

**Charakterisierung und Klonierung des Rezeptors
für das Murine Leukämievirus M813
aus *Mus cervicolor* (Linnaeus, 1758)**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Sibyll Hein
aus Kiel

Hamburg 2003

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. Wolfram Ostertag

Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. W.O. Abel

Tag der Disputation: 14. Februar 2003; 15 Uhr

Für meine Familie und für Karsten

Die Arbeit wurde nach den Regeln der neuen Rechtschreibung angefertigt.

1	Vorwort	10
2	Einleitung	11
2.1	Retroviren	11
2.2	Die viralen Env-Hüllproteine und deren Funktion	14
2.2.1	Die Untereinheit SU und Rezeptorerkennung durch diese Untereinheit	17
2.2.2	Die Env-Untereinheit TM	18
2.3	Klassifizierung der Retroviren	20
2.4	Rezeptorverwendung der Maus-Leukämieviren	22
2.5	Fragestellung	25
3	Material und Methoden	27
3.1	Allgemeines	27
3.2	Material Zellkultur	27
3.2.1	Zell-Linien	27
3.2.2	Kulturmedien	28
3.3	Methoden Zellkultur	28
3.3.1	Herstellung einer Verpackungszell-Linie für die transiente Expression von Vektoren mittels Kalziumphosphat-Transfektion	28
3.3.2	Titerbestimmung von virushaltigen Überständen	29
3.3.3	Infektion von Zellen mit virushaltigen Überständen	30
3.3.4	Analyse von eGFP-exprimierenden Zellen im Durchflusszytometer	31
3.3.5	Strategie der Marker- bzw. Interferenzversuche	32
3.3.6	Herstellung von Viren für Markerversuche	33
3.3.7	Markerversuche	33
3.4	Material Molekularbiologie	33
3.4.1	Wichtige Chemikalien, Lösungen, Puffer, Enzyme und Kits	33
3.4.2	Bakterienstämme	34
3.4.3	cDNA-Bank	34
3.5	Methoden Molekularbiologie	34
3.5.1	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	34

3.5.2	Großaufarbeitung von Plasmid DNA	35
3.5.3	RNA-Isolierung	35
3.5.4	Herstellung von cDNA	36
3.5.5	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	36
3.5.6	Phenolextraktion	37
3.5.7	Sequenzierung	37
3.5.8	Schneiden von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen	37
3.5.9	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen	38
3.5.10	Isolierung von DNA Fragmenten	38
3.5.11	Desoxyoligonukleotide	38
3.5.12	Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	38
3.5.13	Abspaltung von 5'-Phosphaten durch alkalische Phosphatase	40
3.5.14	Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren	41
3.5.15	Transformation von Bakterien	41
3.5.16	Einfrieren von Bakterien/Glyzerinkulturen	41
4	Ergebnisse	42
4.1	M813-MuLV kann nur Mauszellen infizieren	42
4.2	M813-MuLV weist unterschiedliche Interferenz mit anderen MuLV auf	44
4.3	Humanzellen, die mit dem ökotropen Rezeptor mCAT1 transduziert sind, werden nicht für die Infektion mit M813 empfänglich	45
4.4	M813-MuLV induziert Synzytienbildung in PA317 Zellen	48
4.4.1	M813 induziert Fusion in Zellen, die unterschiedliche MuLV freisetzen	50
4.5	Klonierung des M813-Rezeptors durch Expression einer cDNA-Bank aus Mauszellen in Humanzellen	52
4.5.1	Klonierung und Analyse von Humanzellen, die eine cDNA-Bank aus Mauszellen exprimieren	53
4.5.2	Analyse der cDNA aus einem M813-infizierbaren Klon	56
4.6	Lokalisierung des M813-MuLV Rezeptorgens mit der „Whole Genome-Radiation Hybrid Map (WG-RH) Methode“	58
4.7	M813 infiziert Humanzellen, die das Scf5a3-Gen exprimieren	60
5	Diskussion	63
5.1	M813 stellt eine neue Interferenzgruppe dar	63

5.2	Klonierung des M813-Rezeptors mit der „Whole Genome-Radiation Hybrid Map Methode“	66
5.3	Welche Gemeinsamkeiten bestehen zwischen den bisher charakterisierten MuLV-Rezeptoren und dem neu klonierten M813-Rezeptor?	68
5.4	Warum lassen sich Zellen bestimmter Spezies nicht mit M813 infizieren?	73
5.5	Warum ist M813 in der Lage, Synzytienbildung zu induzieren?	76
6	Zusammenfassung	79
	Literaturverzeichnis	81

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CA	Kapsid Protein
cDNA	komplementäre DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>env</i>	"envelope" ORF
Env	virale Glykoproteine, kodiert von <i>env</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanosin
G418	Geneticin
<i>gag</i>	"group specific antigen" ORF
Gag	virale Strukturproteine, kodiert von <i>gag</i>
eGFP	"enhanced green fluorescence protein", grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HIV	"Human Immunodeficiency Virus"
hyg [®]	Hygromycinresistenz
kb	Kilobasen
LTR	lange terminale Repetition
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
m	Milli
M	Molar
M813	M813 Maus-Leukämievirus
MA	Matrixprotein
min	Minute
MESV	"Murine Embryonic Stem cell Virus"
MMTV	"Mouse Mammary Tumor Virus"
Mo-MuLV	"Moloney Murine Leukemia Virus"
MPEV	Vektor basierend auf MPSV und MESV
MPMV	"Mason Pfizer Monkey Virus"
MPSV	"Myeloproliferatives Sarcoma Virus"
mRNA	Boten-RNA
MuLV	Maus-Leukämieviren
n	nano

NC	Nukleokapsidprotein
NaAc	Natriumacetat
neo ^R	Geneticin-Resistenz
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
ORF	"open reading frame", offener Leserahmen
PCR	"polymerase chain reaction", Polymerase Ketten Reaktion
PBS	Phosphatpuffer
<i>pol</i>	Polymerase ORF
Pol	virale Replikationsenzyme, kodiert von <i>pol</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	"rounds per minute", Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SDS	"Sodiumdodecylsulfat", Natriumdodecylsulfat
SFEV	Vektor basierend auf SFFV und MESV
SFFV	"Spleen Focus Forming Virus"
TE	Tris/EDTA
TBE	Tris Borat EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	"unit", Einheit
UV	ultraviolett
V	Volt
VSV	"Vesicular Stomatitis Virus"
w/v	Gewichts-/Volumenverhältnis
w/w	Gewichts-/Gewichtsverhältnis

1 Vorwort

Retroviren können eine Reihe von Krankheiten wie Leukämie, neurologische Erkrankungen und Krankheiten des Immunsystems hervorrufen und betreffen zahlreiche Spezies, z.B. Säuger, Vögel, Reptilien, Fische und Mollusken. Die Übertragung erfolgt entweder endogen (über die Keimbahn übertragen) oder exogen (horizontal übertragen).

Insbesondere das Verständnis der Interaktion zwischen den viralen Hüllproteinen (Env) mit bestimmten Zelloberflächenproteinen, den Rezeptoren, ist interessant, da über den Rezeptor die Infektion der Zelle vermittelt wird und so die Verbreitung der Viren stattfindet. Innerhalb der letzten Jahre konnten eine Vielzahl retroviraler Rezeptoren identifiziert werden. Auffällig ist jedoch, dass bestimmte Gruppen von Retroviren zwar unterschiedliche Rezeptoren erkennen, die Proteine an sich jedoch hinsichtlich ihrer zellulären Funktion und in ihrer Struktur sehr ähnlich sind. Beispielsweise verwenden alle aus *Mus musculus* gewonnenen Isolate natriumabhängige Transporterproteine als Rezeptoren.

In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass das wenig erforschte Maus-Leukämievirus M813 nicht dem herkömmlichen ökotropen Wirtsspektrum entspricht und einen neuen, unbekannten Rezeptor für den Eintritt in die Zelle verwendet. Ich konnte zeigen, dass sich das Gen für den Rezeptor auf Chromosom 16 befindet und dass M813 den "Sodium Myo-Inositol Transporter" (SMIT1) als Rezeptor in Mauszellen verwendet.

2 Einleitung

2.1 Retroviren

Retroviren wurden ursprünglich als Ursache für Leukämie und Karzinome in Hühnern identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass retrovirale Onkogene in der Lage sind, Zellen zu transformieren und Tumore zu erzeugen (Überblick in: Ostertag et al., 1987; Jonkers und Berns, 1996). Weiterhin können Retroviren neurologische Erkrankungen verursachen. Münk et al. zeigte, dass amphotrope Maus-Leukämieviren eine langsam verlaufende, neurodegenerative Störung des Zentralnervensystems verursachen können (spongiforme Enzephalopathie) (Münk et al., 1997; 1998). Zudem vermögen Retroviren, z.B. das Immundefizienzvirus des Menschen (HIV) Krankheiten des Immunsystems hervor zu rufen (Überblick in: Fauci und Desrosiers, 1996). Retroviren sind aber nicht nur im Hinblick auf ihre pathogene Rolle interessant. Der Replikationszyklus der Retroviren bringt entscheidende Vorteile mit sich, da sie stabil und kolinear in das Genom der Zelle integriert werden. Daher sind sie für den Einsatz als genetische Vektoren in der Gentherapie (Überblick in: Stocking et al., 1993; Baum et al., 2002) und für die molekulare Grundlagenforschung besonders attraktiv.

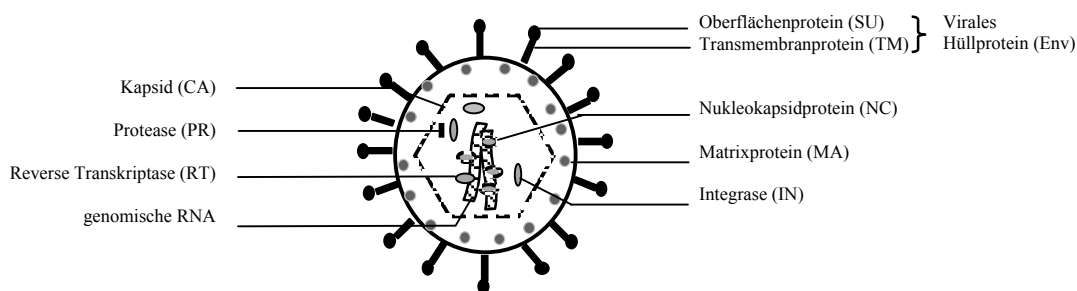


Abb. 1: Retroviren sind Viren, die zwei identische genomische RNA-Moleküle enthalten. Sie sind von einer Membran umhüllt, in die retrovirale Hüllproteine (Env) integriert sind. Die genomische RNA ist mit der Reversen Transkriptase assoziiert und mit Nukleokapsidproteinen bedeckt. Weiterhin befinden sich im Virion die tRNA, die Integrase und die Protease.

Retroviren sind membranumhüllte Viren mit einem Durchmesser von 80 bis 120 nm (s. Abb. 1). Ihr Genom besteht aus zwei identischen Kopien einer einzelsträngigen Plus-Strang RNA, die sich zusammen mit den zur Replikation notwendigen Enzymen in

einem Nukleokapsid befinden. Das Nukleokapsid ist von einer Lipidmembran umgeben, in die virale Env-Glykoproteine integriert sind. Die Bindung an den Rezeptor findet über das Env-Oberflächenprotein SU statt. Durch die Bindung von SU an den Rezeptor erfolgt eine Konformationsänderung des Env-Proteins, was zur Fusion von Virus- und Zellmembran führt (genauer unter Abschn. 2.2). Anschließend wird das Kapsid mit dem Virusgenom in das Zytoplasma freigesetzt (s. Abb. 2).

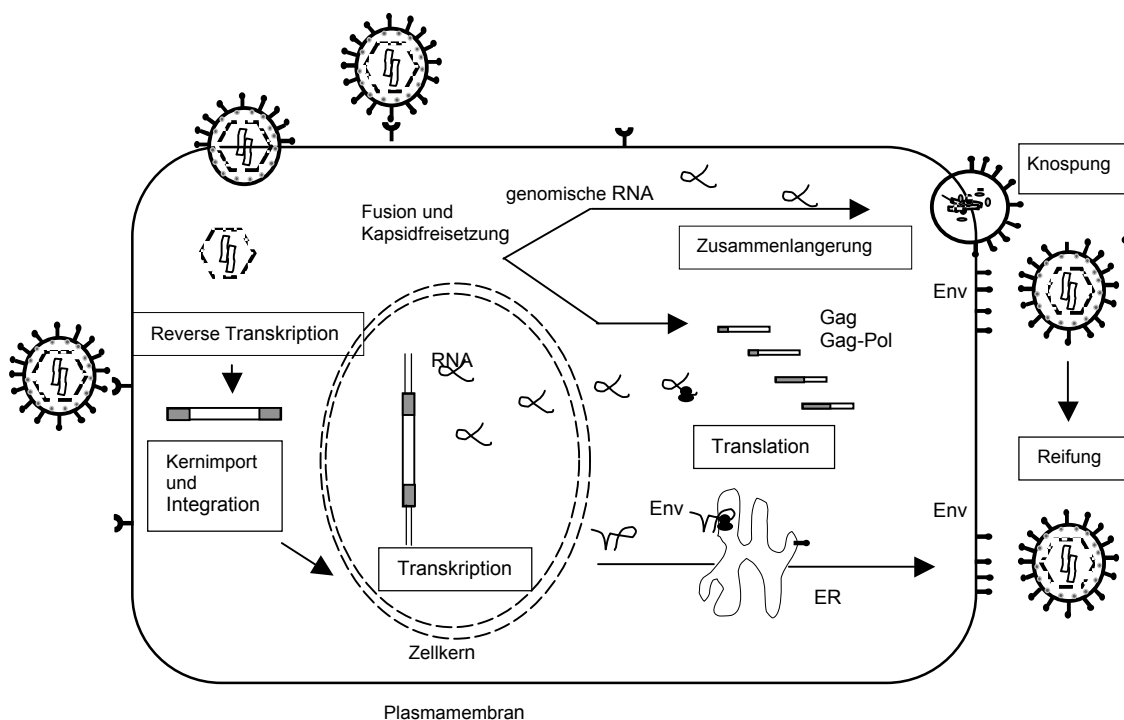


Abb. 2: Schematische Darstellung des retroviralen Replikationszyklus (C-Typ Morphogenese), Erklärungen im Text.

Innerhalb des Kapsids wird durch das virale Enzym Reverse Transkriptase (RT) die virale RNA in eine doppelsträngige DNA umgeschrieben, wobei nur eine der beiden RNA-Moleküle für die normale Transkription notwendig ist. Während der Transkription kann es zu Rekombinationen zwischen den beiden viralen RNA-Molekülen kommen. Nach der Synthese wird die doppelsträngige lineare DNA in Form eines Nukleo-Protein Komplexes (Prä-Integrationskomplex) während der Mitose nach Auflösung der Kernmembran zur chromosomalen DNA der Wirtszelle transportiert und anschließend durch die virale Integrase (IN) ins zelluläre Genom integriert. Der Prä-Integrationskomplex der Lentiviren kann unabhängig von der Mitose mit Hilfe eines

viralen Proteins in den Zellkern gelangen und daher ruhende Zellen infizieren. Die Integration in das Wirtsgenom erfolgt zufällig und ohne Bevorzugung bestimmter Integrationsstellen. Derart ins Genom integrierte DNA bezeichnet man als Provirus.

Die Transkription des integrierten Provirus erfolgt durch die wirtseigene Polymerase II. Alle Proviren besitzen mindestens drei offene Leserahmen (ORF) *gag*, *pol* und *env*, die für die Strukturproteine Gag (Matrix: MA; Kapsid: CA und Nukleokapsid: NC), die viralen Enzyme Pol (Reverse Tanskriptase: RT; Integrase: IN und Protease: PR) und die Glykoproteine Env (Oberflächenprotein: SU und Transmembranprotein: TM) kodieren. Dieser Aufbau stellt den Grundbauplan einfacher Retroviren dar. Komplexe Retroviren, z.B. die Lentiviren, enthalten zusätzliche akzessorische Gene, die für die Regulation der Virusvermehrung benötigt werden.

Die Transkription der proviralen DNA in mRNAs und deren Translation leitet die zweite Phase der Virusreplikation ein. Proviren produzieren ungespleißte und gespleißte RNA. Erstere wird in Virionen als genomische RNA verpackt. Die mRNA für das Gag und Gag-Pol Polyprotein ist auch ungespleißt. Im Gegensatz dazu werden die Env-Polyproteine von gespleißter RNA translatiert.

Ungespleißte Transkripte entstehen zum einen durch das Zusammenwirken von *cis*-aktiven viralen Sequenzen mit zellulären Faktoren. Zum anderen sind die retroviralen Spleißsignale schwach, sodass die Effizienz des Spleißens nicht besonders hoch ist. Die mRNA-Spleißsignale werden von uns im Labor genauer untersucht (Kraunus, Baum und Ostertag, noch unveröffentlicht).

Die Strukturproteine werden als Gag-Polyprotein translatiert und die viralen Enzyme entstehen als Domänen des Gag-Pol Polyproteins. Die Expression von Pol unterscheidet sich bei den unterschiedlichen Gruppen der Retroviren. Bei den Maus-Leukämieviren (MuLV) wird bei fünf bis zehn Prozent der Translationvorgänge von *gag* das Stopkodon überlesen, sodass ein Gag-Pol Polyprotein entsteht. Bei den Lentiviren wird das Gag-Pol Polyprotein durch einen ribosomalen Leserasterwechsel gebildet. Nachfolgend wird das Env-Protein als Vorläuferprotein an membranständigen Ribosomen am rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und nach Glykosylierung über ER und Golgi-Apparat zur Zellmembran transportiert.

Nach der Zusammenlagerung der Strukturproteine zu einem Viruspartikel und der gleichzeitigen Verpackung der genomischen RNA, wird das Virus in der Regel an der

Zellmembran, zusammen mit den dort eingelagerten Env-Hüllproteinen, freigesetzt (Knospung), sodass die Kapside eine Doppellipidmembran erwerben. Der virale Replikationszyklus wird durch die Reifung (Maturation) zu infektiösen Partikeln außerhalb der Zelle beendet.

Während der Reifung erfolgt die proteolytische Spaltung der Gag und Gag-Pol Polyproteine in die Strukturproteine MA, CA und NC durch die virale Protease (PR), die selbst als Teil des Polyproteins exprimiert wird. Die Autoaktivierung der Protease findet während des Knospungsvorgangs an der Zellmembran statt. Die Prozessierung führt zu einer Konformationsänderung der inneren Strukturproteine zu einem kondensierten Kapsid im Inneren des Virus. Im reifen Virus befindet sich MA an der Innenseite der Membranhülle und CA bildet das Kapsid als innere Proteinhülle. Die genomische RNA bildet zusammen mit dem NC-Protein den Ribonukleoproteinkomplex, weiterhin sind die Reverse Transkriptase, die Integrase sowie weitere virale oder auch zelluläre Proteine enthalten (zusammengefasst aus Vogt, 1996).

2.2 Die viralen Env-Hüllproteine und deren Funktion

Der Eintritt der Retroviren in die Zelle wird über bestimmte Zelloberflächenproteine, sogenannte Rezeptoren, vermittelt. Zu Beginn der Infektion bindet das virale Oberflächenprotein Env an den Rezeptor auf der Zelloberfläche. Dieser Vorgang ist sehr spezifisch und kleine molekulare Änderungen des Rezeptors, z.B. infolge von Mutationen, können dazu führen, dass der Rezeptor nicht mehr gebunden werden kann.

Retrovirale Env-Proteine bestehen aus zwei Untereinheiten, einem Oberflächenprotein SU und einem Transmembranprotein TM. SU vermittelt die Bindung an den passenden Rezeptor, TM ist für die Verankerung von Env in der Membran und für die Membranfusion der viralen und der zellulären Membran erforderlich. Beide Einheiten sind miteinander verbunden (s. Abb. 3 und 4). Anlagerung von SU an den Rezeptor bewirkt eine Konformationsänderung des Env-Proteins und aufgrund dieser strukturellen Umlagerung kommt es zur Fusion der Membranen (Jones und Risser, 1993; Nussbaum et al., 1993; Peredo et al. 1996). Der Vorgang der Fusionierung ist für alle MuLV pH-unabhängig. Für das Moloney Maus-Leukämievirus (Mo-MuLV) gibt es

jedoch auch Berichte, die - abhängig vom Zelltyp - eine pH-abhängige endozytotische Fusion vermuten lassen (Lee et al., 1999; Katen et al., 2001).

Beim Immundefizienzvirus des Menschen (HIV) wird die Fusion der Membranen über einen zweiten Rezeptor (CXCR4 oder CCR5) vermittelt. Dieser dient als Kofaktor für den Eintritt in die Zelle, indem Teile des viralen Glykoproteins an den Korezeptor binden und dadurch die Fusion der Membranen vermitteln (Deng et al., 1996; Feng et al., 1996).

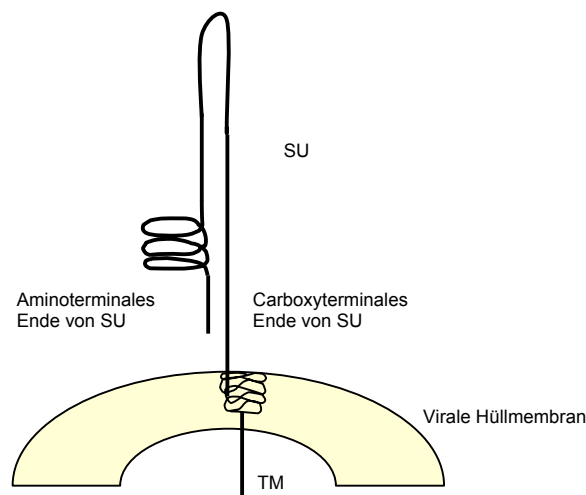


Abb. 3: Die Abbildung zeigt ein schematisches Modell des Env-Proteins mit dem Oberflächenprotein SU und dem Transmembranprotein TM. Diese Einheit lagert sich zu Trimeren zusammen.

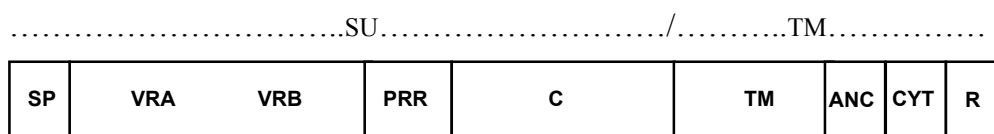


Abb. 4: Das Env-Hüllprotein: SP: Signalpeptid; VRA: variable Region A; VRB: variable Region B; PRR: prolinreiche Region; C: carboxyterminale Domäne; TM: transmembraner Teil; Anc: Verankerung ("anchor"); Cyt: cytoplasmatischer Bereich, R: R-Peptid

Der Grundbauplan der viralen Hüllproteine ist bei allen Retroviren sehr ähnlich. Die vom *env* Gen kodierten Proteine werden als glykosyliertes Vorläuferprotein anhand von gespleißter subgenomischer RNA synthetisiert und anschließend prozessiert. Die Translation wird an freien Ribosomen initiiert. Wie bei zellulären Proteinen, die für die Sekretion bestimmt sind, bindet das Env-Vorläuferprotein über ein aminoterminal

Leitpeptid an ein Signal-Erkennungspeptid. Dadurch assoziiert das Protein mit der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und gelangt nachfolgend in das Lumen des ERs. Innerhalb des ERs erfolgt die Oligomerisierung zu trimerähnlichen Strukturen, wie sie ähnlich auch im Virion zu finden sind. Dieser Zusammenschluss scheint wichtig zu sein, da mutierte Hüllproteine, die keine trimerähnlichen Strukturen ausbilden können, nicht durch das ER transportiert werden (Einfeld und Hunter, 1988; Hunter und Swanstrom, 1990). Der Hüllprotein-Komplex wird durch Disulfidbrücken und nicht-kovalente Bindungen zusammengehalten. Diese sind elementar für die Reifung und den Transport des Glykoproteins innerhalb des ERs (Pinter et al., 1983; Morgan et al., 1993; Pinter et al., 1997; Ikeda et al., 2000). Für die Disulfidbindungen konnten konservierte Sequenzmotive gefunden werden, die sich am C-terminalen Ende von SU und einer CX₆CC-Sequenz von TM befinden (Pinter et al., 1997; Bachrach et al., 2000). Während des Transports durch den Golgi-Apparat wird das Env-Protein von einer zellulären Protease (Furin oder ähnlicher Protease) in das glykosylierte Oberflächenprotein SU und die nicht glykosylierte Transmembranprotein TM gespalten (Einfeld und Hunter, 1988; Überblick in Doms et al., 1993; Einfeld, 1996).

Manche Env-Proteine weisen sehr viele potenzielle Glykosylierungsstellen auf, die Anzahl und Position der Glykosylierungsstellen variiert jedoch innerhalb der unterschiedlichen Retroviren: während das Hüllprotein von HIV über etwa 30 Glykosylierungsstellen verfügt (Li et al., 1997), weisen die entsprechenden Proteine der Maus-Leukämieviren (MuLV) nur sechs bis acht Stellen auf (Felkner und Roth, 1992). Einige der Zucker werden allerdings sofort nach der Glykosylierung durch zelluläre Enzyme wieder entfernt. Die verbleibenden Zucker scheinen eine wichtige Rolle im Hinblick auf die korrekte Zusammenfaltung und den Transport der Env-Proteine zu haben, da in Zellen, die mit Tunikamycin (einem Inhibitor der Glykosylierung) behandelt wurden, unglykosylierte Proteine entstehen, die im Lumen des ERs verbleiben (Pinter et al., 1984; Felkner und Roth, 1992; Battini et al. 1994; Li et al., 1997). Für Friend-MuLV konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass die Zuckerreste eine entscheidende Rolle bei der Erkennung des Rezeptors spielen (Battini et al., 1994).

