

Hemmung der Expression von porzinen endogenen Retroviren (PERVs) mittels RNA-Interferenz

Diplomarbeit
im Fach Biochemie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
UNIVERSITÄT POTSDAM

vorgelegt
von
Christoph Kruse

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Reinhard Kurth
Robert Koch-Institut

2. Gutachter: Prof. Dr. Ralph Gräf
Universität Potsdam

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	v
Abbildungsverzeichnis	viii
Tabellenverzeichnis	x
1 Einleitung.....	1
1.1 Xenotransplantation.....	1
1.1.1 Mangel an Allotransplantaten.....	1
1.1.2 Alternativen zur Allotransplantation	2
1.1.3 Risiken der Xenotransplantation	4
1.1.3.1 Immunologische Abstoßungsreaktionen.....	4
1.1.3.2 Physiologische Inkompatibilität.....	6
1.1.3.3 Potentielle Übertragung von porzinen Mikroorganismen.....	7
1.2 Retroviren.....	8
1.2.1 Taxonomie der Retroviren.....	9
1.2.2 Morphologie der Retroviren.....	10
1.2.3 Retrovirale Genomstruktur	11
1.2.4 Retrovirale Replikation.....	12
1.2.5 Porzine endogene Retroviren (PERVs).....	15
1.3 RNA-Interferenz.....	19
1.4 Zielsetzung	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Material.....	23
2.1.1 Bakterienstämme.....	23
2.1.2 Enzyme.....	23
2.1.3 Oligonukleotide	24

2.1.4	Plasmide	27
2.1.5	Antikörper	28
2.1.6	Eukaryotische Zellen.....	29
2.1.7	Versuchstiere.....	29
2.1.8	Nährmedien und Lösungen.....	29
2.1.9	Kommerzielle Kits	32
2.1.10	Hersteller	32
2.2	Methoden.....	33
2.2.1	Mikrobiologische Methoden	33
2.2.1.1	Stammhaltung von Bakterien.....	33
2.2.1.2	Kultivierung von Bakterien.....	34
2.2.1.3	Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation durch Hitzeschock.....	34
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	34
2.2.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA.....	34
2.2.2.2	Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen	35
2.2.2.3	Phenol-Chloroform-Extraktion	35
2.2.2.4	Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen	36
2.2.2.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	36
2.2.2.6	Restriktion von DNA	37
2.2.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten	37
2.2.2.8	Agarosegelelektrophorese.....	37
2.2.2.9	Gelextraktion linearer DNA-Fragmente.....	38
2.2.2.10	PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	38
2.2.2.11	one-step RT (<i>Reverse Transcriptase</i>) PCR	39
2.2.2.12	one-step RT (<i>Reverse Transcriptase</i>) real-time PCR.....	40
2.2.2.13	DNA-Sequenzierung.....	42
2.2.3	Proteinchemische Methoden.....	42
2.2.3.1	Isolierung von Gesamtprotein aus eukaryotischen Zellen	42

2.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	42
2.2.3.3	SDS (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) ...	43
2.2.3.4	Western Blot-Analyse	44
2.2.4	Zellbiologische Methoden	45
2.2.4.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	45
2.2.4.2	Kryokonservierung eukaryotischer Zellen	45
2.2.4.3	Zellzählung und Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau	46
2.2.4.4	Transfektion eukaryotischer Zellen mit Plasmid-DNA	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Hemmung der PERV-Expression in Fibroblasten Pol2-shRNA-transgener Schweine.....	47
3.1.1	Generierung shRNA-transgener Schweine mittels Nukleus-Transfer	47
3.1.2	Nachweis der Transgen-Integration mittels Fluoreszenz.....	48
3.1.3	Nachweis der Transgen-Integration mittels PCR.....	50
3.1.4	Etablierung einer <i>one-step RT real-time</i> PCR zur Quantifizierung der PERV- mRNA	51
3.1.5	Qualitativer Nachweis von PERV in primären Fibroblasten transgener Schweine.....	54
3.1.6	Quantitativer Nachweis der PERV-Expression in primären Fibroblasten transgener Schweine	56
3.2	Hemmung der PERV-Expression in PK15- und PERV-A/C infizierten 293-Zellen mittels neu synthetisierter shRNAs	58
3.2.1	Selektion eines PERV-A/C infizierten 293-Klons zur Generierung einer Zelllinie mit gleicher Provirusintegration	58
3.2.2	Generierung und Klonierung neuer Expressionskassetten für PERV- spezifische-shRNAs.....	59
3.2.3	Stabile Transfektion von PK15- und PERV-A/C-infizierten 293-Zellen mit shRNA-Expressionskassetten.....	62
3.2.4	Nachweis der shRNA-Expressionskassetten in PK15- und PERV-A/C-infizierten 293-Zellen.....	63

3.2.5	Quantitativer Nachweis der PERV-Expression in shRNA-transgenen Zellen auf Molekularebene	64
3.2.6	Quantitativer Nachweis der PERV-Expression in shRNA-transgenen PK15-Zellen auf Proteinebene	67
4	Diskussion	69
4.1	shRNA-spezifische Hemmung der PERV-Expression in transgenen Schweinen	70
4.2	Effizienzsteigerung der PERV-Expressionshemmung durch neu generierte shRNAs.....	75
5	Zusammenfassung.....	78
	Literaturverzeichnis	I
	Danksagung.....	XI

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
APC	Antigen-Presenting Cell
as	AntiSense
ATP	Adenosin Triphosphate
BaEV	Baboon endogenous virus
BCA	Bicin-Choninic Acid
BHQ	Black Hole Quencher
bp	Base Pair
C	Cytosin
cDNA	copy Desoxy Ribonucleic Acid
CMV	Cytomegalievirus
C _T	threshold cycle
ddH ₂ O	double distilled H ₂ O
DEPC	Diethylene Pyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Desoxy Ribonucleic Acid
dNTP	Desoxy Nucleotide Triphosphate
DPF	Designated Pathogen Free
dsRNA	double-stranded RNA
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
FeLV	Feline Leukemia Virus
FKS	Fötales Kälberserum
G	Guanin
GALV	Gibbon Ape Leukemia Virus
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HERV	Human Endogenous Retrovirus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HRP	Horseradish Peroxidase

HTLV	Human T-Lymphotropic Virus
HuPAR	Human PERV-A-Receptor
ICTV	International Committee On Taxonomy Of Viruses
Ig	Immune Globulin
JEV	Japanese Encephalitis Virus
KoRV	Koala Retrovirus
LB	lysogeny broth
LTR	long terminal repeat
miRNA	micro Ribonucleic Acid
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
MuLV	Murine Leukemia Virus
nt	Nucleotide
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCV	Porcine Circovirus
PERV	Porcine Endogenous Retrovirus
POD	Peroxidase
PPV	Porcine Parvovirus
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
RIPA	Radio Immuno Precipitation Assay
RISC	RNA Induced Silencing Complex
RNA	Ribonucleic Acid
RNAi	Ribonucleic Acid Interference
RT	Reverse Transcriptase, Raumtemperatur
s	Sense
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SFV	Simian Foamy Virus
siRNA	small interfering Ribonucleic Acid
shRNA	small hairpin Ribonucleic Acid
SVDV	Swine Vesicular Disease Virus
T	Thymin
TAE	Tris-Acetate-EDTA

TPG	Transplantationsgesetz
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
tRNA	transfer Ribonucleic Acid
U	Uracil
UV	Ultraviolet
VIS	Visible Spectrum
VSV	Vesicular Stomatitis Virus

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Aufbau eines γ -Retrovirus.....	10
Abbildung 1.2: Genomstruktur der Retroviren.....	12
Abbildung 1.3: Bildung doppelsträngiger DNA aus einzelsträngiger RNA im Zuge der Retrovirus-Replikation	14
Abbildung 1.4: Rasterelektronische Aufnahme von porzinen endogenen Retroviren (PERVs)	18
Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des RNAi-Mechanismus.....	20
Abbildung 2.1: pSuper [Oligoengine, Seattle, WA, USA]	27
Abbildung 2.2: RNAi-Ready pSiren-RetroQ [Clontech, Mountain View, CA, USA]	28
Abbildung 2.3: Funktionsweise der TaqMan-Sonden Hydrolyse	41
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des lentiviralen Vektors pLVTHM	48
Abbildung 3.2: shRNA-transgene Ferkel unter Bestrahlung mit VIS- und UV-Licht.....	49
Abbildung 3.3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen primärer porziner Fibroblasten.....	49
Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Position der verwendeten Primersets im Vektor	50
Abbildung 3.5: Transgennachweis im Genom primärer porziner Fibroblasten mittels PCR unter Verwendung der GFP-Primer	50
Abbildung 3.6: Transgennachweis im Genom primärer porziner Fibroblasten mittels PCR unter Verwendung der 3'LTR-Primer	51
Abbildung 3.7: Transgennachweis im Genom primärer porziner Fibroblasten mittels PCR unter Verwendung der shRNA-Pol2-Primer	51
Abbildung 3.8: Bestimmung der Effizienz in einer <i>one-step</i> RT <i>real-time</i> PCR	53
Abbildung 3.9: Qualitativer Nachweis der PERV Provirus-Integration in primären porzinen Fibroblasten, PK15- und PERV-A/C-inf. 293-Zellen.....	54
Abbildung 3.10: Qualitativer Nachweis der PERV-Expression in primären porzinen Fibroblasten, PK15- und PERV-A/C-inf. 293-Zellen.....	55
Abbildung 3.11: Quantitativer PERV-Expressionsnachweis in Fibroblasten transgener Schweine.....	57
Abbildung 3.12: Provirusnachweis in <i>de novo</i> PERV-A/C-infizierter 293-Zellen.....	58
Abbildung 3.13: Bindungsstellen der generierten shRNAs auf der mRNA von PERV	59
Abbildung 3.14: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie	61
Abbildung 3.15: Nachweis der shRNA-Expressionskassetten in PK15- und PERV-A/C-infizierten 293-Zellen	64
Abbildung 3.16: Relative PERV-Expression einzelner Zelllinien	65

Abbildung 3.17: shRNA-induzierte Hemmung der PERV-Expression in PK15-Zellen66

Abbildung 3.18: shRNA-induzierte Hemmung der PERV-Expression in PERV-A/C-infizierten
293-Zellen67

Abbildung 3.19: Hemmung der p60Gag-Expression durch stabil transfizierte shRNAs in
PK15-Zellen68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Charakteristische Vertreter der Retroviren (modifiziert nach Modrow, 2003)	9
Tabelle 2.1: Komponenten und Temperaturprogramm einer Standard-PCR.....	39
Tabelle 2.2: Komponenten und Temperaturprogramm einer <i>one-step</i> RT-PCR.....	40
Tabelle 2.3: Komponenten und Temperaturprogramm einer <i>one-step</i> RT <i>real-time</i> PCR	41
Tabelle 2.4: Komponenten und Temperaturprogramm einer Sequenzierungs-PCR	42
Tabelle 2.5: Komponenten eines Sammel- und Trenngels für die diskontinuierliche SDS- PAGE	43
Tabelle 3.1: Komponenten und Temperaturprogramm der duplex <i>one-step</i> RT <i>real-time</i> PCR	53
Tabelle 3.2: Auflistung der transfizierten shRNA-Expressionskassetten	62

1 Einleitung

1.1 Xenotransplantation

1.1.1 Mangel an Alлотransplantaten

Die Alлотransplantation (gr. *allos*: anders), d. h. die Übertragung von Zellen, Geweben und Organen zwischen genetisch verschiedenen Individuen derselben Spezies, hat sich in der Medizin inzwischen zu einer weit verbreiteten Methode etabliert.

Schon 1906 gelang dem österreichischen Augenarzt Zirm die erste erfolgreiche Hornhauttransplantation mit einer menschlichen Hornhaut [1]. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts entwickelten sich mit ausgedehnten Fortschritten auf dem Gebiet der Gefäßchirurgie die Voraussetzungen zur Transplantation von Organen. So führte der Ukrainer Voronoy 1933 die erste Nierentransplantation von einem verstorbenen Spender durch, die jedoch aufgrund von immunologischen Abstoßungsreaktionen des Empfängers nicht erfolgreich war [2]. Erst die Entwicklung von Immunsuppressiva Anfang der sechziger Jahre verhalf der Transplantationstechnologie zum Durchbruch. 1967 erfolgte die erste erfolgreiche Herztransplantation durch den südafrikanischen Herzchirurgen Banard [3], der damit einen Meilenstein in der Geschichte der Alлотransplantation setzte.

In Deutschland gibt es zurzeit 50 Einrichtungen, die für die Übertragung von Organen zugelassen sind. Von 1963 bis 2007 wurden fast 89 000 Organe transplantiert, darunter hauptsächlich Nieren und Leber, aber auch Herz, Lunge, Pankreas und Dünndarm [Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO) 2007]. Das deutsche Transplantationsgesetz (TPG), welches 1997 in Kraft trat, regelt die Spende, Entnahme, Vermittlung und Übertragung von Organen, die nach dem Tod oder zu Lebzeiten gespendet werden. Trotz europaweiter Koordination und Verteilung von geeigneten Transplantaten [Eurotransplant International Foundation], herrscht ein akuter Organmangel. Im Jahr 2007 warteten ca. 8 000 Dialysepatienten in Deutschland auf eine geeignete Spenderniere. Die Zahl war damit fast dreimal so hoch, wie die der im selben Jahr transplantierten 2907 Nieren. Rund 30 % der Patienten auf der Warteliste verstarben, weil das gewünschte Transplantat nicht zur Verfügung stand [DSO, 2007]. Die schon ohnehin abnehmende Spendenbereitschaft vieler potentieller Organspender wird zusätzlich durch die öffentliche Diskussion des Hirntodes, der in vielen Ländern den Zeitpunkt der Organentnahme festsetzt und die damit verbundene Angst vor einer vorzeitigen Extransplantation [4] erschwert. Zudem fördert das Defizit an

Spendertransplantaten den kriminellen Handel mit Organen, vor allem in Ländern, in denen dieser nicht gesetzlich verboten ist [5].

Um dem eklatanten Mangel an Allotransplantaten zumindest zeitweise beizukommen, ist es notwendig, geeignete Alternativen zu finden.

1.1.2 Alternativen zur Allotransplantation

In der modernen Medizin wurden bis heute mehrere Ansätze entwickelt, von denen einige vielversprechende Alternativen zur klassischen Allotransplantation darstellen.

Eine Möglichkeit bieten künstliche Transplantate, die die Aufgaben von Organen oder Teile davon übernehmen. Der Herzchirurg DeBakey implantierte schon 1966 einer Mexikanerin eine Pumpe, die temporär die linke Herzkammer unterstützte [6]. Drei Jahre später wurde durch den Amerikaner Cooley erstmals ein total implantierbares, pneumatisch betriebenes Kunstherz einem Patienten eingesetzt, welches für 64 Stunden die Perfusion übernahm, bis dann die Herztransplantation durchgeführt werden konnte [7]. Verschiedene Probleme haben jedoch über Jahrzehnte die Entwicklung der Kunstherzen begleitet, und teilweise sind befriedigende Lösungen bis heute noch nicht vollständig realisiert. Seit 1945, als es dem Internisten Willem Kolff gelang, eine Patientin mit akutem Nierenversagen mit einer eigens entwickelten Trommelniere aus Zellophanröhren zu dialysieren [8], sind auch im Bereich der Dialysebehandlung mit Hilfe der künstlichen Niere große Fortschritte gemacht worden. Dennoch ist die Dialyse keine Dauerlösung, da sich mit der Zeit große Mengen an Schadstoffen im Blut ansammeln, die zu schweren Folgeerkrankungen führen können. Organe mit komplexen Stoffwechselmechanismen, wie beispielsweise der Leber, sind zurzeit durch maschinelle, künstlich geschaffene Transplantate nicht zu ersetzen.

Eine weitere Möglichkeit stellt die Züchtung von morphologisch ähnlichen Organen aus humanen Stammzellen dar. Durch „tissue-engineering“ lassen sich bereits heute einfache autologe Zellverbände im großen Maßstab produzieren. Mit diesem gezüchteten Gewebe können Heilungsprozesse (beispielsweise offene Wunden) unterstützt, funktionsuntauglich gewordenes Gewebe (beispielsweise Knorpelgewebe in den Gelenken) regeneriert, sowie zerstörte Gewebe (beispielsweise verbrannte Haut) ersetzt werden [9]. Auch die Reparatur geschädigter Herzklappen oder der Luftröhre durch „tissue-engineering“ zeigt ermutigende Fortschritte [10]. Das Fernziel ist die Züchtung von komplexen Geweben und Organen. Dafür ist es notwendig, alle für die Ausdifferenzierung notwendigen Faktoren der Zelle zu kennen, um beispielsweise auch das Entstehen von Karzinomen zu unterbinden.

Eine weitere sehr erfolgsversprechende Alternative stellt die Xenotransplantation (gr. *xénos*: Fremder) dar, bei der es sich um die Übertragung von lebens- und funktionstüchtigen Zellen oder Zellverbänden sowie ganzer Organe zwischen verschiedenen Spezies handelt.

Bereits im 17. Jahrhundert gab es Experimente, zerstörte menschliche Haut durch Gewebe von Tieren zu ersetzen. Erste Versuche der Nierentransplantation vom Tier auf den Menschen gab es 1906 durch Mathieu Jabouly, die jedoch scheiterten. Ebenso vergeblich versuchte Unger 1910 die Übertragung einer Rhesusaffenniere auf den Menschen. Bis zur Entwicklung der ersten Immunsuppressiva waren alle weiteren Versuche einer Xenotransplantation aufgrund der hyperakuten Abstoßung des Immunsystems erfolglos. Erst 1964 gelang den Chirurgen Oscar Creech und Keith Reemtsma die Transplantation der Nieren eines Schimpansen [11]. Der Patient lebte noch neun Monate nach der Operation. 1984 verpflanzte der amerikanische Arzt Leonard Bailey ein Pavianherz in ein mit schwerem Herzfehler neugeborenes Mädchen [12], welches nach 21 Tagen an multiplem Organversagen verstarb. In den Jahren 1992 und 1994 folgten weitere Transplantationsversuche mit Herz und Leber, die jedoch erneut zu einer hyperakuten Abstoßung mit letalem Ausgang führten [13]. Trotz fortschreitender Weiterentwicklung der Immunsuppressiva und stetig wachsendem Wissen über immunologische Abstoßungsreaktionen, können solide Xenotransplantate derzeit nicht übertragen werden.

Wesentlich weiter ist man schon im Bereich der Transplantation von tierischen Zellen und Zellverbänden auf den Menschen. So verspricht der Einsatz von verkapselten, fötalen porzinen Inselzellen bei Diabetes mellitus Typ I Patienten eine deutliche Verbesserung der Blutzuckerkontrolle [14]. Die Einbettung der Inselzellen in Alginat und die damit verbundene räumliche Trennung des Immunsystems des Rezipienten und des xenogenen Transplantats verhindert die für gewöhnlich auftretende starke Immunantwort, was den Einsatz von Immunsuppressiva überflüssig macht. Zusätzlich wird die Übertragung von porzinen endogenen Retroviren und weiteren Mikroorganismen stark eingeschränkt [15] (1.1.3). Auch bei Parkinson- und Huntington-Patienten wurden klinische Studien zur Transplantation porziner Neurone durchgeführt, die zu positiven Ergebnissen führten [16, 17]. Des Weiteren wurden schon porzine Hepatozyten als unterstützende Therapie in bioartifiziellen *ex vivo* Reaktoren eingesetzt, um die lebensbedrohliche Situation nach akutem Leberversagen zu überbrücken [18, 19].

1.1.3 Risiken der Xenotransplantation

In der Vergangenheit wurden nicht-humane Primaten aufgrund der nahen Verwandtschaft zum Menschen als Spendertiere für die Xenotransplantation in Erwägung gezogen. Gerade bei Schimpansen weisen Anatomie und Physiologie der Organe sowie die Blutgruppen eine hohe Übereinstimmung mit denen des Menschen auf. Zudem ist die immunologische Abstoßungsgefahr des Rezipienten nach der Organverpflanzung im Vergleich zu anderen Spendertieren nur gering. Allerdings erweist sich die geringe Nachkommenschaft und die lange Tragezeit der Primaten als erheblicher Nachteil, da keine geeignete Anzahl an Spendertieren zu gewährleisten ist. Neben den ethischen Bedenken und dem strengen Artenschutz kommt hinzu, dass die DPF (designated pathogen free)-Haltung und Aufzucht der Tiere extrem kostspielig ist. Das Hauptproblem stellt aber die hohe mikrobielle Durchseuchung der Primaten dar. Aufgrund der phylogenetischen Nähe zum Menschen ist die Gefahr von Zoonosen (Übertragung von Infektionskrankheiten von Tier auf Mensch) besonders groß, insbesondere wenn das Immunsystem des Rezipienten durch Immunsuppressiva geschwächt ist. So wurde in klinischen Studien bei einer Transplantation von einer Pavianleber auf den Menschen die Übertragung des Simian Foamy Virus (SFV), des endogenen Pavian Retrovirus (BaEV) und des Cytomegalievirus (CMV) nachgewiesen [20, 21].

Momentan werden daher Schweine als Organquelle für die Xenotransplantation favorisiert. Ihre Physiologie und Organgröße ist denen des Menschen ähnlich [22, 23], die Tragezeit ist kurz und die Zahl der Nachkommen liegt etwa bei 10 bis 18 Tieren. Darüber hinaus sind die Kosten für DPF-Haltung und Aufzucht wesentlich geringer. Des Weiteren lassen sich gentechnisch veränderte und transgene Schweine leicht generieren. Dennoch gibt es auch beim Schwein als Spendertier noch einige Hürden zu überwinden, um eine komplikationslose Transplantation zu garantieren.

1.1.3.1 Immunologische Abstoßungsreaktionen

Das erste ernst zu nehmende Problem stellen die Abstoßungsreaktionen durch das Immunsystem des humanen Organempfängers dar. Was ansonsten bei der Abwehr pathogener Keime wie Parasiten, Bakterien und Viren erwünscht ist, führt bei der Transplantation zu einer Zerstörung des xenogenen Organs. Verantwortlich dafür sind unter anderem die T-Zell-Antworten des Menschen gegen die hochpolymorphen MHC (*major histocompatibility complex*)-Moleküle. Diese unterscheiden sich bei Schweinen deutlich von

denen des Menschen, weswegen das Ausmaß der Abstoßungsreaktion im Vergleich zur Allotransplantation noch größer ist.

Die erste Stufe der Abstoßungsreaktion erfolgt schon innerhalb von 24 Stunden nach der Transplantation und wird als hyperakute Abstoßung bezeichnet. Spezifische Immunglobuline (IgGs) des humanen Organismus erkennen Epitope von Galactosyl- α -1,3-galactosyl-Resten auf der Oberfläche von Bakterien und binden an diese. Das daraufhin aktivierte Komplementsystem führt zur Zerstörung der Pathogene. Unglücklicherweise richten sich diese Antikörper auch gegen Epitope von porzinen Endothelzellen der Organgefäße, welche auf der Oberfläche der Zellen aller Säuger mit Ausnahme des Menschen und der Altwelt-Affen zu finden sind [24]. Dabei kommt es durch die Komplement- und Gerinnungskaskade zum Gefäßverschluss im Transplantat und damit zum Absterben des Organs. Um die hyperakute Abstoßung zu verhindern, wurden porzine Oligosaccharide verwendet, die die präformierten Antikörper gegen Gal- α -1,3-gal binden und deren Zytotoxizität vermindern [25]. Mittlerweile ist jedoch gelungen, transgene α -1,3-Galactosyltransferase *knock-out*-Schweine zu züchten, die das Gal- α -1,3-gal-Epitop nicht mehr auf der Oberfläche von Endothelzellen tragen. Zusätzlich konnten die porzinen Komplement-regulatorischen Proteine wie CD46, CD55 und CD59 durch humane Varianten ersetzt werden [26-28].

Einige Tage nach der Xenotransplantation tritt die akut vaskuläre Abstoßung auf, die ebenfalls durch humane Antikörper gegen Kohlenhydrat-Epitope ausgelöst wird. Daraufhin setzt erneut die Komplementaktivierung mit den oben beschriebenen Auswirkungen ein. Zusätzlich kommt es zu einer starken Bildung von Adhäsionsmolekülen, wie Selektinen und Integrinen, was eine vermehrte Anlagerung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Monozyten als Folge hat und zu einem Verlust der ansonsten antithrombogenen Eigenschaft des Endothels führt [29]. Zudem wurde ein erhöhter Titer von anti-porzinen IgMs im Blut beobachtet. Diese lassen sich inzwischen mittels IgM-Depletion oder mit Einsatz von monoklonalen anti-IgM-Antikörpern neutralisieren.

Da sich MHC-Moleküle bei Schweinen und Menschen auf der Oberfläche von Zellen stark unterscheiden, lösen die fremden MHC-Moleküle auf dem Transplantat eine weitere Immunreaktion aus. Dies führt zur akuten T-Zell-vermittelten Abstoßung des Organs. Die direkte Erkennung des übertragenen Organs erfolgt über T-Zellen, deren Rezeptoren für das xenogene MHC-Klasse-I- oder Klasse-II-Molekül in Kombination mit einem Peptid spezifisch sind. Dabei werden die T-Zellen durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs) des Spenders, die gleichzeitig auch kostimulierend wirken, aktiviert. Bei einem zweiten Mechanismus führt die Aufnahme von xenogenen Proteinen durch APCs des Empfängers und Präsentation durch eigene MHC-Moleküle zur Aktivierung der T-Zellen (indirekte Erkennung). In beiden Fällen kommt es zur Degeneration des xenogenen Transplantats und somit zur Abstoßung innerhalb weniger Tage oder Wochen. Obwohl xenogene Zellen vom Schwein auf T-Zellen

weitaus immunogener wirken als allogene, sind die gesammelten Erfahrungen auf dem Gebiet der Immunsuppressiva auch bei der Xenotransplantation von großem Nutzen [30, 31].

Die Hauptursache für ein nach Monaten oder Jahren eintretendes Organversagen ist die chronische Abstoßung, die durch konzentrische arteriosklerotische Ablagerung in den Blutgefäßen des Transplantats, begleitet von glomerulärer und tubulärer Fibrose und Atrophie, gekennzeichnet ist. Durch xenoreaktive T-Zellen freigesetzte Mediatoren stimulieren die Expression von Adhäsionsmolekülen im Endothel und locken Monocyten an, die zu Makrophagen reifen. Die Produkte der Leukozyten führen zu einer weiteren Mobilisierung von Makrophagen. Die Mediatoren wirken zusammen und verursachen eine chronische Entzündung mit Narbenbildung, sodass es schließlich zum irreversiblen Organversagen kommt. IgG-Antikörper rufen zudem in den übertragenen soliden Organen eine beschleunigte Arteriosklerose hervor.

1.1.3.2 Physiologische Inkompatibilität

Eines der weiteren Probleme ist die physiologische Inkompatibilität des porcinen Spenderorgans und des humanen Rezipientenorganismus. Während einige physiologische Mechanismen, wie z. Bsp. die Insulinproduktion beim Schwein und beim Menschen sehr ähnlich ablaufen, gibt es andere, die vollkommen inkompatibel sind und keine Interaktion erlauben. Freigesetzte Mediatoren, wie z. Bsp. Hormone, Zytokine, Adhäsionsmoleküle sowie Selektine und Integrine, aber auch Enzyme sind meist artspezifisch und können evtl. nur schwer mit dem Zielorgan wechselwirken [32]. Unterscheiden sich die Aminosäuresequenzen um mehr als 20 %, sind sie für den Empfänger sogar antigen [33]. Proteasen der Gerinnungskaskade sind artspezifisch und somit inkompatibel, was zu einer ungehinderten Koagulation mit letalem Effekt führt. Auch das porcine Parathormon unterscheidet sich in der Aminosäurezusammensetzung signifikant vom menschlichen Pendant. Im Falle einer Nieren-Xenotransplantation führt dies zu einer Hypophosphatämie im Serum, die für den Menschen lebensbedrohlich werden kann. Die Leber, mit sehr komplexen Stoffwechselfunktionen, benötigt eine optimal eingestellte Steuerung der metabolischen und hormonellen Signale und stellt eine besondere Herausforderung an die moderne Medizin dar. Auch im Bereich der Blutgruppen, Blutgerinnung und Blutviskosität sind noch Hindernisse zu überwinden. Ebenfalls ungeklärt ist die Frage der Anpassung der unterschiedlichen Alterungsgeschwindigkeit porciner und humaner Organe. Herz und Niere scheinen dennoch, gerade wegen der relativ wenigen systemisch hormonellen und enzymatischen Funktionen, die ersten Organe zu sein, die in Zukunft klinisch verwendet werden können.

1.1.3.3 Potentielle Übertragung von porzinen Mikroorganismen

Ein weiteres großes Risiko bei der Xenotransplantation stellt die mögliche Übertragung von porzinen Bakterien, Pilzen, Parasiten und Viren auf den Empfänger dar. Bei der Verpflanzung von Organen werden die physikalischen Barrieren des Organismus als Schutz vor Pathogenen umgangen und das Immunsystem supprimiert, was das Infektionsrisiko des Patienten stark erhöht. Infektionskrankheiten, die auf natürlichem Wege vom Tier auf den Menschen übertragen werden, bezeichnet man als Zoonosen. Im Bereich der Xenotransplantation hat man diesen Begriff auf Xenozoonosen oder kurz Xenosen erweitert. Viele der heute bekannten Infektionskrankheiten sind aus Zoonosen hervorgegangen [34]. Die meisten dieser Mikroorganismen sind im natürlichen Wirt apathogen, können jedoch nach der Übertragung auf den humanen Wirtsorganismus z. Bsp. Leukämien oder Immundefizienzen hervorrufen, während andere asymptomatisch bleiben [35]. Das durch humane Immundefizienzviren (HIV) hervorgerufene *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS) [36] und das durch humanpathogene Coronaviren ausgelöste schwere akute Atemnotsyndrom (SARS, *severe acute respiratory syndrome*) [37], aber auch das Ebola Virus, das Marburg Virus und das H5N1-Influenza Virus sind bekannte Beispiele für eine Transspeziesübertragung.

Viele nicht-virale humanpathogene Erreger des Schweins, wie *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Trichinella spiralis*, *Streptococcus suis*, *Campylobacter coli*, *Mycobacterium avium*, *Leptospira interrogans*, *Brucella suis*, *Listeria* und *Erysipelothrix rhusiopathiae* [38, 39], lassen sich durch spezielle Zucht und Haltung unter DPF-Bedingungen aus den Schweinen eliminieren [40].

Eine viel größere Gefahr, im Hinblick auf die Xenotransplantation, geht von Viren aus. So sind Schweine Wirte von einer Vielzahl von Viren, von denen einige beim Menschen Infektionen mit letalem Ausgang hervorrufen können. Ein Schweineinfluenzavirus steht beispielsweise unter dem Verdacht Auslöser der Spanischen Grippe zu sein, der in den Jahren 1918 und 1919 in Europa über 50 Millionen Menschen zum Opfer fielen [41]. Viele weitere humanpathogene Viren, wie das Nipah-Virus, das Enzephalitis Virus (JEV), das Vesicular Stomatitis Virus (VSV), das Swine Vesicular Virus (SVDV), das Tollwutvirus, das Vacciniavirus, das Schweinepapovirus (PPV), das Schweinepockenvirus, das porcine Enzephalomyocarditisvirus und das Herpesvirus lassen sich jedoch auch durch keimfreie Züchtung und Haltung, aus den für die Xenotransplantation vorgesehenen Schweinen, eliminieren. Schwieriger gestaltet sich dies beispielsweise für die Schweinecircoviren PCV 1 und 2, die wahrscheinlich transplazentar übertragen werden können [42]. Zusätzlich besteht das große Risiko einer Infektion mit unbekanntem Erregern, die aufgrund ihrer asymptomatischen Merkmale im natürlichen Wirt nicht erkannt werden. Die Folgen einer

Infektion mit bis dato unbekanntem Viren werden am Beispiel des Ebola- und Marburg-Virus [43] sowie des SARS- und HI-Virus [44] verständlich. Porzine endogene Retroviren (PERVs), die im Genom aller Schweine integriert sind, lassen sich ebenfalls nicht durch Zucht und Haltung unter DPF-Bedingungen eliminieren und stellen somit eine zusätzliche Gefahr der Transspeziesübertragung vom Schwein auf den Menschen bei der Xenotransplantation dar [45].

1.2 Retroviren

Viren sind genetische Elemente, die sich unabhängig von den Chromosomen einer Zelle replizieren können, aber nicht unabhängig von Zellen selbst. Die Klasse der Retroviren (lat. *retro*: rückwärts) verdankt ihren Namen aufgrund der Tatsache, dass diese eine Art umgekehrte Nukleinsäurereplikation haben. Dabei wird ihre RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in ein DNA-Zwischenprodukt umgeschrieben und in das Wirtsgenom integriert.

Vor fast 100 Jahren wurden Retroviren zum ersten Mal beschrieben. 1908 konnten die dänischen Pathologen Ellermann und Bang zeigen, dass die Leukämie einer Maus durch Ultrafiltrate auf andere Mäuse übertragbar war. Drei Jahre später gelang es dem Pathologen Rous bei gesunden Hühnern mit dem Ultrafiltrat aus Geflügelsarkomen, Tumore zu induzieren [46]. Einen weiteren Hinweis auf das pathogene Potential der Retroviren und ihre Assoziation mit Tumorerkrankungen wurde 1936 von John J. Bittner mit seinen Untersuchungen zur Entstehung von malignen Milchdrüsenerkrankungen der Maus, verursacht durch das mouse mammary tumor virus (MMTV), erbracht. So fand er heraus, dass MMTV nicht nur konventionell durch exogene Partikel übertragen werden konnte (horizontale Transmission), sondern auch als endogener Bestandteil von Zellen der Keimbahn an nachfolgende Generationen (vertikale Transmission). Die ersten und bis jetzt einzigen humanpathogenen Retroviren wurden Anfang der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts entdeckt. Dazu zählen die humanen T-Zell-Leukämie-Viren (HTLV-I und HTLV-II) sowie die humanen Immundefizienzviren (HIV-I und HIV-II) [47-49]. Retrovirus-induzierte Erkrankungen sind mit einer Vielzahl unterschiedlicher Symptome assoziiert, wobei Immundefizienzen, Tumore (Lymphome, Sarkome) und neurologische Defekte am häufigsten auftreten. Die Ursachen der Krankheitsbilder sind vielschichtig und vom Genus der Viren abhängig. Heute gehören die Retroviren zu den intensivsten beforschten Erregern in der Virologie und sind von großer Bedeutung für die Gesundheitswissenschaften.

