerzt wurden. Damit konnte von seronegativen Befunden ausgegangen werden.

Wie jedoch läßt sich das Auftreten serologisch negativer Provirussträger erklären? Auf der einen Seite wird über das Vorkommen einer intrauterin erworbenen Immuntoleranz bei einem im Uterus infizierten Nachkommen einer BLV-positiven Mutter berichtet (Beier, 1996; Straub, 1996). Andererseits könnte es sein, daß der Provirusnachweis zu einem sehr frühen Infektionszeitpunkt erfolgte, an dem das betroffene Tier noch keine BLV-AK entwickelt hatte (Burkhardt *et al.*, 1991). Wahrscheinlicher ist, daß sich in den ostdeutschen Beständen schwach immunogene Virusmutanten etablieren konnten (**BLV-Virusselektions-Hypothese**). Die BLV-Selektionsprogramme in Deutschland begannen mit der Aussonderung von AGID-positiven Tieren (Wittmann, 1993). Später wurde der sensitivere ELISA für die Bekämpfungsprogramme genutzt. Damit wäre es theoretisch auch möglich, daß im Zusammenwirken mit anderen Bekämpfungsprogrammen die Rinderpopulation auf immunologisch schwache Reagenten selektiert wurde (**BLV-Wirtsselektions-Hypothese**).

Von den in der LKK untersuchten Tieren (s. 4.7., S.94) konnte nur im ZKÜ der LKK von den seropositiven Tieren mittels ELISA (ZKÜ-ELISA) eine AG-Expression nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde bei den genannten Tieren die Expression BLV-spezifischer Proteine nach Untersuchung des über die LKK gewonnenen Zellpellets auch mittels Western-Blot-Analyse gezeigt. Die seronegativen Probanden 273 und 324 (s. Tab.13, S.59) wiesen schwache Banden bei 51 kDa auf. Da sich Banden gleicher Intensität auch an anderen Positionen ausbildeten, ist ihre Spezifität nicht eindeutig geklärt. Ein alleiniges Auftreten von gp51-Banden (bei Fehlen der p24-Bande) könnte entweder auf eine niedrige Expression des BLV in der LKK, auf die Integration inkompletter Viren (Burny *et al.*, 1980; Van den Broeke *et al.*, 1988; Willems *et al.*, 1995b) oder auf das Vorhandensein intrazellulärer Hemmechanismen (Gupta und Ferrer, 1982; Gupta *et al.*, 1984) schließen lassen. Bei allen anderen seronegativen Provirusträgern konnte keine virale Expression nachgewiesen werden, was bei den betroffenen Zellen *in vivo* mit einem Selektionsvorteil einhergehen könnte (Willems *et al.*, 1995b).

Ungewöhnlich schien das Ergebnis des fehlenden AG-Nachweises des Tieres 2 (s. Tab.31, S.95). Bei diesem über Jahre im ELISA und AGID BLV-seropositiven Tier konnte nach LKK in der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen keine Virusexpression nachgewiesen werden. Da zu diesem Zeitpunkt auch der BLV-Provirusnachweis in peripheren Blutlymphozyten mittels PCR negativ verlief (Blankenstein, 1996), kann möglicherweise davon ausgegangen werden, daß erst jetzt (das Tier zeigt seit 1996 stabil positive PCR-Befunde) die Immunabwehr des Tieres soweit geschwächt ist, daß das Virus in der Blutbahn zirkulieren kann. Interessant wäre es, solche PCR-negativen Tiere auf das Vorhandensein von Virus in Lymphknoten und Milzzellen zu untersuchen (Edgington, 1993; Klintevall *et al.*, 1994).

Insgesamt ist die LKK als Mittel zur Diagnostik der eRL aufgrund der dem ELISA gleichzusetzenden Sensitivität (Klintevall *et al.*, 1994) und vor allem ihres wesentlich höheren Arbeitsaufwandes wegen (s. 3.13, S.55; 3.14., S.56) nicht zu empfehlen. Sie bleibt wissenschaftlichen Untersuchungen zum Nachweis replikationskompetenter Viren vorbehalten (Kuzmak, 1993b).

Als Zufallsbefund ist das Auftreten von Theilerien in der LKK des Tieres 324 zu werten (s.4.7., S.94). In Europa kommt insbesondere *Trypanosoma theileri* (*T. theileri*) vor. Etwa 66% der deutschen Rinder sind davon befallen. Vektoren sind Tabaniden und Schildzecken, die Übertragung erfolgt oral (Zerbeißen der Vektoren) oder durch Zeckenstich. In der Regel wird *T. theileri* als apathogen angesehen (Rommel, 1992). Hingegen lassen Mitteilungen von Ward *et al.* (1984) sowie Liggert und Goldsmith (1986) eine gewisse Pathogenität vermuten. So soll nach vorausgegangener Immunisierung gegen virale Infektionskrankheiten *T. theileri* Verluste an Rindern verursacht haben. Auch über Todesfälle bei trächtigen Kühen und intrauterin infizierten Kälbern wird berichtet. Versuche von Miller *et al.* (1969) zeigten, daß sie vor allen in LKK von Tieren mit Lymphosarkomen und Tieren mit persistierender Lymphozytose nachgewiesen werden konnten.

Zusammenfassend läßt sich aus den vergleichenden Untersuchungen zum Nachweis einer BLV-Infektion mittels AGID, ELISA, LKK und PCR an 37 Rindern erkennen, daß

- nur bei starken Seroreagenten stabile positive ELISA- und AGID-Befunde zu erwarten sind,
- es innerhalb der einheimischen Rinderpopulation einen Anteil seronegativer Provirussträger gibt,
- eine Erklärung dafür in der Selektion auf besonders schwach immunogen wirkende Viren (BLV-Virusselektions-Hypothese) oder aber auf immunologisch schwach reagierende Rinder (BLV-Wirtsselektions-Hypothese) zu suchen ist,
- der ELISA allein trotz seiner hohen Praktikabilität und Rentabilität nicht die einzige Methode für BLV-Sanierungsprogramme sein kann, da mit dem Auftreten seronegativer BLV-infizierter Tiere gerechnet werden muß,
- andererseits die PCR den ELISA nicht generell ersetzen kann, da auch die Konstellation eines positiven AK-Nachweises bei negativem Provirusnachweis in peripheren Blutlymphozyten berücksichtigt werden muß,
- die PCR gerade in der Phase der Endsanierung die Möglichkeit bietet, schwache Seroreagenten zu erkennen und somit den Sanierungserfolg zu verbessern und Neuausbrüchen vorzubeugen.

5.3. Untersuchungen im LTR-Bereich des BLV

Die LTR-Region des BLV enthält die für die virale Integration, Replikation und Transkription entscheidenden Sequenzen (Sagata *et al.*, 1984a). Das Vorhandensein konservativer Regionen, wie den inversen Repeats, dem cap-site sowie der CAT- und TATA-Box, machen diese Region zu einem besonderen Forschungsgegenstand.

Aus diesem Grund wurden 23 Probanden (s. Tab.13, S.59) in der LTR-PCR getestet und mittels Restriktionsenzym- und Sequenzanalysen näher charakterisiert. Alle inserthaltigen Klone der genannten Tiere entsprachen in der Restriktionsenzymanalyse (s. Abb.7a-b und 8a-c, S.66-67) dem Erwartungsmuster des japanischen Isolates (s. Tab.16, S.66). Eine entscheidende Ausnahme bildete das *PvuII*-Spaltergebnis der inserthaltigen Klone des Tieres **134** (s. Abb.8b, S.67). Das Entstehen der 700 bp großen Bande anstelle der erwarteten 500 und 210 bp großen Banden ließ auf das Fehlen der für das japanische Isolat beschriebenen beiden *PvuII*-Spaltorte (s. Tab.16, S.66) schließen. Da die Enzyme *PstI* und *BglI* keinen Spaltort im Fragment selbst besitzen (s. Tab.16, S.66), kann das Entstehen der nach der Restriktionskarte des japanischen Isolats erwarteten Spaltfragmente lediglich ein Hinweis auf das Vorhandensein eines Inserts in Größe eines LTR-Fragmentes sein. Die dargestellten Ergebnisse lassen jedoch den Schluß zu, daß sowohl zwischen dem untersuchten serologisch fraglichen Tier 134 und den untersuchten serologisch negativen Tieren (s. 4.3.2., S.66) als auch zwischen dem Provirus des Tieres 134 und dem japanischen Isolat (Sagata *et al.*, 1984a) Unterschiede in der LTR-Sequenz bestehen.

Anhand von Sequenzanalysen der LTR-Region (s. 4.3.3., S.68) ließen sich die ermittelten Spaltergebnisse nicht erklären, da die dargestellten Sequenzen (s. Abb.10a-b, S.70) keinem der bekannten BLV-Isolate, bzw. der RSV-LTR, dem BIV oder dem pGemT-Vektor selbst zugeordnet werden konnten. Es ist denkbar, daß die ermittelte Nukleotidfolge dem bovinen Genom entstammt und somit die klonierten PCR-Fragmente zumindest teilweise durch unspezifisches Primerannealing entstanden sind (Anonym, 1994c). Das nukleäre bovine Genom besteht aus ca. 3 Milliarden bp, der Stand der Kartierung des Rindergenoms ist im Vergleich zum menschlichen Genom noch gering (Brade, 1996). Ein Vergleich der ermittelten Sequenz mit dem bovinen Genom erwies sich deshalb als nicht durchführbar. Jüngste Veröffentlichungen (Fries *et al.*, 1993; Barendse *et al.*, 1994; Bishop *et al.*, 1994) zeigten die enormen Bestrebungen bei der genetischen und physischen Kartierung des bovinen Genoms. Der Vermutung der Herkunft der ermittelten Sequenzen aus dem bovinem Genom widersprechen die exakte Größe der PCR-Fragmente sowie die Ergebnisse der Restriktionsenzymanalysen.

Das Spaltpattern des nach Ligation eines LTR-Fragmentes des Tieres 574 entstanden Plasmides (s. Spur 10 in Abb.8c, S.68) deutet auf einen Mischklon bzw. eine unvollständige Spaltung hin.

Auch die Autoradiographie (s. Abb.11, S.70) läßt das Vorhandensein mehrerer sich überlagernder Sequenzen vermuten, die eine Auswertung unmöglich machten. Es ist denkbar, daß es sich dabei um einen Teil des bovinen Genoms (nach unspezifischer Bindung des verwendeten Primers, s.o.) und des BLV-Genoms handelte, welche sich nicht von einander trennen ließen. Dieses Bild entsteht z.B., wenn ein Bakterienklon zwei Plasmide mit unterschiedlichen Genomabschnitten enthält.

Die in der PCR verwendeten Primer ließen sich problemlos für die Sequenzierung der LTR des HU-Klons (s. 3.1.2., S.37) verwenden. Dabei konnten zwei Substitutionen im Vergleich mit dem japanischen Isolat ermittelt werden (s. 4.3.3., S.68), davon eine in unmittelbarer Nähe des *env*-Spleißortes an Np 303-311 (Sagata *et al.*, 1985a). In Expressionsversuchen zeigten Wagner *et al.* (1995), daß sowohl die LTR des japanischen Isolates, als auch die FLK-BLV-LTR voll funktionsfähig sind. Daher kann vermutet werden, daß die ermittelten Substitutionen funktionell wenig bzw. nicht bedeutsam sind. Diese Vermutung wird durch die Tatsache, daß diese Veränderungen auch für die Ausbildung der Haarnadelstruktur (welche unbedingt notwendig ist, um poly(A)-Signal und poly(A)-site einander zu nähern [Sagata *et al.*, 1984a]) ohne Bedeutung bleiben, bestätigt (s. Abb.9, S.69). Nach Couez *et al.* (1984) kann die LTR ihre biologische Funktion nur deshalb erfüllen, weil sie, abgesehen von einigen bedeutenden Strukturen und Signalen, relativ tolerant gegenüber der genetischen Drift ist. Untersuchungen von Willems *et al.* (1993), nach denen die Mutationsrate für die BLV-LTR 0,034% pro Jahr beträgt und damit weit über der des *env*-Gens (0,009% pro Jahr) liegt, bestätigen die Notwendigkeit dieser „Toleranz“.

Aus den dargestellten Untersuchungsergebnissen der BLV-LTR läßt sich zusammenfassend feststellen, daß

- die Restriktionsenzymanalysen der LTR-Amplifikat-haltigen Klone der untersuchten serologisch negativen Tiere ein vollständig mit dem japanischen Isolat übereinstimmendes Spaltpattern ergaben,
- das Ergebnis der *PvuII*-Spaltung des LTR-Amplifikates des serologisch fraglichen Tieres 134 Unterschiede zu dem serologisch negativer Tiere und dem japanischen Isolat aufwies,
- die Sequenzierung der FLK-BLV-LTR und der Sequenzvergleich mit dem japanischen Isolat darauf hindeuten, daß trotz unterschiedlichster biologischer und geographischer Herkunft starke Sequenzhomologien bestehen,
- Veränderungen der FLK-BLV gegenüber dem japanischen Isolat auf strukturell wenig bedeutsame Sequenzabschnitte beschränkt blieben.

5.4. Untersuchungen von PCR-Fragmenten aus der *env*-, *tax*- und *pol*-Region verschiedener BLV-Isolate

Seit der Entdeckung der exogenen Natur des BLV wurden verschiedene BLV-Varianten identifiziert und beschrieben (Rice *et al.*, 1984,1985; Sagata *et al.*, 1985a; Coulsten *et al.*, 1990; Mamoun *et al.*, 1990; Molteni *et al.*, 1996) und im molekularen Vergleich festgestellt, daß sich die integrierten Proviren von einander unterscheiden.

Jedes in die Untersuchungen eingeschlossene Rind wurde in der PCR getestet. War der Provirusnachweis im *env*-Bereich positiv, folgte die Untersuchung des *tax*- und *pol*-Bereiches. Dabei gelang es nicht immer (s. Tab.13, S.59), von den in der *env*-PCR positiven Tieren auch ein *pol*- oder *tax*-Amplifikat zu synthetisieren. Die Ursache des fehlenden Provirusnachweises bei den restlichen Tieren kann an der gegenüber der *env*-PCR geringeren Sensitivität der Untersuchung liegen. Möglich ist jedoch auch, daß die in Anlehnung an die Nukleotidsequenz des japanischen Isolates erstellten Primer, aufgrund genetischer Unterschiede, keine Kompatibilität zu den Proviren der untersuchten Tiere besaßen. Ähnliche Erfahrungen beschrieben Marsolais *et al.* (1994) bei der Untersuchung kanadischer Rinder auf BLV-Feldvirus. Eine weitere Erklärung für den fehlenden Virusnachweis mittels *tax*- und *pol*-PCR besteht im Vorhandensein inkompletter Proviren (Kettmann *et al.*, 1979; Van den Broeke *et al.*, 1988; Willems *et al.*, 1995) in den untersuchten Tieren.

Die **Restriktionsenzymanalysen** klonierter und nicht klonierter BLV-*env*-Fragmente zeigten deutlich die auch von Coulsten *et al.* (1990), Mamoun *et al.* (1990) und Molteni *et al.* (1996) beschriebene Divergenz zwischen den Provirusisolaten unterschiedlicher Herkunft. So läßt das *Dra*I-Spaltergebnis (s. Abb.13, S.72) auf das Fehlen des im japanischen Isolat an Np 5425 vorhandenen Spaltortes bei dem seropositiven Tier 41335 schließen, während das Provirus des seronegativen Tieres 167 wie erwartet (s. Tab.17, S.71) spaltet. Die Ähnlichkeit des Tieres 167 zum japanischen Isolat verdeutlicht auch das Ergebnis der *Pvu*II- und *Bgl*I-Spaltung in den Abbildungen 14b bzw. 15 (s. S.73). Aus den Restriktionsenzymanalysen des *env*-Bereiches (aus den Spaltuntersuchungen im *pol*-Bereich lassen sich keine Schlußfolgerungen ziehen, da die verwendeten Enzyme im pGemT-Vektor selbst spalteten) kann gefolgert werden, daß die analysierten Rinder unterschiedliche BLV-Proviren enthielten. Um diese Erkenntnisse zu untermauern, mußte die provirale DNA auf molekularer Ebene weiter untersucht werden. Dazu wurden 443 bp des *env*-Gens sowie Teile des *pol*- und *tax*-Gens sequenziert, die Ergebnisse in den Anhängen 9.1. (s. S.154), 9.3. (s. S.165) und 9.5. (s. S.169) wiedergegeben und einander gegenübergestellt (s. Tab.19, S.75; Abb.16, S.77). Es wird ersichtlich, daß die Isolate BEL, M2, M3, 2, 6869, 15313 und 41335 eher dem belgischen, als dem japanischen Isolat ähnelten. Die Isolate AST, FLK, 68-14, 68-18, 167 und 574 verhielten sich konträr. Die Proviren der Tiere 45 und 134 besaßen mit dem australischen Isolat die höchste Übereinstimmung. Damit gehören alle seropositiven Tiere, mit Ausnahme des Rindes 45 (s. Tab.13, S.59), zu der von Mamoun *et al.* (1990) konstruierten europäischen Subgruppe, die

seronegativen (in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Fechner, 1995) zur japanisch/amerikanischen Subgruppe.

Die eigenen Sequenzuntersuchungen im *env*-Bereich weisen auf die Existenz von

- zwei BLV-Provirusmutanten serologisch negativer Tiere (**BLV-D⁻**)
- zwei BLV-Provirusmutanten serologisch fraglicher Tiere (**BLV-D^{-/+}**)
- vier verschiedenen BLV-Provirusmutanten serologisch positiver Tiere (**BLV-D⁺**) hin.

Auch im *pol*- und *tax*-Bereich (s. Anhänge 9.3., S.165 und 9.5., S.169) zeigten sich deutliche Unterschiede in den Nukleotidsequenzen seronegativer Tiere (68, 574) und seropositiver Tiere (6, 15313). Insgesamt ähnelten die seropositiven Tiere mehr dem belgischen Isolat (Rice *et al.*, 1984,1985) und die seronegativen Tiere mehr dem japanischen Isolat (Sagata *et al.*, 1985a).

Zusammen mit den Ergebnissen aus der Analyse des *tax*-Bereiches und dem Vergleich von seropositiven und seronegativen Tieren (Tier-Nr. 6, 15313 bzw. 574) ließ sich das Vorhandensein von BLV-D⁺- und BLV-D⁻-Mutanten vermuten.

In den vergangenen Jahren wurde von verschiedene Autoren die große genetische Variabilität der Retroviren betont (Temin, 1961; Katz und Skalka, 1990; Coffin, 1992). In diesem Zusammenhang stellten Mamoun *et al.* (1990) 6% Variabilität im ***env*-Gen** von 7 verschiedenen BLV-Isolaten fest. Gleichzeitig zeigten Untersuchungen von Willems *et al.* (1995b), daß zumindestens für den *env*- und LTR-Bereich des BLV asymptomatisch infizierter Tiere, von einem völligen Fehlen genetischer Variationen innerhalb eines Tieres über mehrere Monate auszugehen ist. In Übereinstimmung mit Portetelle *et al.* (1989a), Coulston *et al.* (1990), Mamoun *et al.* (1990) und Molteni *et al.* (1996) bestätigten die eigenen Untersuchungen, daß das *env*-Gen nur eine geringe Neigung zu Sequenzvariationen besitzt (maximal 14 Abweichungen auf 444 bp zum japanischen Isolat [3,4%], s. Tab.20, S.76). Bei keinem der untersuchten Isolate konnten im Vergleich mit dem japanischen oder belgischen Isolat Nukleotiddeletionen oder -insertionen beobachtet werden. Desweiteren bestätigen die eigenen Untersuchungen, daß gerade im gp51-Bereich Veränderungen der As-Sequenz sehr begrenzt sind (Coulston *et al.*, 1990). Nur in maximal 10% führten Änderungen der Nukleotidsequenz im *env*- oder *pol*-Bereich auch zu Änderungen der As-Sequenz (s. Tab.23, S.83; Tab.27, S. 89; Coulston *et al.*, 1990; Mamoun *et al.*, 1990). Im Gegensatz dazu zeigt die Tabelle 30 (s. S.92) für den untersuchten *tax*-Bereich, daß bis zu 50% der Nukleotidveränderungen eine Änderung der kodierten As bedingten.

Die Sequenzvariationen der verschiedenen Isolate im gp51-Bereich betreffen in erster Linie die Konformationsepitope F, G und H (Mamoun *et al.*, 1990). Das **F-Epitop** wird durch die As 95, das **H-Epitop** durch die As 56 und 58 der *env*-As Sequenz determiniert (Mamoun *et al.*, 1990). Die As 95 wird durch die Nukleotide 5106-5108 der *env*-Sequenz kodiert. Innerhalb dieses Bereiches zeigten alle untersuchten Isolate das gleiche Sequenzbild (s. Anhang 9.1., S.154). Die das H-Epitop charakterisierenden As befinden sich nicht im untersuchten Sequenzbereich. Geht man davon aus, daß die As 48, 73, 74 und 121 der *env*-As-Sequenz das **Epitop G** darstellen können (Mamoun *et al.*, 1990), so erfaßte der untersuchte *env*-Bereich die

As-Position 121 (kodiert durch das Triplet von Np 5181-5183) der *env*-Sequenz. An dieser Stelle wiesen die Tiere 6869, 15313, 41335 und 2 (s. Tab.19, S.75) sowie das belgische und zwei von Mamoun *et al.* (1990) untersuchten Isolate Nukleotidabweichungen auf, die zu einem Austausch der As Arginin gegen Histidin führten (s. Tab.24, S.84; Anhang 9.2., S.162). Daraus ließe sich die Vermutung ableiten, daß es sich bei den Tieren 15313, 41335 und 2 um BLV-Mutanten handelt, die das Epitop F besitzen, denen das Epitop G jedoch fehlt. Auch dem von Molteni *et al.* (1996) beschriebenen BLV-Isolat (BLV-I2) fehlte dieses Epitop. Aussagen über das Epitop H lassen sich anhand der eigenen Untersuchungen nicht treffen. Eine G⁻F⁺-Mutante gehört nach der Einteilung von Mamoun *et al.* (1990) zur europäischen BLV-Subgruppe. Da die genannten Epitope das Ziel natürlicher, neutralisierender AK sind, ist gerade ihre Veränderung von entscheidender Bedeutung für den Infektionsprozess und die Frage der Entstehung von Immuntoleranzen (Molteni *et al.*, 1996). Bruck *et al.* (1984a) testeten die antigenetische Stabilität der verschiedenen gp51-Epitope. Auch sie kamen zu der Feststellung, daß in der selben geographischen Region genetische Variationen in den bedeutenden Abschnitten des gp51 bestehen.

Coulsten *et al.* (1990) beschrieben die *pol*- und *env*-Region ihres BLV-Isolats nach einem Vergleich mit anderen Isolaten (Rice *et al.*, 1984,1985; Sagata *et al.*, 1985b) als gleichermaßen konservativ. Die eigenen Sequenzanalysen bestätigen diese Feststellung. So ergaben sich im *pol*-Bereich, nach einem Vergleich mit dem japanischen Isolat, maximal 23 Nukleotidsubstitutionen bei 673 verglichenen Nukleotiden (Tier 15313, s. Tab.26, S.88). Die Variationsrate beträgt demnach 3,5% im *pol*-Bereich und ist damit ähnlich der Rate im *env*-Gen. Die DNA-Sequenz des untersuchten *pol*-Bereichs (Np 4100-4900; s. Anhang 9.3., S.165) umfaßt das 3'Ende dieses Gens, welches nach Goff *et al.* (1981) und Sagata *et al.* (1985b) die virale Integrase kodiert. Die in Tabelle 27 (s. S.89) und Anhang 9.4. (s. S.169) dargestellten As-Abweichungen der Tiere 68 und 15313 im Vergleich zum japanischen (bzw. belgischen und australischen) Isolat zeigen die größere Ähnlichkeit des serologisch positiven Tieres 15313 zum belgischen Isolat. Geht man davon aus, daß die Integrase für die Integration des BLV und damit für eine produktive Infektion überhaupt verantwortlich ist (Hippenmeyer und Grandgenett, 1984; Quinn und Grandgenett, 1988), könnten Expressionsversuche die Bedeutung der gezeigten As-Unterschiede erklären. Dabei muß berücksichtigt werden, daß die ersten endständigen 5-12 bp invertierten Repeats an den Enden der LTR als spezielle Erkennungssignale für Integrationsenzyme von Bedeutung sind (Panganiban und Temin, 1983; Colicelli und Goff, 1988). In der Literatur ist die Bedeutung von BLV-*pol*-Mutationen auf die Integraseaktivität bisher nicht beschrieben, wenngleich Untersuchungen von Willems *et al.* (1993b) zeigten, daß eine BLV-Mutante mit einer weitreichenden Deletionen in der zweiten Hälfte des *pol*-Gens für Schafe nicht infektiös ist. Nach Untersuchungen von Goff *et al.* (1981) führten Mutationen am 3'Ende des *pol*-Gens anderer Retroviren, neben der bis 100fach verminderten Integrationsfähigkeit der Viren, auch zu einer Abnahme der Produktion viraler Partikel und einer verminderten Spaltung des *gag-pol*-Precursor-Proteins.

Von entscheidender Bedeutung für das Transaktivierungspotential des *tax*-Proteins sind die As 157-197 sowie die, vom Vorhandensein verschiedener Cystein- und Histidin-Reste abhängende und die indirekte Bindung von *tax* an die DNA unterstützende Herausbildung der Zink-Finger-Struktur (s. 2.2.3., S.17 und Abb.9, S.69; Willems *et al.*, 1992c). Da die in Tabelle 29 (s. S.91) beschriebenen Nukleotidabweichungen verschiedener BLV-Isolate gegenüber dem japanischen Isolat nicht jene Triplets erfassen, die für die Kodierung der entscheidenden Cystein- und Histidin-Reste verantwortlich sind, ist anzunehmen, daß die Herausbildung der Zink-Finger-Struktur nicht beeinflußt wird. Auch die zweite, für die Funktionsfähigkeit des *tax*-Proteins entscheidende Domäne (As 157-197), erwies sich für die untersuchten und mit dem japanischen Klon verglichenen Isolate als konservativ (s. Anhang 9.6., S.172). Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß nur das Provirus des Probanden 6 über den gesamten Bereich (As157-197) untersucht wurde (s. Tab.28, S.91) ist nur eine, in Übereinstimmung mit dem belgischen Isolat vorhandene As-Abweichung zum japanischen Isolat (s. Anhang 9.6., S.172) auffällig. Geht man davon aus, daß das *tax*-Protein des japanischen Isolates prinzipiell in der Lage ist, die Antigen-Produktion BLV-infizierter Zelllinien zu steigern (Wagner *et al.*, 1995), könnten As-Abweichungen zum japanischen Isolat diese Funktion verändern. Experimentell müßte daher parallel das Transaktivierungspotential verschiedener BLV-Isolate überprüft werden. Die mögliche Bedeutung einer einzigen As-Substitution zeigten Untersuchungen im gp30 des BLV (Willems *et al.*, 1993b). Die von diesen Autoren induzierte Mutation zerstörte vollständig das Infektionspotential des BLV für Schafe. Andererseits zeigten die genannten Autoren, daß selbst das vollständige Fehlen des XIII-Gens die Infektiosität des BLV nicht beeinträchtigt.

Die Bedeutung des Auftretens bestimmter Genom-Mutationen für die Entstehung von Tumoren ließ sich in unseren Untersuchungen nicht verfolgen, denn leukotische Veränderungen werden auf den Schlachthöfen oftmals als Zufallsbefunde oder spontane Rinderleukose bewertet. In keinem Fall war es möglich, die selektierten Probanden in den Normal- oder Krankenschlachtungen vom zuständigen Personal gezielt auf Leukose untersuchen zu lassen, oder von leukotisch veränderten Schlachtkörpern Material für serologische Untersuchungen sowie den Provirusnachweis zu erhalten. Insbesondere bei jenen Tieren, die sich jahrelang unauffällig verhielten und dann plötzlich AK (z.B. Tier 44, 45; s. 3.1.1., S.35) und z.T. leukotische Veränderungen (z.B. Tier 590) aufwiesen, wäre es von Interesse, auch das in die tumorös entarteten Zellen integrierte BLV-Provirus auf eventuell stattgefundene Mutationen zu untersuchen. Unklar ist, ob die untersuchte Provirusmutante BLV-D⁺ des Tieres 15313 zur Entstehung einer tumorösen Leukose geführt hat. Denkbar ist, daß ein einzelnes Virus mutiert ist und die maligne Zelltransformation hervorgerufen hat. Somit wäre es nicht ausgeschlossen, Unterschiede zwischen dem untersuchten Provirus dieses Rindes und aus Tumorgewebe isolierten BLV-Proviren zu finden. Nach Kettmann *et al.* (1985) ist das BLV-Genom in Tumorzellen oftmals partiell deletiert.

Biologisch besonders bedeutsame Sequenzbereiche, wie Spleißdonoren und -akzeptoren (Singer und Berg, 1992) erwiesen sich im gesamten Untersuchungsbereich als hoch konservativ (s. 4.5.3., S.88 und 4.6.1., S.91). Lediglich in der Nähe des Startkodons des *env*- und XII-Leserahmens befand sich eine Veränderung in der DNA-Sequenz des Provirus tragenden Tieres 15313 und des belgischen Isolates im Vergleich mit dem japanischen und australischen Isolat sowie dem des Tieres 68. Wenngleich diese unterschiedliche Nukleotidsequenz zu einer deutlichen Änderung der RNA-Sekundärstruktur führte (s. Abb.21a-b, S.87), die die Transfektionseffizienz beeinflussen könnte, so schien sie im konkreten Fall ohne Bedeutung für den serologischen und klinischen Status des Tieres 15313 zu sein, denn in Übereinstimmung mit dem japanischen und australischen Isolat war das Tier seropositiv und entwickelte Tumoren.