Für die Bindung an den virusspezifischen Rezeptor sind in erster Linie die VRA und VRB erforderlich (Battini et al., 1992; Morgan et al., 1993; Battini et al. 1995; MacKrell et al. 1996). Durch Austausch von VRA und/oder VRB zwischen Hüllproteinen unterschiedlicher MuLV-Untergruppen konnte gezeigt werden, dass VRA eine entscheidende und dominierende Rolle im Hinblick auf die Rezeptorerkennung spielt. Bei ökotropen Viren führen Mutationen in diesem Bereich zu einer starken Beeinträchtigung der Rezeptorbindung (Heard und Danos, 1991; Battini et al., 1992; Battini et al., 1994; MacKrell et al., 1996; Peredo et al., 1996; Bae et al., 1997). Versuche für Mo-MuLV mit chimären Proteinen konnten belegen, dass eine sehr kleine Sequenz von aminoterminalen Aminosäuren des Env-Gens (AS 81 bis 88) für die Bindung an den ökotropen Rezeptor ausreichend ist und die Infektion erfolgreich vermitteln kann, die Effizienz ist dabei allerdings verringert. Diese Aminosäuren scheinen eine zentrale Rolle zu spielen (MacKrell et al., 1996). Im Gegensatz dazu scheint die VRB eine eher akzessorische Funktion zu haben (Battini et al., 1992).

Bei anderen MuLV sind noch weitere Aminosäurereste und Sequenzen stromabwärts der aminoterminalen Domäne für die Anlagerung an den Rezeptor notwendig (Wu et al., 1998). Für 10A1 wurde gezeigt, dass die prolinreiche Region eine entscheidende Rolle spielt und für die Bindung an den Rezeptor benötigt wird. Gleiches konnte für xenotrope und polytrope Hüllproteine beobachtet werden (Battini et al., 1995). Weiterhin vermittelt die PRR die Konformationsänderung im Env-Protein und die Aktivierung der Fusionskapazität (Lavillette et al., 1998).

2.2.2 Die Env-Untereinheit TM

TM ist ein integrales Protein, das sich aus drei unterschiedlichen Bereichen zusammensetzt: der extrazellulären, der membrandurchspannenden und der zytoplasmatischen Domäne (s. Abb. 4). Eine Reihe von Studien mit verschiedenen Retroviren hat gezeigt, dass die N-terminale extrazelluläre Domäne für die Verankerung mit SU, die Oligomerisierung des Env-Hüllproteins und die Membranfusion verantwortlich ist (Einfeld et al., 1988; Rein et al., 1994; Andersen, 1994). Normalerweise ist TM an mehreren Stellen glykosyliert, in einigen Retroviren, z. B. MuLV, ist das jedoch nicht der Fall.

Kurz nach der Virionbildung wird vom carboxyterminalen Teil ein aus 16 Aminosäuren bestehendes Peptid abgespalten (das sogenannte R-Peptid, s. Abb. 4). Erst die Abspaltung des Peptids bewirkt, dass TM die Fusion der Virus- mit der Zellmembran vermitteln kann (Ragheb et al., 1994a/b; Rein et al., 1994; Ragheb et al., 1995; Januszeski et al., 1997; Bae et al., 1997). Sowohl die unprozessierte Form von TM als auch das prozessierte Protein koexistieren im ausgereiften Virion (Green et al., 1981; Zhao et al., 1997), die Prozessierung beginnt jedoch erst nach der Virionbildung (Ragheb et al., 1995). Im carboxyterminalen Bereich von TM befinden sich weitere Determinanten, die die Fusion beeinflussen (Lavillette et al., 1998) und Mutationen im N-terminalen Bereich von TM können die Fusionskapazität vollständig blockieren (Ragheb et al., 1995; Li et al., 1996). Das C-terminale Ende weist eine stab- oder stangenförmige Struktur auf, die stark α -helikal und sehr stabil zu sein scheint, da sie erst bei sehr hohen Temperaturen schmilzt. Die Strukturen lagern sich zu Trimeren zusammen, in denen der N-terminale zentrale Teil von antiparallelen Helices umgeben ist, sodass deren C-terminale Enden mit deren N-terminalen Bereichen „Kopf-an-Kopf“ liegen. Auf diese Weise werden die zu fusionierenden Membranen quasi neben einander gestellt und dadurch sehr nahe zusammengebracht. Für einige Viren, u.a. Mo-MuLV, SIV und HIV konnten diese Strukturen direkt nachgewiesen werden (Skehel et al., 1998).

2.3 Klassifizierung der Retroviren

Retroviren werden nach ihrer Genomorganisation, ihrer Morphologie und ihrem Replikationszyklus in sieben Gattungen eingeteilt (Coffin et al. 1996; s. auch <http://nih.gov/ICTV>) (s. Tab. 1):

Tab.1: Die unterschiedlichen Gattungen der Retroviren und ihre Vertreter (exemplarisch)

Gattungen		Beispiel für Viren dieser Gattung
Neue Bezeichnung nach ICTV** (von 1998)	Einteilung nach Coffin	
□-Retroviren	Vogel C-Typ Viren	Vogel Leukosevirus (ALV)
□-Retroviren	Säuger B-Typ Viren D-Typ Viren	Maus Mammary Tumor Virus (MMTV) Mason Pfizer Monkey Virus (MPMV)
□-Retroviren	- Säuger C-Typ Viren - Reptilien C-Typ Viren - Retikuloendotheliose Viren	Maus-Leukämieviren (MuLV) Viper-Retrovirus Milz-Nekrose Virus (SNV)
□-Retroviren	BLV-HTLV Retroviren	T-Zell Leukämievirus 1 des Menschen (HTLV-1)
□-Retroviren	Fisch	Walauge-Dermal-Sarkoma Virus (WDSV)
Spumaviren	Spumaviren	Affen-Foamyvirus (SFV)
Lentiviren	Lentiviren des Menschen: Lentiviren der Tiere:	Immundefizienzvirus des Menschen (HIV) Rinder-Immundefizienzvirus (BIV) Pferde-Immundefizienzvirus (EIAV) Katzen-Immundefizienzvirus (FIV) Affen-Immundefizienzvirus (SIV) Visna/Maedi-Virus der Schafe

** ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses

Entsprechend der Morphologie ihrer Partikel werden die Retroviren als Säuger B-Typ, Vogel und Säuger C-Typ und D-Typ Viren klassifiziert:

- B-Typ Retroviren bilden unreife, sphärische Kapside im Zytoplasma, die anschließend an die Plasmamembran transportiert und dort freigesetzt werden. Sie besitzen ein einfaches Genom mit offenem Leserahmen für *gag*, *pro*, *pol* und *env*. Der einzige infektiöse Vertreter dieser Gruppe ist das Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV).

- Bei den C-Typ Retroviren assoziieren die Strukturproteine direkt an der Zellmembran, und die unreifen, sphärischen Kapside bilden sich erst während der Reifung. Die dem C-Typ zugeordneten Viren bilden eine heterogene Gruppe, zu der sowohl einfache als auch komplexe Retroviren gehören. Ein Vertreter des C-Typs mit einfachem Genom ist das Moloney Maus-Leukämievirus (Mo-MuLV). Auch die komplexen Lentiviren weisen C-Typ Morphogenese auf.
- D-Typ Retroviren sind den B-Typ Retroviren relativ nah verwandt und bilden ebenfalls unreife, sphärische Kapside im Zytoplasma, die über die Plasmamembran freigesetzt werden. Als einfache Retroviren enthalten sie nur den offenen Leserahmen für *gag*, *pro*, *pol* und *env*. Ein typischer Vertreter dieser Gruppe ist das Mason Pfizer Monkey Virus (MPMV).

Weiterhin konnten Retroviren aus Fischen (Epsilonretroviren) und Mollusken isoliert werden. Da letztere jedoch bisher nur wenig untersucht worden sind, ist ihre systematische Stellung innerhalb des Systems noch weitgehend ungeklärt (Poulet et al., 1994).

Exogene Retroviren werden horizontal übertragen. Sie treten nur in denjenigen Zellen eines Individuums auf, die die Virusaufnahme und Replikation zulassen. Ihr Genom ist vollständig, d.h. es liegen keine Genomdefekte vor und können infektiöse Partikel bilden.

Als *endogen* bezeichnet man Retroviren, die über die Keimbahn übertragen werden. Sie sind ein integraler Bestandteil des Genoms. Es wird allgemein angenommen, dass exogene Vorfahren der endogenen Retroviren im Laufe der Evolution in die Zellen der Keimbahn integrierten und seither zusammen mit dem Genom replizieren. Diese Viren weisen in ihrem Genom häufig Deletionen und/oder Punktmutationen auf. Aufgrund der Defekte im Genom kommt es meistens nicht zur Bildung von infektiösen Viruspartikeln, obwohl manche Sequenzen gewebe- und entwicklungsabhängig exprimiert werden. Die endogenen retroviralen Elemente unterscheiden sich zwar in Bezug auf die Integrationsstelle, hinsichtlich der Sequenz zeigen sie aber ein großes Maß an Übereinstimmung (zusammengefasst aus Boeke und Stoye, 1996).

2.4 Rezeptorverwendung der Maus-Leukämieviren

Maus-Leukämieviren (MuLV) können basierend auf ihrer Sequenzhomologie in zwei unterschiedliche Gruppen, CI und CII, eingeteilt werden. Typ CI Viren konnten aus *Mus caroli*, *Mus cervicolor* und *Mus dunni* isoliert werden. Sie sind mit C-Typ Viren aus Woolley-Affen und Gibbon-Affen verwandt (Benveniste et. al, 1977; Wolgamot et al., 1998). Typ CII Viren sind in Wild- und Labormausstämmen von *Mus musculus* endogen verbreitet, zudem in einigen anderen Wildmausspezies (Benveniste et al., 1997; Tomonaga und Coffin, 1999). CII Viren werden weiterhin entsprechend ihrer Rezeptorbenutzung in unterschiedliche Gruppen eingeteilt (s.u.).

Interferenzversuche werden klassischerweise benutzt, um die Verwendung von Rezeptoren durch entsprechende Viren zu charakterisieren. Diese Versuche basieren auf dem Prinzip der Interferenz: Zellen, die bereits retroviral infiziert sind, sind resistent gegenüber Superinfektion mit Retroviren, die den gleichen Rezeptor verwenden. Dagegen bleibt die Infektion mit Retroviren, die einen anderen Rezeptor benutzen, unbeeinflusst. Interferenz kann auf unterschiedlichem Wege entstehen. Der Rezeptor kann z.B. durch Env-Glykoproteine besetzt werden. Die Blockierung des Rezeptors kommt durch eine direkte Wechselwirkung zwischen Env und dem Rezeptor zustande. Delwart und Panganiban konnten für das Retikuloendotheliosevirus (REV) zeigen, dass die Anlagerung von Env an den Rezeptor schon im ER stattfinden kann und dass dadurch der Transport des Rezeptors zur Zelloberfläche verhindert wird (Delwart und Panganiban, 1989), sodass die Blockierung des Rezeptors schon während des sekretorischen Weges entsteht. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass die Env-Proteine ihren Rezeptor erst an der Zelloberfläche binden und dadurch den Rezeptor belegen. Interferenz kann *in vivo* Auswirkungen auf die Verbreitung exogener Viren haben, da die Blockierung des Rezeptors durch endogene virale Env-Proteine Infektion mit exogenen Viren verhindert.

Die bisher charakterisierten Rezeptoren zeichnen sich dadurch aus, dass sie die Zellmembran mehrfach durchspannen und an natriumabhängigen Transportprozessen beteiligt sind.

Isolate aus *Mus musculus*:

Ökotrope Retroviren kommen sowohl exogen als auch endogen vor. Sie verwenden den Aminosäuretransporter CAT als Rezeptor. Es gibt drei Homologe des Rezeptors in Säugern, wobei ökotrope Viren nur das mCAT1-Protein von Maus und Ratte erkennen können und, jedoch mit wesentlich geringerer Affinität, den CAT3 Rezeptor, der in Gehirnzellen exprimiert wird. Der CAT2 Rezeptor und CAT-Homologe anderer Spezies werden nicht erkannt (Kavanaugh et al., 1994a; Masuda et al., 1999). In Zellen, die mit ökotropen Viren infiziert sind, bleibt die Funktion des Transporters erhalten.

Amphotrope exogene Retroviren nutzen den Phosphattransporter Pit-2 (Kavanaugh et al., 1994b) als Rezeptor. Ein typischer Vertreter eines amphotropen Virus ist 4070A. In Zellen, die mit amphotropen MuLV infiziert sind und die Pit-2 als Rezeptor benutzen, wird die Transporteraktivität des Phosphat-Transporters reduziert. Die Reduktion der Aktivität des Phosphat-Transporters hat indes keine Auswirkungen auf den Zellmetabolismus und damit auf das Überleben der Zelle, da der Aktivitätsverlust kompensiert werden kann und die Phosphataufnahme auf anderem Wege gewährleistet wird (Kavanaugh et al. 1994b; Overbaugh et al., 2001b).

Das 10A1 Maus-Leukämievirus stellt ein Rekombinationsprodukt aus amphotropem 1504A-MuLV und endogenen MuLV Sequenzen dar (Rasheed et al., 1982; Ott et al., 1990). 10A1 nutzt zusätzlich zu Pit-2 auch den ähnlichen Phosphattransporter Pit-1 als Rezeptor (Miller und Miller, 1994; Wilson et al., 1994). Letzterer wird jedoch mit geringerer Präferenz verwendet.

Der von xenotropen und polytropen Retroviren verwendete Rezeptor (Xpr1) weist vermutlich auch Phosphattransportaktivität auf und wird in vielen Spezies exprimiert, er kann jedoch nicht in allen Zellen als Rezeptor genutzt werden. Das Protein ist eng mit dem Syg1-Protein aus Hefe verwandt, dessen Funktion bisher nicht bekannt ist (Tailor et al., 1999). Ob Zellen bestimmter Spezies mit diesen Viren infizierbar oder resistent sind, wird über orthologe Varianten des Xpr1 Proteins bestimmt (Marin et al., 1999). Xenotrope Viren, z.B. das New Zealand Black MuLV, können nur den Xpr1-Rezeptor von Mensch und einigen Wildmäusen erkennen. In Labormäusen wird kein funktioneller Xpr1-Rezeptor exprimiert, sodass diese Zellen nicht mit xenotropen Viren infiziert werden können. Polytrope Retroviren entstehen in ökotrop infizierten Mäusen durch Rekombination zwischen dem exogenen Virus und endogenen MuLV Sequenzen

(sogenanntes Nerz-Zellfokus bildendes Virus: „Mink-Cell Focus Forming Virus“, MCF). MCF-Viren enthalten daher rekombinante Env-Gene, die die Nutzung des polytropen Rezeptors erlauben. Polytrope Viren können den Xpr1-Rezeptor von Maus und Mensch erkennen.

Andere Isolate:

Das aus *Mus dunni* isolierte *Mus dunni* endogene Virus (MDEV) definiert eine eigene, bisher noch nicht beschriebene Interferenzgruppe mit sehr breitem Wirtsspektrum (Bonham et al., 1997). MDEV zeigt keine Interferenz mit den bisher bekannten MuLV oder mit anderen Retroviren, wie z.B. dem Gibbon-Affen Leukemievirus (GALV) (Wolgamot et. al., 1998). Der Rezeptor wurde bisher noch nicht kloniert.

Isolate aus *Mus cervicolor*: Es konnten bisher zwei unterschiedliche endogene Retroviren (CI und CII) identifiziert werden. CI weist ein klassisches xenotropes Wirtsspektrum auf, d.h. dieses Isolat infiziert Zellen aus Wildmäusen und Säugern, Zellen aus Labormäusen können nicht mit CI infiziert werden. Das Isolat ist eng mit Viren, die aus *Mus caroli* isoliert wurden, verwandt. Das Wirtsspektrum des CII-Isolats M813 beschränkt sich auf Zellen aus *M. musculus*. Rattenzellen sind nur schlecht und Humanzellen nicht mit M813 infizierbar (Benveniste et al., 1977). M813 weist Ähnlichkeiten mit ökotropen MuLV auf und man vermutet, dass der Rezeptor für M813 auf Chromosom 2 lokalisiert ist (Rapp und Marshall, 1980). Im Gegensatz dazu befindet sich das Gen für den ökotropen Rezeptor mCAT1 auf Chromosom 5 (Kim et al., 1991; Wang et al., 1991). Da sich das Gen für Pit-1 auch auf Chromosom 2 befindet, besteht die Möglichkeit, dass M813 den gleichen Rezeptor wie 10A1 verwenden kann (Adamson et al., 1991). Es wurden bisher jedoch keine Interferenzversuche durchgeführt um zu klären, ob M813 einen schon bekannten oder einen neuen Rezeptor für die Infektion verwenden kann.

Tab. 2: Klassifizierung der Maus-Leukämieviren basierend auf der Rezeptorverwendung oder Homologie

Spezies und Interferenzgruppe	Vertreter	Rezeptor	Chromosomenlokalisierung ^a	
			Maus	Human
<i>Mus musculus</i>				
Ökotrop	Mo-	mCAT	5	13 ^b
Xenotrop	MuLV	1	1 ^c	1
Polytrop	NZB-	Syg1	1	1
Amphotrop	MuLV	Syg1	8	8
10A1	Mo-	Pit2	2, 8	2, 8
	MCFV	Pit2,		
	4070A	Pit1		
	10A1			
<i>Mus dunni</i>				
Multitrop	MDEV	Unbekannt	-	-
<i>Mus cervicolor</i>				
CI	CERV	Unbekannt	-	-
CII	CI	annt	2	-
	M813	Unbekannt		
<i>Mus caroli</i>				
CI	CARO	Unbekannt	-	-
	CI	annt		

^a Chromosomenlokalisierung des Rezeptorgens^b homologes Gen in Humanzellen; das Genprodukt kann von ökotropen Mäusen nicht als Rezeptor verwendet werden^c das Allel des Gens von Labormäusen kodiert für ein Protein, das von xenotropen MuLV nicht erkannt wird

2.5 Fragestellung

Die Infektion mit Retroviren kann Krankheiten des Immunsystems und Krebs in verschiedenen Spezies verursachen. Die Bindung des viralen Hüllproteins Env an seinen Rezeptor stellt den ersten entscheidenden Schritt bei der Infektion mit Retroviren dar. Weiterhin lassen sich oftmals evolutionäre Veränderungen bezüglich der Wechselwirkungen zwischen Virus und Rezeptor nachvollziehen.

Ähnlich wie ökotrope MuLV, die aus *M. musculus* isoliert wurden, stellt M813 wahrscheinlich ein relativ neues rekombinantes Virus dar. Die Annahme wird durch die Tatsache unterstützt, dass M813 endogen in *M. cervicolor*, aber nicht in anderen Spezies, wie z.B. *M. musculus*, vorkommt und steht im Gegensatz zur weiten Verbreitung von xenotropen und polytropen Viren (Kozak und O'Neil, 1987).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob M813 einen bereits charakterisierten MuLV-Rezeptor oder einen eigenen neuen Rezeptor für die Infektion verwendet. Bei früheren Versuchen wurde beobachtet, dass M813 ein hohes Fusions-

potenzial aufweist und die Bildung von Synzytien induzieren kann. Es sollte geklärt werden, unter welchen Bedingungen das Virus die Bildung vielkerniger Riesenzellen induzieren kann. Zudem sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Fähigkeit zur Synzytienbildung nur durch das M813 Hüllprotein vermittelt wird oder ob weitere virale Determinanten anderer MuLV eine Rolle bei der Fusion der Zellen spielen.

Der Rezeptor für M813 sollte mit Hilfe einer cDNA aus Mauszellen oder über die Lokalisierung des Rezeptorgens kloniert werden. Anschließend sollte der Rezeptor mit bereits bekannten MuLV-Rezeptoren auf eventuelle strukturelle und/oder funktionelle Gemeinsamkeiten hin verglichen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Allgemeines

Die meisten der verwendeten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad „zur Analyse“ und wurden hauptsächlich von folgenden Lieferanten bezogen: Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Pharmacia (Freiburg i.B.), Roth (Karlsruhe), Riedel-de-Haen (Seelze) und Boehringer Mannheim (Mannheim).

Plastikwaren kamen von den Firmen Greiner (Nürtingen), Becton-Dickinson (Heidelberg) und Eppendorf (Hamburg). Verwendete Gerätschaften wie Zentrifugen, Inkubatoren, Schüttler, Elektrophoresekammern, Pipetten, Pipettierhilfen etc. stammten von verschiedenen Firmen. Alle Arbeiten mit Zellen und rekombinanter DNA wurden in entsprechend zugelassenen Laboratorien durchgeführt. Zur besseren Standardisierung einzelner Arbeiten wurden kommerziell erhältliche Fertigkits verwendet.

3.2 Material Zellkultur

3.2.1 Zell-Linien

CHO	Zellen, die aus Ovarien des chinesischen Hamsters gewonnen wurde (ATCC Nr. CCL-61)
MS-5	Stromazell-Linie aus Maus-Knochenmark (Itho et al., 1989)
Phönix-Ampho:	Transiente amphotrope Verpackungszell-Line auf Basis von 293T-Zellen (Humanepithelzellen aus der Niere), die sich gut über Kalciumposphat Transfektion transfizieren lässt (http://www.stanford.edu/group/nolan/NL-phoenix.html)
SC1:	Fibroblastenzell-Linie mit größerer Sensitivität gegenüber den meisten Mause-tropischen MuLV-Stämmen als andere Mauszell-Linien (Hartley und Rowe, 1975; ATCC Nr. CRL-1404)
T31 WG-RH	Hamster-Maus Hybridzell-Linie, die verschiedene Anteile an Maus-Chromosomen (durchschnittlich 31% pro Hybridzelle) enthält (McCarthy et al., 1997)
TE 671:	Zell-Linie, die vom Medullablastom des Menschen abstammt (ATCC CRL-8805)

3.2.2 Kulturmedien

Kulturmedium für SC1:

Minimal Essential Medium (MEM), Sigma Cell Culture™, München

Zugabe von :

Fötalem Kälberserum	10%
Glutamin 200 mM	2% (4 mM)
Natriumpyruvat	1% (1 mM)
pH 7,9 %	

Kulturmedium für TE 671, CHO und Phönixzellen:

Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM), Gibco, Eggenstein

Zugabe von:

Fötalem Kälberserum	10%
Glutamin 200 mM	2% (4 mM)
Natriumpyruvat	1% (1mM)
NaHCO ₃ (stock 7,5% w/v)	5%
pH 7,9 %	

3.3 Methoden Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit.

3.3.1 Herstellung einer Verpackungszell-Linie für die transiente Expression von Vektoren mittels Kalziumphosphat-Transfektion

Für die transiente Produktion von virushaltigen Überständen mit VSV-G/ampho-env Pseudotypen wurde die Verpackungszell-Linie Phönix-ampho verwendet. Der Vorteil der transienten Virenexpression liegt in der einfachen und schnellen Handhabung, sowie der Herstellung von zumeist hochtitrigen Überständen. Aufgrund der fusogenen Eigenschaft (Synzytienbildung) ist das VSV-G Protein zelltoxisch, sodass die Produktion von

virushaltigen Überständen nur drei bis vier Tage lang möglich ist. Am Vorabend der Kalziumphosphat-Transfektion wurden $5 \text{ bis } 7 \times 10^6$ Phoenix-ampho Zellen in einer 10 cm Petrischale ausplattiert. Das Medium wurde am nächsten Morgen gewechselt und durch 8 ml frisches Medium mit Zusatz von Chloroquin (Sigma; Endkonzentration $25 \mu\text{M}$) ersetzt. Chloroquin verhindert den Abbau der in die Zellen eingebrachten DNA, sodass dadurch die Qualität der Transfektion verbessert wird. Das Expressionsplasmid für das VSV-G Protein ($3 \mu\text{g}$), ein Expressionsplasmid für die retroviralen Proteine *gag* und *pol* ($10 \mu\text{g}$) sowie der zu verpackende Vektor (3 bis $5 \mu\text{g}$) wurden gemischt und entsprechend der Herstellerangaben für die Transfektion vorbereitet („Calcium-Phosphate Transfection Kit“, Fa. 5-3prime (PeqLab, Erlangen)). Abweichend vom Protokoll des Herstellers wurde jedoch dem Transfektionsmedium Chloroquin zugefügt (s. o.). Der erste Mediumwechsel ohne Chloroquin erfolgte sechs bis acht Stunden nach der Transfektion. Die ersten Überstände wurden 24 Stunden nach der Transfektion abgenommen, anschließend wurden zwei Mal täglich Überstände gesammelt, aliquotiert und bei -70°C eingefroren. Der Titer der Überstände wurde auf SC1 Zellen bestimmt.

3.3.2 Titerbestimmung von virushaltigen Überständen

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren enthielten als Markergene entweder eGFP (enhanced green fluorescence protein) oder ein Gen, das Drogenresistenz ($\text{neo}^{\text{®}}$ oder $\text{hyg}^{\text{®}}$) vermittelt. Für die Bestimmung der Infektiosität (Titer = Anzahl der Viren pro Milliliter) der virushaltigen Überstände wurden entsprechend dem Markergen unterschiedliche Methoden angewendet: eGFP-haltige Überstände wurden durchflusszytometrisch analysiert. Bei $\text{neo}^{\text{®}}$ oder $\text{hyg}^{\text{®}}$ -haltigen Überständen erfolgte die Selektion der Zielzellen mit Geneticin bzw. Hygromycin.

