

**Xenotransplantation und porcine endogene  
Retroviren (PERV): Evaluierung des Risikos und  
Prävention der Virusübertragung**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Britta Alexandra Dieckhoff

Berlin, Juli 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Kurth

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am \_\_\_\_\_

# INHALTSVERZEICHNIS

	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	vi
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	ix
	TABELLENVERZEICHNIS	xi
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Xenotransplantation	1
1.1.1	Allotransplantation	1
1.1.2	Alternativen zur Allotransplantation	2
1.1.3	Das Schwein als favorisierte Organquelle für die Xenotransplantation	3
1.1.4	Potentielle Übertragung von porzinen Mikroorganismen	5
1.2	Retroviren	6
1.2.1	Taxonomie der Retroviren	7
1.2.2	Virusgenom	8
1.2.3	Aufbau der Retroviren	9
1.2.4	Das pathogene Potential von Retroviren	10
1.2.5	Porzine endogene Retroviren (PERV)	11
1.2.6	Hüllproteine von PERV und KoRV	14
1.3	RNA-Interferenz	15
1.3.1	Mechanismus der RNA-Interferenz	15
1.3.2	RNA-Interferenz in Säugetieren	16
1.4	Impfstoffe	16
1.4.1	Das Koala Retrovirus (KoRV) als potentielles Modellsystem für Impfstoffversuche in Ratten	17
1.4.2	Impfstoff gegen das virale Hüllprotein am Beispiel von FeLV	17
1.5	Zielsetzung der Arbeit	18
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>20</b>
2.1	Bakterienstämme	20
2.2	Enzyme	20
2.3	Oligonukleotide	20
2.4	Plasmide	23
2.5	Plasmidkonstrukte	23
2.6	Antikörper	24
2.7	DNA- und Protein-Längenstandards	25
2.8	Eukaryontische Zellen	25
2.9	Versuchstiere	25
2.10	Hersteller	26
<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>27</b>
3.1	Mikrobiologische Methoden	27
3.1.1	Stammhaltung von Bakterien	27

3.1.2	Kultivierung von Bakterien	27
3.1.3	Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen	27
3.1.4	Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation durch Hitzeschock	27
3.2	Molekularbiologische Methoden	28
3.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA	28
3.2.2	Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen und Gewebe	28
3.2.3	Isolierung genomischer DNA aus Ohrbiopsien	28
3.2.4	Phenol/Chloroform-Extraktion	29
3.2.5	Ethanol-fällung von DNA-Lösungen	29
3.2.6	Isopropanolfällung von DNA-Lösungen	29
3.2.7	Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen und Gewebe	30
3.2.8	Isolierung von miRNAs (microRNA) aus eukaryontischen Zellen	30
3.2.9	Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen	30
3.2.10	cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase	31
3.2.11	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	31
3.2.12	<i>one-step</i> Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)	32
3.2.13	<i>real-time</i> PCR	33
3.2.14	SYBR GREEN <i>real-time</i> PCR	34
3.2.15	<i>one-step</i> RT (Reverse Transkriptase) <i>real-time</i> PCR	34
3.2.16	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	35
3.2.17	Ligation von DNA-Fragmenten mit der T4 DNA-Ligase	36
3.2.18	Agarosegelelektrophorese	36
3.2.19	Gelextraktion linearer DNA-Fragmente	36
3.2.20	DNA-Sequenzierung	36
3.2.21	Konstruktion und Markierung kleiner RNA-Sonden	37
3.2.22	Kalkulation der theoretischen spezifischen Aktivität der RNA-Sonde	38
3.2.23	Detektion von siRNAs	38
3.2.24	Präzipitation von DNA an Goldpartikel	38
3.3	Proteinchemische Arbeiten	39
3.3.1	Isolierung von Gesamtprotein aus eukaryontischen Zellen und Geweben	39
3.3.2	Bestimmung des Proteingehaltes	39
3.3.3	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	40
3.3.3.1	IPTG-induzierte Expression	40
3.3.3.2	Aufschluss der Bakterien	40
3.3.3.3	Affinitätschromatografische Aufreinigung rekombinanter Proteine	40
3.3.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	41
3.3.5	Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	41
3.3.6	Detektion von Glykoproteinen	42
3.3.7	Western-Blot-Analyse	42
3.3.8	Kolonie-Blot	43
3.3.9	ELISA ( <i>enzyme linked immuno sorbent assay</i> )	43
3.3.10	Nachweis der Aktivität Reverser Transkriptase (RT)	44
3.4	Zellbiologische Methoden	44

3.4.1	Kultivierung eukaryontischer Zellen	44
3.4.2	Kryokonservierung eukaryontischer Zellen	45
3.4.3	Bestimmung der Vitalität und der Zellzahl mit Trypanblau	45
3.4.4	Isolierung porziner PBMC (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)	46
3.4.5	Mitogen-Stimulation porziner PBMCs	46
3.4.6	Transfektion eukaryontischer Zellen mit Plasmid-DNA	46
3.4.7	Herstellung lentiviraler Partikel	47
3.4.8	Bestimmung des Titers lentiviraler Vektoren	48
3.4.9	Fluoreszenzmikroskopie	48
3.4.10	Durchflusszytometrie	49
3.4.11	Erzeugung transgener Schweine	50
3.5	Immunologische Methoden	50
3.5.1	Immunisierung mit rekombinanten Proteinen	50
3.5.2	DNA-Vakzinierung	50
3.5.2	Neutralisationstest	51
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>53</b>
4.1	Evaluierung des Risikos der PERV-Übertragung bei der Xenotransplantation	53
4.1.1	PERV-Provirusintegration in Schweinen verschiedener Rassen sowie transgenen und multitransgenen Schweinen	53
4.1.2	Etablierung eines <i>one-step</i> RT <i>real-time</i> PCR-assays zur relativen Quantifizierung von PERV-mRNA	54
4.1.3	PERV-Expression in Schweinen verschiedener Rassen sowie transgenen und multitransgenen Schweinen	55
4.1.4	PERV-Expression in unterschiedlichen Organen eines Tieres	58
4.1.5	Simulation einer Immunantwort porziner Zellen <i>in vitro</i>	59
4.1.6	Untersuchungen zur PERV-Übertragung nach Transplantation porziner Inselzellen auf Cynomolgus-Affen	61
4.1.7	PERV-Expression in Melanomen der Münchner Miniatur Schweine Troll	63
4.1.7.1	Morphologie sowie histologische und immunhistochemische Charakterisierung der Melanome	64
4.1.7.2	Melanom-Marker	65
4.1.7.3	PERV-Provirusintegration im Genom der MMS Troll	66
4.1.7.4	PERV-Expression in porzinen Melanomen	66
4.1.7.5	PERV-Expression in Lungenmetastasen-abgeleiteten Melanomzellen	68
4.1.7.6	PERV-Proteinexpression in primären Tumoren und Melanomzellkulturen	69
4.1.7.7	Freisetzung viraler Partikel aus Melanomzellen	70
4.2	Prävention der PERV-Übertragung bei der Xenotransplantation	72
4.2.1	Hemmung der PERV-Expression in primären porzinen Zellen mittels RNA-Interferenz und lentiviralen Vektoren	72
4.2.1.1	Lentivirale Expressionsvektoren	72
4.2.1.2	PERV-Provirusintegration und -Expression in porzinen Fibroblasten SE105, SE101 und PFF P1 F10	73

4.2.1.3	Transduktion porziner Fibroblasten und PK-15-Zellen mit lentiviralen Partikeln	74
4.2.1.4	pol2-shRNA-vermittelte Hemmung der PERV-Expression in primären porzinen Zellen sowie PK-15- Zellen	75
4.2.1.5	Hemmung der PERV-Expression auf Proteinebene	76
4.2.1.6	Reduzierte RT-Aktivität in den Überständen transduzierter Zellen	77
4.2.2	Generierung shRNA-transgener Schweine mittels Nukleus-Transfer	78
4.2.2.	Expression der pol2-shRNA <i>in vivo</i>	79
4.2.2.2	pol2-shRNA-vermittelte Hemmung der PERV-Expression <i>in vivo</i>	80
4.2.3	Induktion neutralisierender Antikörper gegen PERV- und KoRV-Hüllproteine	81
4.2.3.1	Immunisierung mit rekombinanten PERV-gp70-Proteinfragmenten	81
4.2.3.2	Immunisierung mit rekombinatem PERV- bzw. KoRV-rp52	85
4.2.3.3	DNA-Vakzinierung mit gp70 und gp85 von PERV und KoRV	95
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>98</b>
5.1	Evaluierung des PERV-Übertragungsrisikos bei der Xenotransplantation	99
5.1.1	PERV-C-Provirusintegration in Schweinen verschiedener Rassen sowie transgenen und multitransgenen Schweinen	99
5.1.2	Normalisierung und relative Quantifizierung von PERV-mRNA	101
5.1.3	Variable PERV-Expression in Schweinen verschiedener Rassen sowie transgenen und multitransgenen Schweinen	103
5.1.4	Variable PERV-Expression in unterschiedlichen Organen eines Tieres	104
5.1.5	Keine PERV-Freisetzung nach Simulation einer Immunantwort porziner Zellen <i>in vitro</i>	105
5.1.6	Keine PERV-Übertragung nach Transplantation porziner Inselzellen auf Cynomolgus-Affen	107
5.1.7	Erhöhte PERV-Expression in Melanomen der Münchner Miniatur Schweine Troll	108
5.2	Prävention der PERV-Übertragung bei der Xenotransplantation	111
5.2.1	RNA-Interferenz-vermittelte PERV-Expression in porzinen Zellen	111
5.2.2	Hemmung der PERV-Expression in shRNA-transgenen Schweinen	114
5.2.3	Induktion neutralisierender Antikörper gegen PERV und KoRV	116
5.2.3.1	Induktion bindender und neutralisierender Antikörper gegen PERV-gp70-Proteinfragmente	118
5.2.3.2	Induktion bindender und neutralisierender Antikörper gegen PERV- und KoRV-gp70 auf Basis des rekombinanten p52	121
5.2.3.3	DNA-Vakzinierung mit gp70 und gp85 von PERV und KoRV	123
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY</b>	<b>125</b>
6.1	Zusammenfassung	125
6.2	Summary	126

LITERATURVERZEICHNIS	I
ANHANG	a
VERWENDETE PLASMIDE	a
PUBLIKATIONEN	f
ABSTRACTS	f
LEBENSLAUF	g
DANKSAGUNG	h

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Die in dieser Arbeit verwendeten ein- und dreibuchstabigen Abkürzungen sowie alle physikalischen Größen entsprechen der Konvention der „International Union for Biochemistry (LIÉBECQ, 1978). Grundsätzlich werden die international üblichen chemischen Symbole und Abkürzungen der SI-Einheiten (Systeme International d'Unites) benutzt.

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Accnr.	<i>Accession number</i>
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
anti-	Antikörper gegen
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
BCA	<i>bicinchonic acid</i>
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaare (engl.: <i>base pairs</i> )
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i> )
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	circa
CBP	Calmodulin Bindeprotein
Ci	Curie (1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Zerfälle pro Sekunde)
cpm	Zerfälle pro Minute (engl.: <i>counts per minute</i> )
CT	<i>threshold cycle</i>
CTP	Cytosin-5´-triphosphat
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosin-5´-triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5´-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-5´-triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-5´-triphosphat
ds	doppelsträngig
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immuntest (engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	Fötales Rinderserum
FCS	fötale Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
xg	Erdbeschleunigungskonstante $9,8 \text{ m/s}^2$
G	Guanin
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GP	Glykoprotein
h	Stunde



HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HERV	Humanes endogenes Retrovirus
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
Lsg.	Lösung
LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	Molarität
ml	Milliliter
mA	Milliampere
MCS	multiple Klonierungsstelle (engl.: <i>multiple cloning site</i> )
min	Minute
mol	$6,3 \times 10^{23}$ Teilchen
mRNA	Boten-RNA (engl.: <i>messenger RNA</i> )
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NEAA	nicht essentielle Aminosäuren
ng	Nanogramm
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (engl.: <i>open reading frame</i> )
ori	Replikationsursprung (engl.: <i>origin of replication</i> )
p	pico
P	Protein
<sup>32</sup> p	Radioisotop 32 des Phosphors
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PHA	Phytohämagglutin
POD	Peroxidase
Pol	Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute (engl.: <i>rotation per minute</i> )
RT	Reverse Transkriptase oder Raumtemperatur
SA	Spleißakzeptor
SD	Spleißdonor
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodiumdodecylsulfat</i> )
sek	Sekunden
spez. Akt.	spezifische Aktivität
ssDNA	einzelsträngige DNA (engl.: <i>single stranded DNA</i> )
suppl.	supplementiert
SV40	Affenvirus 40 (engl.: <i>simian virus 40</i> )
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylendiamin
Tris	Trishydromethylaminomethan
tRNA	Transfer-RNA (engl.: <i>transfer RNA</i> )
U	Einheit (engl.: <i>unit</i> )
UE	Untereinheiten
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett

V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht (engl.: <i>weight</i> ) pro Volumen
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-indolyl-D-Galaktosid
μ	micro

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abb. 1.1	Genomorganisation der Retroviren	9
Abb. 1.2	Schematische Darstellung der Morphologie eines $\gamma$ -Retrovirus	10
Abb. 1.3	Schematische Darstellung des PERV-Hüllproteins	14
Abb. 4.1	Bestimmung der Effizienz der <i>one-step</i> RT <i>real-time</i> PCR	55
Abb. 4.2	Relative PERV-Expression in PBMCs unterschiedlicher Schweinerassen innerhalb eines Wurfes	56
Abb. 4.3	Relative PERV-Expression in unterschiedlichen Organen transgener Tiere	58
Abb. 4.4	Relative PERV-Expression in unterschiedlichen Organen Deutscher Landrasse Schweinen	59
Abb. 4.5	Serologische Analyse der untersuchten Cynomolgus-Affen hinsichtlich PERV-spezifischer Antikörper	63
Abb. 4.6	Melanome und Metastasen der MMS Troll	64
Abb. 4.7	Histologische und immunhistochemische Analyse eines kutanen Melanoms und einer Lymphknotenmetastase	65
Abb. 4.8	Expression porciner Tyrosinase in Melanomen, Lymphknoten mit Metastase und unverändertem Gewebe von vier verschiedenen MMS	65
Abb. 4.9	PERV-Provirusintegration und PERV-A/C-Rekombination	66
Abb. 4.10	PERV-Expression im Melanom des Tieres #372	67
Abb. 4.11	PERV-Expression in Melanomen und unveränderten Geweben von vier verschiedenen MMS Troll	67
Abb. 4.12	PERV-Expression in Melanomzellen unterschiedlicher Passagen	68
Abb. 4.13	Unveränderte LTR-Länge während der Passagierung der Lungenmetastasen-abgeleiteten Melanomzellkultur	68
Abb. 4.14	Nachweis der Expression des p15E-Proteins	69
Abb. 4.15	Detektion des viralen p15E-Proteins in Lungenmetastasen abgeleiteten Melanomzellen der 87. Passage	70
Abb. 4.16	PERV-Partikel-Freisetzung aus den Lungenmetastasen-abgeleiteten Melanomzellen	70
Abb. 4.17	Detektion von PERV-Partikeln in Lungenmetastasen abgeleiteten Melanomzellen der 93. Passage	71
Abb. 4.18	Schematische Darstellung der lentiviralen Vektoren RRL-pGK-GFP und pLVTHM	73
Abb. 4.19	PERV-Provirusintegration und -Expression in fötalen porcinen Fibroblasten und PK-15-Zellen	74
Abb. 4.20	pLVTHM-pol2-transduzierte und nicht-transduzierte porcine Fibroblasten	75
Abb. 4.21	Hemmung der PERV-Expression in porcinen fötalen Fibroblasten	76
Abb. 4.22	Hemmung der PERV-Expression in PK-15-Zellen	76
Abb. 4.23	Expression des viralen p27Gag in transduzierten PK-15-Zellen	77
Abb. 4.24	RT-Aktivität in den Überständen von PK-15-Zellen	78
Abb. 4.25	Nachweis der Transgen-Integration im Genom pol2- transgenen Ferkel 6 und 7	79
Abb. 4.26	Nachweis pol2-shRNA-Expression <i>in vivo</i> in unterschiedlichen Organen der pol2-shRNA-transgenen Ferkel 6 und 7	79
Abb. 4.27	Hemmung der PERV-Expression unterschiedlichen Organen der pol2-shRNA-transgenen Ferkel 6 und 7	80
Abb. 4.28	PERV-gp70-Detektion mit den Seren der mit gp70-Fragmenten immunisierten Ratten	82
Abb. 4.29	Neutralisierende Effekte der Immunsereen der Rattegruppen 142, 143, 149 und 150	83
Abb. 4.30	PERV-gp70-Detektion mit den Seren der mit den gp70-Fragmenten sowie rp52 immunisierten Ziegen	84
Abb. 4.31:	Neutralisierende Effekte des Serums der mit PERV-gp70-Proteinfragmenten immunisierten Ziege 52	85

Abb. 4.32:	Detektion der PERV-Proteine gp70 und p15E mit den Immunsereen der Rattengruppen 213, 214, 215 und der Ziege 62	89
Abb. 4.33:	Neutralisierende Effekte der Immunsereen der Rattengruppen 213 (p15E) und 214 (rp52)	90
Abb. 4.34:	Neutralisierende Effekte des Serums der mit PERV-rp52 immunisierten Ziege 62	91
Abb. 4.35:	Neutralisierende Effekte der Immunsereen der Rattengruppe 215 (rp52 & p15E)	91
Abb. 4.36:	Detektion der KoRV-Proteine Gp70 und p15E mit den Immunsereen der Rattengruppen 210 und Ziege 61	92
Abb. 4.37:	Neutralisierende Effekte der Immunsereen der Rattengruppen 210 (KoRV- rp52), 211 (KoRV-rp52 + p15E) und 212 (KoRV-p15E)	93
Abb. 4.38:	Neutralisierende Effekte des Serums der mit KoRV-rp52 immunisierten Ziege 61	94
Abb. 4.39:	Kreuzneutralisierende Effekte der Ziegensereen 52, 61 und 62	95
Abb. 5.1:	Phylogenetischer Stammbaum einiger Retroviren	117

## TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1.1	Charakteristische Vertreter der Retroviren	7
Tab. 2.1	Bakterienstämme	20
Tab. 2.2	Verwendete Enzyme	20
Tab. 2.3	Verwendete Oligonukleotide	21
Tab. 2.4	Verwendete Plasmide	23
Tab. 2.5	Generierte Plasmidkonstrukte	24
Tab. 2.6	Verwendete Antikörper und Antiseren	24
Tab. 2.7	Verwendete Längenstandards	25
Tab. 2.8	Verwendete Zelllinien und primäre Zellen	25
Tab. 2.9	Versuchstiere	26
Tab. 2.10	Hersteller	26
Tab. 3.1	Komponenten eines Standard-PCR-Ansatzes	31
Tab. 3.2	Komponenten eines <i>one-step</i> RT-PCR-Ansatzes	32
Tab. 3.3	Komponenten eines <i>real-time</i> PCR-Ansatzes	33
Tab. 3.4	Komponenten eines SYBR GREEN <i>real-time</i> PCR-Ansatzes	34
Tab. 3.5	Komponenten eines <i>one-step</i> RT <i>real-time</i> PCR-Ansatzes	34
Tab. 3.6	Komponenten und Temperaturbedingungen eines Sequenzierungsansatzes	37
Tab. 3.7	Konzipierung der pol2-shRNA-Sonde	37
Tab. 3.8	Komponenten eines Sammel- und Trenngels für die SDS-Acrylamidgelelektrophorese	41
Tab. 3.9	Supplemente der Medien DMEM und RPMI	45
Tab. 3.10	Plasmide für die Herstellung lentiviraler Partikel	48
Tab. 3.11	Appikationsschema für die Immunisierung von Ratten und Ziegen	50
Tab. 4.1	PERV-C-Status der getesteten Schweine verschiedener Rassen	53
Tab. 4.2	PERV-C-Status der getesteten transgenen Schweine	54
Tab. 4.3	Relative PERV-Expression in den PBMCs der getesteten Schweine	57
Tab. 4.4	Vergleich der relativen PERV-Expression PHA-stimulierter und nicht stimulierter PBMCs transgener Schweine	60
Tab. 4.5	Befunde der serologischen Analysen der transplantierten Cynomolgus-Affen	62
Tab. 4.6	Phänotypen der untersuchten MMS Troll hinsichtlich Melanom- und Metastasenausbildung	64
Tab. 4.7	Übersicht der mit PERV-gp70-Proteinfragmenten immunisierten Rattengruppen	82
Tab. 4.8	Ermittelte Spannen der Sequenzen für rp52 von PERV und KoRV	86
Tab. 4.9	Übersicht der mit PERV-rp52 und -p15E sowie KoRV-rp52 und -p15E immunisierten Rattengruppen und Ziegen	88
Tab. 4.10	Aminosäureaustausche in Folge von Punktmutationen in den gp70- und gp85-Sequenzen von PERV und KoRV	96
Tab. 4.11	Übersicht der DNA-Immunisierungen	97
Tab. 5.1	Vergleich der <i>house keeping</i> Gene HPRT, GAPDH und Cyclophilin	103

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Xenotransplantation

Die Allotransplantation, d.h. die Übertragung von Zellen und Organen zwischen genetisch verschiedenen Individuen derselben Spezies, ist eine in der Medizin weit verbreitete Methode. Laut Eurotransplant wurden im ersten Quartal des Jahres 2007 bereits 1032 Transplantationen durchgeführt; benötigt werden jedoch bislang weitere 11500 Organe, eine Zahl, die die heutigen Kapazitäten bei weitem übersteigt. Einen vielversprechenden Ansatz zur Überbrückung dieses Engpasses stellt die Xenotransplantation dar, die Übertragung von lebens- und funktionsfähigen Zellen und Organen zwischen verschiedenen Spezies.

### 1.1.1 Allotransplantation

Die Geschichte der Transplantation ist eng mit der Geschichte der Immunsuppressiva verbunden. 1933 wurde von dem ukrainischen Chirurgen Voronoy die erste Nierentransplantation von Mensch zu Mensch durchgeführt, die jedoch aufgrund der Gewebeunverträglichkeit scheiterte. In den folgenden Jahrzehnten wurden viele weitere erfolglose Versuche durchgeführt: Die erste erfolgreiche Transplantation einer Niere gelang 1954 dem Arzt Joseph Murray bei eineiigen Zwillingen. Mit Hilfe von Ganzkörperbestrahlungen der Transplantatempfänger und der damit verbundenen Schädigung des Knochenmarks gelang es, eine Unterdrückung des Abwehrsystems zu erzielen. Seit den frühen 60er Jahren wurden pharmakologische und biologische Verfahren der Immunsuppression entwickelt, welche die „Überlebensraten“ von transplantierten Organen dramatisch verbesserten. Die Zahl der Allotransplantationen wuchs dementsprechend zunehmend (DE VITO DABBS et al., 2000).

Heute stellt die Organtransplantation ein etabliertes Behandlungsverfahren in der Medizin dar. Allein in Deutschland sind etwa 50 Kliniken an der Transplantation von Organen beteiligt. Im Zeitraum von 1963 bis 2006 wurden in der Bundesrepublik Deutschland 79000 Allotransplantationen durchgeführt, überwiegend Nieren, aber auch Organe wie Leber, Herz, Pankreas und Lunge (Deutsche Stiftung Organtransplantation, 2006). Inzwischen ist die Zahl von Patienten, die auf ein Organ warten, derart angestiegen, dass der Bedarf weder durch Organspender noch durch Lebendspenden gedeckt werden kann. Trotz europaweiter Koordination und Verteilung geeigneter Transplantate versterben ca. 30% der Patienten auf der Warteliste, weil das benötigte Organ nicht verfügbar ist (Deutsche Stiftung Organtransplantation, 2006).

Die Bereitschaft zur Organspende innerhalb der Bevölkerung wird durch die öffentliche Diskussion über die Definition des Hirntodes, der in den meisten Ländern den Zeitpunkt der Organentnahme regelt, und die damit verbundene Angst vor einer verfrühten Explantation beschränkt (BOWMAN AND RICHARD, 2003). Obwohl die Bereitschaft zur Lebendspende bei Familienangehörigen wächst, besteht noch immer ein großer Mangel an Allotransplantaten, der die moderne Medizin auffordert, geeignete Alternativen zu finden.

### 1.1.2 Alternativen zur Allotransplantation

Mit Hilfe eines maschinellen „künstlichen Herzens“ ist es möglich, die Funktion des Herzens, also die Blutversorgung eines Organismus, kurzfristig zu überbrücken (LEDERMAN et al., 2002). Für Organe mit komplexen Stoffwechselwegen, wie beispielsweise die Leber, ist der Einsatz eines solchen artifiziellen Organs derzeit nicht realisierbar.

Des Weiteren bietet das sog. *tissue engineering* die Möglichkeit, morphologisch ähnliche Organe aus humanen Stammzellen zu züchten. Einfache Zellverbände können bereits heute produziert werden und auf diese Weise gewonnene Haut wurde z.B. bereits bei der Versorgung von großflächigen Brandwunden eingesetzt (BANNASCH et al., 2000). Um komplexere Organe wie Herz, Leber oder Niere zu reproduzieren, müssen jedoch erst alle nötigen zellulären Faktoren identifiziert werden, welche die Vorläuferzellen zur Differenzierung in die entsprechende Zelle mit der richtigen Morphologie und Funktion anregen.

Eine weitere vielversprechende Alternative zur Allotransplantation stellt die Xenotransplantation dar. Der erste dokumentierte Fall einer Xenotransplantation geht auf das Jahr 1905 zurück, in dem Princeteau einem an Urämie leidenden Mädchen Teile einer Kaninchenniere einsetzte. 1910 übertrug Unger die Niere eines Rhesusaffen auf eine Patientin. Es folgten 1923 und 1963 Nierentransplantationen von Schafen und Schimpansen. In allen Fällen wurde das Xenotransplantat in Folge einer hyperakuten Reaktion des menschlichen Immunsystems abgestoßen. Erst durch die Behandlung eines Rezipienten mit einer Kombination verschiedener Immunsuppressiva überlebte dieser nach der Transplantation einer Schimpansen-Niere neun Monate (REEMTSMA et al., 1964). Trotz erheblich verbesserten Immunsuppressiva und wachsendem Wissen über immunologische Abstoßungsreaktionen sind bis heute noch keine Xenotransplantationen mit zufriedenstellendem Erfolg gelungen. 1985 scheiterte die Transplantation eines Pavian-Herzens auf einen Säugling, der 21 Tage nach dem Eingriff an multiples Organversagen starb (BAILEY et al., 1985). Letzte Xenotransplantationen wurden 1992 mit der Übertragung eines Schweineherzens und 1994 mit der Verpflanzung einer Schweineleber durchgeführt (MAKOWKA et al., 1994). Jedoch starben jeweils beide Rezipienten innerhalb von 24 Stunden an den Folgen einer hyperakuten Abstoßung.

Bei der Xenotransplantation wird generell zwischen der Übertragung solider Organe und der von Zellen unterschieden. Die größten Fortschritte wurden hierbei mit der Transplantation von Zellen oder Zellverbänden erzielt. Bei Diabetes Typ I-Patienten ersetzen verkapselte, fötale, porcine Inselzellen die Insulinproduktion über einen Zeitraum von bis zu zwei Jahren (ELLIOT et al., 2000). Eine verminderte immunologische Reaktion wurde hierbei durch die Verkapselung der Inselzellen und die damit verbundene räumliche Trennung des Immunsystems des Rezipienten und des xenogenen Transplantats erreicht. Darüber hinaus kann mit dieser Technik auch das Risiko einer Übertragung von Mikroorganismen minimiert werden. Weiterhin konnte die Verwendung porciner Zellen des ventralen Mesencephalon zur Behandlung von Morbus Parkinson sowie der Huntigton'schen Krankheit über einen Zeitraum von über 12 Monaten zu einer deutlichen Verbesserung der klinischen Symptome der Patienten beitragen (FINK et al., 2000, SCHUMACHER et al., 2000). Ebenso wurden porcine Hepatozyten in bioartifiziellen Leberunterstützungssystemen (Bioreaktoren) zur Leberperfusion mit Erfolg für die

Überbrückung lebensbedrohlicher Situationen nach akutem Leberversagen eingesetzt (LEVY et al., 2000, SAUER et al., 2003).

### **1.1.3 Das Schwein als favorisierte Organquelle für die Xenotransplantation**

Als Spendertiere für die Xenotransplantation wurden aus phylogenetischer Sicht zunächst Primaten in Betracht gezogen. Insbesondere nicht-humane Primaten der Altwelt, wie Menschenaffen und Paviane, weisen in der Anatomie und Physiologie ihrer Organe sowie ihrer Blutgruppen eine hohe Kompatibilität auf. Von diesen Spendertieren wurde aus zahlreichen Gründen jedoch schnell wieder Abstand genommen: Haltung und Zucht dieser Tiere gestalten sich schwierig und sind zudem sehr kostspielig. Zudem kann durch die lange Tragzeit und geringe Nachkommenschaft keine ausreichende Anzahl an Spendertieren gewährleistet werden (FISHMAN, 1997). Ein weiterer Grund, der gegen die Verwendung von Primaten spricht, ist das aufgrund der phylogenetischen Nähe zwischen Menschen und Menschenaffen hohe Risiko der Übertragung von Mikroorganismen. So wurden bei ersten klinischen Transplantationen von Pavian-Lebern auf den Menschen Übertragungen des Simian Foamy Virus (SFV), des endogenen Retrovirus der Paviane (BaEV) und des Pavian Cytomegalievirus beobachtet (ALLAN et al., 1998; MICHAELS et al., 2001).

Momentan wird aus zahlreichen Gründen das Schwein (*Sus Scrofa*) als potentielles Spendertier favorisiert. Neben der anatomischen und der physiologischen Ähnlichkeit der Schweineorgane zu humanen Organen (HANNON et al., 1990; SACHS, 1994) erlauben züchterische Vorteile, wie die frühe Geschlechtsreife, kurze Tragzeit und hohe Reproduktionsrate, eine kostengünstige Produktion von Spendertieren. Des Weiteren besteht die Möglichkeit der *specific pathogen free* (spf)-Haltung, wodurch bekannte zoonotische sowie potentiell pathogene Erreger weitestgehend aus der Spendertierzucht eliminiert werden können. Bis die ersten porzinen Organe für die Xenotransplantation eingesetzt werden können, müssen jedoch noch zahlreiche Hürden überwunden werden. Dazu sind vor allem physiologische und immunologische Probleme, sowie das Risiko der Übertragung porziner endogener Retroviren (PERV), welche im Genom der Schweine integriert sind und durch SPF-Maßnahmen nicht entfernt werden können, zu zählen.

Von komplexen Organen wie der Leber werden zahlreiche Enzyme und Hormone produziert, deren Kompatibilität und Funktionalität im menschlichen Körper fraglich ist (SCHON et al., 1999). Das humane Parathormon ist beispielsweise nicht mit der porzinen Niere kompatibel, so dass es zu einer vermehrten Ausscheidung von Phosphor kommt, was zur Hypophosphatämie im Serum führt, die für den Menschen lebensbedrohlich werden kann. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass humane Wachstumsfaktoren porzine Zellen zur Proliferation anregten, was aufgrund eines fehlenden Antagonisten im Schweineorgan zu unbegrenztem Wachstum führte. Des Weiteren beträgt die Körperkerntemperatur im Schwein 39°C, während sie im Menschen bei 37°C liegt, und dies könnte, ebenso wie der unterschiedliche pH-Wert zu Funktionsstörungen in metabolischen Prozessen führen. Eine weitere Frage ist die der Anpassung der unterschiedlichen Alterungsgeschwindigkeit porziner und humaner Organe. Der physiologische Aspekt bleibt daher bis zur klinischen Realisierung von Xenotransplantationen solider Organe Gegenstand intensiver Forschung, worauf im Folgenden jedoch nicht näher eingegangen wird.



Bei der Xenotransplantation kommt es, wie bei der Alлотransplantation auch, zu einer Abwehrreaktion durch das Immunsystem des Rezipienten. Diese Abstoßung lässt sich bei Alлотransplantationen durch die Verwendung von Immunsuppressiva erfolgreich unterdrücken. Die Ursache dieser Reaktion auf allogene Transplantate ist eine zytotoxische T-Zellantwort auf fremde MHC (*major histocompatibility complex*)-Moleküle. Mit Ausnahme von eineiigen Zwillingen, die über einen identischen genetischen Hintergrund verfügen, sind diese Moleküle in den seltensten Fällen kompatibel.

Porzine Zellen weisen hinsichtlich ihrer Oberflächenmoleküle deutliche Unterschiede zu humanen Zellen auf, was im Vergleich zur Alлотransplantation zu einer gesteigerten Immunantwort führt, die sich mit den gegenwärtig verfügbaren Immunsuppressiva nicht kontrollieren lässt.

Dementsprechend gilt es bis zur Realisierung der klinischen Xenotransplantation vier unterschiedliche Reaktionen des Immunsystems zu umgehen: die hyperakute vaskuläre Abstoßung, die akut vaskuläre Abstoßung, die akute T-Zell vermittelte sowie die chronische Transplantatabstoßung.

Zum Schutz vor bakteriellen Infektionen verfügt das menschliche Immunsystem über präformierte Antikörper gegen Epitope der  $\alpha$ -1,3-Galactosyltransferase, welche auf der Oberfläche von Bakterien und Säugetierzellen vorkommen. Durch die Reaktion dieser Antikörper mit den entsprechenden Epitopen des porzinen Gefäßendothels nach einer Xenotransplantation wird das Komplement- und Gerinnungssystem aktiviert, was zum Gefäßverschluss und somit zum Absterben des Transplantats binnen weniger Minuten führen kann (hyperakute vaskuläre Abstoßung). Des Weiteren stimulieren artspezifische und Komplement-regulatorische Proteine des porzinen Transplantats wie CD59, DAF (*decay-accelerating factor*, CD55) und MCP (*membrane-cofactor protein*, CD46) zusätzlich eine unerwünschte Komplementaktivierung (ROSENGARD et al., 1995). Eine vielversprechende Möglichkeit, diese Art der Abstoßung zu überwinden, ist die bereits erfolgte Generierung von Schweinen, denen beide Kopien des  $\alpha$ -1,3-Galactosyltransferase-kodierenden Gens fehlen (DAI et al., 2002, LAI et al., 2002, PHELPS et al., 2003), sowie transgener Schweine, in denen die Gene für Komplement-regulatorischen Proteine (DAF, CD59, MCP) durch humane Varianten ersetzt wurden (SCHMOECKEL et al., 1997).

Die akut vaskuläre Abstoßung kann vier bis acht Tage nach der Xenotransplantation auftreten. Sie wird ebenfalls durch die Reaktion mit Kohlenhydrat-Epitopen der porzinen Zellen ausgelöst. Gefolgt von einer Komplement- und Endothelzell-Aktivierung kommt es zur Anlagerung und Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Monozyten und somit zur Zelllyse des porzinen Organs (COOPER, 1996). Dabei wurde häufig ein Titeranstieg von zirkulierenden porzinen IgMs beobachtet. Mit Hilfe spezifischer IgM-Depletionen (Immunapherese) sowie durch die Verwendung monoklonaler anti-IgM-Antikörper konnte jedoch im Tiermodell bereits eine akut vaskuläre Abstoßung verhindert werden (LEVENTHAL et al., 1994, SATO et al., 1999).

Innerhalb einiger Tage oder auch Wochen nach der Transplantation besteht zusätzlich die Gefahr einer akuten T-Zell-vermittelten Abstoßungsreaktion. Sie erfolgt über die Erkennung MHC-I-präsentierter Peptidantigene auf der Oberfläche fremden Gewebes durch T-Zellen des Immunsystems. Gefolgt von der klonalen Expansion spezifischer CD4-

positiver T-Helferzellen und CD8-positiver zytotoxischer T-Lymphozyten (CTLs) kommt es durch Induktion der Apoptose zum Absterben des Xenotranplantats. Gegen diese Art der Abstoßung konnten im Bereich der Allotransplantation bereits einige Immunsuppressiva erfolgreich eingesetzt werden (BROUARD et al., 1999, DORLING 2002).

Verursacht durch eine zunehmende Verengung der Blutgefäße des Transplantats kann es noch Monate oder Jahre nach der Transplantation zur chronischen Abstoßung kommen. Bei Allotransplantationen konnte nach einer Entzündung im Bereich des Transplantats eine irreversible Proliferation des Gewebes durch freigesetzte Wachstumsfaktoren beobachtet werden (SHEN et al., 1998). Die Blutgefäße verschließen sich und das Transplantat wird nekrotisch, was letztlich zum Organversagen führt. Eine Behandlung ist bislang meist nicht möglich.

#### **1.1.4 Potentielle Übertragung von porzinen Mikroorganismen**

Ein großes Problem der Xenotransplantation stellt das Risiko einer Übertragung von Mikroorganismen auf den Organempfänger dar. Bei einer Xenotransplantation werden natürliche Barrieren wie Haut und Schleimhaut umgangen und potentiell erregerehaltene Organe in direkten Kontakt mit Organen und Blutkreislauf des Empfängers gebracht. Da der Patient stark immunsupprimiert ist, können sich durch Bakterien, Viren oder Parasiten verursachte Infektionen leicht etablieren. Viele der heute bekannten Infektionskrankheiten sind aus Zoonosen hervorgegangen, wie z.B. das durch humane Immundefizienzviren (HIV) hervorgerufene AIDS (GRIMM et al., 2003) und das durch humanpathogene Coronaviren ausgelöste schwere akute Atemnotsyndrom (SARS, *severe acute respiratory syndrome*, WEINGARTL et al., 2004).

Die meisten nicht-viralen humanpathogenen Erreger des Schweins, wie *Mycobacterium avium*, *Trichinella spiralis*, *Toxoplasma gondii*, *Campylobacter coli*, *Listeria*, *Cryptosporidium parvum*, *Streptococcus suis*, *Leptospira interrogans*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* und *Brucella suis* (FISHMAN 1997, TUCKER et al., 2002) können durch SPF-Bedingungen aus dem Schwein eliminiert werden (SWINDLE, 1998). Eine größere Rolle hinsichtlich der Risikobewertung von Xenotransplantationen spielen jedoch Viren. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Viren des Schweins identifiziert, die ein potentiell humanpathogenes Potential aufweisen. Schweine stellen zum Beispiel Wirte der zu den Orthomyxoviren gehörenden Influenzaviren dar. Es konnte gezeigt werden, dass porcine Influenzaviren die Speziesbarrieren überwinden und auch Menschen infizieren können (WELLS et al., 1991). Vor allem bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem wie z.B. ältere Menschen, Kinder, AIDS-Patienten oder immunsupprimierte Patienten nach Transplantationen, können solche Infektionen letal verlaufen. Es wird vermutet, dass die Übertragung des Schweineinfluenzavirus Auslöser der Influenza-Pandemie von 1918, der sog. „Spanischen Grippe“ war, der über 20 Millionen Menschen zum Opfer fielen (TAUBENBERGER et al., 1997). Auf asiatischen Schweinefarmen kam es zu zahlreichen Todesfällen unter den Mitarbeitern, verursacht durch eine Infektion mit dem porcinen Nipah-Virus, das den Paramyxoviren zugeordnet wird. Dieses Virus führt zu fieberhaften Hirnhautentzündungen und systemischen Erkrankungen bei Menschen, Schweinen und anderen Säugetieren (CHUA et al., 2000, CHUA et al., 2003).