1.2.1 Taxonomie der Retroviren

Retroviren werden zurzeit durch das *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) basierend auf den Unterschieden in der Morphologie, der Genomsequenz, der Wirtsspezifität, den antigenen Eigenschaften und in der Pathogenese in sieben Genera unterteilt: α -, β -, γ -, δ - und ϵ -Retroviren sowie Lentiviren und Foamyviren. Zusätzlich zu der oben aufgeführten Unterteilung, kann man bei Retroviren zwischen exogenen und endogenen Viren unterscheiden. Exogene Retroviren sind zur Expression aller retroviraler Proteine und somit auch zur Partikelfreisetzung im Stande und können horizontal von Organismus zu Organismus übertragen werden. Endogene Retroviren sind hingegen im Genom aller Zellen ihrer Wirtsspezies integriert und werden vertikal, aber auch horizontal über die Keimzellen übertragen [50]. Alle untersuchten Vertebraten besitzen hauptsächlich defekte endogene Retroviren als Bestandteil ihres Erbgutes [51], die z. Bsp. bis zu acht Prozent des menschlichen Genoms ausmachen [52]. Die genetische Information der meisten endogenen Retroviren ist soweit deletiert, dass keine intakten Partikel mehr gebildet werden können. Dennoch gibt es einige, wie das porcine endogene Retrovirus (PERV), die in der Lage sind, exogene infektiöse Virionen zu produzieren.

Tabelle 1.1: Charakteristische Vertreter der Retroviren (modifiziert nach Modrow, 2003)

Genus	Mensch	Tier	Typ
α -Retrovirus		aviäres Leukosevirus (ALV)	exogen
		Rous-Sarkomvirus (RSV)	exogen
β -Retrovirus		Maus-Mammatumorvirus (MMTV)	endogen/exogen
		Mason-Pfizer-Affen-Virus (MPMV)	exogen
	HERV-K-Familie		endogen
γ -Retrovirus		porzines endogenes Retrovirus (PERV)	endogen
		felines Leukämievirus (FeLV)	endogen/exogen
		Affenleukämievirus (SMV)	exogen
	Erv-3		endogen
δ -Retrovirus	humane T-Zell-Leukämie-Viren (HTLV-I, HTLV-II)	bovines Leukosevirus (BLV)	exogen
	HRES-1		exogen
			endogen
ϵ -Retrovirus		diverse Fischretroviren	exogen
		Walleye-Dermal-Sarcoma-Virus (WDSV)	exogen
Lentivirus		Affenimmundefizienzvirus (SIV)	exogen
	humane Immundefizienz-Viren (HIV-I, HIV-II)	felines Immundefizienzvirus (FIV)	exogen
			exogen
Foamyvirus		felines Spumavirus	exogen
		Affenspumavirus	exogen

Man fand zudem heraus, dass endogene Retroviren eine wichtige Rolle in der Biologie des Wirtes spielen. So wurde die Regulation von Transkriptions- und Translationsvorgängen [53], die Kontrolle von Zellfusionsprozessen während der plazentalen Entwicklung [54, 55] und die Vermittlung von Resistenzen gegenüber exogenen retroviralen Infektionen [56] beschrieben.

1.2.2 Morphologie der Retroviren

Infektiöse Retroviren gehören zu den RNA-Viren und haben einen Durchmesser von etwa 100 nm. Die diploide RNA ist in einem Kapsid eingeschlossen, das von einer Virus-hülle umgeben ist, die aus der Zytoplasmamembran der Wirtszelle abgeschnürt wurde. In dieser Hüllmembran ist das transmembrane Hüllprotein (TM, *transmembrane subunit*) lokalisiert, welches mit dem viralen Glykoprotein an der Oberfläche (SU, *surface subunit*) nicht-kovalent verbunden ist. Diese Proteine interagieren mit den Rezeptoren der Zielzellen und werden als gemeinsames Vorläuferprotein gebildet und erst später, während der Virusmorphogenese, mit Hilfe zellulärer Proteasen gespalten. An der Innenseite der Virusmembran sind die mit aminoterminal angefügten Myristinsäurereste verankerten Matrixproteine (MA) angeordnet. Im Inneren des Partikels ist das Viruskapsid lokalisiert, welches je nach Genus eine sphärisch-ikosaedrische oder eine konische Form aufweist und aus Kapsidproteinen (CA) zusammengesetzt ist. Dieses umschließt das retrovirale Genom, bestehend aus zwei, mit Nukleokapsidproteinen (NC) komplexierten, identischen RNA-Einzelsträngen. Die Enzyme Integrase (IN), Reverse Transkriptase (RT) und Protease (PR) sind weitere Bestandteile eines jeden Retrovirus und spielen bei dessen Replikation eine essentielle Rolle. In komplexeren Retroviren (Lentiviren, δ -Retroviren) sind zusätzlich noch akzessorische und regulatorische Proteine vorhanden.

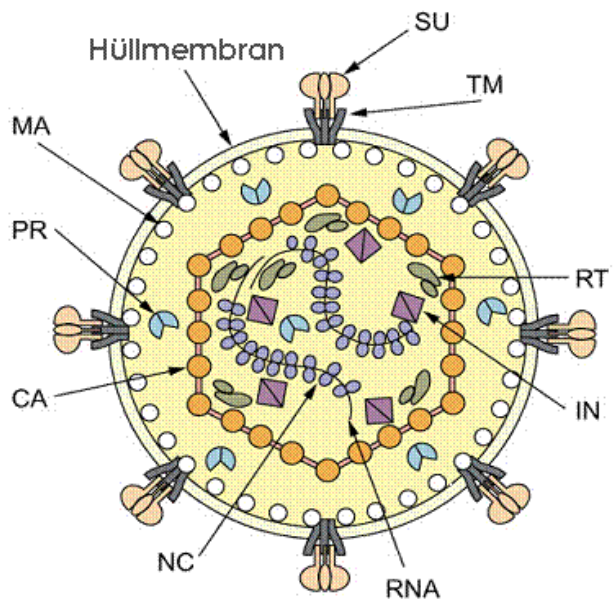


Abbildung 1.1: Aufbau eines γ -Retrovirus

SU: Oberflächenprotein, TM: Transmembranprotein, MA: Matrixprotein, CA: Kapsidprotein, NC: Nukleokapsid-proteine, IN: Integrase, RT: Reverse Transkriptase, PR: Protease [Vogt, 1997]

1.2.3 Retrovirale Genomstruktur

Das retrovirale Genom besteht aus zwei identischen positiv-einzelsträngigen RNA-Molekülen, die jeweils eine durchschnittliche Länge von etwa 10 000 Basenpaaren haben. Die RNA besitzt am 5'-Ende eine Cap-Struktur und am 3'-Ende eine Polyadenylierung und weist somit alle Charakteristika einer eukaryotischen mRNA auf. Infektiöse Partikel beinhalten in ihrem Genom mindestens drei Regionen, die für die viralen Proteine kodieren. Die Genabschnitte werden als *gag*, *pol* und *env* bezeichnet.

Das Element *gag* kodiert die Matrixproteine, Kapsidproteine und Nukleokapsidproteine, *pol* die Enzyme enthält die genetische Information für Integrase, Reverse Transkriptase und virale Protease während *env* die beiden Hüllproteine kodiert. Am 5'- und am 3'-Ende der RNA befinden sich die R-Regionen („*redundant*“), die in identischer Sequenz und Orientierung vorliegen. Sie tragen Signale für den Start bzw. für die Beendigung der Transkription. Auf den 5'-R-Bereich folgt die bei γ -Retroviren ca. 75 nt lange U5-Region („*unique*“), die invertierte Sequenzen enthält, welche für die Integration des Provirus in das Zellgenom wichtig sind. In direkter Nachbarschaft findet sich die Primerbindungsstelle (PBS), deren Sequenz von 18 Basen komplementär zum 3'-Ende einer spezifischen zellulären tRNA der Wirtszelle ist, die bei der viralen Replikation von Bedeutung ist. Auf die PBS-Region folgt die sogenannte leader-Region, die eine Spleißdonorstelle (SD) sowie eine ψ -Stelle enthält. Die Spleißdonorstelle wird für die Produktion aller gespleißten mRNA-Moleküle verwendet, wohingegen die ψ -Stelle ein Verpackungssignal darstellt, mittels dessen sich die RNA-Genome bei der Morphogenese an die Nukleokapsidproteine der sich bildenden Viruspartikel anlagern können. Am Ende der Region, die für *pol* kodiert, befindet sich die Spleißakzeptorstelle (SA). Auf das *env*-Gen folgt eine Purin-reiche Sequenz (PPT) mit mindestens neun Adenosin- und Guanosinresten, die für die Initiation der DNA-Doppelstrang Synthese bei der reversen Transkription wichtig sind. Die daneben lokalisierte und in der Länge variable U3-Region weist mit Verstärker- und Promotorbereichen wichtige Motive für die Regulation der viralen Transkription auf. In der proviralen DNA treten die U3- sowie die U5-Region aufgrund des besonderen Mechanismus der reversen Transkription an beiden Enden auf und bilden mit den R-Regionen die identisch langen terminalen Wiederholungssequenzen (*long terminal repeat*, LTR) (Abb. 1.2).

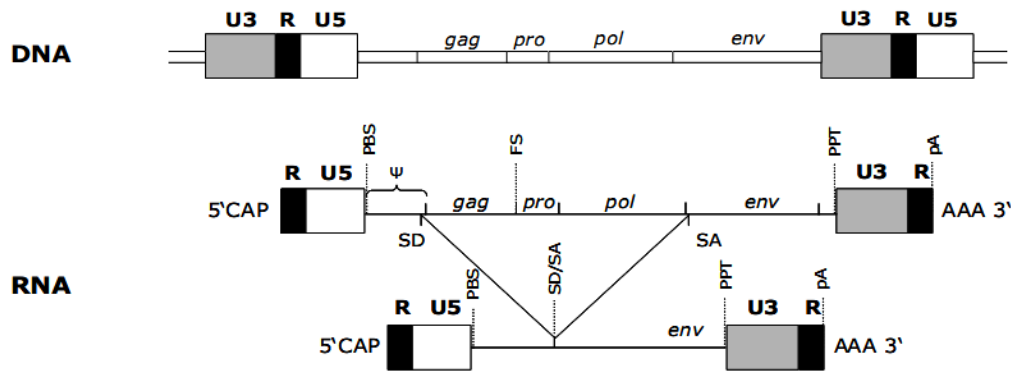


Abbildung 1.2: Genomstruktur der Retroviren

Oben: Die transkribierte virale Vollängen-RNA sowie gespleißte env-mRNA.

U3, R, U5: *long terminal repeat*, PBS: Primerbindungsstelle, ψ : Verpackungselement,

SD: Spleißdonor, SA: Spleißakzeptor, PPT: Polypurintrakt, FS: *frame shift* Stelle,

pA: Polyadenylierungssignal

Unten: Die genetische Struktur des Provirus nach der Integration in das zelluläre Genom.

[Coffin, 1997]

1.2.4 Retrovirale Replikation

Der Erste Schritt der Retrovirusreplikation stellt die Adsorption des Virions an Rezeptoren der Zelle dar. Dies wird durch das Oberflächenhüllprotein vermittelt, indem es spezifisch an ein zelluläres Oberflächenprotein bindet. Dabei kommt es zur Konformationsänderung des SU- und TM-Proteins und anschließend zur Aufnahme des Viruskapsids in das zelluläre Zytoplasma durch Fusion der Virusmembran mit der Zellmembran oder mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose.

Nach der Freisetzung des einzelsträngigen RNA-Genoms in der Zelle wird es mit der Hilfe der Reversen Transkriptase in mehreren Schritten in doppelsträngige DNA umgeschrieben, um sie später in das Wirtsgenom zu integrieren (Abb. 1.3). Zu Beginn bindet ein zellulärer tRNA-Primer an die Primerbindungsstelle (PBS) der retroviralen RNA, deren U5- und R-Region daraufhin in DNA revers transkribiert wird. Der Typ der tRNA hängt vom Virus ab und wird von der vorhergehenden Wirtszelle in das Virion eingebracht. Anschließend folgt die Entfernung der endständigen R- und U5-Bereiche der viralen RNA durch die Ribonuklease-H-Aktivität der Reversen Transkriptase und der Transfer von DNA und tRNA zum 3'-Ende. Die redundanten Bereiche sind komplementär und bilden nun die einzige Verbindungsstelle. Die weitere Synthese der DNA am 3'-Ende führt zur Verlängerung des Minusstranges, nach dessen Fertigstellung die virale RNA bis auf ein RNA-Fragment vollständig abgebaut wird. Dieses Fragment dient als Primer für die Synthese des komplementären DNA-Plusstranges, der sich in 5'-3'-Richtung bis zu der PBS-Region mit hybridisierter tRNA erstreckt. Durch die

darauffolgende Entfernung der beiden Primer entsteht ein 3'-Überhang des Plusstranges, dessen Sequenz komplementär zur PBS-Region des Erststranges ist. Die Hybridisierung dieser beiden DNA-Fragmente liefert die Primärstruktur der nachfolgenden Synthese des DNA-Zweitstranges. Nach dem Auffüllen der einzelsträngigen Enden durch die Aktivität der Reversen Transkriptase und der Ribonuklease H, liegt das Virusgenom als doppelsträngiges DNA-Molekül mit langen endständigen Sequenzwiederholungen (*long terminal repeat*, LTR) vor. Diese LTRs enthalten starke Promotoren für die Transkription und sind am Integrationsprozess beteiligt. Wegen der fehlenden Fehlerkorrektur der Reversen Transkriptase kommt es bei der Synthese der beiden DNA-Stränge relativ häufig (alle 10^3 bp bis 10^4 bp) zu einem Einbau falsch gepaarter Nukleotide, der für die hohen Mutationsraten der Retroviren verantwortlich ist.

Bis zur Integration der viralen DNA in das chromosomale Genom der Wirtszelle, verbleibt sie mit viralen Proteinkomponenten verbunden. So ist auch erst bei der Zellteilung und der damit einhergehenden Auflösung der Kernmembran eine Infektion der Zelle möglich, da die Kernmembranporen für den 20 nm bis 30 nm großen DNA/Protein-Komplex undurchlässig sind. Lentiviren wie HIV bilden hier eine Ausnahme, da sie über das akzessorische Protein Vpr verfügen, das Teil ihres Präintegrationskomplexes ist und den Transport in die Zellen katalysiert.

Im Zellkern kommt es mit Hilfe des Enzyms Integrase zur unspezifischen Integration der viralen Doppelstrang-DNA in das zelluläre Genom. Dabei entfernt die Integrase ein Dinukleotid von beiden 3'-Enden der viralen DNA und schneidet durch die Endonuklease-Aktivität die zelluläre DNA an einer unspezifischen Stelle, so dass 5'-Überhänge entstehen. Im Anschluss werden mittels zellulärer Ligasen die *sticky-ends* der Wirts-DNA mit denen der Virus-DNA verbunden. Als Provirus kann seine genetische Information exprimiert werden, oder sie kann in einem latenten Zustand verbleiben und nicht exprimiert werden.

Wenn die Promotoren im rechten LTR aktiviert werden, wird die integrierte provirale DNA durch die zelluläre RNA-Polymerase II in Transkripte umgesetzt, die mit einer Cap-Struktur versehen und polyadenyliert sind. Diese RNA-Transkripte können entweder in Viruspartikel verpackt oder prozessiert und in Virusproteine übersetzt werden. Einige Virusproteine werden anfangs durch die Translation der Vollängen-RNA als großes primäres Gag-Pro/Pol-Protein an freien zytoplasmatischen Ribosomen produziert. Dieses wird am aminoterminalen Ende myristiliert und gelangt bei den meisten Retroviren mittels zellulärer Strukturen, wie dem Zytoskelett, zur Plasmamembran, an der die Akkumulation aller viraler Proteine und Nukleotide stattfindet. Zur Translation des Env-Proteins hingegen muss bei γ -Retroviren im Zellkern ein für das *env*-Gen kodierendes RNA-Molekül mittels Spleißdonor und -akzeptor gespleißt werden (Abb. 1.2). Dieses wird anschließend mittels Signalpeptid an der aminoterminalen Domäne an der Membran des endoplasmatischen Retikulums zum Env-Vor

1 Einleitung

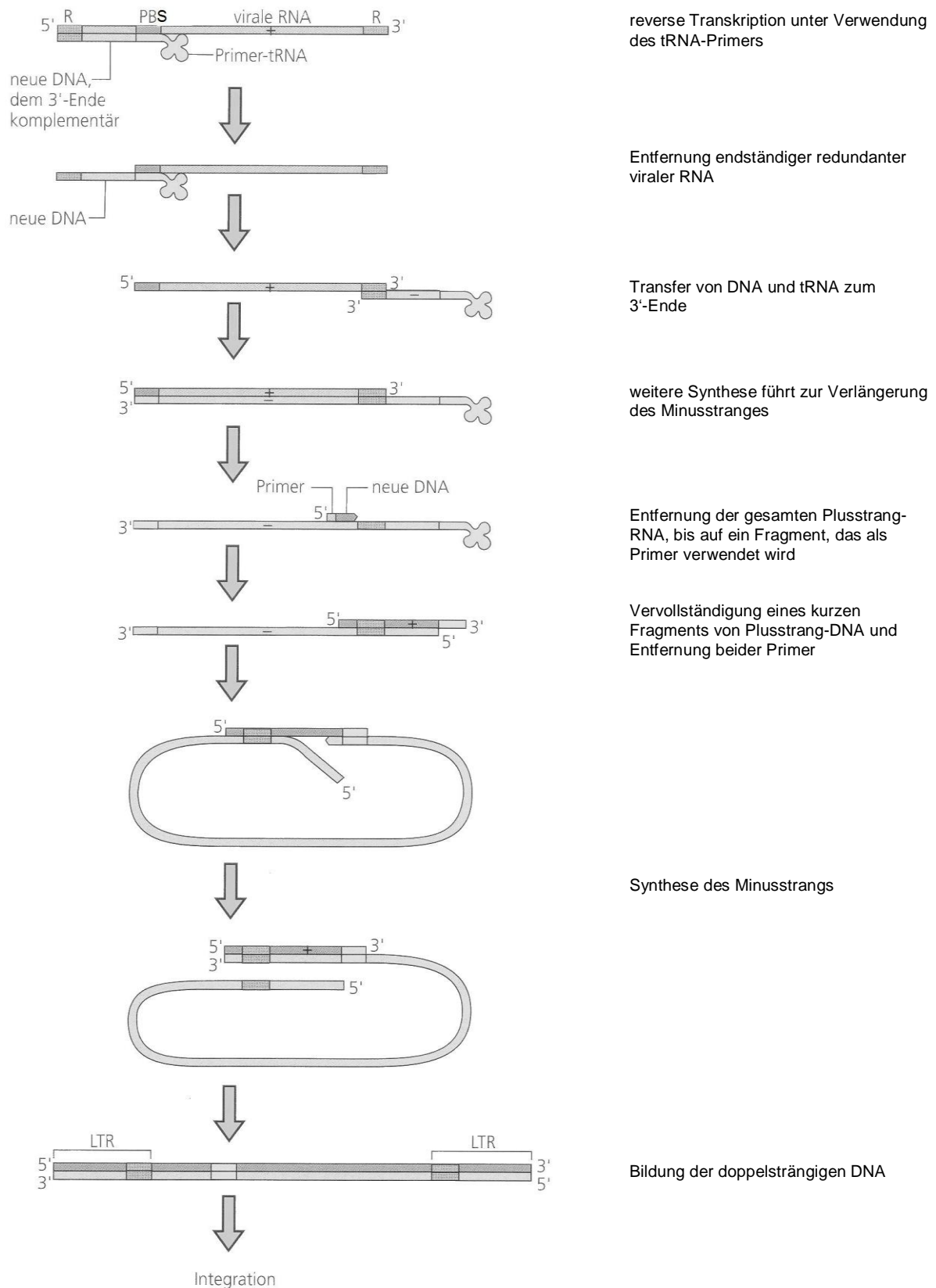


Abbildung 1.3: Bildung doppelsträngiger DNA aus einzelsträngiger RNA im Zuge der Retrovirus-Replikation
 R: redundanter Bereich, PBS: Primerbindungsstelle, LTR: *long terminal repeat*
 [Madigan, 2001]

läuferprotein prozessiert. Im Verlauf des weiteren Transportes über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche kommt es zur Glykosilierung und Spaltung in den transmembranen (TM) und externen Teil (SU) des Env-Glykoproteins. Bei den komplexeren Retroviren wie etwa den Lentiviren existieren hingegen mehrere einfach bzw. mehrfach gespleißte mRNA Spezies, die für die regulatorischen und akzessorischen Proteine kodieren. Aufgrund des vorhandenen ψ -Verpackungselements kann sich die Vollängen-RNA spezifisch an das virale Nukleokapsidprotein, das über RNA-bindende Zinkfinger motive verfügt, anlagern.

Die Virus-Proteine sowie zelleigene tRNA-Primer wandern an die Zelloberfläche und es kommt zu Ausstülpungen an der zellulären Plasmamembran, auf die schlussendlich die vollständige Abschnürung von unreifen Viruspartikeln folgt („*budding*“).

Bei einem pH-Wert von 6,0 bis 6,2 im Inneren des Partikels wird die virale Protease, die noch als Gag-Pro/Pol-Vorläuferprotein vorliegt, aktiviert und spaltet sich autokatalytisch ab. Anschließend sorgt sie für die Prozessierung der Matrix-, Kapsid-, und Nukleokapsidproteine sowie von Reverser Transkriptase und Integrase. Die im weiteren Reifungsprozess einhergehende Umlagerung der Kapsidproteine führt zur Bildung von infektiösen retroviralen Partikeln, so dass der Replikationszyklus erneut beginnen kann.

1.2.5 Porzine endogene Retroviren (PERVs)

Porzine endogene Retroviren (PERVs) wurden erstmals Anfang der 70er Jahre im Kulturüberstand einer porzinen Nieren-Zelllinie (PK15) elektronenmikroskopisch nachgewiesen [57] und konnten auch später bei der Kultivierung anderer porziner Zellen beobachtet werden [58, 59]. Aufgrund ihrer Morphologie wurden sie dem Genus der γ -Retroviren zugeordnet. Die Virionen haben einen Durchmesser von ca. 100 nm und weisen die für alle Retroviren typischen viralen Proteine Gag, Pol und Env auf (Abb. 1.2).

PERVs sind als DNA-Proviren mit mehr als 100 Kopien integraler Bestandteil des Schweine-Genoms [60-62]. Die meisten dieser Proviren sind jedoch defekt und unfähig, infektiöse Virionen zu bilden [61, 63]. Nur wenige Kopien stellen intakte, Replikations-kompetente Viren her und werden in die Subtypen PERV-A, PERV-B und PERV-C eingeteilt [64]. Die Anzahl der Kopien sowie die Freisetzung von Virus-Partikeln kann sowohl zwischen verschiedenen Schweinerassen, als auch bei einzelnen Tieren innerhalb einer Rasse variieren [65, 66]. Zudem ist die Expressionsstärke von PERV-mRNA in verschiedenen Geweben eines Schweins unterschiedlich. So konnte in Nierengewebe die höchste und im Pankreasgewebe die geringste Expression an PERV-mRNA detektiert werden. [67, 68]. Da die meisten

Proviren defekt sind und nur wenige intakte Loki existieren, ist die Anwesenheit von PERV-DNA bzw. PERV-mRNA kein sicheres Indiz für die Bildung von intakten infektiösen Partikeln. PERV-A und PERV-B sind im Genom aller Schweine vorhanden und können neben porzinen Zellen auch humane Zellen [69-72] sowie Säugetierzellen anderer Spezies *in vitro* infizieren [73-76]. Sie werden deshalb als polytrop bezeichnet. Bei PERV-C handelt es sich dagegen um ein ecotropes Virus, das nicht ubiquitär ist und nur Zellen des Schweins infizieren kann [64]. Umfangreiche Studien zeigen, dass die *in vitro* mit PERVs infizierten Zellen und Zelllinien in der Lage sind, intakte infektiöse Viruspartikel zu bilden und freizusetzen [69, 76]. Die einzelnen PERV-Subtypen enthalten hochhomologe *gag*- und *pol*-Gene, unterscheiden sich aber deutlich in ihren *env*-Sequenzen [77], was zu unterschiedlichen Rezeptor-Spezifitäten und Wirts-Tropismen führt. Für PERV-A konnten bislang zwei humane Rezeptoren (HuPAR1 und HuPAR2, *human PERV-A receptor*) identifiziert und kloniert werden [78]. Der genaue Aufbau und die Funktion sind weitgehend unbekannt und werden zurzeit noch erforscht [79, 80]. Auch die LTRs, die mit ihren starken Promotor-Bereichen, die Transkriptionsaktivität von PERV steuern, zeigen in ihrer Sequenz viele Variationen auf. So wurden vor kurzem 69 verschiedene Kopien von LTR-Elementen identifiziert [81].

Bei PERV-A und PERV-C besteht aufgrund der hohen Sequenzhomologie die Möglichkeit einer Rekombination. So wurde nach einer Infektion von humanen 293 Nierenzellen mit Überständen von porzinen *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs), die erste PERV-A/C-Rekombinante identifiziert. Diese besitzt die Genabschnitte LTR, *gag*, *pol* und Teile von *env* des PERV-C-Subtyps, aber auch einen Bereich von *env* inklusive der *receptor binding domain* (RBD) des PERV-A-Subtyps. Somit ist es der Rekombinante möglich, sich in humanen Zellen zu replizieren [71, 74, 82]. Weitere Studien zeigten eine Titererhöhung nach wiederholten Passagen auf humane Zellen, was mit einer gesteigerten Promotoraktivität durch sequentielle Multimerisierung der Bindestelle des Transkriptionsfaktors NF-Y der U3-Region der LTR zu erklären ist [83-85]. Die gesteigerte Replikationsrate der PERV-A/C-Rekombinante kann mit einer Zunahme der Pathogenität korrelieren, wie es im Fall von anderen Retroviren, z. Bsp. HIV, FeLV und MuLV beschrieben wurde [86-91]. Zudem wurde PERV-A/C *in vitro* und *de novo* als Provirus in Milzzellen von Miniaturschweinen von Münchener Miniaturschweinen, aber nicht in den Keimzellen, gefunden [82, 92-94]. Da PERV-A/Cs in der Lage sind, humane Zellen zu infizieren und eine gesteigerte Replikationsrate aufweisen, stellen sie ein zusätzliches Risiko für die Xenotransplantation dar [95]. Um die Gefahr einer potentiellen Infektion mit PERV-A/C bei einer Organ- oder Gewebetransplantation zu umgehen, sollten Schweine ausgewählt werden, die in ihrer Keimbahn keine PERV-C-Proviren tragen, um eine Rekombination von PERV-A und PERV-C zu vermeiden.

Porzine endogene Retroviren zeigen in ihrem natürlichen Wirt, dem Schwein, keine pathogene Symptomatik. Jedoch besteht die Gefahr, dass es bei einer Transspeziesübertragung von PERVs zu Immundefizienzen und aufgrund der Integration der Proviren in das zelluläre Genom, zu einer erhöhten Tumorbildung im Rezipienten führt. Diese Annahme liegt darin begründet, dass PERV große Ähnlichkeiten zu anderen bekannten γ -Retroviren, wie dem *gibbon ape leukemia virus* (GALV) [69], dem endogenen Koala Retrovirus (KoRV) [96] sowie dem felines und murinen Retroviren (FeLV, MuLV) aufweist, von denen bekannt ist, dass sie Immundefizienzen hervorrufen und die Tumorbildung induzieren [97]. Des Weiteren könnten PERVs mit humanen endogenen Retroviren (HERVs) rekombinieren, da einige HERVs Sequenzhomologien mit den Schweineviren aufweisen.

Zur verbesserten Akzeptanz des porzinen Organs im humanen Rezipienten sollen in Zukunft transgene Schweine verwendet werden (1.1.3.2). Dabei führt die Entfernung der Gal- α -1,3-gal-Epitope auf der Oberfläche von porzinen Zellen durch den doppelten Gen-Knockout der α -1,3-Galaktosyltransferase [27] zu verminderten Abstoßungsreaktionen des Empfängers, aber auch zu einem erhöhtem Risiko einer PERV-Übertragung. Dies lässt sich damit erklären, dass die von der porzinen Zellmembran abgeschnürten PERV-Partikel auf ihrer Hüllmembran ebenfalls keine Gal- α -1,3-gal-Epitope aufweisen und somit die Bindung und Neutralisation durch die sonst xenoreaktiven Antikörper ausbleibt. Zusätzlich verringert die Expression von humanen Komplement-regulierenden Proteinen auf der Oberfläche der porzinen Zellen, und damit auch auf der Hüllmembran der PERVs, die Komplementaktivierung des humanen Rezipienten. Auf diese Weise würde ein wichtiger Bestandteil des menschlichen Immunsystems, der nachweislich in der Lage ist, γ -Retroviren zu inaktivieren, ausfallen [98, 99].

Zur genauen Beurteilung der pathogenen Eigenschaften der porzinen endogenen Retroviren wäre ein Tiermodell förderlich. Umfangreiche Infektionsstudien mit nicht-humanen Primaten und vielen Kleintieren [73, 76, 100-105] sowie erste experimentelle Xenotransplantationen mit nicht-human Primaten [106-108] zeigten bis jetzt keine *in vivo* Übertragung von PERV. Bei gentechnisch veränderter Mäusen, die den PERV-A-Rezeptor-2 (HuPAR-2) auf ihren Zelloberflächen exprimieren [109], ist jedoch eine Infektion mit PERV möglich. So konnte in den Tieren nach Applikation von infektiösen PERV Überständen, virale DNA und RNA nachgewiesen werden. Mit Hilfe dieser Mäuse wäre es möglich, das pathogene Potential von PERV besser einzuschätzen sowie potentielle Therapeutika und präventive Maßnahmen zu untersuchen.

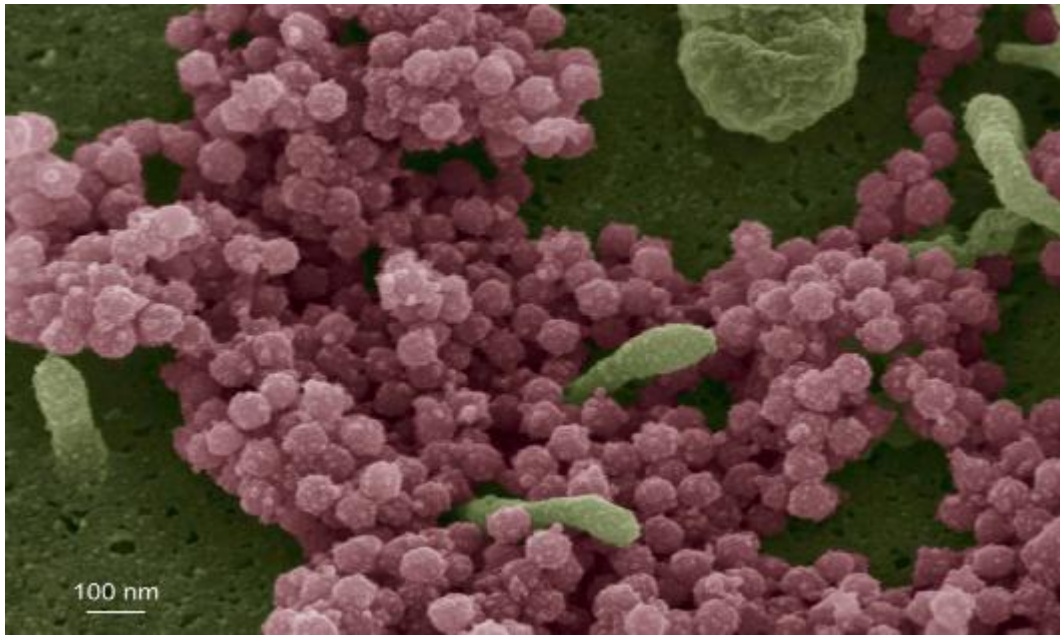


Abbildung 1.4: Rasterelektronische Aufnahme von porzinen endogenen Retroviren (PERVs)
PERV-Partikel bei der Abknospung („budding“) von humanen embryonalen Nierenzellen (293) in Falschfarbendarstellung [Dr. M. Özel, Robert Koch-Institut, Berlin]

Um die Übertragung von porzinen endogenen Retroviren bei einer Xenotransplantation schon im Vorfeld einzuschränken, sind Erfolg versprechende Strategien entwickelt worden. So gelang die Induktion von neutralisierenden Antikörpern gegen das transmembrane Hüllprotein von PERV [110, 111], so dass eine Impfung gegen das Virus denkbar ist. Da das Provirus mit über 100 Kopien an verschiedenen Loci des porzinen Genoms lokalisiert ist, gestaltet sich der Einsatz des klassischen *Gen-Knockout*-Verfahrens als äußerst schwierig. So bietet sich zum Schutz einer Übertragung die Möglichkeit der RNA-Interferenz (RNAi) an, mit der man schon auf Molekularebene die Replikation der PERVs blockieren kann. Karlas et al. konnten zeigen, dass sich mit Hilfe dieser Methode, die Virus-Expression in humanen PERV-B-infizierten Zellen um bis zu 90 % hemmen lässt [112]. Ferner wurde die PERV-Expression in porzinen primären Fibroblasten um bis zu 94,8 % und in porzinen Nierenzellen (PK15) um bis zu 73,5 % inhibiert [113]. Kürzlich ist es gelungen, transgene Schweine zu generieren, die eine PERV-spezifische *small hairpin* RNA (shRNA) exprimieren. In den entnommenen Organen dieser Tiere konnte eine um bis zu 94 % reduzierte PERV-Expression nachgewiesen werden [114]. Sollte es trotz aller Sicherheitsvorkehrungen zu einer Übertragung der porzinen endogenen Retroviren auf den Menschen kommen, könnten die bei der HIV-Therapie eingesetzten Reverse Transkriptase- und Protease-Hemmer verwendet werden. So gelang es mittels eines Nukleosidanalogs AZT, die PERV-Replikation *in vitro* zu hemmen [115, 116].