Die Bestimmung der Titer von Überständen mit eGFP-exprimierenden Viren wurde mit dem Durchflusszytometer *FACScalibur*[□] (Becton Dickinson) durchgeführt. Hierfür wurden pro Loch 5×10^4 der zu infizierenden Zielzellen am Vorabend in 24-Loch Platten ausplattiert. Am nächsten Morgen wurde das Medium durch 0,5 ml, 1 ml und 1,5 ml Virusüberstand ersetzt. Um die Infektionsrate zu verbessern wurde Polybren (6 bis $8 \mu\text{g/ml}$) hinzugefügt. Nach sechs bis acht Stunden wurde das Medium gewechselt. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte drei Tage nach der Infektion. Die Anzahl der Viren pro

Milliliter berechnet sich aus dem Prozentsatz der eGFP-positiven Zellen und der Menge des eingesetzten Virusüberstandes.

Die Titer von Überständen mit neo^r-Resistenz (bzw. analog hyg[®]-Resistenz) vermittelnden Viren wurde anhand von GTUs (Geneticin Transfer Unit) ermittelt. Am Vortag wurden 5×10^3 der zu infizierenden Zellen in 24-Loch Platten pro Loch ausplattiert. Am nächsten Morgen wurde von dem Virusüberstand eine serielle Verdünnungsreihe (1:5) in polybrenhaltigem Medium angesetzt (6 bis 8 µg/ml Polybren). Anschließend wurde das Medium auf den Zellen durch 1 ml verdünnten Virusüberstand ersetzt (Dreifachansätze pro Verdünnung). Am nächsten Tag wurde mit der Geneticin-Selektion begonnen (400µg/ml für SC-1, bzw. 800µg/ml für TE671 Zellen). Nach 10 bis 14 Tagen wurde die Anzahl der Klone pro Verdünnungsansatz gezählt. Der Titer berechnet sich aus der Anzahl der Drogen-resistenten Klone pro Verdünnungsansatz multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor.

3.3.3 Infektion von Zellen mit virushaltigen Überständen

Die erfolgreiche Infektion von Zellen ist zum einen von der Dichte der ausplattierten Zellen zum anderen vom Volumen des Virusüberstandes abhängig. Die Zellen müssen in optimaler Dichte zur Infektion ausplattiert werden, sodass eine bestmögliche Teilungsrate erreicht werden kann. Weiterhin muß das Volumen des Überstands so gering wie möglich gehalten werden, damit Viruspartikel und Zelle möglichst nah zusammengebracht werden (sog. „Brownian-Motion Effekt“, Chuck et al., 1996). Weiterhin sollten Mehrfachinfektionen durchgeführt werden, um die Infektionsrate zu erhöhen. Der M.O.I.-Wert (Multiplicity of Infection) ist eine rechnerische Größe und gibt an, wie viele Viren pro Zelle eingesetzt werden, d.h. bei einem M.O.I.-Wert von 1 ist theoretisch ein Virus pro Zelle im Infektionsansatz vorhanden. Je höher der M.O.I.-Wert, desto mehr Viren werden pro Zelle für die Infektion eingesetzt.

Am Vorabend wurden 2×10^5 der zu infizierenden Zellen in Sechs-Loch Platten ausplattiert. Am nächsten Morgen wurde die Menge an Virusüberstand entsprechend einem M.O.I. Wert von mindestens 1 oder höher abgefüllt und mit Wachstumsmedium auf ein Gesamtvolumen von 3 ml aufgefüllt. Zur Verbesserung der Infektionsrate wurde 6 bis

8 µg/ml Polybren hinzugefügt. Auf diese Art wurden mehrere Infektionen jeweils morgens und abends durchgeführt.

3.3.4 Analyse von eGFP-exprimierenden Zellen im Durchflusszytometer

In dieser Arbeit wurde ein *FACScalibur*[®] (Becton Dickinson) für die Analysen verwendet. Mit Hilfe dieser Methode können unterschiedliche physikalische Eigenschaften einer Zelle bestimmt werden. Zur Analyse werden die Zellen aus dem Probenröhrchen mit Überdruck in eine Messküvette geleitet. Der Flüssigkeitsstrom mit den Zellen wird dabei so weit eingengt, dass die Zellen hintereinander angeordnet werden. Die Zellen passieren anschließend einzeln den Analysepunkt. Hier werden die Zellen an einem Laserstrom vorbeigeführt und analysiert. Die Zellen werden in Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität in Klassen eingeteilt, wobei die Verteilung der einzelnen Zellen in Form eines Häufigkeitsdiagramms (Histogramm) erfolgt. Durch die vergleichende Analyse unterschiedlicher Histogramme können Veränderungen der eGFP-Expression in den Zellen sichtbar gemacht werden. Aus dem Vergleich der Histogramme der infizierten Zellen mit demjenigen der Negativkontrolle kann anschließend der Anteil der eGFP-exprimierenden Zellen bestimmt werden.

Für die Analyse wurden die Zellen aus der Kultur genommen, in Eppendorfgefäße überführt und bei 5000 Umdrehungen/Minute für drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet wurde in 500µl PBS aufgenommen. Anschließend wurde die Probe direkt im *FACScalibur* analysiert. Als negative Kontrolle diente ein parallel kultivierter, nicht-infizierter Ansatz der betreffenden Zell-Linie. Anhand dieser Negativkontrolle wurde auch die Einstellung der unterschiedlichen Parameter am *FACS* durchgeführt. Anschließend erfolgte die vergleichende Analyse der erhaltenen Histogramme.

Um die Zellen in positive (= eGFP Expression) und negative (= keine eGFP Expression) Zellen zu sortieren, wurde ein MoFlow Sorter (Cytomation) verwendet.

3.3.5 Strategie der Marker- bzw. Interferenzversuche

Zellen, die bereits retroviral infiziert sind, sind resistent gegenüber Superinfektion mit Viren, die den gleichen Rezeptor verwenden (s. hierzu auch Abschnitt 2.4). Daher kann anhand von Interferenzversuchen getestet werden, ob ein Virus einen schon bekannten oder einen neuen Rezeptor für die Infektion verwenden kann. Das Virus, mit dem die Infektion erfolgt, muss einen Marker exprimieren, z.B. ein Gen für Drogenresistenz oder eGFP, sodass das Virus nach der Infektion detektiert werden kann (s. hierzu auch 3.3.2 und 3.3.4).

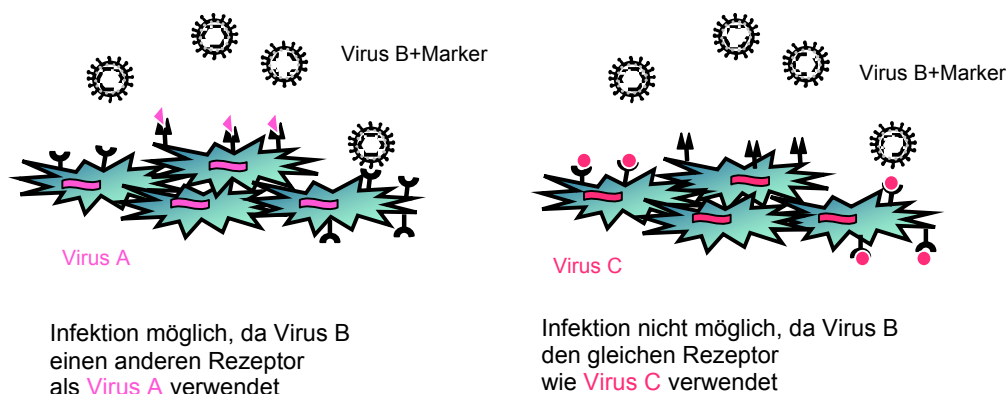


Abb.6: Strategie der Interferenzversuche; genauere Erklärungen im Text.

In Zellen, die bereits mit Virus A infiziert sind, wird der Rezeptor, den das Virus A für die Infektion verwendet, aufgrund endogener Env-Expression blockiert (Abb. 6, links). Werden diese Zellen nun mit Virus B infiziert, das einen anderen Rezeptor als Virus A verwendet, ist die Infektion der Zellen mit Virus B möglich, da dieser Rezeptor nicht blockiert wird (Abb. 6, links). Die Zellen exprimieren nach erfolgreicher Infektion einen nachweisbaren Marker und können entweder erfolgreich selektiert oder im *FACS* analysiert werden. Aufgrund der positiven Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass die Zellen mit Virus B infiziert wurden und daraus schließen, dass Virus B einen anderen Rezeptor als Virus A verwendet.

Sind die Zellen mit einem Virus C infiziert, das den gleichen Rezeptor wie Virus B verwendet, ist keine Infektion möglich, da Expression der Env-Hüllproteine von Virus C den Rezeptor blockiert (s. Abb.6, rechts). Es findet keine Infektion mit Virus B statt und da

kein Markergen in die Zellen eingebracht wird, sterben die Zellen bei der Selektion mit einem Antibiotikum ab bzw. bei der Analyse im *FACS* ist keine eGFP-Expression messbar. Aufgrund der Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass Virus B den gleichen Rezeptor wie Virus C für die Infektion verwendet.

3.3.6 Herstellung von Viren für Markerversuche

Die virusproduzierenden SC1 Zellen wurden nach dem Protokoll von Prassolov et al., 2001b hergestellt.

3.3.7 Markerversuche

Die Marker- und Interferenzversuche wurden nach dem Protokoll von Prassolov et al., 2001b erstellt.

3.4 Material Molekularbiologie

3.4.1 Wichtige Chemikalien, Lösungen, Puffer, Enzyme und Kits

EDTA 0,5 M; [pH 8,0]

Ethanol absolut (nicht vergällt)

Ethanol 70%

Isopropanol

SDS 10%

Tris-HCl 2 M [pH 8,0]

TE-Puffer: 10 mM Tris und 0,5 mM EDTA

PBS: 0,13 M NaCl; 2,7mM KCl; 6,5 mM Na₂HPO₄; 1,5mM KH₂PO₄

Lösung I: 50mM Tris, 5mM EDTA

Lösung II: 1% SDS, 0,2 M NaOH

Lösung III: Kalium Acetat 3 M [pH5,0]

TE/Rnase: TE mit 20µg/ml RnaseA

Kulturmedium für Bakterien:

Luria-Bertani Medium (LB-Medium)

Bacto-Trypton 1% (w/v)

Hefe-Extrakt 0,5% (w/v)

NaCl 0,5% (w/v)

[pH 7,4]

bei Selektion erfolgt Zugabe von 100mg/l Ampicillin

bei Medium für Petrischalen erfolgt Zugabe von 1,5% Agar (w/v)

3.4.2 Bakterienstämme

CMK 603 (Derivat des Stammes C600, Appleyard, 1954)

3.4.3 cDNA-Bank

Es wurde cDNA aus Maus-MS-5 bzw. PA6 Zellen verwendet, die in ein retrovirales Expressionsplasmid (pMX) kloniert wurde (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von T. Kitamura, Herstellungsprotokoll nach: Kitamura et al., 1995).

3.5 Methoden Molekularbiologie

Die in dieser Arbeit durchgeführten Methoden entsprechen weitgehend den üblichen Standardmethoden wie sie in folgenden Büchern/Protokollen aufgeführt sind: Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., 1992) und Molecular Cloning (Maniatis et al., 1982, Neuauflage: Sambrook et al., 1989).

3.5.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für die Gewinnung kleiner Mengen Plasmid DNA (sog. Mini-Präp.) aus Bakterien wurden 2 ml Selektionsmedium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und bei 37°C über

Nacht im Roller oder Schüttler inkubiert. 1,5 ml dieser Übernachtskultur wurden in einem Eppendorfgefäß für drei Minuten bei 4000 Umdrehungen/Minute (rpm) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Lösung I resuspendiert und zusammen mit Lösung II invertiert. Nach fünf Minuten Inkubation auf Eis wurden 0,2 ml Lösung III hinzugegeben, invertiert und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 20 Minuten bei höchster Drehzahl zentrifugiert. Der Überstand (ca. 450µl) wurde anschließend in ein neues Eppendorfgefäß transferiert, mit gleicher Menge Phenol-Chloroform Gemisches (1:1) versetzt, kurz gevortext und anschließend fünf Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert, in dem 1 ml 100% Ethanol vorgelegt waren. Danach wurde erneut für 15 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen, das Pellet mit 70 % Ethanol gereinigt und anschließend im Vakuum getrocknet. Die DNA wurde in 50 µl TE/RnaseA aufgelöst und konnte dann direkt für den Restriktionsverdau (analytisch 5 µl), die photometrische Konzentrationsbestimmung und zum Sequenzieren eingesetzt werden.

3.5.2 Großaufarbeitung von Plasmid DNA

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA für die Transfektion von Zellen wurden 200 ml einer dichten Bakterien-Übernachtskultur nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aufgearbeitet. Anschließend wurde die DNA über Anionenaustauscher-Säulen der Firma Qiagen (Hilden) aufgearbeitet. Diese Vorgehensweise ergab ca. 500 bis 800 µg Plasmid DNA.

3.5.3 RNA-Isolierung

(nach RNA Insta System, Eurogentec)

Die adhärent wachsenden Zellen wurden in 10 cm Petrischalen ausplattiert (2/3 konfluent). Das Medium wurde abgenommen, anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Nachfolgend wurde nach Angaben des Herstellers weitergearbeitet. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch.

3.5.4 Herstellung von cDNA

Für die Herstellung der cDNA wurde das Omniscript RT-Kit (Qiagen) nach modifiziertem Protokoll verwendet. Es wurden etwa 2 µg RNA verwendet, was zumeist einem Volumen von 2 bis 5 µl RNA entsprach. Pro Ansatz wurde wie folgt hinzugefügt:

1 µl Oligo dTs (100 ng/µl), 1 µl Random-Primer (100ng/µl) und mit DEPC-behandeltem Wasser auf insgesamt 10µl aufgefüllt. Die Probe wurde zehn Minuten bei 72°C erhitzt, um die RNA leicht zu denaturieren und Anlagerung der Primer zu ermöglichen, anschließend wurde die Probe für 15 Minuten auf Eis gestellt. Es erfolgte Zugabe von 2µl RT-Puffer (10-fach konzentriert), 2µl dNTPs (5mM), 0,25 µl RNAsin (40U/ml), 1µl Omniscript RT (4U/µl) und 4,75µl DEPC-behandeltes Wasser, sodass ein Gesamtvolumen von 10 µl vorlag. Dieser Ansatz wurde auf Eis zum ersten Ansatz pipettiert, die Proben wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden dem Ansatz 50µl Wasser hinzugefügt, die Probe wurde für zehn Minuten bei 92°C erhitzt, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren und anschließend auf Eis gestellt oder bei -20 °C gelagert.

Um die Qualität der erhaltenen cDNA zu kontrollieren, wurden 3µl cDNA einer Aktin - PCR unterzogen. Erst bei positiven Ergebnissen auf diese PCR wurde die cDNA für weitere Analysen verwendet.

3.5.5 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Nukleinsäuren haben eine maximale Extinktion (optische Dichte, OD) bei 260 nm. Bei einer Konzentration von 50µg/ml hat doppelsträngige DNA eine OD₂₆₀ von 1,0. Damit lässt sich die DNA-Konzentration berechnen. Proteine haben eine höhere Extinktion bei 280 nm und der Quotient aus OD₂₆₀/OD₂₈₀ gibt Auskunft über den Reinheitsgrad der DNA. Bei einer sauberen DNA-Präparation sollte der Quotient einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 ergeben. Gleiches gilt für RNA.

3.5.6 Phenolextraktion

Mit der Phenolextraktion können unerwünschte Proteine aus DNA-Lösungen entfernt werden. Dazu wurde die DNA auf ein Volumen von etwa 200 bis 500 μ l verdünnt und mit gleichem Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt. Die Proteine gehen dabei in die phenolische Phase über, die durch anschließende fünfminütige Zentrifugation von der wässrigen Phase abgetrennt wurde. Nach Überführung der DNA in ein neues Röhrchen wurde die DNA mit Alkohol ausgefällt.

3.5.7 Sequenzierung

Zum Sequenzieren doppelsträngiger Plasmid-DNA wurden 300 bis 500 ng aufgereinigte Minipräp-DNA mit 15 pM Primer und 4 μ l Big-Dye in einem Gesamtvolumen von 20 μ l einer PCR mit 25 Zyklen unterzogen: 30 Sekunden bei 96°C, 15 Sekunden bei 50°C und vier Minuten bei 60°C. Die DNA wurde anschließend mit Alkohol präzipitiert, gewaschen und das trockene Pellet an die Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dietmar Richter im Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) übergeben, die die Gelelektrophorese und Auswertung der Nukleotidsequenz durchführten. Zur Sequenzierung wurde dort die Methode nach "Sanger" angewendet (Sanger et al., 1977).

3.5.8 Schneiden von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen

Spaltungen von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen wurden in der Regel nach Angaben des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt. Das Volumen des zugefügten Enzymes darf dabei 10% des Gesamtvolumens nicht überschreiten. Ein diagnostischer Verdau wurde in der Regel mit 1-2 μ g DNA (oder 4 μ g Minipräp) in einem Gesamtvolumen von 20 μ l durchgeführt.

3.5.9 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Eine nicht-denaturierende elektrophoretische Größenauftrennung von DNA erfolgte über 0,5 bis 1,9% Agarose-Horizontal Gele mit 2 µg/ml Ethidiumbromid bei einer Spannung von sechs bis acht Volt pro cm. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit 0,1-Volumen Ladepuffer vermischt. Als Größenmarker wurden mit EcoRI/Hind III verdaute Lambda-Phagen DNA verwendet. Die DNA-Fragmente wurden durch Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids auf einem UV-Transilluminator (254 nm) sichtbar gemacht und das Ergebnis photographisch dokumentiert.

3.5.10 Isolierung von DNA Fragmenten

Nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel wurden die DNA-Banden bei UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten. Zur anschließenden Extraktion der DNA wurde das Millipore Ultrafree DA Kit (Amicon) nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.5.11 Desoxyoligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden über die Firma Invitrogen bezogen.

3.5.12 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die PCR wurde in einem 50 µl Ansatz mit dem Taq PCR Core Kit (Qiagen) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 250 nM dNTPs, 25-50 ng Template-DNA, je 100ng entsprechende Primer, 4U Polymerase und 5 µl Puffer (10-fach konzentriert). PCR-Produkte, die zur Klonierung vorgesehen waren, wurden mit Pfu-Polymerase amplifiziert, um die Wahrscheinlichkeit PCR-bedingter Mutationen zu minimieren.

Die Reaktion wurde, je nach Primerkombination und Fragmentlänge, in einem Thermocycler (Biometra) mit Deckelheizung über 25 bis 35 Zyklen durchgeführt. Anschließend wurden die Fragmente, die zur Klonierung vorgesehen waren, über ein Agarosegel aufgereinigt, nach Schneiden mit dem entsprechenden Restriktionsenzym in einen Vektor

kloniert und durch Sequenzierung überprüft. Es wurden unterschiedliche PCRs unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Allgemein:

Deckeltemperatur: 103°C

95°C: 5 Min.

individuelles Programm: s.u.

72°C: 5 Min

4°C: Pause

PCR auf neo:

Primer CS 267 (TGA TGC AAT GCG GCG GCT GC)

Primer CS 268 (CGG GTA TCG GCC GCT CCC GAT)

Programm: 94°C- 1 Min./65°C- 1 Min./72°C- 2 Min., 30 Zyklen

Erwartete Bandengröße: 300 bp

PCR auf Aktin:

Primer CS 21 (CGC TGC GCT GGT CGT CGA CA)

Primer CS 37 (GTC ACG CGC ACG ATT TCC CGC CT)

Programm: 94°C- 30Sek./60°C- 30 Sek./72°C- 30 Sek., 30 Zyklen

Erwartete Bandengröße: 700 bp

PCR auf die cDNA-Bank:

Primer CS 248: (GGT GGA CCA TCC TCT AGA CT)

Primer CS 249: (CCC TTT TTC TGG AGA CTA AAT)

Programm: 95°C- 1 Min./59°C- 2 Min./72°C- 3 Min., 35 Zyklen

Erwartete Bandengröße: nicht bekannt, abhängig von der im Expressionsplasmid enthaltenen cDNA

PCR auf M813- env:

A) Primer CS 314 (CCA CAT GGC AGA TTC ATC GC)

Primer CS 246 (CAC AGC CAA CAT TGT TG)

Erwartete Bandengröße: A: 800 bp

B) Primer CS 324 (GGC ATT CTA GCC CTC AGC)

Primer CS 327 (TAG GTG TAG GTT CTA AGC)

B: 1100 bp

Programm: 95°C- 1 Min./55°C- 2 Min./72°C- 2 Min.; 35 Zyklen

PCR zur Klonierung des Rezeptorgens

A) Primer CS 368 (ATG AGG GCT GTA CTG GAG)

Primer CS 369 (GCT TAG CCA AGC CTG GTG ATG ACC)

Erwartete Bandenlänge: 1000 bp

B) Primer CS 370 (TAG CTT GGA TCA ACC CAG AAC ACT)

Primer CS 371 (GTT TAT TTC TCC TTA TGA)

Erwartete Bandenlänge: 1100 bp

Programm: 94°C- 1 Min./70°C- 2 Min./72°C- 3 Min; 35 Zyklen

3.5.13 Abspaltung von 5'-Phosphaten durch alkalische Phosphatase

Die Abspaltung der 5'-Phosphomonosäureester ist notwendig, um bei Ligasereaktionen eine intramolekulare Verknüpfung des Vektors zu verhindern. Dies geschieht besonders häufig, wenn der Vektor nur mit einem Enzym geschnitten wurde. Die gespaltene Vektor-DNA wurde mit Wasser auf 100 µl Gesamtvolumen aufgefüllt, und es wurden 10 µl des mitgelieferten Inkubationspuffers (10-fach konzentriert) dazu gegeben. Anschließend wurde 1 µl (1U/µl) alkalische Phosphatase hinzugefügt, und der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz für fünf Minuten bei 50°C inkubiert, um verborgene 5'-Enden dem Enzym zugänglich zu machen, danach mit

frischem Enzym versetzt und für weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde durch Phenolextraktion entfernt und die DNA mittels Alkoholpräzipitation gefällt.

3.5.14 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

Vor jeder Ligasereaktion wurden die isolierten DNA-Fragmente zur groben Quantifizierung nebeneinander auf einem Agarosegel aufgetrennt. 5 bis 10 ng Vektor-DNA wurden mit einem drei bis zehnfachen molaren Überschuss des DNA-Fragments in einem Gesamtansatz von 20 μ l mit 2 Einheiten T4 Ligase (New England Biolabs) versetzt und über Nacht bei 14°C inkubiert. Zur Kontrolle wurde immer ein Ansatz ohne Zugabe des zu klonierenden Fragmentes gemacht. Zur Transformation kompetenter Bakterien wurden 2 bis 10 μ l des Ligationsansatzes verwendet.

3.5.15 Transformation von Bakterien

Nach dem Auftauen der transformationskompetenten Bakterien (Methode nach Inoue et al., 1990) auf Eis wurden 20 bis 50 μ l Bakteriensuspension mit 2 μ l DNA aus dem Ligationsansatz vermischt und für 20 Minuten auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Bakterien für eine Minute einem Hitzeschock bei 37°C im Wasserbad ausgesetzt, für weitere fünf Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mit 200 bis 500 μ l LB-Medium versetzt. Dieser Ansatz wurde 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Selektion der Bakterien wurde der gesamte Ansatz auf vorgetrocknete LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.5.16 Einfrieren von Bakterien/Glyzerinkulturen

Die Bakterienkulturen wurden in 30% Glycerol bei -80°C eingefroren.

4 Ergebnisse

Die Wechselwirkung des viralen Env-Hüllproteins mit dem passenden Rezeptor stellt den ersten entscheidenden Schritt bei der Infektion mit Retroviren dar. Das Verständnis des Infektionsmechanismus ist von besonderem Interesse, da Mutationen innerhalb der viralen Glykoproteine, die zu einer Änderung der Rezeptorerkennung führen, die Evolution endogener Viren und spezie-übergreifender Infektionen beeinflussen. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung der Interferenzgruppe, die Lokalisierung des Rezeptorgens und die Klonierung des Rezeptors für das Maus-Leukämievirus M813.

4.1 M813-MuLV kann nur Mauszellen infizieren

Retroviren infizieren Wirtszellen über Rezeptoren. Folglich können nur Zellen, die den geeigneten Rezeptor exprimieren, infiziert werden und diese Zellen stellen das Wirtsspektrum eines Virus dar. Zellen, die bereits retroviral infiziert sind, können nicht mit Viren infiziert werden, die den gleichen Rezeptor verwenden (Interferenz). Im Gegensatz dazu ist die Infektion mit Viren, die einen anderen Rezeptor benutzen, möglich. Interferenzversuche basieren auf dieser Tatsache. Aufgrund früherer Ergebnisse ist bekannt, daß CII-Typ Viren aus *M. cervicolor*, z.B. M813, nur Zellen infizieren können, die aus *M. musculus* etabliert wurden, z. B. SC1-Fibroblasten oder NIH3T3-Zellen. Zellen aus *M. cervicolor* sind nicht, Rattenzellen nur schlecht und Humanzellen nicht mit M813 infizierbar (Benveniste et al., 1977). Zuerst wurden Marker-Transfer Versuche gemacht um sicher zu stellen, dass es sich bei unserem Virus-Isolat wirklich um M813 handelte. Bei diesen Versuchen wurde durch verschiedene MuLV (M813, Mo-MuLV und 10A1) ein retroviraler Vektor mit einem Marker-Gen in die Zellen eingebracht (sog. Pseudotypen) (s. Abschn. 3.3.2 ff). Maus-SC1 Zellen wurden als Produzentenzellen verwendet und als Markergen wurde neo[®] eingesetzt. Die Expression des Gens verleiht den Zellen Resistenz gegen Geneticin.