Potentiell übertragbare Viren, wie die kürzlich entdeckten Schweinehepatitisviren, die Herpesviren, das *vesicular stomatitis virus* (VSV), das *swine disease virus* (SDV), das

Schweinepapovirus (PPV), das Maul- und Klauenseuchevirus, das Tollwutvirus, das porcine Enzephalomyocarditisvirus sowie das Schweinepockenvirus können jedoch bei normaler Immunkompetenz oder prophylaktischer Impfung des Empfängers als eher ungefährlich eingestuft werden (BORIE et al., 1998, METTENLEITER, 1996, EHLERS et al., 1999, MENG et al., 1997). Des Weiteren können die genannten Viren durch intensive Zucht und Haltung der Schweine unter SPF-Bedingungen und strenge Kontrollen eliminiert werden (TUCKER et al., 2002). Die Entfernung der porcinen Circoviren (PCV) aus den Schweinebeständen dürfte sich schwieriger gestalten. Es existieren zwei Subtypen, PCV-1 und -2 (FENAUX et al., 2000, MANKERTZ et al., 1997), von denen PCV-2 mit dem *postweaning multisystemic wasting syndrome* (PMWS) in Verbindung gebracht wird, das bei Schweinen zu einer hohen Sterberate führt (SORDEN et al., 1999, MANKERTZ et al., 2000, ROVIRA et al., 2002), während PCV-1 nicht virulent ist. PCV-2 ist in allen Schweineherden auf der ganzen Welt vorhanden, kann persistierende Infektionen auslösen und vertikal über die Plazenta übertragen werden (ALLAN AND ELLIS, 2000, PAUL et al., 2003).

Weiterhin geht ein Risiko von unbekanntem Viren aus, die aufgrund fehlender pathogener Merkmale nur schwer zu identifizieren sind. Die Folgen einer Infektion mit bis dahin unbekanntem Viren werden am Beispiel des Ebola- und Marburgvirus (SMITH et al., 1967) sowie des SARS- und HI-Virus (GAO et al., 1999) verständlich.

Eine weiteres Risiko der Xenotransplantation besteht in der Übertragung der porcinen endogenen Retroviren (PERV), die im Genom aller Schweine integriert sind und sich deshalb durch Zucht und Haltung unter SPF-Bedingungen nicht eliminieren lassen (DENNER, 1998, MANG et al., 2001).

## 1.2 Retroviren

Als Ursache zahlreicher Krankheiten, die heute als Viruserkrankungen bekannt sind, wurden bis ins späte 19. Jahrhundert Gifte vermutet (Virus, lateinisch für „Gift“), da sich mit Hilfe der damals verfügbaren Methoden keine pathogenen Organismen wie Bakterien oder Protozoen nachweisen ließen. Im Jahr 1892 konnte von Dimitri Iwanowski gezeigt werden, dass die Mosaikkrankheit der Tabakpflanze durch ein ultrafiltrierbares Agens verursacht wird, das deutlich unter der Größe von Bakterien liegt (0,5 bis 5 µm). Der erste Nachweis eines tierpathogenen Virus, des Maul-und-Klauenseuche-Virus, wurde 1898 von Friedrich Loeffler und Paul Frosch erbracht. Mit verbesserten Methoden, wie z.B. Entwicklung bakteriendichter Ultrafilter, konnte im Laufe der Zeit die Existenz vieler Viren gezeigt werden. So gelang es Walter Reed im Jahre 1900, das erste humanpathogene Virus nachzuweisen, das Gelbfiebertvirus.

Retroviren wurden vor fast 100 Jahren zum ersten Mal beschrieben. 1908 konnten Wilhelm Ellermann und Oluf Bang zeigen, dass die Mäuseleukämie durch zellfreie Ultrafiltrate auf andere Mäuse übertragbar ist. Drei Jahre später gelang es Peyton Rous gesunde Hühner mit einem Ultrafiltrat aus Geflügelsarkomen zu infizieren und damit eben diese Tumorerkrankung zu induzieren. Einen weiteren Hinweis auf das pathogene Potential der Retroviren und ihre Assoziation zu Tumorerkrankungen wurde 1936 von John J. Bittner erbracht. Ihm gelang es, den Erreger zu isolieren, der zur Entstehung der malignen Milchdrüsenerkrankung der Maus führt. Dieses als Maus-Mammatumor-Virus

(MMTV) bezeichnete Retrovirus kann neben der konventionellen, horizontalen Übertragung auch über Zellen der Keimbahn vertikal an nachfolgende Generationen übertragen werden. Zu Beginn der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts wurden erstmals humanpathogene Vertreter der Retroviren beschrieben, wie das humane T-Zell-Leukämie-Virus (HTLV, POIESZ et al., 1980, KALYANARAMAN et al., 1982) und das humane Immundefizienzvirus (HIV, BARRE-SINOUSI et al., 1983).

Ein Charakteristikum, das allen Retroviren gemein ist und sich in der Namensgebung widerspiegelt, stellt das Enzym Reverse Transkriptase dar. Es versetzt Retroviren in die Lage, den konventionellen genetischen Informationsfluss von DNA über RNA zu Protein umzukehren. Durch die Reverse Transkriptase, die 1970 erstmals von Howard M. Temin, S. Mizutani sowie David Baltimore beschrieben wurde, wird das retrovirale einzelsträngige RNA-Genom in doppelsträngige DNA überführt.

### 1.2.1 Taxonomie der Retroviren

Die Familie der Retroviridae ist in sieben Genera unterteilt, die  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -Retroviren, sowie die Lentiviren und Spumaviren (Tab. 1.1). Diese Einteilung erfolgte nach genetischen und morphologischen Unterschieden der Viren sowie nach Besonderheiten während der Infektion und der durch sie verursachten Krankheiten (MODROW, 2003). Retrovirusinfektionen kommen hauptsächlich bei Wirbeltieren vor und können Krankheiten verschiedener Symptomatik induzieren, wie z.B. Tumorerkrankungen, Immundefizienzen und neurologische Defekte. Des Weiteren wird zwischen exogenen und endogenen Retroviren unterschieden.

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

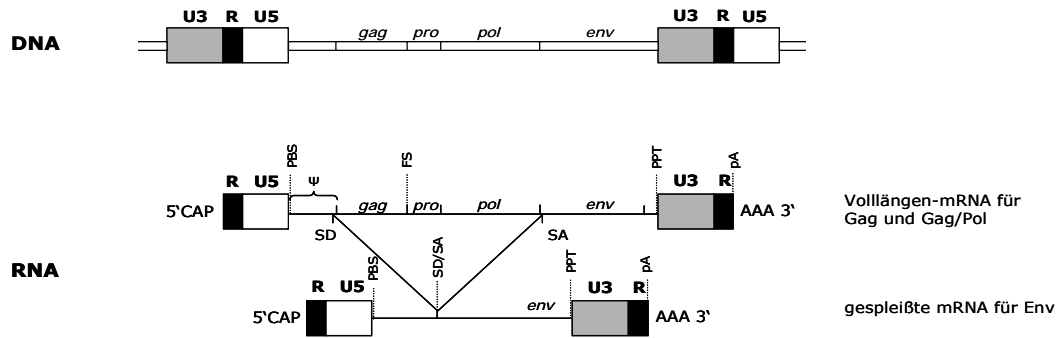
Genus	Mensch	Tier	Typ
$\alpha$ -Retrovirus		aviäre Leukoseviren (ALV)	exogen
		Rous-Sarkomvirus (RSV)	exogen
$\beta$ -Retrovirus		Maus-Mammatumor-Virus (MMTV)	endo/exogen
		Mason-Pfizer-Affen-Virus (MPMV)	exogen
	HERV-K-Familie		endogen
$\gamma$ -Retrovirus		porzines endogenes Retrovirus (PERV)	endogen
		felines Leukämievirus (FeLV)	exogen
		Gibbonleukämievirus (GALV)	exogen
	Erv-3		endogen
$\delta$ -Retrovirus	humane T-Zell- Leukmie-Viren (HTLV-1/HTLV-2)	Simian-Lymphotropic-Virus (STLV)	exogen
			exogen
$\epsilon$ -Retrovirus		diverse Fischretroviren	exogen
Lentivirus		Affenimmundefizienzvirus (SIV)	exogen
	humane Immundefizienzviren (HIV-1/HIV-2)	felines Immundefizienzvirus (FIV)	exogen
			exogen
Spumavirus		feline Spumaviren	exogen
		Affenspumaviren	exogen

Exogene Retroviren besitzen alle zur Expression der viralen Proteine und somit zur Freisetzung viraler Partikel notwendigen Elemente und können horizontal von Organismus zu Organismus übertragen werden. Manche exogene Retroviren enthalten

zusätzliche genetische Informationen mit tumorerzeugendem Potential, sog. Onkogene. Im Unterschied zu exogenen Retroviren sind endogene Retroviren in das Genom aller Zellen eines Organismus integriert und werden vertikal über die Keimbahn übertragen. Unter bestimmten Umständen können auch sie zur Bildung exogener, infektiöser Partikel angeregt werden. Überwiegend ist die genetische Information dieser Viren jedoch stark deletiert, so dass keine intakten Partikel mehr gebildet werden können. In den Genomen der meisten Säugetiere und Vögel wurden inzwischen hauptsächlich defekte endogene Retroviren nachgewiesen. Auch das menschliche Genom besteht zu einem Teil (1%) aus diesen Retrovirus-ähnlichen, beweglichen Elementen, den sog. Retrotransposons (KAZAZIAN, 2004).

### 1.2.2 Virusgenom

Das Genom der Retroviren besteht aus zwei einzelsträngigen RNA-Molekülen, welche aufgrund der 5'-Cap-Struktur und der 3'-Polyadenylierung die Charakteristika eukaryontischer mRNAs aufweisen. Je nach Genus und Vorhandensein akzessorischer Gene variiert die Genomgröße zwischen 7000 und 12000 Basen. Das RNA-Genom der porzinen endogenen Retroviren umfasst ca. 8100 Nukleotide (CZAUDERNA et al., 2000). Die Genome aller infektiösen Retroviren beinhalten die Gene *gag*, *pol* und *env*, welche für die „gruppenspezifische Antigene“ (Gag-Proteine: Matrixproteine, Kapsidproteine, Nukleokapsidproteine), die Enzyme (Reverse Transkriptase; Integrase, Protease) und die Hüllproteine kodieren. Diese Regionen werden am 5'- und 3'-Ende des Genoms von regulatorischen Kontrollsequenzen flankiert, die für die reverse Transkription und die Integration des viralen Genoms in die zelluläre DNA von großer Bedeutung sind (Abb.1.1) An die 5'-Cap-Struktur der viralen RNA schließt sich die R-Region (R: redundant) an, die in identischer Basenfolge und Orientierung auch am 3'-Ende des Genoms vorliegt. In direkter Nachbarschaft zur R-Region befindet sich eine bei  $\gamma$ -Retroviren etwa 75 Nukleotide lange, als U5 (U: *unique*) bezeichnete Basenfolge. Sie enthält Sequenzen, die bei der Integration des Provirus in das Zellgenom eine Rolle spielen. Im Anschluss an die U5-Region findet sich eine 18 Basen lange Primer-Bindungsstelle (PBS), die mit dem 3'-Ende einer zellulären tRNA komplexiert vorliegt und bei der viralen Replikation von Bedeutung ist. Bei PERV stellt diese tRNA eine tRNAGly, bei HIV eine tRNALys dar (BARTOSCH et al., 2002). Die Sequenzfolge zwischen der PBS und dem Beginn der *gag*-Gene wird als *leader*-Region bezeichnet. Sie beinhaltet eine Spleißdonorstelle für die Bildung aller gespleißten mRNA-Moleküle, wie z.B. die mRNA für das Env (siehe Abb. 1.1), aus dem bei PERV gp70 und p15E hervorgehen. Die Spleißakzeptorstelle liegt zwischen den für die viralen Proteine kodierenden Genen *pol* und *env*. Neben der PBS befindet sich eine kurze Sequenzfolge, die  $\psi$ -Stelle, mit deren Hilfe die RNA-Genome bei der Morphogenese an die Nukleokapsidproteinabschnitte der sich bildenden Viruspartikel binden. Im Anschluß an die viralen Gene (*gag*, *pol* und *env*) folgt ein Polypurintrakt (PPT), eine bei jedem Retrovirus unterschiedliche Folge von mindestens neun Adenosin- bzw. Guanisinresten, die für die Initiation der DNA-Doppelstrang-Synthese bei der Reversen Transkription von Bedeutung ist. An den PPT schließt sich die U3-Region an, die je nach Virustyp variiert. Die U3-Region stellt nach der Integration des viralen Genoms in das des Wirts einen wichtigen Faktor für die virale Expression dar, da sie *cis*-aktive Elemente enthält.

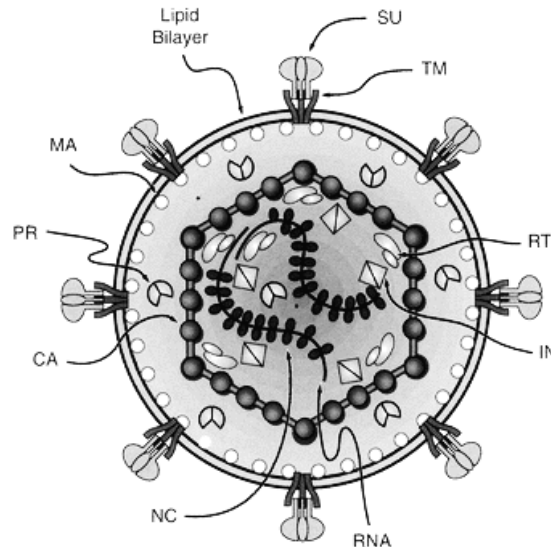


**Abbildung 1.1: Genomorganisation der Retroviren**

Oben: Provirale Struktur nach Integration in das zelluläre Genom. Unten: Transkribierte Vollängen-mRNA sowie die gespleißte *env*-mRNA. U3, R, U5: *long terminal repeat*, PBS: Primerbindungsstelle,  $\Psi$ -Verpackungselement, SD: Spleißdonor, SA: Spleißakzeptor, PPT: Polypurintrakt, FS: *frame shift* Stelle, pA: Polyadenylierungssignal (nach COFFIN, 1997)

### 1.2.3 Aufbau der Retroviren

Infektiöse retrovirale Partikel haben einen Durchmesser von ca. 100 nm. Das Kapsid ist von einer der Zytoplasmamembran der Wirtszelle abgeleiteten Hüllmembran umgeben (Abb. 1.2). Mit der Hüllmembran sind die viralen Hüllproteine TM („*transmembrane subunit*“) und SU („*surface subunit*“) assoziiert. Das TM-Protein ist über eine Region von bis zu 20 hydrophoben Aminosäuren in der Hüllmembran verankert, während das SU-Protein nicht-kovalent bzw. bei  $\gamma$ -Retroviren über Disulfidbrücken mit dem außerhalb der Membran gelegenen Teil des TM-Proteins verbunden ist. Auf dem Viruspartikel liegen beide Proteine jeweils als Trimere vor. Mit der Innenseite der Hüllmembran sind die Matrixproteine (MA) über aminoterminal angefügte Myristinsäurereste verbunden. Im Inneren des Viruspartikels liegt das Viruskapsid, das je nach Genus eine sphärisch-ikosaedrische oder eine konische Form aufweist. Es besteht aus Kapsidproteinen (CA), die wie die Matrixproteine Komponenten der gruppenspezifischen Antigene (Gag-Proteine) darstellen. Im Inneren des Kapsids befindet sich das Virusgenom: zwei identische, einzelsträngige RNA-Moleküle, die mit Nukleokapsidproteinen (NC), ebenfalls Komponenten der Gag-Proteine komplexiert sind. Weiterhin sind im Viruspartikel Enzyme vorhanden, die Reverse Transkriptase (RT), die Integrase (IN) und eine Protease (PR), welche bei der viralen Replikation sowie bei der Morphogenese eine bedeutende Rolle spielen. Zusätzlich zu den genannten Proteinen, die generell Bestandteile aller Retroviren darstellen, sind in komplexeren Retroviren, wie den Lentiviren und den  $\delta$ -Retroviren zusätzlich regulatorische Proteine vorhanden. Die porzinen endogenen Retroviren, die dem Genus der  $\gamma$ -Retroviren angehören, besitzen keine regulatorischen oder akzessorischen Proteine (CZAUERNA et al., 2000).



**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Morphologie eines  $\gamma$ -Retrovirus**

*lipid bilayer*: Lipiddoppelschicht, abgeleitet von der Wirtszelle, SU: *surface unit*, TM: Transmembranprotein, RT: reverse Transkriptase, IN: Integrase, NC: Nukleokapsid, CA: Kapsidproteine, PR: Protease, MA: Matrixproteine, (COFFIN, 1997)

#### 1.2.4 Das pathogene Potential von Retroviren

Retrovirus-induzierte Erkrankungen sind mit einer Vielzahl unterschiedlicher Symptome assoziiert, wobei Immundefizienzen, Tumorentstehung und neurologische Defekte die häufigsten Symptome darstellen. Die Ursachen dieser Krankheitsbilder sind vielschichtig und vom Genus der Viren abhängig.

Die Integration der Retroviren in die Chromosomen der Wirtszelle erfolgt unspezifisch an zufälligen Positionen. Tumore, die nach einer langen Latenzphase zwischen Infektion und Transformation entstehen, sind monoklonalen Ursprungs, d.h. aus einer einzigen transformierten Vorläuferzelle entstanden, und können sowohl durch Aktivierung als auch durch Inaktivierung entsprechender Gene induziert werden. So konnte gezeigt werden, dass die Transformation von Zellen in den meisten Fällen durch Insertion induziert wurde, wobei die durch retrovirale Integration transformierten Gene den natürlichen physiologischen Regulationsmechanismen der Zelle entzogen werden. So führt z.B. die Aktivierung von Protoonkogenen wie *c-myc* durch die LTR-Promotoraktivität benachbarter Retroviren zur Überexpression des Transkriptionsfaktors und schließlich zur Karzinogenese (KLEIN, 1988).

In zahlreichen Tumoren von Nagern, Katzen und Vögeln wurden neben retroviralen Elementen Sequenzen mit akut transformierendem Potential entdeckt (DUESBERG and VOGT, 1970), die als virale Onkogene bezeichnet werden. Sie kodieren für Genprodukte, die zu Veränderungen der Regulation des Zellzyklus führen und somit Tumorstadium induzieren können.

Bei retroviralen Infektionen, wie z.B. durch HIV werden häufig Immunsuppressionen beobachtet, deren Mechanismus noch nicht vollständig untersucht ist.

### 1.2.5 Porzine endogene Retroviren (PERV)

Porzine endogene Retroviren stellen einen integralen Bestandteil des Genoms aller Schweine dar. Erstmals beschrieben wurden diese Viren Anfang der 70er Jahre des vergangenen Jahrhunderts: Im Kulturüberstand der porzinen Nierenzelllinie PK-15 konnten elektronenmikroskopisch Virus-ähnliche Partikel identifiziert werden (BRESE, 1970). Auch in Kulturüberständen anderer porziner Zelllinien konnten virale Partikel beobachtet werden, die auf Grund ihrer Morphologie dem Genus der  $\gamma$ -Retroviren zugeordnet wurden (ARMSTRONG et al., 1971, WOODS et al., 1973, TODARO et al., 1974).

Die als Proviren bezeichneten im porzinen Genom vorliegenden PERV sind mit über 50 Kopien an verschiedenen Loci integriert (LE TISSIER et al., 1997, PATIENCE et al., 2001, ERICSSON et al., 2001), je nach Schweinerasse kann die Zahl der Integrationen zwischen 10 und 100 liegen (BOSCH et al., 2000, HERRING et al., 2001b). Zahlreiche dieser Proviren weisen jedoch Mutationen auf und können daher keine intakten infektiösen Viruspartikel bilden (PATIENCE et al., 2001, LEE et al., 2002). Die intakten, Partikel-bildenden Proviren werden in die Subtypen PERV-A, PERV-B und PERV-C eingeteilt (TAKEUCHI et al., 1998). PERV-A und -B, sind im Gegensatz zu PERV-C, im Genom aller Schweine vorhanden, (BOSCH et al., 2000, JIN et al., 2000). Die Expression von PERV-mRNA variiert in verschiedenen Geweben, wobei im Pankreas die geringste und in Nieren die höchste Expression an PERV-mRNA zu detektieren ist (AKIYOSHI et al., 1998, CLEMENCEAU et al., 1999). Des Weiteren bestehen zwischen verschiedenen Schweinestämmen erhebliche Unterschiede bezüglich der Freisetzung von PERV-Partikeln (TACKE et al., 2000b, TACKE et al., 2003).

Die Unterscheidung der Subtypen basiert auf Variationen in der Sequenz des *env*-Gens (LE TISSIER et al., 1997) und dem daraus resultierenden Wirtsspektrum. PERV-A und PERV-B sind polytrope Viren, die Zellen verschiedener Spezies (WILSON et al., 2000, SPECKE et al., 2001a, SPECKE et al., 2002a) einschließlich des Menschen (PATIENCE et al., 1997, WILSON et al., 1998, SPECKE et al., 2001b) und nicht-humaner Primaten (BLUSCH et al., 2000, SPECKE et al., 2002b) *in vitro* infizieren können. Zur Untersuchung des Wirtsspektrums der PERV wurden umfangreiche Studien durchgeführt, dabei zeigten eine Vielzahl humaner Zelllinien und primäre Zellen nach Infektion mit PERV *in vitro* Virusreplikation und -freisetzung (WILSON et al., 2000, SPECKE et al., 2001b, SPECKE et al., 2002b). Des Weiteren konnten *in vitro* Zellen von Nerz, Katze, Pavian und Rhesusaffe mit PERV infiziert werden (WILSON et al., 2000, SPECKE et al., 2001a, SPECKE et al., 2002a). Die Replikationsrate der Viren ist in den meisten dieser Zellen allerdings sehr gering. Für PERV-A konnten zwei humane Rezeptoren identifiziert und kloniert werden (*human PERV-A receptor*, huPAR-1 und -2), deren zelluläre Funktionen bislang jedoch noch unbekannt sind (ERICSSON et al., 2003). Bei PERV-C handelt es sich um ein ecotropes Virus, das nur porzine Zellen infizieren kann (TAKEUCHI et al., 1998), wie z.B. die porzine Zelllinie ST-IOWA (OLDMIXON et al., 2002).

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie der PERV-Subtypen besteht die Möglichkeit einer Rekombination zwischen humantropen und ecotropen Viren. So konnte gezeigt werden, dass aus Mitogen-stimulierten porzinen PBMCs, PERV-Partikel freigesetzt wurden, welche das Genom von PERV-C und die Rezeptorbindestelle von PERV-A aufweisen und somit humane Zellen infizieren können (WILSON et al., 1998, WILSON et al., 2000, WOOD et al.,



2004). Diese PERV-A/C-Rekombinante war in der Lage, an humane Zellen zu adaptieren. Dies ging mit einer gesteigerten Promotoraktivität durch sequentielle Multimerisierungen im replikationsregulierenden Bereich (Bindestelle des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B) der U3-Region der LTR und somit einer Erhöhung der Virusreplikation einher (DENNER et al., 2003a). Ähnliche Multimerisierungen bestimmter Sequenzmotive in den LTRs wurden bereits bei anderen  $\gamma$ -Retroviren, z.B. den Leukämieviren der Maus und der Katze beobachtet und korrelierten mit einer Zunahme der Pathogenität (WOLGAMOT AND MILLER, 1999). Kürzlich wurden in genomischer porciner DNA PERV-A/C rekombinante Proviren als Folge einer Autoinfektion nach exogener viraler Rekombination beschrieben (MARTIN et al., 2006).

Die porcinen endogenen Retroviren zeigen in ihrem natürlichem Wirt, dem Schwein, keine pathogene Symptomatik. Sie weisen jedoch hohe Homologien zu anderen bekannten  $\gamma$ -Retroviren auf, wie dem Leukämievirus der Gibbons (*gibbon ape leukemia virus*, GALV) (PATIENCE et al., 1997), dem endogenen Koala Retrovirus (KoRV) (HANGER et al., 2000), sowie zu feline und murinen  $\gamma$ -Retroviren (FeLV, MuLV), für die bereits beschrieben wurde, dass sie in ihrem Wirt Immundefizienzen hervorrufen und Tumore induzieren können (MIKKERS UND BERNS, 2003). Für das feline Leukämie Virus konnte gezeigt werden, dass die Tumorentwicklung von einem hohem Expressionsstatus, der Insertionsmutagenese sowie von Veränderungen in den viralen LTRs abhängt (ATHAS et al., 1995). Für die klinische Anwendung der Xenotransplantation ist dies von zentraler Bedeutung, da eine PERV-Transspeziesübertragung ebenfalls zu Immundefizienzen und aufgrund der Integration der Proviren in das zelluläre Genom zu einer erhöhten Tumorbildung führen könnte (LE TISSIER et al., 1997, PATIENCE et al., 1997, AKIYOSHI et al., 1998, DENNER et al., 1998). Kürzlich wurden PERV-Integrationsstellen im humanen Genom charakterisiert (MOALIC et al., 2006). Diese an HEK-293-Zellen durchgeführten Untersuchungen zeigten stark erhöhte Integrationshäufigkeiten an Transkriptionsstartpunkten und CpG-Inseln. Die Frequenzen der Integrationsereignisse stiegen mit den Expressionsniveau der Gene an. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das PERV-Integrationsprofil hohe Ähnlichkeiten zu dem des murinen Leukämie Virus aufweist, dessen Tumor-induzierendes Potential bekannt ist.

Zur Einschätzung des pathogenen Potentials der porcinen endogenen Retroviren wäre ein Tiermodell hilfreich. Auf diese Weise wäre es möglich, die Modulation der Immunantwort oder die Induktion eines Virus-assoziierten Krankheitsbildes zu untersuchen. Umfangreiche *in vivo*-Studien mit nicht-humanen Primaten und vielen Kleintieren konnten bislang keine produktive PERV-Übertragung zeigen (DENNER et al., 2003b, MARTIN et al., 2002, SPECKE et al., 2001a, SPECKE et al., 2002a, SPECKE et al., 2002b). Kürzlich wurde jedoch von einer transienten PERV-Übertragung auf fötale Lämmer nach Transplantation von porcinem Inselzellgewebe berichtet (POPP et al., 2007). Die publizierte PERV-Übertragung bei einer Transplantation porciner Inselzellen auf SCID-Mäuse (VAN DER LAAN et al., 2000, DENG et al., 2000) ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Bildung von Pseudotypen mit den murinen Leukämieviren (MLV) zurück zu führen, da Mäuse keinen PERV-A-Rezeptor besitzen (TAKEUCHI et al., 1998, ERICSSON et al., 2003). Kürzlich gelang die Generierung transgener Mäuse, die den PERV-A-Rezeptor-2 (HuPAR-2) auf ihren Zelloberflächen exprimieren (MARTINA et al., 2006). Nach Applikation

infektiöser PERV-Überstände konnte sowohl virale DNA als auch RNA detektiert werden, was auf eine produktive Infektion hinweist. Mit Hilfe dieser Mäuse wäre es möglich, das Risiko der PERV-Übertragung, deren pathogenes Potential sowie potentielle Therapeutika und präventive Maßnahmen zu untersuchen. Fiebig et al. zeigten eine *in vivo* Transspeziesübertragung des Koala Retrovirus (KoRV) auf Ratten, die zur Induktion eines Tumors führte (FIEBIG et al., 2006). Aufgrund großer Sequenzhomologien zwischen PERV und KoRV könnten Ratten somit ein geeignetes Tiermodell darstellen.

Die PERV-Übertragung auf den Menschen bei künftigen Xenotransplantationen kann nicht ausgeschlossen werden. Das Risiko steigt z.B. durch den Einsatz transgener Schweine, denen - zur verbesserten Akzeptanz des porzinen Organs im humanen Organismus - das  $\alpha$ -Gal-Epitop durch doppelten Gen-Knockout der  $\alpha$ 1,3-Galaktosyl-Transferase entfernt wurde (PHELPS et al., 2003). Dadurch wird zwar die Wahrscheinlichkeit einer Abstoßung des Transplantats (siehe 1.1.3) verringert, jedoch der Schutz der porzinen endogenen Retroviren vor der humanen Immunantwort erhöht: aufgrund der fehlenden Gal-Epitope in der von porzinen Zellen abgeleiteten Hüllmembran der porzinen endogenen Retroviren sind die sonst xenoreaktiven Antikörper gegen das Gal-Epitop wirkungslos.

Die Expression humaner, komplement-regulierender Proteine wie CD59, DAF und MCP (vgl. 1.1.3) auf der Oberfläche porziner Endothelzellen verringert die Aktivierung des humanen Komplementsystems und steigert somit die Akzeptanz des Xenotransplantats (MIYAGAWA et al., 1994, BYRNE et al., 1997). Es besteht jedoch die Gefahr, dass durch die Inkorporation dieser humanen Proteine in die Hüllmembran der porzinen endogenen Retroviren deren Inaktivierung durch das Komplementsystem stark eingeschränkt ist. Auf diese Weise würde ein wichtiger Bestandteil des menschlichen Immunsystems, der nachweislich in der Lage ist,  $\gamma$ -Retroviren zu inaktivieren, ausfallen (TAKEUCHI et al., 1996, FUJITA et al., 2003).

Zahlreiche Xenotransplantationen transgener porziner  $\alpha$ -Gal-negativer Organe oder Zellen wurden bereits auf Paviane durchgeführt. Pavianzellen besitzen, wie auch humane Zellen, keine  $\alpha$ -Gal-Epitope auf ihrer Oberfläche und lassen sich zudem *in vitro* infizieren (SPECKE et al., 2001a, ERICSSON et al., 2003). Bei ausreichend langer Überlebenszeit mit dem Xenotransplantat könnten Paviane daher die Möglichkeit bieten, eine eventuelle PERV-Infektion unter *in vivo*-Bedingungen zu untersuchen.

Für den klinischen Einsatz der Xenotransplantation spielt das Monitoring der Patienten nach der Transplantation eine entscheidende Rolle. Die bisher entwickelten Nachweismethoden basieren auf der indirekten immunologischen Detektion von Antikörpern gegen virale Epitope (STEPHAN et al., 2001, TACKE et al., 2001, FISCHER et al., 2003). Des Weiteren wurden hochsensitive molekularbiologische Methoden wie die quantitative *real-time* PCR für den direkten PERV-Nachweis etabliert (ARGAW et al., 2002, SHAH et al., 2003).

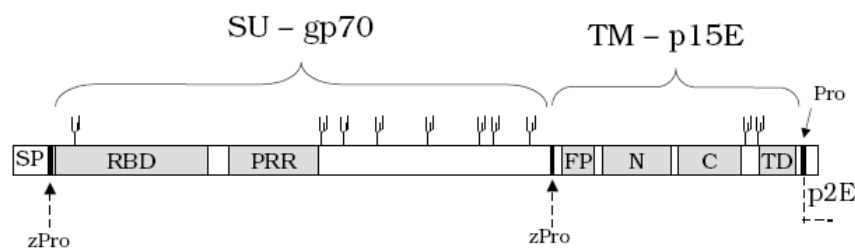
Sollte es trotz aller Sicherheitsvorkehrungen zu einer Übertragung der porzinen endogenen Retroviren auf den Menschen kommen, könnten die bei der HIV-Therapie eingesetzten Reverse-Transkriptase-Hemmer verwendet werden. So konnte gezeigt werden, dass das Nukleosidanalogon AZT in der Lage ist, die PERV-Replikation *in vitro* zu hemmen (QUARI et al., 2001, STEPHAN et al., 2001). Des Weiteren gelang die Induktion neutralisierender Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein von PERV (FIEBIG et

al., 2003, CHIANG et al., 2007), so dass eine Impfung gegen PERV möglich wäre. Weiterhin könnte der Einsatz der RNA-Interferenz einen Schutz bieten. So konnten Karlas et al. zeigen, dass sich die Virus-Expression in humanen PERV-infizierten Zellen um bis zu 90% reduzieren lässt (KARLAS et al., 2004).

### 1.2.6 Hüllproteine von PERV und KoRV

Die Hüllproteine werden durch das *env*-Gen kodiert und als gemeinsames Vorläuferprotein (gp85) am Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und glykosiliert. Im Golgi-Netzwerk wird das Vorläuferprotein von einer zellulären Furinprotease in gp70 und p15E gespalten und beide Proteine zur Zellmembran exportiert, wo es zur Virusmorphogenese und dem Abknospen der viralen Partikel kommt. Letztendlich wird der zytoplasmatische C-Terminus (p2E) des p15E von der viralen Protease abgespalten. Die Bezeichnungen der viralen Proteine mit den entsprechenden Größenangaben erfolgten nach der Analyse des Molekulargewichtes mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese (TACKE et al., 2001).

Bei zahlreichen Retroviren wurden für die Hüllproteine trimere Strukturen beschrieben (EINFELD AND HUNTER, 1988, YANG et al., 1990, ZHU et al., 2003), was auch für PERV und KoRV angenommen wird (Abb. 1.2). Das gp70-Protein kann in drei Bereiche unterteilt werden: die Rezeptor-Binde-Domäne (RBD), die prolinreiche Region (PRR) und einen konservierten Bereich (Abb. 1.3). In der RBD befindet sich N-terminal ein bei allen  $\gamma$ -Retroviren hochkonserviertes PHQ-Motiv, welches mit weiteren Bereichen der RBD die Rezeptorbindung vermittelt (LAVILLETTE AND KABAT, 2004, WATANABE et al., 2005). Für PERV-A und -C konnten zudem innerhalb der RBD zwei variable Bereiche identifiziert werden (LE TISSIER et al., 1997).



**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des PERV-Hüllproteins**

Die Zuckerbäume simulieren die potentiellen Glykosylierungsstellen. SU: *surface unit*, TM: Transmembranprotein, zPro: Spaltstelle für die zelluläre Protease, Pro: Spaltstelle für die virale Protease, SP: Signalpeptid für die Kotranslokation in das ER, RBD: Rezeptorbindedomäne, PRR: Prolinreiche Region, FP: Fusionspeptid, N: N-terminale Helixregion, C: C-terminale Helixregion, TD: Transmembrandomäne, p2E: kurzes Oligonukleotid, das während der Prozessierung des Hüllproteins abgespalten wird.

Das p15E-Protein besitzt ein N-terminales, stark hydrophobes Fusionspeptid, das sich nach der Adsorption des Viruspartikels an die Wirtszelle in deren Zellmembran einlagert, um den Fusionsvorgang zu vermitteln. Dem schließen sich zwei helikale Bereiche an, die für die spätere Ausbildung des 6-Helixbündels erforderlich sind. Zwischen den beiden

Helices wurde zudem eine immunsupprimierende Domäne beschrieben (DENNER, 1998). An die N-helikale Region knüpft die Transmembrandomäne an.

Die Env-Proteine beider Retroviren besitzen N-Glykosilierungsstellen: PERV besitzt acht potentielle Glykosilierungsstellen im Bereich des Gp70 und eine im p15E; KoRV besitzt nur fünf Glykosilierungsstellen im gp70 (alle C-terminal), jedoch zwei im p15E. Für PERV wird vermutet, dass auch O-Glykosilierungen vorhanden sind (WATANABE et al., 2005). Die Glykosilierung des Hüllproteins hat zwei nachgewiesene Auswirkungen: Sie ist notwendig für die korrekte Faltung des gp85, da es sonst zum Rückhalt im ER kommt (LI et al., 1993, BATTINI et al., 1994), des Weiteren maskieren die Oligosaccharide das Hüllprotein gegenüber Angriffen des Immunsystems des Wirts (CHACKERIAN et al., 1997).

### 1.3 RNA-Interferenz

Eine vielversprechende Strategie zur Minimierung des Risikos der PERV-Übertragung bei der Xenotransplantation ist die Hemmung der PERV-Expression in den entsprechenden Organen mit Hilfe der RNA-Interferenz (RNAi). Darunter wird ein post-transkriptionelles Blockieren von Genen, basierend auf einer durch kurze doppelsträngige RNA-Moleküle induzierten Sequenz-spezifischen Degradierung von mRNA verstanden. Dieses Phänomen, das vermutlich einen der ältesten Abwehrmechanismen gegen virale Infektionen darstellt, wurde als erstes im Nematoden *Caenorhabditis elegans* beschrieben (FIRE et al., 1998) ist jedoch, wie spätere Arbeiten zeigten, hoch konserviert in Pflanzen, Fliegen, Würmern und Säugetieren (CAPLEN et al., 2001). Während der Replikation von RNA-Viren entstehen vorübergehend doppelsträngige RNA-Moleküle, welche in kleine 21-23 Basenpaare lange Fragmente prozessiert werden, und somit Sequenz-spezifisch an die virale mRNA binden um zu deren Abbau zu führen.

#### 1.3.1 Mechanismus der RNA-Interferenz

Der Mechanismus der RNA-Interferenz wurde in den letzten Jahren mit Hilfe genetischer und biochemischer Studien an *C. elegans* und Zell-Extrakten aus *Drosophila melanogaster* in vielen Punkten aufgeklärt:

RNAi beruht auf einem mehrere Schritte umfassenden intrazellulären Prozess, der in zwei Phasen unterteilt werden kann: In der Initiationsphase werden doppelsträngige RNA-Moleküle endogenen (z.B. miRNA) oder exogenen Ursprungs durch die ATP-abhängige Spaltungsaktivität eines Enzyms vom Ribonuklease III-Typ (*Dicer*) in kleine 19 bis 23 Basenpaare (bp) umfassende siRNAs (*small interfering RNAs*) prozessiert (HAMMOND et al., 2001, MATZKE et al., 2001, SHARP et al., 2001, HUTVAGNER AND ZAMORE, 2002), die am 3'-Ende 2 bis 3 Nukleotide Überhang besitzen (Zamore et al., 2000, Elbashir et al., 2001a, ELBASHIR et al., 2001b, ELBASHIR et al., 2001c). Während der Effektorphase erfolgt die Zusammenlagerung dieser siRNAs mit dem *RNA induced silencing complex* (RISC) und die Spaltung der Ziel-mRNA. Nach der Assoziation der siRNA mit dem RISC kommt es durch die Helikase-Aktivität des RISC unter ATP-Verbrauch zur Entwindung der doppelsträngigen siRNA. Einer der siRNA-Einzelstränge hybridisiert sequenzspezifisch an die Ziel-mRNA die daraufhin durch die Nuklease-Aktivität des RISC degradiert und von zellulären Nukleasen abgebaut wird, wodurch die Translation des Proteins verhindert wird

(BILLY et al., 2001, YANG et al., 2000a). Der RISC kann wiederum neue siRNAs binden und entfaltet somit eine katalytische Aktivität.

Die Methode der RNA-Interferenz ist inzwischen ein wichtiges Hilfsmittel zur Aufklärung der Funktion von Genen geworden.