1.3 RNA-Interferenz

Eine vielversprechende Methode zur Reduzierung der Replikation von porzinen endogenen Retroviren in infizierten Zellen, Geweben und Organen stellt die RNA-Interferenz (RNAi) dar, mit deren Hilfe das Risiko einer PERV-Übertragung bei der Xenotransplantation deutlich reduziert werden könnte. Die RNA-Interferenz beschreibt einen durch kurze doppelsträngige RNA-Moleküle ausgelösten hoch konservierten Mechanismus, der zur Sequenz-spezifischen Degradierung der mRNA und damit zur post-transkriptionellen Stilllegung von Genen führt. Erstmals Ende der 90er Jahre wurde die RNAi, die vermutlich einen der ältesten Abwehrstrategien gegen virale Infektionen darstellt, aber von der Zelle auch als Instrument für Genregulationen genutzt wird, in den Fadenwürmern *C. elegans* beobachtet [117]. Inzwischen wurde der Mechanismus der RNA-Interferenz durch umfangreiche Studien an *C. elegans* und *Drosophila melanogaster* teilweise aufgeklärt.

In der ersten Phase werden doppelsträngige RNA-Moleküle endogenen (z. Bsp. micro RNA, miRNA) oder exogenen (z. Bsp. virale RNA) Ursprungs durch das Schlüsselenzym Dicer RNase III zytoplasmatisch in kleine 21 bp bis 23 bp kurze RNA-Fragmente (small interfering RNA, siRNA) gespalten, welche an den 3'-Enden einen 2 nt-Überhang besitzen (Abb. 1.5). Eine anschließende Phosphorylierung der 5'-Enden des siRNA-Duplex führt zur Bindung an den im Zytoplasma vorkommenden Nukleasekomplex RISC (*RNA induced silencing complex*), der die Sequenz-spezifische Erkennung und Degradation der Ziel-mRNA unterstützt. Durch die in der zweiten Phase unter ATP-Verbrauch stattfindenden Entwindung der doppelsträngigen siRNA wird der RISC aktiviert und mit Hilfe des antisense-Strangs (as) der siRNA über komplementäre Basenpaarung an die korrespondierende mRNA-Sequenz herangeführt. Dieser schneidet die zelluläre mRNA an definierter Stelle innerhalb der siRNA-Bindungsstelle oder blockiert sie, um eine Translation des mRNA-Abschnittes zu unterbinden. Anschließend wird die geschnittene und nun ungeschützte mRNA mittels zellulärer RNasen komplett degradiert und somit die Bildung des Proteins verhindert.

Der Einsatz doppelsträngiger RNA mit einer Länge von 38 bp bis 1662 bp induziert bei Säugern, im Gegensatz zu einfachen Organismen, eine unspezifische Hemmung aller Genprodukte. Deswegen ist der Einsatz von dsRNAs mit dieser Länge für die Inhibition von spezifischen Genen in Säugern ungeeignet. Als Ersatz können synthetisch hergestellte siRNAs dienen, die genauso wie die Dicer-Spaltprodukte meist 21 nt kurz sind und einen Überhang am 3'-Ende aufweisen. Sie sind aufgrund ihrer geringen Größe leicht zu transfizieren und lösen in den Zellen keine unerwünschte Interferonantwort aus. Ein entscheidender Nachteil besteht aber in der Wirksamkeitsdauer in der die Proteinsynthese gehemmt wird. Nach vier bis fünf Tagen fällt die Konzentration der siRNAs durch Abbau oder

Zellteilung und der einhergehenden Ausverdünnung in den Zellen rapide ab, so dass keine spezifische Blockierung der entsprechenden Gene mehr nachgewiesen werden kann. Ein weiterer Nachteil stellen die hohen Kosten für die Synthese dieser Polynukleotide dar. Abhilfe verschaffen sog. *small hairpin RNAs* (shRNAs), die eine Proteinsynthese eines spezifischen Gens dauerhaft hemmen können. Sense- und Antisense-Strang dieser shRNA sind direkt über eine kurze unspezifische Nukleotidsequenz (*Loop*) miteinander verbunden und bilden eine Haarnadelstruktur aus, die den Einbau in den RISC ermöglicht. Die codierende DNA-Sequenz steht unter der Kontrolle eines Polymerase III-Promotors und ist stabil im Genom der jeweiligen Zielzellen integriert.

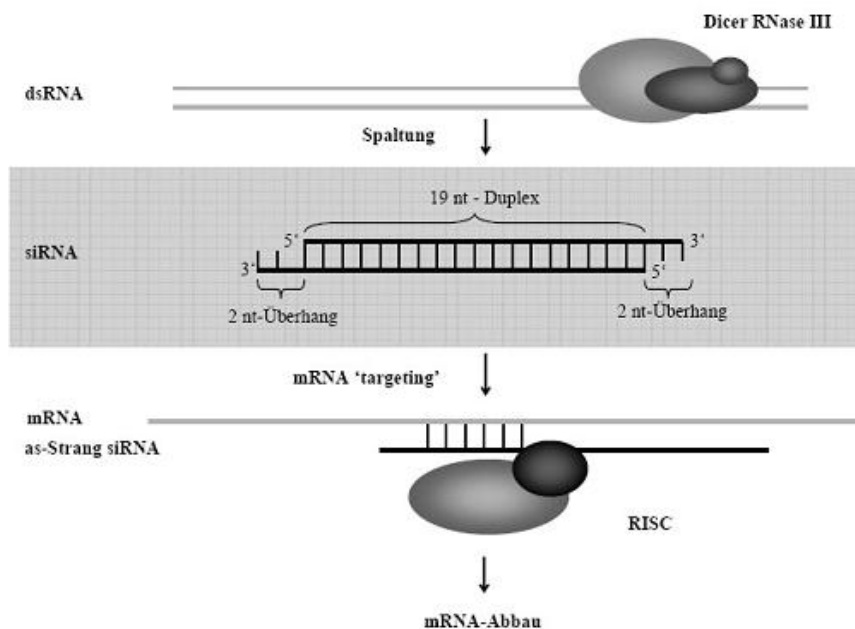


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des RNAi-Mechanismus

Die dsRNA wird unter ATP-Verbrauch mittels der Dicer RNase III in 21 nt bis 23 nt kleine siRNAs prozessiert. Das siRNAs-Duplex wird entwunden und aktiviert den RISC, der die mRNA anschließend Sequenz-spezifisch spaltet. Die mRNA-Fragmente werden daraufhin von RNasen komplett degradiert.

[McManus et al., 2002]

1.4 Zielsetzung

Die Xenotransplantation stellt eine vielversprechende Möglichkeit dar, um dem weltweiten Mangel an Alлотransplantaten zu begegnen. Als Spendertier für Zellen, Gewebe und Organe wird momentan das Schwein bevorzugt. Allerdings müssen die damit verbundenen Risiken, wie immunologische Abstoßungsreaktionen und physiologische Inkompatibilitäten des Empfängers erst weitgehend eliminiert werden, damit eine erfolgreiche Transplantation vom Schwein auf den Menschen in Zukunft garantiert werden kann. Zudem besteht die Gefahr der Übertragung von Mikroorganismen, insbesondere von porzinen endogenen Retroviren (PERVs) [45]. Diese Viren sind in hoher Kopienzahl im Genom aller Schweine integriert und lassen sich im Gegensatz zu fast allen anderen Mikroorganismen durch *designated pathogen free* (DPF)-Bedingungen bei der Zucht der Tiere nicht eliminieren. PERVs sind in der Lage, humane Zellen *in vitro* zu infizieren [69-72] und stehen unter dem Verdacht Immundefizienzen auszulösen und Tumore zu induzieren [97]. Des Weiteren besteht aufgrund der Sequenzhomologie die Möglichkeit der Rekombination untereinander oder mit anderen Viren. Obwohl weder in Infektionsversuchen noch in ersten Xenotransplantationen eine PERV-Übertragung beobachtet wurde [73, 76, 100-105], besteht dennoch das Risiko einer Infektion. So wurden in den letzten Jahren Strategien entwickelt, um die Gefahr einer Übertragung von porzinen endogenen Retroviren auf den Menschen zu minimieren. Eine Erfolg versprechende Möglichkeit bietet der Einsatz einer zur PERV-Sequenz komplementären shRNA.

Auf Basis dieser Methode gelang die Generierung shRNA-transgener Schweine, in denen eine deutlich verminderte Replikation von PERV beobachtet wurde [114]. Inzwischen wurden erneut transgene Schweine generiert, die die gleiche shRNA exprimieren, wie die Vorgängergeneration.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem Nachweis und der Bestimmung der Expression von PERV in primären Fibroblasten, die aus den shRNA-Ferkeln sowie den Kontrolltieren isoliert wurden. Dazu wird das Virus mit Hilfe der PCR bzw. RT-PCR qualitativ und der *realtime*-RT-PCR quantitativ bestimmt. Des Weiteren soll eine neue *real-time*-RT-PCR etabliert werden, um evtl. Unterschiede in der Detektionsempfindlichkeit zur bisherigen Methode aufzuzeigen.

Wie letzte Studien belegen [113, 114], führt die eingesetzte shRNA in den transgenen Schweinen zu einer deutlich verminderten PERV-Expression. Um die Effizienz der Hemmung noch zu steigern, wurden neue shRNAs generiert, die jeweils in verschiedenen Bereichen der PERV-mRNA komplementär binden. Die codierenden Sequenzen dieser shRNAs wurden mit der Expressionskassette der bisher verwendeten shRNA zu Doppel-

kassetten verknüpft und anschließend einzeln und in der Kombination in ein retrovirales Vektorsystem kloniert.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollen mittels eines retroviralen Systems PK15- und PERV-A/C-infizierte 293 Zellen mit den generierten Einzel- und Doppelexpressionskassetten der shRNAs transfiziert werden. Im Anschluss erfolgt die Analyse der Zelllinien im Hinblick auf die PERV-Expression mittels molekularbiologischer und proteinchemischer Nachweismethoden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Bezeichnung	Stamm/Genotyp
Top10 F'	E. coli / F'(lacIq, Tn10(TetR)) mcrA Δ(mrrhsdRMS-mcrBC) Φ80 lacZΔm15 ΔlacX74 deoR recA1 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(StrR) endA1nupG)

2.1.2 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
AMPLITAQ GOLD DNA Polymerase	Applied Biosystems
SUPERScript™ III Reverse Transcriptase (RT)	Invitrogen
PLATINUM® TAQ DNA Polymerase	Invitrogen
DNase	Qiagen
RNase A	Qiagen
T4 DNA Ligase	Roche
SHRIMP ALKALINE PHOSPHATASE	Fermentas
BamHI	NEB
BglII	NEB
EcoRI	NEB
HindIII	NEB
MfeI	NEB
SacII	NEB
Proteinase K	Qiagen
Trypsin	Invitrogen

2.1.3 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Referenz
<u>Detektion</u>		
PERV envA for	TGGAAAGATTGGCAACAGCG	[60]
PERV envA rev	AGTGATGTTAGGCTCAGTGG	[60]
PERV envB for	TTCTCCTTTGTCAATTCCGG	[60]
PERV envB rev	TACTTTATCGGGTCCCACTG	[60]
PERV envC for	CTGACCTGGATTAGAACTGG	[64]
PERV envC rev	ATGTTAGAGGATGGTCCTGG	[64]
PERV real-time for	TCCAGGGCTCATAATTTGTC	Fiebig, 2007
PERV real-time rev	TGATGGCCATCCAACATCGA	Fiebig, 2007
PERV vor SD for	TGCTGTTTGCATCAAGACCGC	Karlas, 2004
PERV hinter SA rev	ATGGAGGCGAAGCTTAAGGGGA	Karlas, 2004
outer pSir for	CCTCCGCCTCCTCTTCCTCCATCC	diese Arbeit
outer pSir rev	GGCCTACCCGCTTCCATTGCTCAG	diese Arbeit
<u>Sequenzierung</u>		
pSiren Seq for	CTCCCTTTATCCAGCCCTCACTCC	Jobst, 2007
pSiren Seq rev	GAAAAGCGCCTCCCCTACC	Jobst, 2007
T7 promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	AG Denner
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC	AG Denner
<u>real-time PCR</u>		
PERV real-time for	TCCAGGGCTCATAATTTGTC	Fiebig, 2007
PERV real-time rev	TGATGGCCATCCAACATCGA	Fiebig, 2007
PERV pol c for	ATGTGGATGAGCGTAAGGGAGTAG	diese Arbeit
PERV pol c rev	GTCTGGGGGCTGCCGAACGAT	diese Arbeit
porz. GAPDH real for	ACATGGCCTCCAAGGAGTAAGA	[118]
porz. GAPDH real rev	GATCGAGTTGGGGCTGTGACT	[118]
porz. Cycl. real for	TGCTTTCACAGAATAATTCCAGGATTTA	[118]
porz. Cycl. real rev	GACTTGCCACCAGTGCCATTA	[118]
humanes GAPDH 41	GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC	[119]
humanes GAPDH 42	TGGTCCACACCCATGACGA	[119]

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Referenz
<u>Tagman-Sonden</u>		
PERV gag Sonde	FAM-AGAAGGGACCTTGGCAGA CTTTCT-BHQ1	Fiebig, 2007
PERV pol c Sonde	FAM-TAGGACCATGGAGGAGACCT GTTGCC-BHQ1	diese Arbeit
porz. GAPDH Sonde	HEX-CCACCAACCCCAGCAAGA GCACGC-BHQ1	[119]
porz. Cyc. Sonde	Cy-TGCCAGGGTGGTGACTIONTCA CACGCC-BHQ2	[119]
humane GAPDH Sonde	HEX-CTTCACCACCATGGAGAAG GCTGGG-Dabcyl	[120]

Klonierung

	LINKER SENSE/ANTISENSE SEQUENZ LOOP	
shRNA pol II Sense	GATCCCCGGACGCTGACAAATTGACT TTCAAGAGAAGTCAATTTGTCAGCGTCC TTTTTGAAA	[112]
shRNA pol II ASense	AGCTTTTCCAAAA GGACGCTGACAAATTGACTTCTCTTGAA AGTCAATTTGTCAGCGTCCGGG	[112]
shRNA I Sense	GATCCCC GGAGGGAAATAAAGAACAAAGCGAA CTTTGTTCTTTATTTCCCTCCTTTTTA	Jobst, 2007
shRNA I ASense	AGCTTAAAAA GGAGGGAAATAAAGAACAAAGTTCG CTTTGTTCTTTATTTCCCTCCGGG	Jobst, 2007
shRNA II Sense	GATCCCC GCAAGGACCTTACAGACATACCGAA GTATGTCTGTAAGGTCCTTGCTTTTTA	Jobst, 2007
shRNA II ASense	AGCTTAAAAA GCAAGGACCTTACAGACATACTTCG GTATGTCTGTAAGGTCCTTGCGGG	Jobst, 2007
shRNA III Sense	GATCCCC GCAGGAGAGAGGTAACATACTCGAA AGTATGTTACCTCTCTCCTGCTTTTTA	Jobst, 2007

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Referenz
shRNA III ASense	AGCTTAAAAA GCAGGAGAGAGGTAACATACTTTCG AGTATGTTACCTCTCTCCTGC GGG	Jobst, 2007
shRNA 21 Sense	GATCCCCGCCCTCTTAGTTTGACTCTC GACCATCGAAATGGTTCGAGAGTCAA ACTAAGAGGGTTTTTA	Scobie, 2007
shRNA 21 ASense	AGCTTAAAAACCCTCTTAGTTTGACTCTC GACCATCGAAATGGTTCGAGAGTCAAA CTAAGAGGGC GGG	Scobie, 2007
shRNA 67 Sense	GATCCCC GCTCATAATTTGTCAGTTCAGGTTACGAA TAACCTGAACTGACAAATTATGAGCTTTTTTA	Scobie, 2007
shRNA 67 ASense	AGCTTAAAAA GCTCATAATTTGTCAGTTCAGGTTATTCG TAACCTGAACTGACAAATTATGAGC GGG	Scobie, 2007
shRNA EnvA1 Sense	GATCCCC GCAAGCAATGGAGCTGCATAACGAA TTATGCAGCTCCATTGCTTGC TTTTTA	diese Arbeit
shRNA EnvA1 ASense	AGCTTAAAAA GCAAGCAATGGAGCTGCATAATTCG TTATGCAGCTCCATTGCTTGC GGG	diese Arbeit
shRNA EnvA2 Sense	GATCCCC GGGAAATTCAATGTGACAAAGCGAA CTTTGTCACATTGAATTTCCC TTTTTA	diese Arbeit
shRNA EnvA2 ASense	AGCTTAAAAA GGGAAATTCAATGTGACAAAGTTCG CTTTGTCACATTGAATTTCCC GGG	diese Arbeit
shRNA EnvB1 Sense	GATCCCC GCAATAGTACTGTGGTTTATGCGAA CATAAACCACAGTACTATTGC TTTTTA	diese Arbeit
shRNA EnvB1 ASense	AGCTTAAAAA GCAATAGTACTGTGGTTTATGTTCG CATAAACCACAGTACTATTGC GGG	diese Arbeit
shRNA EnvB2 Sense	GATCCCC GGTTTGAAGGATGGTTCAACA CGAA TGTTGAACCATCCTTCAAACC TTTTTA	diese Arbeit

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Referenz
shRNA EnvB2 ASense	AGCTTAAAAA GGTTTGAAGGATGGTTCAACA TTCG TGTTGAACCATCCTTCAAACC GGG	diese Arbeit
shRNA Luzif. Sense	GATCCCC GTGCGCTGCTGGTGCCAACCC CGAA GGGTTGGCACCAGCAGCGCAC TTTTTA	[121]
shRNA Luzif. ASense	AGCTTAAAAA GTGCGCTGCTGGTGCCAACCC TTCG GGGTTGGCACCAGCAGCGCAC GGG	[121]

2.1.4 Plasmide

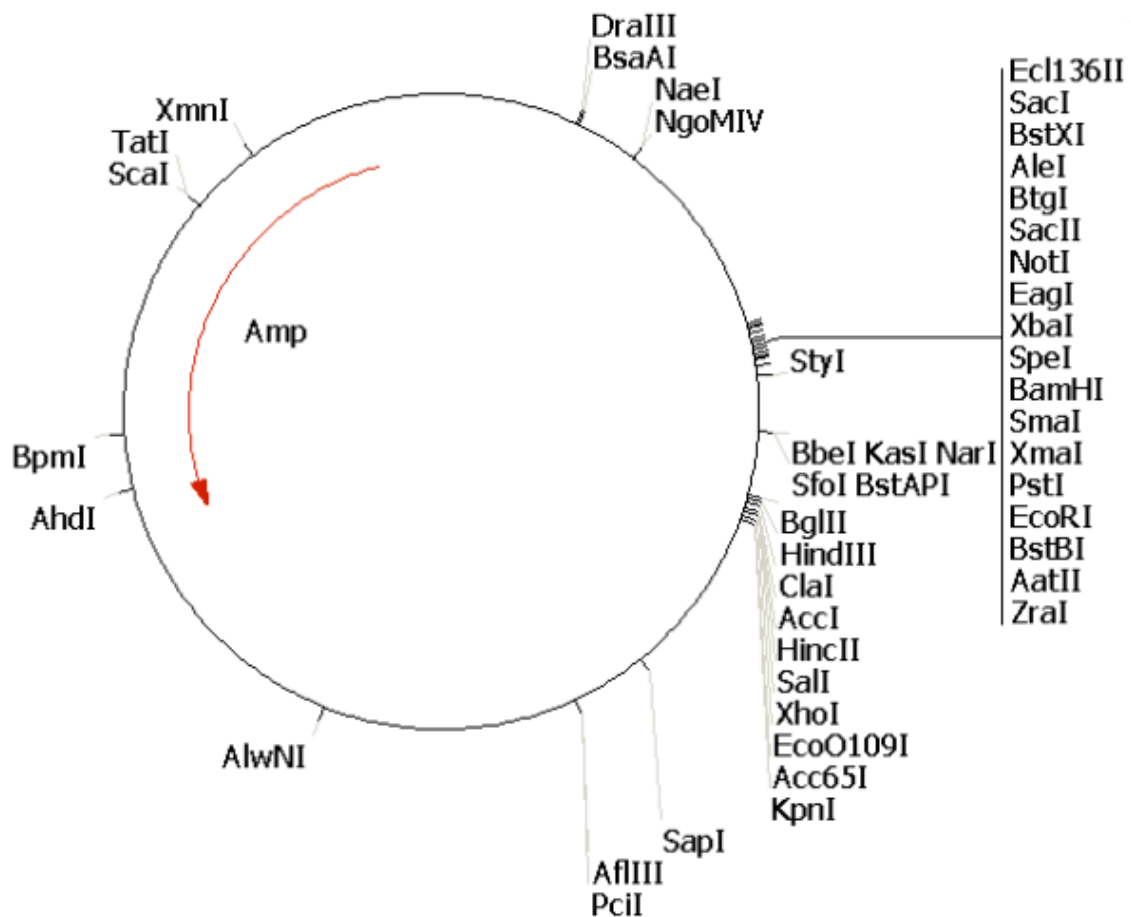


Abbildung 2.1: pSuper [Oligoengine, Seattle, WA, USA]

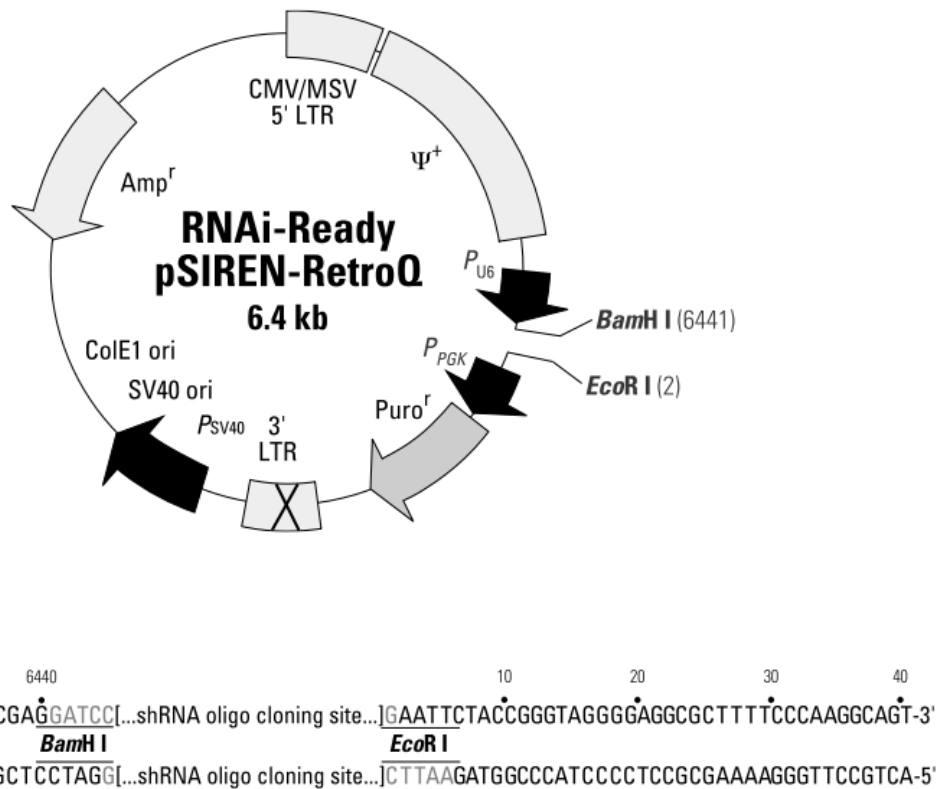


Abbildung 2.2: RNAi-Ready pSiren-RetroQ [Clontech, Mountain View, CA, USA]

2.1.5 Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Ziege anti-p27 Gag (PERV) AK Ziegenserum 14	1:200	hergestellt in der AG Denner, RKI [110]
Monoklonaler Anti-β-Actin AK Klon AC-74	1:5 000	Sigma-Aldrich
Polyklonaler Kaninchen Anti-Ziege AK HRP	1:2 000	Dako
Polyklonaler Kaninchen Anti-Maus AK HRP	1:1 000	Dako

2.1.6 Eukaryotische Zellen

Bezeichnung	Spezies	Zelltyp	Bezugsquelle
HEK 293	Mensch	Embryonale Nierenzelllinie	Paul-Ehrlich-Institut
HEK 293-PERV 5°	Mensch	Embryonale Nierenzelllinie	Paul-Ehrlich-Institut
PK15	Schwein	Nierenzelllinie	[113]
PFF F10	Schwein	primäre fötale Fibroblasten	Friedrich-Löffler Institut
PT67	Maus	NIH 3T3 abgeleitet	Clontech

2.1.7 Versuchstiere

Tiere	Bezugsquelle
Deutsche Landrasse Schweine, transgen, 2. Generation	Friedrich-Loeffler Institut Institut für Nutztiergenetik Mariensee

Von den Schweinen wurde ausschließlich Probenmaterial erhalten.

2.1.8 Nährmedien und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
<u>Bakterienkultur</u> LB-Vollmedium	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl ggf. 100 µg/ml Ampicilin
LB-Vollmedium-Platten	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl 1,5 % (w/v) Agar Agar ggf. 100 µg/ml Ampicilin

Bezeichnung

Zusammensetzung

Zellkultur

Nährmedium

DMEM

4,5 g/l Glukose

10 % (v/v) FKS (Biochrom)

2 mM Glutamin (Biochrom)

100 U/ml Penicillin (Biochrom)

100 µg/ml Streptomycin (Biochr.)

15 mM HEPES-Puffer (Biochrom)

Nährmedium (fötale Fibroblasten)

zus. 0,1 mM β -Mercaptoethanol

zus. 1 % (v/v) nicht essentielle

Aminosäuren (Sigma-Aldrich)

zus. 1 % (v/v) Vitaminlösung

(Sigma-Aldrich)

PBS „ohne“

140 mM NaCl

6,4 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

10 mM KCl

2 mM KH_2PO_4 , pH 7,2

Plasmid-Isolation

Lösung I

50 mM Glucose

25 mM Tris

10 mM EDTA

RNase A (200 µg/ml)

Lösung II

0,2 N NaOH

1 % (w/v) SDS

Lösung III

3 M Kaliumacetat pH 5,2

Agarose-Gelelektrophorese

10 x DNA-Ladepuffer

50 % (v/v) Glycerin

2 % (v/v) 1 x TAE

1 Spatelspitze Orange G

Bezeichnung

50 x TAE-Puffer

Zusammensetzung

2 M Tris

50 mM EDTA

1 M Essigsäure, pH 8,0

Proteinisolation

RIPA-Puffer

150 mM NaCl

10 mM Tris (pH 7,2)

0,1 % (w/v) SDS

1 % (v/v) Triton X-100

1 % (w/v) Deoxycholat

5 mM EDTA

1 mM Phenylmethylsulfonyl-fluorid

10 mM Benamidin

2 µg/ml Leupeptin

100 µM Natriumorthovanadat

10 mM p-Nitrophenylphosphat

SDS-PAGE

SDS-Probenpuffer

50 mM TrisHCl, pH 6,8

12 % (v/v) Glycerin

5 % (v/v) β-Mercaptoethanol

4 % (w/v) SDS

0,01 % (w/v) Coomassie Brilliant
Blue G-250

Anodenpuffer

200 mM Tris, pH 8,9

Kathodenpuffer

100 mM Tris

100 mM Tricin

0,1 % (w/v) SDS

Western Blot

Transferpuffer

48 mM Tris

39 mM Glycin

20 % (v/v) Methanol

0,038 % (v/v) SDS

Bezeichnung	Zusammensetzung
Waschpuffer	PBS „ohne“ 0,05 % Tween 20
Blockierungspuffer	Waschpuffer 5 % (w/v) Magermilchpulver

2.1.9 Kommerzielle Kits

Bezeichnung	Herstellung
INVISORB SPIN PLASMID MINI TWO KIT	Invitex
INVISORB PLASMID MAXI KIT	Invitex
ENDOFREE PLASMID MAXI KIT	Qiagen
DNEASY BLOOD & TISSUE KIT	Qiagen
RNEASY MINI KIT	Qiagen
RNASE-FREE DNASE SET	Qiagen
QIAQUICK GEL EXTRACTION KIT	Qiagen
INVISORB FRAGMENT CLEANUP	Invitex

2.1.10 Hersteller

Firma	Firmensitz
American National Can	Menasha, WI, USA
Applied Biosystems	Forster City, CA, USA
Biorad	München, Deutschland
Biochrom	Berlin, Deutschland
Biozym	Hess. Oldendorf, Deutschland
Clontech	Mountain View, CA, USA
Dako	Glostrup, Dänemark
DNA Star	Madison, WI, USA
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Fermentas	St.Leon-Roth, Deutschland
Fujifilm	Düsseldorf, Deutschland
GE Healthcare	München, Deutschland

Firma	Firmensitz
Greiner Bio One	Frickenhausen, Deutschland
Hofer	San Francisco, CA, USA
Invitak	Berlin, Deutschland
Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Millipore	Schwalbach, Deutschland
Novagen	Darmstadt, Deutschland
New England Biolabs	Frankfurt, Deutschland
Oligoengine	Seattle, WA, USA
PAA	Pasching, Österreich
Peqlab	Erlangen, Deutschland
Pierce	Bonn, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
Roche	Mannheim, Deutschland
Roth	Karlsruhe, Deutschland
Serva	Heidelberg, Deutschland
Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Stratagene	Amsterdam, Niederlande
USB Corporation	Cleveland, OH, USA
Tecan	Crailsheim, Deutschland
TPP	Trasadingen, Schweiz
Wheaton	Millville, NJ, USA
Zeiss	Göttingen, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Stammhaltung von Bakterien

Escherichia Coli-Kulturen wurden zur längerfristigen Aufbewahrung mit sterilem wasserfreien Glycerin versetzt (10 % (v/v)) und bei -20 °C in Kryogefäßen (Greiner Bio One) gelagert. Glycerin verhindert die Eiskristallbildung während des Einfrierprozesses und damit die irreversible Schädigung der Zellen.

Häufig verwendete Bakterienstämme konnten auf LB-Vollmediumplatten (ggf. mit Ampizillin (100 µg/ml Endkonz.)) mit PARAFILM (American National Can) umwickelt für vier Wochen bei 4 °C gelagert werden.

2.2.1.2 Kultivierung von Bakterien

E. coli Bakterien wurden unter Schütteln (230 rpm) bei 37 °C in LB-Vollmedium angezogen. Bei Plasmid-vermittelter Ampizillinresistenz wurden die Bakterien durch die Zugabe des Antibiotikums (100 µg/ml Endkonz.) zum Medium unter Selektionsdruck gesetzt. Die Animpfung der Medien erfolgte durch Übertragung von Einzelkolonien von Nährbodenplatten oder aus Glycerinstocks.

2.2.1.3 Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation durch Hitzeschock

Für das Einbringen von Plasmid-DNA in *Escherichia coli* (Transformation) müssen diese vorerst durch eine spezielle Behandlung in einen kompetenten Zustand versetzt werden. Dazu wurde ein Protokoll zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen von Qiagen verwendet [QIAexpressionist, 5. Auflage, 2003, S. 39].

Für eine Transformation von *E. coli*-Stämmen Top10 wurde pro Ansatz ein 100 µl Aliquot chemisch kompetenter Bakterien langsam auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden Plasmid-DNA versetzt (10 pg bis 1 ng) und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 90 s bei 42 °C und eine weitere zwei-minütige Inkubation auf Eis. Danach wurden die Bakterien mit 500 µl LB-Medium ohne Antibiotikum versetzt und für 45 min bis 60 min bei 37 °C geschüttelt, so dass die über das eingebrachte Plasmid vermittelte Antibiotikumresistenz ausgebildet werden konnte. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Nährbodenplatten mit Selektionsantibiotikum ausplattiert und für ca. 16 h über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte durch Aufschluss von Bakterien nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Durch anschließende Fällungen, Zentrifugationsschritte, Phenol-

Chloroform-Extraktionen oder Säulenaufreinigungen sowie RNase-Behandlung, wurden denaturierte Proteine, RNA und ein Großteil der chromosomalen DNA entfernt.

Für eine Minipräparation wurden 2 ml Bakterienkultur bei 10 000 x g für 1 min zentrifugiert, das Pellet in 250 µl Lösung I resuspendiert, 250 µl Lösung II zugegeben, vorsichtig gemischt, 250 µl Lösung III und zwei Tropfen Chloroform hinzugefügt, wieder vorsichtig gemischt und bei 14 000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend mit 600 µl Isopropanol versetzt und bei 14 000 x g für 15 min zentrifugiert, das Pellet mit 750 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet, je nach DNA-Menge mit 30 µl bis 100 µl sterilem ddH₂O eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Alternativ wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe der kommerziellen Kits INVISORB SPIN PLASMID MINI TWO KIT (Invitex) bzw. INVISORB PLASMID MAXI KIT (Invitex) nach Angaben des Herstellers isoliert. Das Prinzip basiert auf der Bindung der pDNA an eine Silikamatrix.

Für sehr reine und nahezu Endotoxin-freie Plasmid-DNA erfolgte die Isolierung mit Hilfe des kommerziellen Kits ENDOFREE PLASMID MAXI KIT (Qiagen).

2.2.2.2 Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

Für die Isolierung von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen wurde das kommerzielle DNEASY BLOOD & TISSUE KIT (Qiagen) verwendet. Bei der Methode wird die DNA an eine Silikamatrix gebunden und über Waschschriffe aufgereinigt.

Dafür wurden ca. 5×10^6 Zellen mit PBS „ohne“ gewaschen, für 5 min bei 300 x g pelletiert und der Überstand verworfen. Die weiteren Arbeitsschriffe erfolgten nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde zuletzt mit 200 µl sterilem ddH₂O eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.2.3 Phenol-Chloroform-Extraktion

Proteinhaltige Verunreinigungen von Nukleinsäurepräparationen werden meist über die klassische Methode der Phenol-Chloroform-Extraktion beseitigt. Hierbei denaturiert Phenol die Proteine, die dann zum größten Teil in der sogenannten Interphase zwischen der wässrigen Nukleinsäurelösung und der organischen Phase ausfallen. Dazu wurde die DNA-haltige Lösung nacheinander mit einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) und einem Volumen Chloroform ausgeschüttelt; dazwischen jeweils bei 16 000 x g für 5 min zentrifugiert und die obere, wässrige Phase mit der DNA, unter Vermeidung der Interphase, in ein neues Gefäß überführt und im Anschluss einer Isopropanolfällung unterworfen. Nach einem Waschriff mit 70 % (v/v) Ethanol wurde das getrocknete Pellet mit 30 µl bis 100 µl sterilem ddH₂O eluiert.