Die Überstände wurden eingesetzt, um das Wirtsspektrum der unterschiedlichen Viren zu definieren. Die Infektionseffizienz der MPEVneo[®]-Pseudotypen wurde dabei

auf zwei bzw. drei verschiedenen Zelltypen ermittelt, indem die Anzahl der „Geneticin-Transfer Units“ (GTU) ausgezählt wurde.

Wie aus Tabelle 3 ersichtlich, sind SC1 und NIH3T3-Mauszellen aus *M. musculus* mit MPEV-neo[®](M813) infizierbar. Im Gegensatz dazu lassen sich Rattenzellen nur geringfügig infizieren. Bei der Infektion dieser Zellen mit MPEV-neo[®](M813) konnten, je nach Zell-Linie, nur 30 bis 100 Geneticin-resistente Klone gezählt werden. Im Vergleich zur Infektion der Rattenzellen mit Mo-MuLV bzw. 10A1 war die Infektionseffizienz von M813 stark reduziert. MPEV-neo[®](Mo-MuLV), bzw. (10A1), die als positive Kontrolle eingesetzt wurden, konnten Maus- und Rattenzellen infizieren und die Humanzellen waren auch mit MPEV-neo[®](10 A1) infizierbar.

Tab. 3: Das Wirtsspektrum von M813

Spezies	Zell-Linie	Titer (GTU/ml) ^a neo [®] -Viren Pseudotypen		
		M813	Mo-MuLV	10A1
Mauszellen	SC1	3,5x10 ⁴	1,6x10 ⁵	2,6x10 ⁵
	NIH3T3	8,0x10 ⁴	2,6x10 ⁵	3,0x10 ⁵
Rattenzellen	RAT1	3,7x10	8,6x10 ⁴	5,6x10 ⁴
	NRK	3,0x10	1,2x10 ⁵	1,8x10 ⁵
	REF52	1,3x10 ²	n.g.	1,7x10 ⁵
Humanzellen	HeLa	0	0	8,3x10 ⁵
	HT1080	0	n.g.	4,3x10 ⁴
	TE671	0	n.g.	1,4x10 ⁵

a Mittelwert zweier unabhängiger Experimente

n.g. nicht getestet

Wie unsere Ergebnisse zeigen, weist M813 das gleiche Wirtsspektrum auf wie es bisher für das CII-MuLV Isolat beschrieben wurde, d.h. Mauszellen sind gut, Rattenzellen kaum und Humanzellen nicht mit M813 infizierbar. Somit unterscheidet sich das Wirtsspektrum von M813 von demjenigen anderer MuLV, die aus *M. musculus* und *M. cervicolor* isoliert wurden, da diese Isolate auch Ratten- und Humanzellen (Ausnahme Mo-MuLV) infizieren können (Miller und Chen, 1996). Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei unserem Isolat um M813 handelt.

4.2 M813-MuLV weist unterschiedliche Interferenz mit anderen MuLV auf

Es besteht die Möglichkeit, dass M813 eventuell doch einen der bisher bekannten MuLV-Rezeptoren verwenden kann. Anhand von Interferenzversuchen sollte geklärt werden, ob die Infektion mit M813 durch andere MuLV verhindert wird.

Im ersten Ansatz wurden die Titer von MPEV-neo[□] (M813) Pseudotypen auf Maus-SC1 Zellen bestimmt, die mit verschiedenen MuLV infiziert waren, wobei das Interferenzprofil dieser Viren bekannt war: Mo-MuLV (ökotrop), Mo-AmphoV (amphotrop), 10A1V (10A1-trop) und Mo-MCF (polytrop). Xenotrope MuLV wurden nicht untersucht, da diese Viren zum einen nicht in der Lage sind, alle Zellen aus *M. musculus* zu infizieren, zum anderen nutzen xenotrope Viren den gleichen Rezeptor wie polytrope Viren (Tailor et al., 1999). Als positive Kontrolle wurden 10A1-Pseudotypen verwendet.

Wie Tabelle 4a zeigt, verhindert die Expression von M813 in SC1 Zellen die Infektion mit M813 um das Tausendfache, sodass die Infektion als nahezu vollständig geblockt betrachtet werden kann. Weiterhin zeigte sich keine bzw. nur sehr geringe Interferenz in SC1 Zellen, die andere MuLV freisetzen. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass M813 einen eigenen Rezeptor zur Infektion verwenden kann.

Tab. 4a: M813-Interferenzprofil: Die M813-Infektion wird durch MuLV anderer Interferenzgruppen nicht blockiert

Zielzellen	Titer (GTU/ml)* der MPEV Pseudotypen	
	M813	10A1
SC1	$3,4 \times 10^4$	$7,6 \times 10^4$
SC1+ M813	1,5	$7,4 \times 10^4$
SC1+Mo-MuLV	$3,5 \times 10^4$	$7,6 \times 10^4$
SC1+Mo-AmphoV	$5,7 \times 10^4$	$8,8 \times 10^4$
SC1+10A1V	$8,8 \times 10^3$	2
SC1+Mo-MCFV	$4,3 \times 10^4$	$2,0 \times 10^5$

*Durchschnittswerte zweier unabhängiger Experimente

Anschließend sollte die Infektionsfrequenz von unterschiedlichen MuLV auf uninfizierten SC1 und auf mit M813-infizierten SC1- Zellen ermittelt werden. Es sollte überprüft werden, ob M813 zusätzlich zu einem eigenen Rezeptor eventuell noch einen anderen bereits bekannten Rezeptor, insbesondere den ökotrophen Rezeptor, verwenden kann.

Für Mo-AmphoV, 10A1 und Mo-MCF konnte sowohl auf SC1 Zellen als auch auf den mit M813 infizierten SC1 Zellen keine Interferenz beobachtet werden. Bei der Infektion mit Mo-MuLV trat eine leichte Interferenz auf, der Titer von Mo-MuLV war jedoch auf den mit M813-infizierten SC1 Zellen im Vergleich zu uninfizierten SC1 um das 50-fache reduziert (s. Tab. 4b).

Tab. 4b: M813-Interferenzprofil: M813-Expression zeigt geringe Interferenz mit ökotropen MuLV, jedoch nicht mit anderen MuLV

Pseudotypen MPEV-neo [®]	Titer (GTU/ml) * auf den entsprechenden Zielzellen	
	SC1	SC1-M813
M813	5,4x10 ⁴	0
Mo-MuLV	1,8x10 ⁵	5,1x10 ³
Mo-Ampho V	1,2x10 ⁵	1,2x10 ⁵
10A1 V	7,8x10 ⁴	8,2x10 ⁴
Mo-MCF V	2,6x 10 ³	3,0x10 ³

Diese Ergebnisse lassen zwei Schlussfolgerungen zu. Zum einen ist die Infektionseffizienz von M813 in Zellen, die andere MuLV freisetzen, nicht reduziert. Daher muss M813 einen eigenen, bisher noch nicht charakterisierten Rezeptor für die Infektion der Zellen verwenden. Andererseits ist die Infektionseffizienz von Mo-MuLV in Zellen, die M813 freisetzen, leicht reduziert. Daher besteht die Möglichkeit, dass M813 den ökotropen Rezeptor auch verwenden kann, jedoch mit wesentlich geringerer Präferenz.

4.3 Humanzellen, die mit dem ökotropen Rezeptor mCAT1 transduziert sind, werden nicht für die Infektion mit M813 empfänglich

Es sollte der Frage nachgegangen werden, ob M813 eventuell doch den bekannten ökotropen Rezeptor mCAT1 verwenden kann. Humanzellen sind nicht mit M813 infizierbar, daher wurden humane TE671 Zellen ausgewählt, um in diesen Zellen den ökotropen mCAT1-Rezeptor zu exprimieren. Sollte M813 diesen Rezeptor verwenden können, müssten sich diese Zellen anschließend mit M813 infizieren lassen. Zur Etablierung der Zell-Linie wurde cDNA, die für mCAT1 kodiert, durch einen retroviralen MPEV-neo[®] Vektor in TE671 exprimiert. Die Zellen wurden zwei Wochen

lang mit Geneticin selektioniert und anschließend mit SFFV-eGFP (Mo-MuLV, Mo-Ampho und M813) infiziert. Das eGFP-Markergen wird bei erfolgreicher Infektion in den Zielzellen exprimiert und bewirkt eine Grünfärbung der Zellen, die im *FACS* detektierbar ist. Das Protein ist für die Zellen nicht toxisch, daher kann der Marker über längere Zeit nachgewiesen werden (s. auch Abschn. 3.3.4). Die Analyse erfolgte 48 Stunden nach der Virusinfektion im *FACS*.

TE671neo[®]-mCAT1 Zellen wurden verwendet um zu prüfen, ob M813 den ökotropen Rezeptor für die Infektion verwenden kann. Die negative Kontrolle erfolgte auf TE671-neo[®] Zellen. Beide Zell-Linien wurden mit M813 und zudem mit Mo-MuLV und 10A1 infiziert. Die positive Kontrolle wurden SC1 Zellen durchgeführt, da diese Mausfibroblasten sowohl mit Mo-MuLV als auch 10A1 und M813 infizierbar sind.

Die SC-1 Zellen ließen sich zu 61% mit Mo-MuLV infizieren. Die humanen Kontrollzellen (TE671-neo[®]) waren, wie erwartet, nicht mit Mo-MuLV infizierbar. Die Infektionseffizienz mit Mo-MuLV auf TE671-neo[®]-mCAT1 Zellen betrug nur 49% und war im Vergleich zu derjenigen auf SC1 Zellen um etwa 25% erniedrigt. Gleiches konnte auch bei der Infektion mit 10A1 beobachtet werden. Wir sind daher davon ausgegangen, dass der ökotrope Rezeptor in der Humanzell-Linie ausreichend genug vertreten war um zu testen, ob M813 den ökotropen Rezeptor für die Infektion verwenden kann. Anschließend wurden die Zell-Linien mit SFFV-eGFP(M813) infiziert. Die positive Kontrolle auf Maus-SC1 Zellen zeigte eine relativ gute eGFP-Expression von 34%. Die Humanzellen mit mCAT1-Rezeptor ließen sich nicht mit M813 infizieren. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass M813 den ökotropen Rezeptor nicht verwenden kann (s. Abb. 7).

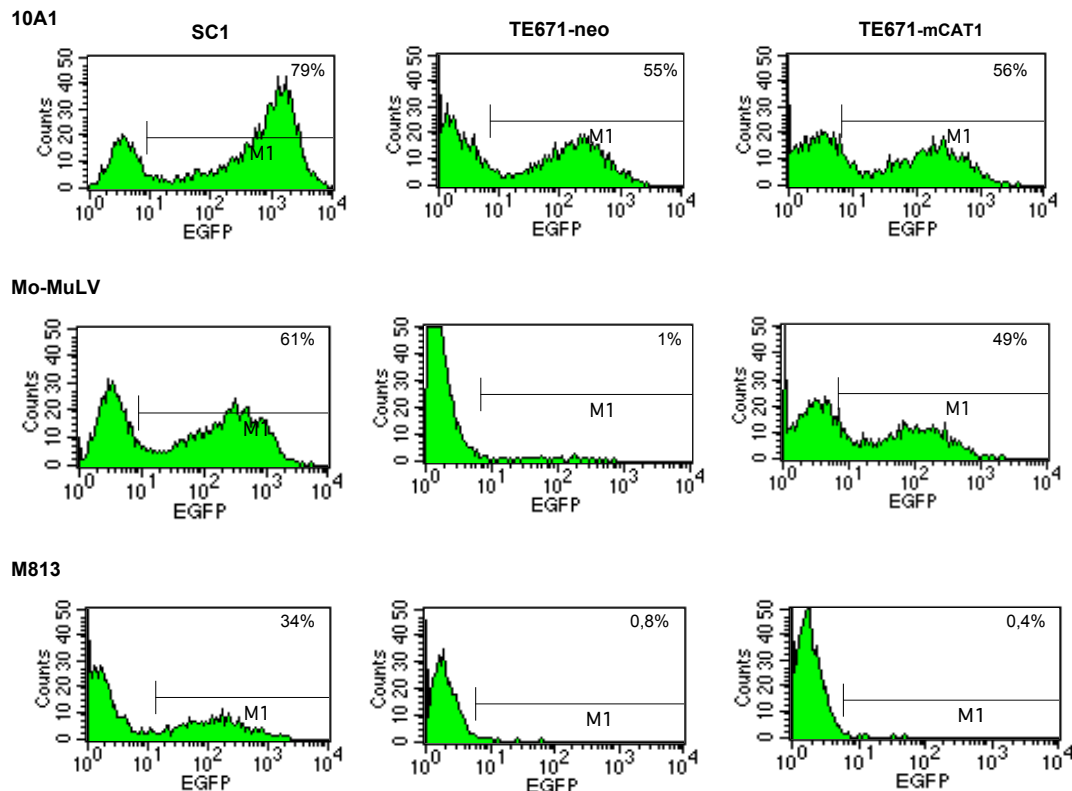


Abb.7: Die Ergebnisse der FACS-Analysen: Humanzellen, die den ökotropen Rezeptor mCAT1 exprimieren, wurden mit unterschiedlichen MuLV infiziert.

FACS-Analysen entbehren im Allgemeinen einer gewissen Sensitivität, daher wurde ein weiterer Versuch durchgeführt. Hierfür wurde die Infektionseffizienz von Mo-MuLV und M813 mit Pseudotypen (MPEV-hyg[®] Vektoren), die Drogenresistenz gegen Hygromycin verleihen, auf TE671neo[®]-mCAT1 Zellen ermittelt. Analog zum „GTU“ wird dieser Test als „HTU“ (Hygromycin Transfer Unit) bezeichnet.

Wie Tabelle 5 zeigt, wurden mit Mo-MuLV sowohl auf SC1 als auch auf den TE671-mCAT1 Zellen ausreichende Titer von 1×10^3 bzw. $2,2 \times 10^3$ /ml erhalten. Bei der Infektion mit M813 auf TE671-mCAT1 Zellen konnten keine Hygromycin-resistenten Klone gezählt werden, trotz ausreichend hoher Titer auf den SC1 Kontroll-Zellen (2×10^4).

Tab. 5: Die Infektionsfrequenz von M813 in mCAT1-transduzierten Humanzellen

Zielzellen	Titer (HTU/ml) * der MPEVhyg [®] Pseudotypen	
	Mo-MuLV	M813
SC1	1×10^3	$2,0 \times 10^4$
TE671neo	0	0
TE671neo-mCAT1	$2,2 \times 10^3$	0

* Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente
HTU, Hygromycin Transfer-Einheit

Die Ergebnisse beider Versuche belegen, dass M813 den ökotropen Rezeptor mCAT1 nicht verwenden kann. M813 verwendet aber auch keinen der bisher bekannten MuLV-Rezeptoren, daher muss das Virus einen eigenen neuen Rezeptor für die Infektion benutzen können.

4.4 M813-MuLV induziert Synzytienbildung in PA317 Zellen

Während der Interferenzversuche konnten wir beobachten, dass M813 die Bildung vielkerniger Riesenzellen (sog. Synzytien) induziert. Wir wollten daher herausfinden, unter welchen Bedingungen M813 die Synzytienbildung ermöglichen kann.

Zellen der amphotropen Verpackungszell-Linie PA317 wurden mit M813 infiziert und unter dem Mikroskop auf Synzytienbildung hin untersucht. Eine Stunde nach der Infektion zeigten sich erste Anzeichen für die Bildung von Synzytien und nach vier Stunden waren nahezu alle Zellen der Kultur fusioniert (s. Abb. 8). 24 Stunden nach der Infektion waren alle Zellen der Kultur tot.

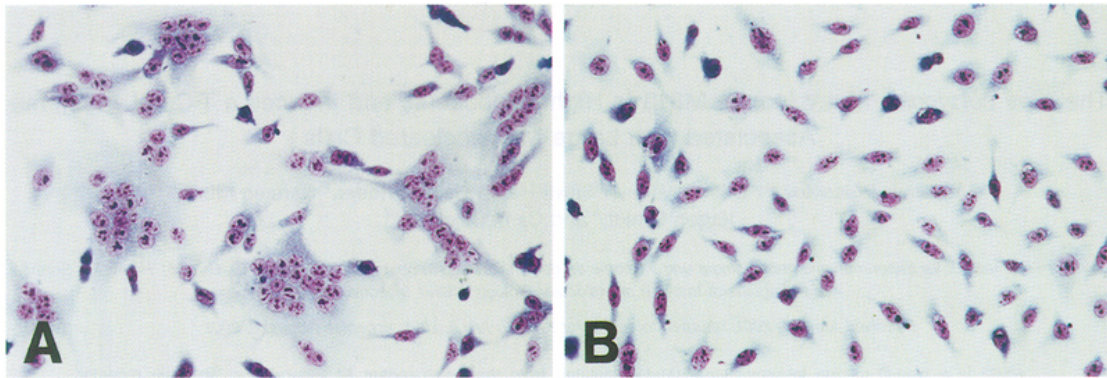


Abb. 8: M813 Infektion bewirkt Synzytienbildung in PA317 Zellen *in vitro*. (A) PA317 Zellen 4 Stunden nach der Infektion mit M813. (B) uninfizierte PA317 Zellen. Die Zellen wurden mit Giemsa angefärbt, Vergrößerung 150X.

Es sollte überprüft werden, ob die Expression amphotroper Env-Proteine auf der Zelloberfläche der Zell-Linie PA317 für die Bildung von Synzytien eine Rolle spielt oder ob nur M813 für die Fusion der Zellen verantwortlich ist. Weiterhin sollte untersucht werden, ob eventuell beide Parameter zusammengekommen für die Synzytienbildung entscheidend sind. Für alle Versuche wurde die gleiche Anzahl an Zellen ausplattiert. Zur Kontrolle wurden NIH 3T3 Zellen verwendet, da in dieser Zell-Linie keine amphotropen Env-Proteine exprimiert wurden. Es erfolgte die Infektion der Zellen mit unterschiedlichen MuLV und vier Stunden nach der Infektion wurden die Kulturen unter dem Mikroskop auf Synzytienbildung hin untersucht.

Der Fusionsindex (FI) wurde wie folgt berechnet:

$$FI = \frac{(N - S)}{T}$$

wobei N die Anzahl der Kerne pro Synzytium, S die Anzahl der Synzytien und T die gesamte Anzahl der Zellkerne darstellt (Andersen, 1994). Insgesamt wurden für jedes Experiment 500 Zellkerne gezählt.

Tab. 6: M813 induziert Synzytienbildung in PA 317 Zellen

Virus	Titer (GTU)	Fusionsindex (%) auf Zielzellen ^b	
		NIH 3T3	PA317
M813-MuLV	1,4x10 ⁴	6±4,2	78±12
10A1-MuLV	7,8x10 ⁴	3±1,4	4± 0,3
Mo-MuLV	3,6x10 ⁴	4±0,6	25±2,8

^b Fusionsindex: siehe Text

Bei NIH 3T3 Zellen, die mit M813 infiziert wurden, konnte keine Synzytienbildung festgestellt werden. Im Gegensatz dazu fusionierten die PA317 Zellen nach Infektion mit M813 (ein FI von 78% für PA317 im Vergleich zu 6% für NIH3T3). Die Synzytien waren sehr groß, es befanden sich teilweise bis zu 18 Kerne in den Riesenzellen. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Expression des amphotropen Env in PA317 Zellen für die Synzytienbildung durch M813 wichtig sein muss (s. Tab. 6).

Im nächsten Ansatz sollte getestet werden, ob auch andere MuLV (Mo- MuLV und 10A1) die Bildung vielkerniger Riesenzellen induzieren können. Bei der Infektion der NIH3T3 Zellen konnte keinerlei Synzytienbildung festgestellt werden (s. Tab. 6).

Auch bei der Infektion der PA317 Zellen mit 10A1-MuLV erfolgte keine Fusion der Zellen. Bei der Infektion mit Mo-MuLV fusionierten die PA317 Zellen in geringem Maße, wobei jedoch die Fusion bei Einsatz von M813 wesentlich höher ausfiel (s. Tab. 6). Zudem fanden sich nur zwei bis vier Kerne in diesen Synzytien.

Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass sowohl Eigenschaften der Zell-Linie PA 317 als auch virale Determinanten in M813 für das hohe Fusionspotential verantwortlich sind (Veröffentlicht in Prassolov et al., 2001a).

4.4.1 M813 induziert Fusion in Zellen, die unterschiedliche MuLV freisetzen

Es besteht die Möglichkeit, dass die Expression des amphotropen Env in der PA317 Zell-Linie für das erhöhte Fusionspotenzial von M813 mit verantwortlich ist. Daher sollte untersucht werden, ob nur Zellen, die amphotrope Komponenten exprimieren oder Zellen, die andere MuLV freisetzen, in der Lage sind, zusammen mit M813 die Synzytienbildung zu beeinflussen. Hierfür wurden Maus-SC1 Zellen, die unterschiedliche MuLV freisetzen, verwendet. Für diesen Versuch wurden chimäre Viren

eingesetzt wurden: Nur die rezeptorbindende Domäne des SU-Fragments von Mo-MuLV wurde gegen die entsprechende Domäne anderer MuLV ausgetauscht. Die Zellen wurden mit M813-Überständen inkubiert und anschließend auf Bildung von Synzytien hin untersucht.

Infektion uninfizierter SC1 Zellen mit M813 führte nicht zur Bildung vielkerniger Riesenzellen. Interessanterweise fand in Zell-Linien, die andere MuLV freisetzen, massive Fusion der Zellen statt (s. Tab.7) (Veröffentlicht in Prassolov et al., 2001a). Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Fähigkeit, Synzytienbildung herbei zu führen, keine spezifische Eigenschaft von amphi Env zu sein scheint.

Tab. 7: Expression von MuLV in SC1 Zellen bewirkt Synzytienbildung nach Infektion mit M813

Zielzellen	Fusionsindex (%)	
	Ohne	M813
SC1	2,4±0,7	5,4± 0,3
SC1-MoMuLV	0,8±0,14	94,0± 5,7
SC1+MoMCFV	1,6±0,6	73,2±15,6
SC1+MoAmphoV	2,0±0,6	70,1± 8,0
SC1+Mo10A1	2,8±0,01	77,4±11,9

Anschließend wurde der Versuch umgekehrt wiederholt, d.h. es wurden SC1-Zellen, die M813 exprimieren, mit unterschiedlichen MuLV inkubiert. Für diesen Versuch konnte auch 48 Stunden nach der Infektion keine Synzytienbildung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Das Vorhandensein von M813 in SC1 Zellen bewirkt keine Erhöhung des Fusionspotentials in diesen Zellen bei Infektion mit ökotropem MuLV oder 10A1.

Die Ergebnisse zeigen, dass bestimmte virale Proteine unterschiedlicher MuLV, die in den SC1-Fibroblasten exprimiert wurden, zusammen mit M813 für die Bildung von Synzytien verantwortlich waren. Entweder haben alle MuLV Env Proteine diese Eigenschaft oder andere virale Proteine (z.B. Gag-Proteine) sind für die Fusionierung der Zellen zusammen mit M813 verantwortlich.

4.5 Klonierung des M813-Rezeptors durch Expression einer cDNA-Bank aus Mauszellen in Humanzellen

In vielen Fällen ist die phänotypische Ausprägung eines Proteins bekannt, die Aminosäuresequenz jedoch nicht. Mit der Methode der Expressionsklonierung können die cDNAs dieser Proteine erhalten werden. Die Gene für viele Zytokine, Zytokinrezeptoren und Transkriptionsfaktoren wurden mit dieser Methode kloniert (zusammengefasst in Kitamura, 1998). Einige Gene, die auf diese Art und Weise charakterisiert wurden, kodieren für Proteine, die von Retroviren als Rezeptoren verwendet werden, z.B. der Xpr1-Rezeptor für xenotrope und polytrope Viren (Tailor et al., 1999). Aufgrund der bisherigen Erfolge mit der Expressionsklonierung erschien es uns viel versprechend, den unbekannten M813-Rezeptor mit dieser Methode zu untersuchen.

Auf der Oberfläche von Mauszellen ist der M813-Rezeptor vorhanden, daher sind diese Zellen mit M813 infizierbar. Humanzellen sind nicht für die Infektion mit M813 empfänglich und sollten nach Expression einer Maus-cDNA, die für den gesuchten Rezeptor kodiert, mit M813 infizierbar werden. Daher sollte versucht werden, den unbekannten M813-Rezeptor mit einer aus Mauszellen etablierten cDNA- Bank zu klonieren. Die cDNA wurde aus PA6 und MS-5 Zellen hergestellt. Beide Zell-Linien sind mit M813 infizierbar. Die cDNA wurde in einen retroviralen Vektor kloniert und in VSV-G/ampho-Pseudotypen verpackt, da sich Humanzellen mit diesen Pseudotypen infizieren lassen. Weiterhin werden mit dieser Verpackungszell-Linie meist sehr hochtitrige Überstände erhalten. Die Überstände wurden zur Infektion der TE671 Zellen verwendet, sodass anschließend die cDNA in diesen Zellen exprimiert werden sollte. Zellen, die den gesuchten Rezeptor aufweisen, können nach der Infektion mit M813-neo[®] durch Geneticin-Selektion identifiziert werden (s. Abb. 9).