Ein interessanter Aspekt ergab sich aus dem Vergleich des aus Baden-Württemberg stammenden seropositiven Tieres 2 mit den aus Ostdeutschland stammenden, seropositiven Rindern (Tier 45, 6869, 15313). Alle Tiere zeigen ein sehr ähnliches Sequenzmuster und nur zwei der 10 Abweichungen des Tieres 2 zum japanischen Isolat sind nicht mit den Abweichungen der ostdeutschen Rinder identisch (Tab.19, S.75). Weiterführende Untersuchungen wären erforderlich, um auch in den westlichen Bundesländern seronegative Provirussträger zu ermitteln, ihre DNA-Sequenz zu analysieren und mit der ostdeutscher seronegativer Rindern zu vergleichen.

Die eigenen Untersuchungen der FLK-BLV zeigten, daß sich die in unserem Institut passagierte Sublinie 44 von anderen BLV-Isolaten unterscheidet (s. Anhänge 9.1., S.154 und 9.5., S.169). Diese FLK-BLV wurde im *env*- sowie *tax*-Bereich partiell analysiert. Ein Vergleich mit der von Mamoun *et al.* (1990) sequenzierten FLK-BLV im *env*-Bereich von Np 5099-5542 ergab eine 100%ige Übereinstimmung (Tab.19, S.75; Abb.16, S.77), während im übrigen Untersuchungsbereich zwei zu As-Veränderungen führende (s. Anhang 9.2., S.162) Nukleotidsubstitutionen zu beobachten waren. Ähnliche Ergebnisse ergab der *tax*-Sequenzvergleich zwischen der FLK des BLV-HU1-Klons (s. 3.1.2., S.37) anhand des Plasmides pSVN4313 und der von uns passagierten FLK 44 (s. Anhang 9.5., S.169 und Tab.29, S.92). Diese Tatsachen verdeutlichen die bereits zwischen verschiedenen FLK-BLV-Varianten vorhandene genetische und möglicherweise auch antigenetische Drift und unterstreichen die potentiellen Probleme bei der Nutzung dieser Zelllinie zur Produktion diagnostischer Antigene (s. 5.6., S.115).

Die Untersuchungen von *env*-, *tax*- und *pol*-Amplifikaten verschiedener BLV-Proviren deuten darauf hin, daß

- mindestens drei Provirusmutanten: **BLV-D⁻**, **BLV-D^{-/+}** und **BLV-D⁺** in deutschen Rinder-Beständen vorhanden sind,
- dem Auftreten von BLV-Mutanten insbesondere unter dem Aspekt der Entwicklung von Immuntoleranzen, der Fähigkeit zur Zelltransformation und der Selektion auf schwache Seroreagenten innerhalb der Rinderpopulation Rechnung zu tragen ist,
- den serologisch positiven Provirussträgern aufgrund von As-Veränderungen in der *env*-Region das gp51-Strukturepitop G fehlt,
- sich die *env*- und *pol*-Region (insbesondere auch deren Spleißakzeptoren und -donoren) der untersuchten BLV-Provirusisolate hinsichtlich Nulkeotidveränderungen und der daraus resultierenden As-Abweichungen konservativ verhielten,
- die ermittelten As-Veränderungen im 3'Ende der *pol*-Region von Einfluß auf die Integrationsfähigkeit des Virus sein könnten,
- die ermittelten As-Veränderungen der *tax*-Region einerseits mit großer Wahrscheinlichkeit ohne Einfluß auf die Ausbildung der Zink-Finger-Struktur sind, andererseits dennoch eine Bedeutung für das Transaktivierungspotential besitzen könnten,
- sich die in unserem Institut passagierte, BLV infizierte FLK-Subzelle von anderen FLK-Subzelllinien unterscheidet.

5.5. Der Einfluß von Nukleotidveränderungen auf die RNA- und Proteinsekundärstruktur

Für ausgewählte Bereiche des BLV-Genoms wurde unter Verwendung des Zuker-Stiegler Algorithmus (Anonym, 1994b) die RNA-Sekundärstruktur ermittelt. Die Abbildungen 17a-c (s. S.80-82) lassen erkennen, daß von einander abweichende Nukleotidsequenzen deutliche Unterschiede in der RNA-Sekundärstruktur bedingen. Dabei muß berücksichtigt werden, daß die Strukturanalyse einen eng begrenzten Bereich des gp51-Gens umfaßte und für definitive Schlußfolgerungen die virale RNA-Struktur in ihrer Gesamtheit, zumindest aber das vollständige *env*-Gen betrachtet werden muß (Singer und Berg, 1992). Auffällig ist die hohe Übereinstimmung der Sekundärstruktur des japanischen Isolats (s. Abb.17a, S.80) mit der des Provirus tragenden, serologisch fraglichen Tieres 134 (s. Abb.17b, S.81). Beide Isolate sind auch genetisch eng verwandt (s. Tab.19, S.75 und 20, S.76). Ein grundverschiedenes Bild zeigte die BLV-RNA des seropositiven Tieres 41335 (s. Abb.17c, S.82). Dieses Provirus wies auch im genetischen Muster starke Abweichungen zum japanischen Isolat auf (s. Tab.19, S.75 und 20, S.76).

Anhand der dargestellten Untersuchungsergebnisse ließ sich nicht klären, ob die unterschiedlichen RNA-Sekundärstrukturen von Bedeutung für elementare virale Funktionen wie Integration, Translation und Expression (Singer und Berg, 1992) sind. Zur Beantwortung

dieser Fragen wäre eine Klonierung der BLV-Proviren in eukaryotische Expressions-Vektorsysteme und eine anschließende Expression in infizierten Zellen nötig. Generell können sich die meisten RNA-Ketten auf mehr als eine Art falten, dennoch ist eine ganz bestimmte Struktur für die Genexpression der viralen RNA entscheidend, da wichtige Regulationssignale bei der einen Faltung offen zugänglich, bei der anderen jedoch verdeckt sein können (Singer und Berg, 1992). Von besonderer Bedeutung ist deshalb die Position solcher Nukleotide innerhalb der RNA-Sekundärstruktur, die in bestimmte Translations- und Spleißmechanismen involviert sind (Singer und Berg, 1992). Dennoch scheint die unterschiedliche RNA-Struktur in der unmittelbaren Umgebung des *env*-ATG verschiedener Isolate (s. Abb.21a-b; S.89) für den serologischen Status und das klinische Bild der infizierten Rinder (beide Strukturvarianten betreffen sowohl seropositive als auch seronegative Tiere) unbedeutend zu sein.

Über Proteinsekundärstruktur-Analysen des BLV unter Anwendung des Chou-Fasman Algorithmus (Anonym, 1994b) wurde in der Literatur bisher nur vereinzelt (Rosenthal *et al.*, 1990) berichtet. Sie stellten fest, daß sich alle As-Änderungen ihrer FLK-BLV im Vergleich zu anderen BLV-Isolaten in Regionen befanden, welche Turns oder Spiralen bildeten. Diese Beobachtung ließ darauf schließen, daß As an der Proteinoberfläche wesentlich eher variieren als jene im Inneren von Proteinen (Schulz und Schirmer, 1979). Die eigenen Proteinsekundärstruktur-Analysen konnten diese Vermutung bestätigen. Anhand einer ausgewählten *env*-Proteinsekundärstruktur ließen sich sowohl die BLV-D⁻-Mutante und das australische sowie japanische Isolat (Abb.18a, S.85) als auch die BLV-D⁺-Mutante und das belgische Isolat (α -Helix in einer Turn-Region, Abb.18b, S.85) eindeutig unterscheiden. Dieser Unterschied konnte im *pol*-Bereich (s. Abb.22a-b, S.90) und *tax*-Bereich (s. Abb.23a-c, S.93) bestätigt werden. Auf die Folgen von As- und damit Proteinveränderungen wurde unter Punkt 5.4. (s. S.106) eingegangen.

Eine besondere Bedeutung besitzen Proteinkonformationen dort, wo sie an der Ausbildung von Epitopen beteiligt sind (Singer und Berg, 1992). Das BLV-gp51 besitzt mindestens 4 Konformationsepitope (C, F, G, H; Bruck *et al.*, 1982a,b, 1984a,b). Diese sind sowohl Haupttarget der AK des Rindes als auch direkt in biologische Prozesse des BLV (Infektiosität, Fusionsaktivität) involviert (Portetelle *et al.*, 1989a). Wenngleich den Proviren der Tiere 2, 15313 und 41335 auf Grund der veränderten As 121 des *env*-Bereiches das Epitop G fehlte (s. 9.2., S.162 und 5.4., S.108), besitzen diese Tiere hohe BLV-gp51 AK Titer. Das Fehlen eines einzelnen Epitops scheint damit von untergeordneter Bedeutung für die AK-Bildung zu sein. Eine FGH-Mutante hingegen wäre wahrscheinlich nicht in der Lage, sich im Wirt zu vermehren. Die Ausbildung der Konformationsepitope ist damit auch für das Virus selbst von entscheidender Bedeutung (Mammoun *et al.*, 1990).

Zusammenfassend kann über den Einfluß von Nukleotidveränderungen auf die RNA- und Proteinsekundärstruktur festgestellt werden, daß

- Nukleotidveränderungen im BLV-Genom generell eine Änderung der RNA-Sekundärstruktur bedingen,
- anhand der RNA-Sekundärstruktur Unterschiede zwischen serologisch fraglichen und serologisch positiven Tieren erkannt werden können,
- anhand der Proteinsekundärstruktur Unterschiede zwischen BLV-D⁻- und BLV-D⁺-Mutanten verdeutlicht werden könnten,
- das Fehlen des Epitops G bei den seropositiven Tieren ohne erkennbaren Einfluß auf die AK-Bildung des Wirtstieres gegen gp51 zu sein scheint,
- Proteinsekundärstruktur-Veränderungen im *tax*- bzw. *pol*-Bereich zu einer Änderung des Infektions- und Expressionsverhaltens des BLV führen könnten.

5.6. Untersuchungen zum Vorkommen von BLV-Provirusmutanten und ihre Beziehung zum serologischen Status und der Herkunft des Wirtstieres

Seit der Entdeckung des BLV wiesen verschiedene Untersucher wiederholt auf den Zusammenhang von geographischer Herkunft und DNA-Sequenz der BLV-Isolate hin (Coulsten *et al.*, 1990; Mamoun *et al.*, 1990; Marsolais *et al.*, 1994; Molteni *et al.*, 1996). Gerade Marsolais *et al.* (1994) zeigten, daß die für routinemäßige PCR-Untersuchungen verwendeten Primer der in einer bestimmtem geographischen Region vorherrschenden Virusvariante angepaßt werden müssen, was auf eine unterschiedliche Provirussequenz dieser Isolate schließen ließ. Nur in Ausnahmen (Fechner, 1995) wurde das Auftreten bestimmter Provirusmutanten in Korrelation mit dem serologischen und klinischen Status der untersuchten Rinder betrachtet.

Die eigenen Untersuchungen wurden an 36 Rinder aus Ostdeutschland und einem Rind aus Westdeutschland (s. Tab.5, S.35) durchgeführt. Dabei zeigte das aus Baden-Württemberg stammende seropositive Tier 2 gegenüber den aus Ostdeutschland stammenden seropositiven Rindern (41335, 6869, 15313, s. Tab.19, S.75) im analysierten *env*-Bereich zehn übereinstimmende und zwei unterschiedliche Abweichungen zum japanischen Isolat. Die dargestellten Resultate (s. Tab.19, S.75 und 20, S.76) verdeutlichen, daß es Unterschiede in der BLV-Sequenz zwischen dem Provirus aus Baden-Württemberg und den Proviren aus den neuen Bundesländern gibt. Der Umfang der Untersuchungen müßte jedoch erweitert werden, um signifikante Feststellungen zu treffen. Bisher gibt es in der Literatur keine Hinweise auf DNA-Sequenzanalysen deutscher BLV-Isolate, die für vergleichende Untersuchungen herangezogen werden könnten.

Innerhalb Ostdeutschlands konnten keine Beziehungen zwischen BLV-Provirusmutante und geographischer Herkunft festgestellt werden. Ungeachtet ihrer geographischen Herkunft zeigten alle Proviren seropositiver Rinder ein sehr ähnliches Sequenzbild (s. Tab.19, S.75).

Dieses Resultat war aufgrund der geringen flächenmäßigen Ausdehnung der DDR, der Dominanz einer einzigen Rasse (Schwarzbuntes Milchrind), umfangreichen Tierbewegungen innerhalb des Landes und zentral geleitetem Import von Zuchttieren und Sperma zu erwarten. Des weiteren muß für eventuelle Schlußfolgerungen auch beachtet werden, daß der größte Teil der untersuchten Tiere (29/37) aus Sachsen-Anhalt stammte und deshalb auch für die Klärung dieser Fragestellung eine Erweiterung des Probenumfangs aus anderen ost- und westdeutschen Bundesländern nötig wäre. Wie weit die differenzierten Provirusmutanten in Deutschland verbreitet sind läßt sich somit anhand der eigenen Untersuchungen nicht einschätzen.

Die große Ähnlichkeit der ermittelten DNA-Sequenzen deutscher Isolate (s. 4.4.2., S.74; 4.5.2., S.87; 4.6.1., S.91) mit z.T. über 10 Jahre älteren, von verschiedenen Kontinenten stammenden BLV-Provirusisolaten (Rice *et al.*, 1984,1985; Sagata *et al.*, 1985b; Coulsten *et al.*, 1990) unterstreicht die vielfach nachgewiesene zeitliche und geographische Konserviertheit des BLV (Coulsten *et al.*, 1990; Mamoun *et al.*, 1990; Willems *et al.*, 1993a; Fechner, 1995). Andererseits verdeutlichen die Untersuchungsergebnisse, in Übereinstimmung mit den von Fechner (1995) durch Restriktionsenzymanalysen gewonnenen Erkenntnissen, aber auch, daß Sequenzvariationen keine Seltenheit sind.

Das Auftreten von BLV-Provirusmutanten im ostdeutschen Raum, die der „japanisch-amerikanischen“-BLV-Subgruppe (s. 5.4., S.108) angehören, wird nach Fechner (1995) folgendermaßen erklärt. Einerseits ist es möglich, daß durch die Rinderzuchtprogramme der DDR und dem damit verbundenen Import von Holstein-Frisian-Rindern aus Nordamerika in den 60er Jahren BLV-Provirusmutanten der „japanisch-amerikanischen“-BLV-Subgruppe nach Deutschland eingeschleppt wurden. Andererseits wurde die eRL ausgehend vom mitteleuropäischen Raum über Rinderexporte weltweit verbreitet (Kautzsch und Schlüter, 1991).

Die BLV-Provirusmutanten der untersuchten Rinder ließen sich anhand ihres DNA-Sequenzmusters in der *env*-Region, des Provirusgehaltes und des serologischen Status des Wirtes in drei Gruppen einteilen (Tab.22, S.79):

BLV-D⁺: BLV-Mutante serologisch positiver Provirusträger

BLV-D^{+/-}: BLV-Mutante serologisch fraglicher Provirusträger

BLV-D⁻: BLV-Mutante serologisch negativer Provirusträger

Ordnet man auch die in der Literatur beschriebenen Isolate anhand ihrer *env*-DNA-Sequenz (ohne Beachtung des serologischen Status) in die genannten Mutantengruppen ein, so stellt das japanische Isolat eine BLV-D⁻, das belgische eine BLV-D^{+/-} und das australische eine BLV-D^{+/-} Mutante dar. Daraus ist zu schlußfolgern, daß die Ursache für die Seronegativität der BLV-D⁻-Mutanten nicht im untersuchten *env*-Bereich liegt, da das japanische Isolat von einem seropositiven Rind (Sgata *et al.*, 1983) stammt.

In Übereinstimmung mit Fechner (1995) konnte gezeigt werden, daß zwischen serologischem Status des infizierten Rindes und BLV-Sequenz nicht nur eine enge Beziehung besteht,

sondern der serologische Status des Wirtes von der vorherrschenden BLV-Provirusmutante abhängig ist. Dabei scheint die BLV-D⁻-Mutante einen atypischen, durch das Auftreten von permanent serologisch negativen Rindern gekennzeichneten, Infektionsverlauf zu provozieren. Einerseits beweisen Verlaufsuntersuchungen von Fechner (1995) und Albrecht (1996) sowie die eigenen Untersuchungen der Bestände 1 und 2 (s. 3.1.1., S.35), daß das Fehlen von BLV-AK bei den untersuchten Rindern mit einer BLV-D⁻-Mutante nicht mit der frühen Phase der BLV-Infektion (Cockerell und Rovnak, 1988; Naif *et al.*, 1990; Burkhardt *et al.*, 1991) in Zusammenhang gebracht werden kann. Andererseits läßt sich das Auftreten des atypischen Infektionsablaufes auch nicht mit der applizierten AG-Dosis (Roberts *et al.*, 1986) oder durch einen ungewöhnlichen Infektionsweg, wie die durch Fechner (1995) favorisierte Möglichkeit der Übertragung *in utero* (Wittmann, 1993), erklären. Der Nachweis dieser Mutante in den verschiedenen Beständen beweist jedoch, daß es sich bei den dargestellten Ergebnissen nicht um Zufallsbefunde handelt.

Mit Ausnahme des Tieres 45 konnten alle Proviren der seropositiven Tiere der Mutantengruppe **BLV-D⁺** zugeordnet werden. Durch fehlende Verlaufsuntersuchungen bei diesem Tier (Probenentnahme erfolgte auf dem Schlachthof) kann nicht mit letzter Sicherheit abgeklärt werden, ob hier die Zuordnung zur Gruppe der serologisch positiven Provirussträger (Tab.13, S. 59) anstelle zur Gruppe der serologisch fraglichen Provirussträger korrekt war.

In Kongruenz mit den Untersuchungsergebnissen von Molteni *et al.* (1996) konnte die höhere Übereinstimmung unserer, aus seropositiven Rindern gewonnenen Isolate mit dem belgischen (Rice *et al.*, 1984, 1985) Isolat festgestellt werden. Die BLV Proviren der seronegativen Rinder ähnelten dagegen eher dem japanischen (Sagata *et al.*, 1985b) und die der serologisch fraglichen Rinder dem australischen (Coulsten *et al.*, 1990) Isolat (s. Abb.19, S.77).

Alle dargestellten Ergebnisse müssen auch unter dem Aspekt betrachtet werden, daß die fehlende Nachweisbarkeit von BLV-AK bei infizierten Tieren diagnostische Ursachen haben kann und auf die gewachsene antigenetische Differenz zwischen dem FLK-BLV und den aktuellen BLV-Feldstämmen hindeuten könnte. Von der für die Antigenproduktion verwendeten permanent BLV produzierenden Zelllinie FLK (Van der Maaten und Miller, 1976) existieren heute die verschiedensten Sublinien. Obwohl durch Zytotoxizitätsstudien gezeigt werden konnte, daß tatsächlich alle Zellen der permanent infizierten Zelllinie FLK-BLV virusinfiziert sind (Portetelle *et al.*, 1978), ist sie doch keine homogene Zellpopulation (Casay und Nicolson, 1982; Derse *et al.*, 1985b). Unterschiede zwischen einzelnen FLK-BLV-Sublinien zeigten sich auch auf molekularer Ebene. Während Rosen *et al.* (1986) auf eine völlige Übereinstimmung der Nukleotidsequenz ihrer FLK-BLV-Sublinie mit der von Sagata *et al.* (1984) beschriebenen BLV-Sequenz hinwiesen, zeigten Restriktionsenzymanalysen (Kettmann *et al.*, 1981), daß sich das amerikanische FLK-BLV Isolat signifikant von den BLV-Provirusisolaten belgischer (Rice *et al.*, 1984,1985) und japanischer Herkunft (Sagata *et al.*, 1983) unterscheidet. Über ähnliche Ergebnisse berichteten Mamoun *et al.* (1990) und Rosenthal *et al.* (1990) bei der Untersuchung weiterer FLK-BLV-Sublinien. Alle Untersucher

beschrieben eine nähere Verwandtschaft der FLK-BLV mit dem japanischen Isolat, als mit dem belgischen. Infektionsversuche von Kassabow *et al.* (1991) belegen, daß sich hämatologische, serologische und klinische Befunde von Versuchstieren, die entweder mit Lyophilisat der FLK-BLV oder mit BLV-Feldvirus infiziert wurden, nicht unterscheiden. Zugleich konnten sie jedoch beobachten, daß das aus LKK der mit BLV-Feldvirus infizierten Tiere gewonnene Virus im Western-Blot im Vergleich zur BLV-FLK zwei Banden mehr aufwies. Damit sind unterschiedliche molekularbiologische Mechanismen und letztendlich unterschiedliche Antigenitätsmerkmale von BLV-Feldvirus und FLK-BLV nicht auszuschließen.

Ein Zusammenhang zwischen der vorherrschenden Provirusmutante und dem serologischen Status des BLV-infizierten Rindes konnte in den vorangegangenen Darstellungen aufgezeigt werden. Die Bedeutung des Auftretens von Provirusmutanten für den klinischen Verlauf und die virale Evolution hatte Horzinek (1996) am Beispiel eines anderen RNA-Virus, dem Tollwutvirus, treffend demonstriert: Vergleicht man einen Wildstamm des Tollwutvirus mit einer attenuierten Lebendvaccine, so stellt man eine winzige molekulare Divergenz fest. Sie besteht in dem Austausch einer einzelnen Aminosäure an einer bestimmten Position des Oberflächenglykoproteins. Für den Wirt jedoch ist dieser Unterschied eine Frage von Leben und Tod (Horzinek, 1996).

Das Wissen um das Vorkommen unterschiedlicher BLV-Provirusmutanten ist eine entscheidende Voraussetzung für die ständige Aktualisierung der Strategie zur Prävention und Bekämpfung der bovinen Leukosevirus-Infektion in hoch verseuchten Regionen (Molteni *et al.*, 1996). Des weiteren erfordern die genomischen Variationen zwischen verschiedenen BLV-Stämmen die Verwendung von mehr als einem Primerpaar in der PCR, um die diagnostischen Resultate absichern zu können (Marsolais *et al.*, 1994). Gleichzeitig wäre die Etablierung einer mit „einheimischen“, frisch isolierten BLV-Feldvirus infizierten Zelllinie zur AG-Produktion möglicherweise geeignet, die o.g. Differenzen zwischen BLV-Feldvirus und BLV-„Laborvirus“ (FLK-BLV) zu verringern.

Zusammenfassend kann aus den Untersuchungen zum Vorkommen von BLV-Provirusmutanten festgestellt werden, daß

- enge Beziehungen zwischen serologischem Status und der vorherrschenden BLV-Provirusmutante bestehen,
- die BLV-Proviren der seropositiven Tiere mehr dem belgischen, die der seronegativen Rinder mehr dem japanischen Isolat ähneln,
- weitere Untersuchungen notwendig sind, um definitive Aussagen über die territoriale Verbreitung bestimmter Provirusmutanten treffen zu können,
- eine Anpassung des inzwischen über zwei Jahrzehnte weltweit für diagnostische Zwecke verwendeten FLK-BLV an aktuelles BLV-Feldvirus zur Optimierung der BLV-Serodiagnostik beitragen könnte.

6. Zusammenfassung

Jahrzehntlang schienen serologische Methoden notwendig und zugleich ausreichend zu sein, eine bovine Leukosevirus (BLV)-Infektion bei Rindern sicher nachzuweisen. Immer wieder wurde dabei festgestellt, daß Antigenvarianten und daraus resultierende Antikörper (AK)-Serotypen nicht auftreten. Das Vorkommen serologisch negativer Provirusträger, bzw. der fehlende BLV-Provirusnachweis bei BLV-Agargel-Immunodiffusionstest (AGID) und BLV-Enzym-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) positiven Tieren ließ jedoch darauf schließen, daß sich im Verlauf der Selektion auf BLV-freie Bestände bestimmte Provirusmutanten durchsetzen konnten. Ziel der Arbeit war es deshalb, Teile der Nukleotidsequenz verschiedener BLV-Isolate und die daraus resultierende Aminosäuresequenz zu ermitteln und in Beziehung zur geographischen Herkunft und dem serologischen Status des Wirtstieres zu setzen. Gleichzeitig sollte der Einfluß von Nukleotid- und Aminosäureveränderungen auf die RNA- und Proteinsekundärstruktur ermittelt werden. DNA-Sequenzanalysen sind auf Grund des hohen Zeit- und Kostenaufwandes gerade in der Veterinärmedizin Grenzen gesetzt. Deshalb sollte es ein weiteres Ziel dieser Arbeit sein, verschiedene Sequenzierungsmethoden hinsichtlich Praktikabilität und Rentabilität miteinander zu vergleichen.

1. Im Vergleich der auf dem Sanger-Prinzip beruhenden Sequenzierungsverfahren (Methode nach Sommer, Hot Tub Sequencing-Verfahren, T7-Sequencing-Verfahren und AutoRead Sequencing-Verfahren hinsichtlich Praktikabilität und Rentabilität erwies sich das T7-Sequencing-Verfahren als das geeignetste. Bei einer Ausgangsmenge von 1,5 bis 2,0 µg dsDNA konnten bis zu 450 Nukleotide innerhalb von 4 h auf einem vertikalen, keilförmigen Gel aufgetrennt werden.

2. Die direkte Sequenzierung von Polymerasekettenreaktion (PCR) -Produkten bot gegenüber der Sequenzierung klonierter Fragmente verschiedene Vorteile: geringerer Zeitaufwand, höhere Reinheit des Ausgangsmaterials, geringerer Materialaufwand und geringere Gefahr der Sequenzierung von Fragmenten mit PCR-induzierten Mutationen (Polymerasefehler). Die Quantität lesbarer Nukleotide nach Sequenzierung von Amplifikaten aus Einfach- bzw. Doppel-PCR lag mit maximal 230 bp unter der nach Sequenzierung klonierter Produkte. Bei Fragmenten aus asymmetrischen PCR's konnte die Anzahl analysierter Nukleotide bis auf 400 bp gesteigert werden.

3. Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis einer BLV-Infektion an 37 Rindern verschiedener Bestände mittels ELISA, AGID, Leukozytenkurzzeitkultur und PCR ermöglichten eine Einteilung der Probanden in vier Gruppen:

zehn Tiere (27%) waren serologisch positive Provirusträger; Gruppe 1

drei Tiere (8%) waren serologisch fragliche Provirusträger; Gruppe 2

zehn Tiere (27%) waren serologisch negative Provirusträger; Gruppe 3

14 Tiere (38%) waren serologisch und im Provirusnachweis negativ; Gruppe 4

4. Ein Vergleich der Untersuchungsverfahren AGID, ELISA, Leukozytenkurzzeitkultur und PCR auf Eignung als Routinediagnostikum ergab, daß der Enzym Linked Immunosorbent Assay nicht ausreichend ist, um alle Provirussträger zu erkennen. Die PCR ist erforderlich bei der Erkennung schwacher Seroreagenten in der Phase der Endsanierung der enzootischen Rinderleukose einzelner Bestände.

5. Die Sequenzierung der long terminal repeat (LTR) - Region vom Provirus der permanent BLV produzierenden Fetalen-Lammnieren- Zelllinie (FLK-BLV) ergab im Vergleich mit dem von Sagata *et al.* (1985a) beschriebenen japanischen Isolat eine starke Sequenzhomologie. Zwei beschriebene Nukleotidsubstitutionen in diesem Bereich befinden sich in strukturell wenig bedeutsamen Sequenzabschnitten.

6. Die DNA-Sequenzierung von BLV-Provirusabschnitten der Envelope (*env*)-, Polymerase- und Tax-Protein (*tax*)- kodierenden Bereiche weist auf die Existenz von drei BLV-Mutantengruppen hin:

BLV-D⁺ (Provirusmutante serologisch positiver Provirussträger)

BLV-D^{+/-} (Provirusmutante serologisch fraglicher Provirussträger)

BLV-D⁻ (Provirusmutante serologisch negativer Provirussträger)

7. Für das Auftreten serologisch negativer Provirussträger gibt es mindestens vier mögliche Erklärungen:

- echte Immuntoleranz nach intrauteriner Infektion,
- Nachweis des BLV-Provirus zu einem sehr frühen Infektionszeitpunkt, an dem das Tier noch keinen BLV-AK-Titer entwickelt hat,
- Durchsetzung schwach immunogen wirkender BLV-Mutanten (BLV-Virusselektions-Hypothese),
- Selektion der Rinderpopulation auf schwache Seroreagenten durch die parallele Durchsetzung verschiedenster Sanierungskonzepte (BLV-Wirtsselektions-Hypothese)

8. DNA-Sequenzveränderungen sind von Einfluß auf die RNA- und Protein-Sekundärstruktur. Potentielle Spleißdonor und -akzeptorregionen blieben von DNA-Sequenzveränderungen und daraus folgenden Strukturänderungen unberührt. Mehreren serologisch positiven Provirusträgern fehlte das gp51 Konformationsepitop G.