2.2.2.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe der kommerziellen Kits RNEASY MINI KIT (Qiagen) und RNASE-FREE DNASE SET (Qiagen). Die Methode basiert auf der Lyse und Homogenisierung der Zellen durch einen Guanidin-Isothiocyanat Puffer (RLT), der anschließenden Bindung der RNA an eine Silikamatrix und verschiedenen Waschschritten, um kontaminierende Substanzen zu entfernen.

Dafür wurden die Zellen mit PBS „ohne“ gewaschen, sedimentiert (1 000 x g, 5 min), der Überstand restlos entfernt, das Zellpellet (ca. 5×10^6 Zellen) mit 350 μ l Puffer RLT (Qiagen) (1 % (v/v) Mercaptoethanol) resuspendiert und gründlich homogenisiert. Nach der Zugabe von 350 μ l 70 % (v/v in DEPC-Wasser) Ethanol und behutsamer Homogenisierung, wurde die Säule beladen und bei 8 000 x g für 15 s zentrifugiert. Der erste Waschschriff erfolgte durch die Zugabe von 350 μ l Puffer RW1 (Qiagen) und anschließender Zentrifugation bei 10 000 x g für 15 s. Daraufhin wurde die Säule mit einer Mischung aus Puffer RDD (Qiagen) und DNase I (Qiagen) (1:7) beladen und für 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde nacheinander mit 350 μ l Puffer RW1 (Qiagen) und 2 x mit 500 μ l Puffer RPE (Qiagen) gewaschen und jeweils bei 10 000 x g für 15 s zentrifugiert. Um die Säule vollständig zu trocknen, wurde nochmals bei 16 000 x g für 2 min zentrifugiert. Abschließend erfolgte die Elution der RNA mit 30 μ l bis 50 μ l DEPC-Wasser (Zentrifugation 10 000 x g, 1 min), die dann bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert wurde.

2.2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

DNA und RNA absorbieren aufgrund der Eigenschaften der enthaltenen Purin- und Pyrimidinbasen im ultravioletten Bereich zwischen 250 nm und 270 nm. Diese Tatsache kann für die Quantifizierung von Nukleinsäuren genutzt werden.

Die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen wurde mit Hilfe des NANODROP SPECTROPHOTOMETERS ND-1000 (peQLab) gemessen. Dafür wurde 1 μ l der zu untersuchenden Probe eingesetzt und mit Hilfe der Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm, die Konzentration in ng/ μ l bestimmt.

Die zyklischen Seitenketten der Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin absorbieren hingegen bei einer Wellenlänge von 280 nm. Dies lässt sich nutzen, um den Grad der Verunreinigung (Protein/Phenol) der Proben festzustellen.

Dazu wurde zeitgleich die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen und der Quotient aus A_{260} und A_{280} gebildet. Dieser Wert sollte für saubere DNA zwischen 1,8 und 1,9 sowie für RNA zwischen 1,9 und 2,0 liegen.

2.2.2.6 Restriktion von DNA

Restriktionsendonukleasen sind eine Klasse von bakteriellen Enzymen, die in beiden Strängen eines DNA-Moleküls innerhalb spezifischer Basensequenzen (Palindrome) Phosphodiester-Bindungen spalten. Die Restriktion diente sowohl als präparatives Hilfsmittel sowie auch analytischen Zwecken zur Überprüfung von Plasmiden nach Klonierungen. Bei optimalen Puffer- und Temperaturbedingungen spaltet in der Regel eine Einheit Enzym [1 U] 1 kb DNA in einer Stunde.

Für einen Restriktionsverdauansatz von 25 µl bis 50 µl wurden 2 U bis 6 U Enzym/µg DNA verwendet und unter den entsprechenden Puffer- und Temperaturbedingungen 1 h bis 16 h inkubiert. Das Ergebnis konnte anschließend mittels Agarosegelelektrophorese überprüft werden.

2.2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4 DNA-Ligase katalysiert in Anwesenheit von ATP die kovalente Phosphodiester-Bindung zwischen der 5'-Phosphat- und der 3'-Hydroxylgruppe von überstehenden (*sticky*) und glatten (*blunt*) DNA-Enden.

Das Volumen eines Ligationsansatzes betrug 20 µl bis 30 µl und beinhaltete neben 50 ng bis 100 ng Vektor-DNA, die 5-fach molare Menge Fragment-DNA, DNA-Ligase-Puffer (Roche), steriles ddH₂O und 2 Einheiten [2 U] T4 DNA-Ligase (Roche). Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16 °C.

Bei einer *blunt end* Ligation wurde die Vektor-DNA nach der Restriktion mit dem Enzym SHRIMP ALKALINE PHOSPHATASE (Fermentas) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert, um eine Religation zu vermeiden.

2.2.2.8 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Analyse, Quantifizierung und Aufreinigung von Nukleinsäurefragmenten. Das Prinzip basiert auf der, je nach Größe, unterschiedlich schnellen Wanderung und der damit einhergehenden Auftrennung von DNA-Fragmenten im elektrischen Feld innerhalb eines festen Agarose-Trägermaterials. Dabei handelt es sich um ein Polymer, das aus verschiedenen verknüpften Galaktoseeinheiten besteht. Die Wandergeschwindigkeit der negativ geladenen DNA ist zudem abhängig von der Agarosekonzentration, der angelegten Spannung, der Art des Laufpuffers sowie der Anwesenheit interkalierender Farbstoffe.

Zur Herstellung eines Agarose-Gels wurden 0,8 % bis 2 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer suspendiert, in einer Mikrowelle erhitzt, unter Rühren auf ca. 60 °C abgekühlt und mit Ethidium-bromid (0,5 µg/ml) versetzt, welches für die Detektion der DNA unter UV-Licht erforderlich ist. Anschließend wurde die Agarose in einen vorbereiteten Gelschlitten (Bio-Rad) mit passendem Kamm gegossen. Nach Erstarren des Gels konnte der Schlitten in eine (WIDE) MINI-SUB CELL GT Gelkammer (Bio-Rad) mit Laufpuffer (1x TAE) überführt und die Geltaschen mit den entsprechenden Proben beladen werden, die zuvor mit 1/10 Volumen 10 x Ladepuffer Orange G versetzt wurden. Um die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente zu bestimmen, wurde der kommerzielle DNA-Längenstandard O'GENERULER (Fermentas) mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80 V bis 110 V für 30 min bis 60 min. Das Gel wurde anschließend auf dem UV-Schirm GEL DOC 2000 (Bio-Rad) fotografiert und mit der QUANTITY ONE SOFTWARE (Bio-Rad) digital ausgewertet.

2.2.2.9 Gelextraktion linearer DNA-Fragmente

Die Aufreinigung von spezifischen DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel nach einer Elektrophorese wurde mit Hilfe der kommerziellen Kits QIAQUICK GEL EXTRACTION KIT (Qiagen) oder INVISORB FRAGMENT CLEANUP (Invitex) nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Bei dieser Methode binden die Nukleinsäuren an eine Silikamatrix und werden über mehrere Waschstschritte aufgereinigt. Die Lagerung der DNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C.

2.2.2.10 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Die PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren, die sich die Eigenschaft von thermostabilen DNA-Polymerasen zu Nutze macht, DNA zu duplizieren. Voraussetzung für diesen Prozess ist ein kurzer Abschnitt doppelsträngiger DNA mit einem freien 3'-OH-Ende. Ein solcher Abschnitt wird durch die Zugabe von künstlich synthetisierten Oligonukleotiden (Primern) geschaffen, die mit den zu amplifizierenden Einzelsträngen hybridisieren und anschließend von einer DNA-Polymerase durch kovalentes Anfügen von Desoxynukleotiden (dNTPs) unter Abspaltung von Pyrophosphat verlängert werden können. Denaturiert man anschließend die neu synthetisierte doppelsträngige DNA durch eine Temperaturerhöhung wieder in Einzelstränge, so können die Primermoleküle erneut binden und der Vorgang wiederholt sich. Die Menge der DNA verdoppelt sich somit bei jedem Zyklus, so dass es zu einer exponentiellen Amplifikation des DNA-Fragmentes kommt.

2 Material und Methoden

Die PCR erfolgte in den PCR-Reaktionsgefäßen PCR SOFT STRIPS (Biozym) mit Hilfe des PCR-Thermocyclers MASTERCYCLER EP GRADIENT S (Eppendorf).

Die Temperaturprogramme der PCRs variierten je nach Schmelztemperatur (T_M) der entsprechenden Primerkombinationen und der Länge des Amplifikates.

Tabelle 2.1: Komponenten und Temperaturprogramm einer Standard-PCR

Komponente	Volumen [μ l]
template DNA ((50 bis 200) ng/ μ l)	1
10x PCR-Puffer (inkl. 15 mM $MgCl_2$), Applied Biosystems	2,5
$MgCl_2$ (25 mM), Applied Biosystems	0,5
dNTPs (je 10 mM), Applied Biosystems	0,5
sense Primer (10 mM)	0,5
antisense Primer (10 mM)	0,5
AMPLITAQ GOLD (5 U/ μ l), Applied Biosystems	0,25
H ₂ O, Nuklease-frei	ad 25

Denaturierung		Primer-Anlagerung	Elongation		
95 °C/5 min	95 °C/15 s	(37 bis 60) °C/30 s	72 °C/(15 bis 70) s	72 °C/(2 bis 7) min	4 °C/ ∞
----- (25 bis 35) Zyklen -----					

2.2.2.11 one-step RT (Reverse Transcriptase) PCR

Die *one-step* RT (Reverse Transkriptase) PCR kombiniert die Umschreibung von RNA in cDNA durch eine Reverse Transkriptase und die anschließende PCR durch eine Polymerase mit Hilfe genspezifischer Primer. Die in einem Schritt ablaufenden Reaktionen dienen u. a. dem Expressionsnachweis von Genen.

Für die *one-step* RT-PCR wurde das SUPERSCRIPT III ONE-STEP RT-PCR SYSTEM WITH PLATINUM TAQ DNA POLYMERASE (Invitrogen) verwendet.

2 Material und Methoden

Tabelle 2.2: Komponenten und Temperaturprogramm einer *one-step* RT-PCR

Komponente	Volumen [μ l]
Gesamt-RNA (20 ng/ μ l)	5
2x Reaktions-Mix, (0,4 mM je dNTP, 3,2 mM MgSO ₄), Invitrogen	12,5
<i>sense</i> Primer (10 mM)	1
<i>antisense</i> Primer (10 mM)	1
SUPERSCRIPT III RT/PLATINUM TAQ MIX, Invitrogen	0,5
H ₂ O, Nuklease-frei	ad 25

cDNA-Synthese	Denaturierung		Primer-Anlagerung	Elongation		
50 °C/30 min	94 °C/2 min	94 °C/15 s	60 °C/30 s	68 °C/30 s	68 °C/7 min	4 °C/ ∞
----- 40 Zyklen -----						

2.2.2.12 *one-step* RT (Reverse Transcriptase) *real-time* PCR

Die *one-step* RT (Reverse Transkriptase) *real-time* PCR ist eine sensitive Technik zur Quantifizierung spezifischer RNA-Sequenzen und basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR. Sie kombiniert die Umschreibung von RNA in cDNA und eine anschließende *real-time* PCR in einem Schritt. Zur Detektion können sowohl sequenzspezifische Fluoreszenz-markierte Sonden, als auch nicht-sequenzspezifische fluoreszierende Farbstoffe eingesetzt werden. Die gemessene Fluoreszenz nimmt dabei im Idealfall proportional zur Menge der DNA-Amplifikate zu und wird über den sog. C_T-Wert (threshold cycle) bestimmt. Dieser wird definiert als der Zyklus, bei dem die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs den Schwellenwert der Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Die Messung findet in jedem Zyklus am Ende der Elongation statt.

Bei denen in dieser Arbeit ausschließlich verwendeten sequenzspezifischen TaqMan-Sonden (Abb. 2.3) handelt es sich um Oligonukleotide, die am 5'-Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (z. B. 6-Carboxy-fluorescein, FAM) und am 3'-Ende einen Quencher (z. B. Black Hole Quencher 1, BHQ1) tragen und inmitten der zu amplifizierenden Sequenzen spezifisch binden. Wird das Reporter-Fluorochrom der Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) angeregt, hat dies zur Folge, dass die Energie an den sich in räumlicher Nähe befindlichen Quencher (Förster-Radius) strahlungsfrei übertragen (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer – FRET) und die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs unterdrückt wird. In der Elongationsphase wird nun die hybridisierte Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut, was zur räumlichen Trennung von Reporter- und Quencher-Fluorochrom führt. Der Energietransfer ist somit unterbrochen und die damit einhergehende ansteigende Fluoreszenz des Reporter-Fluorochroms kann

2 Material und Methoden

detektiert werden. Freie, nicht-hybridisierte Sonde wird hingegen nicht hydrolysiert. Störende Fluktuationen der Fluoreszenz können mit Hilfe eines mitgeführten passiven Referenzfarbstoffs (ROX) ausgeglichen werden.

Für die one-step RT *real-time* PCR wurde das SUPERSCRIPT III PLATINUM ONE-STEP QUANTITATIVE RT-PCR SYSTEM (Invitrogen) verwendet und erfolgte in den *real-time* PCR-Reaktionsgefäßen STRIPTUBE 8X .2ML (Stratagene) mit Hilfe des *real-time* PCR-Thermocyclers MX4000 (Stratagene).

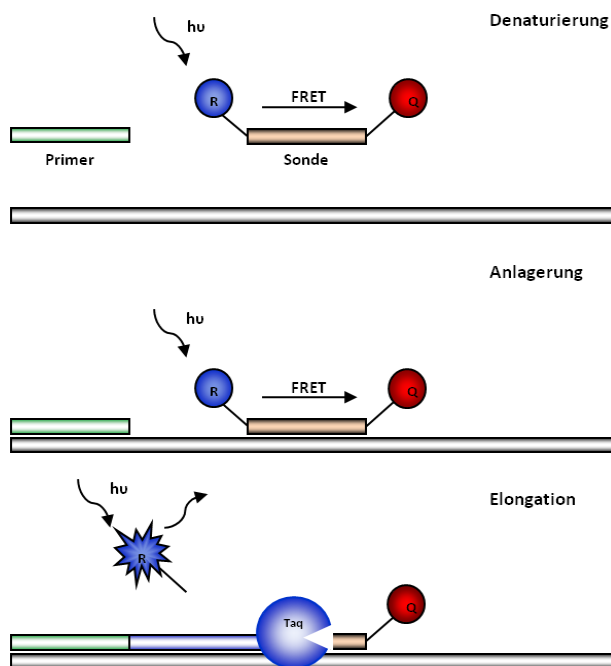


Abbildung 2.3: Funktionsweise der TaqMan-Sonden Hydrolyse

Die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase (Taq) führt bei der Amplifikatverlängerung zur Hydrolyse der TaqMan-Sonde und damit zur räumlichen Trennung des Reporterfluorochroms (R) und dem Quencher (Q). Bei der Anregung des freien Reportermoleküls mit einer externen Lichtquelle (hu) wird die Energie nicht an den Quencher abgegeben (FRET), sondern in Form von Fluoreszenz abgestrahlt.

Tabelle 2.3: Komponenten und Temperaturprogramm einer one-step RT *real-time* PCR

Komponente	Volumen [µl]
Gesamt-RNA (10 ng/µl)	5
2x Reaktions-Mix (0,4 mM je dNTP, 6 mM MgSO ₄), Invitrogen	12,5
MgSO ₄ (50 mM), Invitrogen	1
sense Primer (10 mM)	1
antisense Primer (10 mM)	1
Sonde (10 mM)	0,5
ROX (25 µM), Invitrogen	0,1
SUPERSCRIPT III RT/PLATINUM TAQ Mix, Invitrogen	0,5
H ₂ O, Nuklease-frei	ad 25

cDNA-Synthese	Denaturierung		Primer-Anlagerung / Elongation
(42 bis 60) °C/15 min	95 °C/2 min	95 °C/15 s	(50 bis 60) °C/(30 bis 60s)

----- 40 Zyklen -----

Die Auswertung der gemessenen Triplikate erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode von Livak und Schmittgen [122] mit Hilfe der Software MX Pro (Stratagene) und Excel 2003 (Microsoft).

2.2.2.13 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte in dem institutseigenen Service-Labor und basiert auf der Didesoxy-Methode [123]. Die Sequenzen lagen anschließend als Datei vor und wurden mit der Software LASERGENE 8 (DNA Star) ausgewertet.

Tabelle 2.4: Komponenten und Temperaturprogramm einer Sequenzierungs-PCR

Komponente	Volumen [μ l]
DNA (150 ng/ μ l)	2
BigDye-Mix 3.1	2
Primer (10 mM)	0,5
5 x Puffer	1
H ₂ O, Nuklease-frei	ad 10

Denaturierung	Primer-Anlagerung	Elongation	
96 °C/2 min	96 °C/10 s	(45 bis 60) °C/5 s	60 °C/4 min
----- 25 Zyklen -----			
			4 °C/ ∞

2.2.3 Proteinchemische Methoden

2.2.3.1 Isolierung von Gesamtprotein aus eukaryotischen Zellen

RIPA (*Radioimmunoprecipitation assay*)-Puffer ist ein etabliertes Reagenz zur Gewinnung von Gesamtprotein aus eukaryotischen Zellen. Die Behandlung der Zellen mit der Pufferkomposition führt zur Zellyse und Solubilisierung der Proteine.

Dafür wurden die Zellen mit PBS „ohne“ gewaschen, pelletiert und mit eiskaltem RIPA-Puffer resuspendiert. Nach einer zehn-minütigen Inkubation auf Eis wurden die unlöslichen Bestandteile sedimentiert (10 000 x g, 10 min, 4 °C) und der Überstand mit den löslichen Proteinen abgenommen. Die Lagerung des Proteingemisches erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C.

2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinproben wurde der BCA-Test (Pierce) verwendet. Bei dieser Methode bilden Proteine mit Cu²⁺-Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret-Reaktion). Die Cu²⁺-Ionen des Komplexes werden zu Cu⁺-Ionen reduziert,

die mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden. Die Farbintensität kann anschließend mit einem Spektrophotometer bestimmt werden.

Zur Herstellung einer Kalibrierungsgeraden diente ein Proteinstandard (Pierce) mit den Konzentrationen 1 200 µg/ml, 1 000 µg/ml, 800 µg/ml, 600 µg/ml, 400 µg/ml und 200 µg/ml. Nach Herstellung der Gebrauchslösung (50 Teile Reagenz A, 1 Teil Reagenz B) wurden 200 µl von dieser zu den in einer 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegten 10 µl des Standards, der Nullkontrollen und der Proben hinzugegeben. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37 °C wurden die Absorptionen bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 492 nm im ELISA-READER (Tecan) gemessen und die Proteinkonzentration im Vergleich zu der Kalibrierungsgeraden bestimmt. Um eventuelle Messfehler gering zu halten, wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

2.2.3.3 SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*)-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) ist ein anionisches Detergenz und überdeckt die Eigenladung von Proteinen so effektiv, dass Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen. Bei der Behandlung der Proteine mit einem Überschuss SDS und gleichzeitiger Erhitzung auf 95 °C werden die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspaltung der Wasserstoffbrückenbindungen und durch Streckung der Moleküle aufgelöst. Bei der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese wandert der SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld zum Plus-Pol. Dabei erfolgt die Fokussierung des SDS-Protein-Komplexes im weitporigen Sammelgel und die Auftrennung durch den Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix nach dem Stokes-Radius und damit nach dem Molekulargewicht des jeweiligen Proteins.

Tabelle 2.5: Komponenten eines Sammel- und Trenngels für die diskontinuierliche SDS-PAGE

4 % Sammelgel		10 % Trenngel	
2,0 ml	Gelpuffer (0,1 M Tris-HCl, 0,3 % (w/v) SDS, pH 8)	5,0 ml	Gelpuffer (0,1 M Tris-HCl, 0,3 % (w/v) SDS, pH 8)
3,2 ml	H ₂ O	5,0 ml	H ₂ O
0,8 ml	ROTIPHORESE GEL @30 (30 % Acrylamidlösung, 37,5:1, Roth)	5,0 ml	ROTIPHORESE GEL @30 (30 % Acrylamidlösung, 37,5:1, Roth)
10 µl	Temed (USB)	10 µl	Temed (USB)
100 µl	Ammoniumpersulfat (10 %)	100 µl	Ammoniumpersulfat (10 %)

Dazu wurden die Proteinproben in gleichem Volumen SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Die verwendeten SDS-Gele waren 1,5 mm stark und

setzten sich aus einem Trenngel (10 % Acrylamid) und einem Sammelgel (4 % Acrylamid) zusammen, die zuvor gegossen wurden. Dieses wurde anschließend in das MIGHTY SMALL II SYSTEM (Höfer) eingespannt und die Elektrophoresekammer mit Anoden- und Kathodenpuffer befüllt. Die Geltaschen wurden danach mit 7 µl eines kommerziellen vorgefärbten Größenstandard PAGERULER (Fermentas) und mit ca. 50 µl der jeweiligen Proteinproben beladen. Die Elektrophorese erfolgte bis zum Erreichen des Trenngels bei einer Stromstärke von 15 mA, danach bei 30 mA. Anschließend konnten die aufgetrennten Proteine durch einen Elektro Blot auf eine Membran übertragen werden.

2.2.3.4 Western Blot-Analyse

Beim Western Blot werden aufgetrennte Proteine auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch auf eine Membran übertragen und mittels spezifischer Enzym-gekoppelter Antikörper durch eine Nachweisreaktion detektiert.

Dazu wurden die Proteine nach der Auftrennung mit Hilfe der TRANSBLOT SEMI-DRY TRANSFER CELL (Biorad) Apparatur durch ein senkrecht zum Gel orientiertes elektrisches Feld für 20 min bei einer Spannung von 20 V auf eine Polyvinylidifluorid (PVDF)-Membran (0,2 µm Porengröße, Millipore) transferiert. Das Gel sowie zwei Blotting-Filterpapiere (Peglab) wurden zuvor in Transferpuffer äquilibriert, die Membran mit Methanol angefeuchtet. Nach dem Blotten wurde diese an der Luft getrocknet und zur weiteren Verwendung erneut kurz in Methanol getaucht. Freie Bindungsstellen der Membran, die nicht durch Proteine besetzt waren, wurden durch eine zwei-stündige Inkubation bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in einer Blockierungslösung abgesättigt. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Membran mit einem primären Antikörper für zwei Stunden in der Blockierungslösung bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Die Verdünnung wurde nach Angaben des Herstellers vorgenommen. Ungebundene Antikörper konnten durch dreimaliges je zehn-minütiges Waschen mit Waschpuffer entfernt werden. Im Anschluss wurde die Membran für 1 h bis 2 h bei Raumtemperatur mit einem Spezies-spezifischen Peroxidase (POD)-konjugierten Sekundärantikörper (Dako) inkubiert. Die Verdünnung erfolgte in der Blockierungslösung nach Angaben des Herstellers. Nach drei weiteren zehn-minütigen Waschschritten in Waschpuffer konnten die Proteine nach der ECL-Methode (*enhanced chemilumineszenz*, ECL WESTERN BLOTTING SUBSTRATE, Pierce) mit Hilfe eines Röntgenfilms (CL-XPOSURE FILM 5 x 7, Pierce) nach Angaben des Herstellers detektiert werden. Für die Belichtungszeit wurde je nach Fluoreszenzintensität eine Dauer von einer Sekunde bis mehrere Minuten gewählt.

2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.4.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung aller eukaryotischer Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und 91 % Luftfeuchtigkeit in dem Brutschrank BBD 6220 (Heraeus). Sämtliche Zellkultur-Arbeiten wurden unter der Sterilbank HERASAFE (Heraeus) durchgeführt.

Zum Erhalt der Zellen wurden diese bei einer Konfluenz von ca. 80 % passagiert. Hierfür wurde das Medium verworfen und die Zellen vorsichtig mit warmem PBS „ohne“ gewaschen. Um adhärenente Zellen vom Boden der Kulturschale zu lösen, wurden sie anschließend 3 min mit vorgewärmtem Trypsin/EDTA (Invitrogen) bei 37 °C inkubiert und in frischem vorgewärmten Medium evtl. unter Zuhilfenahme eines Zellschabers resuspendiert. Ein Teil der Zellen wurde anschließend in neue Zellkulturschalen oder -flaschen (TPP) überführt.

2.2.4.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Eukaryotische Zellen wurden zur längerfristigen Aufbewahrung bei –196 °C über flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden die Zellen trypsiniert, vereinzelt und bei 500 x g für 5 Minuten pelletiert. Bis zu 2 x 10⁶ Zellen wurden anschließend in 1 ml eiskaltem FKS mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen und in ein vorgekühltes 2 ml Kryogefäß (Greiner Bio One) überführt. DMSO verhindert die Eiskristallbildung während des Einfrierprozesses und damit die irreversible Schädigung der Zellen. Gleichzeitig ist DMSO zytotoxisch, weswegen vorgekühlte Gefäße und Lösungen und ein zügiges Arbeiten erforderlich sind. Die Zellen wurden einige Stunden bei -20 °C und danach über Nacht bei -80 °C gelagert. Anschließend wurden sie in die Gasphase von flüssigem Stickstoff überführt und katalogisiert. Auf diese Weise konnte ein langsamer Zell-schonender Einfrierprozess gewährleistet werden.

Zur Weiterkultivierung wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und sofort in 10 ml warmes Medium überführt und bei 500 x g für 2 min abzentrifugiert, um überschüssiges DMSO zu entfernen. Nach der Resuspension des Zellpellets in 5 ml bzw. 13 ml Medium wurde das gesamte Volumen in einer 25 cm² bzw. 75 cm² Kulturflasche ausgesät und unter oben beschriebenen Zellkulturbedingungen inkubiert.

2.2.4.3 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau

Trypanblau ist ein anionischer Diazofarbstoff, welcher unspezifisch mit Proteinen interagiert und dient u. a. der Vitalfärbung von Zellen. Dabei dringt er durch die defekte Zellmembran in abgestorbene Zellen ein, was in einer dunkelblauen Färbung resultiert. Vitale Zellen nehmen den Farbstoff hingegen nicht auf und erscheinen unter dem Mikroskop weiß leuchtend. Trypanblau ist zytotoxisch, so dass die Zellzählung und Vitalitätsbestimmung direkt nach dem Anfärben erfolgen muss, um ein fehlerhaftes Ergebnis zu vermeiden.

Die Bestimmung wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Dazu wurden gleiche Volumina (10 µl) der Zellsuspension und 0,4 % Trypanblau-Lösung (Sigma-Aldrich) gemischt und in die Zählkammer gefüllt. Das Auszählen der Zellen der vier Eckquadrate erfolgte unter einem Mikroskop bei 10- bis 40-fach vergrößerndem Objektiv. Die Zellzahl/ml wurde anschließend wie folgt berechnet:

Zellzahl/ml = (gezählte Zellzahl x Verdünnungsfaktor x Kammerkapazität)/4

2.2.4.4 Transfektion eukaryotischer Zellen mit Plasmid-DNA

Als Transfektion wird das Einbringen von Fremd-DNA oder -RNA in eukaryotische Zellen bezeichnet. Dabei unterscheidet man zwischen dem nur zeitweiligen Einbringen der Nukleinsäuren in die Wirtszelle (transiente Transfektion) und dem dauerhaften Einbau in das Genom (stabile Transfektion). Eine Methode stellt die Lipofektion dar. Kationische Lipidvesikel binden hierbei an die negativ geladene DNA bzw. RNA und der dabei entstehende Nukleinsäure-Liposomen-Komplex kann durch Fusion mit der Zellmembran aufgenommen werden.

Zur Transfektion eukaryotischer Zellen mit Plasmid-DNA wurde das Transfektionsreagenz LIPOFECTAMINE 2000 (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Hemmung der PERV-Expression in Fibroblasten Pol2-shRNA-transgener Schweine

3.1.1 Generierung shRNA-transgener Schweine mittels Nukleus-Transfer

In einer früheren Publikation dieser Arbeitsgruppe [112] wurden zahlreiche synthetische siRNAs, die komplementäre Bindungen zu verschiedenen Bereichen der PERV-Sequenz aufwiesen, generiert und hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Replikation von PERV zu inhibieren, untersucht. Eine siRNA (Pol2), deren Bindungsstelle im hochkonservierten *pol*-Bereich der PERV-Sequenz lag, konnte die virale mRNA in infizierten 293-Zellen um bis zu 82 % hemmen und war damit effizienter als alle anderen siRNAs. Da sich die einzelnen PERV-Subtypen A, B und C nur im Bereich des *env*-Gens unterscheiden (1.2.5), war die Pol2-siRNA in der Lage, die Expression aller porcinen endogenen Retroviren gleichermaßen zu reduzieren. Für die stabile Expression in Form einer Pol2-shRNA, wurde daraufhin eine neu generierte Expressionskassette auf Basis der Pol2-siRNA in einen Expressionsvektor kloniert.

Um Pol2-shRNA-transgene Schweine mit verminderter PERV-Expression zu generieren, war es zu Beginn notwendig, primäre porcine Fibroblasten mit der entsprechenden shRNA-Expressionskassette zu transfizieren. Da sich jedoch direkte Transfektionen von primären Zellen mit Expressionsvektoren als sehr schwierig erweisen und nur geringere Effizienzen zu erwarten waren, kam ein lentivirales Vektorsystem zum Einsatz [113], mit dessen Hilfe eine stabile shRNA-Expression in den Zielzellen ermöglicht wurde. Der dafür verwendete Vektor pLVTHM [124] ist als *doublecopy* Vektor konzipiert (Abb. 3.1), so dass die in der 3' LTR lokalisierte und unter der Kontrolle des H1-Promotors stehende shRNA-Expressionskassette während der reversen Transkription verdoppelt wird (1.2.4). Des Weiteren kodiert ein Gen das *Green Fluorescent Protein* (GFP), welches nach erfolgreicher Transduktion der Zellen translatiert wird und unter UV-Licht sichtbar gemacht werden kann.

Die Generierung der Pol2-shRNA-transgenen Schweine erfolgte nach der Methode des Nukleustransfer [125] im Institut für Nutztiergenetik in Mariensee. Dazu wurde der Zellkern eines lentiviral pLVTHM-Pol2 transduzierten Fibroblasten in eine entkernte und *in vitro* befruchtete Eizelle eingesetzt und in die Muttersau eingebracht.

Alle Ferkel der ersten Generation verstarben kurz nach der Geburt, so dass man sich für einen erneuten Nukleustransfer mit dem Einsatz von vier Muttertieren entschied. Nach einer

für Schweine üblichen Tragezeit von 116 Tagen wurden sechs Pol2-shRNA-transgene Ferkel sowie 11 Leervektor-transgene-Kontrolltiere geboren. Drei der shRNA-transgenen Ferkel wurden kurz nach der Geburt vom Muttertier erdrückt. Von den restlichen drei transgenen Schweinen sowie einigen Kontrolltieren konnten Ohrbiopsien zu DNA-Isolierung und primäre Fibroblasten zur Weiterkultivierung entnommen werden.

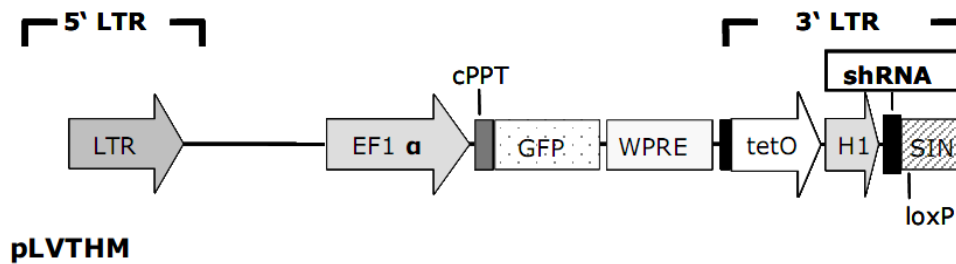


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des lentiviralen Vektors pLVTHM

LTR: *long terminal repeat*, EF1 α : Elongationsfaktor-1 α Promotor, cPPT: zentraler Polypurintrakt, GFP: *Green Fluorescent Protein*, WPRE: post-transkriptionelles Element des Woodchuck Hepatitis B Virus, tetO: Tetracyclin Operator, H1: Polymerase III H1-RNA Gen Promotor, shRNA: *small hairpin* RNA, loxP: Rekombinationsstelle der Cre-Rekombinase für den Bakteriophagen P1, SIN: selbst inaktivierendes Element

3.1.2 Nachweis der Transgen-Integration mittels Fluoreszenz

Auf dem zur Transduktion von primären porzinen Fibroblasten eingesetzten lentiviralen pLVTHM-Vektor ist ein Gen lokalisiert, welches das *Green Fluorescent Protein* (GFP) verschlüsselt. Mit Hilfe dieses Proteins, das unter UV-Licht fluoresziert, konnten die erfolgreich transduzierten Fibroblasten durch Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung angereichert werden. Die Anregung des GFPs der Pol2-shRNA-transgenen Ferkel sowie der Kontrolltiere mit UV-Licht, führte ebenso zu einer Emissionsstrahlung im sichtbaren Bereich und damit zum Nachweis des Transgens in den generierten Schweinen (Abb. 3.2).

Die Fluoreszenz war in Kollagen-haltigen Bereichen der Klauen und der Rüsselscheibe besonders gut ausgeprägt. Die nicht-transgenen Schweine zeigten bei der Bestrahlung mit UV-Licht hingegen keine Fluoreszenzaktivität (Abb. 3.2). Keines der generierten Tier wies unter VIS-Licht sichtbare Anomalien auf, die auf eine Genmutation und damit fehlerhafte Expression von Proteinen schließen lässt.