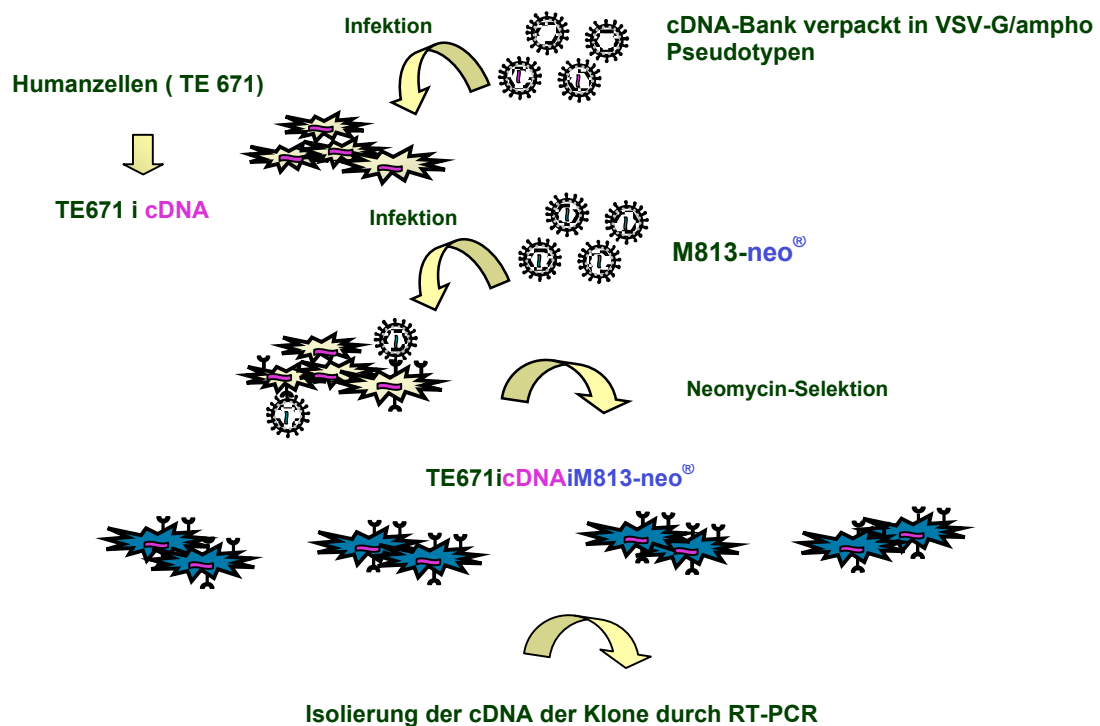


Abb.9: Strategie der Infektion von Humanzellen mit einer cDNA-Bank aus Mauszellen.

4.5.1 Klonierung und Analyse von Humanzellen, die eine cDNA-Bank aus Mauszellen exprimieren

Die cDNA-Bank wurde in VSV-Pseudotypen verpackt und die erhaltenen Überstände wurden zur Infektion der TE671 Zellen eingesetzt. Die Titer der verpackten cDNA-Bank waren nicht direkt ermittelbar, da im Expressionsplasmid kein Marker vorhanden gewesen ist. Um den Titer in etwa abschätzen zu können, wurde parallel zu diesen Ansätzen bei einem Transfektionsansatz ein eGFP-Plasmid statt der cDNA-Bank verpackt. Diese Überstände wurden auf SC1-Zellen titriert und im *FACS* analysiert. Der Titer wurde rechnerisch bestimmt und betrug durchschnittlich $2,5 \times 10^5$ /ml. Für die Infektion der Humanzellen mit der cDNA wurden unterschiedliche M.O.I.-Werte gewählt. Bei dem M.O.I.-Wert (Multiplicity of Infection) handelt es sich um eine rechnerische Größe. Der Wert gibt an, wieviele Viren pro Zelle für die Infektion

eingesetzt werden. 24 Stunden später wurden die Zellen mit MPSV-neo[®](M813) Pseudotypen infiziert. Es wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen jeweils zwei Mal am Tag Mehrfachinfektionen durchgeführt, um eine ausreichende Infektionsfrequenz zu gewährleisten. Anschließend wurden unter Geneticin-Selektion Klone hochgezogen und genauer analysiert.

Für den Kontrollansatz (insgesamt 7×10^5 Zellen) wurden TE671 Zellen, die nicht mit der cDNA-Bank infiziert wurden, eingesetzt und mit MPSV-neo[®](M813) infiziert. Es wurde lediglich ein Klon erhalten.

Wie aus Tab. 8 ersichtlich, konnten bei Einsatz der MS5-cDNA-Bank nur vier Klone erhalten werden, obwohl der M.O.I.-Wert mit 3,8 verhältnismäßig hoch war. Daher wurden für die mit der PA6-cDNA-Bank zu infizierenden Zellen wesentlich höhere M.O.I.-Werte gewählt, um eine bessere Infektionsrate zu erhalten. Für diesen Versuch wurden pro Petrischale sehr viele Klone erhalten (ca. 300). Die Klone lagen extrem dicht zusammen, sodass es nicht möglich war, einzelne Klone zu isolieren. Daher wurden aus diesen Zellen Massenkulturen hergestellt, ausplattiert und aus diesen Ansätzen wurden 40 Klone gepickt. Es konnten nur 23 Klone hochgezogen werden. Diese Klone wurden anschließend mittels PCR weiter analysiert. Die Benennung der Klone wurde entsprechend der eingesetzten cDNA-Bank gewählt:

TE671 Zellen infiziert mit MS-5-cDNA und mit M813-neo[®]: TMM#1,2,3...

bzw.

TE671 Zellen infiziert mit PA6-cDNA und mit M813-neo[®]: TPM# 1,2,3...

Tab. 8: Ergebnisse der cDNA-Bank-Klonierungen

cDNA-Bank	Getestete Zellzahl	M.O.I	Neo Klone	Neo Frequenz	Verhältnis zur Kontrolle
MS5	8×10^5	3,8	4	$5,0 \times 10^{-6}$	3,5-fach
PA6	3×10^5	23	ca. 300	$1,0 \times 10^{-3}$	700-fach
ohne	7×10^5	-	1	$1,4 \times 10^{-6}$	-

Aus allen erhaltenen Klonen wurde RNA isoliert und mit RT-PCR genauer untersucht. Zum einen wurden PCRs auf die eingesetzte cDNA-Bank durchgeführt. Die gewählten Primer flankierten die cDNA und lagen im Expressionsplasmid. Mit dieser PCR sollte sichergestellt werden, dass die cDNA in dem entsprechenden Klon enthalten

war. Zudem wurde eine PCR auf den neo[®]-Marker durchgeführt um zu prüfen, ob die Klone tatsächlich mit M813-neo[®] infiziert wurden.

Alle erhaltenen Klone waren positiv bei der PCR auf M813-neo[®]. Auch bei der PCR auf die cDNA-Bank wurden für alle Klone positive Ergebnisse erhalten, allerdings war die Größe der Banden unterschiedlich (s. Abb. 10). Zudem wurden für jeden Klon mehrere Banden erhalten, sodass sich die Frage stellte, welche der gewonnenen cDNAs für den Rezeptor kodiert. Die Klone mit gleichem Bandenmuster wurden zu Typengruppen zusammengefasst.

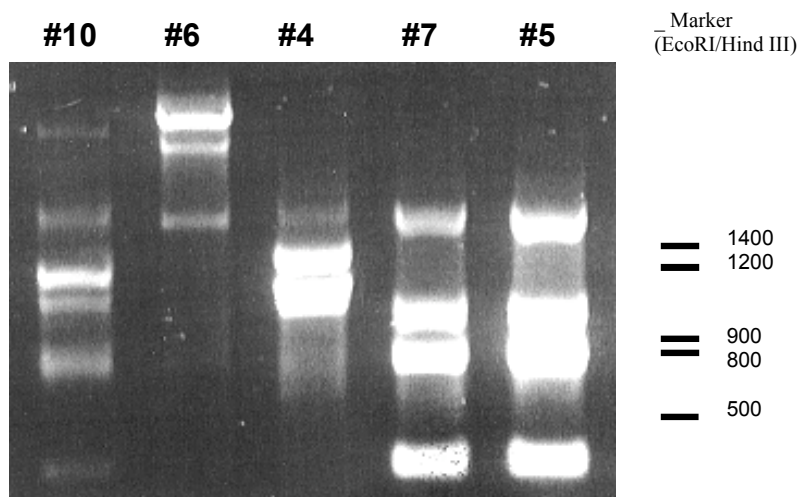


Abb.10: Exemplarische Abbildung einiger Klone, Ergebnisse der PCR auf die cDNA-Bank: Es wurden für jeden Klon mehrere Banden unterschiedlicher Größe erhalten.

Es sollte überprüft werden, ob einige der Klone den M813-Rezeptor exprimieren. Zudem wollten wir sicherstellen, dass die Klone nicht spontan mit M813 infiziert worden sind. Daher wurde die Reinfizierbarkeit der Klone mit M813 untersucht. Dies ist jedoch nur möglich, wenn die Klone nicht das M813-Provirus enthalten, da Expression des Provirus aufgrund von Interferenz eine erneute Infektion mit M813 verhindern würde. Die Klone wurden zuerst mit RT-PCR auf das Vorhandensein von M813 untersucht: Für fünf Klone wurden keine positiven Ergebnisse erhalten. Diese Klone wurden dem SFEV-eGFP (M813) Pseudotyp reinfiziert und anschließend im *FACS* analysiert.

Als positive Kontrolle für die erneute Infektion mit M813 wurden SC1 Zellen verwendet, die negative Kontrolle erfolgte auf uninfizierten TE671 Zellen. Bei den negativen Kontrolle konnte, wie erwartet, keine eGFP-Expression festgestellt werden, die positive Kontrolle mit M813 auf SC1 Zellen war zu 50 % infizierbar. Bei den mit der cDNA-Bank infizierten Klonen war nur bei einem Klon (TPM#7) eGFP-Expression messbar (34%) (s. Abb. 11). Das bedeutet, dass in diesem Klon der gesuchte M813-Rezeptor vorhanden sein sollte. Allerdings wurden für den Klon bei der PCR-Analyse auf die cDNA-Bank (s. vorhergehender Abschn.) mehrere unterschiedliche Banden erhalten, daher besteht die Möglichkeit, dass eine dieser Banden für den gesuchten Rezeptor kodiert.

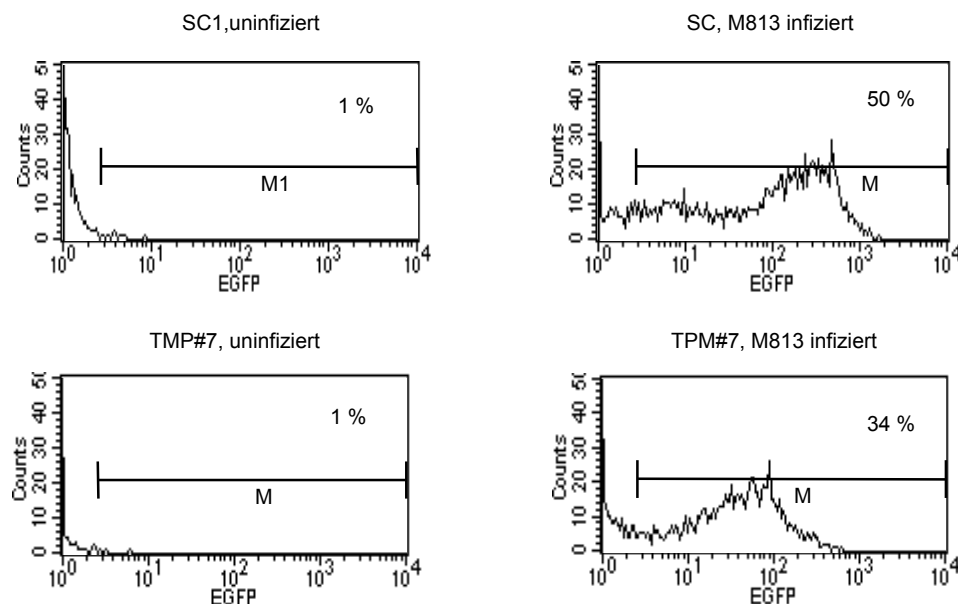


Abb. 11: Die Ergebnisse der FACS-Analysen des Klon TPM#7 nach der Infektion mit M813.

4.5.2 Analyse der cDNA aus einem M813-infizierbaren Klon

Es könnte sein, dass Klon TPM#7 über die cDNA den gesuchten Rezeptor exprimiert. Daher sollte versucht werden, die entsprechende cDNA aus diesen Zellen zu mobilisieren und als einzelne Kopie in TE671 Zellen zu exprimieren (s. Abb. 12).

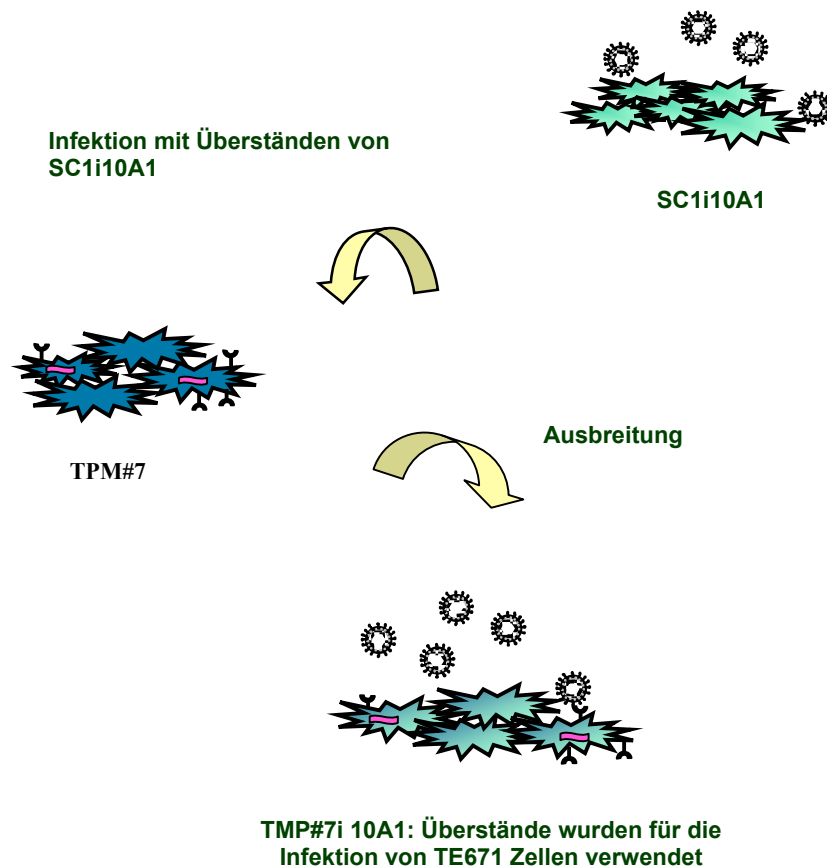


Abb.12: Die Herstellung einer neuen Zell-Linie: SC1-10A1 Überstände wurden verwendet, um die in Klon TPM#7 enthaltenen cDNAs zu mobilisieren. Die Überstände der neuen Zell-Linie (TPM#7i10A1) wurden anschließend zur Infektion von Humanzellen (TE671) verwendet.

TPM#7 Zellen wurden mit 10A1-MuLV infiziert, da das Virus Humanzellen infizieren kann. Die Ausbreitung erfolgte innerhalb von zehn Tagen. 10A1 ist replikationskompetent und da die cDNA in einen retroviralen Vektor kloniert wurde, müssten die von dieser Zell-Linie produzierten 10A1-Viren auch die cDNA enthalten bzw. „mitverpacken“ (s. Abb. 12). Die Überstände der neuen Zell-Linie (TPM#7i10A1) wurden zur Infektion von TE671 Zellen verwendet (TE671i#7i10A1). Sollte in TPM#7 die gesuchte cDNA enthalten gewesen sein, müssten die nun etablierten Zellen mit MPEV-eGFP(M813) infizierbar werden. TE671 Zellen wurden zuerst mit Überständen von TPM#7i10A1 und nachfolgend mit M813 infiziert. Zwei Tage später wurden die Zellen sortiert und als Einzel- und Mehrfachzellablage in 96-Loch Platten abgelegt. Die Ansätze wurden zu Klonen hochgezogen und auf eGFP-Expression im *FACS* analysiert.

Zur positiven Kontrolle wurden SC1 Zellen mit MPEV-eGFP(M813) infiziert, die negative Kontrolle erfolgte auf uninfizierten TE671 Zellen.

Die positive Kontrolle konnte zu 91% mit M813 infiziert werden, die Infektionsbedingungen waren somit sehr gut. Bei der negativen Kontrolle auf TE671 Zellen, war, wie erwartet, keine eGFP-Expression messbar. Für die neue Zell-Linie TE671i#7i10A1 konnte bei Infektion mit M813-eGFP in 5% der Zellen eGFP-Expression gemessen werden, sodass demnach die von uns gesuchte Rezeptor-cDNA in den neu etablierten Zellen enthalten sein sollte. Diese Zellen wurden zu Klonen hochgezogen. Obwohl sehr viele Zellen in unterschiedlicher Zellzahlablage (eine Zelle bzw. drei Zellen pro Loch) in 96-Loch Platten abgelegt wurden, ließen sich die Zellen nur sehr schlecht klonieren. Aus insgesamt 384 Ansätzen konnten nur neun Klone erhalten werden. Die Klonierungseffizienz (2,3%, bzw. 3×10^{-2}) war somit extrem niedrig.

Die cDNA dieser neuen Klone wurde analysiert. Vier von neun Klonen enthielten einzelne Kopien der cDNA, deren Größe jedoch wieder unterschiedlich war und 1,1 bis 1,8 kb betrug. Sequenzanalysen ergaben, dass jeder dieser Klone eine andere cDNA enthielt. Keines der Proteine kam als Rezeptor in Frage, da es sich nicht um membranständige Oberflächenproteine handelte.

Trotz vielfältiger unterschiedlicher Versuche war es nicht möglich, den Rezeptor von M813 über die cDNA-Bank zu klonieren. Es besteht die Möglichkeit, dass M813 aufgrund von Spontanmutationen in einigen Fällen doch vereinzelt Humanzellen infizieren konnte, sodass wir daher immer einen sehr hohen Hintergrund erhalten haben. Denkbar ist auch, dass die cDNA einfach zu groß gewesen ist. Diese Methode erwies sich somit leider als Fehlschlag.

4.6 Lokalisierung des M813-MuLV Rezeptorgens mit der „Whole Genome-Radiation Hybrid Map (WG-RH) Methode“

Da mit der cDNA-Bank aus Mauszellen der gesuchte Rezeptor nicht kloniert werden konnte, wurde eine andere Strategie eingesetzt. Aufgrund vorheriger Arbeiten ging man davon aus, dass sich das Gen für den M813-Rezeptor auf Chromosom 2 befinden könnte (Rapp und Marshall, 1980). Die Lokalisierung des Rezeptorgens sollte mit der „WG-RH“ Methode bestimmt werden. Mit dieser Methode konnten in der

Vergangenheit schon erfolgreich Gene für Rezeptoren lokalisiert werden. So wurde zum Beispiel kürzlich das Rezeptorgen für das Jaagsiekte-Schaf Retrovirus mit einer Hybrid-Linie aus Hamster- und Humanzellen erfolgreich lokalisiert (Rai et al., 2001). Mit der Methode kann jedoch nur ein bestimmter Abschnitt innerhalb des Chromosoms bestimmt werden, in dem das Gen lokalisiert ist, die Klonierung des Gens ist mit dieser Technik nicht möglich.

Zur Herstellung der Hybridzellen wurden Mauszellen bestrahlt, um ihr Genom zu fragmentieren. Diese Zellen wurden anschließend mit Hamsterzellen fusioniert. Die Linie bestand aus 100 Zellen, wobei in jeder Zelle durchschnittlich 31% des Mausgenoms enthalten waren. Die Genbereiche des Mausgenoms, die in den jeweiligen Hamsterzellen vorhanden gewesen sind, wurden über 271 Marker gut charakterisiert (McCarthy et al., 1997).

Die Hybrid-Zellen wurden in einer Anzahl von 5×10^4 Zellen pro Loch in Sechslöchplatten ausplattiert und mit MPEV-eGFP (M813) infiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Ansätze, die mehr als 25 eGFP-Kolonien enthielten, wurden als positive Ansätze gezählt. Anhand der positiven Ansätze konnte die Lokalisation des Rezeptorgens über die bekannten Chromosomenmarker eingengt werden.

Die Auswertung wurde von Linda Rowe mit der " Jackson Laboratory Mouse Radiation Hybrid Database"

(<http://www.jax.org/resources/documents/cmdata/rhmap/RHIntro.html>) durchgeführt.

Diese Auswertung zeigte, dass sich das gesuchte Gen sehr wahrscheinlich am distalen Ende von Chromosom 16 in der Nähe des EST AA51763 Markers befindet und nicht, wie bisher angenommen, auf Chromosom 2. Anschließend wurden die flankierenden Bereiche des Markers mit der "Celera Maus-Genom Datenbank" durchsucht, um Gene zu identifizieren, die als Rezeptor in Betracht kamen. In dem für uns interessanten Chromosomenabschnitt befanden sich mehrere Gene (s. Abb. 13). Vielversprechend erschien uns das *Slc5a3* Gen, das für den Natrium-Myo-Inositol Transporter (Sodium-Myo-Inositol Transporter 1:SMIT1) kodiert. Das Protein gehört zur Familie der Natrium-Glukose Kotransporter und weist 13 Helices auf, die die Membran durchspannen (Turk et al., 1997). Die bisher in *M. musculus* charakterisierten

Rezeptoren sind ebenfalls membranständige Transporterproteine, daher erschien uns dieses Protein als Rezeptor für M813 geeignet.

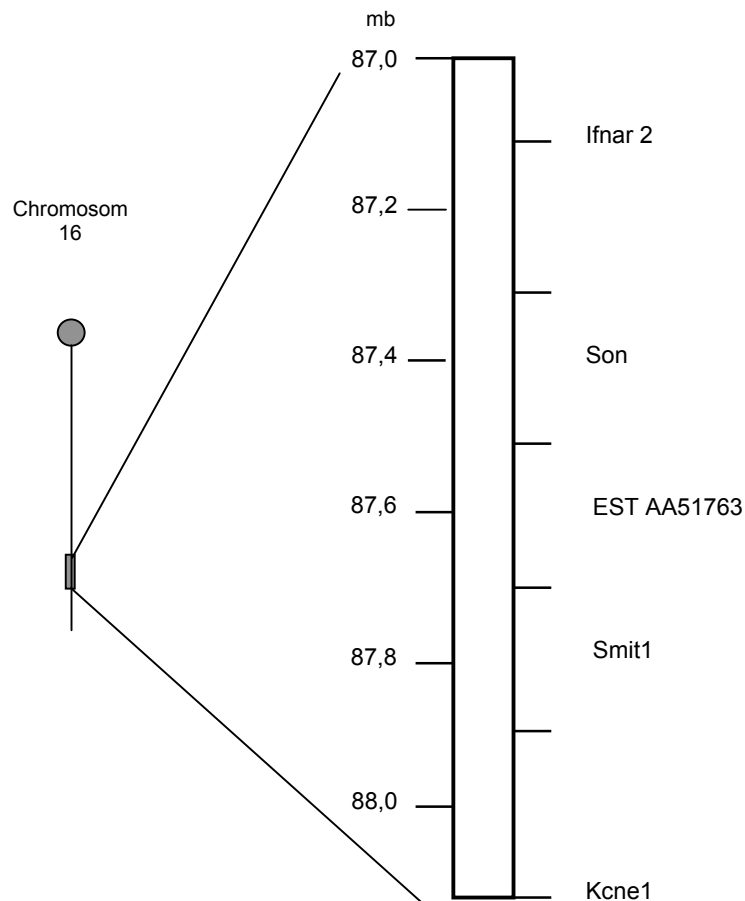


Abb.13: Schematische Darstellung des distalen Endes von Chromosom 16, eingezeichnet sind einige Proteine und der Marker (EST AA51763), in dessen Nähe sich SMIT1 befindet, (Einheit in Megabasen (mb)).

4.7 M813 infiziert Humanzellen, die das *Slc5a3*-Gen exprimieren

Zuerst wurde RNA aus Maus-SC1 Fibroblasten isoliert. Anschließend wurde die *Slc5a3* cDNA mit RT-PCR amplifiziert, wobei die verwendeten Primer die kodierende Region flankierten. Die erhaltene Bande von 1 kb wurde isoliert, sequenziert und anschließend in ein retrovirales Expressionsplasmid mit *neo*[®]-Marker kloniert. Der mSMIT1-Vektor bzw. der *neo*[®]-Kontrollvektor wurde in VSV-Pseudotypen verpackt, und die Überstände wurden zur Infektion von Humanzellen (TE671) eingesetzt.

Anschließend erfolgte zwei Wochen lang Selektion mit Geneticin, sodass folgende Zell-Linien etabliert wurden:

TE671-mSMIT1 (= TE671iR895), in der das potenzielle Rezeptorgen (SMIT1 aus Maus: mSMIT1) exprimiert wurde und die Kontrollzell-Linie TE671-neo[®] (TE671iR338). Diese Zell-Linien wurden mit MPEV-eGFP(M813) infiziert und einige Tage später im *FACS* analysiert. Als positive Kontrolle wurden SC1 Zellen eingesetzt, da sich SC1-Zellen mit M813 infizieren ließen. Die Versuche wurden mehrfach wiederholt, um voneinander unabhängige Ergebnisse zu erhalten.

Zuerst sollten die Titer der MPEV-eGFP(M813) Überstände auf SC1 Zellen bestimmt werden. Der Mittelwert mehrerer Ansätze betrug durchschnittlich 29%, was rechnerisch einem Titer von $1,5 \times 10^4$ entsprach und für unsere Versuche ausreichend war.

Weiterhin sollte sichergestellt werden, dass die neu etablierten Zell-Linien nicht mit fremden eGFP-Plasmiden kontaminiert waren. Bei einer Kontamination mit Fremdplasmid würden die Zellen -uninfiziert analysiert- bei der *FACS*-Analyse positive Ergebnisse liefern, was nicht der Fall war (s. Abb. 14).