### 1.3.2 RNA-Interferenz in Säugetieren

Entgegen der hemmenden Wirkung in Pflanzen-, Invertebraten- und Insektenzellen, induziert doppelsträngige RNA einer Länge von 38 bis 1662 bp in Säugetierzellen eine Interferonreaktion, in Folge derer es zur unspezifischen Hemmung aller Genprodukte kommt (UI-TEI et al., 2000, PADDISON et al., 2002). Der Einsatz solcher RNAs zur Identifizierung von Genfunktionen oder als RNA-basiertes Therapeutikum ist daher ungeeignet. Eine solche Interferonreaktion ist schon seit langem bekannt (HUNTER et al., 1975) und dient, wie die RNAi auch, der Abwehr von Viren und anderen beweglichen genetischen Elementen (MARCUS, 1983). Um diese zu umgehen, werden zu Zwecken der Genfunktionsanalyse in Säugetierzellen siRNAs verwendet.

Diese synthetischen 10 bis 23 bp langen dsRNA-Moleküle entsprechen den Produkten der Dicer-Reaktion und sind in der Lage, die Expression eines Gens Sequenz-spezifisch zu hemmen (ELBASHIR et al., 2001b). Aufgrund ihres geringen Molekulargewichts lassen sich siRNAs in der Zellkultur mit hoher Effizienz transfizieren. Ihre Wirkung ist jedoch zeitlich begrenzt, da sie durch die Zellteilung ausverdünnung und durch RNasen abgebaut werden können.

Um eine über einen längeren Zeitpunkt stabile Hemmung der Genexpression durch RNAi zu erreichen, werden sog. short hairpin RNAs (shRNAs) eingesetzt. Bei diesen shRNAs liegen *sense*- und *antisense*-Strang durch eine Haarnadelstruktur miteinander verbunden unter der Kontrolle eines Polymerase III-Promotors vor (BRUMMELKAMP et al., 2002). Die transkribierten RNA-Moleküle besitzen eine den siRNAs ähnliche Sekundärstruktur, die den Einbau in den RISC ermöglicht. Polymerase III-Promotoren, wie der Promotor der Phosphoglyceratkinase oder der Promotor der RNase P RNA H1 (HANNON et al., 1991), werden zur Expression der shRNAs verwendet, da sie die Transkription einstellen, sobald sie auf eine Folge von vier bis fünf Thyminen treffen (MYSLINSKI et al., 2001).

## 1.4 Impfstoffe

Einen weiteren Ansatz zur Minimierung des Risikos der PERV-Übertragung bei der Xenotransplantation stellt die Entwicklung eines Impfstoffes dar.

Dem Körper stehen verschiedene Schutzmechanismen zur Bekämpfung von Infektionen zur Verfügung. Neben der ersten Barriere, die von Haut und Schleimhäuten gebildet wird, stellt die angeborene Immunität einen unspezifischen Abwehrmechanismus dar, der über Neutrophile, das Komplementsystem, Cytokine und bakterizide Proteine vermittelt wird. Die adaptive Immunantwort wird erst durch den Erreger selbst induziert. T-Helfer-Zellen binden Antigene des Erregers und regen B-Zellen zur Produktion von Antikörpern an, oder aktivieren cytotoxische T-Zellen (CTL), welche infizierte Zellen erkennen und anschließend lysieren. Die adaptive Immunantwort schützt gleichzeitig auch vor Infektionen mit demselben Erreger zu einem späteren Zeitpunkt.

Durch einen Impfstoff wird die adaptive Immunantwort aktiviert, um einen Langzeitschutz gegen einen Erreger zu induzieren. Dabei beeinflusst die Art des Impfstoffes und dessen Applikation die hervorgerufene Immunantwort erheblich. Daher werden im Allgemeinen verschiedene Ansätze verfolgt:

Die klassische Immunisierung mit inaktivierten Viren, oder rekombinant hergestellten viralen Proteinen, induziert eine humorale Immunantwort, die vor einer Infektion schützen kann. Eine weitere Immunisierungsmöglichkeit bieten DNA-Impfstoffe. Dabei wird die entsprechende DNA-Sequenz in einem Vektorsystem appliziert (FYNNAN et al., 1995) und im Zellkern, jedoch distinkt vom Genom, abgelesen und exprimiert. Mit der DNA-Vakzinierung konnten bisher gute zelluläre und humorale Immunantworten erzielt werden.

#### **1.4.1 Das Koala Retrovirus (KoRV) als potentielles Modellsystem für Impfstoffversuche in Ratten**

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden zum ersten Mal Koalas (*Phascolarctos cinereus*) beschrieben, die eine hohe Anfälligkeit für schlecht therapierbare Infektionskrankheiten aufwiesen. Diese Symptomatik wurde als LLIS-Syndrom bezeichnet (*leukaemia, lymphoma and immune suppression*, MCKEE et al., 2005)). Hanger et al. gelang es 2000 in Überständen Mitogen-stimulierter Koala PBMCs Koala Retrovirus (KoRV) zu detektieren und zu beschreiben (HANGER et al., 2000). Sequenzvergleiche zeigten derart hohe Homologien zu dem exogenen Gibbon-Affen-Leukämie Virus (GaLV), dass eine erst kürzlich (in den letzten 200 Jahren) erfolgte Transspeziesübertragung angenommen wird. Da Gibbon-Affen und Koalas geographisch nicht in Kontakt stehen, werden als mögliche Überträger Nagetiere vermutet. Ein Indiz hierfür sind diverse GaLV-verwandte Sequenzen, die in verschiedenen asiatischen Maus- und Rattenarten detektiert werden konnten (MARTIN et al., 1999b).

KoRV wurde in einem Großteil der Koalas Australiens nachgewiesen (40% der Koala-Population im Süden und bis zu 100% im Norden). Das LLIS-Syndrom kann zu Neoplasien in Lymphgewebe, Leukämie, Osteochondromen und anderen Tumoren, sowie zu einer aplastische Anämie, Myelodysplasie und einer Dysfunktion des Immunsystems führen. Das Syndrom ist häufig mit einer Chlamydieninfektion assoziiert, die zu Sterilität führen kann. 71% der Todesfälle in Gefangenschaft lebender Koalas und 15% der Todesfälle freilebender Tiere werden auf LLIS zurück geführt (MCKEE et al., 2005). Bisher konnte noch kein Impfstoff gegen KoRV entwickelt werden.

Kürzlich wurde eine *in vivo*-Transspeziesübertragung von KoRV auf Wistar-Ratten beschrieben, die eine humorale Immunantwort auslöste und zur Induktion eines Tumors führte (FIEBIG et al., 2006). Wistar-Ratten stellen somit ein mögliches Tiermodell für KoRV-Infektionsversuche sowie zur Erprobung diverser Impfstoffansätze gegen KoRV dar.

#### **1.4.2 Impfstoff gegen das virale Hüllprotein am Beispiel von FeLV**

In der Veterinärmedizin spielt das feline Katzen Leukämievirus (FeLV) eine bedeutende Rolle, da eine Infektion von Hauskatzen mit FeLV oft letale Folgen hat. Es kommt zur Degeneration des hematopoetischen Systems (Anämie), Immundefizienz (AIDS) und zu Lympho- und Fibrosarkomen. In seltenen Fällen kann es auch eine Leukämie auslösen.

FelV-A ist ein exogen vorkommendes Virus, es gibt jedoch auch endogen vorkommende FelV Sequenzen, aus denen sich verschiedene infektiöse Rekombinanten, wie z.B. das FelV-B (STEWART et al., 1986) ableiten. Für FelV-A konnte erstmals ein gegen ein Retrovirus gerichteter, Impfstoff entwickelt werden (MARCIANI et al., 1991, Leucogen, Virbac AG, Schweiz), der den Ausbruch der Leukose bei Katzen verhindert, jedoch keine sterile Immunität vermittelt (HOFMANN-LEHMAN et al., 2006).

FelV bietet als Impfstoffmodell einen erfolversprechenden Ansatz: Das phylogenetisch mit PERV und KoRV verwandte FelV ist bisher das einzige Retrovirus gegen das kommerzielle Impfstoffe erhältlich sind. Insgesamt stehen sieben Impfstoffe zur Verfügung: drei basieren auf inaktivierten Viruspartikeln, zwei auf viralen gp70 Untereinheiten und zwei sind rekombinant hergestellte Vakzine (SPARKES et al., 1997). Das rekombinant hergestellte Leucogen (Leucogen, Virbac AG, Schweiz) weist eine hohe protektive Wirkung auf (JARRETT AND GANIÈRE, 1996). Dieser Impfstoff basiert auf dem in *Escherichia coli* hergestellten unglykosilierten FelV-p45 und einem zusätzlichen kurzen N-terminalen Teil des p15E (MARCIANI et al., 1991), der das Fusionspeptid beinhaltet und mit dem kürzlich identifizierten Epitop E1 (LANGHAMMER et al., 2005) endet.

Ein vergleichbares Epitop konnte auch für PERV identifiziert werden (FIEBIG et al., 2003). Des Weiteren konnten neutralisierende Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein (TM) von FelV induziert werden. In einem anschließenden Infektionsversuch wiesen drei von sechs Katzen einen Schutz von bisher zwei Jahren auf (LANGHAMMER et al., 2006b).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Xenotransplantation porziner Zellen, Gewebe und Organe eröffnet eine Möglichkeit, den weltweit herrschenden Mangel an geeigneten allogenen Transplantaten zu überbrücken. Neben der Lösung immunologischer und physiologischer Probleme hinsichtlich Akzeptanz und Funktionalität des Xenotransplantats im Rezipienten, ist dessen mikrobiologische Sicherheit eine Grundvoraussetzung. So muss das Risiko einer Übertragung porziner endogener Retroviren auf ein Minimum reduziert werden.

Diese sog. PERVs sind integrierter Bestandteil des porzinen Genoms und in der Lage humane Zellen *in vitro* zu infizieren. Diese zu den  $\gamma$ -Retroviren gehörenden Viren können nicht durch Haltung der Schweine unter *specific pathogen free* (spf)-Bedingungen eliminiert werden und auch die Entfernung der Viren durch *knock-out*-Verfahren wird als äußerst schwierig angesehen, da PERVS mit mehr als 50 Kopien an verschiedenen Loci des porzinen Genoms integriert sind.

Obwohl weder in Infektionsstudien noch in ersten experimentellen Xenotransplantationen eine PERV-Übertragung beobachtet wurde, besteht weiterhin das Risiko eines möglichen Infektionspotentials *in vivo*. In diesem Zusammenhang ist zu bedenken, dass die gemachten Fortschritte in der Behebung der immunologischen Transplantatabstoßung, wie eine verbesserte Immunsuppression oder die gentechnische Veränderung der Spendertiere hinsichtlich humaner Oberflächenmoleküle, andererseits das Risiko einer Übertragung von Mikroorganismen wie den endogenen Viren auf den humanen Rezipienten deutlich steigern könnten, da dadurch deren Schutz vor einer humanen Immunantwort erhöht wird.

Vor diesem Hintergrund war das Ziel der vorliegenden Arbeit einen Beitrag zu der Evaluierung der Virussicherheit sowie zur Prävention der Virusübertragung bei der Xenotransplantation zu leisten.

Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die PERV-Subtypen PERV-A und -C miteinander rekombinieren können und diese Rekombination mit einer Adaptation der Viren an humane Zellen sowie einer gesteigerten Virusreplikation einherging. Daher bestand ein Ansatz zur Risikominimierung in der Identifizierung geeigneter Schweine, die kein PERV-C in ihrem Genom tragen, um so einer solchen Rekombination vorzubeugen. Des Weiteren sollten zur Evaluierung einer möglichen Selektion von Schweinen mit geringer PERV-Expression und -freisetzung unterschiedliche Schweinerassen und -kreuzungen sowie transgene Schweine, die humane Oberflächenmoleküle tragen, hinsichtlich Unterschieden in PERV-Expression und -freisetzung untersucht werden.

Darüber hinaus konnte für murine und feline  $\gamma$ -Retroviren bereits eine Partizipation an der Entstehung von Tumoren beschrieben werden. Bei humanen Melanomen wurden erhöhte Expressionsniveaus humaner endogene Retroviren (HERV-K) beobachtet. Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Untersuchung der PERV-Expression in porzinen Melanomen, um ein eventuelles karzinogenes Potential dieser Viren hinsichtlich einer Tumorinduktion zu evaluieren.

In Anbetracht der besonderen Situation bei einer Xenotransplantation, der Exposition porziner Organe im immunsupprimierten Organismus über mehrere Jahre, ist das Risiko einer PERV-Übertragung auf den Rezipienten nicht auszuschließen. Daher war ein Hauptziel dieser Arbeit, die Entwicklung von Strategien zur Prävention der PERV-Übertragung. Hierbei sollten basierend auf dem Mechanismus der RNA-Interferenz transgene Schweine mit stark verminderter PERV-Expression erzeugt werden, die zu mikrobiologisch sicheren Xenotransplantaten beitragen könnten.

Weiterhin sollte im Rahmen dieser Arbeit die Entwicklung von Impfstoffstrategien zur Prävention der PERV-Übertragung angestrebt werden. Ein solcher Impfstoff könnte nach Klärung eventueller negativer Auswirkungen auf die Akzeptanz des Transplantats zur Impfung der Rezipienten eingesetzt werden.



## 2 MATERIAL

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

### 2.1 Bakterienstämme

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

Tabelle 2.1: Bakterienstämme

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

### 2.2 Enzyme

Tabelle 2.2 : Verwendete Enzyme

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

### 2.3 Oligonukleotide

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

Tabelle 2.3: Verwendete Oligonukleotide

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

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

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

## 2.4 Plasmide

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

Tabelle 2.4: Verwendete Plasmide

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

## 2.5 Plasmidkonstrukte

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

Tabelle 2.5 : Generierte Plasmidkonstrukte

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

## 2.6 Antikörper

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

Tabelle 2.6: Verwendete Antikörper und Antisera

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

## 2.7 DNA- und Protein-Längenstandards

Tabelle 2.7: Verwendete Längenstandards

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

## 2.8 Eukaryontische Zellen

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

Tabelle 2.8: Verwendete Zelllinien und primäre Zellen

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

## 2.9 Versuchstiere

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

Tabelle 2.9 Versuchstiere

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

## 2.10 Hersteller

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

Tabelle 2.10 Hersteller

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

## 3 METHODEN

### 3.1 Mikrobiologische Methoden

#### 3.1.1 Stammhaltung von Bakterien

Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die verwendeten *Escherichia coli* (*E.coli*)-Stämme (Tab. 2.1) als Glycerinkulturen (1:2) bei -20°C gelagert. Häufiger benötigte Bakterienstämme, konnten auf LB-Vollmediumplatten (1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, 1,5% (w/v) Agar Agar, ggf. Ampicillin 100 µg/ml Endkonzentration), umwickelt mit PARAFILM (American National Can), mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden.

#### 3.1.2 Kultivierung von Bakterien

Die *E.coli*-Kulturen wurden unter ausreichender Belüftung bei 37°C in LB-Vollmedium (1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl) angezogen. Bestand eine Plasmid-vermittelte Ampizillinresistenz, so wurden die Medien mit Ampizillin (Serva) in einer Endkonzentration von 100 µg/µl supplimentiert. Die Inkubation erfolgte jeweils unter Schütteln bei 220 rpm (INNOVA 4330, New Brunswick Scientific). Beimpft wurden die Medien durch Übertragung von Einzelkolonien von Nährbodenplatten oder von Aliquots entsprechender Vorkulturen. Für eine Vorkultur wurden 5 ml LB-Ampizillin-Medium mit einer Bakterienkolonie oder 4 µl einer Glycerindauerkultur angeimpft und bei 37°C über Nacht schüttelnd inkubiert.

#### 3.1.3 Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen

Die Zelldichte der Bakterienkulturen wurde durch Messen der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm im Photometer (BIOPHOTOMETER, Eppendorf) bestimmt. Zuvor wurden die Kulturen bis zu einer maximalen Zelldichte entsprechend einer von OD<sub>600</sub> von 1 mit Flüssigmedium verdünnt.

#### 3.1.4 Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation durch Hitzeschock

Die Transformation von Plasmid-DNA sowie ligierter Plasmid-DNA nach Klonierungen wurde nach der Hitzeschock-Methode durchgeführt (HANAHAH, 1983). Hierfür mussten die *E.coli*-Stämme Top10 F' (Stratagene) und BL21 CodonPlus(DE3)-RP (Stratagene) durch eine spezielle Behandlung in einen kompetenten Zustand versetzt werden, der ihnen die effektive Aufnahme von DNA ermöglichte. Dazu wurde nach einem Protokoll zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien von Qiagen verfahren (QIAexpressionist, 5. Auflage, 2003, S.39).

Als Transformation wird das Einbringen von Plasmid-DNA in elektro- oder chemokompetente Bakterien und Hefen bezeichnet (COHEN et al., 1972). Für eine Transformation der *E.coli*-Stämme Top10 F' und BL21 CodonPlus(DE3)-RP wurde pro Ansatz ein 100 µl Aliquot chemisch kompetenter Bakterien langsam auf Eis aufgetaut. Die Menge der zu transformierenden DNA variierte bei Plasmid-DNA zwischen 10 pg und 1 ng



und bei Ligationen zwischen 5 µl und 20 µl des entsprechenden Ligationsansatzes. Die Zellen wurden mit der zu transformierenden DNA versetzt und anschließend für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dem nachfolgenden Hitzeschock von 90 Sekunden bei 42°C folgte eine zweiminütige Inkubation der Zellen auf Eis. Im Anschluss wurden die Zellen mit 500 µl LB-Medium ohne Antibiotikum versetzt und 45 bis 60 Minuten bei 37°C geschüttelt, so dass die über das eingebrachte Plasmid vermittelte Resistenz ausgebildet werden konnte. Anschließend wurden die Bakterien bei 2000 x g für 2 Minuten pelletiert (CENTRIFUGE 5415D, Eppendorf), in 100 µl Medium resuspendiert, auf LB-Nährboden-Platten mit Selektionsantibiotikum ausplattiert und etwa 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

## **3.2 Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA**

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe der kommerziellen Kits QIAPREP SPIN MINIPREP KIT (Qiagen) und INVISORB PLASMID MAXI KIT (Invitex) nach Angaben des Herstellers. Diese Aufreinigungen basieren auf dem Prinzip der alkalischen Lyse und der Bindung der Plasmid-DNA an eine Silica-Matrix, so isolierte DNA weist eine sehr hohe Reinheit auf.

Für Anwendungen, wie die Transfektion eukaryontischer Zellen wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des ENDOFREE PLASMID MAXI KIT (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert, um eine reine und nahezu Endotoxin-freie DNA zu erhalten und somit höhere Transfektionseffizienzen zu erzielen. Die DNA wurde jeweils mit Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **3.2.2 Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen und Gewebe**

Zur Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen wurde das DNEASY BLOOD & TISSUE KIT (Qiagen) verwendet. Ca.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden bei 1000 x g für 10 Minuten pelletiert (CENTRIFUGE 5415D, Eppendorf) und in 200 µl PBS-Puffer (140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) resuspendiert. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten nach Angaben des Herstellers.

Sollten aus einer Probe sowohl RNA, DNA und Protein isoliert werden, erfolgte die Aufreinigung mittels TRI REAGENT (Sigma-Aldrich). Zur Aufreinigung von DNA wurde der aus der RNA-Aufreinigung verbleibende Rest TRI REAGENT (3.2.7) verwendet. Die DNA wurde nach den Angaben des Herstellers mittels Ethanol (Roth) gefällt und aufgereinigt. Im Anschluss wurde die DNA-Menge über die Messung der optischen Dichte quantifiziert (3.2.9) und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Diese Methode wurde auch zur Isolierung von DNA aus Gewebeproben verwendet.

### **3.2.3 Isolierung genomischer DNA aus Ohrbiopsien**

Ohrbiopsien stellen eine Möglichkeit dar, einem Schwein schnell und ohne größeren operativen Eingriff Gewebe zur DNA-Isolierung zu entnehmen. Da diese Ohrbiopsien zu einem großen Teil aus Knorpel bestehen, eignet sich die unter 3.2.2 beschriebene DNA-Isolierungsmethode nicht.

Dementsprechend wurde auf eine Salz-Chloroform-Extraktion (modifiziert nach MÜLLENBACH et al., 1989) zurückgegriffen: ca. 60 mg Gewebe wurden mit 500 µl HOM-Puffer (160 mM Saccharose, 80 mM, EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8,0), (Roth) und 20 µl einer Proteinase K-Lösung (20 mg/ml, Invitrogen) versetzt und für 12 bis 18 Stunden bei 60°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 200 µl einer 4,5 M Natriumchloridlösung und 700 µl Chloroform/Isoamylalkohol. Nach kräftiger Durchmischung wurde die Lösung zur Phasentrennung für 10 Minuten bei 10000 x g und 4°C zentrifugiert (CENTRIFUGE 5804R, Eppendorf). Es entstanden vier Phasen: die oberste wässrige Phase, welche die DNA enthielt, gefolgt von einer NaCl-, einer Gewebe- und einer Chloroformphase. Die wässrige DNA-haltige Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zum Ausfällen der DNA mit 700 µl Isopropanol (Roth) versetzt. Nach einer Zentrifugation (10000 x g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand entfernt und das DNA-Pellet durch die Zugabe von 200 µl 70% (v/v) Ethanol (Roth) und einer weiteren Zentrifugation (s.o.) gewaschen. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt, die DNA anschließend getrocknet und in 70 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### **3.2.4 Phenol/Chloroform-Extraktion**

Die Phenol/Chloroform-Extraktion stellt eine einfache Methode zur DNA-Aufreinigung dar, bei der hauptsächlich zelluläre Proteine und Protein-komplexierte genomische DNA von Plasmid-DNA abgetrennt werden.

Die DNA-haltige Lösung wurde mit gleichem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, Sigma-Aldrich) versetzt, wobei kleine Volumina zunächst auf mindestens 100 µl mit Wasser aufgefüllt wurden. Nach intensivem Mischen wurde durch Zentrifugation (16000 x g, 2 min, RT, CENTRIFUGE 5415D, Eppendorf) wieder eine Phasentrennung erreicht. Die obere DNA-haltige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und einer Ethanol-fällung (3.2.5) unterzogen.

#### **3.2.5 Ethanol-fällung von DNA-Lösungen**

DNA-haltige Lösungen wurden zur Einkonzentrierung der DNA sowie zum Wechsel von Inkubationspuffern mit Ethanol gefällt. Hierfür wurde die DNA-haltige Lösung mit 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2; Roth) und 2,5 Volumen absolutem Ethanol (Roth) versetzt. Nach einer Inkubation für 20 Minuten bei -20°C wurde die DNA 20 Minuten bei 16000 x g und 4°C pelletiert (CENTRIFUGE 5415D, Eppendorf). Zum Entfernen des Na-Acetats wurde das DNA-Pellet anschließend mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet. Die Resuspendierung des Pellets erfolgte je nach DNA-Menge in 20 bis 200µl Wasser oder TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8,0).

#### **3.2.6 Isopropanol-fällung von DNA-Lösungen**

DNA kann auch mit Isopropanol aus wässrigen Lösungen gefällt werden. Bei dieser Methode werden vergleichsweise weniger Salze präzipitiert als bei der Ethanol-fällung. Durch die Zugabe des 0,7-fachen Volumens Isopropanol (Roth) und des 0,1-fachen Volumens 3 M Na-Acetat (pH 5,2) wurde die Plasmid-DNA für 10 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Die Pelletierung erfolgte durch zehnminütige Zentrifugation (16000 x g, 4°C, CENTRIFUGE 5415D, Eppendorf). Anschließend wurde das Präzipitat mit

70 % (v/v) Ethanol gewaschen und für 5 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde nach dem Trocknen in Wasser oder TE-Puffer (siehe 3.2.5) aufgenommen.

### **3.2.7 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen und Gewebe**

Die RNA-Isolierung erfolgte anhand einer kombinierten Methode mit Hilfe von TRI REAGENT (Sigma-Aldrich) und des RNEASY MINI KITS (Qiagen). Für den Zellaufschluss wurden  $1,5 \times 10^6$  Zellen mit eiskaltem 1x PBS-Puffer gewaschen, sedimentiert (1000 x g, 10 min, 4°C, Centrifuge 5415D, Eppendorf) und in 1 ml TRI REAGENT resuspendiert. Nach fünfzehnminütiger Inkubation bei RT wurden 200 µl Chloroform (Merck) hinzugegeben und mindestens 15 Sekunden gemischt. Nach erneuter Inkubation (15 min, RT) wurde das Zelllysate zur Phasentrennung zentrifugiert (12000 x g, 15 min, 4°C), die obere RNA-haltige Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Ein entsprechendes Volumen 70%-igen Ethanols (v/v in DEPC-Wasser) wurde hinzugegeben, vermischt und auf eine Säule des RNEASY MINI KITS geladen. Die Aufreinigung mit Hilfe dieses Kits basiert auf einer Silica-Gelmembran-Reinigung. Durch Zentrifugation (10000 x g, 1 min) konnte die RNA an die Matrix binden und wurde anschließend durch Zugabe des Puffer RW1 (Qiagen) gewaschen. Um eine eventuelle Kontamination der RNA mit DNA zu vermeiden, wurde diese durch direkte Zugabe von 30 Einheiten DNase (gelöst in 80 µl RDD-Puffer, Qiagen) auf die Säulenmembran für 15 Minuten bei RT verdaut. Es folgten Waschrritte nach Angaben des Herstellers. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Verwendung von TRI REAGENT ermöglicht die Isolierung von RNA, DNA und Protein aus einer Probe. Die Interphase und die untere organische Phase enthalten DNA bzw. Protein. (Aufreinigung siehe 3.2.2, 3.3.1).

Des Weiteren ist mit Hilfe von TRI REAGENT auch die Isolierung von RNA, DNA und Protein aus Gewebeproben möglich. Die Gewebeproben wurden zunächst in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill (Roth) zerkleinert und anschließend im Homogenisatorgefäß mit passendem Kolben (Wheaton) in TRI REAGENT homogenisiert. Die Proben können in TRI Reagent bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden. Die weitere Aufreinigung erfolgte auch bei Gewebeproben wie bereits beschrieben mit Hilfe des RNEASY MINI KITS (Qiagen).

### **3.2.8 Isolierung von miRNAs (microRNA) aus eukaryontischen Zellen**

Die Isolierung von miRNAs (kleiner als 200 Nukleotide) und siRNAs (15 bis 30 Nukleotide) aus eukaryontischen Zellen und Gewebeproben erfolgte mit Hilfe des MIRVANA™ miRNA ISOLATION KITS (Ambion). Diese Methode kombiniert die organische Extraktion mit einer Festphasen-Extraktion. Nach der Zugabe von Ethanol können in Abhängigkeit des Ethanolgehaltes Gesamt-RNA bzw. miRNAs an Glasfaserfiltern immobilisiert und anschließend eluiert werden. Die Aufreinigungen erfolgten entsprechend den Angaben des Herstellers.

### **3.2.9 Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen**

Die Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen erfolgte mit Hilfe der UV-Spektrophotometrie mit dem BIOPHOTOMETER (Eppendorf) oder dem NANO DROP SPECTROPHOTOMETER (Peqlab). Im Falle der NanoDrop-Messung wurde 1 µl der zu

messenden Proben direkt gemessen. Für die Messung im BIOPHOTOMETER wurden meist fünfundzwanzigfache Verdünnungen in einem Endvolumen von 50 bis 100 µl hergestellt und diese photometrisch in einer Eppendorf UVETTE (Eppendorf) gegen Wasser gemessen.

### 3.2.10 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase

Mit Hilfe des retroviralen Enzyms Reverse Transkriptase kann aus RNA die komplementäre cDNA hergestellt werden. Diese spezifische, RNA-abhängige DNA-Polymerase benötigt zur Synthese wie andere Polymerasen auch ein Oligonukleotid, welches an die RNA bindet und den Ort der beginnenden Reaktion kennzeichnet. Für eine unspezifische Synthese der gesamten cDNA empfiehlt sich die Verwendung von oligo-dT oder *random hexamer* Primern. Oligo-dT *primer* bestehen aus 10 bis 15 Thyminbasen, welche komplementär zum Poly-A-Schwanz der eukaryontischen mRNA sind. *Random hexamer primer* bestehen aus sechs zufällig zusammengesetzten Basen, die an zufälligen Positionen der zellulären RNA binden. Es können aber auch Gen-spezifische *primer* eingesetzt werden. Die cDNA-Synthese aus zellulärer Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des REVERTAID™ H MINUS FIRST STRAND CDNA SYNTHESIS KIT (Fermentas) unter Verwendung von *random hexamer* Primern nach Angaben des Herstellers.

### 3.2.11 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR (SAIKI et al., 1985) ermöglicht *in vitro* eine exponentielle Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mit Hilfe zweier flankierender hybridisierender Oligonukleotide und einer thermostabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase, CHIEN et al., 1976).

Mit Hilfe der PCR ist es möglich, genomische DNA hinsichtlich einer Provirusintegration (z.B. des porzinen endogenen Retrovirus) zu untersuchen. Um eine Klonierung spezifischer DNA-Sequenzen in Expressionsvektoren zu erleichtern kann die PCR auch dazu verwendet werden, lineare DNA-Fragmente mit Restriktionsschnittstellen zu versehen. In diesem Fall wurde für die Amplifikation die PFU-POLYMERASE (Fermentas) verwendet, die sich aufgrund ihrer 3'-5'-Exonukleaseaktivität durch eine geringe Mutationsrate auszeichnet.

Die PCR erfolgte mit Hilfe des MASTERCYCLER EP GRADIENT S (Eppendorf) in PCR-Reaktionsgefäßen (PCR Soft Strips, Biozym) mit einem Reaktionsvolumen von 20 bis 25 µl. Die Reaktionsbedingungen (modifiziert nach SAIKI et al., 1985) wurden wie folgt gewählt (Tab. 3.1):

**Tabelle 3.1: Komponenten eines Standard-PCR-Ansatzes**

Komponente	Volumen [µl]
<i>template</i> DNA (100 ng/µl)	1,0
10x PCR-Puffer (inkl. 15 mM MgCl <sub>2</sub> , Applied Biosystems)	2,0
dNTPs (10 mM each, Fermentas)	0,5
<i>sense primer</i> (10 pmol/µl)	0,5
<i>antisense primer</i> (10 pmol/µl)	0,5
AMPLITAQ GOLD (5 U/µl, Applied Biosystems)	0,2
H <sub>2</sub> O, Nuklease-frei	15,3
	20,0

Die verwendeten Temperatur-Programme variierten entsprechend der Primerkombination. Die *annealing* Temperatur ( $T_M$ ) ist von der Länge und dem prozentualen GC-Gehalt der Primer abhängig und wurde 3°C unter dem errechneten Wert gewählt. Wiesen die Primer unterschiedliche  $T_M$ -Werte auf, wurde vom niedrigeren ausgegangen. Berechnet wurde der  $T_M$ -Wert wie folgt, wobei  $n$  die Länge des Primers darstellt (CHESTER AND MARSHAK, 1993):

$$T_M [^\circ\text{C}] = 69,3 + 0,41 \cdot (\% \text{ G/C}) - \frac{650}{n}$$

Aus den Schmelztemperaturen beider Primer wurde die *annealing* Temperatur wie folgt berechnet:

$$T_A [^\circ\text{C}] = \frac{(T_{M1} + T_{M2})}{2} - 3^\circ\text{C}$$

wobei  $T_{M1}$  und  $T_{M2}$  die Schmelztemperaturen der zwei eingesetzten Primer darstellen. Die typischen Temperaturbedingungen sind im Folgenden aufgeführt:

95°C	15 min	}	1 Zyklus
95°C	30 sec		}
x°C	30 sec		
72°C	1 min		
72°C	5 min		1 Zyklus
4°	∞		

### 3.2.12 *one-step* Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Die *one-step* RT PCR kombiniert die Umschreibung von RNA zu cDNA und eine anschließende PCR mit Hilfe Gen-spezifischer Primer in einem Schritt. Das Umschreiben der eingesetzten RNA in cDNA erfolgte bei 50°C für 30 Minuten. Dem folgte die Inaktivierung der Reversen Transkriptase und gleichzeitige Aktivierung der Taq DNA Polymerase bei 95°C für 5 Minuten. Im Anschluss wurde eine konventionelle PCR (siehe 3.2.11) durchgeführt. Für die *one-step* RT-PCR wurde das SUPERScript ONE-STEP RT-PCR SYSTEM MIT PLATINUM TAQ DNA POLYMERASE KIT (Invitrogen) verwendet. Ein typischer RT-PCR Ansatz und die Temperaturbedingungen sind in Tabelle 3.2 aufgeführt:

Tabelle 3.2: Komponenten eines *one-step* RT-PCR-Ansatzes

Komponente	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]
Gesamt-RNA (20 ng/ $\mu\text{l}$ )	5,0
2x Reaktionspuffer (0,2mM je dNTP, 1,2mM MgSO <sub>4</sub> , Invitrogen)	10,0
<i>sense primer</i> (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	1,0
<i>antisense primer</i> (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	1,0
SUPERScript RT/PLATINUM® TAQ MIX (Invitrogen)	0,5
H <sub>2</sub> O Nuklease-frei	2,5
	20,0

50°C	30 min	1 Zyklus
95°C	2 min	} 30 Zyklen
95°C	45 sec	
x°C	45 sec	
72°C	1 min	
72°C	7 min	1 Zyklus
4°C	∞	

### 3.2.13 *real-time* PCR

Die *real-time* PCR ist eine sensitive Technik zur Amplifikation und gleichzeitigen Quantifizierung einer spezifischen DNA-Sequenz, basierend auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR (HIGUCHI et al., 1992). Die Quantifizierung erfolgt durch Fluoreszenzmessungen während der PCR-Zyklen und unterscheidet sich somit von anderen quantitativen PCR-Methoden (qPCR), die erst nach Ablauf der PCR quantitativ ausgewertet werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Die PCR-Produkte können entweder durch Fluoreszenzfarbstoffe, die unspezifisch doppelsträngige DNA binden, oder durch Fluoreszenz-markierte Sequenz-spezifische Sonden detektiert werden. Letztere stellen z.B. die TaqMan-Sonden dar.

TaqMan-Sonden sind Sequenz-spezifische Oligonukleotid-Sonden, die ein Fluophor am 5'-Ende und einen *quencher*-Farbstoff am 3'-Ende tragen. Die unmittelbare Nähe des Fluophors zum *quencher*-Farbstoff (Förster-Radius) verhindert die Fluoreszenz. Während der kombinierten *Anlagerungs*- und *Elongations*phase der PCR wird die Sonde durch die Exonuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase gespalten, was zur räumlichen Trennung von Fluophor und *quencher*-Farbstoff führt. Dies resultiert in einer detektierbaren Fluoreszenz (LEE et al., 1993a), die proportional zur Menge des amplifizierten PCR-Produktes ist. Zur Durchführung der *real-time* PCR wurde der Cyclyer MX4000 (Stratagene) verwendet. Ein typischer Reaktionsansatz und die Temperaturbedingungen sind in Tabelle 3.3 aufgeführt:

Tabelle 3.3: Komponenten eines *real-time* PCR-Ansatzes

Komponente	Volumen [ $\mu$ l]
template DNA (100 ng/ $\mu$ l)	1,0
10x PCR-Puffer (inkl. 15 mM MgCl <sub>2</sub> , Applied Biosystems)	2,0
dNTPs (10 mM <i>each</i> , Fermentas)	0,5
<i>sense primer</i> (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5
<i>antisense primer</i> (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5
spezif. Sonde (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5
AMPLITAQ GOLD (5 U/ $\mu$ l, Applied Biosystems )	0,2
H <sub>2</sub> O	14,8
	20,0

95°C	10 min	1 Zyklus
95°C	30 sec	} 45 Zyklen
x°C	1 min	
4°C	∞	

Aufgrund der geringen Größe des PERV-*gag*-Amplifikats (ca. 100 bp) konnte auf den Elongationsschritt verzichtet werden.

### 3.2.14 SYBR GREEN *real-time* PCR

Im Gegensatz zur TaqMan-Sonden *real-time* PCR interkaliert der bei dieser DNA-Quantifizierungsmethode verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBR GREEN unspezifisch in doppelsträngige DNA-Moleküle. Da auch unspezifische PCR-Produkte sowie Primer-Dimere zum Fluoreszenzsignal beitragen, ist es erforderlich, dass nur spezifische PCR-Produkte entstehen. Die Interkalierung des Farbstoffes führt zu einer starken Erhöhung der Fluoreszenz, wohingegen freies SYBR green nur sehr schwach fluoresziert. Die Signalstärke nimmt aufgrund der Amplifikation des PCR-Produktes mit zunehmender Zyklenzahl zu. Zur Durchführung der SYBR GREEN *real-time* PCR wurde der BRILLIANT SYBR GREEN QPCR MASTERMIX (Stratagene) mit ROX als Referenzfluorophor und der MX-4000-Cycler (Stratagene) verwendet. Am Ende der PCR schloss sich ein zusätzliches Temperaturprogramm zur Ermittlung der Dissoziationskurven an. Ein typischer Reaktionsansatz und die Temperaturbedingungen sind in Tabelle 3.4 aufgeführt:

Tabelle 3.4: Komponenten eines SYBR GREEN *real-time* PCR-Ansatzes

Komponente	Volumen [ $\mu$ l]
cDNA	4,0
BRILLIANT SYBR GREEN QPCR MASTERMIX (2 x), (Stratagene)	6,0
<i>sense primer</i> (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5
<i>antisense primer</i> (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5
ROX-Lösung (100 $\mu$ M)	0,25
H <sub>2</sub> O, Nuklease-frei	0,75
	12,0
95°C      10 min	} 1 Zyklus
95°C      30 sec	
x°C      1 min	} 40 Zyklen
72°C      40 sec	
95°C      1 min	1 Zyklus
55°C $\uparrow$ 30 sec	41 Zyklen (Temperaturgradient für die Dissoziationskurve)
4°C $\infty$	

### 3.2.15 *one-step* RT (Reverse Transkriptase) *real-time* PCR

Die *one-step* RT *real-time* PCR kombiniert die Umschreibung von RNA zu cDNA und eine anschließende *real-time* PCR mit Hilfe Gen-spezifischer Primer in einem Schritt (siehe 3.2.12). Für diese PCR wurde das SUPERSORIPT ONE-STEP RT-QPCR SYSTEM MIT PLATINUM TAQ DNA POLYMERASE (Invitrogen) verwendet.

Tabelle 3.5: Komponenten eines *one-step* RT *real-time* PCR-Ansatzes

Komponente	Volumen [ $\mu$ l]
Gesamt-RNA (20 ng/ $\mu$ l)	5,0
2x Reaktionspuffer (0,2mM je dNTP, 1,2mM MgSO <sub>4</sub> , Invitrogen)	10,0
<i>sense primer</i> (10 pmol/ $\mu$ l)	1,0
<i>antisense primer</i> (V10 pmol/ $\mu$ l)	1,0
SUPERSORIPT RT/PLATINUM® TAQ MIX (Invitrogen)	0,5
Sonde (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5
H <sub>2</sub> O Nuklease-frei	2,5
	20,0

50°C	10 min	1 Zyklus
95°C	2 min	1 Zyklus
95°C	15 sec	} 45Zyklen
54°C	30 sec	
4°C	∞	

Ein typischer RT-PCR Ansatz und die Temperaturbedingungen ist in Tabelle 3.5 aufgeführt. Die Analyse der *real-time* RT-PCR erfolgte digital über die während des Laufes aufgenommenen Daten. Die Auswertung erfolgte über den sog. *threshold cycle* ( $C_T$ ). Dieser Wert gibt den Zyklus der PCR an, in dem die Fluoreszenz einer Probe das erste Mal deutlich die Hintergrundfluoreszenz (Schwellenwert) übersteigt. Hierbei gilt, je mehr Ziel-RNA in der Probe vorhanden ist, desto kleiner ist der  $C_T$ -Wert.