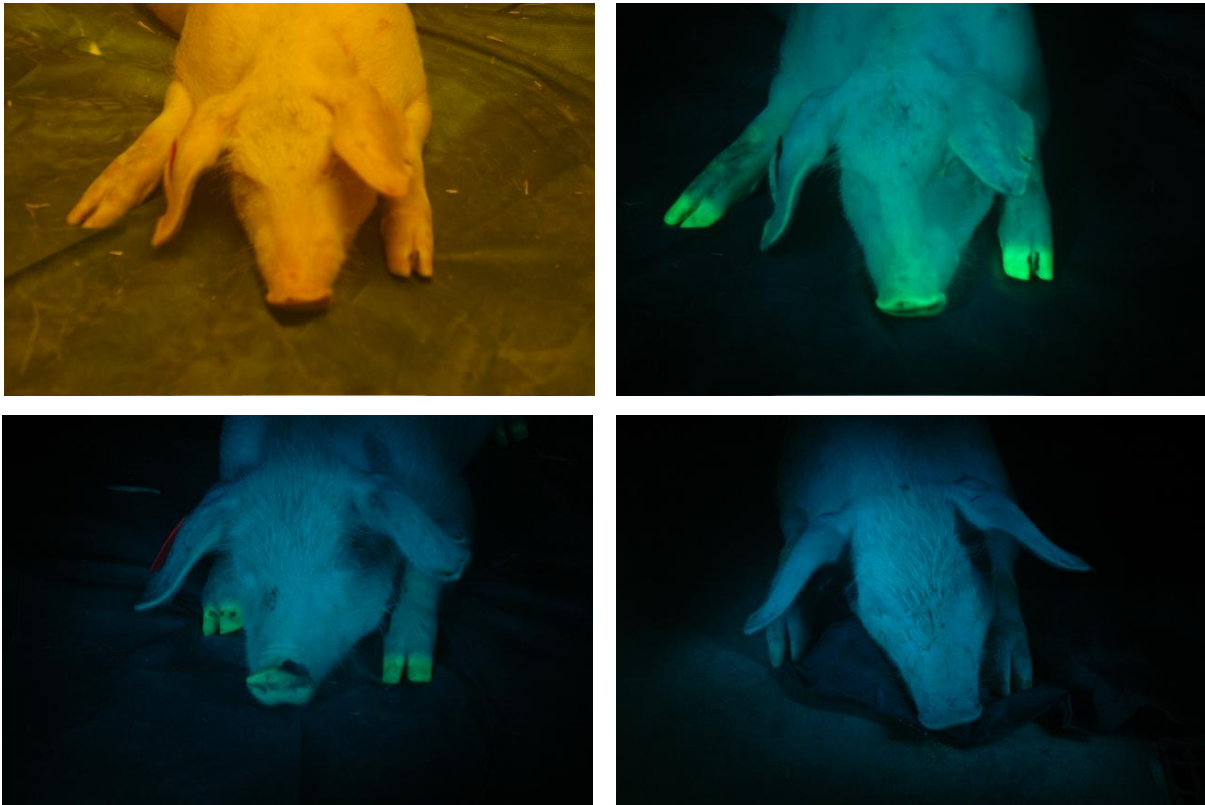


Abbildung 3.2: shRNA-transgene Ferkel unter Bestrahlung mit VIS- und UV-Licht

Oben links: Pol2-shRNA-transg. Ferkel u. VIS-Licht, Oben rechts: Pol2-shRNA-transg.Ferkel u. UV-Licht
Unten links: Leervektor-transgenes Ferkel u. UV-Licht, Unten rechts: nicht-transgenes Ferkel u. UV-Licht

Die zur Weiterkultivierung aus den Ferkeln entnommenen Fibroblasten, konnten ebenfalls zum Transgen-Nachweis herangezogen werden (Abb. 3.3). Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurde sowohl in den Zellen der Pol2-shRNA-transgenen Ferkel, als auch in den Zellen der Kontrolltiere unter UV-Bestrahlung eine Emission im VIS-Bereich beobachtet. Wie zu erwarten, wiesen die Fibroblasten eines nicht-transgenen Schweines keine Fluoreszenzaktivität auf.

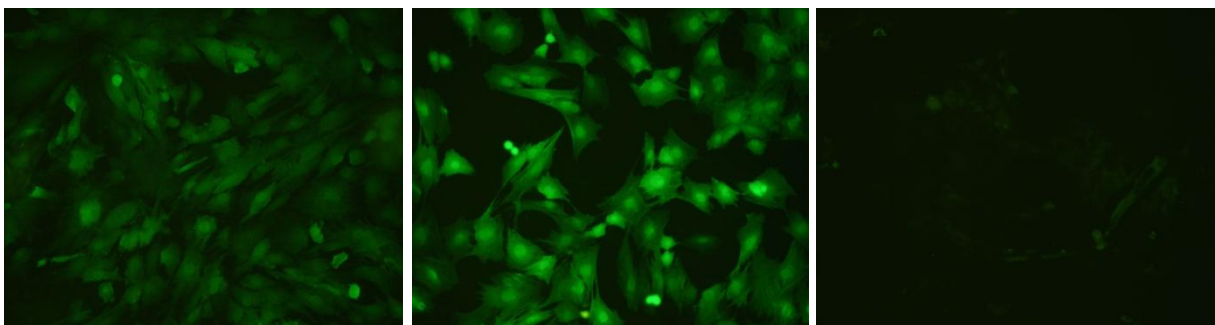


Abbildung 3.3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen primärer porziner Fibroblasten

Rechts: Pol2-shRNA-transgen, Mitte: Leervektor-transgen, Rechts: nicht-transgen

3.1.3 Nachweis der Transgen-Integration mittels PCR

Zur weiteren Analyse der generierten Ferkel, wurde aus den entnommenen Ohrbiopsien DNA isoliert. Mit Hilfe dreier Primersets, die an verschiedenen Bereichen der lentiviralen Vektorsequenz hybridisieren (Abb. 3.4), konnte die Transgen-Integration auch auf Molekularebene mittels PCR und Gelelektrophorese nachgewiesen werden. So konnte gezeigt werden, dass in jedem der getesteten Ferkel das *gfp*-Gen integriert war (Abb. 3.5). Des Weiteren sind unter der Verwendung des 3'LTR-Primerpaars Banden mit der Größe von 677 bp bei den Pol2-shRNA-transgenen Schweinen sowie Amplifikate mit 609 bp bei den Leervektor-transgenen Kontrolltieren zu erkennen (Abb. 3.6). Die Differenz dieser beiden Amplifikatgrößen entspricht dabei genau der Länge der Pol2-shRNA-Expressionskassette, die wiederum mit dem dritten Primerpaar in allen sechs Pol2-shRNA-transgenen Ferkeln nachgewiesen wurde (Abb. 3.7).

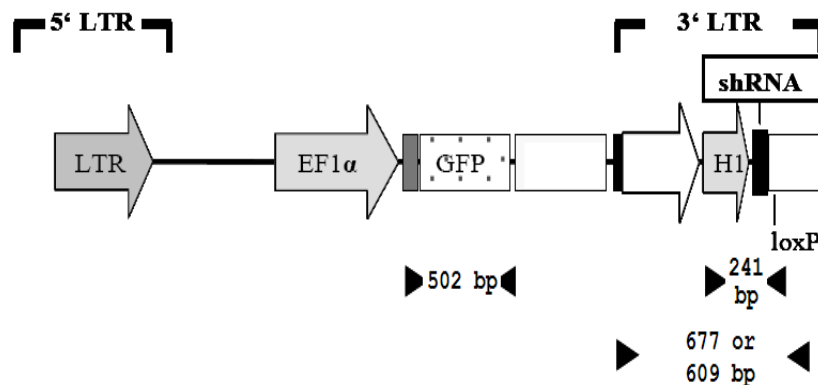


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Position der verwendeten Primersets im Vektor
 Verwendete Primersets: GFP 502 bp, Pol2 241 bp, 3'LTR ohne shRNA 609 bp, 3'LTR mit shRNA 677 bp

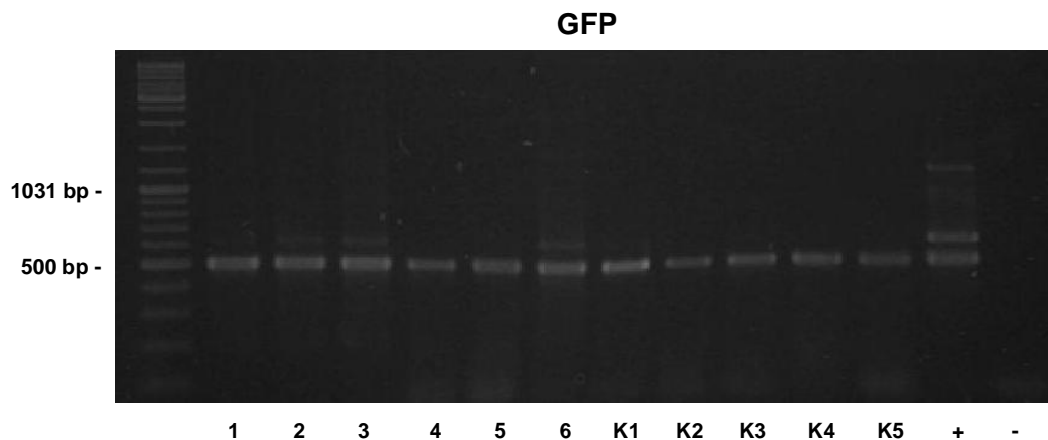


Abbildung 3.5: Transgennachweis im Genom primärer porziner Fibroblasten mittels PCR unter Verwendung der GFP-Primer
 (1-6) Pol2-shRNA-Ferkel, (K1-K5) Leervektor-transgene Kontrollferkel, (+) Kontrolle, (-) Wasserkontrolle

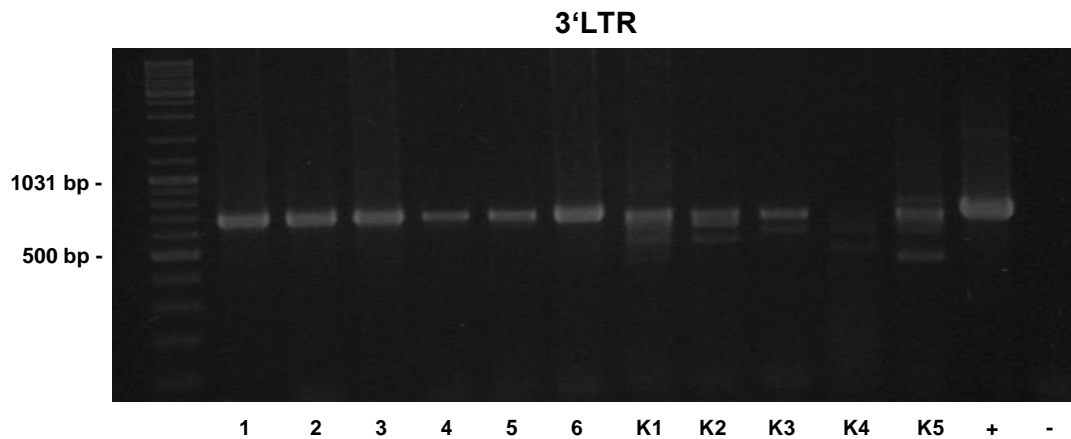


Abbildung 3.6: Transgennachweis im Genom primärer porziner Fibroblasten mittels PCR unter Verwendung der 3'LTR-Primer
(1-6) Pol2-shRNA-Ferkel, (K1-K5) Leervektor-transgene Kontrollferkel,
(+) Kontrolle, (-) Wasserkontrolle

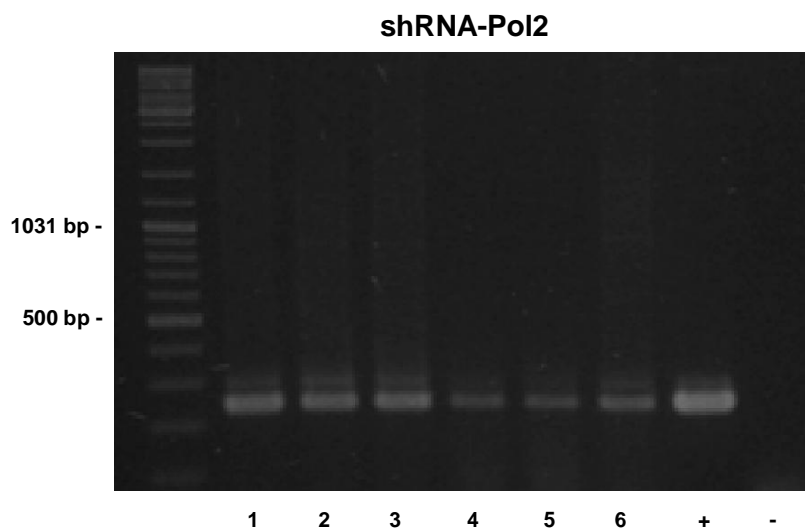


Abbildung 3.7: Transgennachweis im Genom primärer porziner Fibroblasten mittels PCR unter Verwendung der shRNA-Pol2-Primer
(1-6) Pol2-shRNA-Ferkel
(+) Kontrolle, (-) Wasserkontrolle

3.1.4 Etablierung einer *one-step* RT *real-time* PCR zur Quantifizierung der PERV-mRNA

Zur Quantifizierung von PERV-mRNA wurde eine neue *one-step* RT *real-time* PCR, die die cDNA-Synthese und eine anschließende Amplifikation in einem Schritt vereint, basierend auf dem SUPERSRIPT™ III PLATINUM® ONE-STEP QRT-PCR Kit etabliert. Sie soll im

Vergleich mit der bisher eingesetzten Methode eine verbesserte Detektionsempfindlichkeit aufweisen.

Die Primer für die *one-step RT real-time PCR* wurden mit Hilfe der Software PrimerSelect (Lasergene 8) designed und binden, flankierend zur Bindestelle der Pol2-shRNA, im *pol*-Bereich von PERV und ermöglichen somit die Detektion viraler Vollängen-RNA. Die eingesetzte Sonde besitzt ein FAM (6-Carboxy-Fluorescein)-Fluorchrom und einen BlackHole-Quencher und wurde nach folgenden Kriterien entwickelt:

1. Lage: Das 5'-Ende der Sonde sollte sich in relativer Nähe des 3'-Endes des PCR-Primers befinden
2. Länge: 20 Basen bis 30 Basen
3. GC-Gehalt: 40 % bis 60 %
4. T_m : Primer- T_m um ca. 5 °C bis 10 °C unter dem Sonden- T_m
5. Position des Quenchers: Generell am 3'-Ende, jedoch bei Allel-spezifischer TaqMan™ PCR gegebenenfalls auch innerhalb der Sonde
6. Am 5'-Ende der Sonde kein G
7. Nie mehr als 3 x die selbe Base hintereinander (insbesondere keine Poly-Gs)
8. Falls bei einer gegebenen Sondensequenz auch der komplementäre Strang verwendet werden kann, sollte der C-haltigere Strang ausgewählt werden
9. Keine Komplementarität zwischen Sonde und PCR-Primern
10. Möglichst keine auffälligen Sekundärstrukturen im Zielbereich, sowie bei Primern und der Sonde

Die Normalisierung der PERV-Expression erfolgte mit Hilfe der relativen Quantifizierung in Bezug auf die Expression eines *house keeping gene*. Die Primer und Sonden des sog. Referenz- und Zielgens mussten dabei optimal aufeinander abgestimmt werden und sollten nicht miteinander interagieren, um zusammen als „duplex“ in einem Reaktionsgefäß eine exakte Replikation beider Amplifikate zu ermöglichen. Nach einigen Tests (nicht gezeigt), die unter anderem der Ermittlung der optimalen Anlagerungstemperatur sowie der Magnesiumsulfat-Konzentration dienten, wurden Primer und Sonde für das porcine Gen ausgewählt, welches das Protein Cyclophilin [118] codiert. Diese zeigten zusammen mit den *pol*-Primern bei gleichen Reaktionsbedingungen die besten Ergebnisse und wiesen eine ähnliche Amplifikatlänge auf. Neben ähnlichen Expressionsraten beider Gene, sind auch die Effizienzen beider Primerpaare für die *one-step RT real-time PCR* von enormer Bedeutung, um eine fehlerfreie Normalisierung zu garantieren. Für genaue und reproduzierbare Resultate sollten diese beide bei annähernd bei 100 % liegen.

3 Ergebnisse

Zur Bestimmung der Effizienz musste die Zyklenzahl (C_T -Wert) des jeweiligen Gens bei unterschiedlichen mRNA-Verdünnungsstufen (1:2) mittels einer duplex *one-step* RT *real-time* PCR bestimmt werden. Daraufhin wurde die eingesetzte Menge an mRNA in einer logarithmischen Funktion gegen die Zyklenzahl dargestellt. Aus der Steigung der aufgetragenen Standardkurve konnte über die Formel $E = 10^{-1/\text{Steigung}}$ die Effizienz der Primer mit Hilfe der MX Pro

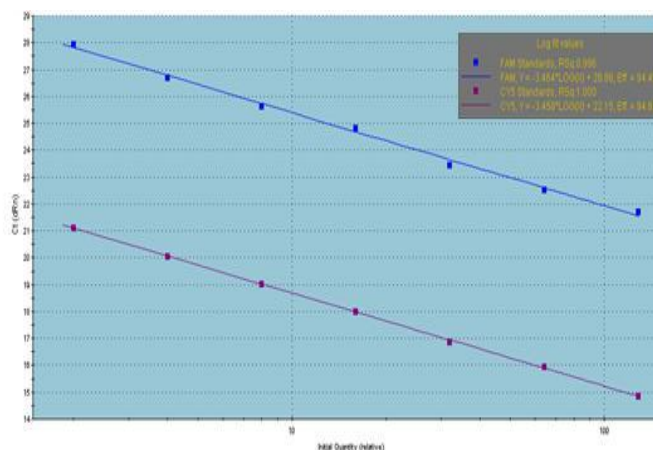


Abbildung 3.8: Bestimmung der Effizienz in einer *one-step* RT *real-time* PCR

Logarithmische Auftragung der relativen Templatemenge gegen C_T -Werte,

Oben: Standardgerade *pol*-Zielgen, Unten: Standardgerade *cyclophilin*-Referenzgen

RSq: Bestimmtheitsmaß, [MxPro (Stratagene)]

Software (Stratagene) bestimmt werden (Abb. 3.8) Beide Primerpaare waren hinsichtlich der somit ermittelten Werte von 94,4 % und 94,6 % optimal für eine duplex *one-step* RT *real-time* PCR geeignet. Durch mehrfache Tests wurde die Komponentenzusammenstellung optimiert und ein passendes Temperaturprogramm erstellt (Tab. 2.6).

Tabelle 3.1: Komponenten und Temperaturprogramm der duplex *one-step* RT *real-time* PCR

Komponente	Volumen [μ l]	Endkonzentration
Gesamt-RNA (10 ng/ μ l)	5	2 ng/ μ l
2x Reaktions-Mix (0,4 mM je dNTP, 6 mM MgSO ₄), Invitrogen	12,5	0,2 mM je dNTP
MgSO ₄ (50 mM), Invitrogen	1	Σ 5 mM
<i>sense</i> Primer <i>pol c</i> / Cyclophilin (10 mM)	jeweils 1	jeweils 0,4 mM
<i>antisense</i> Primer <i>pol c</i> / Cyclophilin (10 mM)	jeweils 1	jeweils 0,4 mM
Sonde <i>pol c</i> / Cyclophilin (10 mM)	jeweils 0,5	jeweils 0,2 mM
ROX (25 μ M), Invitrogen	0,1	0,1 μ M
SUPERSCRIPT III RT/PLATINUM TAQ Mix, Invitrogen	0,5	
H ₂ O, Nuklease-frei	ad 25	

cDNA-Synthese	Denaturierung		Primer-Anlagerung / Elongation
50 °C/15 min	95 °C/2 min	95 °C/15 s	58 °C/30 s
----- 40 Zyklen -----			

3.1.5 Qualitativer Nachweis von PERV in primären Fibroblasten transgener Schweine

Um die Provirusintegration von porzinen endogenen Retroviren im Genom der transgenen Schweine nachzuweisen, wurde aus den entnommenen Fibroblasten DNA isoliert und einem PCR-Programm unterworfen. Dabei kamen spezifische Primerpaare zum Einsatz, die die einzelnen PERV-Subtypen A, B und C durch Detektion im *env*-Gen lokalisieren konnten (Abb. 3.9). Die Analyse und Auswertung erfolgte mit Hilfe der Gelelektrophorese. Als Kontrolle diente DNA aus PK15 und PERV-A/C-infizierten 293 Zellen.

So konnte in allen getesteten Fibroblasten porzine endogene Retroviren des Typs A, B und C nachgewiesen werden, während in PK15- PERV-A und –B und in den PERV-A/C infizierten 293-Zellen nur –A detektiert wurde.

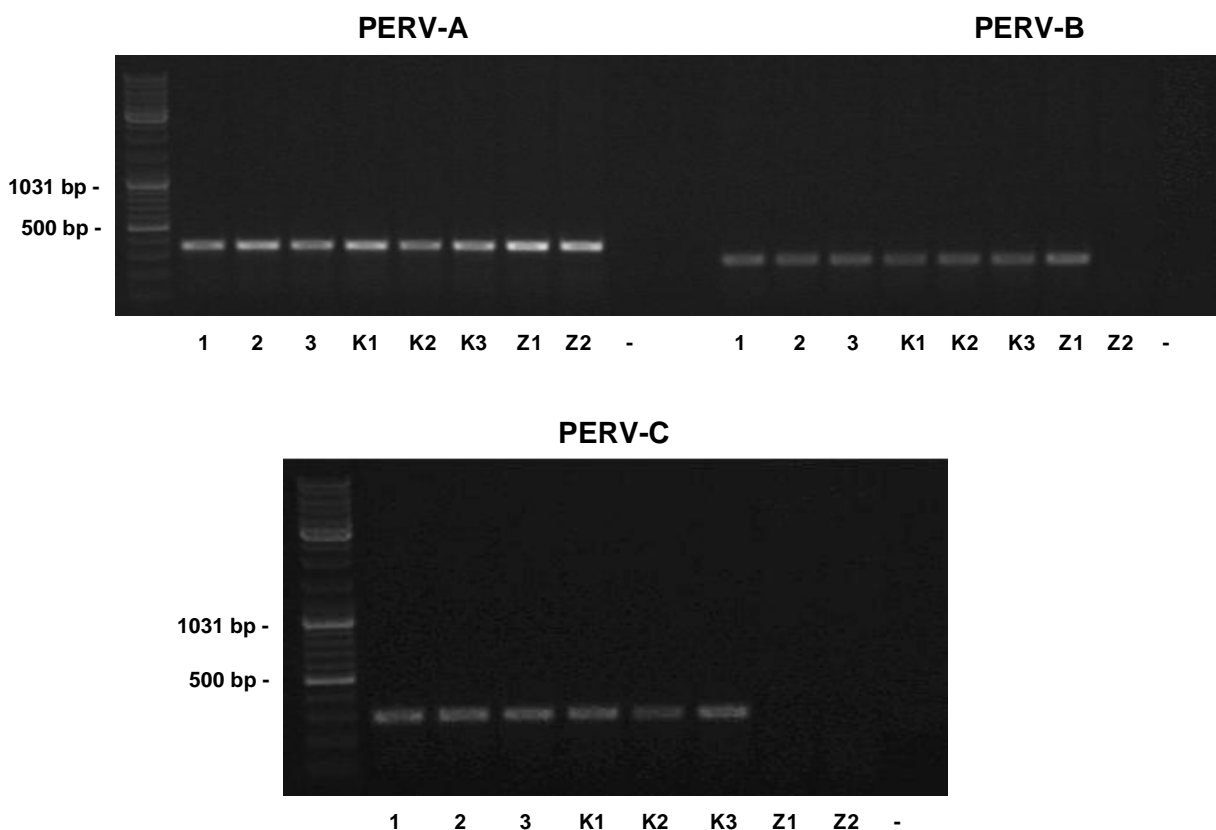


Abbildung 3.9: Qualitativer Nachweis der PERV Provirus-Integration in primären porzinen Fibroblasten, PK15- und PERV-A/C-inf. 293-Zellen
 (1-3) Pol2-shRNA-Ferkel, (K1-K3) Leervektor-transgene Kontrollferkel, (Z1) PK15-Zellen, (Z2) PERV-A/C-infizierte 293-Zellen, (-) Wasserkontrolle

Zur qualitativen Analyse der PERV-Expression in porzinen primären Fibroblasten der transgenen Schweine, wurden Primer entwickelt, die in verschiedenen Bereichen der cDNA binden, die durch Reverse Transkription der viralen mRNA entsteht. Drei der Primerpaare

binden dabei im *env*-Segment und können die PERV-Subtypen A, B und C unterscheiden. Mit zwei weiteren Primerpaaren war man in der Lage, Vollängen-mRNA und gespleißte *env*-mRNA zu differenzieren. Dabei hybridisieren diese zum einen im *pol*-Gen und zum anderen flankierend zu der Spleißdonor- (SD) bzw. Spleißakzeptorstelle (SA) (Abb. 1.2).

Zum Nachweis der porzinen endogenen Retroviren, wurde aus den primären Fibroblasten sowie aus PK15- und PERV-A/C-infizierten 293 Zellen Gesamt-RNA isoliert. Die Umschreibung zu cDNA und die Amplifikation erfolgte mit einer *one-step* RT-PCR. Die Detektion und Analyse wurde mit Hilfe der Gelelektrophorese durchgeführt.

In allen getesteten Fibroblasten sowie den PK15-Zellen konnte die Expression von PERV-A und -B nachgewiesen werden, wogegen bei 293-Zellen nur eine Bande bei PERV-A beobachtet wurde. In allen Zellen konnte zudem sowohl Vollängen mRNA, als auch gespleißte *env*-mRNA detektiert werden. Die Expression von PERV-C konnte hingegen in keiner der untersuchten der Zellen gezeigt werden (Abb. 3.10).

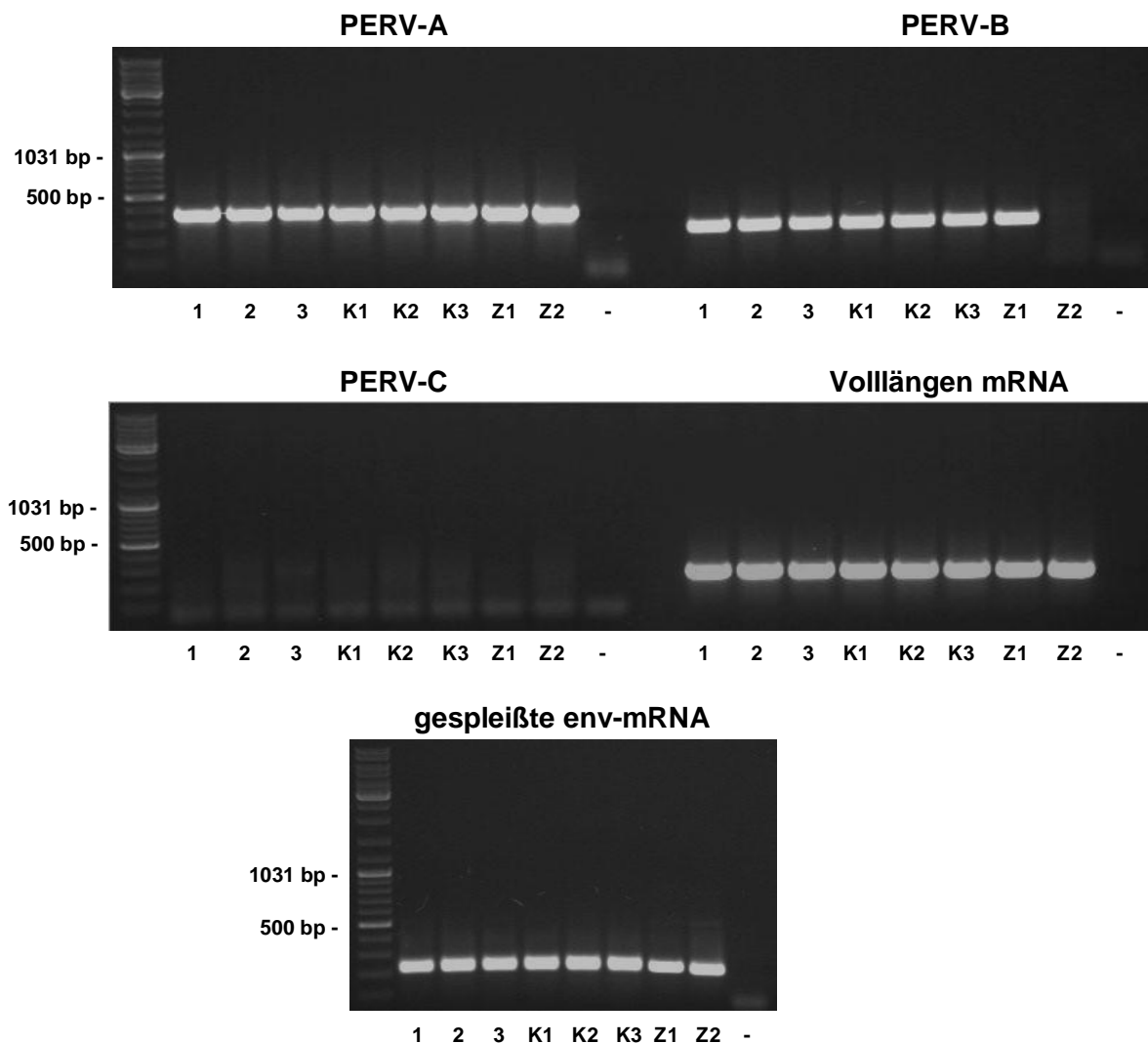


Abbildung 3.10: Qualitativer Nachweis der PERV-Expression in primären porzinen Fibroblasten, PK15- und PERV-A/C-inf. 293-Zellen

(1-3) Pol2-shRNA-Ferkel, (K1-K3) Leervektor-transgene Kontrollferkel, (Z1) PK15-Zellen, (Z2) PERV-A/C-infizierte 293-Zellen, (-) Wasserkontrolle

3.1.6 Quantitativer Nachweis der PERV-Expression in primären Fibroblasten transgener Schweine

Zum quantitativen Nachweis der PERV-Expression wurde aus den Fibroblasten der Pol2-shRNA-transgenen Schweine sowie der Leervektor-transgenen Kontrolltiere Gesamt-mRNA isoliert. Alle Zellen befanden sich zum Zeitpunkt der Isolation in der 38. Passage. Mit Hilfe der *one-step RT real-time PCR* wurden pro Ansatz 50 ng RNA in cDNA revers transkribiert und die PERV-Gensequenzen mittels spezifisch bindender Sonden detektiert (Tab. 3.1). Dabei kamen zwei verschiedene Primerpaare zum Einsatz. Ein Primerset bindet im *gag*-Bereich von PERV, während das andere in der Sequenz des *pol*-Gens (3.1.4) flankierend zur Pol2-shRNA-Schnittstelle hybridisiert. So sollte gezeigt werden, ob die Wahl der Primerbindungsstelle einen Einfluss auf die Detektion der Expression von PERV hat. Für jede Probe wurde gleichzeitig die Expressionsrate von Cyclophilin bestimmt und die erhaltenen PERV-Werte darauf normalisiert. Zudem wurden alle Proben als Triplikate gemessen und später gemittelt. Als passiver Referenzfarbstoff diente ROX. Die Auswertung wurde unter Zuhilfenahme der Software MXPro (Stratagen) und Excel 2003 (Microsoft) nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode [122] durchgeführt.

Um die Hemmung der Expression von porzinen endogenen Retroviren in Fibroblasten Pol2-shRNA-transgener Schweine zu bestimmen, wurde die in der *one-step RT real-time PCR* ermittelte höchste Expressionsrate des Kontrolltier 1 auf 100 % gesetzt. Die Messung unter Verwendung des *gag*-spezifischen Primerpaars zeigte eine Pol2-shRNA-induzierte Reduktion der Expression der viralen mRNA um bis zu 70 % (Abb. 3.11 oben). Dabei ließen sich Schwankungen in der Expression sowohl bei den einzelnen Pol2-shRNA-transgenen Schweinen, als auch bei den Leervektor-transgenen Kontrolltieren beobachten.

Die zweite Messung erfolgte mit Hilfe der neu etablierten *one-step RT real-time PCR* unter Verwendung des *pol*-spezifischen Primerpaars (3.1.4). Alle Werte wurden auf die Kontrolltier 3-Expressiionsrate von 100 % bezogen. So konnte eine durch die Pol2-shRNA hervorgerufene Inhibition der PERV-Vollängen-mRNA um bis zu 93 % beobachtet werden (Abb. 3.11 unten). Auch hier wiesen die Fibroblasten der Kontrolltiere sowie der Pol2-shRNA-transgenen deutliche Schwankungen hinsichtlich ihrer PERV-Expressionsrate auf.