9. Die durchgeführten Untersuchungen belegen, daß eine enge Beziehung zwischen serologischem Status des mit BLV infizierten Tieres und dem DNA-Sequenzbild der BLV-Provirusmutante besteht. Innerhalb Ostdeutschlands konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen vorherrschender BLV-Provirusmutante und geographischer Herkunft des Wirtstieres festgestellt werden.

10. Die partiellen DNA-Sequenzierungen in der *tax*- und *env*-Region des BLV verschiedener FLK-Sublinien zeigten, daß es sowohl innerhalb der Sublinien als auch im Vergleich zu anderen BLV-Isolaten Differenzen gibt. Diese Tatsache läßt eine antigenetische Drift zwischen den BLV-Providiren vermuten, die möglicherweise die Eignung des FLK-BLV-Antigen für die serologische Diagnostik beeinflussen könnte.

6. Summary

Genomanalysis of different bovine leucosis (BLV) proviruses in consideration of the serological state and geographical origin of the cattle.

For decades serological methods seemed to be useful and sufficient to diagnose BLV infection in cattle. Repeatedly it was found out, that antigen variants and outcoming antibody (AK)-serotypes do not appear. The occurrence of serological negative provirus carrying cattle and the lack of BLV-provirus in Enzym-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA)- and Agargel-Immunodiffusion-Test (AGID)-positive animals lead to the assumption, that with the selection of BLV free herds specific mutants of provirus dominated. For this reason the aim of the paper was to investigate the nucleotid sequence of different BLV isolates and the resulting aminoacid sequence in consideration of the serological state and geograpical origin of the infected cattle. Simultaneously the influence of nucleid- and aminoacid-changes on the RNA- and protein-secondary structure should be investigated. Especially in the veterinary medicine DNA sequence analysis is limited because it is much timeconsuming and expensive. For this reason different sequencing methods should be compared with respect to their practicability and rentability.

1. In comparison of different "Sanger principle" using sequencing methods (method after Sommer, Hot Tub sequencing, T7-Sequencing and Auto Read sequencing) with respect to practicability and rentability the T7-sequencing method was the most suitable. With a minimum of 1,5 - 2,0 µg ds DNA up to 450 nucleotides could be read during 4 h from a vertical, wedge-shaped gel.

2. The direct sequencing of polymerase chain reaction (PCR) products in comparison with the sequencing of cloned PCR products has various advantages: less time consuming, high purity of DNA template and less danger of sequencing DNA fragments with PCR induced mutations. The quantity of detectable nucleotides sequencing PCR products synthesized in single- or double PCR with a maximum of 230 bp was lower than sequencing cloned PCR products. Using fragments from asymmetric PCR's the number of detectable nucleotides were raised to 400 bp.

3. Investigations for the detection of BLV provirus in 37 cattle of different herds with ELISA, AGID, leucocyte short term culture and PCR enabled a division of the probands into four groups.

10 animals (27%) serology positive, carrier of provirus; group 1

3 animals (8%) serology uncertain, carrier of provirus; group 2

10 animals (27%) serology negative, carrier of provirus; group 3

14 animals (38%) serology negative, no carrier of provirus group 4

4. The comparison of the diagnostic methods AGID, ELISA, leucocyte short term culture and PCR showed, that the ELISA is not sufficient to detecte all provirus carrier. The PCR is necessary for the detection of cattle with weak serological signals in BLV eradication.
5. The sequencing of the BLV long terminal repeat (LTR) region from FLK (fetal lamb kidney) -BLV provirus is highly comperable with the Japanese isolat (Sagata *et al.*, 1985a). Two detected nucleitid substitutiones found in this region were in structural less significant regions of the sequence.
6. The DNA sequencing of parts from the envelope (*env*)- polymerase- and Tax protein (*tax*)-region of BLV indicate the existence of three groups of mutants from BLV:
 - BLV-D⁺** (BLV mutant of serology positive, carrier of provirus)
 - BLV-D^{+/-}** (BLV mutant of serology instable, carrier of provirus)
 - BLV-D⁻** (BLV mutant of serology negative, no carrier of provirus)
7. For the occurence of serologic negative cattle there are at least four reasonable explanationes:
 - congenital immuntolerance following intrauterin infection
 - BLV provirus detection in the early stage of BLV infection, before detectable antibody titers have developed
 - selection of virus mutants whith weak immunogenicity (BLV virus selection hypothesis)
 - selection of cattle with weakly immune response by parallel working with different eradication concepts (BLV host selection hypothesis)
8. Changes in nucleotid sequence influence the RNA- and protein secondary structure. Potentiell splice donors and acceptors are mainly conservative. BLV isolates from some seropositive cattle were lacking the gp51 sequence epitop G.
9. The result of the study indicate that there is a relation between the serological state of the infected cattle and the DNA sequence of the BLV mutant but not between BLV provirus mutant and the geographical origion of the host.
10. Partial DNA sequencing of the *tax*- and *env*-region of the BLV from different FLK-sublines show, that there are differences between the FLK-sublines as well as between other BLV isolates. This difference indicates an antigenic drift between BLV proviruses that may influence the suitability of FLK-BLV antigenes in test systems for diagnosis of bovine leukosis infection.

8. Literaturverzeichnis

Abt D.A., R.R. Marshak, H.W. Kulp and R.J. Pollock Jr. (1970): Studies on the relationship between lymphocytosis and bovine leukosis.
Bibl. Haematol., 36, 527-536

Adam, E., P. Kerkhofs, M. Mammerickx, R. Kettmann and A. Burny (1994): Involvement of the cyclic AMP-responsive element-binding protein in bovine leukemia-virus expression in-vivo.
J. Virol., 68, 5845-5853

Adam, E., P. Kerkhofs, M. Mammerickx, A. Burny, R. Kettmann and L. Willems (1996): The Creb, AFT-1 and AFT-2 transcription factors from bovine leukemia virus-infected B-lymphocytes activate viral expression.
J. Virol., 70, 1990-1999

Agresti, A., W. Ponti, M. Rocchi, R. Meneveri, A. Marozzi, B. Cavalleri, E. Peri, G. Poli and E. Ginelli (1993): Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at birth.
Am. J. Vet. Res., 54, 373-378

Aida, Y., M. Onuma, K. Tsukiyama, Y. Ogawa, T. Fujieda, T. Mikami and H. Izawa (1987a): Monoclonal antibodies define antigenic regions on the major internal protein p24 of bovine leukemia virus (BLV).
Arch. Virol., 94, 315-321

Aida, Y., M. Onuma, N. Kasai and H. Izawa (1987b): Use of viable-cell ELISA for detection of monoclonal antibodies recognizing tumour-associated antigens on bovine lymphosarcoma cells.
Am. J. Vet. Res., 48, 1319-1324

Aida, Y., H. Amanuma and K. Okada (1994): Identification of tumor-associated antigen that expressed on bovine leukemia virus-induced lymphosarkoma cells and expression of its human homologue in human T-cell lymphotropic virus I-infected cell lines.
Leukemia, 8, 231-234

Albrecht, C. (1996): Entwicklung einer in situ Hybridisierung zum Provirusnachweis des Erregers der enzootischen Rinderleukose bei serologisch leukosepositiven und -negativen Rindern.
Diss. Vet. Med., Freie Universität Berlin

Alexandersen, S., S. Carpenter, J. Christensen, T. Storgaard, B. Viuff, Y. Wannemuehler, J. Belusov and J. Roth (1993): Identification of alternatively spliced mRNA encoding potential new regulatory proteins in cattle infected with bovine leukemia virus.
J. Virol., 67, 39-52

Altanerova, V., J. Ban, R. Kettmann and C. Altaner (1990) : Induction of leukemia in chicken by bovine leukemia virus due to insertional mutagenesis.
Arch. Geschwulstforsch., 60, 89-96

- Abartsumyan, N.S. and A.M. Mazo (1980): Elimination of the secondary structure effect in gel sequencing of nucleic acids.
FEBS Letters, 114, 265-268
- Amborski, G.F., J.L. Lo and C.L. Seger (1989): Serological Detection of multiple retroviral infections in cattle: bovine leukemia virus, bovine syncytial virus and bovine visna virus.
Vet. Microbiol., 20, 247-253
- Andreansky, M., O. Hruskova-Heidingsfeldova, J. Sedlacek, J. Konvalinka, I. Blaha, P. Horejsi (1991): High-level expression of enzymatically active bovine leukemia virus proteinase in *E. coli*.
FEBS Letters, 287, 127-132
- Anonym (1991): Thermalbase *Taq*-Polymerase. Instruction Manual, Stratargene
- Anonym (1992): Hot Tub DNA sequencing system. Manual Amersham Life Science
- Anonym (1994a): AutoRead Sequencing Kit. Instructions, Pharmacia Biotech
- Anonym (1994b): DNASIS for Windows. Users Manual, Hitachi Software Engineering Co.
- Anonym (1994c): T7 Sequencing Kit. Instructions, Pharmacia Biotech
- Ansorge, W., B.S. Sproat, J. Stegemann, C.H. Schwager, M. Zenke (1987): Automated DNA sequencing.
Nucleic Acids Res., 15, 4593-4602
- Atkinson, M.R., M.P. Deutscher, A. Kronberg, A.F. Russel and J.G. Moffatt (1969): In: Sanger, F., S. Nickler and A.R. Coulson (1977): DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 5463-5467
- Ballaun, C., K.G. Farrington, M. Dobrovnik, J. Rusche, J. Hauber and E. Bohnlein (1991): Functional analysis of human T-cell leukemia virus typ I *rex* response element.
J. Virol., 65, 4408-4413
- Barnard, F.G., M. Puder, A.N. Begum and L.B. Chen (1994): PCR product sequencing with [α -³³P] and [α -³²P] dATP.
BioTechniques, 16, 572-573
- Barendse, W., S.M. Armitage and L.M. Kossarek (1994): A genetic linkage map of the bovine genome.
Nature Genetics, 6, 227-235
- Batra, T.R., M.J. Stear and P.A. Macdonald (1996): Association of class-I bovine lymphocyte antigens with profitability and lifetime yields in the holstein breed.
Can. J. Anim. Sci., 76, 145-148
- Batmaz, H., K.T. Carli, M. Kahraman, C. Cetin and E. Kennerman (1995): Serological and haematological diagnosis of enzootic bovine leukosis in cattle in turkey.
Vet. Rec., 136, 42-44

- Baumgartener, L.E., C. Olson, J.M. Miller and M.J. Van der Maaten (1975): Survey for antibodies to leukemia (C-type) virus in cattle.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 166, 249-251
- Baumgartener, L.E. and C. Olson (1982): Host range of bovine leukosis virus: preliminary report.
Curr. Top. Vet. Med. Sci., 15, 338-347
- Bech-Nielsen, S., C.E. Piper and J.F. Ferrer (1978): Natural mode of transmission of the bovine leukemia virus: role of bloodsucking insects.
Am. J. Vet. Res., 39, 1089-1092
- Beier, D., E. Starick, W. Wittmann und B. Nitschke (1987): Blutserologische, pathologisch-histologische und hämatologische Untersuchungen an mit bovinem Leukosevirus infizierten tumorösen Rindern.
Arch. Exper. Vet. Med., 41, 763-766
- Beier, D. (1996): Persönliche Mitteilung.
- Bembridge, G.P., N.D. Machugh, D. Mckeever, E. Awino, P. Soop, R.A. Collins, K.I. Gelder and C.J. Howard (1995): Cd45Ro expression on bovine T-cells-relation to biological function.
Immunology, 86, 537-544
- Bevan, I.S., R. Rapley and M.R. Walker (1992): Sequencing of PCR-amplified DNA.
PCR Methods and Applications, 1, 222-228
- Bhagavati, S., G. Ehrlich, R.W. Kula, S. Kwok, J. Snisky, V. Udani and B.J. Poisz (1988): Detection of human T-cell lymphoma/leukemia virus type I DNA and antigen in spinal fluid and blood of patients with chronic progressiv myelopathy.
New Engl. J. Med., 318, 1141-1147
- Bicka, L., J. Grundboeckjusko, J. Kuzmak and M. Jedrzejewska (1993): Isolation of tumor-associated antigen from bovine lymphoid tumors and detection of TAA-antibodies in cows affected with bovine leukemia-virus.
Bulletin Vet. Inst. Pulawy, 37, 81-86
- Birgel, E.H., J. Dangelino, F.J. Benesi and E.H. Birgel (1995): Prevalence of the infection by the bovine leukosis virus in jersey dairy-cattle, raised in the state of Sao Paulo .
Pesquisa Vet. Brasileira, 15, 93-99
- Birkebak, T.A., G.H. Palmer, W.C. Davis and D.P. Knowles (1994): Association of gp51 expression and persistent Cd5+ B-lymphocyte expansion with lymphomagenesis in bovine leukemia-virus infected sheep.
Leukemia, 8, 1890-1899
- Bishop, M.D., St.V. Kappes and J.W. Keele (1994): A genetic linkage map for cattle.
Genetics, 136, 619-639
- Blankenstein, P. und G. Sommer (1990): Untersuchungen zur Expression des bovinen Leukämievirus in permanenten Zelllinien.
Vet. Med. Diss., Humboldt Universität zu Berlin

Blankenstein, P., A. Bondzio, A. Büchel, E. Kinder and D. Ebner (1996): Investigations of the Japanese bovine tumor virus (BLV) - its ability to express structural and regulatory BLV proteins.

J. Vet. Med. (B), 43, 343-349

Blankenstein, P. (1996): Persönliche Mitteilung.

Boris-Lawrie, K. and H.M. Temin (1995): Genitically simpler bovine leukemia virus derivatives can replicate independently of *tax* and *rex* (1995).

J. Virol., 69, 1920-1924

Brade, W. (1996): Das bovine Genom - eine Übersicht.

Tierärztl. Umschau, 51, 13-18

Brandon, R.B., H. Naif, R.C.W. Daniel and M.F. Lavin (1991): Early detection of bovine leukosis virus DNA in infected sheep using the polymerase chain reaction.

Res. Vet. Sci., 50, 89-94

Bruck, C., S. Mathot, D. Portetelle, C. Berte, J.-D. Franssen, P. Herion and A. Burny (1982a): Monoclonal antibodies define eight independent antigenic regions on the bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein gp51.

Virology, 122, 342-352

Bruck, C., D. Portetelle, A. Burny and J. Zavada (1982b): Topographical analysis by monoclonal antibodies of BLV-gp51 epitopes involved in viral functions.

Virology, 122, 353-362

Bruck, C., N. Rensonnet, D. Portetelle, Y. Cleuter, M. Mammerickx, A. Burny, R. Mamoun, B. Guillemain, M.J. Van der Maaten and J. Ghysdael (1984a): Biologically active epitopes of bovine leukemia virus glycoprotein gp51: their dependence on protein glycosylation and genetic variability.

Virology, 136, 20-31

Bruck, C., D. Portetelle, M. Mammerickx, S. Mathot and A. Burny (1984b): Epitopes of bovine leukemia virus glycoprotein gp51 recognized by sera of infected cattle and sheep.

Leuk. Res., 8, 315-321

Buehring, G.C., P.M. Kramme and R.D. Schultz (1994): Evidence for bovine leukemia-virus in mammary epithelial-cells of infected cows.

Lab. Invest., 71, 359-365

Bunger, I., H. Khalaf, C. Cripe and M. Rimpler (1994): Detection of antibodies against the enzootic bovine leukemia-virus in milk and serum samples by immunoblotting.

Dtsch. Tierärztl. Wschr, 101, 402-405

Burkhardt, H., M. Müller, S. Rosenthal und W. Wittmann (1988): Zum Nachweis von BLV-Antigen bei neugeborenen serologisch IDT-negativen Kälbern aus blutserologisch leukosepositiven Müttern.

Mh. Vet.-Med., 43, 702-704

- Burkhardt, H., M. Müller, S. Rosenthal, W. Wittmann und H. Feist (1991): Zum Nachweis von BLV-Antigen und BLV-Provirus bei neugeborenen serologisch IDT-negativen Kälbern blutserologisch leukosepositiver Muttertiere.
Mh. Vet.-Med., 46, 78-82
- Burny, A., F. Bex, H. Chantrenne, Y. Cleuter, D. Dekegel, J. Ghysdael, R. Kettmann, M. Leclercq, J. Leunen, M. Mammerickx and D. Portetelle (1978): Bovine leukemia virus involvement in enzootic bovine leukosis.
Adv. Cancer Res., 28, 251-311
- Burny, A., C. Bruck, H. Chantrenne, Y. Cleuter, D. Dekegel, J. Ghysdael, R. Kettmann, M. Leclercq, J. Leunen, M. Mammerickx and D. Portetelle (1980): Bovine leukemia virus molecular biology and epidemiologie. In: G.Klein (ed.) Viral oncology.
Raven Press: New York, 231-289
- Burny A, C. Bruck, Y. Cleuter, D. Couez, J. Deschamps, J. Ghysdael, D. Gergoire, R. Ketmann, M. Mammerickx, G. Marbaix, D. Portetelle and L. Willems (1985): Bovine leukemia virus, a versatile agent with various pathogenic effects in various animal species.
Cancer. Res., 45, 4578-4582
- Burny, A., Y. Cleuter, C. Dandoy, R. Kettmann, M. Mammerickx, G. Marbaix, D. Portetelle, A. Van den Broecke and L. Willems (1987): Bovine leukemia: model system for leukemogenesis by a retrovirus.
Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift, 56, 20-27
- Burny, A., Y. Cleuter, R. Kettmann, M. Mammerickx, G. Marbaix, D. Portetelle, A. Van den Broeke, L. Willems and R. Thomas (1988): Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer.
Vet. Microbiol., 17, 197-218
- Burridge, M.J., M.C. Thurmond, J.M. Miller, M.J.F. Schmerr and M.J. Van der Maaten (1982): Duration of colostral antibodies to bovine leukemia virus by two serologic tests.
Am. J. Vet. Res., 43, 1866-1867
- Calafat, J., P.C. Hageman and A.A. Ressay (1974): Structure of C-type virus particles in lymphocyte cultures of bovine origin.
J. Natl. Cancer Inst., 52, 507-519
- Cantor, G.H., T.F. McElwain, T.A. Birkebak and G.H. Palmer (1993): Ribozyme cleaves *rex tax* messengers-RNA and inhibits bovine leukemia-virus expression.
Vet. Sci. Med., 90, 10932-10936
- Carli, K.T., H. Batzmaz, A. Sen and A. Mibay (1993): Comparison of serum, milk and urine as samples in an enzyme-immunoassay for bovine leukemia-virus.
Res. Vet. Sci., 55, 394-395
- Casanova, J.L., C. Panntier, C. Jaulin and P. Kourilsky (1990): Optimal conditions for direct sequencing double stranded PCR products with sequenase.
Nucleic. Acids Res., 18, 4028

- Casay, J.W. and M.O. Nicolson (1982): Susceptibility to productive infection by the bovine leukemia virus is governed at the proviral level.
Fed. Proc., 41, 1275
- Cheng-Mayer, C., T. Shioda and J.A. Levy (1991): Host range, replicative, and cytopathic properties of human immunodeficiency virus type 1 are determined by very few amino acid changes in *tat* and gp120.
J. Virol., 65, 6931-6941
- Chiba, T., M. Hiraga, Y. Aida, T. Ajito, M. Asahina and D. Wu (1995): Immunohistologic studies on subpopulations of lymphocytes in cattle with enzootic bovine leukosis.
Vet. Path., 32, 513-520
- Coats, K.S.C. (1995): Dual infection with bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia-virus in mississippi dairy-cattle.
Vet. Rec., 136, 269-270
- Cockerell, G.L. and J. Rovnak (1988): The correlation between the direct and indirect detection of bovine leukemia virus infection in cattle.
Leuk. Res., 12, 465-469
- Coffin, J.M. (1991): Classification and nomenclature of retroviridae.
Arch. Virology Suppl., 2, 290-299
- Coffin, J.M. (1992): Genetic diversity and evolution of retroviruses.
Curr. Top. Microbiol. Immunol., 176, 143-164
- Colicelli, J. and S.P. Goff (1988): Sequence and spacing requirements of a retrovirus integration site.
J. Mol. Biol., 199, 47-59
- Compton, T. (1990): Degenerate primers for DNA amplification. In: M.A. Innes, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (eds.): PCR protocols, A guide to methods and amplifications.
Academic Press: San Diego, 39-45
- Conell, C., S. Fung, C. Heiner, J. Bridgham, V. Cockerian, E. Heron, B. Jones, S. Menchen, W. Mordan, M. Raff, M. Recknor, L. Smith, J. Springer, S. Woo and M. Hunkapiller (1987): Automated DNA sequence analysis.
BioTechniques, 5, 342-448
- Cordeiro, J.L.F., F. Descyamps, E. Martins and V.M.V. Martins (1994): Identification and control of bovine leukosis in a dairy herd.
Pesquisa Agropecuaria Brasileira, 29, 1287-1292
- Couez, D., J. Deschamps, R. Kettmann, R.M. Stephens, R.V. Gilden and A. Burny (1984): Nucleotide sequence analysis of the long terminal repeat of integrated bovine leukemia provirus DNA and of adjacent viral and host sequences.
J. Virol., 49, 615-620

- Coulston, J., H. Naif, R. Brandon, S. Kumar, S. Khan, R.C.W. Daniel and M.F. Lavin (1990): Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukaemia virus DNA: comparison with other isolates.
J. Gen. Virol., 71, 1737-1746
- Coulston, J., R.C.W. Daniel and M.F. Lavin (1991): Integration of bovine leukaemia virus at all stages of enzootic bovine leukosis.
Arch. Virol., 119, 13-23
- Daenke, S., S. Nightingale, J. Cruickshank and C. Bangham (1990): Sequence variants of human T-cell lymphotropic virus type I from patients with tropical spastic paraparesis and adult T-cell leukemia do not distinguish neurological from leucemic isolates.
J. Virol., 64, 1278-1282
- Dedek, J., H. Loepelmann, M. Müller und S. Dademasch (1987): Serologische Untersuchungen bei einheimischen Wildwiederkäuern (Rot-, Reh-, Dam-, Muffelwild) auf enzootische Rinderleukose (Kurzmitteilung).
Mh. Vet.-Med., 42, 784-785
- Dekegel, D. (1987): Morphology of bovine leukemia virus. In: Enzootic bovine leukosis and leukemia virus. Burny, A. and M. Mammerickx (eds.), Development in veterinary virology, vol 2, Dordrecht: Martinus Nijhoff, 91-96
- Demolis, N., L. Mallet, F. Bussereau and M. Jacquet (1995): Improved strategy for large-scale DNA sequencing using DNaseI cleavage for generating random subclones.
Biochemistry, 18, 1515-1518
- Dequiedt, F., R. Kettmann, A. Burny and L. Willems (1995a): Mutations in the p53 tumor-suppressor gene are frequently associated with bovine leukemia virus-induced leukemogenesis in cattle but not in sheep.
Virology, 209, 676-683
- Dequiedt, F., L. Willems, A. Burny and R. Kettmann (1995b): Nucleotide-sequence of the bovine p53 tumor-suppressor cDNA.
DNA Sequence, 5, 261-264
- Derse, D. and J.W. Casey (1986): Two sequences in the bovine leukemia long terminal repeat that regulate gene expression.
Science, 231, 1437-1440
- Derse, D., A.J. Diniak, J.W. Casey and P.L. Deininger (1985): Nucleotide sequence and structure of integrated bovine leukemia virus long terminal repeats.
Virology, 141, 162-166
- Derse, D. (1987): Bovine leukemia virus transcription is controlled by a virus-encoded *trans*-acting factor and by *cis*-acting response elements.
J. Virol., 61, 2462-2471
- Derse, D. (1988): *Trans*-acting regulation of bovine leukemia virus mRNA processing.
J. Virol., 62, 1115-1119

Deschamps, J., R. Kettmann and A. Burny (1981): Experiments with cloned complete tumor-derived bovine leukemia virus information prove that the virus is totally exogenous to its target animal species.

J. Virol., 40, 605-609

Devare, S.G., J.R. Stephenson, S. Chander, P.S. Sarma and S.A. Aaronson (1976): Bovine lymphosarcoma: development of a radioimmunologic technique for detection of the etiologic agent.

Science, 194, 1428-1430

DiGiacomo, R.F., E. Studer, J.F. Evermann and J. Evered (1986): Embryo transfer and transmission of bovine leukosis virus in a dairy herd.

J. Am. Vet. Med. Assoc., 188, 827-828

DiGiacomo, R.F. (1992a): The epidemiology and control of bovine leukemia virus infection.

Vet. Med., 248-257

DiGiacomo, R.F. (1992b): Vertical transmission of the bovine leukemia virus.

Vet. Med., 258-262

DiGiacomo, R.F. (1992c): Horizontal transmission of the bovine leukemia virus.

Vet. Med., 263-271

Diglio, C.A. and J.F. Ferrer (1976): Induction of syncytia by the bovine C-type leukemia virus.

Cancer. Res., 36, 1056-1067

Dimmock, C.K., W.H. Ward and K.F. Truemann (1990): Lymphocyte subpopulations in sheep with lymphosarkoma resulting from experimental infection with bovine leukemia virus.

Immunol. Cell. Biol., 68, 45-49

Divers, T.J., R.C. Bartholomew, D. Galligan and C. Little (1995): Evidence for transmission of bovine leukemia virus by rectal palpation in a commercial dairy herd.

Preventive Vet. Med., 23, 133-141

Dolz, G. (1990): Untersuchungen zur Diagnose der Rinderleukose in Costa Rica unter Verwendung verschiedener Nachweisverfahren (Immundiffusion, ELISA, Western Blot).

Vet. Med. Diss., Justus von Liebig Universität Gießen

Eaves, F.W., J.B. Molloy, C.K. Dimmock and L.E. Eaves (1994). A field study evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukemia virus proviral DNA in cattle.

Vet. Microbiol., 39, 313-321

Eckert, K.A. and T.A. Kunkel (1991): DNA-Polymerase fidelity and the polymerase chain reaction.

PCR Methods and Applications, 1, 17-24

Eisenstein, B.J. (1990): The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis.