Die Effizienz der Reaktion bei optimalen Bedingungen kann über die Steigung der Geraden der  $C_T$ -Werte bei definierten Verdünnungen bestimmt werden (Stratagene Application Note #10). Für akkurate und reproduzierbare Daten sollte die Effizienz nahe bei 100% liegen, d.h., die *template* DNA wird mit jedem Zyklus verdoppelt. Für die Bestimmung der Effizienz wurde die entsprechende RNA seriell zwischen 50 ng und 0 ng verdünnt und die Effizienz der einzelnen Primer bestimmt. Für die Berechnung der Effizienz gilt:

$$\text{Exponentielle Amplifikation} = 10(-1/\text{Steigung})$$

und

$$\text{Effizienz } E = [10(-1/\text{Steigung})] - 1$$

Die weitere Auswertung erfolgte nach Modifikation der von K. Livak beschriebenen  $\Delta\Delta C_T$ -Methode (LIVAK AND SCHMITTGEN, 2001). Zusätzlich zur beschriebenen Abgleichung der Proben auf ein Haushaltsgen wurden für jeden Ansatz 50 ng Gesamt-RNA verwendet. Für die einzelnen Proben kann dann die Expression relativ zu einem Kalibrator bestimmt werden. Als Kalibrator wurde RNA von z.B. untransduzierten oder untransfizierten Zellen verwendet. Mittelwerte und Standardabweichungen der Replikate sowie die Bestimmung der relativen PERV-Expression wurden mit dem Tabellenkalkulations-Programm Microsoft Excel durchgeführt.

Es gilt:

$$\text{relative Expression} = (1+E)^{-\Delta CT}$$

und

$$\Delta CT = CT \text{ Probe} - CT \text{ Kalibrator}$$

### 3.2.16 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen diente sowohl als präparatives Hilfsmittel für Klonierungszwecke aber auch analytischen Zwecken zur Überprüfung von Plasmiden nach Klonierungen. Jedes Restriktionsenzym hat eine spezifische Erkennungssequenz, die unter optimalen Pufferbedingungen und Inkubationstemperatur geschnitten wird. Die Dauer der Inkubation richtet sich nach der Temperatur und den eingesetzten Mengen an DNA und Enzym. Bei optimalen Bedingungen spaltet eine Einheit [1 U] Restriktionsenzym 1  $\mu$ g DNA in einer Stunde.

Analytische Spaltungen konnten durch die verschiedenen Puffersysteme zeitsparend mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen in einem Reaktionsansatz durchgeführt



werden, sofern beide Enzyme ausreichende Kompatibilität für einen Puffer zeigten. Für präparative Zwecke wurde jedoch einzeln und nacheinander gespalten, um so eine nahezu vollständige Spaltung zu erreichen und den Erfolg jeder einzelnen Spaltung verifizieren zu können. Für analytische Spaltungen wurden ca. 500 ng DNA mit 2 µl 10x Puffer und ca. 0,5 Einheiten Enzym (New England Biolabs) gemischt und mit Wasser zu einem Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Bei präparativen Spaltungen wurden 1 µg bis 10 µg DNA und pro Mikrogramm DNA 1 bis 1,5 Einheiten Enzym eingesetzt. Die optimale Aktivität einiger Enzyme erforderte den Zusatz von BSA. Das Ergebnis einer Spaltung konnte auf einem Agarosegel analysiert werden (3.2.18).

### 3.2.17 Ligation von DNA-Fragmenten mit der T4 DNA-Ligase

Die T4 DNA-Ligase katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphat- und der 3'-Hydroxylgruppe von überstehenden und glatten DNA-Enden. Die Ligation von Vektor-DNA mit DNA-Fragmenten wurde in dem vom Hersteller (Roche) mitgelieferten Puffersystem durchgeführt. Die *insert* DNA sollte gegenüber der Vektor-DNA in einem mehrfachen Überschuss vorhanden sein. Das Endvolumen eines Ligationsansatzes betrug 20 bis 30 µl und beinhaltete neben der DNA 1x DNA-Ligasepuffer, Wasser, sowie 2 Einheiten T4 DNA-Ligase. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C. Nach der Ligation konnte der Ansatz direkt zur Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen verwendet werden (3.1.4).

### 3.2.18 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte je nach erwarteter Fragmentlänge in 0,8 bis 2%-igen (w/v) Agarosegelen in Gelelektrophoresekammern mit 1x TAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer, 50x: 2 M Tris base, 50 mM EDTA, 1 M Eisessig, pH 8,0) als Laufpuffer. Hierfür wurde die Agarose (Sigma) in 1x TAE suspendiert, in der Mikrowelle aufgeköcht und in eine Gelkammer mit passendem Kamm gegossen. Nach Erstarren der Agarose wurden die DNA-Proben mit 1/10 Volumen 10x DNA-Ladepuffer (50% (v/v) Glycerin, 0,35% (v/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencanol, 1x TAE) gemischt und in die Geltaschen gefüllt. Zur Abschätzung der Fragmentgrößen diente der Marker O'GENERULER (Fermentas). Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 bis 120 Volt je nach Fragmentlänge für 30 bis 90 Minuten. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 15 Minuten in einem Bad des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid (0,5 µg/ml, Sigma-Aldrich) inkubiert und auf einem UV-Schirm (GEL DOC 2000, Biorad) betrachtet und digital dokumentiert (QUANTITY ONE SOFTWARE, Biorad).

### 3.2.19 Gelextraktion linearer DNA-Fragmente

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel wurde auch zur Isolierung von DNA mit spezifischer Länge verwendet. Die Bande der entsprechenden Größe wurde mit dem Skalpell ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus dem herausgelösten Gelstück erfolgte mithilfe des QIAQUICK GEL EXTRACTION KIT (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

### 3.2.20 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA erfolgte in dem institutseigenen Service-Labor. Das Service-Labor arbeitet mit dem 370A DNA-SEQUENCING SYSTEM (Applied Biosystems) nach

der Didesoxy-Methode (SANGER et al., 1992). Die Zusammensetzung eines Sequenzieransatzes und die Temperaturbedingungen sind in Tabelle 3.6 aufgeführt:

**Tabelle 3.6: Komponenten und Temperaturbedingungen eines Sequenzierungsansatzes**

DNA (300 ng/μl)	1,0	95°C	2 min	} 1 Zyklus
BigDye-Mix 3.1	2,0	95°C	10 sec	
Primer (10 μM)	0,5	55°C	5 sec	} 25 Zyklen
Puffer	1,5	60°C	4 min	
H <sub>2</sub> O (Nuklease-frei)	5,0	4°C	∞	

Die Sequenzen lagen anschließend als Datei vor, die mit dem Programm LASERGENE (DNA Star) ausgewertet und bearbeitet werden konnten.

### 3.2.21 Konstruktion und Markierung kleiner RNA-Sonden

Die Konstruktion und Markierung einer kleinen (29 nt) RNA-Sonde zur Detektion der pol2-siRNA-Expression in PK15-Zellen und Organen der transgenen Ferkel (siehe 3.4.11) erfolgte mit Hilfe des MIRVANA™ MIRNA PROBE CONSTRUCTION KITS (Ambion). Diese Methode basiert auf dem Prinzip der *in vitro*-Transkription (IVT). Als template für die IVT wurde ein der siRNA-Sequenz komplementäres DNA-Nukleotid verwendet, das am 3'-Ende zusätzlich die acht Nukleotide 5'-CCTGTCTC-3' trägt. Diese Sequenz ist komplementär zu dem im Kit vorhandenen T7-Promotor-Primer und ermöglicht somit die Hybridisierung von DNA-Oligonukleotid und T7-Promotor-Primer. Nach Zugabe einer Klenow-DNA-Polymerase entsteht ein doppelsträngiges Transkriptionstemplate, das einen T7-Promotor beinhaltet. Die Transkriptionsreaktion zum Markieren der RNA-Sonde erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Statt der angegebenen α-<sup>32</sup>P UTPs (800 Ci/mmol, 10 mCi/ml) wurden α-<sup>32</sup>P UTPs (GE Healthcare) mit einer spezifischen Aktivität von 800 Ci/mmol und einer Konzentration von 20 mCi/ml verwendet und dementsprechend nur 2,5 statt 5 μl in die Transkriptionsreaktion eingesetzt, was eine Endkonzentration von 3,125 μM ergab. Im Anschluss an die Markierung der RNA-Sonde musste diese über ein 15%-iges denaturierendes Polyacrylamidgel aufgereinigt werden, um die Vollängen-Sonde von Abbruchfragmenten und nicht eingebauten Nukleotiden zu separieren. Die Visualisierung wurde mit Hilfe des Prospo-Imagers (IMAGINE PLATE TYPE BAS-III, Fujifilm; FLA-2000, Fujifilm) durchgeführt. Zur Detektion der Sonde war eine Expositionszeit von 30 bis 60 Sekunden erforderlich. Die Gelreinigung der Sonde erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Im Folgenden ist die Sequenz der Ziel-RNA (siRNA), die daraus resultierende Sequenz des DNA-templates für die IVT, sowie die entstehende RNA-Sonde und die geschützte Sonden-Sequenz aufgeführt:

**Tabelle 3.7: Konzipierung der pol2-shRNA-Sonde**

Ziel-RNA für die Sonde: (= pol2-shRNA)	5' agucaauuuugucagcgucc 3'
DNA- <i>template</i> :	5' AGTCAATTTGTCAGCGTCC cctgtctc 3'
entstehende RNA-Sonde:	3' UCAGUUAACAGUCGAGG ggacagag gg* 5'
geschützte Sequenz (mirVana):	3' UCAGUUAACAGUCGAGG 5'

\_\_\_ : T7 Promotor Sequenz

\* : 2 zusätzliche Guanidine, die während der Transkriptionsreaktion angehängt werden

### 3.2.22 Kalkulation der theoretischen spezifischen Aktivität der RNA-Sonde

Die theoretische spezifische Aktivität der RNA-Sonde wurde mit Hilfe eines Kalkulationsprogramms der Firma Ambion ([http://www.ambion.com/techlib/tips/specific\\_activity\\_calculator.html](http://www.ambion.com/techlib/tips/specific_activity_calculator.html)) ermittelt.

### 3.2.23 Detektion von siRNAs

Die siRNA-Detektion erfolgte mit Hilfe des MIRVANA MIRNA DETECTION KITS (Ambion), welches auf dem Prinzip einer „In-Lösung-Hybridisierung“ basiert. Die Ziel-RNA enthaltende RNA-Probe wurde mit einer <sup>32</sup>P-markierten RNA-Sonde und dem Hybridisierungspuffer gemischt. Nach einer Hitzedenaturierung wurde die Mischung einer Inkubation bei 42°C unterzogen, während derer die Sonde an ihre komplementäre Sequenz binden konnte. Nicht hybridisierte RNA und überschüssige Sonde wurden anschließend mittels eines RNase-Verdau entfernt. Die hybridisierten und somit geschützten RNA-Fragmente wurden einer Ribonuklease-Inaktivierung und einer Nukleinsäure-Präzipitation unterzogen. Anschließend konnten die RNA-Proben in Gel-Ladepuffer resuspendiert und durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Phosphoimaging (IMAGINE PLATE TYPE BAS-III UND FLA-2000, Fujifilm) analysiert werden. Die Prozedur erfolgte exakt nach den Angaben des Herstellers. Zur Detektion der siRNAs war eine Expositionszeit von 3 bis 7 Minuten erforderlich.

### 3.2.24 Präzipitation von DNA an Goldpartikel

Für die DNA-Vakzinierung wurde das HELIOS GENE GUN SYSTEM (Bio-Rad) eingesetzt und nach Herstellerangaben verwendet. Die Plasmid-DNA wurde mit CaCl<sub>2</sub> an Goldpartikel (Alfa Aesar) präzipitiert, um damit die Innenwand des Patronenschlauchs zu beschichten. Die empfohlenen Standardwerte (0,5 mg Gold pro Patrone, 2 mg DNA pro mg Gold) wurden beibehalten.

25 mg Goldpartikel wurden in 100 µl 50 mM Spermidin resuspendiert (5 Sekunden im Ultraschallbad) und dann mit 50 µg Plasmid gemischt. Unter Vortexen erfolgte die Zugabe von 100 µl 1 M CaCl<sub>2</sub>. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT wurde die Goldpartikel kurz in einer Tischzentrifuge pelletiert (14000 x g, 15 s) und 3 mal mit je 1 ml 100 % Ethanol (wasserfrei aus frisch geöffneten Flasche) gewaschen. Für die Beschichtung des Schlauchs wurden die Goldpartikel in 100 % Ethanol mit 0,015 mg/ml PVP in ein 15 ml Röhrchen überführt (Gesamtvolumen 3,0 ml).

Der 75 cm lange Patronen-Schlauch wurde zunächst in der Beschichtungs-Vorrichtung mit hochreinem N<sub>2</sub> (mindestens Grad 4.8) für 15 min getrocknet. Anschließend wurde die gesamte Gold-Ethanol-Suspension in den Schlauch gesaugt und der Schlauch bei abgeschalteter N<sub>2</sub>-Strömung wieder in die Vorrichtung eingesetzt. Nach dem Absetzen der Goldpartikel (3 bis 5 min), wurde der Ethanol-Überstand vorsichtig abgesaugt und der Schlauch unter Rotation für 5 Minuten mit N<sub>2</sub> (0.4 l/min) getrocknet. Anschließend erfolgte das Zuschneiden des Schlauches zu 1 cm langen Patronen, die bei 4°C im Exikator gelagert wurden.

### 3.3 Proteinchemische Arbeiten

#### 3.3.1 Isolierung von Gesamtprotein aus eukaryontischen Zellen und Geweben

Zur Gewinnung von Gesamtprotein aus eukaryontischen Zellen und Geweben wurde die verbliebene organische Phase aus der RNA- bzw. DNA-Isolierung mittels TRI REAGENT (Sigma-Aldrich) verwendet (vgl. 3.2.7, 3.2.2). Aus dieser wurden die Proteine nach den Angaben des Herstellers mit Isopropanol (Roth) ausgefällt, aufgereinigt und bis zur weiteren Verwendung in 1% (w/v) SDS bei -20°C gelagert.

Sollte aus eukaryontischen Zellen ausschließlich Gesamtprotein isoliert werden, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit eiskaltem 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 Phenylmethylsulfonylfluorid, 10 mM Benamidin, 2 µg/ml Leupeptin, 100 µM Natrium-orthovanadat, 10 mM p-Nitrophenylphosphat) resuspendiert. Nach einer zehnmütigen Inkubation auf Eis wurden die unlöslichen Bestandteile sedimentiert (10000 x g, 10 min, 4°C, CENTRIFUGE 5415D, Eppendorf) und der Proteingehalt des Überstandes quantifiziert (siehe 3.3.2). Bis zur weiteren Verwendung wurde das isolierte Proteingemisch bei -20°C gelagert.

#### 3.3.2 Bestimmung des Proteingehaltes

##### Bradford-Bestimmung

Zur Herstellung einer Eichgeraden diente ein BSA-Standard (Pierce) mit den Konzentrationen 1200 µg/ml, 1000 µg/ml, 800 µg/ml, 600 µg/ml, 400 µg/ml, 200 µg/ml. Zu den in einer 96-well-Mikrotiterplatte vorgelegten 4 µl des BSA-Standards, der Nullkontrollen und der Proben wurden jeweils 196 µl Bradford-Reagenz (Biorad) hinzu gegeben. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Extinktionen bei einer Wellenlänge von 595 nm im ELISA-READER (Tecan) vermessen und die Proteinkonzentrationen anhand einer Eichgeraden des BSA-Standards bestimmt.

##### BCA-Bestimmung

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinproben in 1% SDS wurde der BCA Protein Assay (Pierce) herangezogen. Diese Methode verbindet die Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  durch Proteine in alkalischer Umgebung (Biuret-Reaktion) und die selektive colorimetrische Quantifizierung von  $\text{Cu}^{1+}$  durch die Reaktion mit Bicinchinonischer Säure. 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 BSA-Standards (siehe Bradford-Bestimmung), der Nullkontrollen und der Proben hinzugegeben. Nach einer dreißigminütigen Inkubation bei 37°C wurden die Extinktionen bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 492 nm im ELISA-READER (Tecan) vermessen und die Proteinkonzentrationen im Vergleich zur Eichgeraden des BSA-Standards bestimmt. Um eventuelle Messfehler gering zu halten, wurden jeweils Dreifachbestimmungen angefertigt.

##### Optische Quantifizierung:

Lagen Proteine in einer unlöslichen Form vor, wurde auf eine Quantifizierung im Vergleich zu einer Lysozym- bzw. BSA-Ausverdünnung in einem Polyacrylamidgel zurückgegriffen.

Hierfür wurde ein definiertes Volumen der Proteinsuspension neben einer definierten Lysozym- bzw. BSA-Ausverdünnung in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Hilfe der QUANTITY ONE SOFTWARE (Biorad) quantifiziert.

### 3.3.3 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Zur rekombinanten Herstellung von Proteinen gibt es verschiedene kommerziell erhältliche Systeme mit aufeinander abgestimmten Expressionsvektoren, bakteriellen Expressionsstämmen und Aufreinigungssystemen.

Je nach Beschaffenheit des zu exprimierenden Proteins stehen unterschiedliche *tags* oder Fusionsproteine zur affinitätschromatografischen Aufreinigung zur Verfügung. Für die Expression der viralen Hüllproteine wurden die Expressionsvektoren pET-22b(+) (Novagen) und pGEX-5X-1 (Stratagene) verwendet. Durch einen zusätzlich eingebrachten C-terminalen 6x His-Tag, eine Sequenz von 6 Histidinen in Folge, wurde die affinitätschromatografische Aufreinigung der Proteine über eine Nickel-NTA (nitrilotriacetic acid)-Matrix ermöglicht.

#### 3.3.3.1 IPTG-induzierte Expression

Das in den Vektor pET-22b(+) eingebrachte Gen des Zielproteins steht unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors, der die gezielte Transkription eingefügter Sequenzen durch die Zugabe des Galaktoseanalogons Isopropylthiogalaktopyranosid (IPTG) erlaubt. IPTG ist ein nicht metabolisierbarer Induktor, der durch die Bindung an den Repressor die Transkription der *lac*-Strukturgene und damit auch des eingeführten *inserts* ermöglicht. Die Expression erfolgte in dem *E. coli*-Stamm BL21-CodonPlus(DE3) (Stratagene). Dazu wurden 500 ml auf 37°C vorgewärmtes LB-Amp-Medium mit 1 ml einer frischen Vorkultur (siehe 3.1.2) inokuliert und bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch die Zugabe von IPTG (Roth) (PERV-gp70 und KoRV-gp70: 0,5 mM Endkonzentration, gp70-Fragmente: 1 mM Endkonzentration) bei einer optischen Dichte von 0,8 bei einer Wellenlänge von 600 nm. Nach einer über Nacht-Inkubation der Expressionskultur schüttelnd bei 4°C wurden die Bakterien bei 3200 x g pelletiert (MEGAFUGE 1.0 R, Heraeus), der Überstand dekantiert und das Bakterienpellet bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 3.3.3.2 Aufschluss der Bakterien

Zum Aufschluss der *E. coli*-Zellwände wurde das bei -20°C gelagerte Zellpellet 15 Minuten auf Eis aufgetaut und anschließend in 5 ml Lysepuffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 6 M Guanidinhydrochlorid, pH 8,0) pro Gramm Gewicht resuspendiert. Zur Lyse wurde die Zellsuspension 15 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur unter Vermeidung von Schaumbildung geschüttelt. Um die Proteinfraktion von Zelltrümmern zu trennen, wurden diese für 30 Minuten bei 10000 x g und Raumtemperatur sedimentiert (CENTRIFUGE 5415D, Eppendorf) und das Lysat für die Proteinaufreinigung eingesetzt.

#### 3.3.3.3 Affinitätschromatografische Aufreinigung rekombinanter Proteine

Eine Chromatographiesäule (Amersham Bioscience) wurde mit 3 ml PROBOND Ni-NTA-SEPHAROSE (Invitrogen) mit dem fünffachen Säulenvolumen Lysepuffer (3.3.3.2) äquilibriert. Das Proteinlysate (3.3.3.2) wurde auf die Säule gegeben und mit einer

Flußrate von 1 ml pro Minute 2 h rezirkuliert. Am Tag darauf wurde die Säule mit dem zwanzigfachen Säulenvolumen Waschpuffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 6 M Guanidinhydrochlorid, pH 6,3) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 20 ml eines Elutionspuffers mit geringerem pH-Wert (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 6 M Guanidinhydrochlorid, pH 4,0). Der Proteingehalt der Fraktionen wurde durch photometrische Messung (Biophotometer, Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 280 nm abgeschätzt und die proteinreichen Fraktionen vereint und über Nacht in einem Servapor Dialyseschlauch mit einer Molekulargewichtsgrenze von 12000 bis 14000 kDa (Serva) gegen PBS dialysiert.

### 3.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Proteinproben (*E.coli*-Lysate, Zellysate, aufgereinigte Proteine, etc.) wurden in SDS-Probenpuffer (50 mM Tris-HCl, 12 % (v/v) Glycerin, 4% (w/v) SDS, 0,01% (v/v) Coomassie Blue R-250, 5% (v/v) Mercaptoethanol) aufgenommen und für 5 bis 10 Minuten bei 95°C aufgekocht. Die hier verwendeten SDS-Gele setzten sich aus einem 4% Sammelgel und einem 10% Trenngel zusammen (nach SCHÄGGER UND VON JAGOW, 1987). Ein kommerzieller, vorgefärbter Größenstandard (SEEBLUE PLUS II, Invitrogen, bzw. PAGERULER, Fermentas) wurde mitgeführt. Das Gel wurde in das MIGHTY SMALL II SYSTEM (Hoefler) eingespannt und die Elektrophoresekammer mit Kathoden- (100 mM Tris-Base, 100 mM Tricin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,25) und Anodenpuffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,9) befüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei 60 mA für ca. 2 Stunden. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel entweder durch einen Elektroblot auf eine Membran übertragen (Western Blot-Analyse, 3.3.7) oder direkt mit Coomassie Blue (siehe 3.3.5) gefärbt.

**Tabelle 3.8: Komponenten eines Sammel- und Trenngels für die SDS-Acrylamidgelelektrophorese**

4% Sammelgel		10% Trenngel	
2,0 ml	Gelpuffer (0,1 M Tris-HCl, 0,3% (w/v) SDS, pH 8,0)	5,0 ml	Gelpuffer (0,1 M Tris-HCl, 0,3% (w/v) SDS, pH 8,0)
3,2 ml	H <sub>2</sub> O	6,0 ml	H <sub>2</sub> O
0,8 ml	ROTIPHORESE GEL ®30 (30% Acrylamidlösung, 37,5:1, Roth)	4,0 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%)

### 3.3.5 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Die in einem Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden mit COOMASSIE BRILLIANT BLUE R-250 (Serva) angefärbt, welches sich irreversibel an Proteine anlagert. Durch anschließende Entfärbung werden die proteinfreien Bereiche des Gels wieder entfärbt. Hierfür wurde das Polyacrylamidgel für 5 bis 15 Minuten unter leichtem Schwenken auf dem Schüttler in Coomassie-Färbelösung (3 mM Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure) inkubiert. Die spezifischen Proteinbanden wurden nach etwa 20-minütigem Entfärben in Entfärbelösung (25% (v/v) Methanol, 10% (v/v)

Essigsäure) sichtbar. Zur Aufbewahrung wurde das Gel über Nacht in Wasser geschwenkt, anschließend mit Hilfe der GEL-DRY DRYING SOLUTION (Invitrogen) entwässert und zwischen zwei Zellophan-Folien getrocknet.

### 3.3.6 Detektion von Glykoproteinen

Um zu prüfen, ob die hergestellten Proteine im Periplasma einer bakteriellen Glykosylierung unterlaufen, wurden diese in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ihrer nach Größe aufgetrennt. Mit Hilfe einer speziellen Färbung des Gels wurden dann spezifisch Glykoproteine angefärbt. Die Färbung erfolgte mit dem GELCODE GLYCOPROTEIN STAINING KIT (PIERCE) nach den Angaben des Herstellers. Es wurden jeweils 20 µg Protein eingesetzt.

### 3.3.7 Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse ist eine Methode zur Detektion von auf einer Trägermembran immobilisierten Proteinen mit spezifischen Antikörpern und einer Enzym-gekoppelten Nachweisreaktion [TOWBIN et al. 1989].

Nach der Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE wurden diese mit Hilfe der TRANSBLOT SEMI-DRY TRANSFER CELL (Biorad) Apparatur durch ein senkrecht zum Gel orientiertes elektrisches Feld (20 V, 20 min) auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid, Porengröße 0,2µm, Millipore) transferiert. Das Gel sowie drei Blotting-Filterpapiere (Peqlab) wurden zuvor in Transferpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0,038% (v/v) SDS) äquilibriert. Freie Bindungsstellen auf der Membran, die nicht durch Proteine besetzt waren, wurden durch eine einstündige Inkubation der Membran in einer Blockierungslösung (5% (w/v) Magermilchpulver (Sucofin), 0,05% (v/v) Tween 20 (Roth) in PBS) abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper (bzw. dem Antiserum, Verdünnungen siehe Tabelle 2.6) für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges je zehnmütiges Waschen mit Waschpuffer (0,05% (v/v) Tween 20 in PBS) entfernt. Im Anschluss wurde die Membran für 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur mit einem Spezies-spezifischen, Peroxidase(POD)-konjugierten Sekundärantikörper (DakoCytomation) inkubiert. Die Verdünnung der Sekundärantikörper erfolgte in Blockierungslösung nach Angaben des Herstellers (Tab. 2.6). Nach drei weiteren Waschschritten erfolgte die Detektion entweder nach der ECL-Methode (*enhanced chemilumineszenz*, ECL WESTERN BLOTTING SUBSTRATE, Pierce) und einem Röntgenfilm (CL-XPOSURE FILM 5 x 7, Pierce) nach Angaben des Herstellers oder mit einer 3,3'-Diaminobenzidin-Substratlösung (DAB, Sigma-Aldrich) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (Merck). Hierzu wurde die Membran in eine DAB-Substrat-Lösung aus 20 ml Tris-Puffer (25 mM, pH 8,0) einer Spatelspitze DAB und 50 µl Wasserstoffperoxid inkubiert. Sobald Banden zu erkennen waren, wurde die Farbreaktion mit Wasser abgestoppt und die Membran getrocknet.

Nach der ECL-Detektion bestand die Möglichkeit, die Membran erneut zu verwenden. Hierzu mussten jedoch die gebundenen Antikörper abgelöst werden. Dies geschah nach einem Waschschriff in Waschpuffer durch eine 30 bis 90-minütige Inkubation der Membran in „Strippingpuffer“ (62,5 mM Tris-HCl, 2% (w/v) SDS, 100 mM β-

Mercaptothanol, pH 6,8) bei 50 bis 65°C. Nach zwei weiteren Waschschritten wurde die Membran getrocknet und bis zur weiteren Verwendung trocken bei RT gelagert.

Zur Analyse verschiedener Seren hinsichtlich ihrer Immunreaktion gegen identische Antigene wurde die Apparatur MINI-PROTEAN II MULTISCREEN APPARATUS (Biorad) verwendet. Diese ermöglichte die Testung von bis zu 20 unterschiedlicher Seren auf einer Membran.

### 3.3.8 Kolonie-Blot

Der Kolonie-Blot stellt eine einfache Methode zur Auslese positiver Expressionsklone dar und bietet erste Anhaltspunkte hinsichtlich eventueller zytotoxische Eigenschaften des rekombinanten Proteins. Die Durchführung erfolgte nach dem im QiaExpressionisten (S. 41-44) angegebenen Protokoll.

Zunächst wurde das aus *E. coli* TOP 10 isolierte Plasmid in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 transformiert. Dabei wurde die Selektivplatte statt bei 37°C bei 30°C für ca. 16 bis 36 Stunden inkubiert, um eventuelle zellschädigende Eigenschaften des rekombinanten Proteins zu minimieren. Danach erfolgte ein Abdruck der Kolonien auf eine an die Platte angepasste Nitrozellulose-Membran. Diese wurde auf eine IPTG-haltige Nährbodenplatte überführt und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert, wodurch die Expression induziert werden sollte. Es folgte die Lyse der Zellen mit den angegebenen Puffern (QiaExpressionist S. 111); PBS anstelle von TBS), gefolgt von einer Sättigung der freien Bindungsstellen mit Blockierungspuffer (12 h bei 4°C). Im weiteren Verlauf wurde die Membran wie bei der Western-Blot-Analyse (siehe 3.3.7) behandelt. Die Detektion des rekombinanten Proteins erfolgte mit Hilfe eines  $\alpha$ -Penta-His-Antikörpers.

### 3.3.9 ELISA (*enzyme linked immuno sorbent assay*)

Neben der Western-Blot-Analyse wurde auch der ELISA zur spezifischen Detektion von Antikörpern genutzt. Der Nachweis basiert, wie bei der Western-Blot-Analyse, auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, die durch einen Spezies-spezifischen POD-konjugierten Sekundärantikörper quantifiziert werden kann.

Im Vergleich zur Western-Blot Analyse-ermöglicht der ELISA zusätzlich zur spezifischen Detektion die Titerbestimmung der im Serum enthaltenen bindenden Antikörper sowie die Bestimmung der Avidität monoklonaler Antikörper oder Antiseren zu ihrem Antigen.

Um Seren auf bindende Antikörper zu testen, wurden zunächst die entsprechenden in H<sub>2</sub>O gelösten rekombinanten Proteine (Antigene) auf eine NUNC PROBIND™-96-WELL-PLATTE (Nunc) aufgebracht und über Nacht bei 37°C eingetrocknet. Ungesättigte Bindungsstellen auf der Plattenoberfläche wurden durch eine einstündige Inkubation mit 200  $\mu$ l Blockierungspuffer pro well (10% (v/v) FKS in PBS) blockiert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit 300  $\mu$ l Waschpuffer (PBS, 0,05% (v/v) Tween 20) pro well in einem ELISA-WASHER (Tecan) gewaschen. Es folgte eine zweistündige Inkubation der zu testenden Seren (Primärantikörper) in entsprechender Verdünnung (Tab. 2.6) in 100  $\mu$ l Waschpuffer bei 37°C. Ungebundene Antikörper wurden durch drei Waschzyklen entfernt. Anschließend erfolgte eine zweistündige Inkubation der Platte mit dem Spezies-spezifischen POD-konjugierten Sekundärantikörper in der vom Hersteller angegebenen Verdünnung (Tab. 2.6) in Blockierungspuffer bei 37°. Ungebundene Sekundärantikörper wurden durch fünf Waschzyklen entfernt. Nach dem Waschen wurde die Platte durch kräftiges Ausschlagen von allen Flüssigkeitsresten befreit und mit 50  $\mu$ l pro Well



Substratlösung (PBS pH 6,0; 1mg/ml o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid, Sigma-Aldrich) inkubiert bis eine deutliche Farbreaktion festzustellen war (1 bis 15min). Durch die Zugabe von 25 µl Schwefelsäure (Merck) pro Well wurde die enzymatische Substratumsetzung gestoppt und die Farbreaktion mit einem ELISA-READER (Tecan) bei Wellenlängen von 492 nm und 620 nm quantifiziert. Alle Ansätze wurden in Triplikaten gemessen. Mittelwerte und Standardabweichungen der Triplikate wurden mit dem Tabellenkalkulations-Programm MICROSOFT EXCEL berechnet.

Zur Bestimmung der Titer spezifischer Antikörper in Seren nach einer Immunisierung wurden die Seren gegen die entsprechenden Präimmunseren ausverdünnt. Der Titer eines Serums entspricht der letzten Verdünnungsstufe, bei der die Absorption signifikant über dem Hintergrund durch das Präimmunserum liegt.

### 3.3.10 Nachweis der Aktivität Reverser Transkriptase (RT)

Ein Charakteristikum von Retroviren ist die Reverse Transkriptase, ein Enzym, welches das retrovirale RNA-Genom während der Replikation in provirale DNA umschreibt. Die Messung der Aktivität dieses Enzyms in Überständen kultivierter Zellen ermöglicht den Nachweis retroviraler Infektionen bzw. die Quantifizierung freigesetzter Viruspartikel. Der Nachweis der Reversen Transkriptase erfolgte mit Hilfe des C-TYPE RT ACTIVITY KITS (Cavidi). Dieses System ermöglicht die Quantifizierung der Mangan-abhängigen RT-Aktivität von  $\gamma$ -Retroviren. Es basiert auf der Kopplung von Poly-rA (ein Substrat der RT) und einem Oligo-dT-Primer an eine Mikrotiterplatte. Je nach Konzentration der zugegebenen Reversen Transkriptase erfolgt eine Verlängerung des Oligo-dT-Primers mit Bromodesoxyuridin, welches seinerseits mit Hilfe eines spezifischen, mit Alkalischer Phosphatase-konjugierten Antikörpers und einer Substratlösung photometrisch gemessen und quantifiziert werden kann. Der Nachweis der Reversen Transkriptase erfolgte nach dem „Über-Nacht“-Protokoll des Herstellers.

## 3.4 Zellbiologische Methoden

### 3.4.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Die Kultivierung aller eukaryontischen (Tab. 2.8) Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in einem Brutschrank (BBD 6220, Heraeus). Sämtliche Zellkultur-Arbeiten wurden unter der Sterilbank HERASAFE (Heraeus) durchgeführt.

Die Medien DMEM inkl. 4,5 g/L Glukose (Biochrom KG) und RPMI (Invitrogen) wurden jeweils mit den in Tabelle 3.9 aufgeführten Supplementen versetzt. Das Medium für die Kultivierung der porzinen Fibroblasten enthielt zusätzlich 0,1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich), 1% (v/v) *non essential amino acids* (Sigma) und 1% (v/v) *vitamin solution* (Sigma-Aldrich).

Zum Erhalt der Zellen wurden diese alle 2 bis 3 Tage passagiert. Hierfür wurde das Medium verworfen und die Zellen mit 10 ml 37°C warmem PBS gewaschen.

Tabelle 3.9: Supplemente der Medien DMEM und RPMI

Konzentration	Supplement
10% (v/v)	FKS (Biochrom)
2 mM	L-Glutamin (200 mM, Biochrom)
100 U/ml	Penicillin (10000 U/ml, Biochrom)
100 µg/ml	Streptomycin (10 mg/ml, Biochrom)
15 mM	HEPES (1 M, Biochrom)

Um die adhärennten Zellen vom Boden der Kulturschale zu lösen, wurden sie anschließend 3 bis 4 Minuten mit Trypsin/EDTA (Biochrom) bei 37°C inkubiert, in frischem, vorgewärmten Medium resuspendiert und in neue Zellkulturschalen oder -flaschen (TPP) verteilt. Das Umsetzungsverhältnis variierte je nach Zelldichte zwischen 1:2 und 1:8. Zum Ablösen der porzinen foetalen Fibroblasten wurde ein Zellschaber verwendet (TPP).

### 3.4.2 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen

Die langfristige Lagerung von Zellen über mehrere Jahre ist nur in flüssigem Stickstoff bei -196°C möglich. Um zu gewährleisten, dass möglichst wenige Zellen in Folge der Bildung von Eiskristallen im Zellinneren beim Einfrierprozess Schaden nehmen, müssen diese mit Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich) versetzt werden. Die Zellen wurden in Suspension gebracht, vereinzelt und bei 500 x g für 5 Minuten pelletiert (MEGAFUGE 1.0 R, Heraeus). Bis zu  $2 \times 10^6$  Zellen wurden in 1 ml vorgekühltem FKS (Biochrom) mit 10% DMSO (Sigma-Aldrich) aufgenommen und in ein 2 ml Kryogefäß (Greiner Bio One) überführt. Die Kryogefäße wurden für einige Stunden bei -20°C eingefroren und dann in einer verschlossenen Styroporbox bei -80°C über Nacht gelagert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in katalogisierter Position in einen Stickstofftank überführt. Auf diese Weise wurde ein langsamer Zell-schonender Einfrierprozess gewährleistet.

Zur Weiterkultivierung wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und langsam mit 10 ml 37°C warmem Medium ausverdünnt. Das restliche DMSO und abgestorbene Zellen wurden durch einmaliges abzentrifugieren der Zellen für 2 Minuten bei 500 x g entfernt. Nach Resuspension des Zellpellets in 13 ml Medium wurde das gesamte Volumen in einer 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche ausgesät und unter oben beschriebenen Zellkulturbedingungen inkubiert.

### 3.4.3 Bestimmung der Vitalität und der Zellzahl mit Trypanblau

Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Das Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Cytosol ein und färbt die Zellen tiefblau. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop leuchtend hell. Bei zu langer Einwirkzeit des Trypanblau ist ein Anstieg von toten Zellen zu beobachten, da dieser Farbstoff cytotoxisch wirkt. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer können Zellen somit auf ihre Vitalität überprüft und gleichzeitig die Gesamtzellzahl ermittelt werden. Hierzu wurden gleiche Volumina (10 µl) Zellsuspension und 0,4% Trypanblau-Lösung (Sigma-Aldrich) gemischt und in einer Zählkammer gezählt. Durch Auszählen der Zellen in allen vier Großquadranten kann die Gesamt-Zellzahl wie folgt berechnet werden:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{gezählte Zellzahl} \times 2}{4} \times 10^4$$

#### **3.4.4 Isolierung porziner PBMC (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)**

Die Gewinnung von PBMC erfolgte nach der Methode der Dichtegradientenzentrifugation mit dem Lymphozytenseparationsmedium Ficoll. Bei der Zentrifugation des Ficollgradienten entstehen vier Phasen: eine obere Plasma-Phase, eine darunter liegende weißliche Bande, welche die Lymphozyten und Monozyten enthält, gefolgt von einer Ficoll-Schicht, unterhalb dieser sammeln sich Erythrozyten und Granulozyten an.

Als Ausgangsmaterial wurde porcines heparinisiertes Vollblut verwendet. In einem konischen 50 ml Röhrchen (TPP) wurden 10 ml Ficoll (PAA) vorgelegt und vorsichtig mit 10 ml Blut überschichtet. Die Phasentrennung erfolgte durch eine zwanzigminütige Zentrifugation bei 800 x g ohne Bremse (MEGAFUGE 1.0 R, Heraeus). Die Interphase zwischen der Plasma- und der Ficollschicht wurde mit einer sterilen Pipette isoliert, in ein neues Falcon überführt und mit sterilem PBS auf 50 ml aufgefüllt. Es folgte eine Zentrifugation (340 x g, 10 min, RT) und die anschließende Entfernung des Überstandes. Dieser Waschschrift wurde drei Mal wiederholt. Abschließend wurden die isolierten PBMC in RPMI-1640 (Invitrogen) resuspendiert, einer Zellzahlbestimmung unterzogen und in den jeweiligen Versuch eingesetzt.