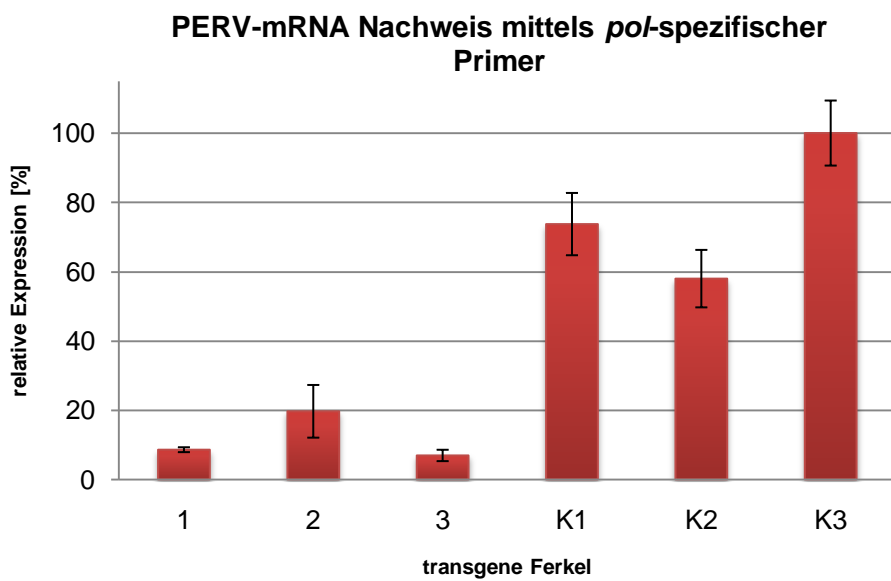
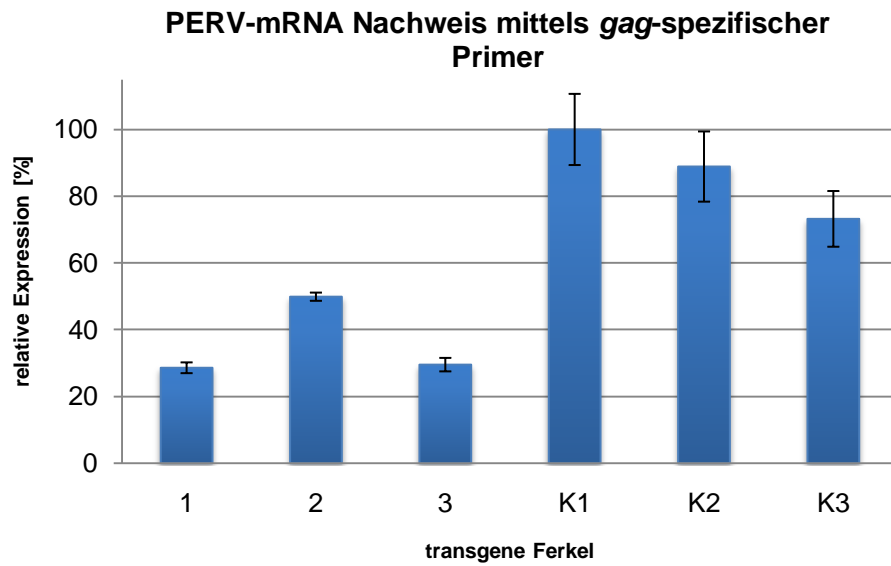


Abbildung 3.11: Quantitativer PERV-Expressionsnachweis in Fibroblasten transgener Schweine
 (1-3) Pol2-shRNA-Ferkel, (K1-K3) Leervektor-transgene Kontrollferkel

3.2 Hemmung der PERV-Expression in PK15- und PERV-A/C infizierten 293-Zellen mittels neu synthetisierter shRNAs

3.2.1 Selektion eines PERV-A/C infizierten 293-Klons zur Generierung einer Zelllinie mit gleicher Provirusintegration

293-Zellen weisen nach einer Infektion mit PERV-A/C eine unterschiedlich starke Virusexpressionsrate auf. Dies liegt an der ungleichen Anzahl von Provirusintegrationen im zellulären Genom und der damit einhergehenden unterschiedlich stark ausgeprägten Partikelproduktion. So ist es möglich, dass eine Zelle durch retrovirale Partikel nur einfach, oder was wahrscheinlicher ist, mehrfach infiziert wird. Unterschiedliche Expressionsraten der PERVs in 293-Zellen führen jedoch später zu keinen reproduzierbaren Ergebnissen hinsichtlich der Replikationshemmung durch shRNAs.

Um eine gleichmäßig stabile PERV-A/C produzierende 293-Zelllinie zu erhalten, mussten Einzelklone isoliert und herangezogen werden. Dazu wurden die Zellen in einer 96-Well-Zellkulturplatte ausverdünnt, um eine Isolierung eines einzelnen Zellklons zu erreichen. Dieser wurde anschließend in eine neue Kulturschale überführt und vermehrt. Alle Tochterzellen dieses Einzelklons wiesen danach die gleiche Provirusintegration auf.

Um zu garantieren, dass die neu generierte Zelllinie in der Lage war, intakte replikationsfähige Viruspartikeln zu produzieren, erfolgte ein Nachweis mit Hilfe eines Infektionsversuchs. Dazu wurde der Überstand der Zellklone auf nichtinfizierte 293-Zellen gegeben, aus denen daraufhin DNA isoliert wurde. Anschließend konnte das PERV-Provirus durch Detektion viraler DNA im Genom der neu infizierten Zellen mittels PCR und Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

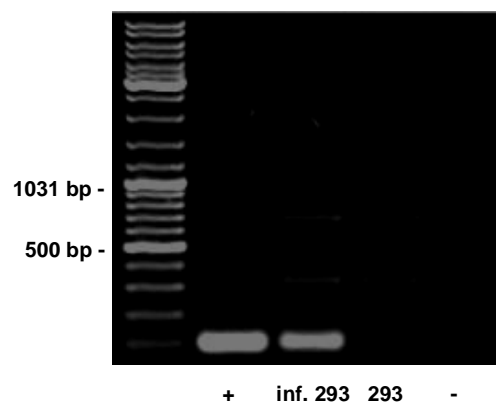


Abbildung 3.12: Provirusnachweis in *de novo* PERV-A/C-infizierter 293-Zellen
(inf. 293) *de novo* PERV-A/C-inf. 293
Zellen, (293) 293-Zellen,
(+) Kontrolle, (-) Wasserkontrolle

3.2.2 Generierung und Klonierung neuer Expressionskassetten für PERV-spezifische-shRNAs

Pol2-shRNA-transgene Schweine weisen eine deutlich verminderte PERV-Replikation auf, wie Untersuchungen an entnommenen primären Fibroblasten zeigten (3.1.6). Um die Effizienz der Hemmung weiter zu verbessern, wurden neue Expressionskassetten generiert, die PERV-spezifische shRNAs codieren. Mit Hilfe eines neuen Algorithmus der Firma Clontech wurden Sequenzen gefunden, die eine hohe Effektivität versprachen. Drei der shRNAs hybridisieren im *pol*-Sequenzabschnitt von PERV, während vier im *env*-Bereich binden, wovon jeweils zwei zwischen PERV-A und -B differenzieren. Zwei weitere, in der *gag*-Sequenz hybridisierende shRNAs, wurden von der kooperierenden Arbeitsgruppe von Dr. Linda Scobie in Glasgow zur Verfügung gestellt. Alle im *pol*- und *gag*-Bereich bindenden shRNAs wurden zudem mit der bisher verwendeten Pol2-shRNA zu sogenannten Tandems kombiniert, um einen additiven Effekt hinsichtlich der PERV-Replikation zu erreichen.

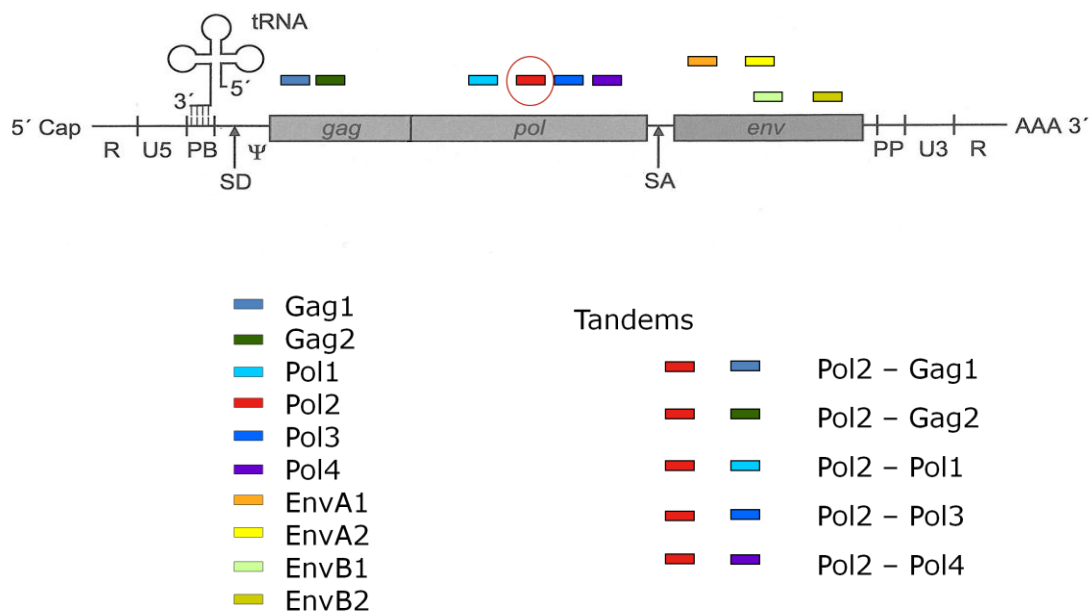


Abbildung 3.13: Bindungsstellen der generierten shRNAs auf der mRNA von PERV

Zwei shRNAs (Gag1, Gag2) binden im *gag*-, vier (Pol1, Pol2, Pol3, Pol4) im *pol*-Bereich der PERV-mRNA. Weitere vier shRNAs (EnvA1, EnvA2, EnvB1, EnvB2) hybridisieren an der *env*-Sequenz von PERV-A bzw. -B. Alle Gag- und Pol-shRNAs wurden mit der Pol2-shRNA zu Tandems kombiniert.

Um Zielzellen mit den neu generierten shRNAs stabil und effizient zu transfizieren, wurde das retrovirale „*Knockout™ RNAi-Ready pSIREN-RetroQ Vector*“ Expressionssystem der Firma Clontech verwendet. Dieses beinhaltet einen selbst inaktivierenden pSiren-Vektor, der neben der Expressionskassette der shRNA, ein Verpackungssignal sowie Transkriptions- und Prozessierungselemente trägt, die für die Virusreplikation notwendig sind (Abb. 2.2). Alle retroviral codierenden Gene *pol*, *gag* und *env* sind im Genom der Verpackungszelllinie PT67 integriert und werden erst nach der Transfektion mit dem pSiren-Vektor aktiviert und transkribiert. Dabei handelt es sich um eine von den Maus-Fibroblasten NIH 3T3 abgeleitete Zelllinie. Mit Hilfe der somit produzierten retroviralen Partikel, die die entsprechende Expressionskassette der shRNAs mit sich führen, können die ausgewählten Zielzellen transduziert werden. Eine weitere Besonderheit stellt die Selbstinaktivierung des retroviralen Systems dar, die durch eine Deletion in der U3-Region der 3'LTR ausgelöst wird. Diese kopiert und ersetzt die 5'LTR während der reversen Transkription der viralen RNA in den infizierten Zellen, so dass der 5'LTR-Promotor (CMV) inaktiviert wird. Das im Genom integrierte Provirus ist damit nicht mehr in der Lage, neue infektiöse retrovirale Partikel zu produzieren.

Dazu entwickelte Danny Jobst eine Klonierungsstrategie, die es erlaubte, alle Expressionseinzel- und -doppelkassetten zusammen mit einem vorgeschalteten H1-Promotor über nur eine Schnittstelle in den pSiren-Vektor zu integrieren (Abb. 3.14). Durch Einsatz dieses Promotors des zuvor mit der Pol2-shRNA verwendeten Expressionssystems, ließen sich so leichter Vergleiche zu früheren Ergebnissen im Hinblick auf die PERV-Replikation ziehen [112, 113]. Der in dem pSiren-Vektor lokalisierte humane U6-Promotor wurde somit durch den mitgeführten H1-Promotor ersetzt.

Zu Beginn wurde in den pSuper-Ausgangsvektor durch PCR-Mutagenese eine MfeI-Schnittstelle eingefügt. Der Vektor besitzt einen Ampicillin-Resistenz-Bereich, mit dessen Hilfe man erfolgreich transformierte *E. coli* Bakterien von nicht-transformierten selektieren konnte. Über eine BglII- und eine HindIII-Schnittstelle erfolgte jeweils die Ligation der Einzel- oder Tandem-shRNA-Expressionskassetten. Anschließend wurde der Vektor mit Hilfe der Restriktionsenzyme EcoRI und MfeI verdaut, so dass man die jeweilige shRNA-Kassette mit vorgeschaltetem H1-Promotor und EcoRI- bzw. MfeI-Überhängen erhielt. Das so entstandene Fragment konnte man nun für die weitere Klonierung in das pSiren-Vektor-System verwenden.

So wurde das Oligonukleotid über eine EcoRI-Schnittstelle in den pSiren-Vektor ligiert. Das fertige Produkt enthielt ebenso wie der pSuper-Vektor einen Ampicillin-Resistenzbereich und des Weiteren eine Puromycin-Resistenz-Kassette, die man später nutzen konnte, um erfolgreich transfizierte Verpackungszellen und transduzierte Zielzellen zu selektieren.

3 Ergebnisse

Mit Hilfe dieses Vektors und einer Verpackungszelllinie war es somit möglich, retrovirale Partikel zu produzieren, die die jeweilige Expressionskassette der shRNAs enthielten und in der Lage waren, Zielzellen stabil zu transduzieren.

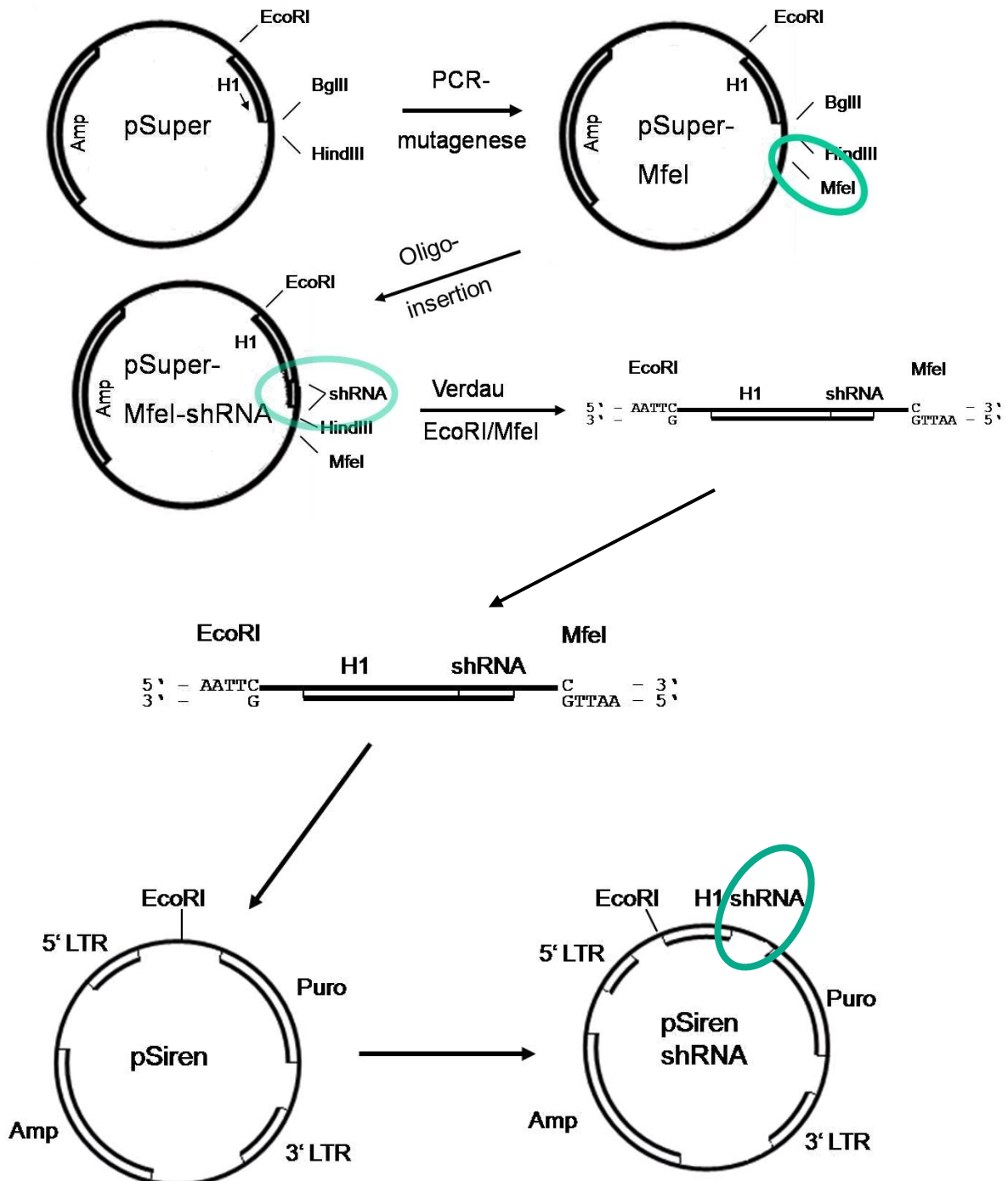

















Abbildung 3.14: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie

Einfügung einer HindII-Schnittstelle in den pSuper-Vektor durch PCR-Mutagenese mit anschließender Ligation der Expressionskassetten in die Schnittstellen BglII- und HindIII. Der weitere Verdau erfolgte mit EcoRI und MfeI. Das erhaltene Oligonukleotid enthält die jeweilige Expressionskassette mit vorgeschaltetem H1-Promotor. Über eine EcoRI-Schnittstelle erfolgte zuletzt die Ligation des Oligonukleotids in den pSiren-Vektor.
 Amp: Ampicillin-Resistenz-Sequenz, H1: H1-Promotor, Puro: Puromycin-Resistenz-Sequenz

3.2.3 Stabile Transfektion von PK15- und PERV-A/C-infizierten 293-Zellen mit shRNA-Expressionskassetten

Nach erfolgreicher Klonierung der generierten Expressionskassetten in den retroviralen pSiren-Vektor, wurde dieser mit Hilfe des Transfektionsreagenz LIPOFECTAMINE 2000, Fermentas nach Angaben des Herstellers in die Verpackungszelllinie PT67 transfiziert. Als Kontrolle diente der Leervektor sowie eine shRNA, die an die mRNA des Luziferase-Gens spezifisch binden kann. Da die Existenz dieses Gens im Schwein ausgeschlossen ist, fungierte die shRNA als eine Art randomisierte Kontroll-shRNA, um eine unspezifische Hemmung der PERV-Expression durch den Vektor oder einer shRNA auszuschließen.

Tabelle 3.2: Auflistung der transfizierten shRNA-Expressionskassetten

Nr.	shRNA	Bindungsstelle
1	Leervektor	-
2	Luziferase	-
3	 Pol2	<i>pol</i>
4	 Pol1	<i>pol</i>
5	 Pol3	<i>pol</i>
6	 Pol4	<i>pol</i>
7	 Gag1	<i>gag</i>
8	 Gag2	<i>gag</i>
9	 Pol1Pol2	<i>pol/pol</i>
10	 Pol3Pol2	<i>pol/pol</i>
11	 Pol4Pol2	<i>pol/pol</i>
12	 Gag1Pol2	<i>gag/pol</i>
13	 Gag2Pol2	<i>gag/pol</i>
14	 EnvA1	<i>env</i> PERV-A
15	 EnvA2	<i>env</i> PERV-A, PERV-A/C
16	 EnvB1	<i>env</i> PERV-B
17	 EnvB2	<i>env</i> PERV-B

Bevor die PT67-Verpackungszelllinie mit dem eukaryotischen Antibiotikum Puromycin unter Selektionsdruck gesetzt werden konnte, musste diese jedoch zuvor auf dessen Verträglichkeit hinsichtlich der Konzentration getestet werden. Dazu wurden die PT67- sowie die PK15- und die PERV-A/C infizierten 293-Zellen jeweils in drei 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und unterschiedlichen Puromycin-Konzentrationen (0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 7,5 µg/ml) ausgesetzt. Dabei galt diejenige geringstmögliche Konzentration als optimal, bei der alle Zellen nach einer Woche abgestorben waren. Daraus ergab sich eine optimale Selektionskonzentration des Puromycins von 5 µg/ml für die PT67- und 0,5 µg/ml für die PK15- und PERV-A/C-infizierten 293-Zellen.

Die Transduktion der Zielzellen mittels der produzierten retroviralen Partikel erfolgte nach der „*Retroviral Gene Transfer and Expression*“-Anleitung von Clontech. Bei beiden Zielzelllinien wurde jedoch nach der Inkubation mit Zellüberstand von PT67 keine Infektion durch Virionen beobachtet, da nach der Behandlung mit Puromycin keine lebenden Zellen selektiert werden konnten. Auch die Änderung verschiedener Parameter, wie Polybren-Konzentration, Inkubationsdauer mit Zellüberstand, Menge an Zellüberstand sowie Konfluenz der Zielzellen bei der Infektion, führten zu keinen neuen Ergebnissen. Der retrovirale pSiren-Vektor wies in seiner Nukleotidabfolge bei einem Vergleich mit der Vektorkarte des Herstellers Clontech nach der Sequenzierung keinerlei Fehler auf, die auf eine Mutation oder Deletion bei der Klonierung hindeuteten.

Um die neu generierten shRNAs dennoch zu testen, wurde eine direkte Transfektion der Zielzellen mit den in die pSiren-Vektoren klonierten Einzel- bzw. Tandem-Expressionskassetten durchgeführt. Dazu wurde, genau wie bei den PT67-Zellen, das Transfektionsreagenz LIPOFECTAMINE 2000, Fermentas, verwendet. Nach der Inkubation mit Puromycin in der zuvor ermittelten optimalen Konzentration, konnten die durch das Resistenzgen überlebenden Zellen selektiert und weiterkultiviert werden. Zudem wurden nicht-transfizierte Zellen unter den gleichen Bedingungen mitgeführt, um später einen direkten Vergleich zu ermöglichen. So konnten die PK15-Zellen mit allen oben aufgeführten Einzel- und Tandemkassetten (Tab. 3.2) erfolgreich transfiziert werden. Bei den PERV-A/C-infizierten 293-Zellen verzichtete man auf die Expressionskassetten EnvA1, EnvB1 und EnvB2, da die transkribierten shRNAs keine Bindungsstelle zur PERV-A/C-Sequenz aufwiesen. Alle anderen Vektoren konnten ebenfalls stabil transfiziert werden.

3.2.4 Nachweis der shRNA-Expressionskassetten in PK15- und PERV-A/C-infizierten 293-Zellen

Um die shRNA-Expressionskassetten in den zuvor transfizierten Zielzellen auf Molekularebene nachzuweisen, wurden neue Primer generiert, die in dem Vektor flankierend zur codierenden Sequenz der shRNAs binden. Daraufhin wurde von allen Zelllinien DNA isoliert, die mittels PCR und Gelelektrophorese auf den integrierten Vektor hin untersucht wurde.

So wurden in den transfizierten PK15- und den PERV-A/C-infizierten 293 Zellen der pSiren-Leervektor sowie die in den Vektor ligierten Einzelkassetten eindeutig nachgewiesen (Abb. 3.15). Bei den Doppelkassetten werden zum Teil Doppelbanden sichtbar, wovon eine auf der Höhe der Einzelkassette lief und die andere, das vollständige Tandem darstellt. Bei anderen

3 Ergebnisse

Zellen konnte jedoch nur eine Expressionskassette der eigentlichen Doppelkassette nachgewiesen werden. Die PK15-Zellen 9 und 11 zeigten hingegen keine bzw. nur unspezifische Banden.

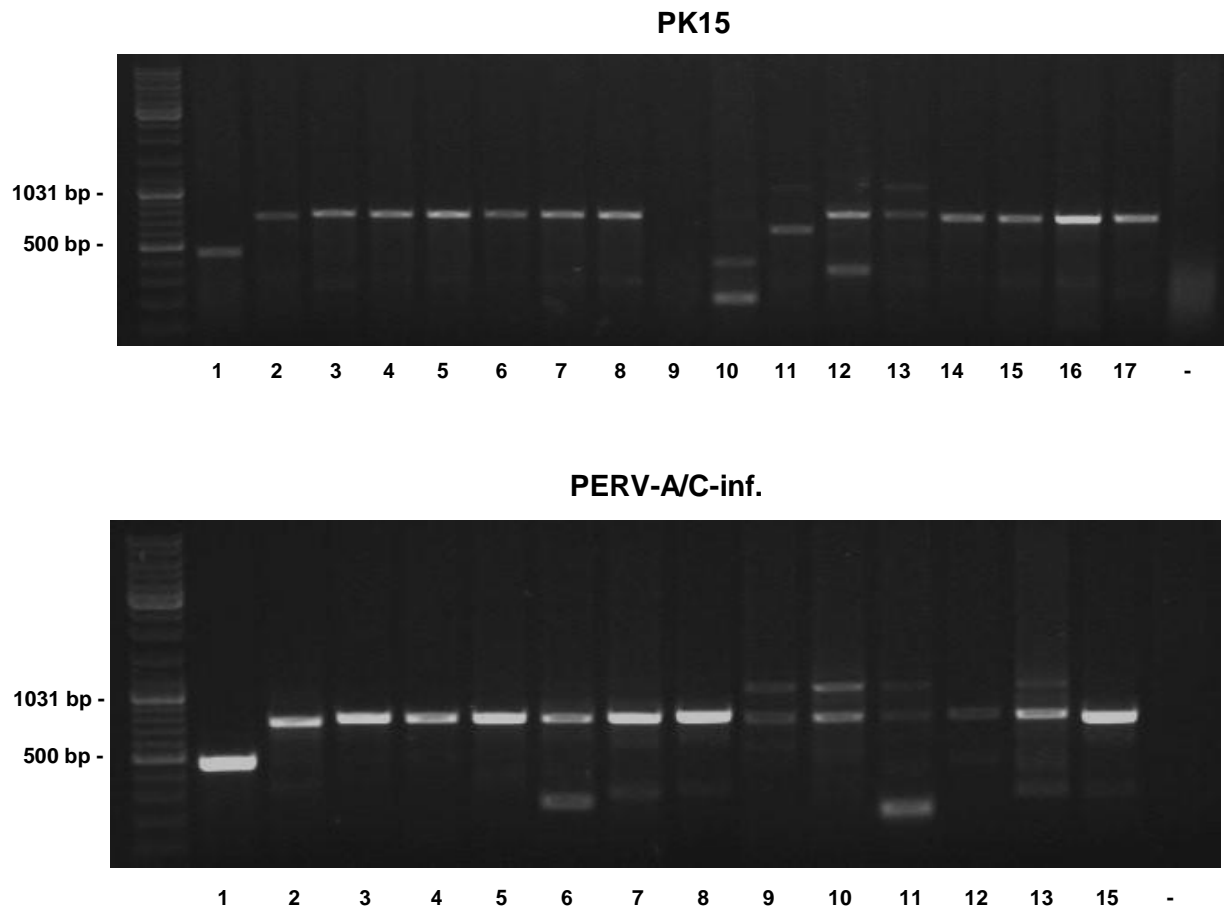


Abbildung 3.15: Nachweis der shRNA-Expressionskassetten in PK15- und PERV-A/C-infizierten 293-Zellen (1-17) siehe Tab.3.2, EnvA1 wurde nicht in PERV-A/C-inf. 293-Zellen transfiziert, (-) Wasserkontrolle

3.2.5 Quantitativer Nachweis der PERV-Expression in shRNA-transgenen Zellen auf Molekularebene

Um die Replikationshemmung von porzinen endogenen Retroviren zu bewerten und zu analysieren, ist es wichtig zu wissen, inwieweit sich die PERV-Expression einzelner Zelllinien unterscheidet. Dazu wurde Gesamt-RNA aus den hier untersuchten Fibroblasten, PK15-, und PERV-A/C-infizierten 293-Zellen isoliert und die retrovirale mRNA wurde mittels der neu etablierten *one-step RT real-time PCR* (3.1.4) quantitativ bestimmt. So zeigten Fibroblasten

eine 99,99 % geringere PERV-Expression als die PERV-A/C-infizierten 293-Zellen, während die PK15-Zellen bei knapp 41 % lagen (Abb. 3.16).

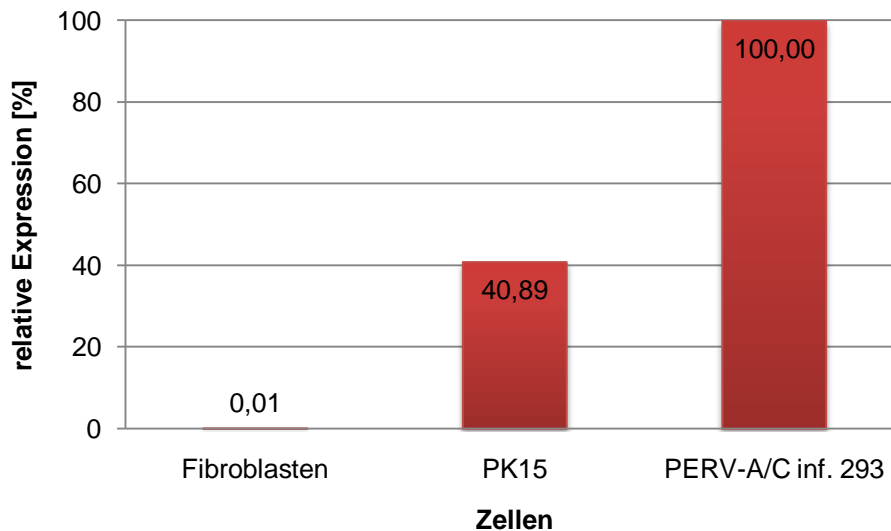


Abbildung 3.16: Relative PERV-Expression einzelner Zelllinien

Mittels *one-step RT real-time PCR* wurde die virale mRNA in Fibroblasten, PK15- und PERV-A/C-infizierten 293-Zellen quantitativ bestimmt.

Um die Effizienz der neu generierten shRNAs in den erfolgreich transfizierten Zielzellen zu testen, wurde aus allen Zellen Gesamt-RNA isoliert und einer *one-step RT real-time PCR* unterworfen. Dabei kamen sowohl die bisher verwendeten *gag*-spezifischen Primer und Sonden zum Einsatz, als auch die neu generierten *pol*-spezifischen, um einen direkten Vergleich zu den in 3.1.6 ermittelten Ergebnissen ziehen zu können. Alle Werte wurden als Triplikate gemessen und mit Hilfe der Software MxPro (Stratagene) und Excel 2003 (Microsoft) nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode [122] berechnet und grafisch dargestellt. Die C_T -Werte des Zielgens wurden auf die Expression des jeweiligen Referenzgens normalisiert. Bei den PK15-Zellen handelte es sich, wie bei den porzinen Fibroblasten, um Cyclophilin, während bei den 293-Zellen humanes GAPDH gemessen wurde. ROX diente bei allen Messungen als Referenz. Alle Expressionswerte der einzelnen Zelllinien wurden relativ auf den Wert der nicht-transfizierten Zellen bezogen.

Als die relative Expression der porzinen endogenen Retroviren in verschiedenen shRNA-transgenen PK15 Zellen untersucht wurde, konnte bei shRNA Pol1 in beiden Messungen die stärkste Hemmung von fast 84 % bzw. 89 % ermittelt werden (Abb 3.17). Die in den transgenen Schweinen eingesetzte shRNA Pol2 wies dagegen nur eine Hemmung von 45 % bzw. 47 % auf. Des Weiteren wurde bei der Einzelkassette Gag1 und den beiden Tandems Pol1Pol2 und Pol3Pol2, eine Expressionshemmung von ca. 70 % detektiert. Alle anderen

3 Ergebnisse

Werte schwankten im oberen Bereich ziemlich stark und ließen keine Aussage hinsichtlich der Effizienz der Hemmung zu. Die Verwendung der zwei verschiedenen Primerpaare führte bei den meisten shRNAs nur zu geringen Unterschieden in den Expressionsraten von PERV.

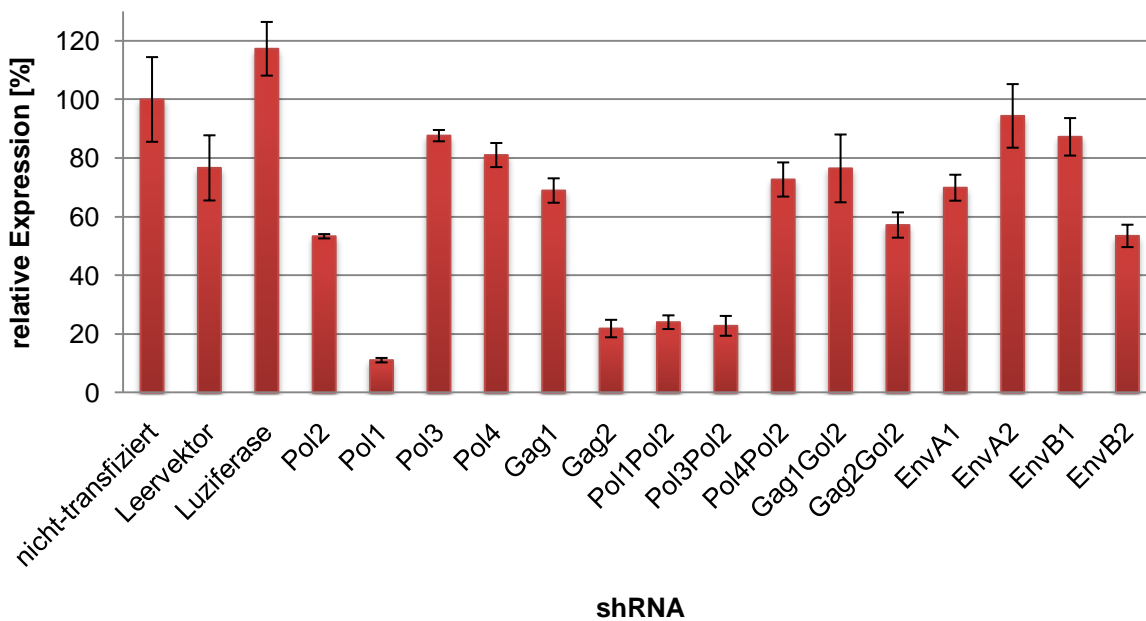
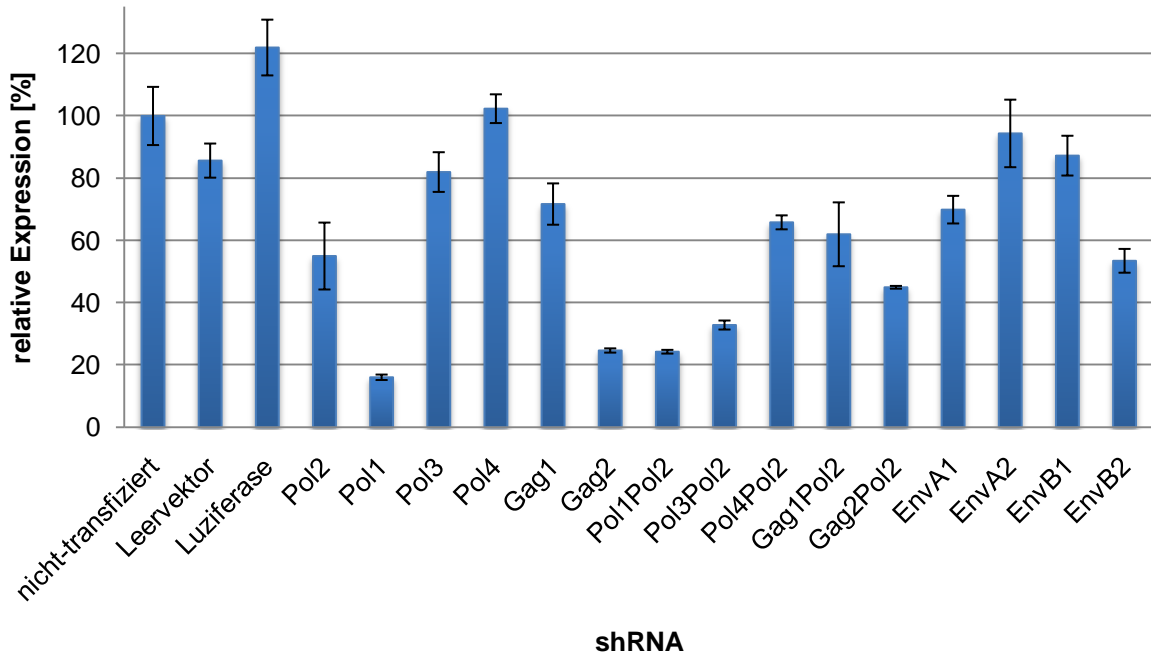


Abbildung 3.17: shRNA-induzierte Hemmung der PERV-Expression in PK15-Zellen

Der quantitative Nachweis der PERV-Expression erfolgte mittels PERV-spezifischer Primer durch eine *one-step RT real-time PCR*. Die C_T -Werte des Zielgens wurden auf die Expression des Referenzgens Cyclophilin normalisiert. Oben: Nachweis mittels *gag*-spezifischer Primer, Unten: Nachweis mittels *pol*-spezifischer Primer

Die eingesetzten shRNAs zeigten in den PERV-A/C-infizierten 293-Zellen hingegen nur eine geringe Hemmung der PERV-Expression (Abb. 3.18). So liegen die Werte bei Pol2 bei knappen 22 % und bei Pol1 bei 31 %. Zudem konnte bei allen Doppelkassetten, bis auf die Pol1Pol2 eine Hemmung von ca. 50 % ermittelt werden. Da diese Werte nur bedingt aussagekräftig sind, wurde auf eine vergleichende Messung mit dem *gag*-Primerpaar verzichtet.