New Engl. J. Med, 322, 178-183

- Elder, J.K., D.K. Green and E.M. Southern (1986): Automating reading of DNA sequencing gel autoradiographs using a large format digital scanner.
Nucleic Acids Res., 14, 417-424
- Engelberg, N.C. and B.I. Eisenstein (1992): Detection of microbial nucleic acid for diagnostic purposes.
Ann. Rev. Med., 43, 147-155
- Erlich, H.A., D.H. Gelfand and R.K. Saiki (1988): Spezific DNA amplification.
Nature, 331, 461-462
- Erlich, H.A. (ed.) (1989): PCR Technology: Principles and applicationes for DNA amplification.
Stockton: New York
- Evermann, J.F. (1992): A look at how bovine leukemia virus infection is diagnosed.
Vet. Med., 272-278
- Fechner H. (1995): Diagnostik der enzootischen Rinderleukose mit serologischen und virologischen Nachweisverfahren unter besonderer Berücksichtigung der Polymerase Kettenreaktion (PCR) - Untersuchungen zum Auftreten von Provirusmutanten des bovinen Leukosevirus (BLV).
Vet. Med. Diss., Freie Universität Berlin
- Ferrer, J.F., D.A. Abt, B.M. Bhatt and R.R. Marshak (1974): Studies on the relationship between infection with bovine C-type virus, leukemia, and persistent lymphocytosis in cattle.
Cancer. Res., 34, 893-900
- Ferrer, J.F., D.M. Bhatt, D.A. Abt, R.R. Marshak and V.L. Baliga (1975): Serological diagnosis of infection with the putative bovine leukemia virus.
Cornell Vet., 65, 527-542
- Ferrer, J.F., C.E. Piper, D.A. Abt, R.R. Marshak and D.M. Bhatt (1976): Natural mode of transmission of bovine C-type virus (BLV).
Bibl. haematologica, 43, 235-237
- Ferrer, J.F., C.E. Piper, D.A. Abt and R.R. Marshak (1977): Diagnosis of bovine leukemia virus infection: Evaluation of serologic and hematologic tests by a direct infectivity detection assay.
Am. J. Vet. Res., 38, 1977-1981
- Ferrer, J.F. (1980): Bovine lymphosarcoma.
Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 24,1-68
- Ferrer, J.F. and C.E. Piper (1981): Role of colostrum and milk in the natural transmission of the bovine leukemia virus.
Cancer Res., 41, 4906-4909
- Forschner, E. und D. Heiseke (1988): ELISA-Ablaufbestimmende Einflußparameter, deren Auswirkungen auf die Testsicherheit and praxisgerechte Prüfmetheden.
Tierärztl. Umschau, 43, 786-796

Fries, R., A. Eggen and J.E. Womack (1993): The bovine genome map. *Mammalian Genome*, 4, 405-428

Fujisawa, J., M. Toita and M. Yoshida (1989): A unique enhancer element for the trans activator of T-cell leukemia virus type I that is distinct from cyclic AMP- and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-responsive element. *J. Virol.*, 63, 3234-3239

Fukuyama F., K. Kodama, T. Hirahara, N. Nakajima, K. Takamura, O. Sasaki and J. Imanishi (1993): Protection against bovine leukemia-virus infection by use of inactivated vaccines in cattle. *J. Vet. Med. Sci.*, 55, 99-106

Ghysdael, J., R. Kettmann and A. Burny (1978): Translation of bovine leukemia virus genome information in heterologous protein synthesizing systems programmed with virion RNA and in cell-lines persistently infected by BLV. *Ann. Rech. Vet.*, 9, 627-634

Ghysdael, J., R. Kettmann and A. Burny (1979): Translation of bovine leukemia virus virion RNAs in heterologous protein-synthesizing systems. *J. Virol.*, 29, 1087-1098

Ghysdael, J., C. Bruck, R. Kettmann and A. Burny (1984): Bovine leukemia virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 112, 1-19

Giam, C. and Y. Cu (1989): HTLV-I tax gene product activates transcription via preexisting cellular factors and cAMP responsive element. *J. Biol. Chem.*, 264, 15236-15241

Gilden, R.V., C.W. Long, M. Hanson, R. Toni, H.P. Charman, S. Oroszlan, J.M. Miller and M.J. Van der Maaten (1975): Characteristics of the major internal protein and RNA-dependent DNA polymerase of bovine leukemia virus. *J. Gen. Virol.*, 29, 305-314

Goff, S.P. (1981): In: Colicelli, J. and S.P. Goff (1988): Sequence and spacing requirements of a retrovirus integration site. *J. Mol. Biol.*, 199, 47-59

Graves, D.C. and J.F. Ferrer (1976): In vitro transmission and propagation of the bovine leukemia virus in monolayer cell cultures. *Cancer Res.*, 36, 4152-4159

Graves, D.C., C.A. Diglio and J.F. Ferrer (1977): A reverse transcriptase assay for detection of the bovine leukemia virus. *Am. J. Vet. Res.*, 38, 1739-1744

Green, J.R., I.A. Herbst and D.J. Schneider (1988): An outbreak of lymphosarcoma in Merino sheep in the South Western Cape. *J. South Africa Vet. Assoc.*, 59, 27-29

- Green, M., M. Ishino and P.M. Löwenstein (1989). Mutational analysis of HIV-I TAT minimal domain peptides.
Cell, 58, 215-223
- Gregoire, D., D. Couez, J. Deschamps, S. Heuertz, M.C. Hors-Cayla, J. Szpirer, A. Burny, G. Huez and A. Kettmann (1984): Different bovine leukemia virus-induced tumors harbour the provirus in different chromosomes.
J. Virol., 50, 275-279
- Grundboeck M., J. Kuzmak and E. Buzala (1994): Syncytial testing in the diagnosis of bovine leukemia-possibilities and limitations.
Medycyna Wet., 50, 205-207
- Gupta, P. and J.F. Ferrer (1982): Expression of bovine leukemia virus genome is blocked by a nonimmunoglobulin protein in plasma from infected cattle.
Science, 215, 405-407
- Gupta, P., S.V.S. Kashmiri and J.F. Ferrer (1984): Transcriptional control of the bovine leukemia virus genome: role and characterization of a non-immunoglobulin plasma protein from bovine leukemia virus-infected cattle.
J. Virol., 50, 267-270
- Gyllenstein, U.B. and H.A. Ehrlich (1988): Generation of single-stranded DNA by polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQa locus
Proc. Natl. Acad. Sci., 85, 7652-7656
- Haas, L., T. Divers and J.W. Casey (1992): Bovine leukemia virus gene expression in vivo.
J. Virol., 66, 6223-6225
- Hasselschwert, D.L., D.D. French, L.J. Hribar, D.G. Luther, D.J. Leprince, M.J. Van der Maaten, C.A. Whetstone and L.D. Foil (1993): Relative susceptibility of beef and dairy calves to infection by bovine leukemia virus via tabanid (Diptera: Tabanidae) feeding.
J. Med. Entomol., 30, 472-3
- Hatfield, D., Y.X. Feng, B.J. Lee, A. Rein, J.G. Levin and S. Oroszlan (1989): Chromatographic analysis of the aminoacyl-tRNAs which are required for translation of codons at and around the ribosomal frameshift sites of HIV, HTLV-I and BLV.
Virology, 173, 736-742
- Heeney, J.L., V.E. Valli and J. Montesanti (1988): Alterations in humoral immune response to bovine leukaemia virus antigens in cattle with lymphoma.
J. Gen. Virol., 69, 659-666
- Heeney, J.L. and V. Valli (1990): Transformed phenotype of enzootic bovine lymphoma reflects differentiation-linked leukemogenesis.
Lab. Invest., 62, 339-346
- Heeney, J.L., P.J.S Valli, R.M. Jacobs and V.E.O. Valli (1992): Evidence for bovine leukemia virus infection of peripheral blood monocytes and limited antigen expression in bovine lymphoid tissue.
Lab. Invest., 66, 608

- Henry, E.T., J.F. Levine and L. Coggins (1987): Rectal transmission of bovine leukemia virus in cattle and sheep.
Am. J. Vet. Res., 48, 634-636
- Hidalgo, G., M. Flores and J.A. Bonilla (1995): Detection and isolation of bovine immunodeficiency-like virus (BIV) in dairy herds of Costa-Rica.
J. Vet. Med. (B), 42, 155-161
- Hippemeyer P.J. and D.P. Grangenett (1984): Requirement of the avian retrovirus p32 DNA binding protein domain for replication.
Virology, 137, 358-370
- Hopkins, S.G., R.F. DiGiacomo, J.F. Evermann, S.M. Parish and J.F. Ferrer (1988): Trauma and rectal transmission of bovine leukemia virus in cattle.
J. Infect. Dis., 158, 1133-1134
- Hopkins, S.G., R.F. DiGiacomo, J.F. Evermann, J.D. Christensen, D.P. Deitelhoff and W.D. Mickelksen (1991): Rectal palpation and transmission of bovine leukemia virus in dairy cattle.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 199, 1035-1038
- Hofirek, B., F. Horin, M. Granatova, J. Franz, V. Madr and M. Machatkova (1986): Prukaz viru enzooticke leukozy skotu (BLV) u serologicky nereagujicich zvirat a vyznam tohoto zjistení pro sireni onemocnení.
Veterinarstvi, 36, 249-251
- Horzinek, C. (1996): Virale Evolution bei Hund und Katze.
Kleintierpraxis, 41, 317-326
- Hruskova-Heidingsfeldova, O. (1995): Proteins of bovine leukemia-virus and human T-cell leukemia viruses.
Fol. Biol. (Praha), 41, 201-212
- Ibelgaufts, H. (ed.) (1990): Gentechnologie von A bis Z.
VCH: Weinheim
- Innes, M.A., K.B. Myambo, D.H. Gelfand and M.A.D. Brow (1988): DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci., 85, 9436-9440
- Ishibashi, K., S. Hanada and S. Hashimoto (1987): Expression of HTLV-I in serum of HTLV-I-related subjects and the early detection of overt ATL in HTLV-I carriers.
J. Immunol., 139, 1509-1513
- Jacobs, R.M., V.Valli and B.N. Wilkie (1981): Response of cows with lymphoma to the intradermal injection of tumor cell antigens and phytohemagglutinin.
Can. J. Comp. Med., 45, 43-50

Jacobs, R.M., Z. Song, H. Poon, J.L. Heeney, J.A. Taylor, B. Jefferson, W. Vernau and V.E.O. Valli (1992): Proviral detection and serology in bovine leukemia virus-exposed normal cattle and cattle with lymphoma.
Can. J. Vet. Res., 56, 339-348

Jacobs, R.M., F.L. Pollari, W.B. McNab and B. Jefferson (1995): A serological survey of bovine syncytial virus in Ontario - associations with bovine leukemia and immunodeficiency-like viruses, production records and management-practices.
Can. J. Vet. Res., 59, 271-278

Jeang, Q.T., I. Boros, J. Brady, M. Radonovich and G. Khoury (1988): Characterization of cellular factors that interact with human leukemia virus typ I p40^X-responsive 21-base-pair sequence.
J. Virol., 62, 4499-4509

Jensen, W.A., J. Rovnak and G.L. Cockerell (1991): In vivo transkription of the bovine leukemia virus *tax/rex* region in normal and neoplastic lymphocytes of cattle and sheep.
J. Virol., 65, 2484-2490

Jimenez, C., J.A. Bonilla, G. Dolz and I.R. Rodriguez (1995): Bovine leukemia-virus infection in Costa-Rica.
J. Vet. Med. (B), 42, 385-390

Johnson, R., J.B. Kaneene and J.W. Lloyd, (1994): Lymphocyte colony formation by aleukemic sheep infected with bovine leukemia-virus.
Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 17, 1-13

Kaaden, O.R., B. Frenzel, B. Dietzschold, F. Weiland and M. Mussgay (1977): Isolation of a p15 polypeptide from bovine leukemia virus and detection of specific antibodies in leukemic cattle.
Virology, 77, 501-509

Kaaden, O.R. und B. Frenzel (1980): Eine Methode zum Direktnachweis des Rinderleukosevirus.
Fortschr. Vet., 30, 184-187

Kaaden, O.R., W. Fischer, A. Meermann and A. Libisch (1982a): Transmission of BLV by Ixodes ricinus ticks.
Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci., 15, 348-358

Kaaden, O.R., S. Lange, W. Romanowski, H. Marre, J. Pfeilsticker and R. Roselius (1982b): Transient viraemia with bovine leukaemia virus in bulls.
Zbl. Vet. Med. (B), 29, 269-274

Kaja, R.W. and C. Olson (1982): Non-infectivity of semen from bulls infected with bovine leukosis virus.
Teriogenology, 18, 107-112

Kassabov, R.S., M. Niaforowa und A.J. Kril (1991): Vergleichende Untersuchungen von dem in vitro kultiviertem Stamm des enzootischen Rinderleukosevirus und einem BLV Feldvirus.
Tierärztl. Umschau, 46, 480-483

Katoh, I., Y. Yoshinaka and Y. Ikawa (1989): Bovine leukemia virus trans-activator p38-*tax* activates heterologous promoters with a common sequence known as a cyclic AMP-responsive element or the binding site of a cellular transcription factor ATF.
EMBO, J., 497-503

Katz, R.A. and A.M. Skalka (1990): Generation of diversity in retroviruses.
Ann. Rev. Genet., 24, 409-445

Kautzsch, S. und H. Schlüter (1991): Kommentar zu H. Schumanns „Prognose der enzootischen Rinderleukose“.
Mh. Vet.-Med., 46, 368-369

Kaura, H.T. and O.J.B. Hubschle (1994): The occurrence of enzootic bovine leukosis (EBL) in Namibia.
Dtsch. Tierarztl. Wschr., 101, 66-67

Kenyon, S.J. and C.E. Piper (1977): Properties of density gradient-fractionated peripheral blood leukocytes from cattle with bovine leukemia virus.
Infect. Immun., 16, 898-903

Kenyon, S.J., J.F. Ferrer, R.A. McFeely and D.C. Graves (1981): Induction of lymphosarcoma in sheep by bovine leukemia virus.
J. Natl. Cancer Inst., 67, 1157-1163

Kerkhofs P., E. Adam, L. Droogmans, D. Portetelle, M. Mammerickx, A. Burny, R. Kettmann and L. Willems (1996): Cellular pathways involved in the ex-vivo expression of bovine leukemia-virus.
J. Virol., 70, 2170-2177

Kettmann, R., M. Mammerickx, D. Dekegel, J. Ghysdael, D. Portetelle and A. Burny (1975): Biochemical approach to bovine leukemia.
Acta Haematol., 54, 201-209

Kettmann, R., D. Portetelle, M. Mammerickx, Y. Cleuter, D. Dekegel, M. Galoux, J. Ghysdael, A. Burny and H. Chantrenne (1976): Bovine leukemia virus: an exogenous RNA oncogenic virus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1014-1018

Kettmann, R., A. Burny, Y. Cleuter, J. Ghysdael and M. Mammerickx (1978): Distribution of bovine leukemia virus proviral sequences in tissues of animals with enzootic bovine leukosis.
Ann. Rech. Vet., 9, 837-844

Kettmann, R., M. Meunier-Rotival, J. Cortadas, G. Cuny, J. Ghysdael, M. Mammerickx, A. Burny and G. Bernardi (1979): Integration of bovine leukemia virus DNA in the bovine genome.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4822-4826

Kettmann, R., Y. Cleuter, M. Mammerickx, M. Meunier-Rotival, G. Bernardi, A. Burny and H. Chantrenne (1980a): Genomic integration of bovine leukemia provirus: Comparison of persistent lymphocytosis with lymph node tumor form of enzootic bovine leukosis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 2577-2581

Kettmann, R., G. Marbaix, Y. Cleuter, D. Portetelle, M. Mammerickx and A. Burny (1980b): Genomic integration of bovine leukemia provirus and lack of viral RNA expression in the target cells of cattle with different responses to BLV-infection. *Leuk. Res.*, 4, 509-519

Kettmann, R., D. Couez and A. Burny (1981): Restriction endonuclease mapping of linear unintegrated proviral DNA of bovine leukemia virus. *J. Virol.*, 38, 27-33

Kettmann, R., J. Deschamps, Y. Cleuter, D. Couez, A. Burny and G. Marbaix (1982): Leukemogenesis by bovine leukemia virus: proviral DNA integration and lack of RNA expression of viral long terminal repeat and 3' proximate cellular sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 2465-2469

Kettmann, R., J. Deschamps, Y. Cleuter, D. Couez, J.-J. Claustrioux, R. Palm and A. Burny (1983): Chromosome integration domain for bovine leukemia provirus in tumors. *J. Virol.*, 47, 146-156

Kettmann, R., M. Mammerickx, D. Portetelle, D. Gregoire and A. Burny (1984): Experimental infection of sheep and goat with bovine leukemia virus: localization of proviral information in the target cells. *Leuk. Res.*, 8, 937-944

Kettmann, R., Y. Cleuter, D. Gregoire and A. Burny (1985): Role of the 3' long open reading frame region of bovine leukemia virus in the maintenance of cell transformation. *J. Virol.*, 54, 899-901

Kisstoth, E. and I. Unk (1994): Downstream regulatory element activates the bovine leukemia-virus promoter. *Bioch. Bioph. Res. Commun.*, 202, 1553-1561

Klintevall, K., K. Näsland, G. Svedland, L. Hajdu, N. Linde and B. Klingeborn (1991): Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus in milk and serum. *J. Virol. Meth.*, 33, 319-333

Klintevall, K., A. Ballagi-Pordany, K. Näslund and S. Belak (1994): Bovine leukemia virus: Rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. *Vet. Microbiol.*, 42, 191-204

Kuzmak, J., A. Skorupska, A. Moussa and J. Grandboeck (1993a): Application of nonradioactive method of DNA detection in the diagnosis of bovine leukemia virus infection. *Bul. Vet. Inst. Pulway*, 37, 3-8

Kuzmak J., L. Bicka, J. Grandboeckjusko, E. Buzala and B. Kozacynska (1993b): Application of the western-blot method for the detection of viral proteins or bovine leukemia virus (BLV) in lymphocytes of infected cattle. *Medycyna Wet.*, 49, 471-474

Kwok, S., G. Ehrlich, B. Poiesz, R. Kalish and J. Sninsky (1988): Enzymatic amplification of HTLV-I viral sequences from peripheral blood mononuclear cells and infected tissues. *Blood*, 72, 1117-1123

Kwok, S. and R. Higuchi (1989): Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 339, 237-238

Lagarias, D.M. and K. Radke (1989): Transkriptional activation of bovine leukemia virus in blood cells from experimentally infected, asymptomatic sheep with latent infections. *J. Virol.*, 63, 2099-2107

Lassauzet, M.-L.G., M.C. Thurmond and R.W. Walton (1989): Lack of evidence of transmission of bovine leukemia virus by rectal palpation of dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 195, 1732-1733

Lassauzet, M.-L.G., M.C. Thurmond, W.O. Johnson, S. Stevens and J.P. Picanso (1990): Effect of brucellosis vaccination and dehorning on transmission of bovine leukemia virus in heifers on a California dairy. *Canad. J. Vet. Res.*, 54, 184-189

Lassauzet, M.-L.G., M.C. Thurmond, W.O. Johnson, S. Stevens and J.P. Picanso (1991): Factor associated with transmission of bovine leukemia virus by contact in cows on a California dairy. *Am. J. Epidemiol.*, 133, 164-174

Lee, C.C. and C.T. Caskey (1990): cDNA cloning using degenerate primers. In: M.A. Innes, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (eds.), *PCR protocols, A guide to methods and amplifications*. Academic: San Diego, 46-59

Leitner, T., E. Halapi, G. Scarlatti, P. Rossi, J. Albert, E.-M. Fenyö and M. Uhlen (1993): Analysis of heterogeneous viral populations by direct DNA sequencing. *BioTechniques*, 15, 120-127

Levkut, M., W. Ponti, D. Soligo, N. Quirici and M. Rocchi (1995): Expression and quantification of IgG and IgM molecules on the surface of lymphocytes of cattle infected with bovine leukemia-virus. *Res. Vet. Sci.*, 59, 45-49

Lewin, H.A. and D. Bernoco (1986): Evidence for BoLA-linked resistance and susceptibility to subclinical progression of bovine leukemia virus infection. *Anim. Genet.*, 17, 197-207

Lewin, H.A., M.C. Wu, J.A. Stewart and T.J. Nolan (1988): Association between BoLA and subclinical bovine leukemia virus infection in a herd of Holstein-Friesian cows. *Immunogenetics*, 27, 338-344

Liebermann, H., W. Wittmann, M. Müller und E. Lehnert (1983): Zu einigen wesentlichen Erkenntnissen der ätiologischen und epizootiologischen Forschungen bei der Rinderleukose und sich daraus ergebenden grundsätzlichen Anforderungen an die Bekämpfungsprinzipien. *Mh. Vet.-Med.*, 38, 41-47

- Liggert, A.D. and S.W. Goldsmith (1986): Bovine neonatal death associated with *Trypanosoma theileri* infection.
Agri-Pract., 7, 29-30
- Lorenz, R., J. (1990): Die Ausbrüche der enzootischen Rinderleukose in der Bundesrepublik Deutschland seit 1984 mit besonderer Berücksichtigung des Jahres 1989.
Tierärztl. Umschau, 45, 388-390
- Losieczka, K. and S. Klimentowski (1994): Epizootiological analysis of the occurrence of enzootic bovine leukemia in individual farms.
Medycyna Wet., 50, 118-121
- Mager, A., R. Masengo, M. Mammerickx and J.J. Letesson (1994): T-cell proliferative response to bovine leukemia-virus (BLV) - identification of T-cell epitopes on the major core protein (p24) in BLV-infected cattle with normal hematological values.
J. Gen. Virol., 75, 2223-2231
- Mammerickx, M., D. Portetelle and A. Burny (1977): Study on the diagnosis of enzootic bovine leukosis by complement-fixation.
Zbl. Vet. Med. (B), 24, 349-357
- Mammerickx, M., A. Cormann, A. Burny, D. Dekegel and D. Portetelle (1978): Eradication of enzootic bovine leukosis based on the detection of the disease by gp immunodiffusion test.
Ann. Rech. Vet., 9, 885-894
- Mammerickx, M., D. Portetelle, A. Burny and J. Leunen (1980): Detection by immunodiffusion- and radioimmunoassay-tests of antibodies to bovine leukemia virus antigens in sera of experimental infected sheep and cattle.
Zbl. Vet. Med. (B), 27, 291-303
- Mammerickx, M., D. Portetelle and A. Burny (1981): Experimental cross-transmissions of bovine leukemia virus (BLV) between several animal species.
Zbl. Vet. Med. (B), 28, 69-81
- Mammerickx, M., D. Portetelle and A. Burny (1985a): Application of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) involving monoclonal antibody for detection of BLV antibodies in individual or pooled bovine milk samples.
Zbl. Vet. Med. (B), 32, 526-533
- Mammerickx, M., D. Portetelle, J. Nys and A. Burny (1985b): Rapid detection of bovine leukaemia virus infection in a large cattle population with an ELISA performed on pooled sera grouped by herd.
Zbl. Vet. Med. (B), 32, 601-608
- Mammerickx, M., D. Portetelle, K. DeClercq and A. Burny (1987): Experimental transmission of enzootic bovine leukosis to cattle, sheep and goats: infectious doses of blood and incubation period of the disease.
Leuk. Res., 11, 353-358

- Mamoun, R.Z., T. Astier, B. Guillemain and J.F. Duplan (1983a): Bovine lymphosarkoma: expression of BLV-related proteins in cultured cells.
J. Gen. Virol., 64, 2791-2795
- Mamoun, R.Z., T. Astier, B. Guillemain and J.F. Duplan (1983b): Bovine lymphosarkoma: processing of bovine leukemia coded proteins.
J. Gen. Virol., 64, 1895-1905
- Mamoun, R.Z., T. Astier-Gin, R. Kettmann, J. Deschamps, N. Rebeyrotte and B. Guillemain (1985): The pX region of the bovine leukemia virus is transcribed as a 2,1-kilobase mRNA.
J. Virol., 54, 625-629
- Mamoun, R.Z., M. Morrisson, N. Rebeyrotte, B. Busetta, D. Couez, R. Kettmann, M. Hospital and B. Guillemain (1990): Sequence variability of bovine leukemia virus *env* gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins.
J. Virol., 64, 4180-4188
- Mansky, L.M., A.E. Krueger and H.M. Temin (1995): The bovine leukemia-virus encapsidation signal is discontinuous and extends into the 5' end of the *gag* gene.
J. Virol., 69, 3282-3289
- Mansky, L.M. and H.M. Temin (1994): Lower mutation rate of bovine leukemia virus relative to that of spleen necrosis virus.
J. Virol., 68, 494-499
- Marsolais, G., R. Dubuc, J. Bergeron, J.D. Morrey and E. Kelly (1994): Importance of primer selection in the application of PCR technology to the diagnosis of bovine leukemia-virus.
J. Vet. Diagn. Invest., 6, 297-301
- Maxam, A.M. and W. Gilbert (1977): A new method for sequencing DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci., 47, 560-564
- McDonald, H.C. and J.F. Ferrer (1976): Detection, quantitation and characterization of the major internal virion antigen of the bovine leukemia virus by radioimmunoassay.
J. Natl. Cancer Inst., 57, 875-882
- Meeker, A.K., Y-K. Li and D. Shortle (1993): A simplified protocol for isolation and characterization of ssM13 DNA templates for use in dideoxy sequencing.
BioTechniques, 15, 1370-371
- Menard A., R.Z. Mamoun, S. Geoffre, M. Castraviejo, S. Raymond, G. Precigoux, M. Hospital and B. Guillemain (1993): Bovine leukemia virus: purification and characterization of the aspartic protease.
Virology, 68, 494-499
- Merza, M., E. Larsson, M. Steen and B. Morein (1994): Association of a retrovirus with a wasting condition in the Swedish moose.
Virology, 202, 956-961
- Meszaros, J., T. Antal, A.T. Polner, L. Sumeghy and I. Szabo (1994): Eradication of bovine leukosis from a heavily infected herd by the use of own offspring.
Acta V. Hung., 42, 421-432

Mewes, G. (1996): Persönliche Mitteilung

Miko, A., D. Scholz und K.-W. Perlberg (1987): Entwicklung und Charakterisierung eines Enzymimmunoassays zum Nachweis von Antikörpern gegen das bovine Leukosevirus. Arch. exper. Vet. med., 41, 724-731

Miller, J.M., L.D. Miller, C. Olson and K.G. Gillette (1969): Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulating cultures with reference to bovine lymphosarcoma. J. Natl. Cancer Inst., 43, 1297-1305

Miller, J.M. and C. Olson (1972): Brief communication: Precipitating antibody to an internal Antigen of the C-type virus associated with bovine lymphosarcoma. J. Natl. Cancer Inst., 49, 1459-1462

Miller, J.M. and M.J. Van der Maaten (1977): Use of glycoprotein in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. Europ. J. Cancer, 13, 1369-1375

Miller, J.M., J.M. Van der Maaten and M. Phillips (1977): Studies of a glycoprotein associated with bovine leukemia virus. In: A. Burny (ed.): Bovine leukosis: Various methods of molecular virology. Comm. Europ. Commun. Luxembourg, 69-82

Miller, J.M. and M.J. Van der Maaten (1979): Infectivity tests of secretions and excretions from cattle infected with bovine leukemia virus. J. Natl. Cancer Inst., 62, 425-428

Miller, L.D. (1980): Export testing for enzootic bovine leukosis. J. Am. Vet. Med. Assoc., 177, 620-622

Miller, J.M., M.J. Van der Maaten and M.J.F. Schmerr (1983): Vaccination of cattle with binary ethylenimine-treated bovine leukemia virus. Am. J. Vet. Res., 44, 64-67

Mirsky, M.L., Y. Da and H.A. Lewis (1993): Detection of bovine leukemia virus proviral DNA in individual cells. PCR Methods and Applicationes, 333-340

Molley, J.B., P.J. Walker, F.C. Baldock, B.J. Rodwell and J.A. Cowley (1990): An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine leukemia virus p24 antibody in cattle. J. Virol. Methods, 28, 47-58

Molteni, E., A. Agresti, R. Meneveri, A. Marozzi, M. Malcovati, L. Bonizzi, G. Poli and E. Ginelli (1996): Molecular characterization of a variant of proviral bovine leukemia virus (BLV). J. Vet. Med. (B), 43, 201-211

Mullis, K.B., F.A. Faloona, S.J. Scharf, R.K. Saiki, G.T. Horn and H.A. Erlich (1986): Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51, 263-273

- Mullis, K.B. and F.A. Faloon (1987): Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction.
Methods Enzymol., 155, 335-350
- Murakami, K., Y. Aida, R. Kageyana, S. Numakunai, K. Ohshima, K. Okada and Y. Ikawa (1994a): Immunopathologic study and characterization of the phenotype of transformed cells in sheep with bovine leukemia virus-induced lymphosarcoma.
Am. J. Vet. Res., 55,
- Murakami, K., K. Okada, Y. Ikawa and Y. Aida (1994b): Bovine leukemia-virus induces Cd5-B-cell lymphoma in sheep despite temporarily increasing Cd5+ B-cells in asymptomatic stage.
Virology, 202, 458-465
- Murtaugh, M.P., G.F. Lin, D.L. Haggard, A.F. Weber and J.C. Meiske (1991): Detection of bovine leukemia virus in cattle by the polymerase chain reaction.
J. Virol. Methods, 33, 73-85
- Mussgay, M. and O.R. Kaaden (1978): Progress in studies on the etiology serology diagnosis of enzootic bovine leukosis.
Curr. Top. Microbiol. Immunol., 79, 43-72
- Naif, H.M., R.B. Brandon, R.C.W. Daniel and M.F. Lavin (1990): Bovine leukemia proviral DNA detection in cattle using the polymerase chain reaction.
Vet. Microbiol., 25, 117-129
- Nguyen V.K. and R.F. Maes (1993): Evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine leukemia virus in serum and milk.
J. Clin. Microbiol., 31, 979-981
- Nyakatura, G., J. Jantschak, U. Nötzel, S. Prösch, S. Rosenthal and H.A. Rosenthal (1985): Molecular cloning of integrated proviral DNA of bovine leukaemia virus from virus producing foetal lamb kidney cells.
Fol. biol. (Praha), 31, 115-120
- Nyborg, J. and W. Dynan (1990): Interaction of cellular proteins with the human T-cell leukemia virus type I transcriptional control region.
J. Biol. Chem., 265, 8230-8236
- Nyborg, J., W. Dynan, I. Chen and W. Wachmann (1988): Binding of host-cell factor to DNA sequences in the long terminal repeat of T-cell leukemia virus type I: implications for viral gene expression.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 1457-1461
- Okada K., I. Sakaguchi, S. Numakunai, Y. Aida, M. Onuma and K. Oshima (1987): Existence of antigens cross-linking to tumor associated antigens of enzootic bovine leukosis in normal tissues of the bovine fetus.
Jap. J. Vet. Sci., 49, 373-377

- Okada, K., Y. Hosokawa, Y. Aida and K.-I. Ohshima (1991): *In situ* hybridization for the demonstration of bovine leukemia virus transcripts in lymphosarcoma cells using biotinylated probes.
J. Vet. Med. (B), 38, 707-713
- Olson, C., R. Kettmann, A. Burny and R. Kaja (1981): Goat lymphosarcoma from bovine leukemia virus.
J. Natl. Cancer Inst., 67, 671-675
- Onuma, M., T. Honma, T. Mikami, S. Ichijo and T. Konishi (1979): Studies on the sporadic and enzootic forms of bovine leukosis.
J. Comp. Path., 89, 159-167
- Onuma, M., N. Sagata, K. Okada, Y. Ogawa, Y. Ikawa and K. Oshima (1982): Integration of bovine leukemia virus DNA in the genomes of bovine lymphosarcoma cells.
Microbiol. Immunol., 26, 813-820
- Onuma, M. (1989): Tumor-associated antigen on bovine leukemia virus-induced bovine lymphosarcoma.
Vet. Immunol. Immunopathol., 22, 213-221
- Oroszlan, S., M.G. Sarngadharan, T.D. Copeland, V.S. Kalranaraman, R.V. Gilden and R.C. Gallo (1982): Primary structure analysis of the major internal protein p24 of human type C T-cell leukemia virus.
Proc. Natl. Acad. Sci., 79, 1291-1294
- Panganiban, A.T. and H.M. Temin (1983): The terminal nucleotides of retrovirus DNA are required for DNA integration but not virus production.
Nature, 306, 155-160
- Parfanovich, N.I., V.N. Zhdanov, A.A. Lazarenko, E.M. Nömm, Y.A. Simovat, V.K. Parakin and V.M. Lemech (1983): Impossibility of specific protection against bovine leukemia virus infection and bovine leukemia with inactivated BLV.
Brit. Vet. J., 139, 137-146
- Patrescu I.V., T. Andrian and O. Costachel (1980) Absence of precipitating antibodies to the glucoprotein and p24 fractions of bovine leukosis in humans.
Rev. Roman Med. Virol., 31, 141-142
- Paul, P.S., K.A. Pomeroy, D.W. Johnson, C.C. Muscoplat, P.S. Handwerger, F.F. Soper and D.K. Sorensen (1977a): Evidence for the replication of bovine leukemia virus in B lymphocytes.
Am. J. Vet. Res., 38, 873-876
- Paul, P.S., K.A. Pomeroy, A.E. Castro, D.W. Johnson, C.C. Muscoplat and D.K. Sorensen (1977b): Detection of bovine leukemia virus in B-lymphocytes by the syncytia induction assay.
J. Natl. Cancer Inst., 59, 1269-1272

- Perlberg, K.W., A. Miko, R. Weiss, R. Gühring und R. v. Baehr (1984): Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern gegen das bovine Leukosevirus bei neugeborenen Kälbern mit Hilfe des Enzymimmuntests im Vergleich zum Immundiffusionstest.
Mh. Vet.-Med., 39, 129-133
- Piper, C.E., J.F. Ferrer, D.A. Abt and R.R. Marshak (1979): Postnatal and prenatal transmission of the bovine leukemia virus under natural conditions.
J. Natl. Cancer Inst., 62, 165-168
- Platzer, C., H. Siakkou, J. Sober, J. Kopp, E. Scheve and S. Rosenthal (1990): Identification of an immunodominant region on the isolated bovine leukaemia virus (BLV) major envelope protein gp51 by monoclonal antibodies presumably not exposed during natural BLV infection.
Acta virol. (Praha), 34, 246-255
- Platzer, C. (1990): Monoklonale Antikörper gegen Proteine des bovinen Leukämievirus - Verwendung zur Analyse der Antigenstruktur und in immunologischen Nachweissystemen.
Rer. Nat. Diss., Humboldt-Universität zu Berlin
- Poon, H., E. Jimenez, R.M. Jacobs, Z. Song and B. Jefferson (1993): Detection of bovine leukemia virus RNA in serum using the polymerase chain reaction.
J. Virol. Methods, 41, 101-112
- Popov, A., V.A. Adarichev, S.M. Kalachikov, E.S. Mishina and G.M. Dymshits (1993): Detection of bovine leukemia provirus by polymerase chain-reaction followed by nonradioactive blot hybridization.
Voprosy Virusologii, 38, 113-116
- Portetelle, D., R. Kettmann, M. Mammerickx, Y. Cleuter, D. Dekegel, M. Galoux, J. Ghysdael, A. Burny and H. Chantrenne (1976): Biochemical features of bovine leukemia virus.
Vet. Microbiol., 1, 129-158
- Portetelle, D., M. Mammerickx, F. Bex, A. Burny, Y. Cleuter, D. Dekegel, J. Ghysdael, R. Kettmann and H. Chantrenne (1977): Purification of BLV gp70 and BLV p24. Detection by radioimmunoassay of antibodies directed against these antigens. In: A. Burny (ed.): Bovine leukosis- Various methods of molecular virology
Comm. Europ. Commun: Luxembourg, 131-152
- Portetelle, D., C. Bruck, A. Burny, D. Dekegel, M. Mammerickx and J. Urbain (1978): Detection of complement-dependent lytic antibodies in sera from bovine leukemia virus-infected animals.
Ann. Rech. Vet., 9, 667-674
- Portetelle, D., D. Couez, C. Bruck, R. Kettmann, M. Mammerickx, M. Van der Maaten, R. Brasseur and A. Burny (1989a): Antigenic variants of bovine leukemia virus (BLV) are defined by amino acid substitutions in the NH₂ part of the envelope glycoprotein gp51.
Virology, 169, 27-33

Portetelle, D., C. Dandoy, A. Burny, J. Zavada, H. Siakkou, H. Gras-Masse, H. Drobecq and A. Tartar (1989b): Synthetic peptides approach to identification of epitopes on bovine leukemia virus envelope glycoprotein gp51.