#### **3.4.5 Mitogen-Stimulation porziner PBMCs**

Zur Simulation einer Antigen-induzierten Aktivierung von PBMCs im Zuge einer Xenotransplantation wurden porcine PBMCs mit dem Mitogen Phytohämagglutinin stimuliert. Hierfür wurden je  $1 \times 10^6$  PBMCs pro 24er well in RPMI ausplattiert und mit 80 µg/ml PHA stimuliert. Der Versuchsansatz erfolgte jeweils in Triplikaten. Für alle PHA-stimulierten PBMC-Ansätze wurden zur Kontrolle jeweils unstimulierte PBMCs mitkultiviert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen wurde der Zellkulturüberstand für die Bestimmung der RT Aktivität (3.3.10) abgenommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Aus den stimulierten und unstimulierten PBMCs wurde zur Bestimmung der PERV-Expression RNA isoliert (3.2.7).

#### **3.4.6 Transfektion eukaryontischer Zellen mit Plasmid-DNA**

Unter einer Transfektion versteht man das Einbringen von DNA oder RNA in eukaryotische Zellen. Dabei wird zwischen dem nur zeitweiligen Einbringen des Plasmids in die Wirtszelle (transiente Transfektion) und dem dauerhaften Einbau in das Genom (stabile Transfektion) unterschieden. Je nach Zellart eignen sich verschiedene Verfahren. Für adhärente Zellen empfiehlt sich der Einsatz der Lipofektion oder der Kalziumphosphatpräzipitation. Aufgrund der negativen Ladung der Nukleinsäuren kommt es zu elektrostatischen Wechselwirkungen der kationischen Lipide mit der DNA, was eine Fusion der DNA-Liposomen-Komplexe mit der Zellmembran ermöglicht. Bei der Kalziumphosphatpräzipitation hingegen bindet die Plasmid-DNA an ausgefallenes Kalziumphosphat einer u.a. aus Kalziumchlorid und Natriumphosphat bestehenden Lösung. Diese DNA-Kalziumphosphat-Kristalle können von der Zelle durch Endozytose aufgenommen werden.

Zur Transfektion eukaryontischer Zellen mit Hilfe kationischer Liposomen wurde das Transfektionsreagenz LIPOFECTAMINE 2000 (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Zur Transfektion mittels Kalziumphosphatpräzipitation wurden die Zellen einen Tag zuvor in einer Zelldichte von  $2 \times 10^6$  pro 10 cm Petrischale (TPP) ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion Konfluenz von ca. 30% aufwiesen. Die verwendeten Lösungen wurden unter sterilen Bedingungen vorbereitet. 40 µg Plasmid-DNA wurden mit 500 µl 250 mM  $\text{CaCl}_2$  vermischt, tropfenweise unter ständigem Mischen zu 500 µl 2x HBS-Puffer (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 42 mM HEPES, 11 mM Glukose, pH 7,05) gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit bildeten sich die Präzipitate. Dieses Gemisch wurde anschließend tropfenweise zu den Zellen hinzugegeben und gemischt. Nach 6 bis 8 Stunden Inkubation der Zellen mit der Transfektionslösung wurde das präzipitathaltige Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt.

#### 3.4.7 Herstellung lentiviraler Partikel

Die Verwendung lentiviraler Partikel ermöglicht einen effektiven Gentransfer auf schlecht transfizierbare eukaryontische Zellen und die Integration sowie die stabile Expression des Transgens. Hierbei können sowohl sich teilende als auch sich nicht teilende Zellen transduziert werden. Aus Sicherheitsgründen ist die genetische Information der viralen Proteine und die des Transgens auf mehrere Plasmide verteilt. Auf diese Weise wird eine mögliche Rekombination verhindert. Zur Herstellung lentiviraler Partikel wurden Zellen der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293T mit drei Plasmiden kotransfiziert: dem Transfektorvektor pLVTHM, einem Verpackungsplasmid psPAX2 und einem Hüllplasmid pCL-VSV-G. Der Transfektorvektor pLVTHM besitzt zwei Promotoren, von denen der eine die Expression des GFPs und der andere die Expression der eingebrachten shRNA steuert. Das Verpackungsplasmid psPAX2 basiert auf dem Stamm 1 des Humanen Immundefizienz Virus (HIV-1). Das Core des lentiviralen Partikels sowie die enzymatischen Komponenten stammen von HIV-1, während das Hüllprotein, welches auf dem Hüllplasmid pCL-VSV-G kodiert ist, aufgrund seiner hohen Stabilität und seinem breiten Wirtstropismus vom Vesicular Stomatitis Virus (VSV) abgeleitet wurde.

Für die Transfektion wurden am Vortag  $2,5 \times 10^6$  293T Zellen in 10 cm Petrischalen (TPP) ausplattiert. Die Transfektion erfolgte mittels Kalziumphosphatpräzipitation (siehe 3.4.6). Die verwendeten Mengen an endotoxinfreier Plasmid-DNA sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellkulturüberstände abgenommen, bei 1800 x g (MEGAFUGE 1.0 R, Heraeus) zur Pelletierung von Zellen und Zelltrümmern für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und mit Hilfe eines Filters mit einer Porengröße von 0,45 µm (Schleier & Huell) sterilfiltriert. Anschließend erfolgte eine Konzentrierung der lentiviralen Partikel mit Hilfe einer Ultrazentrifuge. Hierfür wurden je 33 ml des Zellkulturüberstandes in konische 33 ml fassende Zentrifugenröhrchen (Beckman) überführt und bei 26000 rpm und 4°C für 2 Stunden sedimentiert (ULTRAZENTRIFUGE L8-70, Beckman; Rotor SW28). Nach vorsichtigem Abnehmen des Überstandes wurde das Viruspellet über Nacht mit 100 µl kaltem PBS inkubiert, anschließend resuspendiert und in 30 µl-Aliquots bei -80°C gelagert.

Tabelle 3.10: Plasmide für die Herstellung lentiviraler Partikel

Plasmid	Bezeichnung	zu transfizierende Menge
Transfervektor	PLVTHM	20 µg
Verpackungsplasmid	psPAX2	15 µg
Hüllplasmid	pCL-VSV-G	6 µg

### 3.4.8 Bestimmung des Titers lentiviraler Vektoren

Um bei späteren Transduktionsversuchen stets vergleichbare Mengen Virus einzusetzen, wurde der Titer der hergestellten lentiviralen Vektoren bestimmt. Die Titration basierte auf der Messung der GFP-Expression transduzierter Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie (3.4.10). Die lentiviralen Partikel kodieren u.a. das Gen EGFP und transferieren dieses in die Zielzellen. Auf diese Weise konnte die Zahl der GFP-exprimierenden Zellen eines Transduktionsansatzes analysiert und ein entsprechender Titer berechnet werden.

Für die Titration der lentiviralen Partikel wurden  $4 \times 10^5$  293-, HeLa-Zellen oder porcine Fibroblasten pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät und bei 37°C inkubiert. Am Tag darauf wurde das Medium gegen frisches ersetzt und unterschiedliche Volumina (100 µl, 50 µl, 10 µl, 1 µl, 0,1 µl und 0,01 µl) der konzentrierten Virussuspension (siehe 3.4.7) und Polybrene (Hexadimethrine Bromid 10 µg/ml, Sigma-Aldrich) hinzugegeben. Nach 16 Stunden wurde das Medium erneut gewechselt und die Zellen für weitere 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen abgelöst, mit 2,7% Formaldehyd (Merck) in PBS fixiert und mit Hilfe des Durchflusszytometers (FACS Calibur, Beckton Dickinson) analysiert. Der Virustiter wurde näherungsweise nach folgender Formel für jedes eingesetzte Volumen Virussuspension berechnet:

$$\text{Titer (TU/ml)} = \frac{\text{eingesetzte Zellen} \times (\% \text{ GFP - positive Zellen} \div 100)}{\text{Volumen Virussuspension (in ml)}}$$

### 3.4.9 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht die spezifische Detektion von Proteinen auf der Oberfläche, bzw. in inneren Kompartimenten oder Plasma von Zellen. Hierfür werden Zielprotein-spezifische Antikörper oder Seren in Kombination mit fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern verwendet. Bei einer intrazellulären Detektion muss die Zellmembran zunächst mit Hilfe eines Detergenz permeabilisiert werden, um den Antikörpern Zugang zum Antigen zu verschaffen. Die fluoreszenzmarkierten Antikörper werden über eine UV-Lichtquelle im Fluoreszenzmikroskop angeregt, woraufhin sie Licht in einer farbstoffspezifischen Wellenlänge emittieren. Durch den Einsatz von auf den Farbstoff abgestimmten Filtern können interferierende Wellenlängen ausgeblendet werden.

Adhärenz wachsende Zellen wurden auf Deckgläschen (Roth) in einer 6-Well Platte (TPP) ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 70% kultiviert. Das Medium wurde entfernt, die Deckgläschen mit PBS gespült und mit 2% (v/v) Formaldehyd in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach drei zehnmütigen Waschschrinen mit PBS wurden die Zellen gegebenenfalls mit einer 1%-igen (v/v) Tritonlösung (Triton X100, Roth) für 15

Minuten permeabilisiert. Nach der Permeabilisierung der Zellen folgten drei weitere Waschschrte. Unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation mit einer Blockierungslösung (5% (w/v) Milchpulver (Sucofin) in PBS) für 1 Stunde bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit (Brutschrank BBD 6220, Heraeus) abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem entsprechend in Blockierungslösung verdünnten Primärantikörper (z.B. Ziegenserum 16, Verdünnung siehe Tab. 2.6) für 60 Minuten im Brutschrank. Nach drei fünfminütigen Waschschrten mit PBS wurden die Zellen für 1 Stunde bei 37°C mit dem entsprechenden FITC-gekoppelten, Spezies-spezifischen Sekundärantikörper (DakoCytomation) in der vom Hersteller angegebenen Verdünnung in Blockierungslösung inkubiert. Im Anschluß an drei weitere fünfminütige Waschschrte mit PBS wurden die Deckgläschen aus den *wells* genommen, zusammen mit ProLong® Antifade Reagent (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers auf Objektträger gegeben (dabei Zellen nach unten), über Nacht getrocknet und anschließend im Dunkeln gelagert. Die Zellen konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop (ECLIPSE E600, Nikon) oder dem CSLM510 LASER-SCANNING MICROSCOPE (Zeiss) betrachtet werden, dabei wurde das FITC bei 488 nm angeregt und dessen Emission bei 530 nm detektiert.

#### 3.4.10 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS*®) ermöglicht es, die physikalischen und molekularen Eigenschaften einzelner Zellen in einem Flüssigkeitsstrom zu analysieren und zu sortieren. Zusätzlich zur Bestimmung von Zellgröße und Granularität des Zytoplasmas kann mit Hilfe der Durchflusszytometrie auch die Expression fluoreszierender Proteine wie z.B. GFP quantifiziert werden. Sobald diese Proteine durch einen Laserstrahl angeregt werden, emittieren sie Licht einer spezifischen Wellenlänge, welches mit *photomultipliern* verstärkt wird. Auf diese Weise ist es möglich unterschiedliche Fluoreszenzproteine oder Fluorochrome unabhängig von einander zu analysieren. Die Intensität des emittierten Lichts verhält sich proportional zur Menge des exprimierten fluoreszierenden Proteins, wodurch die Expressionsrate dieses Proteins einer einzelnen Zelle innerhalb gemischter Zellpopulationen gemessen werden kann. Des Weiteren ist es möglich, Zellen zuvor mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die sich gegen spezifische Oberflächenmoleküle richten, zu markieren. Nach einer solchen Markierung kann die Analyse oder auch die Sortierung nach Vorhandensein dieser Moleküle erfolgen.

Für die FACS-Analyse wurden  $1 \times 10^6$  bis  $5 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 30 Minuten in 2,7% (v/v) Formaldehyd bei RT fixiert und erneut mit PBS gewaschen. Da sowohl humane HeLa-Zellen als auch porcine foetale Fibroblasten dazu neigen, Aggregate mit anderen Zellen zu bilden, wurde die Zellsuspension zur Gewinnung einer einzelligen Suspension mit Hilfe von PRE SEPARATION FILTERS (Miltenyi Biotech) nach Angaben des Herstellers filtriert. Die Fluoreszenz wurde am Zytometer FACS CALIBUR (Beckton Dickinson) gemessen. Die Auswertung der Durchflusszytometrie erfolgte mit Hilfe der Software CELLQUEST PRO (Beckton Dickinson).

Für das Sortieren der Zellen nach GFP-Expression wurden diese mit Hilfe der PRE SEPARATION FILTERS (Miltenyi Biotech) nach Angaben des Herstellers filtriert und direkt

eingesetzt. Das Sortieren erfolgte mit dem MOFLO HIGH-PERFORMANCE CELL SORTER (Dako) beim FACS-Service der Max Planck-Institutes für Infektionsbiologie (Berlin).

### 3.4.11 Erzeugung transgener Schweine

Die Generierung transgener Schweine wurde von Dr. Björn Petersen (Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Institut für Tierzucht, Mariensee) nach der Methode des Nukleus-Transfers (HOLKER et al., 2005) durchgeführt.

## 3.5 Immunologische Methoden

### 3.5.1 Immunisierung mit rekombinanten Proteinen

Zur Antikörpergewinnung wurden Versuchstiere (weibliche Wistar Ratten oder Ziegen) mit dem entsprechenden rekombinant hergestellten Antigen immunisiert. Unmittelbar vor der Immunisierung wurde das in PBS aufgenommene Antigen im Verhältnis 1:1 mit öligem (Adjuvans INCOMPLETE FREUND'S ADJUVANT, Pierce) vermischt und durch Suspendieren mit Hilfe einer Kanüle ( $\varnothing$  0,6 mm, BD) in eine sahnige Konsistenz versetzt. Die Immunisierungen erfolgten durch intramuskuläre (i.m.) und subkutane (s.c.) Injektionen der Antigene. Die Mengen und die Applikationsorte der Injektionen sind in Tabelle 3.11 aufgeführt:

Tabelle 3.11: Applikationsschema für die Immunisierung von Ratten und Ziegen

Versuchstier	Menge Antigen	Volumen Antigen-Adjuvans-Gemisch	Injektionen
Wistar Ratte	150 $\mu$ g	1 ml	je 250 $\mu$ l i.m., in beide Hinterläufe 500 $\mu$ l s.c. in die Nackenfalte
Ziege	250 $\mu$ g	2 ml	je 1 ml i.m. in beide Hinterläufe

Drei Wochen nach der ersten Immunisierung erfolgte der erste *boost* mit dem gleichen Antigen, sechs Wochen später der zweite, jeweils nach dem gleichen Applikationsschema. Vor der ersten Immunisierung und drei Wochen nach jedem *boost* wurde den Tieren Blut entnommen (den Ziegen ca. 50 ml, den Ratten 1 ml) und dieses zur Serumgewinnung zunächst drei Stunden bei 4°C inkubiert. Das entstandene Koagulat wurde bei 4000 x g für 30 Minuten zentrifugiert (MEGAFUGE 1.0 R, Heraeus; CENTRIFUGE 5415D, Eppendorf), der Serumüberstand abgenommen, 30 min bei 56°C dekomplementiert und nach Zusatz von Penicillin/Streptomycin (Biochrom) bei 4°C gelagert.

### 3.5.2 DNA-Vakzinierung

Zur Induktion einer humoralen sowie einer zellulären Immunantwort wurden weibliche Wistar-Ratten mit an Goldpartikel präzipitierten DNA-Konstrukten immunisiert. Diese wurden mit Hilfe der HELIOS GENE GUN (BioRad) subkutan in die Bauchdecke der Tiere appliziert. Für jede aus vier Tieren bestehende Rattengruppe wurden zwölf Gold-DNA-beschichtete Patronen in das Magazin der gene gun geladen und jeder Ratte drei leicht

versetzte Schüsse bei 200 psi versetzt. Das Fell musste hierfür lokal rasiert werden. Während der Prozedur waren die Ratten mit Isofluran narkotisiert.

Vier Wochen nach der ersten Immunisierung erfolgte der erste Boost mit dem gleichen DNA-Konstrukt, weitere vier Wochen später der zweite. Zwei Wochen nach jedem Boost wurde den Tieren Blut entnommen. Die Serumgewinnung erfolgte wie oben beschrieben (3.5.1).

### 3.5.2 Neutralisationstest

Zum Nachweis der neutralisierenden Eigenschaften induzierter Seren wurde ein *in vitro* Neutralisationstest verwendet. Dieser *real-time* PCR-basierte Test beruht auf dem Nachweis der PERV-Provirusintegration nach einer 72-stündigen Inkubation uninfizierter 293-Zellen mit PERV-haltigen Zellkulturüberständen und den entsprechenden Immunsereen.

Zu diesem Zweck wurden pro Well einer sterilen 96-Well-Flachbodenplatte (Nunc)  $3 \times 10^3$  uninfizierte 293-Zellen in 100  $\mu$ l Medium ausgesät. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37°C wurde das Medium vorsichtig abgenommen. In einer zweiten 96-Well-Platte wurden zuvor 100  $\mu$ l eines zuvor titrierten PERV-5°-Virusstocks 1:2 verdünnt, mit 100  $\mu$ l vorverdünntem dekomplementiertem Serum (1:10 bzw. 1:20 Verdünnung im Well) gemischt und bei 37°C für 45 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die mit den Seren vorinkubierten Überstände auf die Zellen pipettiert.

Nach 72 Stunden wurden die Überstände abgenommen und die Zellen lysiert. Die Zellyse erfolgte durch dreimaliges Einfrieren (-80°C) und Auftauen (56°C). Durch eine anschließende dreistündige Inkubation mit 100  $\mu$ l einer Proteinase K-Lösung (20 mg/ml, Invitrogen) bei 56°C wurden DNA-assoziierte Proteine enzymatisch abverdaut. Im Anschluß erfolgte eine 30-minütige Inaktivierung der Proteinase K bei 95°C. Das Zellysats wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert oder direkt als *template* für die *real-time* PCR zum Provirusnachweis eingesetzt. Alle Proben wurden dabei als Triplikate gemessen. Die Auswertung des Neutralisationstests erfolgte über die  $C_T$ -Werte. Der  $C_T$ -Wert einer Probe in Relation zur Kontrolle ermöglichte die Quantifizierung des Ausgangsmaterials. Die Messwerte der Kontrollseren (Seren einer mit Adjuvans oder Leervektor immunisierten Rattengruppe oder Präimmunsereen) wurden mit einer 100%igen Infektion gleichgesetzt. So konnte über die folgende Formel der Grad der Provirusintegration in % berechnet werden:

$$I [\%] = E^{-\Delta CT} \times 100, \quad \text{mit } E = 2 \text{ und } \Delta CT = \text{Mittelwert } C_T \text{ Serum} - \text{Mittelwert } C_T \text{ Kontrollserum}$$

Die Normalisierung erfolgte über die GAPDH-Messwerte, indem die Differenz aus beiden  $C_T$ -Werten gebildet wurde ( $C_{T_i} = C_{T_{\text{Virus}}} - C_{T_{\text{GAPDH}}}$ ). Wichen Messwerte um mehr als 1  $C_T$  von dem Mittelwert aller GAPDH-Werte ab, so wurde der Messwert in der Berechnung der Provirusintegration nicht berücksichtigt.

Die Neutralisation ist der Provirusintegration bzw. der Infektion entgegengesetzt und wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Neutralisation } [\%] = 100 - I$$



Die Fehlerberechnung der Neutralisation wurde mit Hilfe der Gaußschen Fehlerfortpflanzung ermittelt.

$$\Delta N = \sqrt{\left(\frac{\delta N}{\delta \bar{c}_x} \cdot \Delta \bar{c}_x\right)^2 + \left(\frac{\delta N}{\delta \bar{c}_K} \cdot \Delta \bar{c}_K\right)^2}.$$

Die Einzelfehler von  $\bar{c}_x$  und  $\bar{c}_K$  resultierten dabei aus der Standardabweichung der Einzelmesswerte.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Evaluierung des Risikos der PERV-Übertragung bei der Xenotransplantation

#### 4.1.1 PERV-Provirusintegration in Schweinen verschiedener Rassen sowie transgenen und multitransgenen Schweinen

Aufgrund hoher Sequenzhomologien der PERV-Subtypen besteht die Möglichkeit einer Rekombination zwischen PERV-A und PERV-C, die mit einer Adaption an humane Zellen und einer gesteigerten Virusreplikation einhergehen kann (1.2.6, WILSON et al., 1998, WILSON et al., 2000, DENNER et al., 2003). Um das Risiko einer solchen Rekombination hinsichtlich der Xenotransplantation zu minimieren, ist die Auswahl PERV-C-negativer Schweine von bedeutendem Interesse.

Zur Einschätzung der PERV-C-Verteilung in den Schweinebeständen der Kooperationspartner der DFG-Transregioforschergruppe „Xenotransplantation“ (Prof. Dr. Niemann, Institut für Tierzucht, Mariensee und Prof. Dr. Wolf, Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, Ludwig-Maximilian-Universität, München) wurden Schweine verschiedener Rassen sowie zahlreiche transgene, für die Xenotransplantation relevante, Schweine verschiedener Kreuzungen hinsichtlich ihres PERV-Provirusintegrationsstatus untersucht. Hierfür standen Primer zur Verfügung, die die Unterscheidung der PERV-Subtypen A, B und C ermöglichten. Die benötigte DNA der Tiere wurde aus Ohrbiopsien, Vollblut oder isolierten PBMCs gewonnen und mittels PCR analysiert.

Die Proviren PERV-A und -B konnten erwartungsgemäß im Genom aller untersuchten Schweine nachgewiesen werden. Von den 184 analysierten Schweinen wurden 5 Tiere PERV-C-negativ getestet (Tabellen 4.1, 4.2).

**Tabelle 4.1: PERV-C-Status der getesteten Schweine verschiedener Rassen**

Rasse	Bezugsquelle	Zahl getesteter Tiere, $\Sigma = 81$	Zahl PERV-C-negativer Tiere
Deutsche Landrasse (DL)	Prof. Dr. Wolf, München	19	1
Duroc	Prof. Dr. Wolf, München	12	0
DL x Duroc bzw. Duroc x DL	Prof. Dr. Wolf, München	22	0
Schwäbisch-Hällisch	Prof. Dr. Wolf, München	10	0
Wildschweine	Dr. Jansen, RKI	18	0

Diese wurden zur Verifizierung des Ergebnisses mit Hilfe eines weiteren Primer-Sets sowie der *real-time* PCR analysiert. Hierfür wurde ein Duplex-Assay entwickelt, der es ermöglicht, den Anteil des PERV-Subtyps C an der gesamten Provirusintegration zu ermitteln. Auch mit dieser Nachweismethode wurden keine PERV-C-Sequenzen detektiert. Eines der PERV-C-negativen Tiere gehörte der „Deutschen Landrasse“ (DL) an, die anderen vier Tiere stammten aus Kreuzungen, die bis zu 50% DL enthielten.

**Tabelle 4.2: PERV-C-Status der getesteten transgenen Schweine**

\*Im Gegensatz zu den anderen hDAF-transgenen Tieren wurden diese Tiere nicht mittels Mikroinjektion sondern mit Hilfe lentiviraler Vektoren generiert.

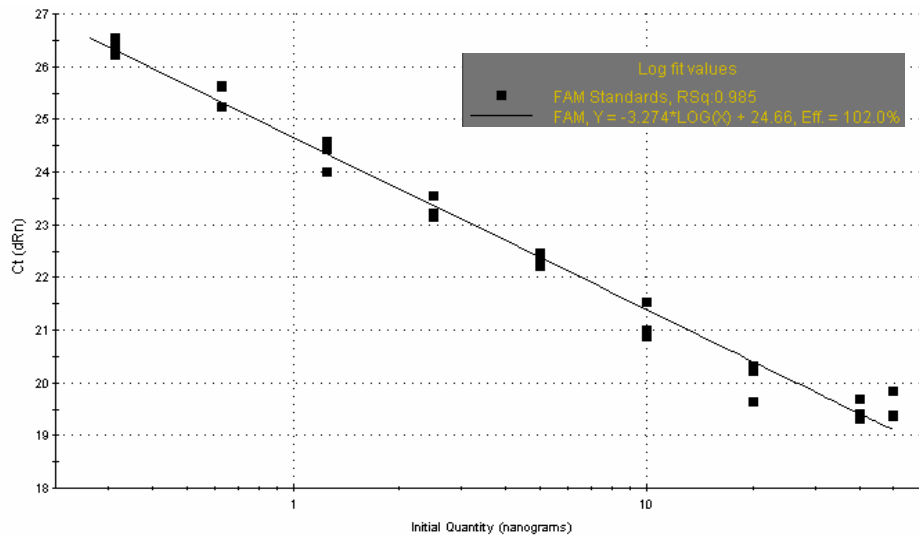
Transgene	Zahl getesteter Tiere, $\Sigma = 103$	Zahl PERV-C- negativer Tiere
GFP	1	0
TRAIL	13	0
HLA E	11	0
hDAF	22	1
Lenti-DAF*	5	2
TRAIL / HLA E	9	0
TRAIL / hDAF	22	1
HLA E / hDAF	6	0
TRAIL / HLA E / hDAF	6	0
hCD55, hCD59	1	0
hCD59, TRAIL	2	0
$\alpha$ -MHC	2	0

#### 4.1.2 Etablierung eines *one-step RT real-time PCR-assays* zur relativen Quantifizierung von PERV-mRNA

Zur Quantifizierung von PERV-mRNA wurde ein *one-step RT real-time PCR-assay*, der die cDNA-Synthese und die anschließende Amplifikation in einem Schritt vereint, basierend auf dem SUPERSRIPT™ III PLATINUM® ONE-STEP QRT-PCR KIT etabliert.

Primer und Sonde für die PERV *one-step RT real-time PCR* wurden von Uwe Fiebig übernommen (FIEBIG, 2007). Sie binden im *pol*-Gen und ermöglichen somit die Detektion viraler Vollängen-RNA. Die empfohlenen Konzentrationen von 10  $\mu$ M für die jeweiligen Primer und die Sonde erwiesen sich als optimal.

Zur Bestimmung der Effizienz der Reaktion mit den verwendeten Primern wurde eine Standardgerade erstellt. Für genaue und reproduzierbare Resultate sollte die Effizienz annähernd 100% betragen. Aus den  $C_T$ -Werten bei definierten Verdünnungen des *templates* lässt sich eine Standardgerade errechnen, über deren Steigung sich die Effizienz der Reaktion bestimmen lässt. Die Darstellung der Geraden zeigt die Verschiebung des  $C_T$ -Wertes um ungefähr einen Zyklus bei der Verdünnung der *template* RNA (PK-15-RNA) um 50%. Dies spiegelt die Verdopplung der *template* Menge während eines Zyklus wieder (Abb. 4.1). Die Effizienz errechnet sich aus der Steigung der Standardgeraden (102,0%). Das Bestimmtheitsmaß  $RSq$  (*R square*) gibt das Quadrat des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten an, ein dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei intervallskalierten Merkmalen. Er kann lediglich Werte zwischen -1 und 1 annehmen, bei einem Wert von +1 (bzw. -1) besteht ein vollständig positiver (bzw. negativer) linearer Zusammenhang. Wenn der Korrelationskoeffizient den Wert 0 aufweist, hängen die beiden Merkmale nicht linear voneinander ab. Liegt das Bestimmtheitsmaß nahe dem Idealwert 1, wie in diesem Fall bei 0,985, ist die ermittelte Standardgerade verlässlich. Die Effizienz der Reaktion wurde mit Hilfe der Standardkurven-Berechnung der MX4000 *software* bestimmt.



**Abbildung 4.1: Bestimmung der Effizienz der *one-step* RT *real-time* PCR**  
Standardgerade der PK-15-RNA-Ausverdünnung, dargestellt sind die CT-Werte in Abhängigkeit der eingesetzten *template* Menge. RSq: Bestimmtheitsmaß

Davon ausgehend, dass die Effizienz, mit der die einzelnen Reaktionen in den zu untersuchenden Proben ablaufen, immer gleich ist, lässt sich die PERV-Expression relativ zu einem Kalibrator (z.B. RNA einer Zelllinie oder von unbehandelten Zellen) mit einer Modifizierung der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (LIVAK UND SCHMITTGEN, 2001) bestimmen. Die Normalisierung der PERV-Expression erfolgte auf die Menge der eingesetzten Gesamt-RNA oder auf die Expression unterschiedlicher porziner *house keeping* Gene. Hierfür wurden die von Duvigneau et al konzipierten Primer und Sonden für die porzinen Gene GAPDH, Cyclophilin und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) verwendet (DUVIGNEAU et al., 2005) und auf die *one-step* RT *real-time* PCR angepasst. Keines der verwendeten Gene eignete sich uneingeschränkt für die Normalisierung, da die Expressionslevel zum Teil stark von dem der PERV-Expression abwichen, sich die Expressionslevel in verschiedenen Geweben unterschieden und durch Veränderungen der experimentellen Konditionen ebenfalls veränderten (5.1.2). Die Art der Normalisierung wurde für jeden Versuchsansatz abhängig vom Level der PERV-Expression, der Stabilität der Expression der *house keeping* Gene unter den gewählten Bedingungen sowie der Vergleichbarkeit der *house keeping*-Genexpression in den entsprechenden Zellen oder Organen gewählt.

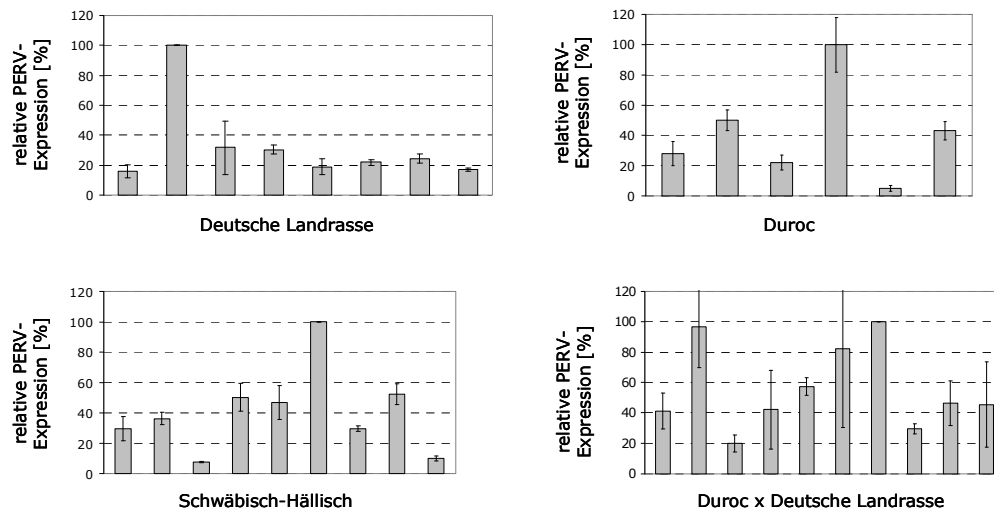
#### 4.1.3 PERV-Expression in Schweinen verschiedener Rassen sowie transgenen und multitransgenen Schweinen

Wie bereits beschrieben, variiert die Expression von PERV-mRNA zwischen verschiedenen Schweinestämmen (TACKE et al., 2000b, TACKE et al., 2003). Diese Tatsache bildet die Grundlage für eine weitere Strategie zur Minimierung des PERV-Übertragungsrisikos hinsichtlich der Xenotransplantation: die Auswahl von Schweinerassen, die wenig PERV exprimieren und freisetzen.

Zur Einschätzung der PERV-Expression in den Schweinebeständen des DFG-Transregioprojekts „Xenotransplantation“ wurden Schweine verschiedener Rassen sowie

zahlreich generierte transgene, für die Xenotransplantation relevante, Schweine verschiedener Kreuzungen hinsichtlich ihrer PERV-Expression untersucht.

Die hierfür benötigte RNA der Tiere wurde aus Vollblut oder isolierten PBMCs gewonnen und mit Hilfe der in Kapitel 3.1.2 beschriebenen *one-step RT real-time PCR* analysiert. Abbildung 4.2 zeigt die relative PERV-Expression in Würfen der Rassen Duroc (Du), Deutsche Landrasse (DL) und Schwäbisch-Hällisch (SH) sowie im Wurf einer Kreuzung der Rassen Duroc und Deutsche Landrasse (Du x DL).



**Abbildung 4.2: Relative PERV-Expression in PBMCs unterschiedlicher Schweinerassen innerhalb eines Wurfes**

Die Daten wurden mittels *one-step RT real-time PCR* erhoben. Die jeweils höchste PERV-Expression innerhalb eines Wurfes wurde gleich 100% gesetzt und die PERV-Expressionen der anderen Tiere des Wurfes darauf bezogen. Normalisiert wurden die Daten auf die eingesetzte Menge Gesamt-RNA.

Die jeweils höchste PERV-Expression wurde gleich 100% gesetzt und die PERV-Expressionen der anderen Tiere des Wurfes darauf bezogen. Normalisiert wurden die Daten auf die eingesetzte Menge Gesamt-RNA. In allen Würfen konnte eine variable PERV-Expression ermittelt werden (Abb. 4.2).

In Tabelle 4.3 sind die relativen PERV-Expressionen der PBMCs der untersuchten Tiere in Bezug auf die Zelllinien PK-15 und 293/5° sowie deren Geschwisterverhältnisse dargestellt. Im Vergleich zu diesen Zelllinien lag die PERV-Expression der untersuchten Schweinerassen unter 2% (PK-15) bzw. 1% (293/5°). Zwischen den getesteten Schweinerassen bzw. Kreuzungen war kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der PERV-Expression zu beobachten.

Auch die untersuchten transgenen Tiere der Kreuzungen Deutsches Edelschwein (DE) x Minipig (MP) x Duroc (Du) zeigten eine variable PERV-Expression innerhalb der Würfe. Im Vergleich zu den Zelllinien PK-15 und 293/5° lag die PERV-Expression der untersuchten transgenen Schweine unter 7% (PK-15) bzw. 2% (293/5°). Die PERV-Expression in den PBMCs der Tiere dieser transgenen Kreuzung ist im Vergleich zu den bereits beschriebenen Tieren der Rassen Du, DL, Du x DL und SH leicht erhöht (Tab. 4.3). Nicht transgene Tiere der Rassen DE und MP standen leider nicht zur Verfügung.

**Tabelle 4.3: Relative PERV-Expression in den PBMCs der getesteten Schweine**

Die Daten wurden mittels *one-step* RT *real-time* PCR erhoben. Die PERV-Expression der Zelllinien PK-15 bzw. 293/5° wurden gleich 100% gesetzt und die PERV-Expressionen der Tiere des jeweiligen Wurfes darauf bezogen (% von PK-15, % von 293/5°). Zusammengehörende Würfe sind durch Striche voneinander abgegrenzt. Stabw: Standardabweichung)

Tier	Rasse / Kreuzung	Transgene	% von PK-15	Stabw.	% von 293/5°	Stabw.
X42	Du x DL	-	0,23	0,06	0,04	0,002
X43	Du x DL	-	0,53	0,15	0,09	0,005
X44	Du x DL	-	0,14	0,04	0,02	0,002
X46	Du x DL	-	0,21	0,06	0,03	0,002
X47	Du x DL	-	0,28	0,08	0,04	0,003
X48	Du x DL	-	0,30	0,09	0,05	0,01
X49	Du x DL	-	0,47	0,13	0,07	0,01
X50	Du x DL	-	0,16	0,04	0,03	0,002
X51	Du x DL	-	0,22	0,07	0,04	0,01
X53	Du x DL	-	0,23	0,06	0,04	0,002
Y54	DL	-	0,17	0,05	0,03	0,002
Y55	DL	-	1,21	0,33	0,19	0,01
Y56	DL	-	0,38	0,10	0,06	0,004
Y58	DL	-	0,39	0,10	0,07	0,004
Y59	DL	-	0,26	0,07	0,04	0,002
Y60	DL	-	0,26	0,07	0,05	0,004
Y61	DL	-	0,31	0,08	0,05	0,002
Y62	DL	-	0,21	0,03	0,03	0,002
Z65	SH	-	0,69	0,19	0,11	0,01
Z66	SH	-	0,70	0,19	0,12	0,01
Z67	SH	-	0,16	0,04	0,02	0,001
Z68	SH	-	1,00	0,31	0,16	0,03
Z69	SH	-	1,07	0,30	0,17	0,01
Z70	SH	-	2,09	0,57	0,33	0,02
Z71	SH	-	0,62	0,17	0,10	0,01
Z72	SH	-	0,98	0,27	0,16	0,01
Z73	SH	-	0,22	0,06	0,04	0,002
9426	MP x Du x DL	TRAIL, hDAF	6,07	1,67	0,97	0,06
9427	MP x Du x DL	HLAE	1,49	0,46	0,24	0,04
9432	MP x Du x DL	HLAE	5,12	1,39	0,82	0,04
9493	DE x MPx Du x DL	-	1,64	0,45	0,26	0,02
9496	DE x MPx Du x DL	TRAIL, hDAF	1,98	0,62	0,32	0,05
9501	DE x MPx Du x DL	hDAF	1,43	0,39	0,35	0,07
9502	DE x MPx Du x DL	TRAIL, hDAF	1,20	0,34	0,38	0,02
9504	DE x MPx Du x DL	hDAF	0,64	0,21	0,17	0,01
9506	DE x MPx Du x DL	hDAF	1,36	0,37	0,47	0,06
9507	DE x MP x Du	hDAF	1,69	0,46	0,27	0,01
9508	DE x MP x Du	hDAF	1,84	0,53	0,29	0,03
9509	DE x MP x Du	hDAF	1,42	0,40	0,23	0,02
9511	DE x MP x Du	TRAIL, hDAF	2,95	0,81	0,47	0,03
9513	DE x MP x Du	TRAIL, hDAF	6,94	1,88	1,11	0,06
9515	DE x MP x Du	hDAF	0,93	0,30	0,15	0,03
9517	DE x MP x Du	hDAF	1,32	0,37	0,21	0,02
9518	DE x MP x Du	hDAF	0,63	0,19	0,10	0,01
9519	DE x MP x Du	hDAF	2,69	0,73	0,43	0,02
9520	DE x MP x Du	HLAE, hDAF	1,53	0,41	0,24	0,01
9521	DE x MP x Du	HLAE, hDAF	1,16	0,32	0,18	0,01
9523	DE x MP x Du	hDAF	4,02	1,09	0,64	0,03
9524	DE x MP x Du	HLAE, hDAF	2,14	0,58	0,34	0,02
9525	DE x MP x Du	hDAF	3,33	0,97	0,53	0,06
9526	DE x MP x Du	hDAF	3,40	0,92	0,54	0,03
9527	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE, hDAF	2,20	0,60	0,35	0,02

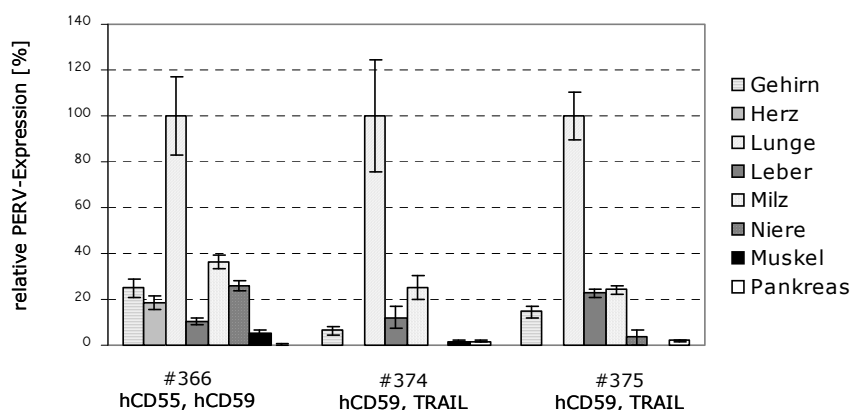
Tier	Rasse / Kreuzung	Transgene	% von PK-15	Stabw.	% von 293/5°	Stabw.
9528	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE, hDAF	2,25	0,62	0,36	0,02
9529	DE x MP x Du	HLAE, hDAF	1,23	0,33	0,20	0,01
9530	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE, hDAF	1,50	0,41	0,24	0,01
9075	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE	3,54	1,12	0,56	0,09
9077	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE	6,0	1,63	0,96	0,05
9228	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE	8,19	2,82	1,30	0,28
9232	DE x MP x Du	TRAIL	0,74	0,21	0,12	0,01
9482	DE x MP x Du	TRAIL, hDAF	4,54	1,71	0,72	0,19
9582	MP x Du x DL	HLAE, CD46	2,67	0,83	0,43	0,07

#### 4.1.4 PERV-Expression in unterschiedlichen Organen eines Tieres

Die PERV-Expression variiert nicht nur zwischen verschiedenen Schweinestämmen (TACKE et al., 2000b, TACKE et al., 2003), sondern auch in unterschiedlichen Organen und Geweben der Schweine (AKIYOSHI et al., 1998, CLEMENCEAU et al., 1999). Bei diesen Untersuchungen konnte bei Miniaturschweinen sowie *Large White* Schweinen jeweils im Pankreas die geringste PERV-Expression und in Thymus, Lunge und Niere die höchste PERV-Expression detektiert werden.