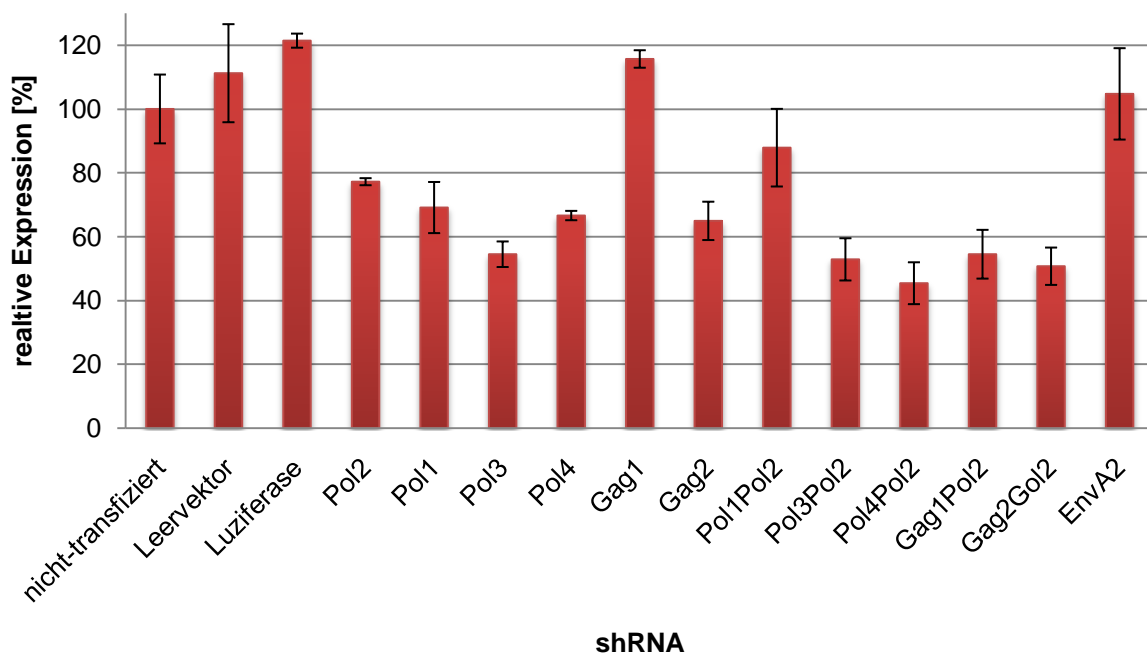


Abbildung 3.18: shRNA-induzierte Hemmung der PERV-Expression in PERV-A/C-infizierten 293-Zellen
 Der quantitative Nachweis der PERV-Expression erfolgte mittels PERV-spezifischer *pol*-Primer durch eine *one-step RT real-time PCR*. Die C_T -Werte des Zielgens wurden auf die Expression des Referenzgens humane GAPDH normalisiert.

3.2.6 Quantitativer Nachweis der PERV-Expression in shRNA-transgenen PK15-Zellen auf Proteinebene

Nachdem gezeigt werden konnte, dass einige der neu generierten shRNAs in der Lage waren, die Expression der PERV-Volllängen-RNA in PK15-Zellen zu hemmen, wurde untersucht, ob die reduzierte Bildung viraler mRNA auch zu einer reduzierten Expression viraler Proteine führt. Diese wurden mit Hilfe der Western-Blot-Analyse analysiert.

Hierzu musste Gesamtprotein aus den transfizierten PK15-Zellen unter Verwendung des RIPA-Puffers isoliert werden, wovon anschließend 50 µg Protein mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran geblottet wurden. Die Detektion erfolgte über ein anti-

3 Ergebnisse

p27Gag-Serum der Ziege 18. Das zelluläre Protein β -Actin wurde ebenfalls detektiert, um eine gleichmäßige Beladung des Gels nachweisen zu können.

Das 27Gag-Protein konnte in keiner der getesteten Zellen nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Dafür sind Banden auf der Höhe von 60 kDa des Gag-Precursors zu erkennen, bei dem es sich um ein noch nicht-prozessiertes akkumuliertes virales Protein handelt. Eine starke Hemmung der p60Gag-Expression wurde in mit Pol1 und Pol1Pol2-transfizierten PK15-Zellen beobachtet. Dies korreliert mit den Ergebnissen aus der *real-time*-PCR-Analyse (Abb. 3.18). Des Weiteren wurde eine schwache Hemmung bei der shRNA Pol2 beobachtet, was auch auf Molekularebene gezeigt werden konnte. Gag2 führte hingegen zu keiner Abnahme des Gag- Proteins.

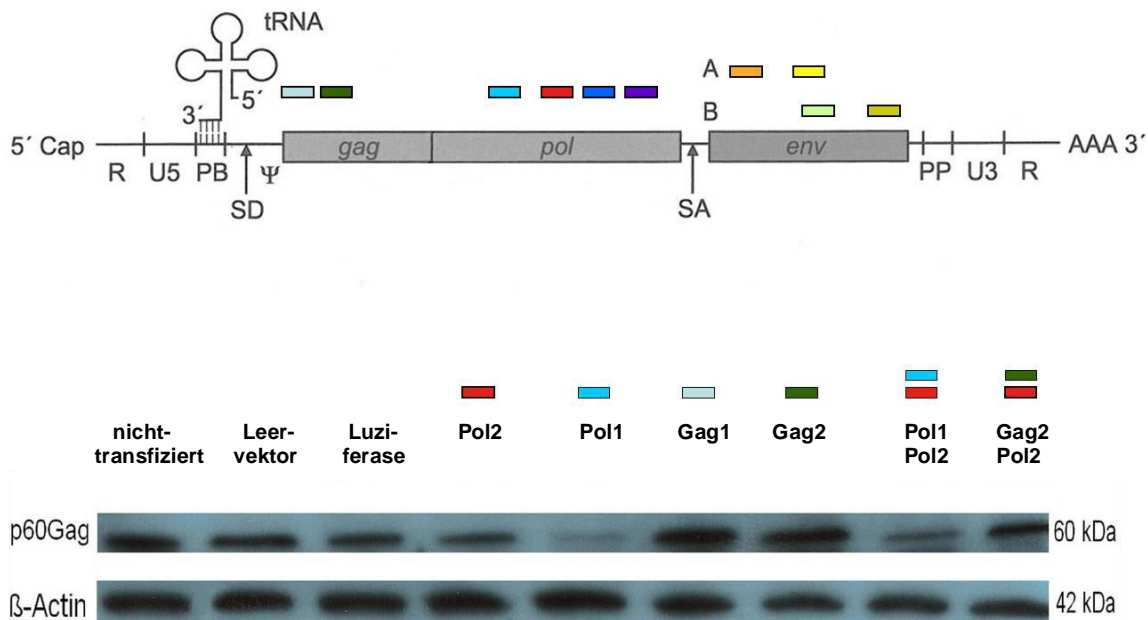


Abbildung 3.19: Hemmung der p60Gag-Expression durch stabil transfizierte shRNAs in PK15-Zellen

Der Gehalt an p60Gag-Protein in transfizierten PK15-Zellen konnte mittels Ziegenserum 18 (anti-p27Gag) detektiert werden. Aufgetragen wurden jeweils gleiche Mengen des Gesamtproteinlysats (50 μ g), zu erkennen an der gleichmäßigen Menge von β -Actin.

4 Diskussion

Die Transplantation eines Organs stellt für viele schwerkranke Menschen in aller Regel die letzte mögliche Überlebenschance dar. Jedoch ist die Zahl der Wartepatienten für ein Transplantat wesentlich höher, als die zur Verfügung stehenden Spenderorgane [DSO 2007]. Der weltweit herrschende Mangel an Allotransplantaten und die, vor allem in Deutschland immer geringer werdende Spendenbereitschaft, stellen somit ernst zu nehmende Probleme der Humanmedizin dar. Die Wissenschaft steht deshalb in der Pflicht, geeignete Alternativen aufzuzeigen, um das Defizit an Allotransplantaten zumindest zeitweise zu überbrücken. Dabei haben sich in den letzten Jahren einige vielversprechende Möglichkeiten herauskristallisiert. Neben der Verwendung künstlicher Organe und dem Einsatz humaner Stammzellen, ist die Übertragung von tierischen Geweben und Organen eine Methode, die schon in naher Zukunft zur Anwendung kommen könnte. Bei dieser sogenannten Xenotransplantation, die auch viele Lebendspenden überflüssig machen würde, wird zurzeit das Schwein als Spendertier favorisiert. Jedoch sind bis zu einem unbedenklichen Einsatz noch einige Hürden zu überwinden. So stellen immunologische Abstoßungsreaktionen, physiologische Inkompatibilitäten aber auch die Transmission von porzinen Mikroorganismen die größten Risiken dar [126-130]. Während sich Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten durch *designated-pathogen free* (DPF)-Bedingungen bei der Zucht der Tiere weitgehend eliminieren lassen [40, 127, 131], ist dies bei porzinen endogenen Retroviren nicht möglich. Diese sind als Proviren mit über 100 Kopien im Genom jeder Zelle des Schweins lokalisiert [60-62]. Man unterscheidet dabei zwischen den polytropen Subtypen A und B, die in der Lage sind, humane Zellen *in vitro* zu infizieren [69-72] und dem ecotropen Subtypen C, welcher sich nur porzinen Zellen replizieren kann [64]. Allerdings besteht die Möglichkeit der Rekombination von PERV-A und -C, was zu einer neuen Variante des Virus führt und in humanen Zellen durch Multimerisierung der LTR hohe Expressionsraten erreicht [71, 74, 82], weswegen PERV-C-freie Schweine als Spendertiere angestrebt werden [95]. Des Weiteren existiert aufgrund der Sequenzhomologie auch das Risiko einer Rekombination mit anderen Viren. PERVs stehen zudem unter Verdacht Immundefizienzen auszulösen und Tumore zu induzieren. So wurde in der Vergangenheit nach geeigneten Wegen gesucht, die Replikation des Virus zu unterbinden, da bei einer Transplantation eines Organs auf den immunsupprimierten Menschen, die Gefahr einer Infektion nicht ausgeschlossen werden kann. Neben der Suche nach einem geeigneten Kleintiermodell zur Evaluierung des Risikos von PERV und der Entwicklung eines Impfstoffs, bietet die RNA-Interferenz einen Erfolg versprechenden Ansatz, die Freisetzung des Virus

schon im Vorfeld einzuschränken und die Gefahr einer Transmission bei der Xenotransplantation zu minimieren.

Das Risiko einer Infektion von humanen Organrezipienten mit porzinen endogenen Retroviren kann trotz bislang durchgeführter *in vivo* Versuche [73, 76, 100, 101, 103-105] nicht vollständig ausgeschlossen werden. So sind in der Vergangenheit Ansätze entwickelt worden, mit deren Hilfe man die Replikation des Virus inhibieren kann.

Der klassische Weg des molekularbiologischen Gen-Knockouts zur Inhibition exprimierter Proteine [132, 133] stellt eine Möglichkeit dar, beschränkt sich jedoch auf die Manipulation der einfachen oder doppelten Ausführung eines Gens im Genom der Zelle. Da PERV mit mehr als 100 Kopien im Genom von Schweinezellen vorliegt [60-62], wäre der Einsatz dieser Methode extrem schwierig und somit nur bedingt geeignet. Zudem gibt es viele defekte Provirus-elemente, die nicht in der Lage sind, intakte und infektiöse Virionen zu bilden. Diese werden aufgrund der Mutationen oder Deletionen in ihrer Sequenz von dem Gen-Knockout nicht erfasst und können sich zu replikationskompetenten intakten Proviren rekombinieren [134]. Eine weitere Möglichkeit bestünde in der Generierung von antisense-RNAs oder Ribozymen, die spezifisch an die virale mRNA binden, deren Degradierung induzieren und damit die Translation der Virusproteine verhindern [135]. Ein Nachteil besteht jedoch darin, dass bei dem Einsatz von langen antisense-RNAs bzw. Ribozymen Interferonantworten und die unspezifische Bindung von zellulären Proteinen ausgelöst werden kann [136].

Vielversprechender ist hingegen die Strategie der RNA-Interferenz, welche ausschließlich in der vorliegenden Arbeit angewendet wird und erstmals 2001 bei Säugetierzellen beschrieben wurde [137]. So konnte diese Technik bereits *in vivo* zur Hemmung von HIV eingesetzt werden [138-142], aber auch die Expression anderer viraler Erreger inhibieren [143-146]. Zudem ist es möglich, die Methode nicht nur in Form einer siRNA transient in Zellen zur Anwendung zu bringen, sondern auch stabil als shRNA durch Transfektion oder Transduktion mittels spezieller Expressionsvektoren. Durch den Einsatz dieser shRNAs war es in der Vergangenheit schon möglich das Zielgen einer Maus mit einer Effizienz von teilweise bis zu 100 % dauerhaft zu unterdrücken [147].

4.1 shRNA-spezifische Hemmung der PERV-Expression in transgenen Schweinen

Um eine effektive Unterdrückung eines Zielgens mittels RNA-Interferenz zu erzielen, ist es notwendig, geeignete siRNA-Sequenzen zu finden, die spezifisch an die entsprechende mRNA binden und deren Degradierung induzieren. So zeigte sich, dass die Effizienz der

Expressionshemmung eines Gens stark von der Auswahl der siRNA abhängig ist [112, 148, 149]. Mittlerweile wurden die Gemeinsamkeiten sehr effizienter siRNAs zusammengestellt und bilden heute die Kriterien, die die Auswahl geeigneter siRNAs bzw. shRNAs erleichtern [150-154].

Zuvor wurden, noch ohne Hilfe dieser Auswahlkriterien, neun unterschiedliche siRNAs zur Hemmung der PERV-Expression generiert [112]. Die meisten davon wurden so ausgewählt, dass sie in der Lage waren, alle PERV-Subtypen gleichermaßen zu inhibieren, indem sie entweder im *gag*- oder *pol*-Bereich binden. Nach der Transfektion von PERV-B-infizierten 293-Zellen, zeigte die Pol2-siRNA die stärkste Expressions-Hemmung. Bei einer späteren Analyse stellte sich heraus, dass die Pol2-siRNA alle geforderten Bedingungen hinsichtlich der neu aufgestellten Kriterien erfüllte. Zur stabilen Expression in Form einer shRNA wurde die Sequenz in den Expressionsvektor pSuper kloniert und in PERV-B-infizierte 293-Zellen transfiziert. Auch hier konnte eine Hemmung der PERV-Expression von mehr als 80 % sowohl auf Molekularebene mittels *real-time* RT-PCR, als auch auf Proteinebene mittels Western Blot nachgewiesen werden.

Um shRNA-transgene Schweine zu generieren, war es zunächst notwendig, primäre porzine Fibroblasten stabil zu transfizieren und eine effiziente Hemmung der PERV-Expression zu erzielen. Eine direkte Transfektion der shRNA-Expressionskassette mittels eines Expressionsvektors erweist sich jedoch bei diesen Zellen als extrem schwierig und ineffizient. So kam deshalb ein lentivirales Vektorsystem zum Einsatz, mit dessen Hilfe es möglich war, primäre Fibroblasten stabil zu transduzieren. Der codierende Sequenzbereich der shRNA-Pol2 wurde dabei in den lentiviralen Vektor pLVTHM (s. Abb. 3.1) kloniert und mit jeweils zwei weiteren Verpackungsplasmiden in die Verpackungszelllinie 293T kotransfiziert. Durch die Transduktion von porzinen Fibroblasten mit den lentiviralen Partikeln konnte eine Pol2-shRNA-vermittelte Hemmung der PERV-Vollängen-RNA von bis zu 94,8 % ermittelt werden [113]. Die ebenfalls transduzierten PK15-Zellen zeigten eine verminderte PERV-Expression von bis 73,5 %. Die Voraussetzungen für die Herstellung Pol2-shRNA transgener Schweine waren somit gegeben.

In Kooperation mit dem Institut für Nutztiergenetik in Mariensee wurden basierend auf den zuvor durch lentiviral transduzierten Fibroblasten, transgene Schweine durch Nukleus-Transfer generiert. Alle Tiere verstarben während oder kurz nach der Geburt, so dass keine Lebendzellen mehr isoliert werden konnten. Allerdings wurde mit Hilfe einer DNA-Analyse aus entnommenen Ohrbiopsien der Transgennachweis einwandfrei erbracht. Des Weiteren konnte in allen Organen eine Hemmung der PERV-Expression um bis zu 95 % nachgewiesen werden [114].

Da für Langzeitbeobachtungen des durch die Pol2-shRNA-induzierten inhibitorischen Effektes keine lebenden Schweine mehr zur Verfügung standen, wurden mittels der zuvor

eingesetzten Methode des Nukleustransfer weitere shRNA-transgene Schweine generiert. Dazu wurden erneut die lentiviral transduzierten Pol2-pIVTHM-Fibroblasten verwendet. Als Kontrolle dienten Leervektor-transgene Schweine, die keine Pol2-shRNAs exprimierten. Nach der üblichen Tragezeit von ca. 116 Tagen kamen 11 Leervektor-transgene Kontrolltiere sowie sechs Pol2-shRNA-transgene Ferkel zur Welt, wovon drei direkt nach der Geburt vom Muttertier erdrückt wurden. Alle Tiere waren vollständig entwickelt und wiesen keine äußerlichen Anomalien auf, die auf eine unspezifische Hemmung lebenswichtiger zellulärer Proteine durch den lentiviralen Vektor oder die exprimierte shRNA hindeuten würde. Offensichtlich traten keine *off-target* Effekte auf, die neben dem Zielgen zusätzlich noch andere Gene beeinflussen [155-158]. Daraufhin wurden Fibroblasten und Ohrbiopsien entnommen, die als Ausgangsmaterial für weitere Analysen hinsichtlich des Transgennachweises und der PERV-Expression dienten.

Ein in dem lentiviralen Vektor pIVTHM lokalisiertes Gen kodiert das Protein GFP, welches die Eigenschaft hat, unter UV-Licht zu fluoreszieren. Die generierten Schweine emittierten durch die Synthese dieses Proteins unter UV-Bestrahlung ein leuchtend grünes Licht (Abb. 3.2). Besonders ausgeprägt war die Fluoreszenz im Bereich der Hufe und der Rüsselscheibe, was auf eine Anreicherung des Proteins in stark Kollagen-haltigen Geweben zurückzuführen ist. Auch in den entnommenen Fibroblasten wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie eine Emission im sichtbaren Bereich beobachtet (Abb. 3.3). Der Transgennachweis konnte so im Vorfeld für alle generierten Schweine erbracht werden. Um die Ergebnisse mit molekularbiologischen Nachweismethoden noch zu untermauern, wurde aus den erhaltenen Ohrbiopsien DNA isoliert und mittels PCR unter Verwendung von drei unterschiedlichen Primerpaaren analysiert. So konnte sowohl der Vektor im Bereich der 3'LTR, als auch das *gfp*-Gen in den sechs getesteten Pol2-shRNA-transgenen Schweinen und in fünf Leervektor-transgenen Kontrolltieren nachgewiesen werden (Abb. 3.5 und 3.6). Die Expressionskassette der Pol2-shRNA wurde ebenfalls in allen shRNA-transgenen Ferkeln detektiert (Abb. 3.7). Über die exakte Zahl der Vektorintegration kann hierbei jedoch keine Aussage getroffen werden. Es ist somit möglich, dass ein Schwein ein oder mehrere Integrate pro Zelle enthält. Im Hinblick auf eine bessere Interpretation der shRNA-induzierten PERV-Expressionshemmung in den einzelnen Tieren, wäre eine Analyse der genomischen DNA mittels Southern-Blot nützlich.

Um den Status der PERV-Provirusintegration zu untersuchen, wurde isolierte DNA aus den porzinen primären Fibroblasten eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mittels PCR unter Verwendung env-spezifischer Primer, die in der Lage waren, die einzelnen Subtypen zu differenzieren. Wie zu erwarten, konnte sowohl PERV-A und -B, als auch -C in dem Genom aller Fibroblasten detektiert werden (Abb. 3.9). Zur Analyse der qualitativen PERV-Expression wurde Gesamt-RNA aus den Fibroblasten der transgenen Ferkel isoliert und

einer RT-PCR unterworfen. So wurde in allen primären Zellen mRNA des Typs PERV-A und B detektiert (Abb. 3.10), ein Nachweis der Expression von PERV-C konnte hingegen nicht erbracht werden. Da Fibroblasten, wie gezeigt wurde (Abb. 3.16), ohnehin schon eine sehr niedrige PERV-Replikation aufweisen, könnte die daraus resultierende niedrige mRNA-Konzentration eine Erklärung der fehlenden Banden sein. Die Expression der viralen Vollängen-mRNA sowie gespleißter *env*-mRNA konnte wiederum in allen primären Zellen nachgewiesen werden. Letztere weist auf die Möglichkeit der Env-Proteintranslation und der Viruspartikelproduktion hin. Auf die Untersuchung der viralen Proteine wurde verzichtet, da Dieckhoff (2007) zeigen konnte, dass die Replikation der retroviralen Partikel in Fibroblasten zu gering ist, um eine Detektion der PERV-Proteine mittels SDS-PAGE und Western Blot zu ermöglichen.

Zur quantitativen Messung der PERV-Expression wurde in dieser Arbeit eine neue *one-step* RT *real-time* PCR etabliert. Ziel war es, mit Hilfe neu generierter Primer, die flankierend zur Bindungsstelle der Pol2-shRNA auf der PERV-mRNA binden, eine verbesserte Hemmung der Virusexpression zu detektieren. So besteht die Vermutung, dass ein bestimmter Anteil durch den RISC-Komplex gespaltener Ziel-mRNAs noch als „falsch intakt“ detektiert werden, da die Degradation der Stränge durch RNasen zeitverzögert stattfindet. Es wird davon ausgegangen, dass immer eine bestimmte Menge an geschnittenen, aber noch nicht degradierten mRNA-Transkripten im Zytoplasma vorliegt. Die Detektion findet allerdings nur statt, wenn die Primer in einiger Entfernung der Schnittstelle binden. Bei den neu generierten Primern liegt die Bindungssequenz rechts und links neben der RISC-Schnittstelle im Pol2-Abschnitt, so dass eine Erfassung geschnittener mRNAs ausgeschlossen werden kann, da die Amplifikatsynthese nicht erfolgt. Als Vergleich dienten die bisher verwendeten Primer, die im *gag*-Bereich hybridisieren. Für die Normalisierung der PERV-Expression erwies sich das porcine Cyclophilin am geeignetsten, da es eine hohe Effizienz aufwies und im Gegensatz zum porcinen GAPDH sehr stabile C_T -Werte lieferte. Eine Messung der PERV-Expressionshemmung von 100 % kann dennoch auch mittels *real-time* PCR nicht erreicht werden, da auch nicht-geschnittene mRNA-Sequenzen des Zellkerns detektiert werden, die für den RISC-Komplex, der nur im Zytoplasma vorliegt, unzugänglich sind.

So konnte in allen drei Pol2-shRNA-transgenen Ferkeln unter Verwendung der *pol-Primer* eine verminderte PERV-Expression von bis zu 93 % nachgewiesen werden. Die stärkste Hemmung wurde dabei in den Schweinen 1 und 3 beobachtet. Ein ähnliches Bild zeigte die Messung mit Hilfe der *gag-Primer*. Auch hier wurde eine Inhibition der viralen PERV-mRNA in primären Zellen der Pol2-shRNA-transgenen Schweine beobachtet. Allerdings ergab die Messung nur eine Hemmung von bis zu 70 %. Obwohl Karlas et al. zeigen konnten, dass die Wahl der Primer bei der Detektion von PERV in PERV-B-infizierten 293 Zellen keinen Einfluss auf Messung der viralen Expressionshemmung hat [112], liegt die Vermutung nahe,

dass den niedrig exprimierenden Zelllinien, wie den Fibroblasten, wieder eine Bedeutung zufällt. So macht die Menge an durch den RISC-Komplex geschnittenen RNAs in Fibroblasten vermutlich einen weitaus größeren Anteil der Gesamt-RNA aus, als das in anderen Zellen mit höherer Expression der Fall ist. Die Detektion dieser „falsch intakten“ RNAs fällt somit mehr ins Gewicht, was evtl. zu ungenaueren Ergebnissen führen kann.

Alle pol2-shRNA-Schweine zeigten eine stark verminderte PERV-Replikation. Dennoch gibt es zwischen den drei Zelllinien Unterschiede in den Expressionsraten. Dies lässt sich zum einen damit erklären, dass Tiere verschiedener Rassen und sogar auch Tiere innerhalb eines Stamms eine variable PERV-Replikation aufweisen können [66]. Darüber hinaus ist es möglich, dass die Schweine eine unterschiedliche Anzahl an Vektorintegrationen tragen, was sich in der Menge der exprimierten shRNAs widerspiegelt und der damit verbundenen unterschiedlich starken Inhibition der PERV-mRNA äußern kann. Des Weiteren schwankt die PERV-Expression nicht nur zwischen verschiedenen Kontrollschweinen bei einer Messung, sondern auch zwischen zwei verschiedenen Messungen desselben Tiers. Zur Begründung muss hier auf die umgekehrte proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der RNA- bzw. DNA-Menge und dem C_T -Wert der *real-time* PCR eingegangen werden. So sind Schwankungen von $\pm 0,5 C_T$ zwischen den einzelnen Messungen, aufgrund vielfältiger Faktoren akzeptabel und nicht vermeidbar. Ein ΔC_T -Wert von ± 1 entspricht in diesem Fall schon einer Halbierung bzw. Verdopplung der PERV-mRNA-Menge. Bei der Linearisierung und der relativen Auftragung, machen sich diese Schwankungen bei prozentual hohen Expressionen stärker bemerkbar, als bei kleinen. Hinzu kommt, dass auch die C_T -Werte des Referenzgens in die Rechnung mit einfließen und die Unterschiede der Expressionen gegebenenfalls noch verstärken können. Dies ist ebenso bei der Standardabweichung zu beobachten, die jedoch nur die Differenzen der Triplikatmessungen berücksichtigt. Auch hier fallen die absoluten Schwankungen von prozentual hohen Expressionswerten mehr ins Gewicht, auch wenn die relative Standardabweichung aller Messungen identisch ist. Erschwerend kommt hinzu, dass sich die Hemmung eines Gens im Gegensatz zu einer Überexpression mit der *real-time* PCR deutlich schwerer bestimmen lässt, da sich eine Hemmung nur in einem Messbereich zwischen 0 % und 100 % bewegt, während eine Überexpression keine obere Grenze aufweist. Eine Expressionshemmung von 50 % oder weniger ist deshalb nur bedingt aussagekräftig und kann nur mit Hilfe mehrerer Messwiederholungen bestätigt werden.

4.2 Effizienzsteigerung der PERV-Expressionshemmung durch neu generierte shRNAs

Die erfolgreiche Generierung von Pol2-shRNA-transgenen Ferkeln und der Nachweis der Hemmung der PERV-Expression von bis zu 93 % in den primären Fibroblasten sind eindeutige Belege dafür, dass die Methode der RNA-Interferenz für die Inhibition von porzinen endogenen Retroviren geeignet ist. Jedoch ist man bestrebt, die Effizienz dieses Systems weiter zu optimieren. Aufgrund neu programmierter Algorithmen, wurde die Programm-gesteuerte Generierung effizienter shRNAs, die möglichst keine *off-target*-Effekte aufweisen, in den letzten Jahren und Monaten enorm verbessert. So sollte im Rahmen dieser Arbeit unter anderem die Effizienz neu erzeugter shRNAs in Zelllinien untersucht werden, um die Schaffung weiterer transgener Schweine mit stark verminderter PERV-Expression zu ermöglichen. Darüber hinaus sollte gezeigt werden, ob Kombinationen von zwei einzelnen shRNAs, sogenannten Tandems, eine stärkere Inhibition der PERV-Expression bewirken. So konnte in zahlreichen Publikationen ein additiver Effekt von multiplen shRNAs nachgewiesen werden [159-161].

Die Auswahl von sieben shRNAs, deren spezifische Bindungsstellen im *pol*- und *env*-Bereich der mRNA von PERV liegen, erfolgte mit Hilfe eines neuen Algorithmus der Firma Clontech. Zwei weitere in der *gag*-Sequenz hybridisierende shRNAs wurden von der kooperierenden Arbeitsgruppe von Dr. Linda Scobie in Glasgow zur Verfügung gestellt (Abb. 3.13). Der vor der Expressionskassette lokalisierte humane U6-Promotor des retroviralen Vektors pSiren wurde durch den H1-Promoter des pSuper-Expressionsvektors ersetzt, um einen besseren Vergleich der Expressionsraten zu den bisher veröffentlichten Ergebnissen zu ermöglichen. Die Transfektion der pSiren-Vektoren mit den Einzel bzw. Doppelkassetten in die Verpackungszelllinie PT67 verlief optimal. Jedoch konnte keine Infektion der Zielzellen durch die Retroviren festgestellt werden, obwohl explizit nach Anleitung des Herstellers Clontech verfahren wurde. Auch nach Veränderung verschiedener Parameter, blieb die Transduktion erfolglos. Die Vermutung einer Mutation oder Deletion in Bereichen der LTRs des pSiren-Vektors, konnte durch Sequenzierung und Abgleich mit der Vektorkarte des Herstellers nicht bestätigt werden. So ist eventuell davon auszugehen, dass die Verpackungszelllinie PT67 in den codierenden retroviralen Bereichen eine Mutation aufwies, die eine erfolgreiche Bildung von intakten infektiösen Partikeln verhinderte. Dennoch gelang es, die Zielzellen PK15 und die PERV-A/C-infizierten 293 mit allen Vektoren direkt zu transfizieren. Für die Messung der Expressionshemmung von PERV ist diese Methode vollkommen ausreichend; eine direkte Transfektion von primären porzinen Fibroblasten zur Generierung neuer transgener Schweine gestaltet sich jedoch extrem schwierig, weswegen

die Verwendung einer alternativen Verpackungszelllinie, wie beispielsweise 293GP, in Erwägung gezogen werden sollte. Die Nachteile einer direkten Transfektion äußern sich zudem in einem eventuell auftretenden Verlust der Ausprägung einer shRNA, da die Möglichkeit eines Einbaus des Vektors in das zelluläre Genom über eine Schnittstelle in der Expressionskassette besteht. So wird in diesem Fall, trotz erfolgreicher Integration des Vektors, keine shRNA transkribiert, was zu verfälschten Ergebnissen bei der Expressionsbestimmung führen kann.

Der Nachweis der Integrate in den PK15- Zellen erfolgte mittels PCR und konnte für alle Expressionskassetten, außer der Pol1Pol2 erbracht werden. Die PERV-A/C-infizierten 293-Zellen zeigten dagegen bei jedem Vektor ein Signal (Abb. 3.15). Interessanterweise sind bei allen Doppelkassetten mehrere Banden zu erkennen, die zum einen auf der Höhe der Einzelkassetten oder Doppelkassetten liegen und zum anderen auch unspezifisch sind. Auch nach mehrmaligen Wiederholungen der Messungen mit unterschiedlichen Enzymen unter optimierten PCR-Bedingungen, konnte keine signifikante Verbesserung der Ergebnisse erzielt werden. Studien belegen, dass die codierende Sequenz der multiplen shRNAs bei der Amplifikation starke Sekundärstrukturen bildet, die eine korrekte Verdopplung der DNA bei der PCR verhindert [162]. So kann es vorkommen, dass nur eine Kassette des Tandems oder nur ein Teil davon amplifiziert wird, was zu unterschiedlich großen Oligonukleodidfragmenten führt.