Virology, 169, 34-41

Portetelle, D., M. Mammerickx and A. Burny (1989c): Use of two monoclonal antibodies in an ELISA test for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus envelope protein gp51.

J. Virol. Methods, 23, 211-222

Prober, J.M., G.T. Trainor, R.J. Dam, F.W. Hobbs, C.W. Robertson, R.J. Zagursky, A.J. Cocuzza, M.A. Jensen and K. Baumeister (1987): A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides.

Science, 238, 336-339

Quinn T.P. and D.P. Grandgenett (1988): Genetic evidence that the avian retrovirus DNA endonuclease domain of the *pol* is necessary for viral integration.

J. Virol., 62, 2307-2312

Quirke, P. (1992): The molekular revolution - coming your way soon.

Gut, 33, 1-3

Reinacher, M., M.C. Thurmond, M. Onuma, D. Portetelle, J. Picanso and G.H. Theilen (1989): Immunohistological demonstration of virus and tumor associated antigens in tissues in experimental and spontaneous bovine leukemia virus (BLV) infection.

Vet. Immunol. Immunopathol., 22, 223-231

Ressang, A.A., D.J. Ellens, N. Mastebroek, J. Quak, J.M. Miller and M. J. Van der Maaten (1976): Studies on bovine leukemia: II. Haematological, serological, virological and electron microscopical diagnosis.

Zbl. Vet. Med. (B), 23, 566-579

Ressang, A.A., N. Mastebroek and J. Quak (1978): Studies of bovine leukemia IV: A comparative study on the practical value of the agar gel immunodiffusion test, the indirect fluorescent antibody technique and the micro complement fixation test for the detection of antibodies to bovine leukemia virus. In: Wittmann, W. (ed.): Leukosen der Wiederkäuer

Gustav Fischer: Jena, Stuttgart, 1-259

Ressang, A.A., A.L.J. Gielkens, N. Mastebroek and J. Quak (1981): Studies of bovine leukosis VII: Further experience with an ELISA for the detection of antibodies to bovine leukosis virus.

Vet. Quarterly, 3 (1), 31-33

Ressang, A.A., N. Mastebroek and J. Quak (1982): Studies on bovine leukosis: IX. Excretion of bovine leukosis virus.

Zbl. Vet. Med. (B), 29, 137-144

Rhim, J.S., M. Kraus and P. Arnstein (1983): Transformation of fetal lamb kidney cells by bovine leukemia virus.

Leukemia Rev. Intern., 1, 127-128

- Rice, N.R., R.M. Stephens, D. Couez, J. Deschamps, R. Kettmann, A. Burny and R.V. Gilden (1984): The nucleotide sequence of the *env* gene and post-*env* region of bovine leukemia virus. *Virology*, 138, 82-93
- Rice, N.R., R.M. Stephens, A. Burny and R.V. Gilden (1985): The *gag* and *pol* genes of bovine leukemia virus: nucleotide sequence and analysis. *Virology*, 142, 357-377
- Rice, N.R., S.L. Simek, G.C. Dubois, S.D. Showalter, R.V. Gilden and R.M. Stephens (1987): Expression of the bovine leukemia virus X region in virus-infected cells. *J. Virol.*, 61, 1577-1585
- Rimsky, L., M. Duc Dodon, E.P. Dixon and W.C. Green (1989): Transdominant inactivation of HTLV-I and HIV-I expression by mutation of the HTLV-I *rex* transactivator. *Nature*, 341, 353-356
- Roberts, D.H., M.H. Lucas and G. Wibberley (1986): To compare the incubation period following intratracheal and subcutaneous inoculation of bovine leukosis virus infected lymphocytes and to study their clearance from the circulation. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 11, 351-359
- Rössler, H., O. Werner, B. Brescher, W. Wittmann, P. Venker und S. Rosenthal (1980): Ein verbesserter Test zum Nachweis der reversen Transkriptase des Rinderleukosevirus. *Arch. exper. Vet. med.*, 34, 595-615
- Rogers, R.J., C.K., Dimmock, A.J. de Vos and D.J. Rodwell (1988): Bovine leukosis virus contamination of a vaccine produced *in vivo* against bovine babesiosis and anaplasmosis. *Austral. Vet. J.*, 65, 285-287
- Rommel, M. (1992): Infektionen mit apathogenen Trypanosomen. In: J. Boch und R. Supperer (eds.), *Veterinärmedizinische Parasitologie*. Paul Parey: Berlin, Hamburg, 4. Aufl., 114-115
- Rosen, C.A., J.G. Sodroski, L. Willems, R. Kettmann, K. Camobell, R. Zaya, A. Burny and W.A. Haseltine (1986): The 3' region of bovine leukemia virus genome encodes a transactivator protein. *EMBO J.*, 5, 2585-2589
- Rosenthal, S., B. Drescher, S. Weber and R. Möhring (1990): Nukletid sequence analysis of the 3' end of the bovine leukemia virus grown in FLK cells. *Acta virologica (Praha)*, 34, 1-10
- Rosenthal, A., O. Coutelle and M.T.I. Craxton (1993): Large-scale production of DNA sequencing templates by microtiter format PCR. *Nucleic Acids Res*, 21, 173-174
- Rulka, J., B. Kozaczynska, M. Reichert and E. Buzala (1994a): TI diagnostic values of 2 antigens in the immunodiffusion test - containing only bovine leukemia (BLV) and comprising BLV plus parainfluenza virus (Vol 50, Pg 18, 1994). *Medycyna Wet.*, 50, 144

- Rulka, J., J. Stec, B. Kozaczynska and S. Klimentowski (1994b): Immunogenicity of enzootic bovine leukemia virus in calves infected with FLK cells and lymphocytes from leucemic cattle. *Medycyna Wet.*, 50, 79-81
- Sagata, N., Y. Ogawa, J. Kawamura, M. Onuma, H. Izawa and Y. Ikawa (1983): Molecular cloning of bovine leukemia virus DNA integrated into the bovine tumor cell genome. *Gene*, 26 (1), 1-10
- Sagata, N., T. Yaunaga, Y. Ogawa, J. Tsuzuku-Kawamura and Y. Ikawa (1984a): Bovine leukemia virus: unique structural features of its long terminal repeats and its evolutionary relationship to human T-cell leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 4741-4745
- Sagata, N., T. Yaunaga, K. Ohishi, J. Tsuzuku-Kawamura, M. Onuma and Y. Ikawa (1984b): Comparison of the entire genomes of bovine leukemia virus and human T-cell leukemia virus and characterization of their unidentified open reading frame. *EMBO J.*, 3, 3231-3237
- Sagata, N., J. Tsuzuku-Kawamura, M. Nagyoshi-Aida, F. Shimizu, K.I. Imagawa and Y. Ikawa (1985a): Identification an some biochemical properties of the major X_{BL} gene product of bovine leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 7879-7883
- Sagata, N., T. Yasunaga, J. Tsuzuku-Kawamura, K. Ohishi, Y. Ogawa and Y. Ikawa (1985b): Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: Its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 677-681
- Sagata, N., T. Yasunaga and Y. Ikawa (1985c): Two distinct polypeptides may be translated from a single spliced mRNA of the X genes of human T cell leukemia and bovine leukemia viruses. *FEBS Letters*, 192, 37-42
- Sagner, G. (1993): Nonradioactive DNA sequencing with the dig Taq DNA sequencing kit. *Colloquium*, 2, 10-11
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis and H.A. Erlich (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science*, 239, 487-491
- Sakurai, M., A. Taneda, H. Nagoya and K. Sekikawa (1991): Construction and functional characterization of mutants of the bovine leukaemia virus trans-activator protein p34^{tax}. *J. Gen. Virol.*, 72, 2527-2531
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis (1989): *Molekular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York
- Sanger, F.S. and A.R. Coulsen (1975): A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, 94, 444-448

- Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson (1977): DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467
- Schmitz, D.G. and T.L. Seahorn (1994): Use of echocardiography to detect tumors in the heart of a bull with bovine leukosis.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 205, 1590-1592
- Schramm, G. und A. Aragon (1994): Fallstudie über den Einfluß von Leukose und Leukosebekämpfungsmaßnahmen auf die Produktions- und Reproduktionsleistungen einer Milchviehherde in Cost Rica.
Tierärztl. Umschau, 49, 26-31
- Schröder, A. (1993): Bovines Herpesvirus I- Charakterisierung der Glykoprotein gI kodierenden DNA-Sequenz des attenuirten Virusstammes deer Riemser IBR/IPV-Vakzine
Agrar. Diss., Humboldt Universität zu Berlin
- Schwartz, I. and D. Levy (1994): Pathobiology of bovine leukemia-virus.
Vet. Res., 25, 521-536
- Sears, L.E. (1992): CircumVent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo) DNA-Polymerase.
Appl. Environ. Microbiol., 58, 3751-3758
- Seiki, M., S. Hattori, Y. Hirayama and M. Yoshida (1983): Human T-cell leukemia virus: Moleclular cloning off the provirus DNA and the unique terminal structure. In: Sagata, N., T. Yaunaga, Y. Ogawa, J. Tsuzuku-Kawamura and Y. Ikawa (1984): Bovine leukemia virus: unique structural features of its long terminal repeats and its evolutionary relationship to human T-cell leukemia virus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4741-4745
- Seiki, M., A. Hikikoshi, T. Taniguchi and M. Yoshida (1985): Expression of the pX gene of HTLV-I: general splicing mechanism in the HTLV family.
Science, 228, 1532-1534
- Singer, M. und P. Berg (eds.) (1990): Gene und Genome.
Spektrum: Heidelberg, Berlin, New York
- Singh, V.P. and M.P. Bansal (1986a): Experimental bovine leukemia virus infection in laboratory animals.
Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis., 7, 71-75.
- Singh, V.P. and M.P. Bansal (1986b): Infectivity of bovine leukemia virus for indigenous breed of goats.
Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis, 7, 98-100.
- Slamon, D.J., K. Shimotohno, M.J. Cline, D.W. Golde and I.S.Y. Chen (1984): Identification of the putativ transforming protein of the human T-cell leukemia viruses HTLV-I and HTLV-II.
Science, 226, 61-65

- Smith, L.M., S. Fung, M.W. Hunkapiller, T.J. Hunkapiller and L.E. Hood (1985): The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus; synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis. *Nucleic Acids Res.*, 13, 2399-2412
- Smith, L.M., J.Z. Sanders, R.J. Kaiser, P. Hughes, C. Dood, C.R. Connell, C. Heiner, S.B.H. Kent and L.E. Hood (1986): Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 321, 674-679
- Smith, M.R. and W.C. Green (1990): Identification of HTLV-I *tax* trans-activator mutants exhibiting novel transcriptional phenotypes. *Genes and Development*, 4, 1875-1885
- Smith, C.L. and C.W. Fuller (1996): Artefact free DNA sequencing with new ³³P-radiolabelled ddNTPs and Thermo Sequenase. *Life Sci. News*, 20, 2-4
- Snider, T.G., D.G. Luther, B.F. Jenny, P.G. Hoyt, J.K. Battels, W.H. Ennis, J. Balady, U. Blasmachado, T.X. Lemarchand and M.A. Gonda (1996): Encephalitis, lymphoid-tissue depletion and secondary diseases associated with bovine immunodeficiency virus in a dairy. *Comp. Imm. Microbiol. Inf. Dis.*, 19, 117-131
- Sommer, G., A. Kurg, H.J. Wagner, S. Heymann, P. Blankenstein and D. Ebner (1990): Studies into position of presumed packing site in genome of bovine leukosis virus. *Mh. Vet.-Med.*, 45, 713-716
- Sommer, G. (1992): persönliche Mitteilung
- Srivastava, A.K., V. Montanaro and J. Kere (1992): Simplified template preparation and improved direct sequencing using *Taq* polymerase. *PCR Meth. Appl.*, 1, 255-256
- Stoflet, E.S., D.D. Koeberl, G. Sakar and S.S. Sommer (1988): Genomic amplification with Transcript sequencing. *Science*, 239, 491-497
- Stott, M.L., M.C. Thurmond, St.J. Dunn, B.I. Osburn and J.L. Stott (1991): Integrated bovine leukosis proviral DNA in T helper and T cytotoxic/suppressor lymphocytes. *J. Gen. Virol.*, 72, 307-315
- Straub, O.C. (1978): Horizontal transmission studies on enzootic bovine leukosis. *Ann. Rech. Vet.*, 9, 809-813
- Straub, O.C. (1982): Transmission studies for leucotic cattle to sheep using secretions, excretions, breath and skin scrapings. *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.*, 15, 299-309
- Straub, O.C. (1984): The importance of the seropositive dam's state for transmission and spread of enzootic bovine leukosis. In: O.C. Straub (ed.), *Fifth International Symposium on Bovine Leukosis*. *Comm. Europ. Commun.*, Luxembourg, 258-264

Straub, O.C. (1996): Persönliche Mitteilung.

Theilen, G., R. Ruppner and J. Miller (1982): Vaccination against bovine leukemia virus (BLV) Proc. Am. Assoc. Cancer. Res., 23, 277

Thurmond, M.C., R.L. Carter, D.M. Puhr and M.J. Burrige (1982): Decay of colostral antibodies to bovine leukemia virus with application to detection of calfhoo infection. Am. J. Vet. Res., 43, 1152-1155

Thurmond, M.C. and M.J. Burrige (1982): Application of research to control of bovine leukemia virus infection and to exporation of bovine leukemia virus free cattle and semen. J. Am. Vet. Med. Ass., 181, 1531-1534

Thurmond, M.C., R.L. Carter, D.M. Puhr, M.J. Burrige, J.M. Miller, M.J.F. Schmerr and M.J. Van der Maaten (1983): An epidemiological study of natural in utero infection with bovine leukemia virus. Can. J. Comp. Med., 47, 316-319

Uckert W. and V. Wunderlich (1979): Proteins of bovine leukemia virus: p15 is the major phosphoprotein. Acta biol. med. germ. 38, K35-K42

Uckert, W., M. Grofova und G. Beaudreau (1984a): Translational order of bovine leukemia virus *gag* and *env* gene-coded protein. Virology, 135, 288-292

Uckert, W., V. Wanderlich, J. Ghysdael, D. Portetelle and A. Burny (1984b): Bovine leukemia virus (BLV) - a structural model based on chemical crosslinking studies. Virology, 133, 386-392

Uckert, W., I. Hertling, R. Kraft, H. Bossmann, H. Rössler und U. Meyer (1987): Strukturbestandteile des Rinderleukosevirus: Eine weitere biochemische and immunologische Charakterisierung der internen Strukturproteine and Hüllglykoproteine. Arch. exper. Vet. med. 41, 692-696

Van den Broeke, A., Y. Cleuter, G. Chen, D. Portetelle, M. Mammerickx, D. Zagury, M. Fouchard, L. Coulombel, R. Kettmann and A. Burny (1988): Even transcriptionally competent proviruses are silent in bovine leukemia virus-induced sheep tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 85, 9263-9267

Van der Maaten, M.J., J.M. Miller and A.D. Boothe (1974): Replicating type-C virus particles in monolayer cell cultures of tissues from cattle with lymphosarcoma. J. Natl. Cancer Inst., 52, 491-497

Van der Maaten, M.J. and J. M. Miller (1976): Serological evidence of transmission of bovine leukemia virus to chimpanzees. Vet. Microbiol., 1, 351-357

- Van der Maaten, M.J. and J.M. Miller (1978): Susceptibility of cattle to bovine leukemia virus infection by various routes of exposure. In: P. Bentvelzen, J. Hilgert and O.S. Yohn (eds.): Advances in comparative leukemia research. Elsevier/North Holland Biomedical Press: Amsterdam, 29-32
- Van der Maaten, M.J., J.M. Miller and M.J.F. Schmerr (1981): Effect of colostral antibody on bovine leukemia virus infection of neonatal calves. Am. J. Vet. Res., 42, 1498-1500
- Wachsmann, W., D. W. Golde, P.A. Temple, E.R. Orr, S.C. Clark and I.S.Y. Chen (1985): HTLV x-Gene product: requirement for the *env* methionine initiation codon. Science, 228, 1534-1537
- Wagner, H.-J., P. Blankenstein, A. Bondzio, D. Ebner and S. Risse (1995): Increase of antigen production in BLV-infected cell lines via additional expression of *tax*. J. Vet. Med (B), 42, 543-550
- Walker, P.J., J.B. Molloy and B.J. Rodwell (1987): A protein immunoblot test for detection of bovine leukemia virus p24 antibody in cattle and experimentally infected sheep. J. Virol. Methods, 15, 201-211
- Wang, C.T. (1991): Bovine leukemia virus infection in Taiwan: epidemiological study. J. Vet. Med. Sci., 53, 394-398
- Ward, W.H., M.W.M. Hill, I.D. Mazlin and C.K. Foster (1984): Anaemia associated with a high parasitaemia of *Trypanosoma theileri* in a dairy cow. Austral. Vet. J., 61, 324
- Weber, R. and H. Wehrle (1994): PCR in der Diagnostik. In: Wink, M. und H. Wehrle (eds.): PCR im medizinischen and biologischen Labor. GIT: Darmstadt, 1. Aufl., 97-136
- Weiland, F. and S. Ueberschär (1976): Ultrastructural comparison of bovine leukemia virus (BLV) with C-type particles of other species. Arch. Virol., 52, 187-190
- Wilesmith, J.W. (1979): Needle transmission of bovine leukosis virus. Vet. Rec., 104, 107
- Wilesmith, J.W., O.C. Straub and R.J. Lorenz (1980): Some observations on the epidemiology of bovine leukosis virus infection in a large dairy herd. Res. Vet. Sci., 28, 10-16
- Willems, L., C. Bruck, D. Portetelle, A. Burny and R. Kettmann (1987a): Expression of a cDNA clone corresponding to the long open reading frame (X_{BL}-I) of the bovine leukemia virus. Virology, 160, 55-59
- Willems, L., A. Gegonne, G. Chen, A. Burny, R. Kettmann and J. Ghysdael (1987b): The bovine leukemia virus p34 is a transactivator protein. EMBO J., 6, 3385-3389

Willems, L., C. Letellier, M. Gonze, R. Martin, R. Kettmann, A. Burny and G. Meulemans (1989): Expression of the bovine leukemia virus transactivator protein p34 by a recombinant vaccinia virus.

Vet. Immunol. Immunopathol., 22, 201-211

Willems, L., R. Kettmann, G. Chen, D. Portetelle, A. Burny and D. Derse (1992a): A cyclic AMP-responsive DNA-binding protein (CREB2) is a cellular activator of the bovine leukemia virus long terminal repeat.

J. Virol., 66, 766-772

Willems, L., D. Portetelle, P. Kerkhofs, G. Chen, A. Burny, M. Mammerickx and R. Kettmann (1992b): *In vivo* transfection of bovine leukemia provirus into sheep.

Virology, 189, 775-777

Willems, L., C. Grimonpont, H. Heremans, N. Rebeyrotte, G. Chen, D. Portetelle, A. Burny and R. Kettmann (1992c): Mutations in the bovine leukemia virus *Tax* protein can abrogate the long terminal repeat-directed transactivating activity without concomitant loss of transforming potential.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3957-3961

Willems, L., E. Thienpont, P. Kerkhofs, A. Burny, M. Mammerickx and R. Kettmann (1993a): Bovine leukemia virus, an animal model for the study of intrastrain variability.

J. Virol., 67, 1086-1089

Willems, L., R. Kettmann, F. Dequiedt, D. Portetelle, V. Voneche, I. Cornil, P. Kerkhofs, A. Burny and M. Mammerickx (1993b): *In vivo* infection of sheep by bovine leukemia virus mutants.

J. Virol., 67, 4078-4085

Willems, L., P. Kerkhofs, F. Dequiedt and D. Portetelle (1994): Attenuation of bovine leukemia-virus by deletion of R3 and G4 open reading frames.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 91, 11532-11536

Willems, L., J.S. Gatot, M. Mammerickx, D. Portetelle and A. Burny (1995a): The YxxI signaling motifs of the bovine leukemia-virus transmembrane protein are required for in-vivo infection and maintenance of high viral loads.

J. Virol., 69, 4137-4141

Willems, L., P. Kerkhofs, M. Mammerickx and R. Kettmann (1995): Lack of LTR and env genetic variation during bovine leukemia virus induced leukemogenesis.

Virology, 206, 769-772

Williams, D.L., G.F. Amborski and W.C. Davis (1988a): Enumeration of T and B lymphocytes in bovine leukemia virus infected cattle, using monoclonal antibodies.

Am. J. Vet. Res., 49, 1098-1103

Williams, D.L., O. Barta and G. Amborski (1988b): Molecular studies of T-lymphocytes from cattle infected with bovine leukemia virus.

Vet. Immunol. Immunopathol., 19, 307-323

Wink, M. und H. Wehrle (eds.): PCR im medizinischen und biologischen Labor.
GIT: Darmstadt, 1. Aufl., 97-136

Wittmann, W. und D. Urbaneck (1969): Untersuchungen zur Ätiologie der Rinderleukose: 8. Übertragungsversuche mit Blut leukosekranker Rinder auf Schaflämmer.
Arch. Exper. Vet. Med., 23, 709-713

Wittmann, W., H. Liebermann, E. Starick, H. Liebermann, G. Dietz, R. Riebe, U. Meyer, S. Schilow, K.H. Kluge und F. Heim (1983): Die virologisch-serologischen Diagnosemöglichkeiten der Rinderleukose sowie die Diagnostikkonzeption in der Deutschen Demokratischen Republik.
Mh. Vet.-Med., 38, 53-59

Wittmann, W., E. Starick, H. Liebermann, G. Dietz, H. Pitzschke, I. Raettig und K.H. Kluge (1986): Die intrauterine Infektion und ihre Bedeutung für die Weiterverbreitung der enzootischen Rinderleukose sowie darauf aufbauende Maßnahmen der Bekämpfung.
Arch. exper. Vet. med., 40, 363-367

Wittmann, W. (1993): Leukosen der Wiederkäuer.
Gustav Fischer Verlag, Jena Stuttgart, 1-259

Wyatt, C.R., D. Wingett, J.S. White, C.D. Buck, D. Knowles, R. Reeves and N.S. Magnuson (1989): Persistent infection of rabbits with bovine leukemia virus associated with development of immune dysfunction.
J. Virol. , 63, 4498-4506

Yoshinaka Y. and S. Oroszlan (1985): Bovine leukemia virus postenvelope gene coded protein: Evidence for expression in natural infection.
Biochem. Biophys. Res. Com., 131, 347-354

Yoshinaka, Y., I. Katoh, T. Copeland, G.W. Smythers and S. Oroszlan (1986): Bovine leukemia virus protease: purification, chemical analysis and in vitro processing of *gag* precursor polyproteins.
J. Virol., 57, 826-832

Zabransky, A. (1993): Study of the Proteinase from bovine leukemia virus. In: Hruskova-Heidingsfeldova, O. (1995): Proteins of bovine- and human T-cell leukemia viruses.
Fol. biol. (Praha), 41, 201-212

Zajac, V. and K. Slavikova (1989): Expression of a bovine leukaemia virus envelope fusion protein in *E-coli*.
Fol. biol. (Praha), 35, 35-41

Zavada, J., L. Cerny., A.D. Altstein and Z. Zavada (1978): Pseudotype particles of vesicular stomatitis virus with the surface antigens of bovine leukemia virus-VSV-BLV-as a sensitive probe for detecting antibodies in the sera of spontaneously infected cattle.
Acta Virol., 22, 91-96