Zur Einschätzung der PERV-Expression in unterschiedlichen porzinen Organen wurden drei transgene Schweine der Rassen Deutsche Landrasse (DL) und DL x Minipig sowie fünf nicht transgene Schweine der Rassen DL hinsichtlich ihrer PERV-Expression untersucht. Die hierfür benötigte RNA wurde anhand einer kombinierten Methode mit Hilfe von TRI REAGENT und des RNEASY MINI KITS (3.2.7) aus den zur Verfügung stehenden Organen gewonnen und mit Hilfe der in Kapitel 3.1.2 beschriebenen *one-step RT real-time* PCR analysiert. Die Integrität der isolierten RNA wurde zuvor mit Hilfe einer *one-step* RT-PCR unter Verwendung GAPDH-spezifischer Primer überprüft.

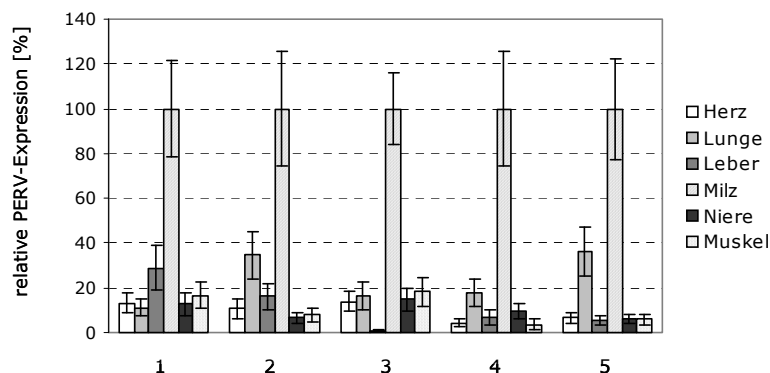
Bei den transgenen Tieren # 366 (hCD55, hCD59, DL), #374 (hCD59, TRAIL, DL x Minipig) und #375 (hCD59, TRAIL, DL x Minipig) konnte jeweils in der Lunge die höchste PERV-Expression bestimmt werden (Abb. 4.3).



**Abbildung 4.3: Relative PERV-Expression in unterschiedlichen Organen transgener Tiere**

Die Daten wurden mittels *one-step RT real-time* PCR erhoben. Die höchste PERV-Expression des jeweiligen Organs eines Tieres (Lunge) wurde gleich 100% gesetzt und die PERV-Expressionen der anderen Organe des Tieres darauf bezogen. Normalisiert wurden die Daten auf die eingesetzte Menge Gesamt-RNA.

Die Expression in der Lunge des jeweiligen Tieres wurde gleich 100% gesetzt und die PERV-Expressionen der anderen Organe des Tieres darauf bezogen. Bei den nicht transgenen DL Tieren (1 bis 5) wurde die jeweils höchste PERV-Expression in der Milz (gleich 100%) festgestellt und die Expressionen der anderen Organe darauf bezogen (Abb. 4.4). Keines der zur Verfügung stehenden *house keeping* Gene eignete sich uneingeschränkt für die Normalisierung. Die Expressionslevel der Gene GAPDH und Cyclophilin wichen stark von denen der PERV-Expression ab (5.1.2). Das Gen HPRT eignete sich in dieser Hinsicht. Jedoch variierten die Expressionslevel aller drei Referenzgene in verschiedenen Geweben (5.1.2). Die Normalisierung erfolgte daher auf die eingesetzte Menge Gesamt-RNA. Durch Normalisierung auf die verwendeten Referenzgene HPRT, GAPDH und Cyclophilin konnte die jeweils höchsten PERV-Expression in der Lunge bzw. in der Milz jedoch bestätigt werden.



**Abbildung 4.4 Relative PERV-Expression in unterschiedlichen Organen Deutscher Landrasse Schweinen**

Die Daten wurden mittels *one-step RT real-time PCR* erhoben. Die höchste PERV-Expression des jeweiligen Organs eines Tieres (Milz) wurde gleich 100% gesetzt und die PERV-Expressionen der anderen Organe des Tieres darauf bezogen. Normalisiert wurden die Daten auf die eingesetzte Menge Gesamt-RNA.

#### 4.1.5 Simulation einer Immunantwort porziner Zellen *in vitro*

Porzine endogene Retroviren werden von primären porzinen Zellen freigesetzt (MARTIN et al., 1998a, TACKE et al., 2003, WILSON et al., 1998) und sind in der Lage, humane Zellen *in vitro* zu infizieren (MARTIN et al., 2000, SPECKE et al., 2001 a, b, c). Ob in transplantierten porzinen Zellen, Geweben oder Organen PERVs exprimiert und Partikel gebildet werden, die humane Zellen *in vivo* infizieren können, ist weiterhin unklar. Da bei der Xenotransplantation porziner Organe stets PBMCs mitübertragen werden, die durch das fremde Milieu einer Aktivierung unterlaufen könnten, wurde die PERV-Expression stimulierter und nicht-stimulierter porziner PBMCs miteinander verglichen. Zur Simulation einer Immunantwort, der Antigen-induzierten Aktivierung der PBMCs, wie sie bei einer Xenotransplantation wahrscheinlich ist, wurden die PBMCs mit dem T-Zell-Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert (TACKE et al., 2000b, TACKE et al., 2003). Hierfür wurden die PBMCs der in Tabelle 4.4 aufgeführten transgenen Schweine aus Heparin-Blut isoliert und in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen pro 24er *well* mit 80  $\mu\text{g/ml}$  PHA für 5 Tage inkubiert (siehe 3.4.5). Zur Kontrolle wurden die PBMCs jeweils ohne Zugabe von PHA inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Abnahme des Zellkulturüberstandes zur Bestimmung



der Aktivität Reverser Transkriptase (siehe 3.3.10) sowie die Lyse der Zellen zur RNA-Isolierung (siehe 3.2.7). Die RNA der PBMCs wurde mit Hilfe der unter Kapitel 3.2.15 beschriebenen *one-step RT real-time PCR* analysiert. Hierbei wurde die relative PERV-Expression der PHA-stimulierten sowie der nicht-stimulierten PBMCs bestimmt und auf die gleich 100% gesetzte Expression von PK-15-Zellen bezogen. Die Bestimmung der Reversen Transkriptase-Aktivität im Überstand der PBMC-Kulturen erfolgte mit Hilfe des C-TYPE RT ACTIVITY ASSAY (Cavidi, 3.3.10). In Tabelle 4.4 ist die PERV-Expression in PHA-stimulierten PBMCs im Vergleich zur Expression in nicht-stimulierten PBMCs sowie zur Expression in den Zelllinien PK-15 und 293/5° aufgeführt. Nach Normalisierung auf die Gesamt-RNA-Menge sowie auf unterschiedliche *house keeping* Gene konnte in den meisten Fällen ein Anstieg der PERV-Expression in den PBMCs nach PHA-Stimulation im Vergleich zu den nicht stimulierten PBMCs beobachtet werden.

**Tabelle 4.4: Vergleich der relativen PERV-Expression PHA-stimulierter und nicht stimulierter PBMCs transgener Schweine**

Die mittels *one-step RT real-time PCR* bestimmten Werte wurden auf die gleich 100% gesetzte Expression der Zelllinien PK-15 (% von PK-15) bzw. 293/5° (% von 293/5°) bezogen und auf die eingesetzte Menge Gesamt-RNA normalisiert. Zusammengehörende Würfe sind durch Striche voneinander abgegrenzt.

Tier	Rasse / Kreuzung	Transgene	% von PK-15	Stabw.	% von 293/5°	Stabw.	RT [mU/ml]	Stabw.
9426	MP x Du x DL	TRAIL, hDAF	4,79	1,3	0,76	0,04	0	0
9426 PHA	MP x Du x DL	TRAIL, hDAF	6,07	1,67	0,97	0,06	1,72	0,11
9427	MP x Du x DL	HLAE	1,49	0,46	0,24	0,04	0	0
9427 PHA	MP x Du x DL	HLAE	2,19	0,72	0,35	0,07	0	0
9432	MP x Du x DL	HLAE	3,91	1,10	0,62	0,06	0	0
9432 PHA	MP x Du x DL	HLAE	5,12	1,39	0,82	0,04	2,76	0,16
9507	DE x MP x Du	hDAF	1,69	0,46	0,27	0,01	0	0
9507 PHA	DE x MP x Du	hDAF	6,45	1,85	1,03	0,11	0	0
9508	DE x MP x Du	hDAF	1,84	0,53	0,29	0,03	0	0
9508 PHA	DE x MP x Du	hDAF	7,69	2,40	1,23	0,20	0	0
9509	DE x MP x Du	hDAF	1,42	0,40	0,23	0,02	0	0
9509 PHA	DE x MP x Du	hDAF	2,53	0,89	0,40	0,09	0	0
9511	DE x MP x Du	TRAIL, hDAF	2,95	0,81	0,47	0,03	0	0
9511 PHA	DE x MP x Du	TRAIL, hDAF	6,09	2,16	0,97	0,22	0	0
9513	DE x MP x Du	TRAIL, hDAF	6,94	1,88	1,11	0,06	0	0
9513 PHA	DE x MP x Du	TRAIL, hDAF	7,68	2,61	1,22	0,25	0	0
9515	DE x MP x Du	hDAF	0,93	0,30	0,15	0,03	0	0
9515 PHA	DE x MP x Du	hDAF	1,24	0,36	0,20	0,02	0	0
9517	DE x MP x Du	TRAIL, hDAF	1,32	0,37	0,21	0,02	0	0
9517 PHA	DE x MP x Du	TRAIL, hDAF	8,79	2,96	1,40	0,28	0	0
9518	DE x MP x Du	hDAF	0,63	0,19	0,10	0,01	0	0
9518 PHA	DE x MP x Du	hDAF	1,77	0,51	0,28	0,03	0	0
9519	DE x MP x Du	hDAF	2,69	0,73	0,43	0,02	0	0
9519 PHA	DE x MP x Du	hDAF	15,02	4,53	2,39	0,33	0	0
9520	DE x MP x Du	HLAE, hDAF	1,53	0,41	0,24	0,01	0	0
9520 PHA	DE x MP x Du	HLAE, hDAF	8,61	2,34	1,37	0,08	0	0
9521	DE x MP x Du	HLAE, hDAF	1,16	0,32	0,18	0,01	0	0
9521 PHA	DE x MP x Du	HLAE, hDAF	2,77	0,76	0,44	0,03	0	0
9523	DE x MP x Du	hDAF	4,02	1,09	0,64	0,03	0	0
9523 PHA	DE x MP x Du	hDAF	2,75	0,75	0,44	0,02	0	0
9524	DE x MP x Du	HLAE, hDAF	2,14	0,58	0,34	0,02	0	0
9524 PHA	DE x MP x Du	HLAE, hDAF	12,13	3,29	1,93	0,10	0	0
9525	DE x MP x Du	hDAF	3,33	0,97	0,53	0,06	0	0
9525 PHA	DE x MP x Du	hDAF	7,04	1,91	1,12	0,06	0	0

Tier	Rasse / Kreuzung	Transgene	% von PK-15	Stabw.	% von 293/5°	Stabw.	RT [mU/ml]	Stabw.
9526	DE x MP x Du	hDAF	3,40	0,92	0,54	0,03	0	0
9526 PHA	DE x MP x Du	hDAF	5,03	1,38	0,80	0,05	0	0
9527	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE, hDAF	2,20	0,60	0,35	0,02	0	0
9527 PHA	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE, hDAF	3,02	0,83	0,48	0,03	0	0
9528	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE, hDAF	2,25	0,62	0,36	0,02	0	0
9528 PHA	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE, hDAF	3,44	0,93	0,55	0,03	0	0
9529	DE x MP x Du	HLAE, hDAF	1,23	0,33	0,20	0,01	0	0
9529 PHA	DE x MP x Du	HLAE, hDAF	2,55	0,69	0,41	0,02	0	0
9530	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE, hDAF	1,50	0,41	0,24	0,01	0	0
9530 PHA	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE, hDAF	5,23	1,47	0,83	0,07	0	0
9075	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE	3,54	1,12	0,56	0,09	0	0
9075 PHA	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE	37,20	10,96	5,93	0,73	0	0
9077	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE	6,0	1,63	0,96	0,05	0	0
9077 PHA	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE	13,23	3,86	2,11	0,24	0	0
9228	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE	8,19	2,82	1,30	0,28	0	0
9228 PHA	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE	43,90	12,02	6,99	0,44	0	0
9232	DE x MP x Du	TRAIL	0,74	0,21	0,12	0,01	0	0
9232 PHA	DE x MP x Du	TRAIL,	39,45	10,94	6,29	0,48	0	0
9482	DE x MP x Du	TRAIL, hDAF	4,54	1,71	0,72	0,19	0	0
9482 PHA	DE x MP x Du	TRAIL, hDAF	4,54	1,71	2,92	0,41	0	0
9582	MP x Du x DL	HLAE, CD46	2,67	0,83	0,43	0,07	n.t.	n.t.
9582 PHA	MP x Du x DL	HLAE, CD46	11,09	3,22	1,77	0,20	n.t.	n.t.
PK-15	-	-	100	8,41	16,58	4,33	12,89	0,20
293/5°	-	-	628,95	32,74	100	7,23	26,12	0,21

Mit zwei Ausnahmen (9426 PHA und 9432 PHA) konnte im Überstand der PBMCs keine Reverse Transkriptase-Aktivität detektiert werden. Trotz der stark erhöhten PERV-Expression in den PHA-stimulierten PBMCs der Tiere 9075 und 9232 wurde keine RT-Aktivität im Zellkulturüberstand gemessen. Im Gegensatz dazu wurden in den Überständen der Zelllinien PK-15 und 293/5° Reverse Transkriptase-Aktivitäten von 12,89 bzw. 26,12 mU/ml bestimmt.

#### 4.1.6 Untersuchungen zur PERV-Übertragung nach Transplantation porziner Inselzellen auf Cynomolgus-Affen

Zahlreiche humane Zelllinien und primäre Zellen (WILSON et al., 2000, SPECKE et al., 2001a) sowie Zellen von Nerz, Katze und nicht-humaner Primaten wie Gorilla, Pavian und Rhesusaffen (BLUSCH et al., 2000, SPECKE et al., 2001a, SPECKE et al., 2002a, WILSON et al., 2000) sind *in vitro* mit PERV infizierbar. Aufgrund der phylogenetischen Nähe nicht-humaner Primaten zum Menschen stellen diese ein gutes Modell für die Untersuchung der Übertragung porziner Mikroorganismen im Zuge einer Xenotransplantation dar.

In Kooperation mit der Firma Living Cell Technologies Ltd in Auckland, Neuseeland wurde in einer prospektiven Studie die *in vivo* Übertragung porziner endogener Retroviren und anderer porziner Viren nach Transplantation porziner Inselzellen auf Cynomolgus-Affen untersucht.

Ein potentieller Einsatz einer solchen Inselzell-Xenotransplantation wäre die Behandlung von an Diabetes mellitus erkrankten Patienten, um das fehlende Insulin durch porcines Insulin zu ersetzen.

**Tabelle 4.5: Befunde der serologischen Analysen der transplantierten Cynomolgus-Affen**

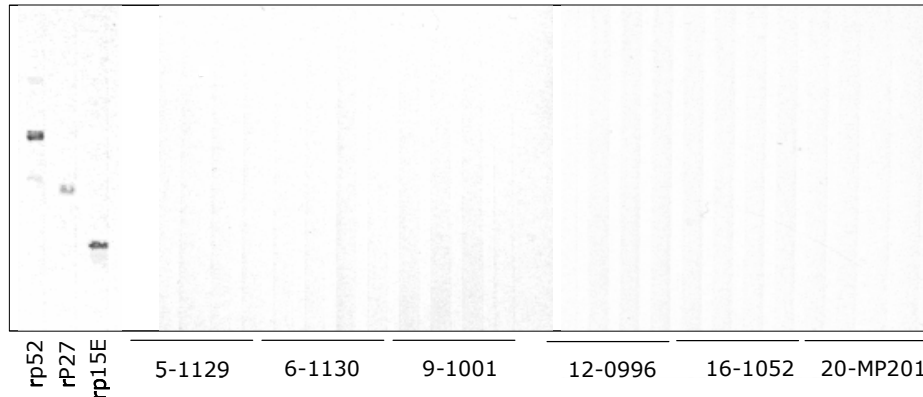
Die Seren der transplantierten Cynomolgus-Affen wurden mittels ELISA und Western-Blot-Analyse hinsichtlich PERV-spezifischer Antikörper getestet. Hierfür wurden die rekombinanten Proteine p15E, p27Gag und p52 sowie pelletierte PERV-Partikel verwendet.

Tier	Serum	Western-Blot-Analyse				ELISA	
		p15E	p27Gag	p52	pellet. PERV	p15E	p27Gag
5-1129	prä TX	-	-	-	-	-	-
	1 Monat post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post 2. TX	-	-	-	-	-	-
6-1130	prä TX	-	-	-	-	-	-
	1 Monat post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post 2. TX	-	-	-	-	-	-
9-1001	prä TX	-	-	-	-	-	-
	1 Monat post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post 2. TX	-	-	-	-	-	-
12-0996	prä TX	-	-	-	-	-	-
	1 Monat post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post 2. TX	-	-	-	-	-	-
16-1052	prä TX	-	-	-	-	-	-
	1 Monat post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post 2. TX	-	-	-	-	-	-
17-MP087	prä TX	-	-	-	-	-	-
	1 Monat post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post 2. TX	-	-	-	-	-	-
	6 Monate post 2. TX	-	-	-	-	-	-
18-MP018	prä TX	-	-	-	-	-	-
	1 Monat post TX	-	-	-	-	-	-
20-201	prä TX	-	-	-	-	-	-
	1 Monat post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post 2. TX	-	-	-	-	-	-

Bei acht männlichen Cynomolgus-Affen wurde durch Applikation einer Einzeldosis Streptozotocin (125 mg/kg) Diabetes induziert. Drei Wochen nach dieser Diabetes-Induktion erfolgte die Transplantation der Affen mit Alginat-verkapselten porcinen Inselzellen (10000 Inselzellequivalente pro kg) ohne Immunsuppression. Die Inselzellen wurden von fünf bis sieben Tagen alten Ferkeln gewonnen (ELLIOTT et al., 2005).

Die Verkapselung der Inselzellen erlaubt die Passage kleiner Moleküle wie Insulin und Glukose, nicht jedoch den Eintritt von zytotoxischen T-Zellen und Antikörpern, sowie die Freisetzung porciner Mikroorganismen. Somit sollten durch die Verkapselung zum einen die Inselzellen vor dem Immunsystem des Rezipienten geschützt und zum anderen die Freisetzung porciner Mikroorganismen verhindert werden. Blutabnahmen erfolgten vor der Transplantation und einen Monat, drei sowie sechs Monate nach der Transplantation. Sieben Tiere überlebten mehr als 3 Monate und der Insulin-Bedarf war bei diesen Tieren 30% geringer als bei einer Kontrollgruppe. Die Seren der transplantierten Tiere wurden sowohl mit Hilfe des ELISAs als auch mittels der Western-Blot-Analyse hinsichtlich PERV-spezifischer Antikörper untersucht. Für diese Analysen wurden die rekombinanten

Proteine p15E (FIEBIG et al., 2003), p27Gag (IRGANG et al., 2003) und p52 (siehe 4.2.3.2) sowie pelletierte PERV-Partikel aus dem Überstand PERV-infizierter 293-Zellen (293/5°) verwendet. In Tabelle 4.5 sind eine Übersicht der getesteten Tiere sowie die Befunde der serologischen Untersuchungen aufgeführt.



**Abbildung 4.5: Serologische Analyse der untersuchten Cynomolgus-Affen hinsichtlich PERV-spezifischer Antikörper**

Die Seren der transplantierten Cynomolgus-Affen wurden mittels Western-Blot-Analyse hinsichtlich spezifischer Antikörper gegen die rekombinanten PERV-Proteine rp52, rp27 Gag und rp15E getestet. Die Auftragung der Seren der jeweiligen Tiere entspricht der in Tabelle 4.5.

In keinem der untersuchten Seren konnten PERV-spezifische Antikörper detektiert werden. Abbildung 4.5 zeigt eine exemplarische Western-Blot-Analyse der Seren der Tiere 5-1129, 6-1130, 9-1001, 12-0996, 16-1052 und 20-MP201 hinsichtlich einer Bindung an die rekombinanten PERV-Proteine rp52, rp27Gag und rp15E.

#### 4.1.7 PERV-Expression in Melanomen der Münchner Miniatur Schweine Troll

Porzine endogene Retroviren zeigen große Homologien zu den murinen und felines Leukämieviren (MLV, FeLV), welche in der Lage sind Tumore (z.B Lymphosarkome und Leukämien) und Immundefizienzen zu induzieren (1.2.5). Sowohl die Expression von PERV als auch deren biologische Rolle in normalen Schweinen sowie in porzinen Tumoren ist bisher nicht umfassend untersucht. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass ein humanes endogenes Retrovirus (HERV-K) vom Typ der  $\beta$ -Retroviren in humanen Melanomen stark exprimiert wird. Hinsichtlich der Xenotransplantation ist es daher interessant, die PERV-Expression und eine eventuelle Bedeutung dieser Viren bei der Tumorentstehung zu untersuchen. Schweine der Rasse Münchner Miniatur Schwein (MMS) Troll weisen eine hohe Disposition zur Ausbildung angeborener sowie postnatal spontan auftretender melanozytischer Läsionen (Abb. 4.6), wie invasiven kutanen Melanomen, auf. In Tabelle 4.6 sind die untersuchten MMS und deren Phänotyp hinsichtlich Melanom- und Metastasenbildung aufgeführt.

**Tabelle 4.6: Phänotypen der untersuchten MMS Troll hinsichtlich Melanom- und Metastasenausbildung**

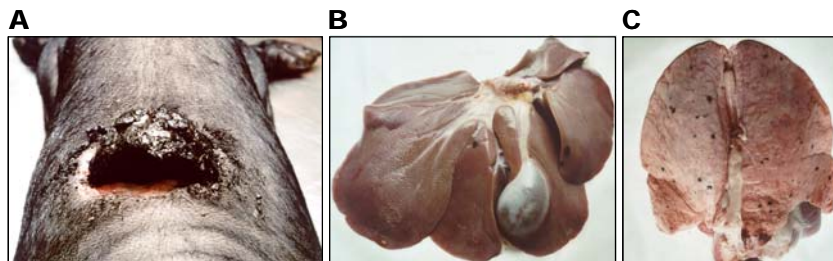
Alle MMS Troll zeigten ein oder mehrere Melanome, sowie z.T. Metastasen in verschiedenen Organen.

MMS	Haut	regionale Lymphknoten	Milz	Metastasen in weiteren Organen
#371	Melanom (1) multiple Nevi	Metastase	Metastasen	Lunge, Herz, Darm, Leber, Niere
#372	Melanome (3) multiple Nevi	Metastase	Metastasen	Zunge, Lunge, Herz, Magen, Darm, Leber, Niere
#472	Melanome (5) multiple Nevi	Metastase	Metastasen	Lunge, Magen, Darm, Leber, Niere
#499	Melanom (1) multiple Nevi	Metastase	unauffällig	keine

#### 4.1.7.1 Morphologie sowie histologische und immunhistochemische Charakterisierung der Melanome

Die untersuchten MMS Troll exprimierten einzelne oder multiple maligne, häufig eiternde, Melanome (Abb. 4.6 A). Melanomatöse Läsionen wurden des Weiteren in regionalen Lymphknoten und in einer Vielzahl innerer Organe, wie z.B. in der Lunge, der Leber und der Milz gefunden (Abb. 4.6 B, C, Tabelle 4.6).

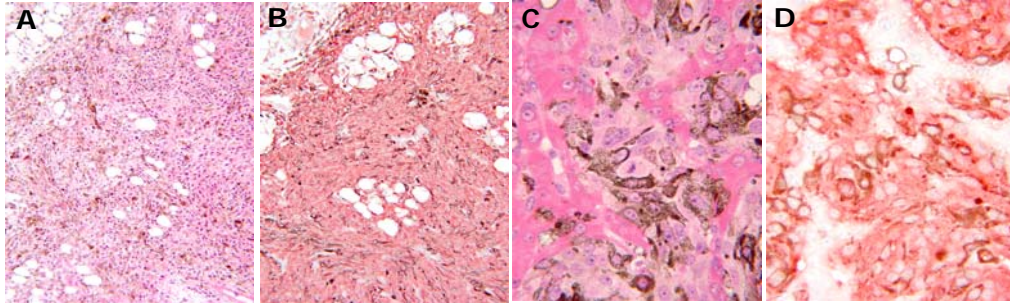
Histologische Untersuchungen mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin-Färbung zeigten, dass die Haut-Tumore aus stark pigmentierten Melanomzellen bestanden, die bereits in die Dermis und subkutanes Gewebe eingedrungen waren.



**Abbildung 4.6: Melanome und Metastasen der MMS Troll**

A: Kutaner Melanom auf dem Rücken B: Melanommetastasen in der Leber und C: in der Lunge (DIECKHOFF et al., 2007b)

Mittels Immunhistochemie konnten Pigment-beladene Makrophagen beobachtet werden. Die regionalen Lymphknoten wiesen eine starke Infiltration von Melanomzellen auf, die in der Zerstörung der Gewebestruktur resultierte (Abb. 4.7 A, B). Mit Hilfe der Immunhistochemie konnte für Zellen beider Melanome sowie der Metastasen eine starke Reaktivität mit dem monoklonalen Antikörper HMB-45 gezeigt werden (Abb. 4.7 C, D). Dieser färbt ein zytoplasmatisch lokalisiertes Antigen (gp100) in Melanozyten und melanozytären Tumoren an. Das Antigen repräsentiert eine Komponente der melanosomalen Oxidoreduktasen und ist somit Melanosomen-spezifisch. HMB-45 lässt sich in ca. 85% der malignen Melanome nachweisen.



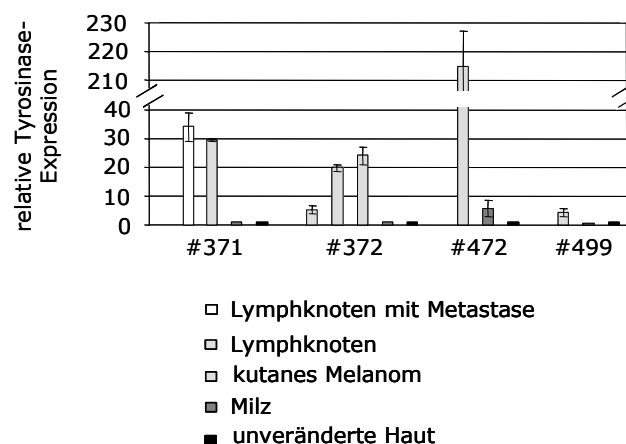
**Abbildung 4.7: Histologische (A, B) und immunohistochemische Analyse eines kutanen Melanoms (A, C) und einer Lymphknotenmetastase (B, D)**

**A:** Kutanes Melanom: Invasion von subkutanem adipösem Gewebe (Paraffinschnitt, Hämatoxylin- und Eosin-Färbung nach Bleichen). **B:** Melanommetastase in einem regionalen Lymphknoten: Tumorzellen haben das lymphatische Gewebe großflächig ersetzt (Kunststoffschnitt, Hämatoxylin- und Eosin-Färbung). **C:** Invasives kutanes Melanom: Die Melanomzellen wurden mit Hilfe des Antikörpers HMB45 angefärbt (rot), verstreute, pigment-beladene Makrophagen (braun) (Paraffinschnitt, indirekte Immun-Alkalische Phosphatase Immunhistochemie).

**D:** Melanommetastase in einem regionalen Lymphknoten: Die Melanomzellen wurden immunohistochemisch mit HMB45 angefärbt (Paraffinschnitt, indirekte Alkalische Phosphatase Immunhistochemie). (DIECKHOFF et al., 2007b)

#### 4.1.7.2 Melanom-Marker

Zahlreiche Melanom-Marker wurden getestet, um zu verifizieren, dass das hinsichtlich der PERV-Expression zu untersuchende Gewebe tatsächlich Tumormaterial enthält. Da bislang keine Marker für porcine Melanome beschrieben sind, wurden drei humane Melanommarker verwendet: MIA (*melanoma inhibitory activity*), MART-1 (*melanoma antigen recognized by T-cells*) und gp100 (*recognized by cytotoxic T lymphocytes*) (PEREZ et al., 2000). Weil die Sequenzen von porcinem MIA, MART-1 und gp100 in der NCBI-Datenbank nicht erhältlich waren, wurden die von Perez et al. publizierten, für humanes MIA, MART-1 und gp100 spezifischen Primer auf porciner DNA getestet. Sie zeigten jedoch kein Amplifikat im porcinen System und konnten somit nicht verwendet werden.



**Abbildung 4.8: Expression porciner Tyrosinase in Melanomen, Lymphknoten mit Metastase und unverändertem Gewebe von vier verschiedenen MMS**

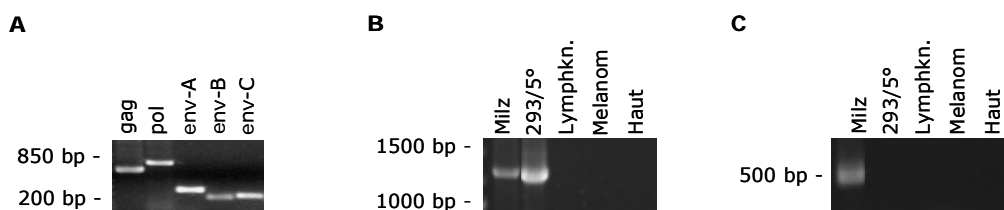
Die Daten wurden mittels SYBR GREEN RT *real-time* PCR erhoben. Die jeweilige Expression in normaler Haut wurde gleich 1 gesetzt und die Expression der anderen Gewebe darauf bezogen (DIECKHOFF et al., 2007b).

Da die porcine Sequenz für einen weiteren beschriebenen Melanommarker, die Tyrosinase, bereits beschrieben wurde (Acc. No. NM\_001025212), wurden basierend auf dieser Sequenz spezifische Primer für das Tyrosinase-Gen konzipiert und in eine *one-step* RT-PCR eingesetzt. Die Größe des Amplifikats betrug 177 bp.

Anschließend wurde die Tyrosinase-Expression in den unterschiedlichen porcinen Geweben mit Hilfe der SYBR Green *real-time* PCR analysiert. In den kutanen Melanomen konnte eine höhere Tyrosinase-Expression nachgewiesen werden als in den unveränderten Haut-Proben, sowie in Lymphknoten- und Milzproben, bis zu 215-fach erhöht (Abb. 4.8).

#### 4.1.7.3 PERV-Provirusintegration im Genom der MMS Troll

Der PERV-Subtyp C ist nicht im Genom aller Schweine vorhanden (1.2.6), daher wurden zunächst alle verwendeten Schweine hinsichtlich der PERV-Provirusintegration innerhalb ihres Genoms untersucht. Mittels PCR und der Verwendung *gag*-, *pol* und *env*-spezifischer Primer konnten Proviren aller drei Subtypen (PERV-A, -B, C) im Genom der verwendeten MMS Troll #007, #371, #372, #472 und #499 detektiert werden. Abbildung 4.9 A zeigt die nach der Auftrennung im Agarosegel erhaltenen Amplifikate exemplarisch für Tier #007. Des Weiteren konnte in der Milz der Tiere #371 und #372, jedoch nicht in anderen Organen, die Präsenz zweier verschiedener PERV-A/C-rekombinanten Proviren festgestellt werden (Abb. 4.9 B, C).



**Abbildung 4.9: PERV-Provirusintegration und PERV-A/C-Rekombination**

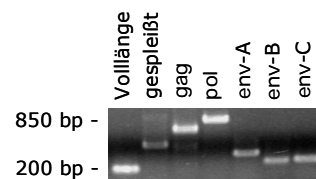
**A:** Detektion von PERV-A, -B und -C-Proviren im Genom des Tieres #007 mittels PCR und spezifischen Primern für *gag*, *pol*, *env-A*, *env-B*, und *env-C*. **B, C:** Detektion der Präsenz zweier verschiedener PERV-A/C-rekombinanten Proviren in der Milz des Tieres #371 sowie in PERV/5°-infizierten 293-Zellen unter Verwendung der Primer VRBF und TMR (B) und VRBF und PERV *env-C* rev (C) (DIECKHOFF et al., 2007b).

Die Freisetzung solcher PERV-A/C-Rekombinanten wurde bereits bei porcinen Mitogen-stimulierten PBMCs beobachtet (WILSON et al., 1998, WILSON et al., 2000). Kürzlich wurden in genomischer porciner DNA PERV-A/C rekombinante Proviren als Folge einer Autoinfektion nach exogener viraler Rekombination beschrieben (MARTIN et al., 2006). Mit dem von Martin et al. publizierten Primer-Set VRBF und TMR konnte das PERV/5°-Provirus in den mit diesem infizierten 293/5°-Zellen nachgewiesen werden. In keinem der untersuchten Gewebe der Tiere #007, #472 und #499 konnte die PERV-A/C-Rekombinante detektiert werden.

#### 4.1.7.4 PERV-Expression in porcinen Melanomen

Da bislang unklar ist, ob porcine endogene Retroviren in Melanomen stärker exprimiert werden als in normalem Gewebe, wurden sowohl Melanome als auch nicht verändertes

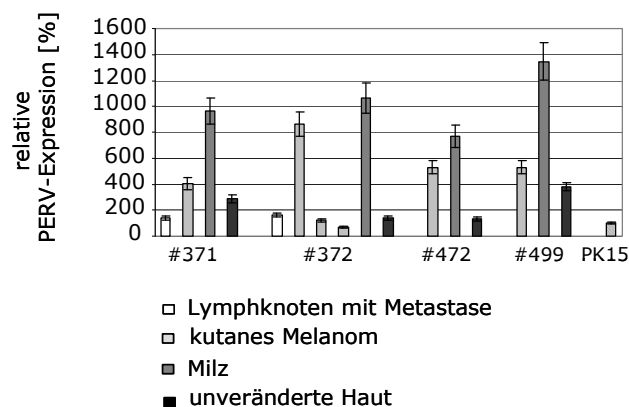
Gewebe der MMS Troll hinsichtlich deren PERV-Expression mit Hilfe einer *one-step* RT-PCR untersucht. In allen analysierten kutanen Melanomen, Lymphknoten mit Metastasen, Milzen mit und ohne Metastasen sowie unveränderten Hautbiopsien der MMS Troll Tiere konnte sowohl virale Volllängen-RNA (Volllänge, *gag*, *pol*, Abb. 4.10), als auch *gag*- und *pol*-RNA sowie *env*-RNA aller PERV-Subtypen detektiert werden. Abbildung 4.10 zeigt die nach der Auftrennung im Agarosegel erhaltenen Amplifikate exemplarisch für das Melanom des Tieres #372. Des Weiteren wurde in allen untersuchten Geweben gespleißte *env*-mRNA nachgewiesen. Die Präsenz gespleißter *env*-mRNA erlaubt theoretisch die Translation des Env-Proteins.



**Abbildung 4.10: PERV-Expression im Melanom des Tieres #372**

Detektion von PERV-mRNA mittels one-step RT-PCR und spezifischen Primern für Volllängen-RNA, gespleißte *env*-mRNA, sowie *gag*-, *pol* und die *env*-mRNA der PERV-Subtypen A, B, und C. (DIECKHOFF et al., 2007b)

Um die PERV-Expression quantitativ zu untersuchen, wurde eine *one-step* RT *real-time* PCR verwendet. Diese PCR (4.1.2) bedient sich *gag*-spezifischer Primer und erlaubt somit die Quantifizierung der Expression viraler Volllängen-mRNA. Im Vergleich zur Expression in unveränderter Haut war die PERV-Expression in den kutanen Melanomen in den meisten Fällen erhöht (Abb. 4.11). Unabhängig von der Art der Normalisierung, auf Gesamt-RNA oder auf die Expression der *house keeping* Gene porcines GAPDH und porcines Cyclophilin ergaben sich ähnliche Expressionsmuster.



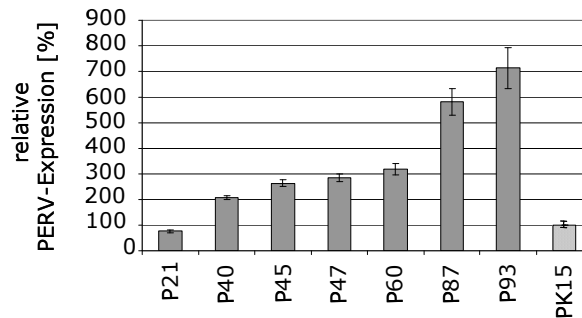
**Abbildung 4.11: PERV-Expression in Melanomen und unveränderten Geweben von vier verschiedenen MMS Troll**

Die mittels one-step RT *real-time* PCR bestimmte PERV-Expression in den Geweben der Tiere #371, #372, #472, #499 wurde auf die gleich 100% gesetzte Expression der Zelllinie PK-15 bezogen. Die Daten wurden auf die Expression des *house keeping* Gens GAPDH normalisiert. Im Fall des Tieres #372 wurden drei verschiedene Melanome untersucht (DIECKHOFF et al., 2007b).



#### 4.1.7.5 PERV-Expression in Lungenmetastasen-abgeleiteten Melanomzellen

Die kultivierten, von Lungenmetastasen abgeleiteten Melanomzellen wurden mit den gleichen, bereits beschriebenen PCR-Methoden hinsichtlich ihrer PERV-Expression untersucht. Auch hier konnten virale Vollängen-RNA sowie gespleißte *env*-mRNA, eine Voraussetzung für die Bildung viraler Partikel, nachgewiesen werden.