Die negative Kontrolle der TE671-neo[®] Zellen ließ sich, wie erwartet, nicht mit M813 infizieren. Im Gegensatz dazu waren die TE671-mSMIT1 Zellen zu 52 % mit M813 infizierbar (s. Abb. 14). Die Ergebnisse konnten unabhängig voneinander mehrfach reproduziert werden. Gleiche Resultate konnten für die Infektion mit einem chimären Virus, bei dem die aminoterminalen Env Sequenz von Mo-MuLV gegen diejenige von M813 ausgetauscht wurde, erhalten werden. Weiterhin zeigte sich, dass die TE671-SMIT1 Zellen nicht für die Infektion mit ökotropem MuLV (Mo-MuLV) empfänglich waren, obwohl ausreichend hohe Titer auf Mauszellen (SC1) erhalten wurden. Alle Zellen waren für die Infektion mit 10A1 empfänglich (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass es sich bei mSMIT1 um den gesuchten M813 Rezeptor handelt (Hein et al., 2002; zur Veröffentlichung eingereicht).

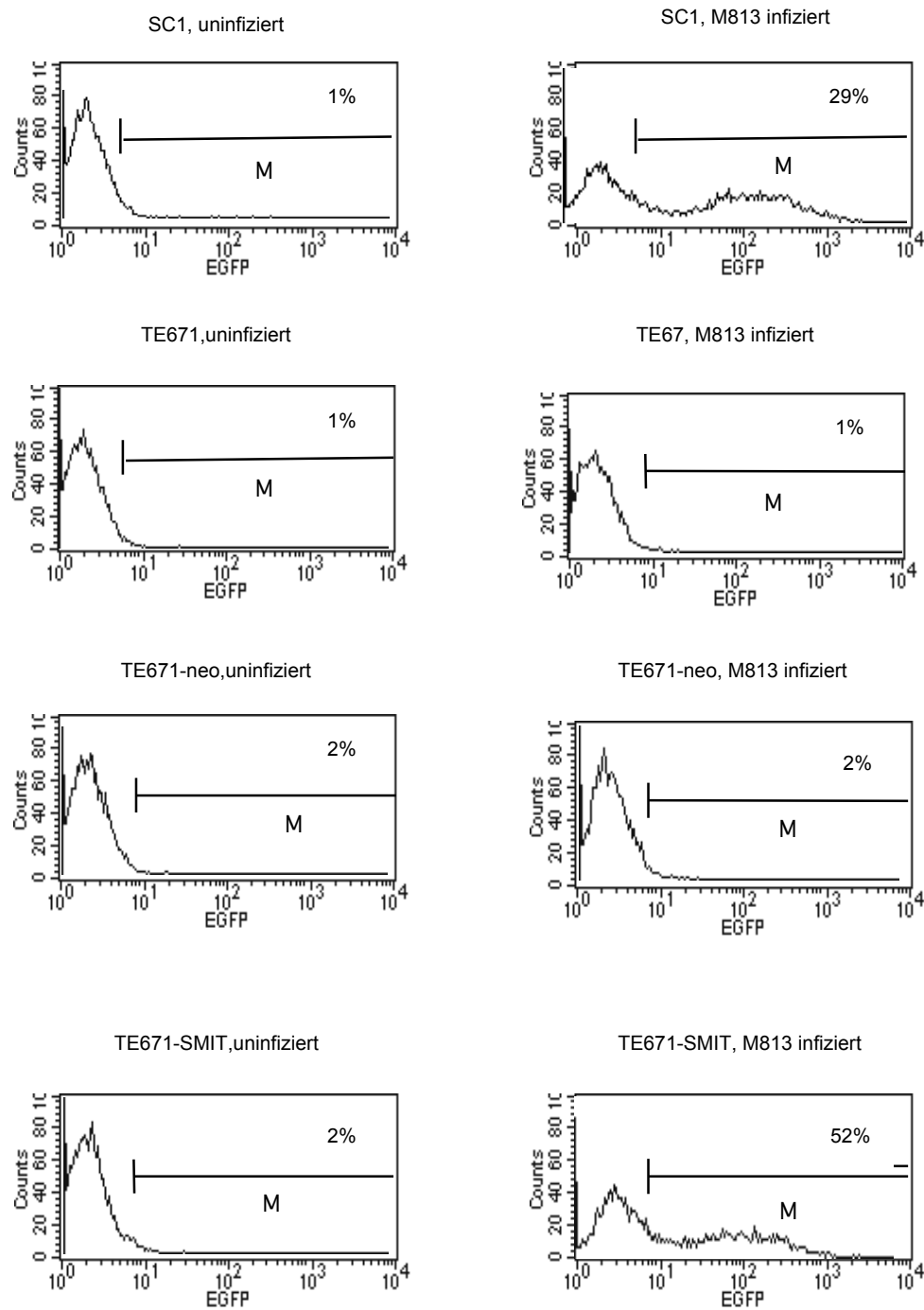


Abb. 14: Die Ergebnisse der FACS-Analysen: Humanzellen, die mSMIT1 exprimieren, wurden mit M813 infiziert und waren anschließend für die Infektion mit M813 empfänglich.

5 Diskussion

Der erste entscheidende Schritt bei der Infektion mit Retroviren ist die Bindung des viralen Glykoproteins (Env) an den passenden Rezeptor auf der Zelloberfläche. Die Verbindung bewirkt eine Konformationsänderung des Hüllproteins, was anschließend zur Fusion der viralen und zellulären Membran führt. Mutationen innerhalb der *env* Gene können zur Folge haben, dass andere Zelloberflächenproteine als Rezeptoren erkannt werden. Miteinander verwandte Viren benutzen zwar unterschiedliche Rezeptoren, diese weisen jedoch innerhalb einer Virusgruppe beträchtliche Gemeinsamkeiten auf. Die bisher am besten charakterisierten MuLV wurden aus *M. musculus* isoliert, daneben konnten auch Isolate aus anderen Mausspezies gewonnen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals Interferenzversuche für das M813 Isolat aus *M. cervicolor* angefertigt um zu untersuchen, ob das Virus einen neuen oder einen schon bekannten MuLV-Rezeptor für die Infektion verwenden kann. Es zeigte sich, dass M813 einen eigenen neuen Rezeptor für die Infektion verwendet. Aufgrund bisher publizierter Daten (Rapp und Marshall, 1980) ging man davon aus, dass sich das Rezeptorgen auf Chromosom 2 befindet. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass sich das Gen auf Chromosom 16 lokalisiert ist. Die Expression des Gens in Humanzellen bewirkte, dass diese empfänglich für die Infektion mit M813 wurden. Die Ergebnisse beweisen, dass M813 einen neuen eigenen Rezeptor verwenden kann. Im Vergleich mit schon bekannten Rezeptoren zeigten sich viele Gemeinsamkeiten im Hinblick auf die Struktur und Funktion der Proteine. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass M813 zusammen mit anderen viralen Komponenten für die Synzytienbildung von Zellen verantwortlich ist.

5.1 M813 stellt eine neue Interferenzgruppe dar

Wie in Abschnitt 2.2.4 genauer beschrieben sind Zellen, die bereits retroviral infiziert sind, resistent gegenüber Superinfektion mit Retroviren, die den gleichen Rezeptor benutzen. Die Infektion mit Viren, die einen anderen Rezeptor erkennen, wird nicht beeinflusst. Anhand von Interferenzversuchen können Aussagen über die

Verwendung von Rezeptoren gemacht werden. M813 wurde anfangs als Maus-Leukämievirus mit ökotropem Wirtsspektrum eingeteilt (Benveniste et al., 1977; Marshall und Rapp, 1979). Daher sollte zuerst mit Interferenzversuchen geklärt werden, ob das M813-Isolat zur ökotropen oder zu einer eigenen Interferenzgruppe gehört. Die Ergebnisse zeigten, dass M813 eine eigene neue Gruppe definiert.

Zellen, die bereits amphotrope-, polytrope MuLV oder 10A1 freisetzen, sind für die Infektion mit M813 empfänglich. Die Ergebnisse zeigen, dass M813 einen anderen Rezeptor für die Infektion verwendet, der von diesen MuLV nicht erkannt wird. Erstaunlicherweise bestand eine leichte Interferenz bei der Infektion mit ökotropem MuLV in Zellen, die bereits M813 exprimieren. Im Gegensatz dazu zeigte sich in Zellen, die ökotrope MuLV freisetzen und mit M813 infiziert wurden, keine Interferenz. Aufgrund dieser einseitigen geringen Interferenz bestand die Möglichkeit, dass M813 zusätzlich zu einem eigenen Rezeptor auch den ökotropen Rezeptor mCAT1 verwenden kann, jedoch mit geringerer Präferenz.

Diese besondere Form der einseitigen Interferenz kann auf die Verwendung von zwei Rezeptoren hinweisen, wie es zum Beispiel bei 10A1 der Fall ist: Zellen, die 10A1 freisetzen, können nicht mit amphotropen Viren infiziert werden, da durch endogene Expression von 10A1-Env der amphotrope Pit-2 Rezeptor blockiert wird. Im Gegensatz dazu können Zellen, die amphotrope Viren freisetzen, zudem mit 10A1 infiziert werden, da 10A1 zusätzlich zum amphotropen Rezeptor Pit-2 auch das Oberflächenprotein Pit-1 für die Infektion verwenden kann, allerdings mit geringerer Bevorzugung (Wilson et al., 1994; Miller et al., 1994).

Es wurden weitere Versuche durchgeführt um zu überprüfen, ob M813 eventuell auch den ökotropen Rezeptor für den Eintritt in die Zelle benutzen kann. Humanzellen können nicht mit M813 infiziert werden, daher wurde der ökotrope Rezeptor mCAT1 in diesen Zellen exprimiert und anschließend wurden die Zellen mit M813 infiziert. Es stellte sich heraus, dass die Zellen nicht für die Infektion M813 empfänglich wurden. Die Ergebnisse dieser Versuche belegen, dass M813 den ökotropen Rezeptor nicht verwenden kann.

Wie lässt sich die leichte Interferenz mit Mo-MuLV, die während der ersten Versuche beobachtet wurde, erklären? Es konnte nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die geringe Interferenz auf der Verwendung von CAT3 beruht. CAT3 ist

mit mCAT1 verwandt und kann auch die Infektion vermitteln. Dagegen spricht allerdings zum einen, dass ökotrope MuLV diesen verwandten Rezeptor nur schlecht verwenden können (Masuda et al., 1999). Zum anderen befindet sich dieser Rezeptor nur auf der Oberfläche von Gehirnzellen. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch SC1 Fibroblasten verwendet und auf deren Oberfläche ist das verwandte Protein nicht vorhanden. Es besteht die Möglichkeit, dass die geringe Interferenz zwischen ökotropem MuLV und M813 nicht direkt mit der M813-Expression an sich zusammen hing, sondern durch andere Viren zustande kam, die in der Original-M813 Produzentenzell-Linie vorhanden gewesen sind. Die Isolierung einer Env-Sequenz mit RT-PCR, die dem ökotropen C3H Virus ähnelt, unterstützt diese Hypothese (Ziegler und Stocking, nicht veröffentlichte Ergebnisse).

Weitere Untersuchungen weisen darauf hin, dass M813 einen neuen Rezeptor erkennen kann. In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass durch Austausch der Env-Sequenz von Mo-MuLV gegen diejenige von M813 ein chimäres replikationskompetentes Virus (Mo-M813) mit dem Wirtsspektrum von M813 entsteht. In Zellen, die Mo-MuLV exprimieren, zeigte sich keinerlei Interferenz mit Mo-M813 (Prasolov et al. 2001b). Weiterhin konnten wir anhand von vergleichenden Analysen belegen, dass die Sequenz der aminoterminalen rezeptorbindenden SU-Domäne von M813 nur sehr geringe Homologie (37%) mit entsprechenden Bereichen anderer MuLV aufweist und genau diese Domäne ist in erster Linie für die Bindung an den Rezeptor erforderlich (Battini et al., 1995; Han et al., 1998). Die Bereiche, die nicht wesentlich an der Rezeptorerkennung beteiligt sind (der carboxyterminale Teil von SU und die TM-Domäne), zeigen eine bedeutend höhere Homologie von 76% (Prasolov et al., 2001b). Diese Tatsache unterstützt unsere Vermutung, dass M813 nur einen eigenen und nicht mCAT1 als Rezeptor verwenden kann.

Wie können die Sequenzen, die für die Bindung an den Rezeptor wichtig sind, im Fall von M813 entstanden sein? Auch das Wirtsspektrum ökotroper MuLV aus *M. musculus* ist sehr eingeschränkt, da diese Viren nur Maus- und Rattenzellen infizieren können. Man vermutet, dass das ökotrope Env durch Austausch der rezeptorbindenden Domäne im N-terminalen Teil des SU-Proteins eines xenotropen Virus durch eine analoge Region eines unbekannten Virus oder einer zellulären Sequenz, die den Rezeptor binden kann, entstanden ist (Stoye und Coffin, 1987). Ein ähnlicher Austausch

innerhalb der Env-Sequenz könnte auch bei M813 erfolgt sein, sodass anschließend eine neuartige Bindungsstruktur entstanden ist, die die Verwendung eines neuen Rezeptors ermöglichte.

Die Ergebnisse der Interferenzversuche und die Unterschiede im Hinblick auf die Sequenz der SU-Domäne zeigen, dass M813 eine einzigartige bzw. neue, noch nicht charakterisierte Bindungsstruktur aufweist, die sich erheblich von den bisher bekannten Domänen unterscheidet.

5.2 Klonierung des M813-Rezeptors mit der „Whole Genome-Radiation Hybrid Map Methode“

Für die Charakterisierung des M813-Rezeptors wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet. Mit der zuerst angewandten cDNA-Expressionsklonierung war es nicht möglich, den gesuchten Rezeptor zu identifizieren, da zu viele unterschiedliche Sequenzen erhalten wurden und keine davon als Rezeptor in Betracht kam. Was können die Ursachen hierfür sein?

Insgesamt ist nicht klar, warum keiner der M813-positiven Klone die richtige cDNA enthalten hat. Wir vermuten, dass die Spontanmutationsfrequenz der Humanzellen zu hoch war, sodass viele Zellen mit M813 infiziert wurden, ohne den passenden M813-Rezeptor zu exprimieren. Die Infektionen wurden mit Polybren (einem Polykation) durchgeführt, um die Infektionseffizienz zu erhöhen. Man nimmt an, dass durch Polybren negativ geladene Anteile näher zusammen gebracht werden und somit eine bessere Verbindung zwischen Rezeptor und Virus hergestellt wird (Mastromarino et al., 1992; Andersen et al., 1994). Es besteht die Möglichkeit, dass die Humanzellen aufgrund der schnell aufeinander folgenden Mehrfachinfektionen mit Polybren durchlässig für die Infektion mit M813 wurden, ohne den entsprechenden Rezeptor zu exprimieren. Weiterhin könnte es sein, dass in einigen TE671-Zellen Punktmutationen innerhalb des humanen Rezeptors vorlagen und zu Veränderungen in der Struktur des Proteins führten, sodass M813 das Protein als Rezeptor verwenden konnte. Die Tatsache, dass einzelne Mutationen die Funktion eines Proteins als Rezeptor erheblich beeinflussen können, konnte für Mo-MuLV gezeigt werden: Mo-MuLV kann aufgrund einer Punktmutation den ökotropen Rezeptor in *M. dunni* Zellen nicht verwenden.

Andere ökotrope Viren, z.B. Friend-MuLV, sind davon nicht betroffen und können den Rezeptor in *M. dunni* Zellen nutzen. Wird die Mutation gezielt rückgängig gemacht, sind auch *M. dunni* Zellen mit Mo-MuLV infizierbar (Eiden et al., 1993).

Denkbar wäre auch, dass das Rezeptorgen aufgrund geringer Expression der cDNA-Bank nicht ausreichend genug vertreten war, sodass das Expressionsniveau des Rezeptorgens in unseren TE671 Zellen zu niedrig gewesen ist.

Ferner besteht die Möglichkeit, dass die Rezeptor-cDNA aufgrund ihrer Größe nicht amplifiziert werden konnte.

Anschließend wurde die "Whole Genome-Radiation Hybrid Map Methode" angewendet. Mit dieser Methode konnten in der Vergangenheit schon erfolgreich Gene lokalisiert und nachfolgend kloniert werden. So wurden zum Beispiel die Rezeptorgene für das Jaagsiekte-Schaf Retrovirus und für MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) über Hybridzellen aus Hamster- und Humanzellen kloniert (Rai et al., 2001; Ross et al., 2002).

Wir konnten zeigen, dass sich das Gen für den M813-Rezeptor auf dem distalen Ende von Chromosom 16 befindet (s. Abb. 13). Unser Ergebnis steht im Widerspruch zur bisherigen Veröffentlichung von Rapp und Marshall, die den Rezeptor auf Chromosom 2 vermutet haben (Rapp und Marshall, 1980). Was können die Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse sein?

Auch für die ersten Versuche wurden, wie in unserem Fall, Hybridzellen aus Hamster- und Mauszellen verwendet (Rapp und Marshall, 1980). Wir vermuten, dass das Ergebniss aufgrund der limitierten Anzahl der verwendeten Chromosomenmarker nicht exakt genug war, da insgesamt nur 20 Marker benutzt wurden, um die Chromosomenabschnitte zu bestimmen. Daher konnte nur eine sehr grobe Lokalisierung erfolgen. In unseren Hybridklonen wurden die Chromosomenabschnitte über insgesamt 271 Marker charakterisiert. Durch die große Anzahl konnte eine wesentlich engere und genauere Eingrenzung der einzelnen sich überlappenden Abschnitte erfolgen, sodass wir das Gen auf einem anderen Chromosom lokalisiert haben.

Für unsere Versuche wurden 100 mit M813 infizierte Hybridklone ausgewertet. Wir konnten innerhalb des ermittelten Chromosomenabschnitts ein viel versprechendes Gen identifizieren (*Slc5a3*). In unserem Fall war von Vorteil, dass viele Gene innerhalb des

ermittelten Chromosomenabschnitts von Anfang an ausgeschlossen werden konnten, da die Proteine nicht membranständig waren und folglich nicht als Rezeptor in Betracht kamen, sodass die Auswahl eines geeigneten Kandidaten erheblich vereinfacht wurde.

Das Gen wurde aus Mausfibroblasten kloniert und anschließend in Humanzellen exprimiert. Diese Zellen waren nachfolgend für die Infektion mit M813 empfänglich. Damit haben wir bewiesen, dass es sich bei mSMIT1 um den von uns gesuchten M813-Rezeptor handelt.

5.3 Welche Gemeinsamkeiten bestehen zwischen den bisher charakterisierten MuLV- Rezeptoren und dem neu klonierten M813-Rezeptor?

Der von mir klonierte M813-Rezeptor mSMIT1 gehört in die Gruppe der Natrium-Substrat Symporter (SSF). Diese Transporterfamilie umfasst mehr als 40 Mitglieder sowohl pro- als auch eukaryotischen Ursprungs, wobei innerhalb dieser Gruppe große Gemeinsamkeit im Hinblick auf die Sequenz vorliegt. Sie sind in der Lage, freie Energie, die in Form eines elektrochemischen Natrium-Gradienten gespeichert ist, zur Anhäufung eines bestimmten Substrats, z.B. einer Aminosäure, zu verwenden. Innerhalb der Gruppe der eukaryotischen SSF befinden sich in erster Linie Transporter für Glukose (SGLT), Nukleotide (SNST) und Myo-Inositol (Sodium Myo-Inositol Transporter 1: SMIT1) (Überblick in Reizer et al., 1994; Turk und Wright, 1997).

Die Transporter dieser Gruppe sind membranständige Proteine und weisen auf struktureller Ebene ein gemeinsames Motiv aus 13 Helices auf. Für SMIT1 und SGLT1 wird angenommen, dass sie zusätzlich zu dem gemeinsamen Motiv aus 13 Helices noch über eine weitere 14. Domäne verfügen. In vielen Fällen bewirkt die Bindung des natürlichen Liganden eine Konformationsänderung des Transporterproteins (Turk und Wright, 1997) (s. Abb. 16).



Abb. 16: Die Abbildung zeigt ein Modell des M813-Rezeptors mSMIT1, Glykosylierung an Aminosäure 251 (verändert nach Turk und Wright, 1997).

Alle bisher charakterisierten Rezeptoren der Gamma- und D-Typ-Betaretroviren sind membranständige Transporterproteine, die die Zellmembran mehrfach durchspannen (Überblick in: Overbaugh et al., 2001b). Beim ökotropen Rezeptor mCAT1 handelt es sich um ein Glykoprotein mit 14 membrandurchspannenden Domänen, das in Abhängigkeit von Natrium bestimmte Aminosäuren (Lysin, Ornithin und Arginin) transportiert. In Zellen, die chronisch mit ökotropen MuLV infiziert sind, erfolgt ein vollständiger Verlust des Proteins als Rezeptor, die Transporteraktivität bleibt erhalten, wenn gleich jedoch eine leichte Reduzierung der Aminosäureaufnahme beobachtet werden kann. Vermutlich sind die Bindungsstellen für Substrat und Virus verschieden (Kavanaugh et al., 1994a).

Die Rezeptoren für amphotrope MuLV (Pit-2) sowie GALV (Pit-1), FeLV-B (Pit-1) und 10A1 (Pit-1 und Pit-2) sind membranständige Phosphattransport-Proteine mit 10 membrandurchspannenden Domänen (sog. Typ III-Phosphattransporter). Auch diese beiden Proteine sind in ihrer Funktion natriumabhängig. Beide Rezeptoren werden in vielen verschiedenen Geweben exprimiert und spielen eine wichtige Rolle beim Phosphattransport (Kavanaugh et al., 1994b; Olah et al., 1994).

Bei dem kürzlich klonierten Rezeptor für das Betaretrovirus RD114 handelt es sich ebenfalls um einen natriumabhängigen Aminosäuretransporter (hASCT2) (Rasko et al., 1999), der interessanterweise auch vom HERV-W-Glykoprotein (Human Endogenous Retrovirus Type W) gebunden werden kann. Das HERV-W-Glykoprotein kann zusätzlich zum hASCT2 Rezeptor auch den ähnlichen Rezeptor hASCT1 verwenden.

Die Bindung des Glykoproteins an den passenden Rezeptor kann massive Synzytienbildung induzieren (Blond et al., 2000; Lavillette et al., 2002) (genauer s. Abschn. 5.5).

Die Env-Hüllproteine sind in struktureller Hinsicht sehr ähnlich aufgebaut (s. Abb. 17), daher könnte es sein, dass Gamma- und D-Typ-Betaretroviren einen speziellen Mechanismus für den Eintritt in die Zelle benötigen, der am besten von Transporterproteinen vermittelt werden kann, sodass nur wenige Zelloberflächenproteine als Rezeptoren in Frage kommen (Overbaugh und Bangham, 2001). Zudem besteht die Möglichkeit, dass diejenigen Strukturen, die für den Natriumkotransport wichtig sind, auch eine entscheidende Rolle bei der Virusbindung spielen.

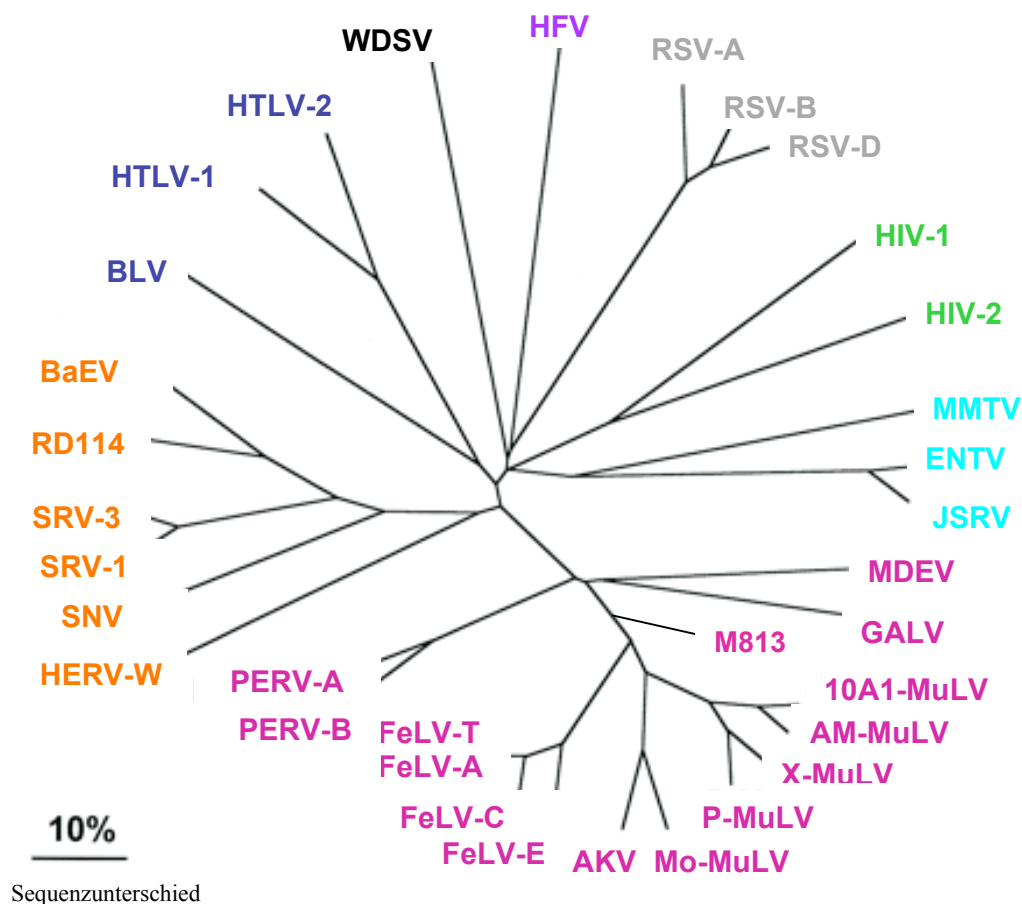


Abb. 17: Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Aminosäuresequenz der retroviralen Env-Proteine innerhalb der sieben verschiedenen Retrovirusgattungen; Viren, die in einer Farbe eingetragen sind, gehören der gleichen Gattung an: Alpharetroviren, Betaretroviren (Type D), Betaretroviren (Type B), Gammaretroviren, Deltaretroviren, Epsilonretroviren, Spumaretroviren, Lentiviren; Abkürzungen: 10A1-MuLV: 10A1 Maus-Leukämievirus; AKV: AKR-MuLV, AM-MuLV: amphotropes Maus-Leukämievirus; BLV: Rinder-Leukämievirus; ENTV: Enzootic Nasal Tumovirus; FeLV: Katzen-Leukämievirus; GALV: Gibbon-Affen Leukämievirus; HERV: Humanes Endogenes Retrovirus; HFV: Humanes Foamy-Virus; HIV: Immundefizienzvirus des Menschen; JSRV: Jaagsietke Schaf Retrovirus; MDEV: *M. dunni* Endogenes Virus; Mo-MuLV: Moloney Maus-Leukämievirus; P-MuLV: Polytropes Maus-Leukämievirus; PERV: endogenes Retrovirus in Schweinen; RD114: endogenes Retrovirus in Katzen; RSV: Rous Sarkoma Virus; SRV (= MPMV): Mason Pfizer Affenvirus; X-MuLV: Xenotropes Maus-Leukämievirus.