Die Messung der PERV-Expression in den transfizierten Zellen wurde mittels der oben verwendeten *one-step RT realtime* PCR unter Verwendung der *gag*- und *pol*-Primerpaare durchgeführt. Dabei konnte die stärkste Hemmung von bis zu 89 % bei der Pol1-shRNA in PK15-Zellen nachgewiesen werden. Mit der bisher verwendeten Pol2-shRNA wurde dagegen die Replikation von PERV nur um bis zu 47 % inhibiert. Des Weiteren zeigten Gag1 sowie die Tandems Pol1Pol2 und Pol3Pol2 eine Reduzierung PERV-mRNA um bis zu 78 %. Die *env*-shRNAs führten erwartungsgemäß nur zu einer geringen Hemmung des Virus, da diese nur in der Lage sind, an jeweils einen Subtypen von PERV, also entweder A oder B zu binden. Dennoch könnten sie später bei der Generierung von *env*-shRNA-transgenen Schweinen einen Forschungsbeitrag dazu leisten, inwieweit das *env*-Gen eine Rolle bei der Kontrolle von Zellfusionsprozessen während der plazentalen Entwicklung spielt [54, 55]. Ein signifikanter Unterschied der Expressionen bei der Verwendung von zwei verschiedenen Primerpaaren konnte nicht gezeigt werden, was die Studien von Karlas et al. [112] und die oben aufgestellte Vermutung bestätigt. Bei den Doppelkassetten war wider Erwarten kein additiver Effekt erkennbar. So ist es möglich, dass die Expressionskassetten der Tandems zu eng aneinander liegen, was die Transkription aufgrund der sterischen Hinderung der RNA-Polymerasen erschwert. Ein größerer Spacer zwischen den Kassetten würde eventuell Abhilfe verschaffen und die Effizienz der shRNAs erhöhen.

Bei den PERV-A/C-transfizierten 293-Zellen konnte keine signifikante shRNA-vermittelte Inhibition der PERV-Expression beobachtet werden. Als Erklärung für den Effekt der variablen Expressionshemmung einer shRNA in unterschiedlichen Zelltypen, müssen die enormen PERV-Expressionsunterschiede herangezogen werden (Abb. 3.16). Die primären porzinen Fibroblasten weisen hierbei eine um 99,99 %, die PK15 eine um 59 % geringere Virus-Expression als die PERV-A/C-infizierten 293-Zellen auf. Anscheinend stößt das RNAi-System bei einer hohen PERV-Replikationsrate an seine Grenzen und ist nicht mehr in der Lage, die virale mRNA effektiv zu inhibieren. Vermutlich steht der RISC-Komplex im Zytoplasma der Zelle nicht in mehr in ausreichender Menge zur Verfügung, um die Degradierung der viralen mRNA zu induzieren. Somit würde auch der Einsatz multipler shRNAs in diesem Fall keine Steigerung der Effektivität herbeiführen. Denkbar wäre auch eine variable Expression der Dicer- und RISC-Proteinkomplexe in verschiedenen Zelltypen. Mit Hilfe der *one-step RT realtime* PCR konnte durch einige shRNAs eine effektive Reduzierung der PERV-Expression in PK15-Zellen nachgewiesen werden. Zur weiteren Charakterisierung der inhibierenden Wirkung wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot die Menge an viralen Proteinen bestimmt (Abb. 3.19), die darüber Aufschluss gibt, inwieweit die Reduzierung der mRNA auch zu einer Reduktion der Partikelproduktion führt. Bei dem detektierten p60Gag-Protein handelt es sich um das virale Vorläuferprotein, welches erst nach der Freisetzung der Virionen durch die mitgeführte Protease gespalten wird. Da das Gesamtprotein aus dem Zelllysat isoliert wurde, konnten folglich keine einzelnen prozessierten Gag-Proteine, wie p49Gag, p37Gag und p27Gag nachgewiesen werden. So konnte die stärkste Hemmung der Expression des PERV-p60Gag-Proteins bei den Pol1-shRNA-transgenen Zellen beobachtet werden. Des Weiteren zeigten die Zellen mit den Kassetten Pol2 und Pol1Pol2 eine reduzierte Proteinexpression. Diese Resultate korrelieren mit den Ergebnissen der *real-time* PCR und bestätigen die Effektivität dieser shRNAs. Jedoch konnte die Gag1-Kassette wider Erwarten keine Inhibition der viralen Proteine vermitteln.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue shRNAs generiert, wovon die Pol1-shRNA eine signifikant gesteigerte Effizienz der PERV-Expressionshemmung im Vergleich zu der bisher eingesetzten Pol2-shRNA aufwies. So könnten auf Grundlage dessen in Zukunft neue shRNA-transgene-Schweine geklont werden, bei denen die Replikation von porzinen endogenen Retroviren noch stärker inhibiert wäre.

5 Zusammenfassung

Die Xenotransplantation vom Schwein auf den Menschen ist mit dem Risiko der Übertragung von porzinen endogenen Retroviren (PERVs) verbunden, die im Genom jeder Zelle des Schweins integriert sind und sich nicht durch DPF-(*designated pathogen free*) Zucht eliminieren lassen. PERVs infizieren humane Zellen *in vitro*, womit die Möglichkeit einer *in vivo* Infektion des humanen immunsupprimierten Rezipienten nicht ausgeschlossen werden kann. In den letzten Jahren wurde deshalb nach Möglichkeiten gesucht, die Übertragung zu verhindern. Die RNA-Interferenz stellt hierbei eine vielversprechende Strategie dar, da sie die Replikation von PERV posttranskriptional unterbinden kann. So gelang es, transgene Schweine zu generieren, die in der Lage waren, shRNAs stabil zu exprimieren.

In isolierten primären Fibroblasten der transgenen Schweine wurde das fluoreszierende GFP mittels Fluoreszenzmikroskopie sowie die Integration des Transgens mittels PCR nachgewiesen, indem zum einen das *gfp*-Gen und der verwendete lentivirale Vektor, als auch die Expressionskassette der shRNA detektiert wurden. Alle entnommenen primären Fibroblasten enthielten Proviren der Subtypen A, B und C, die mittels PCR nachgewiesen wurden. Zudem konnte die Expression der Vollängen-mRNA sowie gespleißter env-mRNA mittels RT-PCR gezeigt werden. Um die Sensitivität der Nachweismethoden der PERV-Expression zu erhöhen, wurde eine neue *one-step RT real-time* PCR unter Verwendung neuer Primer und Sonde etabliert. Dadurch konnte eine verbesserte Detektion der shRNA-induzierten Hemmung der PERV-Expression um bis zu 93 % anstelle früherer 70 % nachgewiesen werden.

Um die Effektivität der RNA-Interferenz weiter zu erhöhen, wurden neue PERV-mRNA-spezifische shRNAs generiert und mit der bisher verwendeten shRNA zu Tandems kombiniert. Nach der Klonierung der Expressionskassetten in einen retroviralen Vektor und der Transfektion in eine Verpackungszelllinie, konnten keine retroviralen Partikel nachgewiesen werden. Die Zielzellen PK15- und PERV-A/C-infizierten 293 wurden daraufhin direkt transfiziert. Die quantitative Bestimmung der PERV-Expression erfolgte molekularbiologisch mittels *one-step RT real-time* PCR und proteinchemisch mittels Western Blot. Die Ergebnisse zeigten dabei eine in PK15-Zellen shRNA-induzierte Hemmung der Virus-Expression um bis zu 89 %, womit die Effizienz der bisher eingesetzten shRNA deutlich gesteigert wurde. Ein additiver Effekt der shRNA-Doppelkassetten konnte vorerst nicht beobachtet werden. Im Unterschied zu den PK15-Zellen war die PERV-Expression in PERV-A/C-infizierten 293-Zellen so hoch, dass die Hemmung kaum gemessen werden konnte. Mit Hilfe der verbesserten Strategie der PERV-spezifischen RNA-Interferenz konnte ein Beitrag geleistet werden, die Sicherheit bei der Übertragung von xenogenen Transplantaten auf den Menschen zu erhöhen.

Literaturverzeichnis

1. Zirm, E.K., *Eine erfolgreiche totale Keratoplastik (A successful total keratoplasty)*. 1906. *Refract Corneal Surg*, 1989. **5**(4): p. 258-61.
2. Hamilton, D.N. and W.A. Reid, *Yu. Yu. Voronoy and the first human kidney allograft*. *Surg Gynecol Obstet*, 1984. **159**(3): p. 289-94.
3. Barnard, C.N., *The first heart transplant--background and circumstances*. *S Afr Med J*, 1995. **85**(9): p. 924, 926.
4. Bowman, K.W. and S.A. Richard, *Culture, brain death, and transplantation*. *Prog Transplant*, 2003. **13**(3): p. 211-5; quiz 216-7.
5. Muraleedharan, V.R., S. Jan, and S. Ram Prasad, *The trade in human organs in Tamil Nadu: the anatomy of regulatory failure*. *Health Econ Policy Law*, 2006. **1**(Pt 1): p. 41-57.
6. DeBakey, M.E., *Left ventricular bypass pump for cardiac assistance. Clinical experience*. *Am J Cardiol*, 1971. **27**(1): p. 3-11.
7. Cooley, D.A., *The first implantation of an artificial heart: reflections and observations*. *Transplant Proc*, 1973. **5**(2): p. 1135-7.
8. Kolff, W.J., *Artificial kidney; treatment of acute and chronic uremia*. *Cleve Clin Q*, 1950. **17**(4): p. 216-28.
9. Bannasch, H., et al., *Skin tissue engineering*. *Clin Plast Surg*, 2003. **30**(4): p. 573-9.
10. Schmidt, D. and S.P. Hoerstrup, *Tissue engineered heart valves based on human cells*. *Swiss Med Wkly*, 2006. **136**(39-40): p. 618-23.
11. Reemtsma, K., et al., *Heterotransplantation of the Kidney: Two Clinical Experiences*. *Science*, 1964. **143**: p. 700-2.
12. Bailey, L.L., et al., *Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate*. *JAMA*, 1985. **254**(23): p. 3321-9.
13. Makowka, L., et al., *Immunohistopathologic lesions associated with the rejection of a pig-to-human liver xenograft*. *Transplant Proc*, 1994. **26**(3): p. 1074-5.
14. Thanos, C.G. and R.B. Elliott, *Encapsulated porcine islet transplantation: an evolving therapy for the treatment of type I diabetes*. *Expert Opin Biol Ther*, 2009. **9**(1): p. 29-44.
15. Elliott, R.B., et al., *No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of encapsulated porcine islet xenografts*. *Cell Transplant*, 2000. **9**(6): p. 895-901.
16. Fink, J.S., et al., *Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results*. *Cell Transplant*, 2000. **9**(2): p. 273-8.

17. Schumacher, J.M., et al., *Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD*. Neurology, 2000. **54**(5): p. 1042-50.
18. Levy, M.F., et al., *Liver allotransplantation after extracorporeal hepatic support with transgenic (hCD55/hCD59) porcine livers: clinical results and lack of pig-to-human transmission of the porcine endogenous retrovirus*. Transplantation, 2000. **69**(2): p. 272-80.
19. Sauer, I.M., et al., *Clinical extracorporeal hybrid liver support--phase I study with primary porcine liver cells*. Xenotransplantation, 2003. **10**(5): p. 460-9.
20. Allan, J.S., et al., *Amplification of simian retroviral sequences from human recipients of baboon liver transplants*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1998. **14**(10): p. 821-4.
21. Michaels, M.G., et al., *Detection of infectious baboon cytomegalovirus after baboon-to-human liver xenotransplantation*. J Virol, 2001. **75**(6): p. 2825-8.
22. Hannon, J.P., C.A. Bossone, and C.E. Wade, *Normal physiological values for conscious pigs used in biomedical research*. Lab Anim Sci, 1990. **40**(3): p. 293-8.
23. Sachs, D.H., *The pig as a potential xenograft donor*. Vet Immunol Immunopathol, 1994. **43**(1-3): p. 185-91.
24. McKenzie, I.F., et al., *Distribution of the major xenoantigen (gal (alpha 1-3)gal) for pig to human xenografts*. Transpl Immunol, 1994. **2**(2): p. 81-6.
25. Li, S., et al., *Potent inhibition of human and baboon anti-alpha Gal antibodies by a subfraction of oligosaccharides derived from porcine stomach mucin*. Transplant Proc, 1996. **28**(2): p. 558.
26. Schmoeckel, M., et al., *Transgenic human decay accelerating factor makes normal pigs function as a concordant species*. J Heart Lung Transplant, 1997. **16**(7): p. 758-64.
27. Phelps, C.J., et al., *Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs*. Science, 2003. **299**(5605): p. 411-4.
28. Rosengard, A.M., et al., *Endothelial expression of human decay accelerating factor in transgenic pig tissue: a potential approach for human complement inactivation in discordant xenografts*. Transplant Proc, 1995. **27**(1): p. 326-7.
29. Cooper, D.K., *Xenotransplantation--state of the art*. Front Biosci, 1996. **1**: p. d248-65.
30. Brouard, S., et al., *T cell response in xenorecognition and xenografts: a review*. Hum Immunol, 1999. **60**(6): p. 455-68.
31. Dorling, A., *Clinical xenotransplantation: pigs might fly?* Am J Transplant, 2002. **2**(8): p. 695-700.
32. Schon, M.R., et al., *Xenogeneic, extracorporeal liver perfusion in primates improves the ratio of branched-chain amino acids to aromatic amino acids (Fischer's ratio)*. Eur Surg Res, 1999. **31**(3): p. 230-9.
33. Hammer, C., *[Xenogenic acceptance, a realistic fantasy?]*. Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd, 1996. **113**: p. 371-5.

34. Patience, C., Y. Takeuchi, and R.A. Weiss, *Zoonosis in xenotransplantation*. Curr Opin Immunol, 1998. **10**(5): p. 539-42.
35. Denner, J., *Transspecies transmissions of retroviruses: new cases*. Virology, 2007. **369**(2): p. 229-33.
36. Grimm, T.A., et al., *Simian immunodeficiency viruses from multiple lineages infect human macrophages: implications for cross-species transmission*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2003. **32**(4): p. 362-9.
37. Weingartl, H.M., et al., *Susceptibility of pigs and chickens to SARS coronavirus*. Emerg Infect Dis, 2004. **10**(2): p. 179-84.
38. Fishman, J.A., *Xenosis and xenotransplantation: addressing the infectious risks posed by an emerging technology*. Kidney Int Suppl, 1997. **58**: p. S41-5.
39. Tucker, A., et al., *The production of transgenic pigs for potential use in clinical xenotransplantation: microbiological evaluation*. Xenotransplantation, 2002. **9**(3): p. 191-202.
40. Swindle, M.M., *Defining appropriate health status and management programs for specific-pathogen-free swine for xenotransplantation*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **862**: p. 111-20.
41. Taubenberger, J.K., et al., *Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus*. Science, 1997. **275**(5307): p. 1793-6.
42. Allan, G.M. and J.A. Ellis, *Porcine circoviruses: a review*. J Vet Diagn Invest, 2000. **12**(1): p. 3-14.
43. Smith, C.E., et al., *Fatal human disease from vervet monkeys*. Lancet, 1967. **2**(7526): p. 1119-21.
44. Gao, F., et al., *Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 436-41.
45. Denner, J., *Is porcine endogenous retrovirus (PERV) transmission still relevant?* Transplant Proc, 2008. **40**(2): p. 587-9.
46. Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., *Molekulare Virologie*. 2. Auflage ed. 2002: Spektrum akademischer Verlag.
47. Poiesz, B.J., et al., *Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(12): p. 7415-9.
48. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
49. Kalyanaraman, V.S., et al., *A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia*. Science, 1982. **218**(4572): p. 571-3.

50. Coffin, M., Hughes, J.H., Varmus, E.H., *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, E-print, 1997.
51. Herniou, E., et al., *Retroviral diversity and distribution in vertebrates*. J Virol, 1998. **72**(7): p. 5955-66.
52. Mallet, F. and S. Prudhomme, [*Retroviral inheritance in man*]. J Soc Biol, 2004. **198**(4): p. 399-412.
53. Medstrand, P., J.R. Landry, and D.L. Mager, *Long terminal repeats are used as alternative promoters for the endothelin B receptor and apolipoprotein C-I genes in humans*. J Biol Chem, 2001. **276**(3): p. 1896-903.
54. Blond, J.L., et al., *An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor*. J Virol, 2000. **74**(7): p. 3321-9.
55. Esnault, C., et al., *A placenta-specific receptor for the fusogenic, endogenous retrovirus-derived, human syncytin-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(45): p. 17532-7.
56. Ponferrada, V.G., B.S. Mauck, and D.P. Wooley, *The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus HERV-W induces cellular resistance to spleen necrosis virus*. Arch Virol, 2003. **148**(4): p. 659-75.
57. Breese, S.S., Jr., *Virus-like particles occurring in cultures of stable pig kidney cell lines. Brief report*. Arch Gesamte Virusforsch, 1970. **30**(4): p. 401-4.
58. Armstrong, J.A., J.S. Porterfield, and A.T. De Madrid, *C-type virus particles in pig kidney cell lines*. J Gen Virol, 1971. **10**(2): p. 195-8.
59. Woods, W.A., et al., *Antigenic and biochemical characterization of the C-type particle of the stable porcine kidney cell line PK-15*. J Virol, 1973. **12**(5): p. 1184-6.
60. Le Tissier, P., et al., *Two sets of human-tropic pig retrovirus*. Nature, 1997. **389**(6652): p. 681-2.
61. Patience, C., et al., *Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species*. J Virol, 2001. **75**(6): p. 2771-5.
62. Ericsson, T., et al., *Identification of novel porcine endogenous betaretrovirus sequences in miniature swine*. J Virol, 2001. **75**(6): p. 2765-70.
63. Lee, J.H., et al., *Characterizing and mapping porcine endogenous retroviruses in Westran pigs*. J Virol, 2002. **76**(11): p. 5548-56.
64. Takeuchi, Y., et al., *Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus*. J Virol, 1998. **72**(12): p. 9986-91.
65. Herring, C., et al., *Mapping full-length porcine endogenous retroviruses in a large white pig*. J Virol, 2001. **75**(24): p. 12252-65.
66. Tacke, S.J., V. Specke, and J. Denner, *Differences in release and determination of subtype of porcine endogenous retroviruses produced by stimulated normal pig blood cells*. Intervirology, 2003. **46**(1): p. 17-24.

67. Akiyoshi, D.E., et al., *Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine*. J Virol, 1998. **72**(5): p. 4503-7.
68. Clemenceau, B., et al., *Porcine endogenous retroviral mRNAs in pancreas and a panel of tissues from specific pathogen-free pigs*. Diabetes Metab, 1999. **25**(6): p. 518-25.
69. Patience, C., Y. Takeuchi, and R.A. Weiss, *Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs*. Nat Med, 1997. **3**(3): p. 282-6.
70. Martin, U., et al., *Expression of pig endogenous retrovirus by primary porcine endothelial cells and infection of human cells*. Lancet, 1998. **352**(9129): p. 692-4.
71. Wilson, C.A., et al., *Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells*. J Virol, 1998. **72**(4): p. 3082-7.
72. Specke, V., S. Rubant, and J. Denner, *Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses*. Virology, 2001. **285**(2): p. 177-80.
73. Specke, V., et al., *Productive infection of a mink cell line with porcine endogenous retroviruses (PERVs) but lack of transmission to minks in vivo*. Arch Virol, 2002. **147**(2): p. 305-19.
74. Wilson, C.A., et al., *Extended analysis of the in vitro tropism of porcine endogenous retrovirus*. J Virol, 2000. **74**(1): p. 49-56.
75. Blusch, J.H., et al., *Infection of nonhuman primate cells by pig endogenous retrovirus*. J Virol, 2000. **74**(16): p. 7687-90.
76. Specke, V., et al., *Virus safety in xenotransplantation: first exploratory in vivo studies in small laboratory animals and non-human primates*. Transpl Immunol, 2002. **9**(2-4): p. 281-8.
77. Magre, S., Y. Takeuchi, and B. Bartosch, *Xenotransplantation and pig endogenous retroviruses*. Rev Med Virol, 2003. **13**(5): p. 311-29.
78. Ericsson, T.A., et al., *Identification of receptors for pig endogenous retrovirus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(11): p. 6759-64.
79. Marcucci, K.T., et al., *Functional hierarchy of two L domains in porcine endogenous retrovirus (PERV) that influence release and infectivity*. Virology, 2008. **375**(2): p. 637-45.
80. Marcucci, K.T., et al., *Identification of two distinct structural regions in a human porcine endogenous retrovirus receptor, HuPAR2, contributing to function for viral entry*. Retrovirology, 2009. **6**: p. 3.
81. Huh, J.W., et al., *Identification and molecular characterization of PERV gamma1 long terminal repeats*. Mol Cells, 2009. **27**(1): p. 119-23.
82. Wood, J.C., et al., *Identification of exogenous forms of human-tropic porcine endogenous retrovirus in miniature Swine*. J Virol, 2004. **78**(5): p. 2494-501.

83. Denner, J., et al., *Genetic alterations of the long terminal repeat of an ecotropic porcine endogenous retrovirus during passage in human cells*. Virology, 2003. **314**(1): p. 125-33.
84. Harrison, I., et al., *Determinants of high titer in recombinant porcine endogenous retroviruses*. J Virol, 2004. **78**(24): p. 13871-9.
85. Wood, A., et al., *Porcine endogenous retroviruses PERV A and A/C recombinant are insensitive to a range of divergent mammalian TRIM5alpha proteins including human TRIM5alpha*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 3): p. 702-9.
86. Takeuchi, Y., et al., *Feline leukemia virus subgroup B uses the same cell surface receptor as gibbon ape leukemia virus*. J Virol, 1992. **66**(2): p. 1219-22.
87. Roy-Burman, P., *Endogenous env elements: partners in generation of pathogenic feline leukemia viruses*. Virus Genes, 1995. **11**(2-3): p. 147-61.
88. Fan, H., *Leukemogenesis by Moloney murine leukemia virus: a multistep process*. Trends Microbiol, 1997. **5**(2): p. 74-82.
89. Villanueva, R.A., S. Campbell, and M.J. Roth, *Molecular analysis of a recombinant M-MuLV/RaLV retrovirus*. Virology, 2003. **315**(1): p. 195-208.
90. Konings, F.A., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) circulating recombinant form 02_AG (CRF02_AG) has a higher in vitro replicative capacity than its parental subtypes A and G*. J Med Virol, 2006. **78**(5): p. 523-34.
91. Motomura, K., J. Chen, and W.S. Hu, *Genetic recombination between human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2, two distinct human lentiviruses*. J Virol, 2008. **82**(4): p. 1923-33.
92. Bartosch, B., et al., *Evidence and consequence of porcine endogenous retrovirus recombination*. J Virol, 2004. **78**(24): p. 13880-90.
93. Martin, S.I., R. Wilkinson, and J.A. Fishman, *Genomic presence of recombinant porcine endogenous retrovirus in transmitting miniature swine*. Virol J, 2006. **3**: p. 91.
94. Dieckhoff, B., et al., *Expression of porcine endogenous retroviruses (PERVs) in melanomas of Munich miniature swine (MMS) Troll*. Vet Microbiol, 2007. **123**(1-3): p. 53-68.
95. Denner, J., *Recombinant porcine endogenous retroviruses (PERV-A/C): a new risk for xenotransplantation?* Arch Virol, 2008. **153**(8): p. 1421-6.
96. Hanger, J.J., et al., *The nucleotide sequence of koala (Phascolarctos cinereus) retrovirus: a novel type C endogenous virus related to Gibbon ape leukemia virus*. J Virol, 2000. **74**(9): p. 4264-72.
97. Mikkers, H. and A. Berns, *Retroviral insertional mutagenesis: tagging cancer pathways*. Adv Cancer Res, 2003. **88**: p. 53-99.
98. Takeuchi, Y., et al., *Sensitization of cells and retroviruses to human serum by (alpha 1-3) galactosyltransferase*. Nature, 1996. **379**(6560): p. 85-8.

99. Fujita, F., et al., *Inactivation of porcine endogenous retrovirus by human serum as a function of complement activated through the classical pathway*. Hepatol Res, 2003. **26**(2): p. 106-113.
100. Specke, V., et al., *Porcine endogenous retroviruses: in vitro host range and attempts to establish small animal models*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 4): p. 837-44.
101. Denner, J., et al., *Porcine endogenous retroviruses (PERVs): adaptation to human cells and attempts to infect small animals and non-human primates*. Ann Transplant, 2001. **6**(3): p. 25-33.
102. Denner, J., *Porcine endogenous retroviruses (PERVs) and xenotransplantation: screening for transmission in several clinical trials and in experimental models using non-human primates*. Ann Transplant, 2003. **8**(3): p. 39-48.
103. Irgang, M., et al., *Porcine endogenous retroviruses PERV-A and PERV-B infect neither mouse cells in vitro nor SCID mice in vivo*. Intervirology, 2005. **48**(2-3): p. 167-73.
104. Denner, J., et al., *No transmission of porcine endogenous retroviruses (PERVs) in a long-term pig to rat xenotransplantation model and no infection of immunosuppressed rats*. Ann Transplant, 2008. **13**(1): p. 20-31.
105. Specke, V., et al., *No in vivo infection of triple immunosuppressed non-human primates after inoculation with high titers of porcine endogenous retroviruses*. Xenotransplantation, 2009. **16**(1): p. 34-44.
106. Loss, M., et al., *A primate model for discordant pig to primate kidney xenotransplantation without hyperacute graft rejection*. J Invest Surg, 2001. **14**(1): p. 21-9.
107. Switzer, W.M., et al., *Lack of cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus infection to nonhuman primate recipients of porcine cells, tissues, or organs*. Transplantation, 2001. **71**(7): p. 959-65.
108. Martin, U., et al., *Absence of PERV specific humoral immune response in baboons after transplantation of porcine cells or organs*. Transpl Int, 2002. **15**(7): p. 361-8.
109. Martina, Y., et al., *Mice transgenic for a human porcine endogenous retrovirus receptor are susceptible to productive viral infection*. J Virol, 2006. **80**(7): p. 3135-46.
110. Fiebig, U., et al., *Neutralizing antibodies against conserved domains of p15E of porcine endogenous retroviruses: basis for a vaccine for xenotransplantation?* Virology, 2003. **307**(2): p. 406-13.
111. Chiang, C.Y., et al., *Functional epitopes on porcine endogenous retrovirus envelope protein interacting with neutralizing antibody combining sites*. Virology, 2007. **361**(2): p. 364-71.
112. Karlas, A., R. Kurth, and J. Denner, *Inhibition of porcine endogenous retroviruses by RNA interference: increasing the safety of xenotransplantation*. Virology, 2004. **325**(1): p. 18-23.

113. Dieckhoff, B., et al., *Inhibition of porcine endogenous retroviruses (PERVs) in primary porcine cells by RNA interference using lentiviral vectors*. Arch Virol, 2007. **152**(3): p. 629-34.
114. Dieckhoff, B., et al., *Knockdown of porcine endogenous retrovirus (PERV) expression by PERV-specific shRNA in transgenic pigs*. Xenotransplantation, 2008. **15**(1): p. 36-45.
115. Qari, S.H., et al., *Susceptibility of the porcine endogenous retrovirus to reverse transcriptase and protease inhibitors*. J Virol, 2001. **75**(2): p. 1048-53.
116. Stephan, O., et al., *Porcine endogenous retroviruses (PERVs): generation of specific antibodies, development of an immunoperoxidase assay (IPA) and inhibition by AZT*. Xenotransplantation, 2001. **8**(4): p. 310-6.
117. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
118. Duvigneau, J.C., et al., *Quantitative simultaneous multiplex real-time PCR for the detection of porcine cytokines*. J Immunol Methods, 2005. **306**(1-2): p. 16-27.
119. Buscher, K., et al., *Expression of the human endogenous retrovirus-K transmembrane envelope, Rec and Np9 proteins in melanomas and melanoma cell lines*. Melanoma Res, 2006. **16**(3): p. 223-34.
120. Fiebig, U., et al., *Transspecies transmission of the endogenous koala retrovirus*. J Virol, 2006. **80**(11): p. 5651-4.
121. Wakiyama, M., T. Matsumoto, and S. Yokoyama, *Drosophila U6 promoter-driven short hairpin RNAs effectively induce RNA interference in Schneider 2 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **331**(4): p. 1163-70.
122. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
123. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. 1977. Biotechnology, 1992. **24**: p. 104-8.
124. Wiznerowicz, M. and D. Trono, *Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference*. J Virol, 2003. **77**(16): p. 8957-61.
125. Holker, M., et al., *Duration of in vitro maturation of recipient oocytes affects blastocyst development of cloned porcine embryos*. Cloning Stem Cells, 2005. **7**(1): p. 35-44.
126. Onions, D., et al., *An approach to the control of disease transmission in pig-to-human xenotransplantation*. Xenotransplantation, 2000. **7**(2): p. 143-55.
127. Denner, J., *Immunosuppression by retroviruses: implications for xenotransplantation*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **862**: p. 75-86.
128. Stoye, J.P., et al., *Endogenous retroviruses: a potential problem for xenotransplantation?* Ann N Y Acad Sci, 1998. **862**: p. 67-74.
129. Weiss, R.A., *Xenografts and retroviruses*. Science, 1999. **285**(5431): p. 1221-2.

130. Onions, D.E. and C.J. Witt, *Xenotransplantation: an overview of microbiological risks and potentials for risk management*. Rev Sci Tech, 2000. **19**(1): p. 289-301.
131. Mang, R., et al., *Identification of a novel type C porcine endogenous retrovirus: evidence that copy number of endogenous retroviruses increases during host inbreeding*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 8): p. 1829-34.
132. Iizumi, S., et al., *Simple one-week method to construct gene-targeting vectors: application to production of human knockout cell lines*. Biotechniques, 2006. **41**(3): p. 311-6.
133. Harrison, S., et al., *An efficient method for producing alpha(1,3)-galactosyltransferase gene knockout pigs*. Cloning Stem Cells, 2004. **6**(4): p. 327-31.
134. Scobie, L., et al., *Characterization of germline porcine endogenous retroviruses from Large White pig*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 8): p. 2421-8.
135. Peracchi, A., *Prospects for antiviral ribozymes and deoxyribozymes*. Rev Med Virol, 2004. **14**(1): p. 47-64.
136. Scherer, L.J. and J.J. Rossi, *Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(12): p. 1457-65.
137. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 494-8.
138. Coburn, G.A. and B.R. Cullen, *Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference*. J Virol, 2002. **76**(18): p. 9225-31.
139. Jacque, J.M., K. Triques, and M. Stevenson, *Modulation of HIV-1 replication by RNA interference*. Nature, 2002. **418**(6896): p. 435-8.
140. Novina, C.D., et al., *siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection*. Nat Med, 2002. **8**(7): p. 681-6.
141. Banerjee, A., et al., *Inhibition of HIV-1 by lentiviral vector-transduced siRNAs in T lymphocytes differentiated in SCID-hu mice and CD34+ progenitor cell-derived macrophages*. Mol Ther, 2003. **8**(1): p. 62-71.
142. Barnor, J.S., et al., *Inhibition of HIV-1 replication by long-term treatment with a chimeric RNA containing shRNA and TAR decoy RNA*. Antiviral Res, 2009.
143. Radhakrishnan, S., et al., *Intracellular approach for blocking JC virus gene expression by using RNA interference during viral infection*. J Virol, 2004. **78**(13): p. 7264-9.
144. Radhakrishnan, S.K., T.J. Layden, and A.L. Gartel, *RNA interference as a new strategy against viral hepatitis*. Virology, 2004. **323**(2): p. 173-81.
145. Pan, Q., et al., *Prospects of RNAi and microRNA-based therapies for hepatitis C*. Expert Opin Biol Ther, 2009. **9**(6): p. 713-24.
146. Stram, Y. and L. Kuzntzova, *Inhibition of viruses by RNA interference*. Virus Genes, 2006. **32**(3): p. 299-306.

147. Rubinson, D.A., et al., *A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference*. Nat Genet, 2003. **33**(3): p. 401-6.
148. Chalk, A.M., C. Wahlestedt, and E.L. Sonnhammer, *Improved and automated prediction of effective siRNA*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **319**(1): p. 264-74.
149. Reynolds, A., et al., *Rational siRNA design for RNA interference*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(3): p. 326-30.
150. Schwarz, D.S., et al., *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. Cell, 2003. **115**(2): p. 199-208.
151. Khvorova, A., A. Reynolds, and S.D. Jayasena, *Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias*. Cell, 2003. **115**(2): p. 209-16.
152. Krol, J., et al., *Structural features of microRNA (miRNA) precursors and their relevance to miRNA biogenesis and small interfering RNA/short hairpin RNA design*. J Biol Chem, 2004. **279**(40): p. 42230-9.
153. Ui-Tei, K. and K. Saigo, *[Molecular mechanism of RNA interference and the selection of highly effective siRNA sequences]*. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 2004. **49**(17 Suppl): p. 2662-70.
154. Bassik, M.C., et al., *Rapid creation and quantitative monitoring of high coverage shRNA libraries*. Nat Methods, 2009.
155. Fedorov, Y., et al., *Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype*. RNA, 2006. **12**(7): p. 1188-96.
156. Aleman, L.M., J. Doench, and P.A. Sharp, *Comparison of siRNA-induced off-target RNA and protein effects*. RNA, 2007. **13**(3): p. 385-95.
157. Scacheri, P.C., et al., *Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 1892-7.
158. Persengiev, S.P., X. Zhu, and M.R. Green, *Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs)*. RNA, 2004. **10**(1): p. 12-8.
159. Nagao, A., et al., *Multiple shRNA expressions in a single plasmid vector improve RNAi against the XPA gene*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **370**(2): p. 301-5.
160. Song, J., et al., *Multiple shRNA expressing vector enhances efficiency of gene silencing*. BMB Rep, 2008. **41**(5): p. 358-62.
161. Yan, Y., et al., *Multiple shRNA-mediated knockdown of TACE reduces the malignancy of HeLa cells*. Cell Biol Int, 2009. **33**(2): p. 158-64.
162. McIntyre, G.J., et al., *An infinitely expandable cloning strategy plus repeat-proof PCR for working with multiple shRNA*. PLoS ONE, 2008. **3**(11): p. e3827.

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Reinhard Kurth und bei Herrn Dr. Joachim Denner für die Bereitstellung des interessanten Themas meiner Diplomarbeit sowie für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe P13 bedanken. Insbesondere möchte ich Herrn Dr. Denner für die exzellente Betreuung, die ständige Ansprechbarkeit und die Diskussionsbereitschaft danken.

Herrn Prof. Dr. Ralph Gräf danke ich für Bereitschaft, als Gutachter dieser Diplomarbeit zu fungieren.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Danny Jobst für die vielen Ratschläge, die hervorragende Betreuung, sowie für die anregenden Gespräche bedanken.

Debora Mihica danke ich für die Einarbeitung, die großartige Unterstützung und die gute Laune.

Für das gute Arbeitsklima und die Unterstützung möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe P13 des Robert Koch-Instituts danken.

Meinen Eltern danke ich für die Aufmunterungen und die ständige Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Potsdam, den 22. Juni 2009