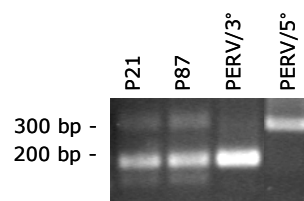


**Abbildung 4.12: PERV-Expression in Melanomzellen unterschiedlicher Passagen**

Die mittels *one-step* RT *real-time* PCR bestimmten Werte wurden auf die GAPDH-Expression normalisiert und in Relation zur PERV-Expression der Zelllinie PK-15 (gleich 100%) gesetzt (DIECKHOFF et al., 2007b).

Interessanterweise stieg die PERV-Expression mit der Zahl der Passagen der Melanomzellen *in vitro* (Abb 4.12). Während die PERV-Expression in Passage 21 weniger als 80% der Expression in PK-15-Zellen betrug, konnte in Passage 87 eine 7-fach höhere PERV-Expression als in PK-15-Zellen gezeigt werden. Auch hier ergaben sich unabhängig von der Art der Normalisierung, auf Gesamt-RNA oder auf die Expression der *house keeping* Gene porcines GAPDH und porcines Cyclophilin ähnliche Expressionsmuster.

Da bereits beschrieben wurde, dass sich die Länge der viralen LTRs sowie der Virustiter während der Passagierung von PERV in humanen Zellen erhöht (DENNER et al., 2003a), wurde die Länge der viralen LTRs in den Melanomzellen verschiedener Passagen untersucht. Es konnten jedoch keine Veränderungen in deren Länge beobachtet werden (Abb. 4.13). Die Länge der LTR entsprach der des Isolates PERV/3°, die nur eine 37 bp Wiederholung mit einer Kernfaktor Y (NF-Y)-Bindungsstelle besitzt (DENNER et al., 2003a).



**Abbildung 4.13: Unveränderte LTR-Länge während der Passagierung der Lungenmetastasen-abgeleiteten Melanomzellkultur**

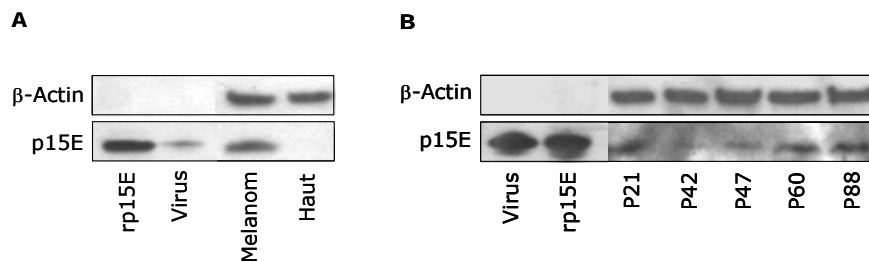
Die PCR erfolgte mit DNA aus Zellen der 21. und 87. Passage (P). Plasmide, die die LTR von PERV/3° bzw. PERV/5° beinhalten, wurden als Kontrollen eingesetzt (DIECKHOFF et al., 2007b).

#### 4.1.7.6 PERV-Proteinexpression in primären Tumoren und Melanomzellkulturen

Um zu analysieren, ob die erhöhte Expression von PERV-mRNA mit einer gesteigerten Expression viraler Proteine einhergeht, wurden Proteinpräparationen von Melanomen und Lungen-Metastasen abgeleiteten Melanomzellkulturen mit Hilfe der Western-Blot-Analyse und p15E- und Gag-spezifischen Antikörpern (FIEBIG et al., 2003, IRGANG et al., 2003) untersucht.

Die Nachweisgrenzen von p15E und Gag lagen bei 50 bzw. 100 ng. Virales p15E-Protein konnte z.B. in Melanomproben des Tieres #372 nachgewiesen werden, nicht jedoch in Proben unveränderter Haut desselben Tieres (Abb. 4.14). Von 10 untersuchten Melanomen, 4 unveränderten Hautproben, drei Milzproben und einem Lymphknoten mit Metastase, konnten in drei der Melanomproben, jedoch in keiner der Hautproben virales p15E-Protein detektiert werden.

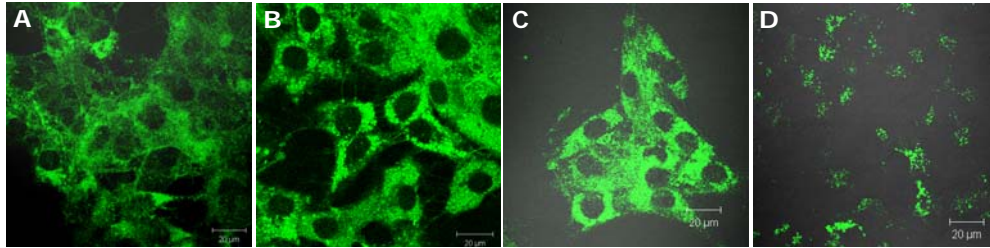
In allen untersuchten Passagen der Lungen-Metastasen abgeleiteten Melanomzellkultur wurde das virale p15E nachgewiesen, die stärkste Protein-Expression war in Passage 88 zu beobachten (Abb. 4.14) und korrelierte somit mit der PERV-RNA-Expression (Abb. 4.12). Auch geringe Mengen Gag-Vorläufer-Protein konnten in primären Tumoren sowie in den Zellkulturen gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4.14: Nachweis der Expression des p15E-Proteins**

**A:** in primärem Melanom und unveränderter Haut des Tieres #372. **B:** und in Zellen verschiedener Passagen (P) der Lungenmetastasen-abgeleiteten Melanomzellen (B) mittels Western-Blot-Analyse und einem p15E-spezifischen Antiserum (Ziegenserum 16). Sedimentierte PERV-Partikel (Virus) und rekombinates p15E (rp15E) wurden als Kontrollen verwendet. Die Gelbeladung mit äquivalenten Proteinmengen wurde durch die Verwendung von Antikörpern gegen  $\beta$ -Actin verifiziert (DIECKHOFF et al., 2007b).

Die Expression des p15E-Proteins in der Lungen-Metastasen abgeleiteten Melanomzellkultur wurde durch Immunfluoreszenz bestätigt (Abb. 4.15). Bei der Analyse nicht-permeabilisierter Melanomzellen konnte die Expression des viralen p15E sowohl auf der Zelloberfläche als auch im Zytoplasma detektiert werden (Abb. 4.15 A). In permeabilisierten Zellen wurde das p15E vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 4.15 B, C). Als Kontrolle wurden PK-15-Zellen mitgeführt. Übereinstimmend mit den PERV-RNA-Expressionsdaten war die p15E-Proteinexpression in der untersuchten Passage 83 der Melanomzellen weitaus höher als in den PK-15-Zellen (Abb. 4.15 D). Als Negativ-Kontrolle mitgeführte 293-Zellen zeigten keine p15E-Expression (Daten nicht gezeigt).

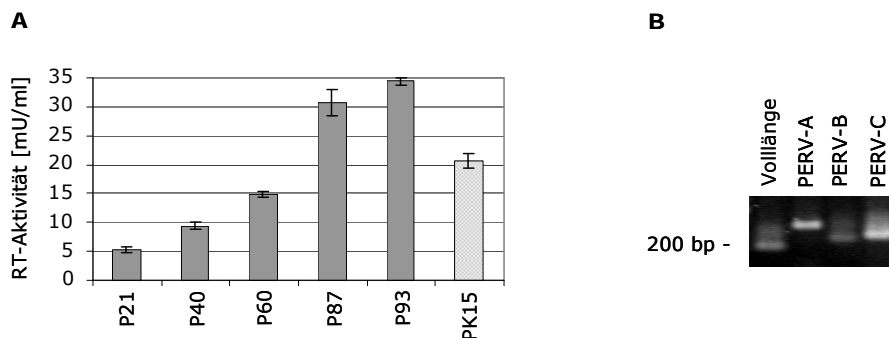


**Abbildung 4.15: Detektion des viralen p15E-Proteins in Lungenmetastasen abgeleiteten Melanomzellen der 87. Passage**

Die Immunfluoreszenz-Markierung erfolgte mit einem für p15E spezifischen Antiserum (Ziege 16, FIEBIG et al., 2003). **A:** Nicht-permeabilisierte Zellen. **B, C:** permeabilisierte Zellen, unterschiedliche Vergrößerungen. **D:** Permeabilisierte PK-15-Zellen als Kontrolle. Der Balken in den rechten unteren Bildrändern entspricht einer Größe von 20 µm (DIECKHOFF et al., 2007b).

#### 4.1.7.7 Freisetzung viraler Partikel aus Melanomzellen

Um zu untersuchen, ob die Lungenmetastasen-abgeleiteten Melanomzellen Viruspartikel freisetzen, wurde die RT-Aktivität in deren Kulturüberständen gemessen. Übereinstimmend mit dem Anstieg der Menge viraler Vollängen-RNA und viralen Proteins, stieg auch die Menge der freigesetzten RT-Aktivität während der Passagierung der Zellen an (Abb. 4.16 A).



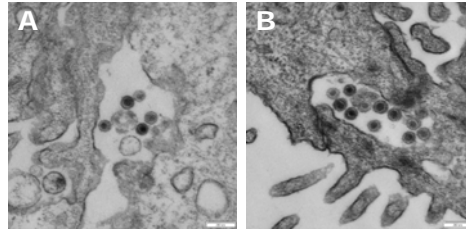
**Abbildung 4.16: PERV-Partikel-Freisetzung aus den Lungenmetastasen-abgeleiteten Melanomzellen**

**A:** RT-Aktivität im Überstand von Melanomzellen verschiedener Passagen, gemessen mit Hilfe des C-TYPE RT ACTIVITY ASSAYS. **B:** Detektion der Subtypen PERV-A, -B, und -C in pelletierten Viruspartikeln aus Überständen der Melanomzellen in Passage 95. (DIECKHOFF et al., 2007b)

Im Überstand der 93. Passage der Melanomzellkulturen wurde eine höhere RT-Aktivität detektiert als im Überstand der porzinen PK15-Zellen.

Um zu analysieren, welche PERV-Subtypen von den Melanomzellen freigesetzt werden, wurden Viruspartikel im Überstand der Passage 95 durch Ultrazentrifugation pelletiert und die RNA-Genome mittels *one-Step* RT-PCR analysiert. Alle drei PERV-Subtypen A, B und C konnten nachgewiesen werden (Abb. 4.16 B).

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurden in Präparationen der Melanomzellen der Passage 93 intakte PERV-Partikel beobachtet (Abb. 4.17). Um festzustellen, ob diese Viruspartikel infektiös sind, wurde ein Infektionsversuch durchgeführt. Humane 293-Zellen wurden mit dem Überstand der Melanomzellen aus Passage 87, welche eine hohe PERV-Expression zeigten (Abb. 4.12), inkubiert.



**Abbildung 4.17: Detektion von PERV-Partikeln in Lungenmetastasen abgeleiteten Melanomzellen der 93. Passage**

Transmissions-Elektronen-mikroskopische Darstellung zweier Präparationen (A, B) der Lungenmetastasen-abgeleiteten Melanomzellen (Passage 93). (DIECKHOFF et al., 2007b)

Nach 42 Tagen Inkubation konnte jedoch keine PERV-Provirusintegration in den 293-Zellen gezeigt werden. Im Gegensatz wiesen die Kontrollzellen, 293-Zellen, die parallel mit dem Überstand PERV/5<sup>o</sup>-produzierender 293-Zellen inkubiert wurden, nach der gleichen Zeit eine PERV-Infektion auf.

## 4.2 Prävention der PERV-Übertragung bei der Xenotransplantation

Bislang konnte weder in Transplantations- und Infektionsstudien mit Kleintieren und nicht-humanen Primaten noch in ersten klinischen Xenotransplantationen ein Nachweis einer PERV-Übertragung erbracht werden (LOSS et al., 2001, WINKLER et al., 2005, SPECKE et al., 2001a, HENEINE et al., 1998, GARKAVENKO et al., 2004, IRGANG et al., 2003, XU et al., 2003, PARADIS et al., 1999, TACKE et al., 2001). Trotz der zusätzlichen Sicherheitsvorkehrungen, wie die Auswahl von Schweinen, die den PERV-Subtyp C nicht enthalten, eine geringe PERV-Expression aufweisen und keine PERV-Partikel freisetzen, kann eine PERV-Übertragung auf den Menschen nach einer Xenotransplantation nicht ausgeschlossen werden. Humane Zellen lassen sich *in vitro* infizieren und der Transplantatempfänger steht zum Schutz des Transplantats zudem unter einer starken Immunsuppression.

Aufgrund dieser Tatsachen gilt es Strategien zu entwickeln, um eine potentielle PERV-Übertragung zu verhindern. Vielversprechende Strategien sind hierbei die Hemmung der PERV-Expression durch RNA-Interferenz und die Entwicklung eines Impfstoffes.

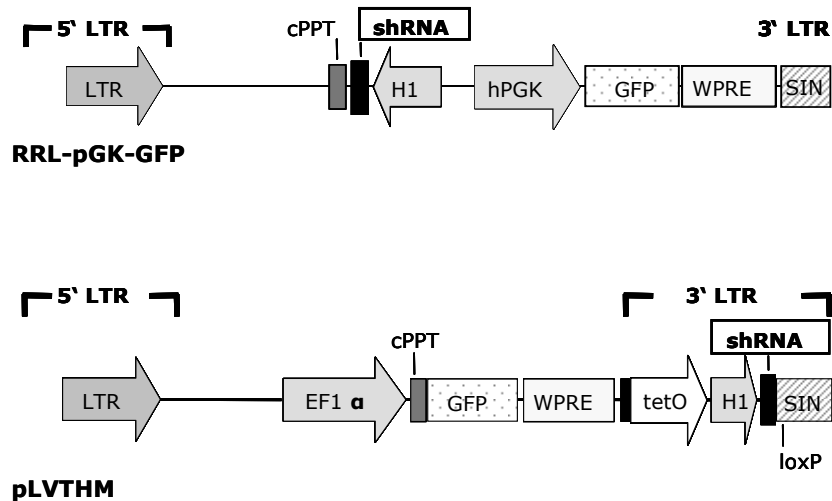
### 4.2.1 Hemmung der PERV-Expression in primären porzinen Zellen mittels RNA-Interferenz und lentiviralen Vektoren

In einer früheren Publikation der Arbeitsgruppe (KARLAS et al., 2004) wurden bereits zahlreiche synthetische siRNAs, die Komplementarität zu verschiedenen Bereichen der PERV-Sequenz aufwiesen, konzipiert und hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die PERV-Expression in infizierten humanen 293-Zellen zu inhibieren, getestet. Die effizienteste siRNA entsprach einer hochkonservierten Sequenz im viralen *pol*-Gen (*pol2*). Da die Unterscheidung der PERV-Subtypen ausschließlich auf Unterschieden im *env*-Gen beruhen, ist die Ziel-Sequenz in allen funktionellen PERV-Subtypen identisch und die siRNA somit in der Lage, die Expression aller drei Subtypen zu hemmen. Durch die Insertion der *pol2*-siRNA in den Expressionvektor pSuper konnte eine permanente Expression der entsprechenden *pol*-spezifischen shRNA und eine effiziente Hemmung der PERV-Expression in 293-Zellen erreicht werden.

Hinsichtlich des Ziels, shRNA-transgene Schweine mit stark verminderter PERV-Expression zu erzeugen, wurde zunächst eine Hemmung der PERV-Expression in primären porzinen Zellen angestrebt. Da sich primäre Zellen nur schwer und mit schlechter Effizienz mit Expressionsvektoren wie pSuper transfizieren lassen, wurden diese Versuche mit Hilfe lentiviraler Vektoren unternommen.

#### 4.2.1.1 Lentivirale Expressionsvektoren

Zwei verschiedenen lentivirale Vektoren RRL-pGK-GFP (FOLLENZI et al., 2000) und pLVTHM (WIZNEROWICZ et al., 2003), welche die Expression der entsprechenden shRNAs ermöglichten, wurden verwendet (Abb. 4.18). Die Vektoren unterscheiden sich in den Promotoren, welche die Expression des GFP-Reporter-Gens induzieren sowie in der Anordnung der shRNA- und GFP-Expressionskassetten.



**Abbildung 4.18: Schematische Darstellung der lentiviralen Vektoren RRL-pGK-GFP und pLVTHM**

LTR: *long terminal repeat*. H1: Polymerase III H1-RNA Gen Promotor. shRNA: *short hairpin RNA*. SIN: selbst-inaktivierendes Element. cPPT: zentraler Polypurintrakt. GFP: *green fluorescent protein*. WPRE: post-transkriptionelles Element des Woodchuck Hepatitis B Virus. EF-1  $\alpha$ : Elongationsfaktor-1  $\alpha$  Promotor. tetO: Tetracyclin Operator. hPGK: Phosphoglycerat Kinase Promotor. loxP: Rekombinationsstelle der Cre-Rekombinase für den Bakteriophagen P1

Der Vektor pLVTHM bedient sich eines EF1-alpha-Promotors, während der Vektor RRL-pGK-GFP einen PGK-Promotor verwendet. Die shRNA-Expressionkassette des Vektors pLVTHM ist in den 3' LTR lokalisiert. Des Weiteren wurde der Vektor pLVTHM als *double-copy* Vektor konzipiert. Während der reversen Transkription wird die U3-Region der 5' LTR mittels ihres 3'-Homologs als *template* synthetisiert, was in einer Verdopplung der shRNA-Expressionkassette im integrierten Vektors resultiert.

Mit Hilfe der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *ClaI* bzw. *EcoRI* und *HindIII* wurde die pol2-shRNA-Kassette des Vektors pSuper-pol2 in die lentiviralen Vektoren pLVTHM und RRL-pGK-GFP inseriert. Die entstandenen Vektoren tragen im Folgenden die Bezeichnungen pLVTHM-pol2 und RRL-pGK-GFP-pol2.

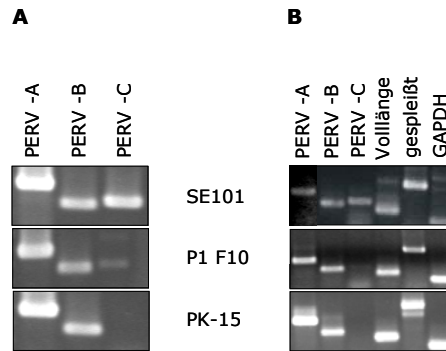
Lentivirale Partikel wurden durch Ko-Transfektion der Verpackungszelllinie 293T mit dem Hüllplasmid pCL-VSV-G, dem Verpackungsplasmid psPAX2 und dem Transfervektor pLVTHM-pol2 bzw. der Kontrolle pLVTHM generiert und mittels Ultrazentrifugation konzentriert. Die Titration der konzentrierten lentiviralen Partikel erfolgte auf HeLa-Zellen. Für die lentiviralen Vektoren pLVTHM und pLVTHM-pol2 konnten die folgenden Titer ermittelt werden:  $1,73 \times 10^8$  IU/ml und  $1,78 \times 10^7$  IU/ml.

Die Herstellung der auf dem Vektor RRL-pGK-GFP basierenden lentiviralen Partikel erfolgte durch Andreas Hofmann (Kooperation DFG-Projekt) wie bereits beschrieben (HOFMANN et al., 2003, PFEIFER et al., 2002). Die Titer betragen  $2,10 \times 10^{10}$  IU/ml (RRL-pGK-GFP) und  $2,25 \times 10^{10}$  IU/ml (RRL-pGK-GFP-pol2).

#### 4.2.1.2 PERV-Provirusintegration und -Expression in porzinen Fibroblasten SE101, SE105 und PFF P1 F10

Die verwendeten porzinen Fibroblastenkulturen wurden aus verschiedenen Deutsche Landrasse-Foeten (Tag 25 p.c.) isoliert (Kooperation DFG-Projekt, Prof. Niemann,

Mariensee). Um zunächst den Status der PERV-Provirusintegration sowie die PERV-Expression der porzinen Fibroblasten, SE101, SE105 und PFF P1 F10 zu untersuchen, wurde die DNA dieser Zellen in eine PCR eingesetzt. Mit Hilfe *env*-spezifischer Primer konnten alle drei PERV-Subtypen A, B und C im Genom der porz. Fibroblasten detektiert werden (Abb. 4.19). Die DNA der PERV-C-negativen PK15-Zellen wurde als Negativkontrolle mitgeführt.



**Abbildung 4.19: PERV-Provirusintegration und -Expression in fötalen porzinen Fibroblasten und PK-15-Zellen**

**A:** Detektion von PERV-Proviren im Genom zweier unabhängiger primären Fibroblastenkulturen (SE101, P1 F10) und PK-15-Zellen mittels PCR. **B:** Detektion der PERV-Expression in fötalen Fibroblasten (SE101, P1 F10) und in PK-15-Zellen mittels *one-step* RT-PCR. Zusätzlich zu spezifischen Primern für *env*-A, -B und -C wurden Primer verwendet, die virale Vollängen-RNA sowie gespleißte *env*-mRNA detektieren. Die Integrität der RNA wurde durch die Amplifikation des *house keeping* Gens GAPDH verifiziert (DIECKHOFF et al., 2007a).

Zur Analyse der PERV-Expression in den porzinen fötalen Fibroblasten wurde Gesamt-RNA isoliert und für eine *one-step* RT PCR mit den bereits beschriebenen Primern, sowie Primern, die es erlauben virale Vollängen-RNA von gespleißter *env*-mRNA zu diskriminieren, verwendet. Die Integrität der RNA wurde durch die Amplifikation des *house keeping* Gens GAPDH bestimmt.

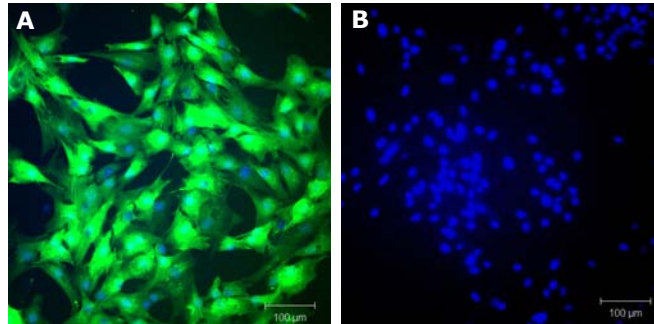
In allen getesteten Fibroblastenkulturen konnten sowohl mRNAs der PERV-Subtypen A, B und C sowie gespleißte *env*-mRNA detektiert werden (Abb. 4.19). Auch hier wurde die RNA von PERV-C-negativen PK-15-Zellen mitgeführt. Die Präsenz gespleißter *env*-mRNA weist auf die Möglichkeit der Env-Protein-Translation und der Viruspartikelbildung hin.

#### 4.2.1.3 Transduktion porziner Fibroblasten und PK-15-Zellen mit lentiviralen Partikeln

Für die Transduktion mit den unter 4.2.1.1 beschriebenen lentiviralen Partikeln wurden die porzinen Fibroblasten SE 101, SE 105 und P1 F10 sowie PK-15-Zellen ( $1 \times 10^5$  pro 6er *well*) ausplattiert und in Anwesenheit von 6 mg/ml Polybren und konzentrierten lentiviralen Partikeln (MOI: 2,5) fünf Tage inkubiert.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie konnten für die porzinen Fibroblasten über die Detektion des Reportergens GFP Transduktionseffizienzen von 20% bestimmt werden. Da dieser Prozentsatz transduzierter Zellen zu gering ist, um eine effektive Hemmung der PERV-Expression nachzuweisen, wurden die transduzierten Fibroblasten durch Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung angereichert. Auf diese Weise

konnten somit nahezu 100% transduzierte Fibroblasten erreicht werden (Abb. 4.20). Bei den PK-15-Zellen ließen sich höhere Transduktionseffizienzen von etwa 80% erreichen. Durch erneute Transduktion mit den lentiviralen Partikeln konnten diese auf über 95% gesteigert werden.



**Abbildung 4.20: pLVTHM-pol2-transduzierte und nicht-transduzierte porzine Fibroblasten**

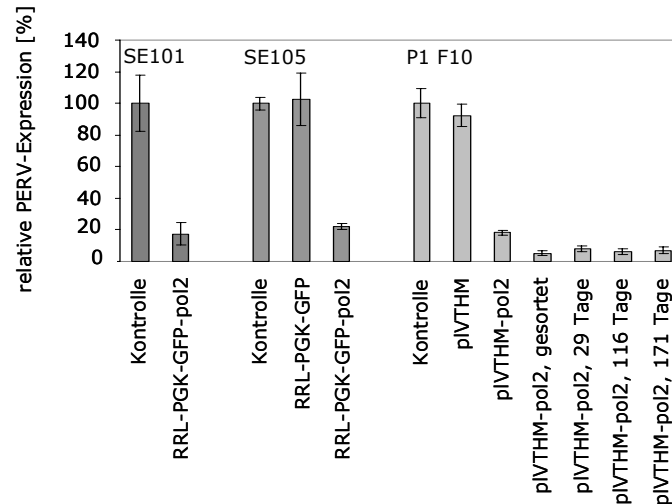
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von pLVTHM-pol2-transduzierten (A) sowie nicht-transduzierten (B) porzinen Fibroblasten P1 F10 nach Anreicherung durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung. Überlagerung der Signale für GFP und DAPI. Der Balken in den rechten unteren Bildrändern entspricht 100 µm.

#### 4.2.1.4 pol2-shRNA-vermittelte Hemmung der PERV-Expression in primären porzinen Zellen sowie PK-15-Zellen

Aus den transduzierten sowie nicht-transduzierten fötalen Fibroblasten und PK15-Zellen wurden Gesamt-RNA und Protein isoliert. Die Hemmung der PERV-Expression wurde quantitativ mit Hilfe der unter 4.1.2 beschriebenen *one-step* RT *real-time* PCR bestimmt. Für jede Reaktion wurden 50 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Der Level an viraler Vollängen-RNA wurde mit einer Modifizierung der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode (LIVAK UND SCHMITTGEN, 2001) relativ zur eingesetzten Menge Gesamt-RNA kalkuliert. Die PERV-Expression der pLVTHM-pol2- bzw. RRL-pGK-GFP-pol2-transduzierten Zellen wurde mit der PERV-Expression in den nicht-transduzierten sowie den pLVTHM- bzw. RRL-pGL-GFP-transduzierten Zellen verglichen. Auf diese Weise wurde eine pol2-shRNA-vermittelte Hemmung der PERV Vollängen-RNA-Expression von bis zu 94,8% ermittelt (Abb. 4.21). Die Inhibierung der PERV-Expression blieb bei 95% über Monate (171 Tage) stabil (Abb. 4.21).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die lentiviralen Vektoren pLVTHM-pol2 und RRL-pGK-GFP-pol2 in der Lage sind, die PERV-Expression in fötalen Fibroblasten zu hemmen, wurde deren Effekt in PK-15-Zellen untersucht. Mit Hilfe der bereits beschriebenen *one-step* RT *real-time* PCR (3.2.15, 4.1.2) konnte eine Hemmung der PERV-Expression von 65,8 bzw. 73,5% ermittelt werden (Abb. 4.22).

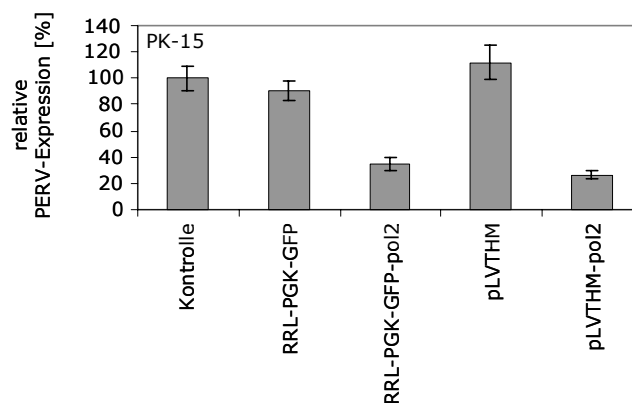




**Abbildung 4.21: Hemmung der PERV-Expression in porzinen fötalen Fibroblasten**

Die porzinen fötalen Fibroblasten wurden mit den lentiviralen Vektoren RRL-pGK-GFP-pol2 und pLVTHM-pol2 sowie den entsprechenden Leervektoren pLVTHM und RRL-PGK-GFP transduziert. Die PERV-Expression wurde mittels *one-step RT real-time* PCR an verschiedenen Zeitpunkten nach der Transduktion bestimmt und mit den Leervektorkontrollen sowie den nicht-transduzierten Fibroblasten (Kontrolle, gleich 100%) verglichen (DIECKHOFF et al., 2007a).

Die PERV-Expression wurde des Weiteren in PHA-stimulierten PBMCs reduziert. Diese Zellen lassen sich nur sehr schlecht transduzieren, was sich in einer sehr geringen Transduktionseffizienz widerspiegelt. Nach Anreicherung der GFP-positiven Zellen durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung wurde eine Inhibierung der PERV-Vollängen-mRNA-Expression von 75% beobachtet (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4.22: Hemmung der PERV-Expression in PK-15-Zellen**

Die Zelllinie PK-15 wurde mit den lentiviralen Vektoren RRL-pGK-GFP-pol2 und pLVTHM-pol2 sowie den entsprechenden Leervektoren pLVTHM und RRL-PGK-GFP transduziert. Die PERV-Expression wurde mittels *one-step RT real-time* PCR bestimmt und mit den Leervektorkontrollen sowie den nicht-transduzierten PK-15-Zellen (Kontrolle, gleich 100%) verglichen (DIECKHOFF et al., 2007a).

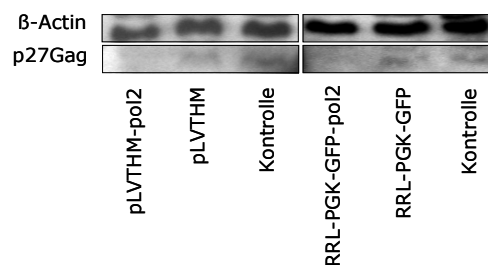
#### 4.2.1.5 Hemmung der PERV-Expression auf Proteinebene

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die lentiviralen Vektoren pLVTHM-pol2 und RRL-pGK-GFP-pol2 in der Lage sind, die Expression der PERV-Vollängen-RNA in

unterschiedlichen Zelltypen zu hemmen, wurde untersucht, ob die reduzierte Expression viraler mRNA auch zu einer reduzierten Expression viraler Proteine führt.

Protein-Präparationen der fötalen Fibroblasten und der PK-15-Zellen wurden mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse untersucht. Hierfür wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein der transduzierten sowie nicht-transduzierten PK-15-Zellen und ein anti-p27Gag-Ziegen Serum verwendet (IRGANG et al., 2003). Abbildung 4.23 zeigt eine reduzierte p27 Gag-Proteinexpression der mit pLVTHM-pol2- und RRL-PGK-GFP-pol2-transduzierten PK-15-Zellen. Die Beladung äquivalenter Proteinmengen wurde mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Actin verifiziert.

Bei der Western-Blot-Analyse der porzinen Fibroblasten konnte auch nach Verwendung von 80 µg Gesamtprotein kein Gag-Protein in den Kontrollzellen detektiert werden, was deutlich macht, dass die PERV-Expression in diesen Zellen so gering ist, dass sie unter der Nachweisgrenze liegt. Dies wird durch die Tatsache bestätigt, dass die PERV-Expression den porzinen Fibroblasten im Vergleich zu der in PK-15-Zellen nur 0,2% beträgt.



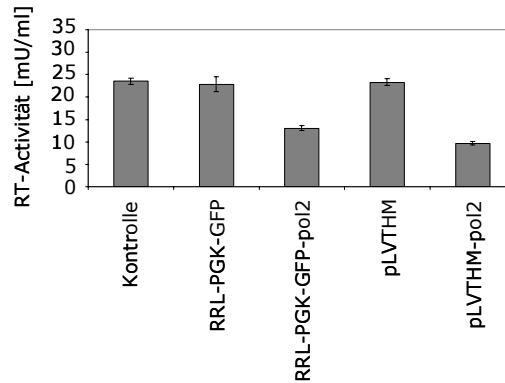
**Abbildung 4.23: Expression des viralen p27Gag in transduzierten PK-15-Zellen**

Die mit den lentiviralen Vektoren pLVTHM-pol2 und RRL-pGK-GFP-pol2 sowie den entsprechenden Leervektoren RRL-PGK-GFP und pLVTHM transduzierten PK-15-Zellen wurden mittels Western-Blot-Analyse und einem PERV-p27-Gag-spezifischen Antiserum hinsichtlich der p27-Gag-Proteinexpression untersucht und mit nicht-transduzierten PK-15-Zellen (Kontrolle) verglichen (DIECKHOFF et al., 2007a).

#### 4.2.1.6 Reduzierte RT-Aktivität in den Überständen transduzierter Zellen

Um zu untersuchen, ob die mit den lentiviralen Vektoren pLVTHM-pol2- und RRL-PGK-GFP-pol2-transduzierten Zellen auch eine reduzierte virale RT-Aktivität freisetzen, wurden die Überstände der Kontrollzellen und der transduzierten Zellen (porzine Fibroblasten P1 F10, PK-15) in einen RT-Assay eingesetzt. Hierfür wurden die Zellen in einer Dichte von  $5 \times 10^4$  Zellen pro 24er *well* ausgesät und der Überstand nach drei Tagen abgenommen. Die RT-Aktivität wurde mit Hilfe des CAVIDI C-TYPE RT ACTIVITY ASSAYS bestimmt.

In den Überständen der mit den lentiviralen Vektoren pLVTHM-pol2- und RRL-PGK-GFP-pol2-transduzierten PK-15-Zellen (4,74 mU/ml bzw. 5,78 mU/ml) konnten im Vergleich zu den Leervektorkontrollen (23,2 mU/ml bzw. 21,2 mU/ml) bzw. nicht-transduzierten PK-15-Zellen (23,4 mU/ml) reduzierte RT-Aktivitäten gezeigt werden (Abb. 4.24). In den Überständen der porzinen Fibroblasten P1 F10 konnte keine RT-Aktivität detektiert werden, was den geringen PERV-Expressionslevel bestätigt.



**Abbildung 4.24: RT-Aktivität in den Überständen von PK-15-Zellen**

In den Überständen der mit den lentiviralen Vektoren RRL-pGK-GFP-pol2 und pLVTHM-pol2, den entsprechenden Leervektoren RRL-PGK-GFP und pLVTHM transduzierten sowie nicht-transduzierten PK-15-Zellen wurde die RT-Aktivität [mU/ml] mit Hilfe des C-TYPE RT ACTIVITY ASSAYS die RT-Aktivität [mU/ml] bestimmt (DIECKHOFF et al., 2007a).

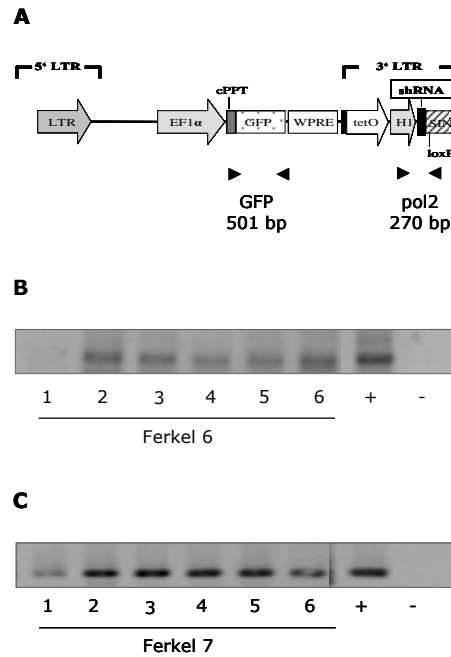
#### 4.2.2 Generierung shRNA-transgener Schweine mittels Nukleus-Transfer

Eine viel versprechende Strategie der Prävention der PERV-Übertragung bei der Xenotransplantation beruht auf dem Einsatz shRNA-transgener Schweine mit verminderter PERV-Expression. Mit der erfolgreichen Hemmung der PERV-Expression in primären porzinen Zellen sowie in einer porzinen Zelllinie wurde die Basis zur Herstellung solcher shRNA-transgener Schweine geschaffen.

Die Generierung der pol2-shRNA-transgenen Schweine erfolgte nach der Methode des Nukleustransfers (HOLKER et al., 2003) am Institut für Tierzucht in Mariensee. Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung der Zellkerne dienten die bereits beschriebenen porzinen, mit dem lentiviralen Partikeln pLVTHM-pol2 transduzierten Fibroblasten P1 F10. Nach der für Schweine üblichen Tragzeit von 116 Tagen wurden sieben Ferkel geboren, von welchen eines direkt nach der Geburt starb. Aufgrund einer Agalaktie der Muttersau starben zwei Ferkel innerhalb der ersten Nacht. Sowohl die Ernährung der Ferkel mittels einer Sonde als auch die Behandlung der Muttersau mit Oxytocin (2 ml, 10 IE/ml, Pharma Partner, Hamburg), welches die Laktation verstärken sollte, schlugen fehl, so dass zwei weitere Ferkel starben. Eine Amme zur Ernährung der Ferkel stand nicht zur Verfügung.

Von sechs Tieren konnten Ohrbiopsien zur DNA-Isolierung und von zwei Tieren Gewebe der Organe Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, Pankreas und Muskel sowie Hautbiopsien zur RNA-Isolierung gewonnen werden.

Mit Hilfe zweier Primer-Sets (Abb. 4.25), die in verschiedenen Bereichen des Transgens hybridisieren, im *gfp*-Gen sowie innerhalb der shRNA-Expressionskassette, erfolgte der Nachweis der Transgen-Integration für alle sechs Ferkel.

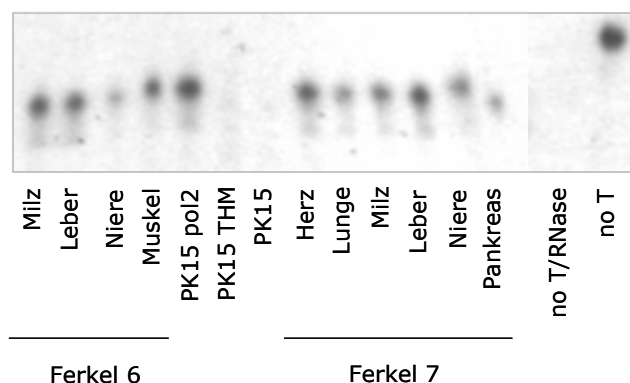


**Abbildung 4.25: Nachweis der Transgen-Integration im Genom pol2-transgenen Ferkel 6 und 7**

**A:** Schematische Darstellung der Positionen der zum Integrationsnachweis verwendeten Primer-Sets GFP und pol2 mit Amplifikatgrößen **B:** Integrationsnachweis mittels PCR unter Verwendung der pol2-Primer **C:** Integrationsnachweis mittels PCR unter Verwendung der GFP-Primer.

#### 4.2.2.1 Expression der pol2-shRNA *in vivo*

Nachdem gezeigt wurde, dass die generierten Schweine tatsächlich transgen für die pol2-shRNA-Expressionskassette des Vektors pLVTHM waren, erfolgte der Nachweis der shRNA-Expression *in vivo*. Da die Größe der exprimierten siRNA 21 bp betrug, eine Molekülgröße, die bei herkömmlichen RNA-Isolierungsmethoden nicht erfasst wird, wurde ein Kit (MIRVANA MIRNA ISOLATION KIT) verwendet, das speziell die Aufreinigung von microRNAs (miRNAs, bis zu 200 nt) ermöglicht.