9. Anhänge

9.1. DNA-Sequenzvergleich von ausgewählten BLV-Provirusabschnitten der *env*-Region (Np 4821-6368)

	4830	4840	4850	4860	4870
JAP	ATGCCTAAAG	AACGACGGTC	CCGAAGACGC	CCACAACCGA	TCATCAGATG
BEL	ATGCCCAAAG	AACGACGGTC	CCGAAGACGC	CCACAACCGA	TCATCAGATG
AST	ATGCCTAAAG	AACGACGGTC	CCGAAGACGC	CC CG AACCGA	TCATCAGATG
M1	ATGCCTAAAA	AACGACGGTC	CCGAAGACGC	CCACAACCGA	TCATCAGATG
M2	ATGCCCAAAG	AACGACGGTC	CCGAAGACGC	CCACAACCGA	TCATCAGATG
M3	ATGCCCAAAG	AACGACGGTC	CCGAAGACGC	CCACAACCGA	TCATCAGATG
FLK	ATGCCTAAAG	AACGACGGTC	CCGAAGACGC	CCACAACCGA	TCATCAGATG
	4880	4890	4900	4910	4920
JAP	GGTAAGTCTC	ACTCTCACTC	TCCTCGCTCT	CTGTCTCGGCC	ATCCAGACTT
BEL	GGTAAGTCTC	ACTCT T ACTC	TCCTCGCTCT	CTGTCT A GCC	ATCCAGACTT
AST	GGTAAGTCTC	ACTCTCACTC	TCCTCGCTCT	CTGTCT A GCC	ATCCAGACTT
M1	GGTAAGTCTC	ACTCTCACTC	TCCTCGCTCT	CTGTCTCGGCC	ATCCAGACTT
M2	GGTAAGTCTC	ACTCT T ACTC	TCCTCTCTCT	CTGTCT A GCC	ATCCAGACTT
M3	GGTAAGTCTC	ACTCT T ACTC	TCCTCGCTCT	CTGTCT A GCC	ATCCAGACTT
FLK	GGTAAGTCTC	ACTCTCACTC	TCCTCGCTCT	CTGTCTCGGCC	ATCCAGACTT
	4930	4940	4950	4960	4970
JAP	GGAGATGCTC	CCTGTCCCTA	GGAAACCAAC	AATGGATGAC	AGCATCTAAC
BEL	GGAGATGCTC	CCTGTCCCTA	GGAAAT T CAAC	AATGGATGAC	A ACAT A TAA
AST	GGAGATGCTC	CCTGTCCCTA	GGAAAT T CAAC	AATGGATGAC	AGCAT A TAA
M1	GGAGATGCTC	CCTGTCCCTA	GGAAACCAAC	AATGGATGAC	AGCAT A TAA
M2	GGAGATGCTC	CCTGTCCCTA	GGAAAT T CAAC	AATGGATGAC	A ACAT A TAA
M3	GGAGATGCTC	CCTGTCCCTA	GGAAAT T CAAC	AATGGATGAC	A ACAT A TAA
FLK	GGAGATGCTC	CCTGTCCCTA	GGAAACCAAC	AATGGATGAC	AGCAT A TAA
	4980	4990	5000	5010	5020
JAP	CAAGAGGCAA	AATTTTCCAT	CTCCATTGAC	CAAATACTAG	AGGCTCATAA
BEL	CAAGAGGCAA	AATTTTCCAT	CTCCATTGAC	CAAAT A T T AG	AGGCTC A CAA
AST	CAAGAGGCAA	AATTTTCCAT	CTCCATTGAC	CAAATACTAG	AGGCTCATAA
M1	CAAGAGGCAA	AATTTTCCAT	CTCCATTGAC	CAAATACTAG	AGGCTCATAA
M2	CAAGAGGCAA	AATTTTCCAT	C GCCATTGAC	CAAATACTAG	AGGCTCATAA
M3	CAAGAGGCAA	AATTTT T CCAT	CTCCATTGAC	CAAATACTAG	AGGCTCATAA
FLK	CAAGAGGCAA	AATTTTCCAT	CTCCATTGAC	CAAATACTAG	AGGCTCATAA
	5030	5040	5050	5060	5070
JAP	TCAGTCACCT	TTCTGTGCCA	AGTCTCCAG	ATACACCTTG	GACTCTGTAA
BEL	TCA A T C ACCT	TTCTGT C CCA	G GTCTCCAG	ATACACCTTG	GACT T CGTAA
AST	TCAGTCACCT	TTCTGTGCCA	AGTCTCCAG	ATACACCTTG	GACTCTGTAA
M1	TCAGTCACCT	TTCTGTGCCA	AGTCTCCAG	ATACACCTTG	GACTCTGTAA
M2	TCA A T C GCCT	TTCTGT C CCA	G GTCTCCAG	ATACACCTTG	GACT T TGTAA
M3	TCA A T C ACCT	TTCTGT C CCA	G GTCTCCAG	ATACACCTTG	GACT T TGTAA
FLK	TCAGTCACCT	TTCTGTGCCA	AGTCTCCAG	ATACACCTTG	GACTCTGTAA

	5080	5090	5100	5100	5120
JAP	ATGGCTATCC	TAAGATCTAC	TGGCCCCCCC	CACAAGGGCG	GCGCCGTTTT
BEL	ATGGTTATCC	TAAGATCTAT	TGGCCCCCCC	CACAAGGGCG	GCGCCGTTTT
AST	ATGGCTATCC	TAAGATCTAC	TGGCCCCCCC	CACAAGGGCG	GCGCCGTTTT
M1	ATGGCTATCC	TAAGATCTAC	TGGCCCCCCC	CACAAGGGCG	GCGCCGTTTT
M2	ATGGTTATCC	TAAGATCTAT	TGGCCCCCCC	CACAAGGGCG	AC GCCGTTTT
M3	ATGGTTATCC	TAAGATCTAT	TGGCCCCCCC	CACAAGGGCG	GCGCCGTTTT
2	-----	-----	-----CC	CACAAGGGCG	GCGCCGTTTT
45	-----	-----	-----CC	CACAAGGGCG	GCGCCGTTTT
134	-----	-----	-----CC	CACAAGGGCG	GCGCCGTTTT
15313	-----	-----	-----CC	CACAAGGGCG	GCGCCGTTTT
167	-----	-----	-----CC	CACAAGGGCG	GCGCCGTTTT
41335	-----	-----	-----CC	CACAAGGGCG	GCGCCGTTTT
574	-----	-----	-----CC	CACAAGGGCG	GCGCCGTTTT
68-14	-----	-----	-----CC	CACAAGGGCG	GCGCCGTTTT
68-18	-----	-----	-----CC	CACAAGGGCG	GCGCCGTTTT
6869	-----	-----	-----CC	CACAAGGGCG	GCGCCGTTTT
FLK	ATGGCTATCC	TAAGATCTAC	TGGCCCCCCC	CACAAGGGCG	GCGCCGTTTT

	5130	5140	5150	5160	5170
JAP	GGAGCCAGGG	CCATGGTCAC	ATATGATTGC	GAGCCCCGAT	GCCCTTATGT
BEL	GGAGCCAGGG	CCATGGTCAC	ATATGATTGC	GAGCCCCGAT	GCCCTTATGT
AST	GGAGCCAGGG	CCATGGTCAC	ATATGATTGC	GAGCCCCGAT	GCCCTTATGT
M1	GGAGCCAGGG	CCATGGTCAC	ATATGATTGC	GAGCCCCGAT	GCCCTTATGT
M2	GGAGCCAGGG	CCATGGTCAC	ATATGATTGC	GAGCCCCGAT	GCCCTTATGT
M3	GGAGCCAGGG	CCATGGTCAC	ATATGATTGC	GAGCCCCGAT	GCCCTTATGT
2	GGAGCCAGGG	CCATGGTCAC	ATATGATTGC	GAGCCCCGAT	GCCCTTATGT
45	GGAGCCAGGG	CCATGGTCAC	ATATGATTGC	GAGCCCCGAT	GCCCTTATGT
134	GGAGCCAGGG	CCATGGTCAC	ATATGATTGC	GAGCCCCGAT	GCCCTTATGT
15313	GGAGCCAGGG	CCATGGTCAC	ATATGATTGC	GAGCCCCGAT	GCCCTTATGT
167	GGAGCCAGGG	CCATGGTCAC	ATATGATTGC	GAGCCCCGAT	GCCCTTATGT
41335	GGAGCCAGGG	CCATGGTCAC	ATATGATTGC	GAGCCCCGAT	GCCCTTATGT
574	GGAGCCAGGG	CCATGGTCAC	ATATGATTGC	GAGCCCCGAT	GCCCTTATGT
68-14	GGAGCCAGGG	CCGT GGTCAC	ATATGATTGC	GAGCCCCGAT	GCCCTTATGT
68-18	GGAGCCAGGG	CCATGGTCAC	ATATGATTGC	GAGCCCCGAT	GCCCTTATGT
6869	GGAGCCAGGG	CCATGGTCAC	ATATGATTGC	GAGCCCCGAT	GCCCTTATGT
FLK	GGAGCCAGGG	CCATGGTCAC	ATATGATTGC	GAGCCCCGAT	GCCCTTATGT

	5180	5190	5200	5210	5220
JAP	GGGGGCAGAT	CGCTTCGACT	GCCCCCACTG	GGACAATGCC	TCCCAGGCTG
BEL	GGGGGCAGAT	CA CTTCGACT	GCCCCCACTG	GGACAATGCC	TCCCAGG CCG
AST	GGGGGCAGAT	CGCTTCGACT	GCCCCCACTG	GGACAATGCC	TCCCAGG CCG
M1	GGGGGCAGAT	CGCTTCGACT	GCCCCCACTG	GGACAATGCC	TCCCAGG CCG
M2	GGGGGCAGAT	CA CTTCGACT	GCCCCCACTG	GGACAATG CT	TCCCAGG CCG
M3	GGGGGCAGAT	CA CTTCGACT	GCCCCCACTG	GGACAATGCC	TCCCAGG CCG
2	GGGGGCAGAT	CA CTTCGACT	GCCCCCACTG	GGACAATGCC	TCCCAGG CCG
7	GGGGGCAGAT	CGCTTCGACT	GCCCCCACTG	GGACAATGCC	TCCCAGGCTG
45	GGGGGCAGAT	CGCTTCGACT	GCCCCCACTG	GGACAATGCC	TCCCAGG CCG
134	GGGGGCAGAT	CGCTTCGACT	GCCCCCACTG	GGACAATGCC	TCCCAGG CCG
15313	GGGGGCAGAT	CA CTTCGACT	GCCCCCACTG	GGACAATGCC	TCCCAGGCTG
167	GGGGGCAGAT	CGCTTCGACT	GCCCCCACTG	GGACAATGCC	TCCCAGGCTG

	5180	5190	5200	5210	5220
41335	GGGGGCAGAT	C ACTTCGACT	GCCCCCACTG	GGACAATGCC	TCCCAGGCTG
574	GGGGGCAGAT	CGCTTCGACT	GCCCCCACTG	GGACAATGCC	TCCCAGGCTG
68-14	GGGGGCAGAT	CGCTTCGACT	GCCCCCACTG	GGACAATGCC	TCCCAGGCTG
68-18	GGGGGCAGAT	CGCTTCGACT	GCCCCCACTG	GGACAATGCC	TCCCAGGCTG
6869	GGGGGCAGAT	C ACTTCGACT	GCCCCCACTG	GGACAATGCC	TCCCAGG C CG
159	GGGGGCAGAT	CGCTTCGACT	GCCCCCACTG	GGACAATGCC	TCCCAGGCTG
FLK	GGGGGCAGAT	CGCTTCGACT	GCCCCCACTG	GGACAATGCC	TCCCAGG C CG

	5230	5240	5250	5260	5270
JAP	ATCAAGGATC	CTTTTATGTC	AATCATCAGA	TTTTATTCCT	GCATCTCAAA
BEL	ATCAAGG G TC	CTTTTATGTC	AATCATCAGA	TTTTATTCCT	GCATCTCAAA
AST	ATCAAGG G ATC	CTTTTATGTC	AATCATCAGA	TTTTATTCCT	GCATCTCAAA
M1	ATCAAGGATC	CTTTTATGTC	AATCATCAGA	TTTTATTCCT	GCATCT T AAA
M2	ATCAAGG G TC	CTTTTATGTC	AATCATCAGA	TTTTATTCCT	GCATCTCAAA
M3	ATCAAGG G TC	CTTTTATGTC	AATCATCAGA	C TTTTATTCCT	GCATCTCAAA
2	ATCAAGGATC	CTTTTATGTC	G AATCATCAGA	TTTTATTCCT	GCATCTCAAA
7	ATCAAGGATC	CTTTTATGTC	AATCATCAGA	TTTTATTCCT	-----
45	ATCAAGGATC	CTTTTATGTC	AATCATCAGA	TTTTATTCCT	GCATCTCAAA
134	ATCAAGGATC	CTTTTATGTC	AATCATCAGA	TTTTATTCCT	GCAT G T T AAA
15313	ATCAAGGATC	CTTTTATGTC	AATCATCAGA	TTTTATTCCT	GCAC C CTCAAA
167	ATCAAGGATC	CTTTTATGTC	AATCATCAGA	TTTTATTCCT	GCATCTCAAA
41335	ATCAAGG G TC	CTTTTATGTC	AATCATCAGA	TTTTATTCCT	GCAC C CTCAAA
574	ATCAAGGATC	CTTTTATGTC	AATCATCAGA	TTTTATTCCT	GCATCTCAAA
68-14	ATCAAGGATC	CTTTTATGTC	AATCATCAGA	TTTTATTCCT	GCATCTCAAA
68-18	ATCAAGGATC	CTTTTATGTC	AATCATCAGA	TTTTATTCCT	GCATCTCAAA
6869	ATCAAGG G TC	CTTTTATGTC	AATCATCAGA	TTTTATTCCT	-----
159	ATCAAGGATC	CTTTTATGTC	AATCATCAGA	TTTTATTCCT	GCATG T AAA
FLK	ATCAAGGATC	CTTTTATGTC	AATCATCAGA	TTTTATTCCT	GCATCT T AAA

	5280	5290	5300	5310	5320
JAP	CAATGTCATG	GAATTTTCAC	TCTAACCTGG	GAGATATGGG	GATATGATCC
BEL	CAATGTCATG	GAATTTTCAC	TCTAACCTGG	G AATATGGG	GATATGATCC
AST	CAATGTCATG	GAATTTTCAC	TCTAACCTGG	GAGATATGGG	GATATGATCC
M1	CAATGTCATG	GAATTTTCAC	TCTAACCTGG	GAGATATGGG	GATATGATCC
M2	CAATGTCATG	GAATTTTCAC	TCTAACCTGG	G AATATGGG	GATATGATCC
M3	CAATGTCATG	GAATTTTCAC	TCTAACCTGG	G AATATGGG	GATATGATCC
2	CAATGTCATG	GAATTTTCAC	TCTAACCTGG	G AATATGGG	GATATGAT G C
45	CAATGTCATG	GAATTTTCAC	TCTAACCTGG	GAGATATGGG	GATATGATCC
134	CAATGTCATG	GAATTTTCAC	TCTAACCTGG	GAGATATGGG	GATATGATCC
15313	CAATGTCATG	GAATTTTCAC	TCTAACCTGG	G AATATGGG	GATATGATCC
167	CAATGTCATG	GAATTTTCAC	TCTAACCTGG	GAGATATGGG	GATATGATCC
41335	CAATGTCATG	GAATTTTCAC	TCTAACCTGG	G AATATGGG	GATATGATCC
574	CAATGTCATG	GAATTTTCAC	TCTAACCTGG	GAGATATGGG	GATATGATCC
68-14	CAATGTCATG	GAATTTTCAC	TCTAACCTGG	GAGATATGGG	GATATGATCC
68-18	CAATGTCATG	GAATTTTCAC	TCTAACCTGG	GAGATATGGG	GATATGATCC
6869	CAATGTCATG	GAATTTTCAC	TCTAACCTGG	G AATATGGG	GATATGATCC
FLK	CAATGTCATG	GAATTTTCAC	TCTAACCTGG	GAGATATGGG	GATATGATCC

	5330	5340	5350	5360	5370
JAP	CCTGATCACC	TTTTCTTTAC	ATAAGATCCC	TGATCCCCCT	CAACCCGACT
BEL	CCTGATCACC	TTTTCTTTAC	ATAAAAT T CC	TGATCCCCCT	CAACCCGACT
AST	CCTGATCACC	TTTTCTTTAC	ATAAGATCCC	TGATCCCCCT	CAACCCGACT
M1	CCTGATCACC	TTTTCTTTAC	ATAAGATCCC	TGATCCCCCT	CAACCCGACT
M2	CCTGATCACC	TTTTCTTTAC	ATAAAAT A CCC	TGATCCCCCT	CAACCCGACT
M3	CCTGATCACC	TTTTCTTTAC	ATAAAAT A CCC	TGATCCCCCT	CAACCCGACT
2	CCTGATCACC	TTTTCTTTAC	ATAAAAT A CCcC	TGATCCCCCT	CAACCCGACT
45	CCTGATCACC	TTTTCTTTAC	ATAAGATCCC	TGATCCCCCT	CAACCCGACT
134	CCTGATCACC	TTTTCTTTAC	ATAAGATCCC	TGATCCCCCT	CAACCCGACT
15313	CCTGATCACC	TTTTCTTTAC	AT T AG C TCCC	TGATCCCCCT	CAACCCGACT
167	CCTGATCACC	TTTTCTTTAC	ATAAGATCCC	TGATCCCCCT	CAACCCGACT
41335	CCTGATCACC	TTTTCTTTAC	ATAAAAT A CCC	TGATCCCCCT	CAACCCGACT
574	CCTGATCACC	TTTTCTTTAC	ATAAGATCCC	TGATCCCCCT	CAACCCGACT
68-14	CCTGATCACC	TTTTCTTTAC	ATAAGATCCC	TGATCCCCCT	CAACCCGACT
68-18	CCTGATCACC	TTTTCTTTAC	ATAAGATCCC	TGATCCCCCT	CAACCCGACT
6869	CCTGATCACC	TTTTCTTTAC	ATAAAAT A CCC	TGATCCCCCT	CAACCCGACT
FLK	CCTGATCACC	TTTTCTTTAC	ATAAGATCCC	TGATCCCCCT	CAACCCGACT

	5380	5390	5400	5410	5420
JAP	TTCCCCAGTT	GAACAGTGAC	TGGGTTCCCT	CTGTCAGATC	ATGGGCCCTG
BEL	T CC T CAG C T	GAACAGTGAC	TGGGTTCCCT	CTGTCAGATC	ATGGGCCCTG
AST	TTCCCCAGTT	GAACAGTGAC	TGGGTTCCCT	CTGTCAGATC	ATGGGCCCTG
M1	TTCCCCAGTT	GAACAGTGAC	TGGGTTCCCT	CTGTCAGATC	ATGGGCCCTG
M2	T CC T CAG C T	GAACAGTGAC	TGGGTTCCCT	CTGTCAG G T C	ATGGGCCCTG
M3	T CC T CAG C T	GAACAGTGAC	TGGGTTCCCT	CTGTCAGATC	ATGGGCCCTG
2	T CC T CAG C T	GAACAGTGAC	TGGGTTCCCT	CTGTCAGATC	ATGGGCCCTG
45	TTCCCCAGTT	GAACAGTGAC	TGGGTTCCCT	CTGTCAGATC	ATGGGCCCTG
134	T CC T CAG C T	GAACAGTGAC	TGGGTTCCCT	CTGTCAGATC	ATGGGCCCTG
15313	T CC T CAG C T	GAACAGTGAC	TGG A T T CCCT	CTGTCAGATC	ATGGGCCCTG
167	TTCCCCAGTT	GAACAGTGAC	TGGGTTCCCT	CTGTCAGATC	ATGGGCCCTG
41335	T CC T CAG C T	GAACAGTGAC	TGGGTTCCCT	CTGTCAGATC	ATGGGCCCTG
574	TTCCCCAGTT	GAACAGTGAC	TGGGTTCCCT	CTGTCAGATC	ATGGGCCCTG
68-14	TTCCCCAGTT	GAACAGTGAC	TGGGTTCCCT	CTGTCAGATC	ATGGGCCCTG
68-18	TTCCCCAGTT	GAACAGTGAC	TGGGTTCCCT	CTGTCAGATC	ATGGGCCCTG
6869	T CC T CAG C T	GAACAGTGAC	TGGGTTCCCT	CTGTCAGATC	ATGGGCCCTG
FLK	TTCCCCAGTT	GAACAGTGAC	TGGGTTCCCT	CTGTCAGATC	ATGGGCCCTG

	5430	5440	5450	5460	5470
JAP	CTTTTAAATC	AAACAGCACG	GGCCTTCCCA	GACTGTGCTA	TATGTTGGGA
BEL	CTTTTAAATC	AAAC G GCACG	GGCCTTCCCA	GACTGTGCTA	TATGTTGGGA
AST	CTTTTAAATC	AAACAGCACG	GGCCTTCCCA	GACTGTGCTA	TATGTTGGGA
M1	CTTTTAA A CC	AAACAGCACG	GGCCTTCCCA	GACTGTGCTA	TATGTTGGGA
M2	CTTTTAAATC	AAAC G GCACG	GGCCTTCCCA	GACTGTGCTA	TATGTTGGGA
M3	CTTTTAAATC	AAAC G GCACG	GGCCTTCCCA	GACTGTGCTA	TATGTTGGGA
2	T TTTTAAATC	AAAC G GCACG	GGCCTTCCCA	GACTGTGCTA	TATGTTGGGA
45	CTTTTAA A CC	AAACAGCACG	GGCCTTCCCA	GACTGTGCTA	TATGTTGGGA
134	CTTTTAAATC	AAACAGCACG	GGCCTTCCCA	GACTGTGCTA	TATGTTGGGA
15313	CTTTTAAATC	AAAC G GCACG	GGCCTTCCCA	GACTGTGCTA	TATGTTGGGA
167	CTTTTAAATC	AAACAGCACG	GGCCTTCCCA	GACTGTGCTA	TATGTTGGGA
41335	CTTTT T AATC	AAAC G GCACG	GGCCTTCCCA	GACT G C G CTA	TATGTTGGGA

	5430	5440	5450	5460	5470
574	CTTTTAAATC	AAACAGCACG	GGCCTTCCCA	GACTGTGCTA	TATGTTGGGA
68-14	CTTTTAAATC	AAACAGCACG	GGCCTTCCCA	GACTGTGCTA	TATGTTGGGA
68-18	CTTTTAAATC	AAACAGCACG	GGCCTTCCCA	GACTGTGCTA	TATGTTGGGA
6869	CTTTTAAATC	AAAC G GCACG	GGCCTTCCCA	GACTGTGCTA	TATGTTGGGA
FLK	CTTTTAAACC	AAAC G GCACG	GGCCTTCCCA	GACTGTGCTA	TATGTTGGGA

	5480	5490	5500	5510	5520
JAP	ACCTTCCCCT	CCCTGGGCTC	CCGAAATATT	AGTATATAAC	AAAACCATCT
BEL	ACCTTCCCCT	CCCTGGGCTC	CCGAAATATT	AGTATATAAC	AAAACCATCT
AST	ACCTTCCCCT	CCCTGGGCTC	CCGAAATATT	AGTATATAAC	AAAACCATCT
M1	ACCTTCCCCT	CCCTGGGCTC	CCGAAATATT	AGTATATAAC	AAAACCATCT
M2	ACCTTCCCCT	CCCTGGGCTC	CCGAAATATT	AGTATATAAC	AAAACCATCT
M3	AC C CTCCCCT	CCCTGGGCTC	CCGAAATATT	AGTATATAAC	AAAACCATCT
2	ACCTTCCCCT	CCCTGGGCTC	CCGAAATATT	AGTATATAAC	AAAACCATCT
45	ACCTTCCCCT	CCCTGGGCTC	CCGAAATATT	AGTATATAAC	AAAACCATCT
134	ACCTTCCCCT	CCCTGGGCTC	CCGAAATATT	AGTATATAAC	AAAACCATCT
15313	ACCTTCCCCT	CCCTGGGCTC	CCGAAATATT	AGTATATAAC	AAAACCATCT
167	ACCTTCCCCT	CCCTGGGCTC	CCGAAATATT	AGTATATAAC	AAAACCATCT
41335	ACCTTCCCCT	CCCTGGGCTC	CCGAAATATT	AGTATATAAC	AAAACCATCT
574	ACCTTCCCCT	CCCTGGGCTC	CCGAAATATT	AGTATATAAC	AAAACCATCT
68-14	ACCTTCCCCT	CCCTGGGCTC	CCGAAATATT	AGTATATAAC	AAAACCATCT
68-18	ACCTTCCCCT	CCCTGGGCTC	CCGAAATATT	AGTATATAAC	AAAACCATCT
6869	ACCTTCCCCT	CCCTGGGCTC	CCGAAATATT	AGTATATAAC	AAAACCATCT
FLK	ACCTTCCCCT	CCCTGGGCTC	CCGAAATATT	AGTATATAAC	AAAACCATCT

	5530	5540	5550	5560	5570
JAP	CCAGCTCTGG	ACCCGGCCTC	GCCCTCCCGG	ACGCCCAAAT	CTTCTGGGTC
BEL	CC G GCTCTGG	ACCC G GTCTC	GCCCTCCCGG	ACGCCCAAAT	CTTCTGGGTC
AST	CCAGCTCTGG	ACCCGGCCTC	GCCCTCCCGG	ACGCCCAAAT	CTTCTGGGTC
M1	CCAGCTCTGG	ACCCGGCCTC	GCCCTCCCGG	ACGCCCAAAT	CTTCTGGGTC
M2	CC A ACTCTGG	ACCC G GTCTC	GCCCTCCCGG	ACGCCCAAAT	CTTCTGGGTC
M3	CCAGCTCTGG	ACCC G GTCTC	GCCCTCCCGG	ACGCCCAAAT	CTTCTGGGTC
2	CCAGCTCTGG	ACCCGGCCTC	-----	-----	-----
45	CCAGCTCTGG	ACCCGGCCTC	-----	-----	-----
134	CCAGCTCTGG	ACCCGGCCTC	-----	-----	-----
15313	CCAGCTCTGG	ACCCGGCCTC	-----	-----	-----
167	CCAGCTCTGG	ACCCGGCCTC	-----	-----	-----
41335	CCAGCTCTGG	ACCCGGCCTC	-----	-----	-----
574	CCAGCTCTGG	ACCCGGCCTC	-----	-----	-----
68-14	CCAGCTCTGG	ACCCGGCCTC	-----	-----	-----
68-18	CCAGCTCTGG	ACCCGGCCTC	-----	-----	-----
6869	CCAGCTCTGG	ACCCGGCCTC	-----	-----	-----
FLK	CCAGCTCTGG	ACCCGGCCTC	-----	-----	-----

	5580	5590	5600	5610	5620
JAP	AACTCGTCCT	CGTTTAAACAC	CACCCAAGGA	TGGCACCACC	CTTCCAGAG
BEL	AAC A CGTCCT	T GTTTAAACAC	CACCCAAGGA	TGGCACCACC	CTTCCAGAG
AST	AAC A CGTCCT	CGTTTAAACAC	CACCCAAGGA	TGGCACCACC	CTTCCAGAG
M1	AAC A CGTCCT	CGTTTAAACAC	CACCCAAGGA	TGGCACCACC	CTTCCAGAG
M2	AAC A CGTCCT	T GTTTAAACAC	CACCCAAGGA	TGGCACCACC	CTTCCAGAG
M3	AAC A CGTCCT	T GTTTAAACAC	CACCCAAGGA	TGGCACCACC	CTTCCAGAG

	5630	5640	5650	5660	5670
JAP	GTTGTTGTTT	AATGTTTCTC	AAGGCAACGC	CTTGTTATTA	CCTCCTATCT
BEL	GTTGTTGTTT	AATGTTTCTC	AAGGCAACGC	CTT A TTATTA	CCCCCTATCT
AST	GTTGTTGTTT	AATGTTTCTC	AAGGCAACGC	CTTGTTATTA	CCTCCTATCT
M1	GTTGTTGTTT	AATGTTTCTC	AAGGCAACGC	CTTGTTATTA	CCTCCTATCT
M2	GTTGTTGTTT	A AC GTTTCTC	AAGGCAACGC	CTT A TTATTA	CCCCCTATCT
M3	GTTGTTGTTT	A AC GTTTCTC	AAGGCAACGC	CTT A TTAT TG	CCCCCTATCT
	5680	5690	5700	5710	5720
JAP	CCCTGGTTAA	TCTCTCTACG	GCTTCCTCCG	CCCCTCCTAC	CCGGGTCAGA
BEL	CCCTGGTTAA	TCTCTCTACG	G TTTCCTCCG	CCCCTCCTAC	CCGGGTCAGA
AST	CCCTGGTTAA	TCTCTCTACG	GCTTCCTCCG	CCCCTCCTAC	CCGGGTCAG G
M1	CCCTGGTTAA	TCTCTCTACG	GCTTCCTCCG	CCCCTCCTAC	CCGGGTCAGA
M2	CCCTGGTTAA	TCTCTCTACG	GCTTCCTCCG	CCCCTCCTAC	CCGGGTCAGA
M3	CCCTGGTTAA	TCTCTCTACG	GCTTCCTCCG	CCCCTCCTAC	CCGGGTCAGA
	5730	5740	5750	5760	5770
JAP	CGTAGTCCCC	TCGCGGCCCT	GACCTTAGGC	CTAGCCCTGT	CAGTGGGGCT
BEL	CG C AGTCCCC	TCG C AGCCCT	GACCTTAGGC	CTAGCCCTGT	CAGTGGGGCT
AST	CGTAGT C CTG	TCGCGGCCCT	GACCTTAG G T	CTAGCCCTGT	CAGTGGGGCT
M1	CGTAGTCCCC	TCG C AGCCCT	GACCTTAGGC	CTAGCCCTGT	CAGTGGGGCT
M2	CG C AGT C CTG	CCG CAGCCCT	GACCTT G GGC	CTAGCCCTGT	CAGTGGGGCT
M3	CG C AGTCCCC	TCG C AGCCCT	GACCTTAGGC	CTAGCCCTGT	CAGTGGGGCT
	5780	5790	5800	5810	5820
JAP	CACTGGCATT	AATGTGGCCG	TGTCTGCCCT	TAGCCATCAG	AGACTCACCT
BEL	CACTGG A AATT	AATGT A GCCG	TGTCTGCCCT	TAGCCATCAG	AGACTCACCT
AST	CACTGG A AATT	AA AGT A GCCG	TGTCTGCCCT	TAGCCATCAG	AGACTCACCT
M1	CACTGG A AATT	AATGTGGCCG	TGTCTGCCCT	TAGCCATCAG	AGACTCACCT
M2	CACTGG A AATT	AATGT A GCCG	TGT C GCCCT	TAGCCATCAG	AGACTCACCT
M3	CACTGG A AATT	AATGT A GCCG	TGTCTGCCCT	TAGCCATCAG	AGACTCACCT
	5830	5840	5850	5860	5870
JAP	CCCTGATCCA	CGTTCTGGAG	CAAGATCAGC	AACGCTTGAT	CACAGCAATT
BEL	CCCTGATCCA	CGTTCTGGAG	CAAGATCAGC	AACGCTTGAT	CACAGCAATT
AST	CCCTGATCCA	CGTTCTGG A A	CAAGATCAGC	AACGCTTGAT	T ACAGCAATT
M1	CCCTGATCCA	CGTTCTGGAG	CAAGATCAGC	AACGCTTGAT	CACAGCAATT
M2	CCCTGATCCA	CGTTCTGGAG	CAAGATCAGC	AACGCTTGAT	CACAGCAATT
M3	CCCTGATCCA	CGTTCTGGAG	CAAGATCAGC	AACGCTTGAT	CACAGCAATT
	5880	5890	5900	5910	5920
JAP	AATCAGACCC	ACTATAATTT	GCTTAATGTG	GCCTCTGTGG	TTGCCAGAA
BEL	A AC CAGACCC	A TTATAATTT	GCTTAATGTG	GCCTCTGTGG	TT C CCCAGAA
AST	A AC CAGACCC	ACTATAATTT	GCTTAATGTG	GCCTCTGTGG	T CGCCCAGAA
M1	A AC CAGACCC	ACTATAATTT	GCTTAATGTG	GCCTCTGTGG	TTGCCAGAA
M2	A AC CAGACCC	ACTATAATTT	GCTTAATGTG	GCCTCTGTGG	T CGCCCAGAA
M3	A AC CAGACCC	ACTATAATTT	GCTTAATGTG	GCCTCTGTGG	T CGCCCAGAA