Nicht alle Retroviren verwenden mehrfach die membrandurchspannende Transporterproteine als Rezeptoren: Lentiviren (s. Abb. 17) benutzen den Zelloberflächenmarker CD4 als Rezeptor (Sweet et al., 1991). Das Protein durchspannt die Membran nur ein Mal. Auch die Retroviren der anderen Gattungen verwenden Rezeptoren, die die Membran nur einfach durchspannen. So benutzt zum Beispiel das

B-Typ Betaretrovirus MMTV den Maus Transferrin Rezeptor 1 für die Infektion (Ross et al., 2002). Die Infektion ist dabei pH-abhängig und die Änderungen der Konformation der Env-Proteine finden erst nach Aufnahme in Endosomen statt (Ross et al., 2002).

HIV benötigt zusätzlich ein mehrfach die Membran durchziehendes Protein als Korezeptor. Der Korezeptor (CCR5 oder CXCR4) spielt eine entscheidende Rolle bei der Fusion der viralen und zellulären Membran (Deng et al., 1996; Feng et al. 1996).

Die Proteine, die innerhalb einer bestimmten Virusgruppe als Rezeptoren erkannt werden, sind in ihrer Funktion und Struktur sehr ähnlich. Die unterschiedlichen Bindungsdomänen im Bereich des SU-Proteins sind im Laufe der Evolution entweder durch Mutationen oder durch Austausch der Sequenzen infolge von Rekombination entstanden (Kozak und O'Neil, 1987). Man vermutet, dass ein gemeinsames unbekanntes Vorläufervirus der xenotropen und polytropen Viren in die *Mus* Keimbahn gelangt ist (Kozak und O'Neil, 1987; Tomonaga und Coffin, 1999). Mutationen innerhalb des xenotropen Env-Proteins führten zur Entstehung polytroper Viren mit einem erweiterten Wirtsspektrum. Diese waren in der Lage, Populationen von Wildmäusen zu infizieren (Marin et al., 1999). Mutationen in Env, die zu einem größeren Zelltropismus führen und/oder zur Verwendung anderer neuer Rezeptoren wurden auch für 10A1 beschrieben: das Virus entstand durch Rekombination eines exogenen amphotropen Virus, das nur Pit-2 als Rezeptor verwenden kann, mit endogenen polytropen Sequenzen. 10A1 weist im Vergleich zu amphotropen Viren eine umfangreichere Rezeptorverwendung auf, da es zusätzlich zu Pit-2 auch Pit-1 als Rezeptor erkennen kann (Miller und Miller, 1994; van Zeijl et al., 1994). Für die Entstehung des ökotropen Glykoproteins nimmt man an, dass das aminoterminal Ende von SU eines xenotropen Virus gegen eine analoge Sequenz eines unbekannten Virus ausgetauscht wurde, sodass anschließend ein neuer Rezeptor erkannt werden konnte (Stoye und Coffin, 1987; Tomonaga et al., 1999). Auf ähnliche Art und Weise könnte auch das Env von M813 entstanden sein.

Interessanterweise haben sich einige Viren im Laufe der Zeit konvergent entwickelt, wobei man unter Konvergenz die unabhängige, aber ähnliche Entwicklung von Merkmalen oder Organismen aufgrund ähnlicher Bedingungen versteht. Das Gibbon-Affen Leukämievirus (GALV) und das Katzen-Leukämievirus (FeLV) werden aufgrund

ihrer Homologie verwandtschaftlich den Klasse 1 (CI) Isolaten zugeordnet (Benveniste et al., 1977) und beide benutzen den gleichen Rezeptor (Pit-1), genau wie das nicht direkt verwandte Klasse II (CII) Isolat 10A1 (s. auch Abschn. 2.4). Dieses Charaktersitikum (hier: die Verwendung des gleichen Rezeptors) hat sich innerhalb der genannten Viren unabhängig voneinander entwickelt, was sich in der fehlenden Homologie der Env-SU Bindungsdomäne dieser Viren widerspiegelt. Es besteht die Möglichkeit, dass nur wenige Oberflächenproteine für die Infektion verwendet werden können, z.B. aufgrund hoher Expression in vielen verschiedenen Zelltypen.

5.4 Warum lassen sich Zellen bestimmter Spezies nicht mit M813 infizieren?

M813 kann Zellen infizieren, die aus *M. musculus* etabliert wurden, wie z.B. SC1 Fibroblasten. Zellen aus *M. cervicolor* sind nicht mit M813 infizierbar, obwohl das Isolat aus diesem Mausstamm gewonnen wurde (Benveniste et al., 1977). Rattenzellen sind nur sehr schlecht und Humanzellen sowie Zellen aus Hunden und Katzen sind nicht mit M813 infizierbar. Somit ist das Wirtsspektrum von M813 stark beschränkt. Was können die Ursachen hierfür sein?

Es ist bekannt, dass das Glykosylierungsmuster des Rezeptors bei der Erkennung durch entsprechende Viren eine entscheidende Rolle spielt, da das Protein durch die Zuckerreste eine bestimmte Struktur erhält. Die Änderung des Glykosylierungsmusters führt folglich auch zu strukturellen Veränderungen, die die Funktion des Rezeptors beeinträchtigen können. Das ist insbesondere dann der Fall, wenn durch Mutationen im Protein neue Glykosylierungsstellen entstehen. GALV und amphotrope MuLV verwenden Pit-1 bzw. Pit-2 als Rezeptoren für die Infektion. Sowohl Pit-1 als auch Pit-2 sind hoch konservierte Proteine, die in einer Vielzahl von Geweben exprimiert werden. Hamsterzellen (CHO) sind weder mit amphotropen MuLV noch mit GALV infizierbar und die Infektion mit diesen Viren wird erst möglich, nachdem die Zellen mit Tunikamycin, einem Inhibitor der Glykosylierung, behandelt worden sind. Man nimmt an, dass beide Rezeptoren in Hamsterzellen ein verändertes Glykosylierungsmuster aufweisen, sodass GALV und amphotropen MuLV die Proteine in Hamsterzellen nicht als Rezeptor benutzen können. Hamsterzellen sind auch für die Infektion mit ökotropen MuLV nicht empfänglich und können erst nach Behandlung mit Tunikamycin mit

ökotropen MuLV infiziert werden. Die bisher durchgeführten Versuche haben gezeigt, dass sich ein verändertes Glykosylierungsmuster durchweg negativ auf die Funktion eines Proteins als Rezeptor auswirkt (Miller und Miller, 1992; 1993; Tailor et al., 2000).

Auch in unserem Fall besteht die Möglichkeit, dass SMIT1 in bestimmten Spezies anders glykosyliert wird als in Mauszellen, sodass SMIT1 nicht mehr als Rezeptor für M813 fungieren kann. Glykosylierung von Rezeptoren wird als weit verbreiteter Abwehrmechanismus gegen die retrovirale Infektion betrachtet (Wang et al., 1996). Das neue Glykosylierungsmuster von SMIT1 ist eventuell im Laufe der Evolution als Schutzmechanismus gegen die Infektion mit M813 entstanden.

Punktmutationen bewirken oftmals Veränderungen hinsichtlich der Struktur eines Proteins, sodass es nicht mehr als Rezeptor verwendet werden kann. Eiden et al. konnte zeigen, dass der ökotrope Rezeptor CAT1 in vielen verschiedenen Spezies vorhanden ist. Es lassen sich jedoch nur Gewebe von Nagerzellen mit ökotropen MuLV, z.B. Mo-MuLV infizieren, wobei es auch innerhalb dieser Gruppe von Zellen erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Infektionseffizienz gibt. Einige Zell-Linien lassen sich sehr gut infizieren, z.B. die Mauszell-Linie NIH3T3 oder SC1. Im Gegensatz dazu sind MDTF Zellen (*Mus dunni* tail fibroblasts) nur sehr schlecht mit ökotropen Viren infizierbar. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es Unterschiede hinsichtlich des ökotropen Rezeptors innerhalb der verschiedenartigen Zell-Linien geben muss. Klonierungen des mCAT1 Rezeptors aus NIH3T3 und MDTF Zellen haben gezeigt, dass mCAT1 aus MDTF Zellen eine Punktmutation an Position 214 aufweist. Die Mutation befindet sich innerhalb eines Rezeptorbereichs, der für die Bindung des Virus wichtig ist und bewirkt, dass Mo-MuLV das Protein in MDTF Zellen nicht als Rezeptor verwenden kann. Wird die Punktmutation gezielt rückgängig gemacht, lassen sich auch diese Zellen erfolgreich mit Mo-MuLV infizieren (Eiden et al., 1994). Ähnliches konnte für die Infektion von Mauszellen mit GALV gezeigt werden: GALV kann Mauszellen nicht infizieren, da der von GALV verwendete Rezeptor Pit-1 in diesen Zellen zwei Punktmutationen aufweist, die die primäre Struktur des Proteins verändern, sodass es nicht mehr als Rezeptor verwendet werden kann (Olah et al., 1994). Auch in unserem Fall sind in SMIT1 in Human- und Rattenzellen mehrere Punktmutationen vorhanden und einige der Mutationen betreffen die dritte und vierte extrazelluläre Schleife des Rezeptors. Diese Bereiche scheinen für die Bindung des Rezeptors sehr wichtig zu sein,

was für den Pit-1 und Pit-2 Rezeptor bereits gezeigt werden konnte: Mutationen innerhalb dieser Schleifen bewirken, dass diese Proteine nicht mehr als Rezeptor verwendet werden können (Lundorf et al., 1999).

Weiterhin entsteht in SMIT1 in Humanzellen durch eine Punktmutation in der vierten extrazellulären Domäne eine neue Glykosylierungsstelle (rot eingezeichnet, s. Abb. 18). Die dadurch entstandene Strukturveränderung könnte zum Verlust der Rezeptorfunktion geführt haben.

	209	↓ ↓	↓ ↓	260
Maus-SMIT1	IGGFEEVKRR•YMLASPDVAS•ILLKY NLS NT•NACMVHPKAN•ALKMLLRDPT•DEDVPW			
Ratten-SMIT1	V.....N.....TH.....S.....D.....			
Mensch- SMIT1	T.....T.....S N.SKE.....N.....			
	325			361
Maus-SMIT1	ADEIAGINPE•HCMQVCGRSA•GCSNIAYPRL•VMTLVPV			
Ratten-SMIT1	V.D.....E.....			
Mensch-SMIT1	T.D.....L.....K.....			

Abb. 18: Sequenzvergleich der Aminosäuren 209 bis 260 in der 4. extrazellulären Schleife des M813-Rezeptors SMIT1: blau eingezeichnet: eine konservierte Glykosylierungsstelle; rot eingezeichnet: eine durch Punktmutation neu entstandene Glykosylierungsstelle im humanen SMIT1, Aminosäure 325 bis 361 umfassen die 5. extrazelluläre Schleife.

Insgesamt sind wahrscheinlich sowohl die vorhandenen Mutationen als auch das veränderte Glykosylierungsmuster dafür verantwortlich, dass M813 SMIT1 in Ratten- und Humanzellen nicht mehr als Rezeptor verwenden kann.

Denkbar wäre auch, dass SMIT1 in diesen Zellen nicht ausreichend vertreten ist: Tailor et al. konnte zeigen, dass CHO Zellen, in denen Pit-1 und Pit-2 überexprimiert wurde, für die Infektion mit GALV und amphotropen MuLV empfänglich wurden und zwar auch dann, wenn die Zellen vorher nicht mit Tunikamycin behandelt worden sind (Tailor et al. 2000). Die Rezeptoren scheinen in relativ geringer Konzentration in CHO Zellen vorhanden zu sein, wobei dann durch Überexpression des Rezeptors die Infektion vermittelt werden kann (Tailor et al., 2000).

Zellen aus *M. cervicolor* lassen sich nicht mit M813 infizieren. Es besteht die Möglichkeit, dass in diesen Zellen durch die Expression endogener viraler Sequenzen der Rezeptor blockiert wird und somit ein Mechanismus der Interferenz entstanden ist. Ähnliches konnte auch schon für das *Fv4* Gen gezeigt werden: in Mäusen, die dieses Gen enthalten, wird die Replikation ökotroper Viren verhindert, da *FV4* teilweise einer

endogenen ökotropen Env-Sequenz entspricht (Ikeda und Sugimura, 1989). Durch die Expression von *Fv4* entstehen Env-ähnliche Proteine, die den ökotropen Rezeptor blockieren, sodass Superinfektion mit ökotropen Viren verhindert wird. Ein weiteres Beispiel für die Beteiligung endogener retroviraler Sequenzen zum Schutz vor der Infektion durch exogene Viren ist das *Fv-1* Gen in Mäusen. Das *Fv-1* Gen ist ein endogenes Provirus, das mit der HERV-Familie verwandt ist und kodiert für ein kapsidähnliches Protein. Das Protein spielt eine entscheidende Rolle im Hinblick auf die Empfänglichkeit von Mäusen für eine erneute Infektion mit Mo-MuLV, denn bei Infektion mit MuLV bindet das Protein an die Kapsidproteine von Mo-MuLV und verhindert wahrscheinlich dadurch die Integration des neu eintretenden Komplexes. Der genaue Mechanismus ist allerdings nicht bekannt (zusammengefasst aus Bushmann, 2002).

5.5 Warum ist M813 in der Lage, Synzytienbildung zu induzieren?

Die Bildung von Synzytien nach der Infektion mit Retroviren kann auf zwei unterschiedlichen Wegen zustande kommen: ein einzelnes Virus kann simultan zwei Zellen miteinander verbinden und so zur Fusion dieser Zellen führen („Fusion von außen“). Bei der „Fusion von innen“ bewirkt die endogene Expression von viralen Env-Proteinen auf der Zelloberfläche die Verbindung der Zellen miteinander, sodass diese anschließend fusionieren. Für ökotrope Viren ist bekannt, dass sie in bestimmten Zellen die Synzytienbildung von innen her bewirken können (White et al., 1983; Jones und Risser, 1993).

In meiner Arbeit und auch in Arbeiten unserer Gruppe wurde gezeigt, dass M813 ein hohes Fusionspotenzial aufweist und in bestimmten Zellen die Bildung vielkerniger Riesenzellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* bewirkte (Prasolov et al., 2001a). Voraussetzung für die Synzytienbildung war jedoch, dass die Zellen einerseits den M813-Rezeptor und andererseits andere MuLV exprimieren. Anhand von chimären Viren konnten wir belegen, dass die M813-SU Domäne für die Fusion verantwortlich ist (Prasolov et al., 2001a).

Die Bildung von Synzytien ist zum einen vom Virus und zum anderen von der zellulären Umgebung abhängig. Innerhalb der Gruppe der onkogenen MuLV kann das

MMTV Synzytienbildung induzieren (Jones und Risser, 1993). Ökotrope MuLV sind nur bedingt dazu in der Lage, wobei die Induktion auch von äußeren Faktoren wie zum Beispiel geänderte Wachstumsbedingungen und vom Zellsystem abhängig ist (Pinter et al., 1986; Jones und Risser, 1993). Es wird angenommen, dass die Bindung von SU an den Rezeptor Änderungen hinsichtlich der Konformation der TM Domäne nach sich zieht und dass diese Änderung für die Zell-Virus Fusion einen entscheidenden Schritt darstellt. In unserem Fall scheint allerdings die Bildung von Synzytien durch spezifische Sequenzen innerhalb von SU bedingt zu werden, denn Austausch der TM von M813 gegen diejenige von Mo-MuLV bewirkte ebenfalls Fusion der Zellen. Diese Annahme wird unterstützt durch die Ergebnisse anderer Versuche, die gezeigt haben, dass Austausch der TM innerhalb unterschiedlicher MuLV keine Erhöhung des Fusionspotenzials bewirkte (Ragheb et al., 1995).

Blond et al. zeigte, dass bloße Env-Proteine fähig sind, Synzytienbildung zu induzieren (Blond et al., 1999, 2000). Das humane Retrovirus HERV-W ist ein nicht-replikationskompetentes endogenes Retrovirus mit mehreren Vertretern. Die Mehrzahl dieser Viren sind trunkiert oder weisen Mutationen auf, sodass sie keine funktionellen Proteine oder replikationskompetenten Viren generieren können. Einige HERV weisen jedoch ORFs auf und können komplette virale Proteine exprimieren, die sich zu virenähnlichen Partikeln zusammenlagern (Boller et al., 1993; Blond et al., 1999). Insbesondere die Env-Proteine werden gewebeabhängig exprimiert, zum Beispiel entsteht bei HERV-W in Plazentazellen ein vollständiges Env-Glykoprotein mit der Fähigkeit, Fusion von Plazentatrophoblasten zu induzieren. Die Env-cDNA weist dabei ein komplettes *env* Gen mit einem ORF auf (Blond et al., 1999). Transiente Expression des Gens in humanen TE671 Zellen bewirkt ein bis zwei Tage nach der Transfektion massive Synzytienbildung (Blond et al., 2000).

Für das amphotrope Env ist bekannt, dass die prolinreiche Sequenz, die sich der rezeptorbindenden Domäne anschließt (s. Abb. 4), maßgeblich am Fusionsprozeß beteiligt ist. Sie stabilisiert den Env-Komplex und scheint den Übergang der Konformationsänderung des Env-Komplexes vor und nach der Bindung an den Rezeptor zu regulieren (Andersen, 1994; Lavillette et al., 1998). Um genauere Aussagen über die Sequenzen von M813 machen zu können, die maßgeblich an der Synzytieninduktion beteiligt sind, müssten weitere Versuche durchgeführt werden,

wobei man dafür einzelne SU-Domänen unterschiedlicher MuLV gegeneinander austauschen könnte, um nachfolgend ihr Fusionspotenzial in geeigneten Zellsystemen miteinander vergleichen zu können.

Auch die Anzahl an Rezeptoren spielt bei der virusinduzierten Fusion eine Rolle: Siess et al. konnte für die Rezeptoren mCAT1 und Pit-1 in Hamsterzellen zeigen, dass der Grad der Synzytienbildung direkt mit der Anzahl der vorhandenen Rezeptoren korreliert. Daraus lässt sich schließen, dass die Bildung von Rezeptor-Clustern einen limitierenden Faktor hinsichtlich der Synzytienbildung darstellt. Eine Modulation könnte über die Anzahl an Rezeptoren sowie über andere - bisher unbekannte - zelluläre Faktoren stattfinden (Siess et al., 1996). Eventuell war eine sehr hohe Expression von mSMIT1 für die massive Synzytienbildung verantwortlich. Genauere Untersuchungen des Rezeptors könnten hilfreich sein, die Mechanismen, die zur Fusion von Zellen führen, genauer zu verstehen.

6 Zusammenfassung

Wechselwirkungen zwischen Retroviren und ihren Wirtszellen werden intensiv erforscht, da die Infektion mit Retroviren Krankheiten des Immunsystems und Krebs in verschiedenen Spezies verursachen kann. Das Verständnis der Mechanismen zwischen den viralen Hüllproteinen (Env) mit bestimmten Zelloberflächenproteinen, den Rezeptoren, ist besonders interessant, da über den Rezeptor die Infektion von Zellen und die Verbreitung der Viren erfolgt. Nur Zellen auf deren Oberfläche der richtige Rezeptor vorhanden ist, können mit bestimmten Viren infiziert werden. Sie definieren somit den Zelltropismus und das Wirtsspektrum eines Virus.

Die Bindung von Env an den passenden Rezeptor stellt den ersten entscheidenden Schritt der Infektion dar. Durch diese Bindung wird eine Änderung der Konformation des Hüllproteins hervorgerufen, was anschließend zur Fusion der viralen und zellulären Membran führt. Mutationen innerhalb der viralen *env* Gene, die zu einer veränderten Rezeptorerkennung führen, sind wichtige Faktoren für die Evolution endogener Viren, spezies-übergreifender Infektionen und Pathogenese. Besonders wichtig sind in diesem Zusammenhang Studien für das Immundefizienzvirus der Menschen (HIV). Zudem konnten wichtige Ergebnisse anhand der Wechselwirkungen zwischen viralen Hüllproteinen und ihren Rezeptoren anderer Retroviren gewonnen werden.

Das Maus-Leukämievirus M813 wurde aus *Mus cervicolor* isoliert und gehört zu den Gammaretroviren. Das Wirtsspektrum von M813 ist stark eingeschränkt, da nur Mauszellen aus *Mus musculus* infiziert werden können, Rattenzellen sind nur schlecht und Humanzellen nicht mit M813 infizierbar. Weiterhin kann M813 die Bildung vielkerniger Riesenzellen (Synzytien) bewirken. Diese Eigenschaft von M813 wurde zuerst im Rahmen dieser Arbeit beobachtet und konnte zwischenzeitlich auch *in vivo* belegt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Versuche durchgeführt, um den molekularen Hintergrund des extrem eingeschränkten Wirtsspektrums und das hohe Fusionspotenzial von M813 näher zu untersuchen.

Zuerst wurden Interferenzversuche durchgeführt. Zellen, die bereits retroviral infiziert sind, können nicht mit Viren infiziert werden, die den gleichen Rezeptor benutzen (sog. Interferenz). Im Gegensatz dazu ist die Infektion mit Viren, die einen

anderen Rezeptor verwenden, möglich. Mausfibroblasten, die unterschiedliche Maus-Leukämieviren (MuLV) freisetzen, wurden mit M813 infiziert. Es zeigte sich, dass die Infektion mit M813 nicht von anderen MuLV blockiert wird, d.h. es bestand keine Interferenz mit anderen MuLV. Die Ergebnisse zeigten, dass M813 einen eigenen, bisher unbekannten Rezeptor für die Infektion verwenden kann, der nicht von anderen MuLV benutzt wird.

Da wir während der Versuche beobachten konnten, dass M813 die Bildung von Synzytien induzieren kann, sollte zudem untersucht werden, inwiefern die Fähigkeit zur Fusionsbildung durch M813 hervorgerufen wird und ob weitere virale Komponenten anderer MuLV für die Fusion der Zellen benötigt werden. Hierfür wurden unterschiedliche Zellen zum einen mit verschiedenen MuLV, zum anderen mit M813 infiziert und anschließend auf die Bildung von Synzytien hin untersucht. Es zeigte sich, dass M813 zusammen mit anderen viralen MuLV-Komponenten für die Synzytienbildung verantwortlich ist.

Anschließend sollte der Rezeptor für M813 kloniert werden. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Methoden eingesetzt. Mit der zuerst angewandten Expressionsklonierung war es nicht möglich, den Rezeptor zu charakterisieren. Daher wurde nachfolgend eine Hamster-Maus Hybridzell-Linie verwendet. Mit dieser Zell-Linie konnte das Rezeptorgen auf dem distalen Ende von Chromosom 16 lokalisiert werden. Anhand der Auswertung der in diesem Chromosomenabschnitt vorhandenen Gene mit einer Datenbank konnte ein interessantes Gen (*Slc5a3*) als geeigneter Kandidat für den M813-Rezeptor ermittelt werden. Expression der *Slc5a3* cDNA in Humanzellen bewirkte, dass diese Zellen für die Infektion mit M813 empfänglich wurden. Bei dem Rezeptor handelt es sich um einen natriumabhängigen Myo-Inositol Transporter (Sodium-Myo-Inositol Transporter 1:SMIT1). SMIT 1 weist große Gemeinsamkeiten mit anderen Rezeptoren auf, die von verschiedenen Gammaretroviren verwendet werden. Die Charakterisierung von weiteren SMIT1 Orthologen in verschiedenen Spezies zeigte, dass sich einige der vorhandenen Aminosäureunterschiede in wichtigen extrazellulären Bereichen befinden. Diese Veränderungen sind wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass M813 den Rezeptor in anderen Spezies nicht verwenden kann.