	5930	5940	5950	5960	5970
JAP	CCGACGGGGG	CTTGATTGGT	TGTACATCCG	GCTGGGTTTT	CAAAGCCTAT
BEL	CCGACGGGGG	CTTGATTGGT	TGTACATCCG	GCTGGGTTTT	CAAAGCCTAT
AST	CCGACGGGGG	CTTGATTGGT	TGTACATCCG	GCTGGGTTTT	CAAAGCCTAT
M1	CCGACGGGGG	CTTGATTGGT	TGTACATCCG	GCTGGGTTTT	CAAAGCCTAT
M2	CCGACGGGGG	CTTGATTGGT	TGTACATCCG	GCTGGGTTTT	CAAAGCCTAT
M3	CCGACGGGGG	CTTGATTGGT	TGTACATCCG	GCTGGGTTTT	CAAAG T CCTAT
	5980	5990	6000	6010	6020
JAP	GTCCCACAAT	TAATGAGCCT	TGCTGTTTCC	TGCGCATTCA	AAATGACTCC
BEL	GTCCCACAAT	CAATGA ACCT	TGCTGTTTCC	TAC GCATTCA	AAATGACTCC
AST	GTCCCACAAT	CAATGA ACCT	TGCTGTTTCC	TGCGCATTCA	AAAC GACTCC
M1	GTCCCACAAT	TAATGAGCCT	TGCTGTTTCC	TGCGCATTCA	AAATGACTCC
M2	GTCCCAC G AT	CAATGA ACCT	TGCTGTTTCC	TGCGCATTCA	AAATGACTCC
M3	GTCCCACAAT	CAATGA ACCT	TGCTGTTTCC	TGCGCAT CC A	AAATGACTCC
	6030	6040	6050	6060	6070
JAP	ATTATCCTCC	GCGGTGATCT	CCAGCCTCTC	TCGCAAAGAG	TCTCTACAGA
BEL	ATTATCC G CC	TCGGT GATCT	CCAGCCTCTC	TCGCAAAGAG	TCTCTACAGA
AST	AT CAT CC G CC	TCGGT GATCT	CCAGCCTCTC	TCGCAAAGAG	TCTCTACAGA
M1	ATTATCC G CC	TCGGT GATCT	CCAGCCTCTC	TCGCAAAGAG	TCTCTACAGA
M2	ATTATCC G CC	TCGGT GATCT	CCAGCCTCTC	TCGCAAAGAG	TCTCTACAGA
M3	ATTATCC G CC	TCGGT GATCT	CCAGCCTCTC	TCGCAAAGAG	TCTCTACAGA
	6080	6090	6100	6110	6120
JAP	CTGGCAGTGG	CCCTGGAATT	GGGATCTGGG	GCTCACTGCC	TGGGTGCGAG
BEL	CTGGCAGTGG	CCCTGGAATT	GGGATCTGGG	GCTCAC C GCC	TGGGTGCGAG
AST	CTGGCAGTGG	CCCTGGAATT	GGGATCTGGG	ACT CACTGCC	TGGGTGCGAG
M1	CTGGCAGTGG	CCCTGGAATT	GGGATCTGGG	GCTCACTGCC	TGGGTGCGAG
M2	CTGGCA A TGG	CCCTGGAATT	GGGATCTGGG	GCTCAC C GCC	TGGGTGCGAG
M3	CTGGCAGTGG	CCCTGGAATT	GGGATCTGGG	GCTCAC C GCC	TGGGTGCG G G
	6130	6140	6150	6160	6170
JAP	AAACCATTCA	TTCTGTTCTA	AGCCTGTTCC	TATTAGCCCT	TTTTTTGCTC
BEL	AAACCATTCA	TTCTGTTCTA	AGCCT A TTCC	TATTAGCCCT	TTTTTTGCTC
AST	AAACCATTCA	TT C GTTCTA	AGCCTGTTCC	TATTAGCCCT	T TTTTGCTC
M1	AAACCATTCA	TTCTGTTCTA	AGCCTGTTCC	TATTAGCCCT	TTTTTTGCTC
M2	AAACCATTCA	TTCTGTTCTA	AGCCT A TTCC	TATTAGCCCT	TTTTTTGCTC
M3	AAACCATTCA	TTCTGTTCTA	AGCCT A TTCC	TATTAGCCCT	TTTTTTGCTC
	6180	6190	6200	6210	6220
JAP	TTCCTGGCCC	CCTGCCTGAT	AAAATGCTTG	ACCTCTCGCC	TTTTAAAGCT
BEL	TTCCTGGCCC	CCTGCCTGAT	AAAATGCTTG	ACCTCTCGCC	TTTTAAA A CT
AST	TT C TTGGCCC	CCTGCCTGAT	AAAATGCTTG	ACCTCTCGCC	TTT C AAAGCT
M1	TTCCTGGCCC	CCTGCCTGAT	AAAATGCTTG	ACCTCTCGCC	TTTTAAAGCT
M2	TT C TTGGCCC	CCTGCCTGAT	AAAATGCTTG	ACCTCTCGCC	TTTTAAA A CT
M3	TT C TTGGCCC	CCTGCCTGAT	AAAATG C CTG	ACCTCTCGCC	TTTTAAA A CT
FLK	-----	-----	-----	-----CC	TTTTAAAGCT

	6230	6240	6250	6260	6270
JAP	CCTCCGGCAG	GCTCCCCACT	TCCCTGAAAT	CTCCTTAACC	CCTAAACCCG
BEL	CCTCCGGCAG	GCTCCCCACT	TCCCTGAAAT	CTCCTT CCCC	CCTAAACCCG
AST	CCTCCGGCAG	GCTCCCCACT	TCCCTGAGAT	CTCCTT CCCC	CCTAAACCCG
M1	CCTCCGGCAG	GCTCCCCACT	TCCCTGAAAT	CTCCTTAACC	CCTAAACCCG
M2	CCTCCGGCAG	GCTCCCCACT	TCCCTGAAAT	CTCCTT GGCC	CCTAAACCCG
M3	CCTCCGGCAG	GCTCCCCACT	TCCCTGAAAT	CTCCTT CCCC	CCTAAACCCG
FLK	CCTCCGGCAG	GCTCCCCACT	TCCCTGAAAT	CTCCTTAACC	CCTAAACCCG

	6280	6290	6300	6310	6320
JAP	ATTCTGATTA	TCAGGCCTTG	CTACCATCTG	CACCAGAGAT	CTACTCTCAC
BEL	ATTCTGATTA	TCAGGCCTTG	CTACCATCTG	CACCAGAGAT	CTACTCTCAC
AST	ATTCTGATTA	TCAGGCCTTG	CTACC GTCAG	CACCAGAGAT	CTACTCTCAC
M1	ATTCTGATTA	TCAGGCCTTG	CTACCATCTG	CACCAGAGAT	CTACTCTCAC
M2	ATTCTGATTA	TCAGGCCTTG	CTACCAT CCG	CGCC CAGAGAT	CTACTCTCAC
M3	ATTCTGATTA	TCAGGCCTTG	CTACC G TCTG	CGCC CAGAGAT	CTACTCTCAC
FLK	ATTCTGATTA	TCAGGCCTTG	CTACCATCTG	CACCAGAGAT	CTACTCTCAC

	6330	6340	6350	6360	6370
JAP	CTCTCCCCCG	TCAAACCCGA	TTACATCAAC	CTCCGACCCT	GCCCTTGA--
BEL	CTCTCCCCCG	TCAAACCCGA	TTACATCAAC	CTCCGACCCT	GCCCTTGA--
AST	CTCTCCCC CA	CCAA ACCCGA	TTACATCAAC	CT TCG ACCCT	GCCCTTGA--
M1	CTCTCCCCCG	TCAAACCCGA	TTACATCAAC	CTCCGACCCT	GCCCTTGA--
M2	CTCTCCCC CA	CCAA ACCCGA	TTACATCAAC	CT TCG ACCCT	GCCCTTGA--
M3	CTCTCCCC CA	CCAA ACCCGA	TTACATCAAC	CT TCG ACCCT	GCCCTTGA--
FLK	CTCTCCCCCG	TCAAACCCGA	TTACATCAAC	CTCCGACCCT	GCCCTTGA--

9.2. AS-Sequenzvergleich von ausgewählten BLV-Provirusabschnitten der *env*-Region

	10	20	30	40	50
JAP	MPKERRSRRR	PQPIIRWVSL	TLTLLALCRP	IQTWRCSLSL	GNQQWMTASN
BEL	MPKERRSRRR	PQPIIRWVSL	TLTLLALC QP	IQTWRCSLSL	GNQQWMT TYN
AST	MPKERRSRRR	P EPIIRWVSL	TLTLLALC QP	IQTWRCSLSL	GNQQWMT AYN
M1	MPK K RRSRRR	PQPIIRWVSL	TLTLLALCRP	IQTWRCSLSL	GNQQWMT AYN
M2	MPKERRSRRR	PQPIIRWVSL	TLTLL S LC QP	IQTWRCSLSL	GNQQWMT TYN
M3	MPKERRSRRR	PQPIIRWVSL	TLTLLALC QP	IQTWRCSLSL	GNQQWMT TYN
FLK	MPKERRSRRR	PQPIIRWVSL	TLTLLALCRP	IQTWRCSLSL	GNQQWMT AYN
	60	70	80	90	100
JAP	QEAKFSISID	QILEAHNQSP	FCAKSPRYTL	DSVNGYPKIY	WPPPQGRRRF
BEL	QEAKFSISID	QILEAHNQSP	F C P RSRYTL	D FVNGYPKIY	WPPPQGRRRF
AST	QEAKFSISID	QILEAHNQSP	FCAKSPRYTL	DSVNGYPKIY	WPPPQGRRRF
M1	QEAKFSISID	QILEAHNQSP	FCAKSPRYTL	DSVNGYPKIY	WPPPQGRRRF
M2	QEAKFS I AID	QILEAHNQSP	F C P RSRYTL	D FVNGYPKIY	WPPPQGRRRF
M3	QEAK F FISID	QILEAHNQSP	F C P RSRYTL	D FVNGYPKIY	WPPPQGRRRF
2	-----	-----	-----	-----	---PQGRRRF
45	-----	-----	-----	-----	---PQGRRRF
134	-----	-----	-----	-----	---PQGRRRF
15313	-----	-----	-----	-----	---PQGRRRF
167	-----	-----	-----	-----	---PQGRRRF
41335	-----	-----	-----	-----	---PQGRRRF
574	-----	-----	-----	-----	---PQGRRRF
68-14	-----	-----	-----	-----	---PQGRRRF
68-18	-----	-----	-----	-----	---PQGRRRF
6869	-----	-----	-----	-----	---PQGRRRF
FLK	QEAKFSISID	QILEAHNQSP	FCAKSPRYTL	DSVNGYPKIY	WPPPQGRRRF
	110	120	130	140	150
JAP	GARAMVTYDC	EPRCPYVGAD	RFDCPHWDNA	SQADQGSFYV	NHQILFLHLK
BEL	GARAMVTYDC	EPRCPYVGAD	H FDCPHWDNA	SQADQGSFYV	NHQILFLHLK
AST	GARAMVTYDC	EPRCPYVGAD	RFDCPHWDNA	SQADQGSFYV	NHQILFLHLK
M1	GARAMVTYDC	EPRCPYVGAD	RFDCPHWDNA	SQADQGSFYV	NHQILFLHLK
M2	GARAMVTYDC	EPRCPYVGAD	H FDCPHWDNA	SQADQGSFYV	NHQILFLHLK
M3	GARAMVTYDC	EPRCPYVGAD	H FDCPHWDNA	SQADQGSFYV	NH Q TLFLHLK
2	GARAMVTYDC	EPRCPYVGAD	H FDCPHWDNA	SQADQGSFYV	D HQILFLHLK
7	GARAMVTYDC	EPRCPYVGAD	RFDCPHWDNA	SQADQGSFYV	NH-----
45	GARAMVTYDC	EPRCPYVGAD	RFDCPHWDNA	SQADQGSFYV	NHQILFLHLK
134	GARAMVTYDC	EPRCPYVGAD	RFDCPHWDNA	SQADQGSFYV	NHQILFLHVK
15313	GARAMVTYDC	EPRCPYVGAD	H FDCPHWDNA	SQADQGSFYV	NHQILFLHLK
159	GARAMVTYDC	EPRCPYVGAD	RFDCPHWDNA	SQADQGSFYV	NH-----
167	GARAMVTYDC	EPRCPYVGAD	RFDCPHWDNA	SQADQGSFYV	NHQILFLHLK
41335	GARAMVTYDC	EPRCPYVGAD	H FDCPHWDNA	SQADQGSFYV	NHQILFLHLK
574	GARAMVTYDC	EPRCPYVGAD	RFDCPHWDNA	SQADQGSFYV	NHQILFLHLK
68-14	GARAMVTYDC	EPRCPYVGAD	RFDCPHWDNA	SQADQGSFYV	NHQILFLHLK
68-18	GARA V VTYDC	EPRCPYVGAD	RFDCPHWDNA	SQADQGSFYV	NHQILFLHLK
6869	GARAMVTYDC	EPRCPYVGAD	H FDCPHWDNA	SQADQGSFYV	NHQILFLHLK
FLK	GARAMVTYDC	EPRCPYVGAD	RFDCPHWDNA	SQADQGSFYV	NHQILFLHLK

	160	170	180	190	200
JAP	QCHGIFTLTW	EIWGYDPLIT	FSLHKIPDPP	QPDFPQLNSD	WVPSVRSWAL
BEL	QCHGIFTLTW	EIWGYDPLIT	FSLHKIPDPP	QPDFPQLNSD	WVPSVRSWAL
AST	QCHGIFTLTW	EIWGYDPLIT	FSLHKIPDPP	QPDFPQLNSD	WVPSVRSWAL
M1	QCHGIFTLTW	EIWGYDPLIT	FSLHKIPDPP	QPDFPQLNSD	WVPSVRSWAL
M2	QCHGIFTLTW	EIWGYDPLIT	FSLHKIPDPP	QPDFPQLNSD	WVPSVRSWAL
M3	QCHGIFTLTW	EIWGYDPLIT	FSLHKIPDPP	QPDFPQLNSD	WVPSVRSWAL
2	QCHGIFTLTW	EIWGYDPLIT	FSLHKIPDPP	QPDFPQLNSD	WVPSVRSWAL
45	QCHGIFTLTW	EIWGYDPLIT	FSLHKIPDPP	QPDFPQLNSD	WVPSVRSWAL
134	QCHGIFTLTW	EIWGYDPLIT	FSLHKIPDPP	QPDFPQLNSD	WVPSVRSWAL
15313	QCHGIFTLTW	EIWGYDPLIT	FSLHKIPDPP	QPDFPQLNSD	WVPSVRSWAL
167	QCHGIFTLTW	EIWGYDPLIT	FSLHKIPDPP	QPDFPQLNSD	WVPSVRSWAL
41335	QCHGIFTLTW	EIWGYDPLIT	FSLHKIPDPP	QPDFPQLNSD	WVPSVRSWAL
574	QCHGIFTLTW	EIWGYDPLIT	FSLHKIPDPP	QPDFPQLNSD	WVPSVRSWAL
68-14	QCHGIFTLTW	EIWGYDPLIT	FSLHKIPDPP	QPDFPQLNSD	WVPSVRSWAL
68-18	QCHGIFTLTW	EIWGYDPLIT	FSLHKIPDPP	QPDFPQLNSD	WVPSVRSWAL
6869	QCHGIFTLTW	EIWGYDPLIT	FSLHKIPDPP	QPDFPQLNSD	WVPSVRSWAL
FLK	QCHGIFTLTW	EIWGYDPLIT	FSLHKIPDPP	QPDFPQLNSD	WVPSVRSWAL

	210	220	230	240	250
JAP	LLNQATARAFP	DCAICWEPSP	PWAP EILVYN	KTISSSGPGL	ALPDAQIFWV
BEL	LLNQATARAFP	DCAICWEPSP	PWAP EILVYN	KTISGSGPGL	ALPDAQIFWV
AST	LLNQATARAFP	DCAICWEPSP	PWAP EILVYN	KTISSSGPGL	ALPDAQIFWV
M1	LLNQATARAFP	DCAICWEPSP	PWAP EILVYN	KTISSSGPGL	ALPDAQIFWV
M2	LLNQATARAFP	DCAICWEPSP	PWAP EILVYN	KTISNSGPGL	ALPDAQIFWV
M3	LLNQATARAFP	DCAICWEPSP	PWAP EILVYN	KTISSSGPGL	ALPDAQIFWV
2	FLNQATARAFP	DCAICWEPSP	PWAP EILVYN	KTISSSGPGL	-----
45	LLNQATARAFP	DCAICWEPSP	PWAP EILVYN	KTISSSGPGL	-----
134	LLNQATARAFP	DCAICWEPSP	PWAP EILVYN	KTISSSGPGL	-----
15313	LLNQATARAFP	DCAICWEPSP	PWAP EILVYN	KTISSSGPGL	-----
167	LLNQATARAFP	DCAICWEPSP	PWAP EILVYN	KTISSSGPGL	-----
41335	LFNQATARAFP	DCAICWEPSP	PWAP EILVYN	KTISSSGPGL	-----
574	LLNQATARAFP	DCAICWEPSP	PWAP EILVYN	KTISSSGPGL	-----
68-14	LLNQATARAFP	DCAICWEPSP	PWAP EILVYN	KTISSSGPGL	-----
68-18	LLNQATARAFP	DCAICWEPSP	PWAP EILVYN	KTISSSGPGL	-----
6869	LLNQATARAFP	DCAICWEPSP	PWAP EILVYN	KTISSSGPGL	-----
FLK	LLNQATARAFP	DCAICWEPSP	PWAP EILVYN	KTISSSGPGL	-----

	260	270	280	290	300
JAP	NSSSFNTTQG	WHHPSQRLLF	NVSQGNALLL	PPISLVNLST	ASSAPPTRVR
BEL	NTSLFNTTQG	WHHPSQRLLF	NVSQGNALLL	PPISLVNLST	VSSAPPTRVR
AST	NTSSFNTTQG	WHHPSQRLLF	NVSQGNALLL	PPISLVNLST	ASSAPPTRVR
M1	NTSSFNTTQG	WHHPSQRLLF	NVSQGNALLL	PPISLVNLST	ASSAPPTRVR
M2	NTSLFNTTQG	WHHPSQRLLF	NVSQGNALLL	PPISLVNLST	ASSAPPTRVR
M3	NTSLFNTTQG	WHHPSQRLLF	NVSQGNALLL	PPISLVNLST	ASSAPPTRVR

	310	320	330	340	350
JAP	RSPVAALTLG	LALSVGLTGI	NVAVSALSHQ	RLTSLIHVLE	QDQORLITAI
BEL	RSPVAALTLG	LALSVGLTGI	NVAVSALSHQ	RLTSLIHVLE	QDQORLITAI
AST	RSPVAALTLG	LALSVGLTGI	K VAVSALSHQ	RLTSLIHVLE	QDQORLITAI
M1	RSPVAALTLG	LALSVGLTGI	NVAVSALSHQ	RLTSLIHVLE	QDQORLITAI
M2	RSP A AALTLG	LALSVGLTGI	NVAVSALSHQ	RLTSLIHVLE	QDQORLITAI
M3	RSPVAALTLG	LALSVGLTGI	NVAVSALSHQ	RLTSLIHVLE	QDQORLITAI
	360	370	380	390	400
JAP	NQTHYNLLNV	ASVVAQNRRG	LDWLYIRLGF	QSLCPTINEP	CCFLRIQNS
BEL	NQTHYNLLNV	ASVVAQNRRG	LDWLYIRLGF	QSLCPTINEP	CCFLRIQNS
AST	NQTHYNLLNV	ASVVAQNRRG	LDWLYIRLGF	QSLCPTINEP	CCFLRIQNS
M1	NQTHYNLLNV	ASVVAQNRRG	LDWLYIRLGF	QSLCPTINEP	CCFLRIQNS
M2	NQTHYNLLNV	ASVVAQNRRG	LDWLYIRLGF	QSLCPTINEP	CCFLRIQNS
M3	NQTHYNLLNV	ASVVAQNRRG	LDWLYIRLGF	QSLCPTINEP	CCFLRIQNS
	410	420	430	440	450
JAP	I IRLGDLQPL	SQRVSTDWQW	PWNWDLGLTA	WVRETIHSVL	SLFLLALFLL
BEL	I IRRGDLQPL	SQRVSTDWQW	PWNWDLGLTA	WVRETIHSVL	SLFLLALFLL
AST	I IRLGDLQPL	SQRVSTDWQW	PWNWDLGLTA	WVRETIHSVL	SLFLLAL L LL
M1	I IRLGDLQPL	SQRVSTDWQW	PWNWDLGLTA	WVRETIHSVL	SLFLLALFLL
M2	I IRLGDLQPL	SQRVSTDWQW	PWNWDLGLTA	WVRETIHSVL	SLFLLALFLL
M3	I IRLGDLQPL	SQRVSTDWQW	PWNWDLGLTA	WVRETIHSVL	SLFLLALFLL
	460	470	480	490	500
JAP	FLAPCLIKCL	TSRLLKLLRQ	APHFPEISLT	PKPDSYQAL	LPSAPEIYSH
BEL	FLAPCLIKCL	TSRLLKLLRQ	APHFPEIS F T	PKPDSYQAL	LPSAPEIYSH
AST	FLAPCLIKCL	TSRLL S KLLRQ	APHFPEIS F P	PKPDSYQAL	LPSAPEIYSH
M1	FLAPCLIKCL	TSRLLKLLRQ	APHFPEISLT	PKPDSYQAL	LPSAPEIYSH
M2	FLAPCLIKCL	TSRLLKLLRQ	APHFPEIS L A	PKPDSYQAL	LPSAPEIYSH
M3	FLAPCLIKCL	TSRLLKLLRQ	APHFPEIS F P	PKPDSYQAL	LPSAPEIYSH
FLK	FLAPCLIKCL	TSRLLKLLRQ	APHFPEISLT	PKPDSYQAL	LPSAPEIYSH
	510	520			
JAP	LSPVKPDYIN	LRPCP-----			
BEL	LSP T KPDYIN	LRPCP-----			
AST	LSP T KPDYIN	LRPCP-----			
M1	LSPVKPDYIN	LRPCP-----			
M2	LSP T KPDYIN	LRPCP-----			
M3	LSP T KPDYIN	LRPCP-----			
FLK	LSPVKPDYIN	LRPCP-----			

9.3. DNA-Sequenzvergleich von ausgewählten BLV-Provirusabschnitten der *pol*-Region (Np 4101-4900)

	4110	4120	4130	4140	4150
JAP	GTGTGAAACC	TGCCAAAAGC	TTAATCCAAC	TGGAGGAGGA	AAGATGCGAA
BEL	GTGTGAAACC	TG T C A AAGGC	T CAATCCAAC	TGGAGG TGGG	AAGATGCGAA
AST	GTGTGAAACC	TG T C A AAGGC	T CA A CCCAAC	TGGAGG CGGA	AAGATGCG GA
68	-----	TGCCAAAAGC	TTA A GCCAAC	TGGAGGAGGA	A A CATGCGAA
	4160	4170	4180	4190	4200
JAP	CTATTCAGAG	AGGGTGGGCC	CCGAATCATA	TTTGGCAGGC	CGATATAACC
BEL	CTATTCAGAG	AGGGTGGGCC	CC G AATCATA	TTTGGCAGGC	CGATATAACC
AST	CTATTCAGAG	AGGGTGGGCC	CC A AATCATA	T CTGGCAGGC	CGATATA A CT
68	CTATTCAGAG	AGGGTGGGCC	CCGAATCACA	TTTGGCAGGC	CGATATAACC
15313	-----	-----	-----	-TTGGCAGGC	CGATATAACC
	4210	4220	4230	4240	4250
JAP	CATTATAAAT	ACAAACAGTT	CACCTACGCT	CTGCATGTGT	TTGTAGATAC
BEL	CATTATAAAT	ACAAACAGTT	CACCTACGCT	TTGCACGTGT	TTGTAGATAC
AST	CATTATAAAT	ACAAACAGTT	CACCTACGCT	TTGCACGTGT	TTGTAGATAC
68	CATTATAAAT	ACAAACAGTT	CACCTACGCT	CTGCATGTGT	TTGTAGATAC
15313	CATTATAAAT	ACAAACAGTT	CACCTACGCT	TTGCACGTGT	TTGTAGATAC
	4260	4270	4280	4290	4300
JAP	TTACTCTGGA	GCTACTCATG	CCTCGGCGAA	GCGTGGGCTC	ACCACTCAAA
BEL	TTACTCTGGA	GCTACTCATG	CCTC AGC AAA	GCG AGGG GCTC	ACCACTCAAA
AST	TTACTCTGGA	GCTACTCATG	CCTC AGC AAA	GCG AGGG GCTC	ACCACTCAAA
68	TTACTCTGGA	GCTACTCATG	CCTCGGCGAA	GCGTGGGCTC	ACCACTCAAA
15313	TTACTCTGGA	GCTACTCATG	CCTC AGC AAA	GCG AGGG GCTC	ACCACTCAAA
	4310	4320	4330	4340	4350
JAP	CGACCATTTGA	GGGCCTTCTT	GAGGCCATAG	TGCATCTGGG	TCGCCCAAAA
BEL	T GACCATTTGA	GGGCCTTCT A	GAGGCCATAG	TGCATCTGGG	TCG T CCAAAA
AST	CGACCATTTGA	GGGCCTTCTT	GAGGCCATAG	TGCATCT AGG	TCG T CCAAAA
68	CGACCATTTGA	GGGCCTTCTT	GAGGCCATAG	-----	-----
15313	T GACGATTGA	GGGCCTTCT G	GAGG C GATAG	TGCATCTGGG	CCG ACCAAAA
	4360	4370	4380	4390	4400
JAP	AAGCTAAACA	CTGACCAAGG	TGCAAAC T AC	ACCTCCAAAA	CCTTTGTCAG
BEL	AAGCTAAACA	CTGACCAAGG	C GCAAAC T AC	ACCTCCAAAA	CCTTTGTCAG
AST	AAGCTAAACA	C GACCAAGG	TG C TAACTAC	ACCTCCAAAA	CCTTTGTCAG
68	AAGCTAAACA	CTGACCAAGG	TGCAAAC T AC	-----	-----
15313	AAGCTAAACA	CTGACCAAGG	C GCAAAC A T C	ACCTCCAAAA	CCTTTGTCAG
	4410	4420	4430	4440	4450
JAP	GTTTTGCCAG	CAGTTCGGAG	TTTCCCTTTC	TCATCATGTT	CCCTACAACC
BEL	GTTTTGCCAG	CAGTTCGG A	TTTCCCTTTC	TCATC A GTT	CCCTACAACC
AST	GTTTTGCCAG	CAGTTCGG A	TTTCCCTTTC	TCATCATGTT	CCCTACAACC
68	GTTTTGCCAG	CAGTTCGGAG	TTTCCCTTTC	-----	-----
15313	GTTTTGCCAG	CAGTTCGGAG	TTTCCCTTTC	-----	-----