Literaturverzeichnis

- Adamson, M.C., J. Silver and C.A. Kozak (1991):** The mouse homolog of the gibbon ape leukemia virus receptor: genetic mapping and a possible receptor function in rodents. *Virology* 183: 778-781.
- Andersen, K. (1994):** A domain of murine retrovirus surface protein gp70 mediates cell fusion, as shown in a novel SC-1 cell fusion system. *J. Virol.* 68: 3175-3182.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.G. Smith, and K. Struhl, Herausgeber (1992):** Short protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, N.Y.
- Bachrach, E., M. Marin, M. Pelegrin, G. Karavanas, and M. Piechaczyk (2000):** Efficient cell infection by Moloney murine leukemia virus-derived particles requires minimal amounts of envelope glycoprotein. *J. Virol.* 73: 8480- 8486.
- Bae, Y., S.M. Kingsman, and A.J. Kingsman (1997):** Functional dissection of the Moloney murine leukemia virus envelope protein gp70. *J. Virol.* 71: 2092-2099.
- Battini, J.L., J.M. Heard, and O. Danos (1992):** Receptor choice determinants in the envelope glycoproteins of amphotropic, xenotropic, and polytropic murine leukemia viruses. *J. Virol.* 66: 1468-1475.
- Battini, J.L., S.C. Kayman, A. Pinter, J.M. Heard, and O. Danos (1994):** Role of N-linked glycosylation in the activity of the Friend murine leukemia virus SU protein receptor-binding domain. *Virology* 202: 496-499.
- Battini, J.L., O. Danos, and J.M. Heard (1995):** Receptor-binding domain of murine leukemia virus envelope glycoproteins. *J. Virol.* 69: 713-719.
- Battini, J.L., P. Rodrigues, R. Müller, O. Danos, and J.M. Heard (1996):** Receptor-binding properties of a purified fragment of the 4070A amphotropic murine leukemia virus envelope glycoprotein. *J. Virol.* 70: 4387-4393.
- Baum, C., W. Ostertag, C. Stocking, and D. von Laer (2002):** Retroviral vector design for cancer gene therapy. In: *Gene Therapy for Cancer*, Second edition, 2002: 3-29.
- Benveniste, R.E., R. Callahan, C.J. Sherr, V. Chapman, and G. Todaro (1977):** Two distinct endogenous type C viruses isolated from the asian rodent *Mus cervicolor* : conservation of virogene sequences in related rodent species. *J. Virol.* 21: 849-862.
- Blond, J.L., F. Besème, L. Duret, O. Bouton, F. Bedin, H. Perron, B. Mandrand, and F. Mallett (1999):** Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new endogenous retrovirus family. *J. Virol.* 73: 1175-1185.
- Blond, J.L., D. Lavillette, V. Cheynet, O. Bouton, G. Oriol, S. Chapel-Fernandes, B. Mandrand, F. Mallet, and J.L. Cosset (2000):** An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *J. Virol.* 74: 3321-3329.

- Boeke, J.D., and J.P. Stoye (1996):** Retrotransposons, endogenous retroviruses, and evolution. In: *Retroviruses* (M. Coffin, S.H. Hughes, and H.E. Varmus ed.): 343-435. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y..
- Boller, K., H. Konig, M. Sauter, N. Mueller-Lantzsch, R. Lower, J. Lower, and R. Kurth (1993):** Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for human teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV. *Virology* 196: 349-353.
- Bonham, L., G. Wolgamot, and A.D. Miller (1997):** Molecular cloning of *Mus dunni* endogenous virus: an unusual retrovirus in a new murine viral interference group with a wide host range. *J. Virol.* 71: 4663-4670.
- Bushman, F. (2002):** Lateral DNA Transfer, Mechanisms and Consequences: 206-208. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Chesebro, B., and K. Wehrly (1985):** Different murine cell lines manifest unique patterns of interference to superinfection by murine leukemia viruses. *Virology* 141: 119-129.
- Chuck, A.S., M.F. Clarke, and B.O. Palsson (1996):** Retroviral infection is limited by Brownian Motion. *Human Gene Therapy*: 1527-1534.
- Coffin, J.M., S.H. Hughes, and H.E. Varmus (1996):** Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- DeLarco, J. and G.J. Todaro (1976):** Membrane receptors for murine leukemia viruses: Characterization using purified viral envelope glycoprotein gp 70. *Cell* 8: 365-371.
- Delwart, E.L., and A.T. Panganiban (1989):** Role of reticuloendotheliosis virus envelope glycoprotein in superinfection interference. *J. Virol.* 63: 273-280.
- Doms, R.W., R.A. Lamb, J.K. Rose, and A. Helenius (1993):** Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology* 193: 545-562.
- Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. DiMarzio, S. Marmon, R.E. Sutton, C.M. Hill, C.B. Davis, S.C. Peiper, T.J. Schall, D.R. Littman, and N.R. Landau (1996):** Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381: 661-666.
- Eiden, M.V., K. Farrell, J. Warsowe, L.C. Manham, and C.A. Wilson (1993):** Characterization of a naturally occurring ecotropic receptor that does not facilitate entry of all ecotropic murine retroviruses. *J. Virol.* 67: 4056-4061.
- Eiden, M.V., K. Farrel, and C.A. Wilson (1994):** Glycosylation-dependent inactivation of the ecotropic murine leukemia virus receptor. *J. Virol.* 68: 626-631.
- Einfeld, D., and E. Hunter (1988):** Oligomeric structure of a prototype retrovirus glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8688-8692.
- Einfeld, D. (1996):** Maturation and assembly of retroviral glycoproteins. *Curr. Top. Microbiol.* 214: 133-176.
- Fass, D., R. Davey, P. Hamson, P. Kim, J. Cunningham, and J. Burger (1997):** Structure of a murine leukemia virus receptor-binding glycoprotein at 2.0 Ångstrom resolution. *Science* 277: 1662-1666.

- Fauci, A.S., and R.C. Desrosiers (1996):** Pathogenesis of HIV and SIV. In: *Retroviruses* (Coffin, J.M., Hughes, S.H., and Varmus, H.E.,ed): 529-585. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Felkner, R.H., and M. Roth (1992):** Mutational analysis of the N-linked glycosylation sites of the SU envelope protein of Moloney murine leukemia virus. *J. Virol.* 66: 4258-4264.
- Feng, Y., C.C. Broder, P.E. Kennedy, and E.A. Berger (1996):** HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G-protein-coupled receptor. *Science* 272: 872-877.
- Green, N., T.M. Shinnik, O. Witte, A. Ponticelli, J.G. Sutcliffe, and R.A. Lerner (1981):** Sequence-specific antibodies show that maturation of Moloney murine leukemia envelope polypeptide involves removal of a COOH-terminal peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6023-6027.
- Han, J.Y., Y. Zhao, M.F. Anderson, and P.M. Cannon (1998):** Role of the variable regions A and B in receptor binding domain of amphotropic murine leukemia virus envelope proteins. *J. Virol.* 72: 9101-9108.
- Hartley, J.W., and W.P. Rowe (1975):** Clonal cell lines from a feral mouse embryo which lack host-range restrictions for murine leukemia viruses. *Virology* 65: 128-134.
- Heard, J.M., and O. Danos (1991):** An amino-terminal fragment of the Friend murine leukemia virus envelope glycoprotein binds the ecotropic receptor. *J. Virol.* 65: 4026-4032.
- Hunter, E., and R. Swanstrom (1990):** Retrovirus envelope glycoproteins. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, Vol. 157: 188-233.
- Ikeda, H., and H. Sugimura (1989):** *Fv-4* resistance gene: a truncated endogenous murine leukemia virus with ecotropic interference properties. *J. Virol.* 63: 5405-5412.
- Ikeda, H., K. Kato, T. Suzuki, H. Kitani, Y. Matsubara, S. Takase-Yoden, R. Watanabe, M. Kitagawa, and S. Aizawa (2000):** Properties of the naturally occurring soluble surface glycoprotein of ecotropic murine leukemia virus: binding specificity and possible conformational change after binding to receptor. *J. Virol.* 74: 1815-1826.
- Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama (1990):** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Itoh, K., H. Tezuka, H. Sakoda, M. Konno, K. Nagata, T. Uchiyama, H. Uchino, and K.J. Mori (1989):** Reproducible establishment of hematopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow. *Exp. Hematol.* 17: 145-153.
- Januszski, M., P.M. Cannon, D. Chen, Y. Rozenberg, and M.F. Anderson (1997):** Functional analysis of the cytoplasmic tail of Molony murine leukemia virus envelope protein. *J. Virol.* 71:3613-3619.
- Jones, J.S., and R. Risser (1993):** Cell fusion induced by the murine leukemia virus envelope glycoprotein. *J. Virol.* 67: 67-74.
- Jonkers, J., and A. Berns (1996):** Retroviral insertional mutagenesis as a strategy to identify cancer genes. *Biochim. Biophys.* 1287: 29-57.

- Katen, L.J., M. Januszeski, M.F. Anderson, K.J. Hasenkrug, and L.H. Evans (2001):** Infectious entry by amphotropic as well as ecotropic murine leukemia viruses occurs through an endocytic pathway. *J. Virol.* 75: 5018-5026.
- Kavanaugh, M.P., H. Wang, Z. Zhang, W. Zhang, Y.N. Wu, E. Dechant, R.A. North, and D. Kabat (1994a):** Control of cationic amino acid transport and retroviral receptor functions in a membrane protein family. *J. Biol. Chem.* 269: 15445-15450.
- Kavanaugh, M.P., D.G. Miller, W. Zhang, W. Law, C. Kozak, D. Kabat, and A.D. Miller (1994b):** Cell surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1281-1285.
- Kim, J.W., E.I. Closs, M. Albritton, and J.M. Cunningham (1991):** Transport of cationic acids by mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature* 352: 725-730.
- Kitamura, T., M. Onishi, S. Kinoshita, A. Shibuya, A. Miyajima, and G.P. Nolan (1995):** Efficient screening of retroviral cDNA expression libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 9146-9150.
- Kitamura, T. (1998):** New experimental approaches in retrovirus-mediated expression screening. *Int. Journal of Hematology* 67: 351-359.
- Kozak, C. (1985):** Susceptibility of wild mouse cells to exogenous infection with xenotropic leukemia viruses: control by a single dominant locus on chromosome 1. *J. Virol.* 55: 690-695.
- Kozak, C., and R. O'Neil (1987):** Diverse wild mice origins of xenotropic, mink cell focus forming, and two types of ecotropic proviral genes. *J. Virol.* 61: 3082-3088.
- Lavillette, D., M. Maurice, C. Roche, S.J. Russell, M. Sitbon, and F.L. Cosset (1998):** A proline-rich motif downstream of the receptor binding domain modulates conformation and fusogenicity of murine retroviral envelopes. *J. Virol.* 72: 9955-9965.
- Lavillette, D., M. Marin, A. Ruggieri, F. Mallett, F.L. Cosset, and D. Kabat (2002):** The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus type W uses a divergent family of amino acid transporters/cell surface receptors. *J. Virol.* 76: 6442-6452.
- Lee, S., Y. Zhao, and M.F. Anderson (1999):** Receptor-mediated Moloney murine leukemia virus entry can occur independently of the clathrin-coated-pit-mediated endocytic pathway. *J. Virol.* 73: 5994-6005.
- Li, X., B. McDermott, B. Yuan, and S.P. Goff (1996):** Homomeric interactions between transmembrane proteins of Moloney murine leukemia virus. *J. Virol.* 70: 1266-1270.
- Li, Z., A. Pinter, and S.C. Kayman (1997):** The critical N-linked glycan of murine leukemia virus envelope protein promotes both folding of the C-terminal domains of the precursor protein and the stability of the postcleavage envelope complex. *J. Virol.* 71: 7012-7019.
- Lundorf, M.D., F.S. Pedersen, B. O'Hara, and L. Pedersen (1999):** Amphotropic murine leukemia virus entry is determined by specific combinations of residues from receptor loops 2 and 4. *J. Virol.* 73: 3169-3175.

- MacKrell, A.J., N.W. Soong, C.M. Curtis, and M.F. Anderson (1996):** Identification of a subdomain in the Moloney murine leukemia virus envelope protein involved in receptor binding. *J. Virol.* 70: 1768-1774.
- Maniatis, T., F. Fritsch, and J. Sambrook (1982):** Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Marin, M., C.S. Taylor, A. Nouri, S. Kozak, and D. Kabat (1999):** Polymorphism of cell surface receptor control mouse susceptibilities to xenotropic and polytropic leukemia viruses. *J. Virol.* 73: 9362-9368.
- Marshall, T., and U. Rapp (1979):** Genes controlling receptors for ecotropic and xenotropic type C virus in *Mus cervicolor* and *Mus musculus*. *J. Virol.* 29: 501-506.
- Mastromarino, P., C. Conti, R. Petruzzello, R. Lapadula, and N. Orsi (1992):** Effect of charged molecules on Sindbis virus hemagglutination and hemolysis. *Microbiologica* 15: 23.28.
- Masuda, M., S. Kakushima, S. Wilt, S. Ruscetti, P. Hoffman, A. Iwamotor, and M. Masuda (1999):** Analysis of receptor usage by ecotropic murine retroviruses, using green fluorescent protein-tagged cationic acid transporters. *J. Virol.* 73:9362-9368.
- McCarthy, L.C., J. Terrett, M.E. Davis, C.J. Knights, A.L. Smith, R. Critcher, K. Schmitt, J. Hudson, N.K. Spurr, and P.N. Goodfellow (1997):** A first-generation whole genome-radiation hybrid map spanning mouse genome. *Genome Research* 7:1153-1161.
- Miller, A.D., and F. Chen (1996):** Retrovirus packaging cells based on 10A1 murine leukemia virus for production of vectors that use multiple receptors for cell entry. *J. Virol.* 70: 5564-5571.
- Miller, A.D., and G. Wolgamot (1997):** Murine retroviruses use at least six different receptors for entry into *Mus dunni* cells. *J. Virol.* 71: 4531-4535.
- Miller, D.G., and A.D. Miller (1992):** Tunicamycin treatment of CHO cells abrogates multiple blocks to retrovirus infection, one of which is due to a secreted inhibitor. *J. Virol.* 66: 78-84.
- Miller, D.G., and A.D. Miller (1993):** Inhibitors of retrovirus infection are secreted by several hamster cell lines and are also present in hamster sera. *J. Virol.* 67: 5346-5352.
- Miller, D., and A. Miller (1994):** A family of retroviruses that utilize related phosphat transporters for cell entry. *J. Virol.* 68: 8270-8276.
- Morgan, R., O. Nussbaum, D.D. Muenchau, L. Shu, L. Couture, and F. Anderson (1993):** Analysis of the functional and host range-determining regions of the murine ecotropic and amphotropic retrovirus envelope proteins. *J. Virol.* 67:4712-4721.
- Morling, F.J., K.W. Peng, M.F. Cosset, and S.J. Russel (1997):** Masking of retroviral envelope functions by oligomerizing polypeptide adaptors. *Virology* 234: 51-61.
- Münk, C., J. Löhler, V. Prassolov, U. Just, M. Stockschräder, and C. Stocking (1997):** Amphotropic murine leukemia virus induce spongiform encephalomyelopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 5837-5842.

- Münk, C., S. Thomsen, C. Stocking, and J. Löhler (1998):** Murine leukemia virus recombinants that use phosphat transporters for cell entry induce similar spongiform encephalomyelopathies in newborn mice. *Virology* 252: 318-323.
- Nussbaum, O., M. Roop, and M.F. Andersen (1993):** Sequences determining the pH-dependence of viral entry are distinct from the host-range determining region of the murine ecotropic and amphotropic retrovirus envelope proteins. *J. Virol.* 67: 7402-7405.
- Olah, Z., J. Keller, K. Sill, and A. Rein (1994):** The cellular receptor for Gibbon Ape leukemia virus is a novel high affinity sodium-dependent transporter. *J. Biol. Chem.* 269: 25426-25431.
- Ostertag, W., Stocking, C., Johnson, G., Kluge, N., Kollek, R., Franz, T., and Hess, N. (1987):** Transforming genes and target cells of murine spleen focus forming viruses. *Adv. Cancer Res.* 48, 193-355.
- Ott, D., R. Friedrich, and A. Rein (1990):** Sequence analysis of amphotropic and 10A1 murine leukemia viruses: close relationship to mink cell focus-inducing viruses. *J. Virol.* 64: 757-766.
- Overbaugh, J.J., and C.R.M. Bangham (2001a):** Selection forces and constraints on retroviral sequence variation. *Science* 292: 1106-1109.
- Overbaugh, J., D.A. Miller, and V.M. Eiden (2001b):** Receptors and entry cofactors for retroviruses include single and multiple transmembrane-spanning proteins as well as newly described glycoposphatidylinositol-anchored and secreted proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65: 371-389.
- Peredo, C., L. O'Reilly, K. Gray, and M. Roth (1996):** Characterization of chimeras between the ecotropic Moloney murine leukemia virus and the amphotropic 4070A envelope proteins. *J. Virol.* 70: 3142-3152.
- Pinter, A., and W.J. Honnen (1983):** Topography of murine leukemia virus envelope proteins: characterization of transmembrane components. *J. Virol.* 46: 1056-1060.
- Pinter, A., W.J. Honnen, and J.S. Li (1984):** Studies with inhibitors of oligosaccharide processing indicate a functional role for complex sugars in the transport and proteolysis of Friend mink cell focus-inducing murine leukemia virus envelope proteins. *Virology* 136:196-210.
- Pinter, A., T. Chen, A. Lowry, N. Cortez, and S. Silagi (1986):** Ecotropic murine leukemia virus-induced fusion of murine cells. *J. Virol.* 57: 1048-1054.
- Pinter, A., R. Kopelman, Z. Li, S.C. Kayman, and A. Sanders (1997):** Localization of the labile disulfide bond between SU and TM of the murine leukemia virus envelope protein complex to a highly conserved CWLC motif in SU that resembles the active-site sequence of thiol-disulfide exchange enzymes. *J. Virol.* 71: 8073-8077.
- Poulet, F.M., P.R. Bowser, and J.W. Casey (1994):** Retroviruses of fish, reptiles, and molluscs. In *the Retroviridae* (J.A. Levy, Ed.), pp.1-38, Vol. 3. Plenum Press, New York.
- Prassolov, V., D. Ivanov, S. Hein, G. Rutter, C. Münk, J. Löhler, and C. Stocking (2001a):** The *Mus cervicolor* isolat M813 is highly fusogenic and induces T-cell lymphoma associated with large multinucleated cells. *Virology* 290: 39-49.

- Prassolov, V., S. Hein, M. Ziegler, D. Ivanov, C. Münk, J. Löhler, and C. Stocking (2001b):** *Mus cervicolor* murine leukemia virus isolate M813 belongs to a unique receptor interference group. J. Virol.: 4490-4498.
- Ragheb, J., and M.F. Anderson (1994a):** Uncoupled expression of Moloney murine leukemia virus envelope polypeptides SU and TM: a functional analysis of the role of TM domains in viral entry. J. Virol. 68: 3207-3219.
- Ragheb, J., and M.F. Anderson (1994b):** pH-independent murine leukemia virus ecotropic envelope-mediated cell fusion: implications for the role of the R peptide and p15E TM in viral entry. J. Virol. 68: 3220-3231.
- Ragheb, J.A., H. Yu, T. Hofmann, and M.F. Anderson (1995):** The amphotropic and ecotropic murine leukemia virus envelope TM subunits are equivalent mediators of direct membrane fusion: implications for the role of the ecotropic envelope and receptor in syncytium formation and viral entry. J. Virol. 69: 7205-7215.
- Rai, K.S., F.M. Duh, V. Vigdorovich, A. Danilkovitch-Miagkova, M.I. Lerman, and A.D. Miller (2001):** Candidate tumor suppressor HYAL2 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell-surface receptor for jaagsietke sheep retrovirus, the envelope protein of which mediates oncogenic transformation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 4443-4448.
- Rapp, U., and T. Marshall (1980):** Cell surface receptors for endogenous type C viral glycoprotein and epidermal growth factor: tissue distribution in vivo and possible participation in specific cell-cell interaction. J. Supramol. Struct. 14: 343-352.
- Rasheed, S., B.K. Pal, and M. Gardner (1982):** Characterization of highly oncogenic murine leukemia virus from wild mice. J. Virol. 19: 13-18.
- Rasko, J.E.E., J.L. Battini, R.J. Gottschalk, I. Mazo, and A.D. Miller (1999):** The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 2129-2134.
- Rein, A., and A. Schultz (1984):** Different recombinant murine leukemia viruses use different cell surface receptors. Virology 136:144-152.
- Rein, A., J. Mirro, J.G. Haynes, S.M. Ernst, and K. Nagashima (1994):** Function of the cytoplasmatic domain of a retroviral transmembrane protein: p15E-p2E cleavage activates the membrane fusion capability of the murine leukemia virus env protein. J. Virol.: 1773-1781.
- Reizer, J., A. Reizer, and M.H. Saier (1994):** A functional superfamily of sodium/solute transporters. Biochim. Biophys. 1197: 133-166.
- Ross, S.R., J.J. Schofield, C.J. Farr, and M. Bucan (2002):** Mouse transferrin receptor 1 is the cell entry receptor for mouse mammary tumor virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 12386-12390.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467.

- Siess, D.C., S.L. Kozak, and D. Kabat (1996):** Exceptional fusogenicity of chinese hamster ovari cells with murine retroviruses suggests roles for cellular factor(s) and receptor clusters in the membrane fusion process. *J. Virol.* 70: 3432-3439.
- Skehel, J.J., and D.C. Wiley (1998):** Coiled coils in both intracellular vesicle and viral membrane fusion. *Cell* 95: 871-874.
- Stocking, C., Grez, M., and Ostertag, W. (1993):** Regulation of retrovirus infection and expression in embryonic and hematopoietic stem cells. *In: Virus Strategies* (W. Doerfler and P. Böhm, eds.) VCH Verlag, Heidelberg, pp. 433-455.
- Stoye, J., and J. Coffin (1987):** The four classes of endogenous murine leukemia viruses: structural relationship and potential for recombination. *J. Virol.* 61: 2659-2669.
- Sweet, R.W., A. Truneh, and W.A. Hendrickson (1991):** CD4: its structure, role in immune function and AIDS pathogenesis, and potential as a pharmacological target. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2: 622-633.
- Tailor, C.S., A. Nouri, C.G. Lee, C. Kozak, and D. Kabat (1999):** Cloning and characterization of cell surface receptor for xenotropic and polytropic murine leukemia viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 927-932.
- Tailor, C.S., A. Nouri, and D. Kabat (2000):** Cellular and species resistance to murine amphotropic, gibbon ape, and feline subgroup C leukemia virus is strongly influenced by receptor expression levels and by receptor masking mechanisms. *J. Virol.* 74: 9797-9801.
- Thomas, A., K.D. Gray, and M. Roth (1997):** Analysis of mutations within the cytoplasmatic domain of the Moloney murine leukemia virus transmembrane protein. *Virology* 227: 305-313.
- Tomonaga, K., and J. Coffin (1999):** Structures of endogenous nonectropic murine leukemia virus (MLV) long terminal repeats in wild mice: Implication for evolution of MLVs. *J. Virol.* 73: 4327-4340.
- Turk, E., and E.M. Wright (1997):** Membrane topology motifs in the SGLT cotransporter family. *J. Membrane Biol.* 159: 1-20.
- Van Zeijl, M., S. Johann, E. Closs, J. Cunningham, R. Eddy, T. Shows, and B. O'Hara (1994):** A human amphotropic retrovirus receptor is a second member of the gibbon ape leukemia virus receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91: 1168-1172.
- Vogt, V.M. (1996):** Retroviral Virions and Genomes. *In: Retroviruses* (J.M. Coffin, S.H. Hughes, and H.E. Varmus, ed.): 27-68. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Yang, Y.L., L. Guo, S. Xu, C.A. Holland, T. Kitamura, K. Hunter, and J.M. Cunningham (1999):** Receptors for polytropic and xenotropic mouse leukemia viruses encoded by a single gene at *Rmc1*. *Nature Genetics* 21: 216-219.
- Yu, H., C. Empig, and F. Andersen (1998):** Quantification of MoMuLV envelope protein on the cell surface. *Virology* 243: 415-422.
- Wang, H., M. Kanavaugh, R. North, and D. Kabat (1991):** Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature* 352: 729-731.

- Wang, H., M.P. Kavanaugh, and D. Kabat (1994):** A critical site in the cell surface receptor for ecotropic murine retroviruses required for amino acid transport but not for viral reception. *Virology* 202: 1058-1060.
- Wang, H., E. Klammo, S.E. Kuhmann, S.L. Kozak, M.P. Kavanaugh, and D. Kabat (1996):** Modulation of ecotropic murine leukemia retroviruses by N-linked glycosylation of the cell surface receptor/amino acid transporter. *J. Virol.* 70: 6884-6891.
- White, J., M. Kielian, and A. Helenius (1983):** Membrane fusion proteins of enveloped animal viruses. *Q. Rev. Biophys.* 16: 151-195
- Wilson, C.A., K.B. Farrell, and V.M. Eiden (1994):** Properties of a unique form of the murine amphotropic virus receptor expressed on hamster cells. *J. Virol.* 68: 7697-7703.
- Wolgast, G., L. Bonham, and A.D. Miller (1998):** Sequence analysis of *Mus dunni* endogenous virus reveals a hybrid VL/30 Gibbon Ape leukemia virus-like structure and a distinct envelope. *J. Virol.* 72: 7459-7466.
- Wu, B.W., P.M. Cannon, E.M. Gordon, F.L. Hall, and M.F. Anderson (1998):** Characterization of the proline-rich region of murine leukemia virus envelope protein. *J. Virol.* 72: 5383-5391.
- Zhao, Y., S. Lee, and M.F. Anderson (1997):** Functional interaction between monomers of the retroviral envelope protein complex. *J. Virol.* 71: 6967-6972.