	4460	4470	4480	4490	4500
JAP	CCACAAGTTC	GGGGTTAGAT	GAACGGACAA	ATGGACTGCT	CAAACCTTCTT
BEL	CCACAAGTTC	AGGGTTGGTA	GAGCGGACAA	ATGGACTGCT	CAAACCTTCTT
AST	CCACAAGTTC	AGGGTTAGTG	GAACGGACAA	ATGGACTGCT	CAAACCTTCTT
15313	-----	----- AGTG	GAACGGACAA	ATGGACTGCT	CAAACCTT GTT
	4510	4520	4530	4540	4550
JAP	CTATCTAAAT	ATCACCTAGA	CGAACCCAC	CTTCCCATGA	CTCAGGCCCT
BEL	TTGTCTAAAT	ATCACCTAGA	CGAACCCAC	CTTCCCATGA	CTCAGGCCCT
AST	TTGTCTAAAT	ATCACTTAGA	CGAACCCAC	CTTCCCATGA	CTCAGGCCCT
15313	CTTTCTAAAT	ATCACCTAGA	CGAACCCAC	CTTCCCATGA	CTCAGGCCCT
	4560	4570	4580	4590	4600
JAP	TTCTCGAGCC	CTCTGGACTC	ACAATCAGAT	TAACCTCCTA	CCAATTCTAA
BEL	TTCTCGAGCC	CTCTGGACTC	ACAATCAGAT	TAACCTCCTA	CCAATTCTAA
AST	TTCTCGAGCC	CTCTGGACTC	ACAATCAGAT	TAACCTCCTA	CCAATTCTAA
15313	TTCTCGAGCC	CTCTGGACTC	ACAATCAGAT	TAACCTCCTA	CCAATTCTAA
	4610	4620	4630	4640	4650
JAP	AGACCAGATG	GGAGCTACAC	CATTCACCC	CACTTGCTGT	CATTTAGAG
BEL	AGACCAGATG	GGAG TT ACAC	CATTCACCC	CACTTGCTGT	CATTTAGAG
AST	AGACCAGATG	GGAGCTACAC	CATTCACCC	CACTTGCTGT	CATTTAGAG
68	-----	-----	-----	-----	-----CAGAG
15313	AGACCAGATG	GGAG TT ACAC	CATTCAC CTC	CACTTGCTGT	CATTTAGAG
	4660	4670	4680	4690	4700
JAP	GGCGGAGAAA	CACCCAAGGG	CTCTGATAAA	CTCTTTTTGT	ACTTGCTCCC
BEL	GGCGGAGAAA	CACCCAAGGG	CTCTGATAAA	CTCTTTTTGT	AC AA GCTCCC
AST	GGCGGAGAAA	CACCCAAGGG	CTCTGATAAA	CTCTTTTTGT	AC AA GCTCCC
68	GGCGGAGAAA	CACCCAAGGG	CTCTGATAAA	CTCTTTTTGT	AC AA GCTCCC
15313	GGCGGAGAA G	CACCCAAGGG	CTCTGATAAA	CTCTTTTTGT	AC AA GCTCCC
	4710	4720	4730	4740	4750
JAP	CGGGCAAAAC	AATCGTCGGT	GGCTAGGACC	ACTCCCGGCC	CTAGTCGAAG
BEL	CGGGCAAAAC	AATCGTCGGT	GGCTAGGACC	TCT CCCGGCC	CTAGTCGAAG
AST	CGGGCAAAAC	AATCGTCGGT	GGCTAGGACC	ACTCCCGGCC	CTAGTCGAAG
68	CGGGCAAAAC	AATCGTCGGT	GGCTAGGACC	ACTCCCGGCC	CTAGTCGAAG
15313	CGGGCAAAAC	AATCGTCGGT	GGCTAGGACC	TCT CCCGGCC	CTAGTCGAAG
	4760	4770	4780	4790	4800
JAP	CCTCGGGAGG	CGCTCTCCTG	GCTACTGACC	CCCCCGTGTG	GGTTCCCTGG
BEL	CCTCGGGAGG	CGC CT CCTG	GCTACT A ACC	CCCCCGTGTG	GGTTCCCTGG
AST	CCTCGGGAGG	CGCTCTCCTG	GCTAC CA ACC	CCCCCGTGTG	GGTTCCCTGG
68	CCTCGGGAGG	CGCTCTCCTG	GCTACTGACC	CCCCCGTGTG	GGTTCCCTGG
15313	CCTCGGGAGG	CGC CT CCTG	GCTACT A ACC	CCCCCGTGTG	GGTTCCCTGG

	4810	4820	4830	4840	4850
JAP	CGTTTGCTGA	AAGCCTTCAA	ATGCCTAAAG	AACGACGGTC	CCGAAGACGC
BEL	CGTTTGCT AA	AAGCCTTCAA	ATGCC CAAAG	AACGACGGTC	CCGAAGACGC
AST	CGTTTGCTGA	AG GCCTTCAA	ATGCCTAAAG	AACGACGGTC	CCGAAGACGC
68	CGTTTGCTGA	AAGCCTTCAA	ATGCCTAAAG	AA-----	-----
15313	CGTTTGCT AA	AAGCCTTCAA	ATGCC CAAAG	AACGACGGTC	CCAAAGACGC
	4860	4870	4880	4890	4900
JAP	CCACAACCGA	TCATCAGATG	GGTAAGTCTC	ACTCTCACTC	TCCTCGCTCT
BEL	CCACAACCGA	TCATCAGATG	GGTAAGTCTC	ACTCT T ACTC	TCCTCGCTCT
AST	CCCGAACCGA	TCATCAGATG	GGTAAGTCTC	ACTCTCACTC	TCCTCGCTCT
15313	CCCGAACCGA	TCATCAGATG	GGTAAGTCTC	ACTCTCACTC	TC-----

9.4. As-Sequenzvergleich von ausgewählten BLV-Provirusabschnitten der *pol*-Region
(Np 4101-4900, As-Positionen beginnend ab prt/*pol*-Frameshift [Np 2332-2338]; Hatfield *et al.*, 1989)

	595	605	615	625	635
JAP	--CETCQKLN	PTGGGKMRTI	QRGWAPNHIW	QADITHYKYK	QFTYALHVFV
BEL	--CETCQRLN	PTGGGKMRTI	QRGWAPNHIW	QADITHYKYK	QFTYALHVFV
AST	--CETCQRLN	PTGGGKMRTI	QRGWAPNHIW	QADITHYKYK	QFTYALHVFV
68	-----CQKLK	PTGGGNMRTI	QRGWAPNHIW	QADITHYKYK	QFTYALHVFV
15313	-----	-----	-----	QADITHYKYK	QFTYALHVFV
	645	655	665	675	685
JAP	DTYSGATHAS	AKRGLTTQTT	IEGLLEAIVH	LGRPCKLNTD	QGANYTSKTF
BEL	DTYSGATHAS	AKRGLTTQMT	IEGLLEAIVH	LGRPCKLNTD	QGANYTSKTF
AST	DTYSGATHAS	AKRGLTTQTT	IEGLLEAIVH	LGRPCKLNTD	QGANYTSKTF
68	DTYSGATHAS	AKRGLTTQTT	IEGLLEAIV-	-----	-----
15313	DTYSGATHAS	AKRGLTTQMT	IEGLLEAIVH	LGRPCKLNTD	QGANITSKTF
	695	705	715	725	735
JAP	VRFCQQFGVS	LSHHVPYNPT	SSGLDERTNG	LLKLLLSKYH	LDEPHLPMTQ
BEL	VRFCQQFGIS	LSHHVPYNPT	SSGLVERTNG	LLKLLLSKYH	LDEPHLPMTQ
AST	VRFCQQFGIS	LSHHVPYNPT	SSGLVERTNG	LLKLLLSKYH	LDEPHLPMTQ
15313	VRFCQQFGVS	L-----	----VERTNG	LLKLVLSKYH	LDEPHLPMTQ
	745	755	765	775	785
JAP	ALSRALWTHN	QINLLPILKT	RWELHHSPPPL	AVISEGGETP	KGSDKLFLYL
BEL	ALSRALWTHN	QINLLPILKT	RWELHHSPPPL	AVISEGGETP	KGSDKLFLYK
AST	ALSRALWTHN	QINLLPILKT	RWELHHSPPPL	AVISEGGETP	KGSDKLFLYK
68	-----	-----	-----	---SEGGETP	KGSDKLFLYK
15313	ALSRALWTHN	QINLLPILKT	RWELHHSPPPL	AVISEGGEAP	KGSDKLFLYK
	795	805	815	825	835
JAP	LPGQNNRRWL	GPLPALVEAS	GGALLATDPP	VWVPWRLKA	FKCLKNDGPE
BEL	LPGQNNRRWL	GPLPALVEAS	GGALLATNPP	VWVPWRLKA	FKCPKNDGPE
AST	LPGQNNRRWL	GPLPALVEAS	GGALLATNPP	VWVPWRLKA	FKCLKNDGPE
68	LPGQNNRRWL	GPLPALVEAS	GGALLATDPP	VWVPWRLKA	FKCLK-----
15313	LPGQNNRRWL	GPLPALVEAS	GGALLATNPP	VWVPWRLKA	FKCPKNDGPE
	845	855			
JAP	DAHNRSSDG*	VSLSLSSL..			
BEL	DAHNRSSDG*	VSLLLSSL..			
AST	DAPNRSSDG*	VSLSLSSL..			
15313	DAHNRSSDG*			

9.5. DNA-Sequenzvergleich von ausgewählten BLV-Provirusabschnitten der *tax*-Region (Np 6990-8037)

	7000	7010	7020	7030	7040
JAP	AAGTGTGCAC	AATATCTCTT	CCAAAAGGTC	CTGATGAACG	TCTTCCCATG
BEL	AAGTGTGCAC	AATATCTCTT	CCAAAAGGTC	CTGATGAACA	TCTTCCCATG
AST	AAGT CACGTC	AATATCTCTT	CGAAAAGGTC	CTGATGAACA	TCTTCCCATG
6	-----	-----TCTT	CCAAAAGGTC	CTGATGAACA	TGTT CCCATG
FLK	-----	-----	-----GGTC	CTGATGAACG	TCTTCCCATG
pSVN	-----	-----	-----	-----	TCTTCCCATG

	7050	7060	7070	7080	7090
JAP	TAACAAGCCC	CAGCAGAGAC	ATTCCAGCCA	CATCCAGCAG	CATTTGGGCC
BEL	TAACAAGCCC	CAGCAGAGAC	ATTCCAGCCA	CATCCAGCAG	CATTTGGGCC
AST	TAACAAGCCC	CAAC CAGAGAC	ATTCCAGCCA	CATCCAGCAG	CATT CG GGGCC
6	TAAC GAG CCC	CAGCAGAGAC	ATTCCAGCCA	CATCCAGCAG	CATTTGGGCC
574	-----	-----	---CCAGCCA	CATCCAGCAG	CATTTGGGCC
15313	-----CCC	CAGCAGAGAC	ATTCCAGCCA	CATCCAGCAG	CAT CT GGGCC
FLK	TAACAAGCCC	CAGCAGAGAC	ATTCCAGCCA	CATCCAGCAG	CATTTGGGCC
pSVN	TAACAAGCCC	CAGCAGAGAC	ATTCCAGCCA	CATCCAGCAG	CATTTGGGCC

	7100	7110	7120	7130	7140
JAP	GCCTTTTCTA	ACAGTGCCCA	TAAAGTCCCT	TCCGTTTCCA	CAACGGCTGC
BEL	GCCTT CT TCTA	ACAGTGCCCA	TAAAGTCCCT	TCCGTTTCCA	CAACGGCTGC
AST	GCCTT CT TCTA	ACAGTGCCCA	TAAAGT CT TCT	TCCGTTTCCA	CAAC CG CTGC
6	GCCTT CT TCTA	ACAGTGCCCA	TAAAGTCCCT	TCCGTTTCCA	CAACGGCTGC
574	GCCTTTTCTA	ACAGTGCCCA	TAAAGTCCCT	TCCGTTTCCA	CAACGGCTGC
15313	GCCTT CT TCTA	ACAGTGCCCA	TAAAGTCCCT	TCCGTTTCCA	CAACGGCTGC
FLK	GCCTTTTCTA	ACAGTGCCCA	TAAAGTCCCT	TCCGTTTCCA	CAACGGCTGC
pSVN	GCCTTTTCTA	ACAGTGCCCA	TAAAGTCCCT	TCCGTTTCCA	CAACGGCTGC

	7150	7160	7170	7180	7190
JAP	CTCTGCATCT	TCTATTTCCA	CCTCGGCACC	GACTCCCCCG	CCGAGCCCTT
BEL	CTCTGCATCT	TCTATTTCCA	CCTCGGCACC	GACTCCCCCG	CCGAGCCCTT
AST	CTCTGCATCT	TCTATTTCCA	CCTCGGCACC	GACTCCCCCG	CCGAGCC CT T
6	CTCTG CT TCT	TCTATTTCCA	CCTCGGCACC	GACTCCCCCG	CCGAGCCCTT
574	CTCTGCATCT	TCTATTTCCA	CCTCGGCACC	GACTCCCCCG	CCGAGCCCTT
15313	CTCTGCATCT	TCTATTTCCA	CCTCGGCACC	GACTCCCCCG	CCGAGCCCTT
FLK	CTCTGCATCT	TCTATTTCCA	CCTCGGCACC	GACTCCCCCG	CCGAGCCCTT
pSVN	CTCTGCATCT	TCTATTTCCA	CCTCGGCACC	GACTCCCCCG	CCGAGCCCTT

	7200	7210	7220	7230	7240
JAP	CGAGCTCTTC	GGGATCCATT	ACCTGATAAC	GACAAAATTA	TTTCTTGTCT
BEL	CA AGCTCTTC	GGGATCCATT	ACCTGATAAC	GACAAAATTA	TTTCTTGTCT
AST	CGAGCTCTTC	GGGATCCATT	ACCTGATAAC	GACAAAATTA	TTTCTTGTCT
6	CG GG CTCTTC	GGGATCCATT	ACCTGATAAC	GACAAAATTA	TTTCTTGTCT
574	CGAGCTCTTC	GGGATCCATT	ACCTGATAAC	GACAAAATTA	TTTCTTGTCT
15313	CGAGCTCTTC	GGGATCCATT	ACCTGATAAC	GACAAAATTA	TTTCTTGTCT
FLK	CA AGCTCTTC	GGGATCCATT	ACCTGATAAC	GACAAAATTA	TTTCTTGTCT
pSVN	CGAGCTCTTC	GGGATCCATT	ACCTGATAAC	GAC-----	-----

	7250	7260	7270	7280	7290
JAP	TTTAAGCAAG	TGTTGTTGGT	TGGGGGCCCC	ACTCTCTACA	TGCCTGCCCG
BEL	TTTAAGCAAG	TGTTGTTGGT	TGGGGGCCCC	ACTCTCTACA	TGCCTGCCCG
AST	TTTAAGCAAG	TGTTGTTGGT	TGGGGGCCCC	ACTCTCTGCA	TGCCTGCCCG
6	TTTAAGCAAG	TGTTGTTGGT	TGGGGGCCCC	ACTCTCTACA	TGCCTGCCCG
574	TTTAAGCAAG	TGTTGTTGGT	TGGGGGCCCC	ACTCTCTACA	TGCCTGCCCG
15313	TTTAAGCAAG	TG-----	-----	-----	-----
FLK	TTTAAGCAAG	TGTTGTTGGT	TGGGGGCCCC	ACTCTCTACA	TGCCTGCCCG
	7300	7310	7320	7330	7340
JAP	GCCCTGGTTT	TGTCCAATGA	TGTCACCATC	GATGCCTGGT	GCCCCCTCTG
BEL	GCCCTGGTTT	TGTCCAATGA	TGTCACCATC	GATGCCTGGT	GCCCCCTCTG
AST	GCCCTGGTTT	TGTCCAATGA	TGTCACCATC	GATGCCTGGT	GCCCCCTCTG
6	GCCCTGGTTT	TGTCCAATGA	TGTCACCATC	GATGCCTGGT	GCCCCCTCTG
574	GCCCTGGTTT	TGTCCAATGA	TGTCACCATC	GATGCCTGGT	GCCCCCTCTG
FLK	GCCCTGGTTT	TGTCCA----	-----	-----	-----
	7350	7360	7370	7380	7390
JAP	CGGGCCCCAT	GAGCGACTCC	AATTCGAAAG	GATCGACACC	ACGCTCACCT
BEL	CGGGCCCCAT	GAACGACTCC	AATTCGAAAG	GATCGACACC	ACGCTCACCT
AST	CGGGCCCCAT	GAACGACTCC	AATTCGAAAG	GATCGACACC	ACGCTCACCT
6	CGGGCCCCAT	GAACGACTCC	AATTCGAAAG	GATCGACACC	ACGCTCACCT
574	CGGGCCCCAT	GAGCGACTCC	AATTCGAAA-	-----	-----
FLK	CGGGCCCCAT	GA-----	-----	-----	-----
	7400	7410	7420	7430	7440
JAP	GCGAGACCCA	CCGTATCAAC	TGGACCGCCG	ATGGACGACC	TTGCGGCCTC
BEL	GCGAGACCCA	CCGTATCACC	TGGACCGCCG	ATGGACGACC	TTTTGGCCTC
AST	GCGAGACCCA	CCGTATCACC	TGGACCGCCG	ATGGACGACC	TTTCGGCCTC
6	GCGAGACCCA	CCGTATCACC	TGGACGCCCC	ATGGACGACC	TTT-----
	7450	7460	7470	7478	7488
JAP	AATGGAACGT	TGTTCCCTCG	ACTGCATGTC	TCCGAGA--C	CCGCCCCCAA
BEL	AATGGAACAT	TGTTCCCTCG	ACTGCATGTC	TCCGAGA--C	CCGCCCCCAA
AST	AATGGAACGT	TGTTCCCTCG	ACTGCATGTC	TCC-AGAGAC	CCGCCCCCAA
	7498	7508	7518	7528	7538
JAP	GGGCCCCGAC	GACTCTGGAT	CAACTGCCCC	CTTCCGGCCG	TTCGCGCTCA
BEL	GGGCCCCGAC	GACTCTGGAT	CAACTGCCCC	CTTCCGGCCG	TTCGCGCTCA
AST	GGGCCCCGAC	GACTCTGGAT	CAACTGCCCC	CTTCCGGCCG	TTCGCGCTCA
	7548	7558	7568	7578	7588
JAP	GCCCGGCCCG	GTTTCACTTT	CCCCCTTCGA	GCGGTCCCCC	TTCCAGCCCT
BEL	GCCCGGCCCG	GTTTCACTTT	CCCCCTTCGA	GCAGTCCCCC	TTCCAGCCCT
AST	GCCCGGCCCG	GTTTCACTTT	CCCCCTTCGA	GCAGTCCCCC	TTCCAGCCCT
	7598	7608	7618	7628	7638
JAP	ACCAATGCCA	ATTGCCCTCG	GCCTCTAGCG	ACGGTTGCCC	CATTATCGGG
BEL	ACCAATGCCA	ATTGCCCTCG	GCCTCTAGCG	ACGGTTGCCC	CATCATCGGG
AST	ACCAATGCCA	ATTGCCCTCG	GCCTCTAGCG	ATGGTTCCCC	CATCATCGGG

	7648	7658	7668	7678	7688
JAP	CACGGCCTTC	TTCCCTGGAA	CAACTTAGTA	ACGCATCCTG	TCCTCGGAAA
BEL	CACGGCCTTC	TTCCCTGGAA	CAACTTAGTA	ACGCATCCTG	TCCTCGGAAA
AST	CACGGCCTTC	TTCCCTGGAA	CAACTTAGTA	ACGCACCCCG	TCCTCGGAAA
	7698	7708	7718	7728	7738
JAP	AGTCCTTATA	TTAAATCAAA	TGGCCAATTT	TTCCTTACTC	CCCTCCTTCG
BEL	AGTCCTTATA	TTAAATCAAA	TGGCCAATTT	TTCCTTACTC	CCCCCCTTCG
AST	AGTCCTTATA	TTAAATCAGA	TGGCA A AATTT	C TTCCTTACTC	CCCTCCTTCG
6	-----	TTAAATCAAA	TGGCCAATTT	TTCCTTACTC	CCCCCCTTCG
	7748	7758	7768	7778	7787
JAP	ATACCCTCCT	TGTGGACCCC	CTCCGGCTGT	CCGTCTTTGC	CCCAGAC-AC
BEL	ATACCCTCCT	TGT A GACCCC	CTCCGGCTGT	CCGTCTTTGC	CCC G GAC-AC
AST	ATACCCT C AT	TGT A GACCCC	CTCCGGCTGT	CCGTCTTTGC	CCC G GAC C AC
6	ATACCCTCCT	TGTGGACCCC	CTCCGGCTGT	CCGTCTTTGC	CCCAGAC-AC
574	-----	-----	---CGGCTGT	CCGTCTTTGC	CCCAGAC-AC
pSVN	-----	-----	-----	-----C	CCCAGAC-AC
	7797	7807	7817	7827	7837
JAP	CAGGGGAGCC	ATACGTTATC	TCTCCACCCT	TTTGACGCTA	TGCCCAGCTA
BEL	T AGGGGAGCC	ATACGTTATC	TCTCCACCCT	TTTGACGCTA	TGCCCAG T TA
AST	T AGGGGAGCC	ATACGTTATC	TCTCCACCCT	TTTGACGCTA	TGCCCAGCTA
6	CAGGGGAGCC	ATACGTTATC	TCTCCACCCT	TTTGACGCTA	TGCCCAGCTA
574	CAGGGGAGCC	ATACGTTATC	TCTCCACCCT	TTTGACGCTA	T G TCCAGCTA
15313	----GGAGCC	ATACGTTATC	TCTCCACCCT	TTTGACGCTA	T G TCCAGCTA
FLK	-----	-----	-----	-----	--CCCC G GCTA
pSVN	CAGGGGAGCC	ATACGTTATC	TCTCCACCCT	TTTGACGCTA	TGCCCAGCTA
	7847	7857	7867	7877	7887
JAP	CTTGTTATTCT	ACCCCTAGGC	GAGCCCTTCT	CTCCTAATGT	CCCCATATGC
BEL	CTTGTTATTCT	ACCCCTAGGC	GAGCCCTTCT	CTCCTAATGT	CCCCATATGC
AST	CTTGTTAT C CT	ACCCCTAG A C	GAGCCCTTCT	CTCCTAATGT	CCCCATATGC
6	CTTGTTATTCA	TCCCCTAGGC	GAGCCCTTCT	CTCCTAATGT	CCCCATATGC
574	CTTGTTATTCT	ACCCCTAGGC	GAGCCCTTCT	CTCCTAATGT	CCCCATATGC
15313	CTTGTTATTCT	ACCCCTAGGC	GAGCCCTTCT	CTCCTAATGT	CCCCATATGC
FLK	CTTGTT A TATCT	ACCCCTAGGC	GAGCCCTTCT	CTCCTAATGT	CCCC C ATAGC
pSVN	CTTGTTATTCT	ACCCCTAGGC	GAGCCCTTCT	CTCCTAATGT	CCCCATATGC
	7897	7907	7917	7927	7937
JAP	CGCTTTCCCC	GGGACTCCAA	TGAACCCCCC	CTTTCAGAAT	TCGAGCTGCC
BEL	CGCTTTCCCC	G AGAC A CCAG	TGAAC C TCCC	CTTTCAGAAT	TCGAGCTGCC
AST	CGCTTTCCCC	GGGACTCCAA	TGAACCCCCC	CTTTCAGAAT	TC-----
6	CGCTTTCCCC	GGGAC A CCAA	TGAAC C TCCC	CTTTCAGAAT	TCGAGCT G CT
574	CGCTTTCCCC	GGGACTCCAA	TGAACCCCCC	CTTTCAGAAT	TCGAGCTGCC
15313	CGCTTTCCCC	GGGAC A CCAA	TGAACCCCCC	CTTTCAGAAT	TCGAGCTGCC
FLK	CGCTTTCCCC	GGGACTCCAA	TGAACCCCCC	CTTTCAGAAT	TCGAGCTGCC
PSVN	CGCTTTCCCC	GGGACTCCAA	TGAACCCCCC	CTTTCAGAAT	TCGAGCT G CT

	7947	7957	7967	7977	7987
JAP	CCCCATCCAA	ACGCCCGGCC	TGTCTTGGTC	TGTCCCCGCG	ATCGACCTAT
BEL	CCTTATCCAA	ACGCCCGGCC	TGTCTTGGTC	TGTCCCCGCG	ATCGACCTAT
6	CCTTATCCAA	AC-----	-----	-----	-----
574	CCTTATCCAA	AC-----	-----	-----	-----
15315	CCCCATCCAA	AC-----	-----	-----	-----
FLK	CCCCATCCAA	AC-----	-----	-----	-----
pSVN	CCCCATCCAA	AC-----	-----	-----	-----

9.6. As-Sequenzvergleich von ausgewählten BLV-Provirusabschnitten des *tax*-Proteins

	10	20	30	40	50
JAP	MASVVGWGP	SLHACPALVL	SNDVTIDAWC	PLCGPHERLQ	FERIDTTLTC
BEL	MASVVGWGP	SLHACPALVL	SNDVTIDAWC	PLCGPHERLQ	FERIDTTLTC
AST	MASVVGWGP	SLHACPALVL	SNDVTIDAWC	PLCGPHERLQ	FERIDTTLTC
6	MASVVGWGP	SLHACPALVL	SNDVTIDAWC	PLCGPHERLQ	FERIDTTLTC
574	MASVVGWGP	SLHACPALVL	SNDVTIDAWC	PLCGPHERLQ	FE-----
15313	MAS-----	-----	-----	-----	-----
FLK	MASVVGWGP	SLHACPALVL	S-----	-----	-----

	60	70	80	89	99
JAP	ETHRINWTAD	GRPCGLNGTL	FPRLHVSETR	-PQGPRRLWI	NCPLPAVRAQ
BEL	ETHRITWTAD	GRPFGLNGTL	FPRLHVSETR	-PQGPRRLWI	NCPLPAVRAQ
AST	ETHRITWTAD	GRPFGLNGTL	FPRLHVSXRP	APKGPDDSGS	TAPFRPFALS
6	ETHRITWTAD	GRPF-----	-----	-----	-----

	109	119	129	139	149
FLK	PGPVSLSPFE	RSPFQPYQCQ	LPSASSDGCP	IIGHGLLPWN	NLVTHPVLGK
BEL	PGPVSLSPFE	QSPFQPYQCQ	LPSASSDGCP	IIGHGLLPWN	NLVTHPVLGK
AST	PARFHFPSS	SPPSSPTNAN	CPRPLAMVPP	SSGTAFFPGT	T**RTPSSEK

	157	167	177	187	197
JAP	VL--ILNQMA	NFSLLP SFDT	LLVDPLRLSV	FAPDTRG AIR	YLSTLLTLCP
BEL	VL--ILNQMA	NFSLLP PFDT	LLVDPLRLSV	FAPDTRG AIR	YLSTLLTLCP
AST	SLY*IRWQIS	PYS--PPSIP	SL*TPSGCPS	LPRTTRG AIR	YLSTLLTLCP
6	VL--ILNQMA	NFSLLP PFDT	LLVDPLRLSV	FAPDTRG AIR	YLSTLLTLCP
574	-----	-----	--VDPLRLSV	FAPDTRG AIR	YLSTLLTLCP
15313	-----	-----	-----	---DTRG AIR	YLSTLLTLCP
FLK	-----	-----	-----	-----	---LLTLCP
pSVN	-----	-----	----PLRLSV	FAPDTRG AIR	YLSTLLTLCP

	207	217	227	237	247
JAP	ATCILPLGEP	FSPNVPICRF	PRDSNEPPLS	EFELPPIQTP	GLSWSVPAID
BEL	VTCILPLGEP	FSPNVPICRF	PRDTSEPPPLS	EFELPLIQTP	GLSWSVPAID
AST	ATCILPLDEP	FSPNVPICRF	PRDSNEPPLS	-----	-----
6	ATCILPLGEP	FSPNVPICRF	PRDTNEPPLS	EFELLLIQ--	-----
574	ATCILPLGEP	FSPNVPICRF	PRDSNEPPLS	EFELPLIQ--	-----
15313	ATCILPLGEP	FSPNVPICRF	PRDTNEPPLS	EFELPPIQ--	-----
FLK	ATCYLPLGEP	FSPNVPICRF	PRDSNEPPLS	EFELPPIQ--	-----
pSVN	ATCILPLGEP	FSPNVPICRF	PRDSNEPPLS	EFELPLIQ--	-----

Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. sc. D. Ebner danke ich für die Möglichkeit der Bearbeitung des Themas am Institut für Virologie, Standort Mitte, des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin sowie für die allseitige Förderung meiner Arbeit.

Bei Frau Dr. Petra Blankenstein (Institut für Virologie, Standort Mitte, des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin) möchte ich mich herzlich für die allseitige Betreuung, jederzeit konstruktive fachliche Diskussion sowie wertvollen Anregungen und Hinweise zur Fertigstellung der Arbeit bedanken.

Herrn Dr. G. Sommer (ehemals Institut für Biochemie, Standort Mitte, des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin) danke ich für sein Engagement, mich mit der Methodik der Sequenzierung vertraut zu machen.

Für die Unterstützung in verschiedenen Aspekten dieser Forschungsarbeit und fachliche Diskussion bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Gunnar Mewes und Dr. Henry Fechner (ehemals Institut für Virologie, Standort Mitte, des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin).

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Erika Kinder für die gründliche und kritische Durchsicht des Manuskripts.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei allen nicht namentlich erwähnten Kollegen und Freunden, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Jana Elwert
Geburtstag: 19.04.1971
Geburtsort: Burg (bei Magdeburg)
Anschrift: Neue Schönhauser Straße 14
10179 Berlin
Familienstand: ledig

Schulbildung

1977-1987 Polytechnische Oberschule Tucheim
1987-1989 Erweiterte Oberschule Genthin

Studium

1990-1992 Humboldt Universität zu Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin
1992-1996 Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin
Februar 1996 Tierärztliche Approbation

Berufliche Tätigkeit

1989-1990 Technische Angestellte am Institut für Virologie des Fachbereichs
Veterinärmedizin, Humboldt Universität zu Berlin
seit März 1996 Akademische Mitarbeiterin der W & T GmbH, Berlin