**Abbildung 4.26: Nachweis pol2-shRNA-Expression *in vivo* in unterschiedlichen Organen der pol2-shRNA-transgenen Ferkel 6 und 7**

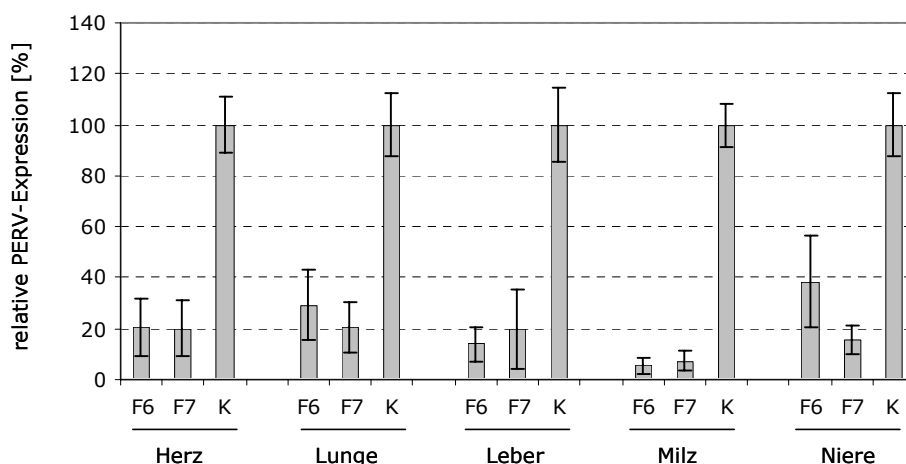
Der Nachweis der shRNA-Expression wurde mit Hilfe des MIRVANA MIRNA DETECTION KITS erbracht. noT/RNase: Negativkontrolle ohne *target*-RNA und mit RNase-Behandlung. Die einzelsträngige Sonde wurde durch die RNase degradiert. No T: Negativkontrolle ohne *target*-RNA und ohne RNase-Behandlung. Die Volllängen-Sonde bleibt erhalten.

Der Nachweis der pol2-shRNA-Expression erfolgte mit Hilfe des MIRVANA MIRNA DETECTION KITS, einer Methode, die auf der herkömmlichen Northern-Blot-Analyse basiert. Die Hybridisierung der  $^{32}\text{P}$ -markierten Sonde mit der Ziel-RNA geschieht nicht auf einer Membran, sondern in Lösung. Nach einer RNase-Behandlung, die zum Abbau nicht-hybridisierter RNA führt, erfolgt die Detektion über Polyacrylamidgelelektrophorese und Phosphoimaging. Auf diese Weise konnte die Expression der pol2-shRNA in allen untersuchten Organen der transgenen Ferkel 6 und 7 gezeigt werden (Abb. 4.26).

#### 4.2.2.2 pol2-shRNA-vermittelte Hemmung der PERV-Expression *in vivo*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die pol2-shRNA *in vivo* in unterschiedlichen Organen der transgenen Ferkel 6 und 7 exprimiert wird, wurde sie hinsichtlich ihres inhibierenden Effekts untersucht. Hierfür wurde aus den entsprechenden Organen Gesamt-RNA isoliert und mit Hilfe der bereits beschriebenen *one-step RT real-time PCR* (3.1.2) analysiert.

Als Kontrolle diente Gesamt-RNA aus den jeweiligen Organen von Kontrollschweinen. Diese Kontrollschweine wurden mittels Nukleus-Transfer generiert und basieren auf dem Genom der nicht-transduzierten porzinen Fibroblasten P1 F10. Nach einer Tragzeit von 89 Tagen konnten Organe von fünf Tieren gewonnen werden. Die PERV-Expression in den jeweils gleichen Organen der Kontrolltiere wurden gemittelt, gleich 100% gesetzt und die PERV-Expression der Organe der pol2-shRNA-transgenen Tiere darauf bezogen. Die Normalisierung erfolgte sowohl auf die Menge der eingesetzten Gesamt-RNA als auch auf die Expression der *house keeping* Gene HPRT, GAPDH und Cyclophilin. Somit konnte in allen getesteten Organen der transgenen Ferkel 6 und 7 eine Hemmung der PERV-Expression von bis zu 94% nachgewiesen werden (Abb. 4.27). In Abbildung 4.27 ist die auf Gesamt-RNA normalisierte Hemmung der PERV-Expression dargestellt. Die auf die Expression der *house keeping* Gene HPRT, GAPDH sowie Cyclophilin normalisierten Daten ergaben ein ähnliches Expressions- bzw. Hemmungsmuster (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4.27: Hemmung der PERV-Expression unterschiedlichen Organen der pol2-shRNA-transgenen Ferkel 6 und 7**

Die PERV-Expression in den jeweiligen Organen wurde mittels *one-step RT real-time PCR* bestimmt und auf die gleich 100% gesetzten, gemittelten Werte der jeweiligen Organe von fünf Kontrollschweinen bezogen. Normalisiert wurden die Daten auf die eingesetzte Menge Gesamt-RNA, sowie die Expression der *house keeping* Gene HPRT, GAPDH und Cyclophilin. Dargestellt sind die auf Gesamt-RNA normalisierten Daten.

### 4.2.3 Induktion neutralisierender Antikörper gegen PERV- und KoRV-Hüllproteine

Eine weitere Strategie der Prävention der PERV-Übertragung bei der Xenotransplantation basiert auf der Entwicklung eines Impfstoffes, mit dem der Xenotransplantatempfänger geimpft werden könnte oder der im Falle einer PERV-Übertragung zum Schutz einer Pandemie zum Einsatz kommen könnte.

Vakzinen gegen  $\gamma$ -Retroviren wie das Feline Leukämie Virus (FeLV) und das Murine Leukämie Virus (MuLV) wurden bereits beschrieben (PETERS et al., 1975, LEE et al., 1977, MARCIANI et al., 1991, SPARKES et al., 1997, SPARKES et al., 2003). Für porcine endogene Retroviren konnten bereits neutralisierende Antikörper gegen das virale p15E-Protein induziert werden (FIEBIG et al., 2003). Der auf dem viralen Hüllprotein gp70 basierende kommerziell erhältliche FeLV-Impfstoff Leucogen vermittelt einen hohen Schutz (ca. 80%) der Katzen vor der Ausbildung einer Leukose. Daher war das Ziel der vorliegenden Versuche die Induktion neutralisierender Antikörper gegen das retrovirale Hüllprotein gp70.

Hierfür wurden drei unterschiedliche Ansätze verfolgt: Die Generierung und Immunisierung von gp70-Proteinfragmenten, die Herstellung und Immunisierung von rekombinantem gp70 sowie die Konstruktion eines auf gp70 und gp85 basierenden DNA-Impfstoffs.

#### 4.2.3.1 Immunisierung mit rekombinanten PERV-gp70-Proteinfragmenten

Da gegen FeLV bereits erfolgreiche *subunit*-Impfstoffe eingesetzt wurden (Sparkes et al., 1997), basierte ein Ansatz zur Induktion von Antikörpern gegen das PERV-gp70 auf der Unterteilung der gp70-Sequenz in Fragmente (*subunits*). Die Immunisierung mit den Proteinfragmenten sollte, neben der Induktion von Antikörpern, den Vergleich verschiedener Bereiche des gp70, hinsichtlich der Immunogenität und des Potentials, neutralisierende Antikörper hervorzurufen, ermöglichen.

#### Generierung, Expression und Immunisierung der Konstrukte

Auf Basis der *env*-Sequenz (Acc. no. AF\_130444) wurden fünf überlappende Fragmente von jeweils 300 bp Länge ausgewählt, der Reihe nach mit 1-5 bezeichnet und in den Vektor pGEX-5X-1 kloniert. Die Fragmente 1, 2, 3 und 5 konnten erfolgreich exprimiert und aufgereinigt werden (3.3.3). Zusätzlich erfolgten Expression und Aufreinigung eines Kombinationskonstrukts, das die Fragmente 1, 2 und 3 umfasst. Trotz versuchter Expressionsoptimierung mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen, Expressionstemperaturen und Induktionszeiten konnte keine Überexpression des Fragmentes 4 erreicht werden. Der Vektor pGEX-5X-1 enthält zur Proteinaufreinigung die N-terminal mit dem Zielprotein fusionierte Gluthathion-S-Transferase sowie einen C-terminal gelegenen 6x-His-Tag. In der Western-Blot-Analyse konnte mit einem  $\alpha$ -Penta-His-Antikörper (Qiagen) kein Signal für Fragment 4 detektiert werden. Mit einem  $\alpha$ -GST-Antikörper (Sigma) konnte jedoch eine Bande auf der Höhe von 26 kDa nachgewiesen werden, die der Größe des N-terminalen GST-Tags entspräche.

Die Immunisierung der Ratten mit den Fragmenten 1, 2, 3, 5 und 123 erfolgte mit öligem Adjuvans intramuskulär in beide Hinterläufe sowie subkutan in die Nackenfalte (3.5.1). In

Tabelle 4.7 ist eine Übersicht der immunisierten Ratten aufgeführt. Drei Wochen nach der jeweiligen ersten Immunisierung erfolgte ein *boost* mit denselben Antigenen und weitere drei Wochen später eine Blutabnahme. Die daraus gewonnenen Seren wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet.

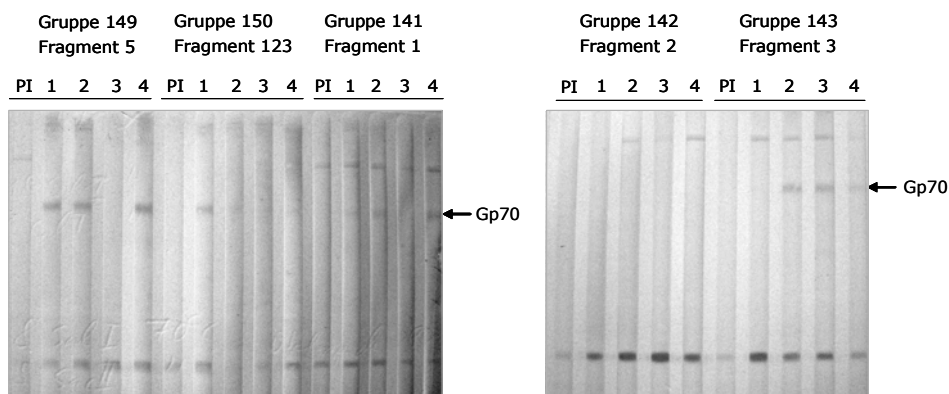
**Tabelle 4.7: Übersicht der mit PERV-gp70-Proteinfragmenten immunisierten Rattengruppen**  
Des Weiteren sind die genauen Nukleotidpositionen der Sequenzen aufgeführt.

Rattengruppe	Antigen	Nukleotidposition in der PERV env-Sequenz AF_130444
141	gp70 Fragment 1	1-300
142	gp70 Fragment 2	271-570
143	gp70 Fragment 3	541-840
149	gp70 Fragment 5	811-1110
150	gp70 Fragment 123	1-840

### Induktion bindender Antikörper gegen die PERV-gp70-Proteinfragmente sowie virales gp70

Eine erste Analyse der Seren hinsichtlich einer humoralen Immunantwort erfolgte mit Hilfe der Western-Blot-Analyse unter Verwendung der rekombinanten Proteinfragmente 5 und 123. Alle Seren, mit Ausnahme derer der Rattengruppe 149 (immunisiert mit Fragment 5), zeigten ein starkes Signal auf der entsprechenden Höhe (37 bzw 59 kDa). Mit den Seren der Rattengruppe 149 wurde bei der gleichen Serumverdünnung ein deutlich schwächeres Signal beobachtet und mit dem Serum der Ratte 149.3 konnte kein Antigen detektiert werden. Die stärksten Signale zeigten die Seren der Rattengruppe 143 (immunisiert mit Fragment 3, Daten nicht gezeigt).

Die generierten Proteinfragmente besitzen jeweils zwei *tags*, wobei jedes für sich in der Lage ist, Antikörper zu induzieren. Ein eindeutiger Nachweis von gp70-spezifischen Antikörpern in den Seren der Tiere kann daher nur mit nicht fusioniertem gp70-Protein erbracht werden. Hierfür wurden mittels eines Saccharose-Gradienten aufgereinigte PERV-Partikel aus dem Überstand PERV-infizierter 293-Zellen verwendet.



**Abbildung 4.28: PERV-gp70-Detektion mit den Seren der mit gp70-Fragmenten immunisierten Ratten**

Western-Blot-Analyse mit den Seren der Rattengruppen 141, 142, 143, 149 und 150 unter Verwendung pelletierter PERV-Partikel. Als Negativkontrolle diente jeweils das Präimmunsersum (PI) der Ratte 1 der jeweiligen Gruppe. Die Detektion erfolgte mit Hilfe einer DAB-Färbung.

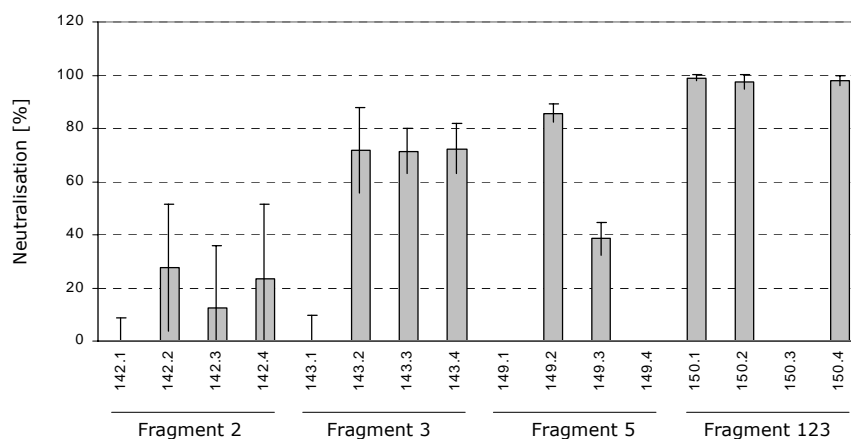
Mit allen Seren, außer denen der Rattengruppe 142 (immunisiert mit Fragment 2), konnte das virale gp70 in der Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden (Abb. 4.28). Jeweils eine von vier Ratten der jeweiligen Gruppe zeigte kein oder nur ein schwaches Signal auf der entsprechenden Höhe (Ratten: 149.3, 150.4, 141.3, 143.1).

Des Weiteren waren unerwartete Banden auf der Höhe von 15 kDa und oberhalb der 170 kDa-Bande zu erkennen (vgl. 5.2.3.1). Beide Signale konnten auch mit den Präimmunseren von Ratte 143.1 und 149.1 detektiert werden. Die stärksten Signale hinsichtlich der Bindung an virales gp70 konnten für die Seren der Ratten, die mit den Fragmente 3 bzw. 5 immunisiert wurden, nachgewiesen werden, Fragment 2 hingegen war nur wenig immunogen.

### Induktion neutralisierender Antikörper gegen die PERV-gp70-Proteinfragmente

Die Unterteilung des viralen gp70 in Fragmente sollte die Lokalisation von Epitopen, die neutralisierende Antikörper induzieren können, ermöglichen. Mit Hilfe eines *real-time* PCR-basierten *in vitro* Neutralisationstests (3.5.2) wurde der Grad der PERV-Provirusintegration in Zellen, die mit den entsprechenden Seren und PERV-haltigem Überstand inkubiert wurden, bestimmt. Der neutralisierende Effekt ist dem Grad der Provirusintegration entgegengesetzt. Je weniger PERV-Provirus detektiert wird, desto stärker ist der neutralisierende Effekt des Serums. Für eine signifikante Neutralisation wurde ein Schwellenwert von 75% bestimmt, d.h. nur Seren, die eine Neutralisation von über 75% erzielen, werden als signifikant neutralisierend eingestuft.

Abbildung 4.29 zeigt die Neutralisationswerte der Seren. Für die Seren der Rattengruppe 141 (immunisiert mit Fragment 1) konnten keine verlässlichen Daten ermittelt werden; sie sind daher nicht aufgeführt. Die Seren der mit Fragment 2 immunisierten Ratten (Gruppe 142) zeigten keine signifikante Neutralisation (unter 30%). Mit den Seren von drei der vier Tiere, die mit Fragment 3 immunisiert wurden, konnte eine Neutralisation von ca. 70% erreicht werden. Von den vier Tieren, die Fragment 5 erhielten, konnte nur im Serum des Tieres 149.2 eine hohe Neutralisation (> 80%) nachgewiesen werden.



**Abbildung 4.29: Neutralisierende Effekte der Immunseren der Rattengruppen 142, 143, 149 und 150**

Mit Hilfe des unter 3.5.2 beschriebenen Neutralisationstests wurden die PERV-neutralisierenden Effekte [%] für die Seren der Rattengruppen 142, 143, 149 und 150 bestimmt. Seren, deren neutralisierender Effekt 75% übersteigt, werden als signifikant neutralisierend betrachtet.



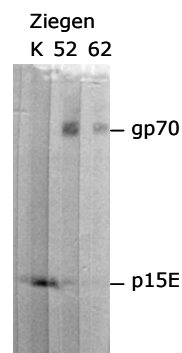
Die stärkste neutralisierende Wirkung (97- 99%) wurde für die Seren der Rattengruppe 150, welche mit dem kombinierten Proteinfragment 123 immunisiert wurden, ermittelt. Die Daten des Neutralisationstests korrelieren zum Teil mit denen der Western-Blot-Analyse: Seren der Ratten, die kein gp70-Signal zeigten, vermittelten auch keine Neutralisation (Ratte 150.3, 143.1; nicht zutreffend für Gruppe 149).

### Immunisierung der Ziege 52 mit den PERV-Gp70-Proteinfragmenten

Die Immunisierung der Proteinfragmente löste bei den Ratten eine humorale Immunantwort aus. Zur Gewinnung größerer Mengen Serum, die als Positivkontrolle für die Diagnostik verwendet werden können, wurde eine Ziege mit den Untereinheiten des gp70 immunisiert. Um möglichst die gesamte Länge des gp70 und somit alle Epitope abzudecken, wurden die Fragmente 123 und 5 verwendet. Die Immunisierung erfolgte auch hier mit öligem Adjuvans intramuskulär in beide Hinterläufe.

### Induktion bindender und neutralisierender Antikörper gegen die PERV-gp70-Proteinfragmente in Ziege 52

Das drei Wochen nach dem *boost* aus dem Blut der Ziege 52 gewonnene Serum wurde zusammen mit den Seren der Ziegen 16 (FIEBIG et al., 2003) und 62 (vgl. 4.2.3.2) mittels Western-Blot-Analyse hinsichtlich bindender Antikörper gegen pelletierte PERV-Partikel getestet. Mit dem Serum der Ziege 52 konnte das virale gp70 (Abb. 4.30) detektiert und somit die Induktion bindender Antikörper bestätigt werden.

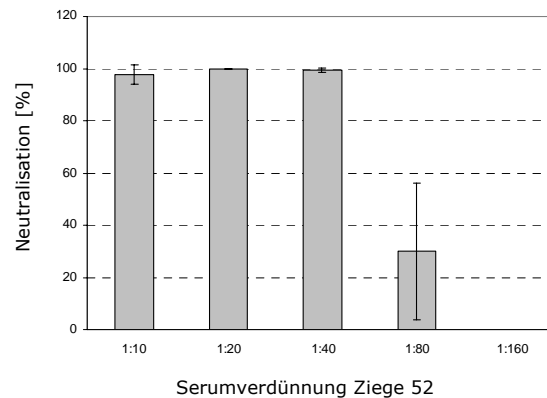


**Abbildung 4.30: PERV-gp70-Detektion mit den Seren der mit den gp70-Fragmenten sowie rp52 immunisierten Ziegen**

Western-Blot-Analyse mit den Seren der immunisierten Ziegen unter Verwendung pelletierter PERV-Partikel. K: Kontrolle (Ziege 16:  $\alpha$ -PERV-p15E, FIEBIG et al., 2003), Ziege 52:  $\alpha$ -PERV-gp70,  $\alpha$ -KoRV-gp70

Mit den Seren der mit Fragment 5 bzw. 123 immunisierten Ratten konnten neutralisierende Effekte auf eine *in vitro*-PERV-Infektion nachgewiesen werden. Wie erwartet, zeigte auch das Serum der Ziege 52 eine starke Neutralisation. Durch Ausverdünnung des Serums konnte für die Neutralisation ein Titer von 40 bestimmt werden (Abb. 4.31), d.h. bis zu einer Verdünnung des Serums von 1:40 wurde ein starker neutralisierender Effekt beobachtet. Zur Bestimmung der Spezifität des neutralisierenden Effekts des Ziegenserums 52 wurde ein Antigen-Inhibitionsversuch durchgeführt. Hierfür wurde das Serum der Ziege 52 vor dem Neutralisationstest jeweils mit den Proteinfragmenten 1, 2, 3 und 5 vorinkubiert. Auf diese Weise sollten Antikörper

gegen das jeweilige Proteinfragment gehemmt werden, um somit zum einen eine Aussage über die Spezifität zu treffen, d.h. dass die neutralisierende Aktivität tatsächlich auf Antikörper zurückzuführen ist und nicht auf eventuelle Komplement- oder andere lösliche antivirale Faktoren. Zum anderen sollten die Bereiche des Antigens, die zur Induktion von neutralisierenden Antikörpern führten, festgestellt werden. Da die Proteine in unlöslicher Form vorlagen, führte die Inkubation der 293-Zellen mit dem Protein-Serum-Gemisch zu zytotoxischen Effekten, wodurch der Neutralisationstest nicht auswertbar war.



**Abbildung 4.31: Neutralisierende Effekte des Serums der mit PERV-gp70-Proteinfragmenten immunisierten Ziege 52**

Titration der Ziegenserums 52 im Neutralisationstest. Zur Bestimmung des Titers an neutralisierenden Antikörpern wurde das Serum mit einer Verdünnungsstufe von 2 ausverdünnt. Seren, deren neutralisierender Effekt 75% übersteigt, werden als signifikant neutralisierend betrachtet. Die dargestellten Neutralisationswerte wurden auf die Werte des Präimmuserums normalisiert.

#### 4.2.3.2 Immunisierung mit rekombinantem PERV- bzw. KoRV-rp52

Das Koala Retrovirus ist phylogenetisch eng mit den porzinen endogenen Retroviren verwandt. Da KoRV im Gegensatz zu PERV in der Lage ist, Ratten *in vivo* zu infizieren, könnte dieses System, wie einleitend beschrieben, als Modell für einen Impfstoff gegen PERV dienen.

Die bisher generierten Proteinfragmente bieten hierfür einen vielversprechenden Ansatz. Dennoch ist es wünschenswert, mit Hilfe des gesamten gp70-Proteins alle Epitope, inklusive möglicher Konformationsepitope, abzudecken. Daher wurde die rekombinante Herstellung der gesamten gp70-Proteine von PERV und KoRV parallel angestrebt.

#### Konzeption der p52-Sequenz am Beispiel des FeLV-p45

Bei dem phylogenetisch eng mit PERV und KoRV verwandten FeLV war es gelungen das Hüllprotein, einschließlich der ersten 34 Aminosäuren des Transmembranproteins p15E, rekombinant herzustellen und als protektiven Impfstoff zu verwenden (MARCIANI et al., 1991). Die Sequenz dieses unglykosilierten Proteins (p45) diente als Vorlage für die Klonierung der Hüllproteine von PERV und KoRV in den Expressionsvektor pET-22b(+). Die Aminosäuresequenz des p45 (FeLV-A Glasgow strain: p08359) wurde ausgehend von Marciani et al. (MARCIANI et al., 1991) übernommen und mit den *env*-Sequenzen von

PERV und KoRV (AF\_151794) abgeglichen. Für den N-Terminus konnte als letzte übereinstimmende Homologie das in den meisten  $\gamma$ -Retroviren hochkonservierte PHQ-Motiv (FeLV: Position 38, PERV: Acc. no. AF\_130444, Position 52, KoRV: Acc. no. AF\_151794, Position 42) identifiziert werden (LAVILLETTE UND KABAT, 2004). Für das in die p15E-Region hineinreichende C-terminale Ende wurden 25 Aminosäuren bestimmt. Diese enthalten das Fusionspeptid von p15E und enden, im Falle von PERV, in der Peripherie des Epitopes E1 (FIEBIG et al., 2003). Die gesamten Spannen der gewählten Sequenzen sind in Tabelle 4.8 aufgeführt.

**Tabelle 4.8: Ermittelte Spannen der Sequenzen für rp52 von PERV und KoRV**

Es sind jeweils die Positionen der ersten und letzten Aminosäure der Env-Sequenz sowie die sich daraus ergebenden Gesamtlängen der rekombinanten p52-Proteine aufgeführt. Die gesamte Env-Sequenz beträgt bei beiden Viren 659 AS. Die Vektorsequenzen setzen sich aus dem C-terminalen His-tag und der MCS zusammen.

	AS Position N-Terminus	AS Position C-Terminus	Gesamtlänge	berechnetes Molekulargewicht	zzgl. Vektorsequenzen
PERV	49	487	439 AS	49,1 kDa	51,8 kDa
KoRV	41	41	448 AS	48,9 kDa	51,7 kDa

Die Molekulargewichte der daraus resultierenden Proteine (inklusive der Vektorsequenzen) wurden mit Hilfe der *software* LASERGENE theoretisch auf 52 kDa berechnet und die rekombinant hergestellten Proteine daher als rp52 bezeichnet.

### Herstellung und Expression der rp52-Konstrukte

Bisher konnte PERV-gp70 nur in eukaryotischen Zellen exprimiert werden (WATANABE et al., 2005). Für KoRV-gp70 wurde bislang noch keine Expression beschrieben.

Da sich das PERV-gp70 in bisherigen Versuchen mit herkömmlichen Expressionsvektoren (pGEX-5x-1, pCAL-n) nicht exprimieren ließ, wurde der Expressionsvektor pET-22b(+) gewählt. Dieser steht unter einer relativ strengen Transkriptionskontrolle, erlaubt somit die Expression von zellschädigenden Proteinen, und besitzt zudem eine Signalsequenz (*pelB-leader sequence*), die das produzierte Protein in das Periplasma von *E. coli* dirigiert (Novagen, TB038 12/98). Das Milieu des Periplasmas ist im Gegensatz zum Lumen stärker reduzierend und kann somit zur korrekten Faltung und zur Löslichkeit des Proteins beitragen. Des Weiteren besitzt das Periplasma eine andere Proteinzusammensetzung als das Zytoplasma, was eine eventuelle Hydrolyse des rekombinant hergestellten Proteins verhindern kann. Nachteilig wirkt sich jedoch die häufig beobachtete reduzierte Expressionsrate aus.

Aufgrund dieser Tatsachen erfolgten parallel zwei Expressionsansätze: Zum einen die Expression der viralen Hüllproteine mit dem Lokalisierungssignal für das *E. coli*-Periplasma und zum anderen eine Expression ohne Lokalisierungssignal, was zum Verbleib der Proteine im Zytoplasma führt.

Für beide Ansätze wurden die in Tabelle 2.3 als PERV-gp70-pET[...] bzw. KoRV-gp70-pET[...] bezeichneten Primer für die p52-Sequenzen von PERV und KoRV ermittelt und an das Leseraster des pET-22b(+) angeglichen. Ausgehend von viraler RNA, wurden die Sequenzen mittels *one-step* RT-PCR kloniert. Es konnten drei von vier Plasmiden hergestellt werden: KoRV-p52-pET-22b(+)-pelB-Is, KoRV-p52-pET-22b(+) und PERV-

p52-pET-22b(+)-pelB-IIs. Die Sequenzierung ergab für alle drei Plasmide ein vollständig erhaltenes Leseraster mit den folgenden Aminosäureaustauschen im Vergleich zur Datenbanksequenz (PERV-A/C: AF130444, KoRV: AF\_151794):

In der PERV-*rp52*-Sequenz kam es an Position 209 zu einem Aminosäureaustausch von Serin zu Alanin. In der KoRV-*rp52*-Sequenz wurden die bereits im Koala Birubi beobachteten Abweichungen an Position 408 (Asparagin zu Histidin) und 459 (Serin zu Prolin) gefunden (FIEBIG et al., 2006).

Mit Hilfe eines Kolonieblots (3.3.8) unter Verwendung eines  $\alpha$ -Penta-his-Antikörpers (Qiagen) wurden die Transformanten zunächst hinsichtlich ihres Potentials, das rekombinante rp52-Protein zu exprimieren, getestet. Hierbei konnte ausschließlich bei Klonen, welche mit den pET-22b(+)-Plasmiden inklusive der *pelB-leader sequence* transformiert wurden, sowohl mittels ECL-Detektion als auch mit DAB-Detektion ein deutliches Signal detektiert werden. Dem gegenüber wurde bei Klonen, die mit dem Vektor pET-22b(+) ohne Signalsequenz transformiert waren, kein Signal beobachtet. Da das His-tag C-terminal mit dem rekombinanten Protein fusioniert ist, wurden mit dem  $\alpha$ -Penta-his-Antikörper nur vollständig translatierte Proteine detektiert. Mit diesem Vortest konnte somit eine Expression der Proteine mit dem Lokalisationssignal für das Periplasma nachgewiesen werden.

#### **Überexpression und Reinigung der rp52-Proteine in *E.coli***

Expressionsversuche unter Standardbedingungen (1 mM IPTG, 37°C, 3 Stunden) führten nicht zur Überexpression der rp52-Proteine beider Viren. Mit Hilfe einer Expressionsoptimierung, im Zuge derer unterschiedliche IPTG-Konzentrationen, verschiedene Temperaturen sowie diverse Expressionszeiträume getestet wurden, konnten zwei Expressionsbedingungen mit ähnlich guten Ausbeuten ermittelt werden:

- 0,05 mM IPTG, 37°C, 3 Stunden
- 0,5 mM IPTG, 4°C, 24 bis 30 Stunden

Nach der Aufreinigung der Proteine mit Hilfe von Ni-NTA-Affinitätschromatografie-Säulen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte eine Dialyse gegen PBS, die zum Ausfallen der Proteine führte. Eine Dialyse über einen Harnstoffgradienten führte ebenfalls nicht zur Löslichkeit des Proteins. Die ausgefallenen Proteine konnten im Polyacrylamidgel sowie mittels der Western-Blot-Analyse auf einer Höhe von ca. 55 kDa detektiert werden.

#### **Detektion von bakteriellen Glykosylierungen**

Da das Signal der rekombinant hergestellten rp52-Proteine im Polyacrylamidgel höher lief als erwartet, wurde eine bakterielle Glykosylierung des Proteins vermutet. Mit Hilfe einer spezifischen Färbung von Glykoproteinen (siehe 3.3.6) im Polyacrylamidgel konnte jedoch keine Glykosylierung der rekombinanten p52-Proteine von PERV und KoRV festgestellt werden.

#### **Immunisierung von Ratten sowie der Ziegen 61 und 62 mit rekombinantem PERV- bzw. KoRV-rp52**

Durch Immunisierung mit dem transmembranen Hüllprotein p15E der Viren PERV, FeLV und KoRV wurden bereits neutralisierende Antikörper induziert (FIEBIG et al., 2003,

LANGHAMMER et al., 2005, FIEBIG et al., 2006), die im Fall des FeLV in der Lage waren, drei von sechs Katzen über einen Zeitraum von 2 Jahren vor einem Ausbruch der Leukose zu schützen (LANGHAMMER, 2006). Wie bereits Stefan Langhammer beschrieben hat, könnte p15E in Kombination mit Leucogen (p45) einen verbesserten Impfstoff darstellen, der im optimalen Fall eine sterile Immunität vermittelt (LANGHAMMER, 2006).

Basierend auf diesen Ergebnissen erfolgte die Immunisierung von Ratten mit den rp52- und p15E-Proteinen beider Viren jeweils einzeln und in Kombination. Die rekombinanten p15E-Proteine bestanden jeweils nur aus der Ektodomäne des transmembranen Hüllproteins (FIEBIG et al., 2003). Tabelle 4.9 zeigt eine Übersicht über die erfolgten Immunisierungen. Die Gruppe 209 diente als Negativkontrolle und wurde ausschließlich mit Adjuvans immunisiert. Im Gegensatz zu dem bei der Doppelimmunisierung gegen FeLV benutzten Aluminiumhydroxid und Saponin erfolgte die Immunisierung mit öligen Adjuvans (Freund). Des Weiteren wurden die Ziegen 61 und 62 mit KoRV-rp52 bzw. PERV-rp52 immunisiert. Drei Wochen nach der jeweiligen ersten Immunisierung erfolgte ein *boost* mit denselben Antigenen und weitere drei Wochen später eine Blutabnahme. Die daraus gewonnenen Seren wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet.

**Tabelle 4.9: Übersicht der mit PERV-rp52 und -p15E sowie KoRV-rp52 und -p15E immunisierten Rattengruppen und Ziegen**

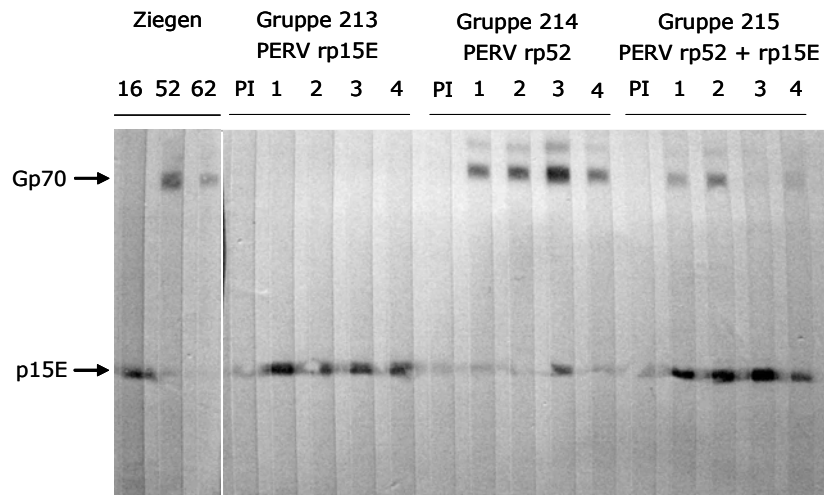
<b>Rattengruppen</b>	<b>Antigen</b>
209	Adjuvans (Kontrollgruppe)
210	KoRV-rp52
211	KoRV-rp52 + p15E
212	KoRV-p15E
213	PERV-p15E
214	PERV-rp52
215	PERV-rp52 + p15E
<b>Ziegen</b>	<b>Antigen</b>
61	KoRV-rp52
62	PERV-rp52

### **Induktion bindender Antikörper gegen die rekombinanten PERV-Hüllproteine rp52 und p15E**

Die gewonnenen Seren der Rattengruppen 213 (PERV-p15E), 214 (PERV-rp52) sowie 215 (PERV-p15E + rp52) und der Ziege 62 (PERV-rp52) wurden mit Hilfe der Western-Blot-Analyse hinsichtlich bindender Antikörper gegen die immunisierten rekombinanten Proteine untersucht. Mit allen Seren konnte das entsprechende Antigen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurde die Bindung der Seren gegen die viralen Hüllproteine (pelletiertes Virus) analysiert (Abb. 4.32).

Mit Ausnahme des Serums der Ratte 215.3, das nur p15E erkannte, konnte mit allen Seren die entsprechenden viralen Proteine detektiert werden. Mit dem Serum der Ratte 214.3 wurde das stärkste Signal gegen rp52 detektiert. Im Gegensatz zu den Seren der restlichen Tiere der Gruppe konnte zusätzlich ein unerwartetes Signal auf der Höhe von p15E beobachtet werden (vgl. 5.2.3.1).

Mit dem Ziegenserum 62 wurde das virale gp70 im Vergleich zum Serum der Ziege 52 (immunisiert mit den PERV gp70-Fragmenten) mit der gleichen Serumverdünnung (1:200) wesentlich schwächer detektiert (Abb. 4.32).



**Abbildung 4.32: Detektion der PERV-Proteine gp70 und p15E mit den Immunsereen der Rattengruppen 213, 214, 215 und der Ziege 62**

Western-Blot-Analyse mit den Seren der mit PERV-rp15E (213), rp52 (214) und rp52 + p15E (215) immunisierten Rattengruppen und der Ziege 62 (rp52) unter Verwendung pelletierter PERV-Partikel. Als Kontrollen wurden die Seren der Ziegen 16 ( $\alpha$ -PERV-p15E) und 52 ( $\alpha$ -PERV-gp70, Fragment 123 und 5) verwendet. Als Negativkontrolle diente jeweils das Präimmunserum (PI) von Ratte 1 der entsprechenden Gruppe.

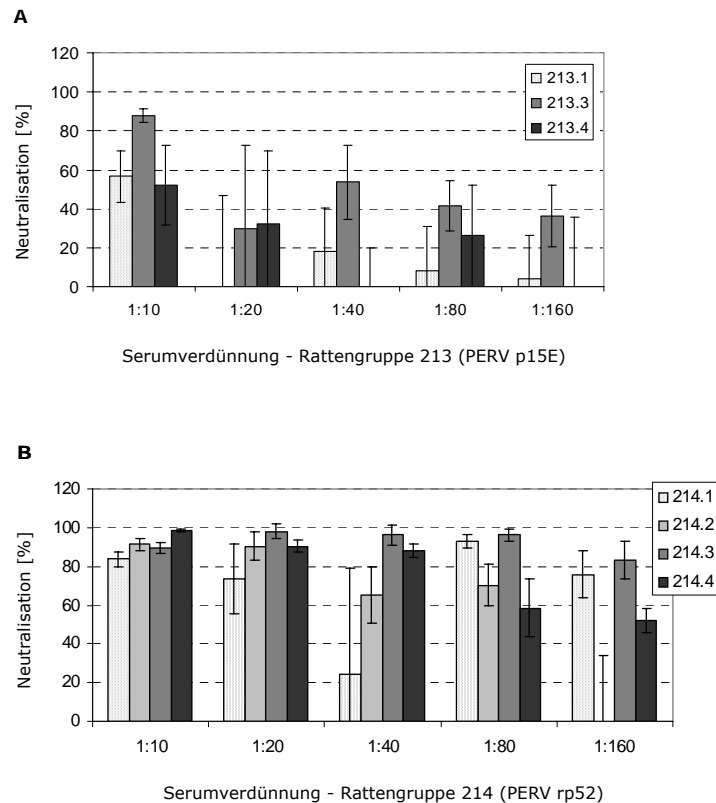
### **Auswirkungen der Doppelimmunisierung mit den rekombinanten PERV-Hüllproteinen auf bindende Antikörper**

Mit den Seren der mit beiden Proteinen (rp52 und p15E) immunisierten Ratten (Gruppe 215) wurde mit der gleichen Serumverdünnung eine schwächere Bindung des viralen gp70 detektiert, als mit den Seren der Rattengruppe 214, welche nur rp52 appliziert bekamen (Abb. 4.32). Das Serum der Ratte 215.4 zeigte hierbei nur eine sehr schwache Bindung des viralen gp70 und mit dem Serum der Ratte 215.3 war kein Signal zu detektieren. Hinsichtlich der Bindung an das virale p15E hingegen konnten mit den Seren der Rattengruppe 215 keine sichtbare Unterschiede im Vergleich zu den Seren der Einzelimmunisierung (Gruppe 213) festgestellt werden. Mit dem Serum des Tieres 215.3 wurde sogar das stärkste Signal gegen p15E detektiert (Abb. 4.32).

### **Induktion neutralisierender Antikörper gegen die PERV-Hüllproteine gp70 und p15E**

Hinsichtlich neutralisierender Eigenschaften, also der Fähigkeit *in vitro* vor einer PERV-Infektion zu schützen, wurden die Seren im Neutralisationstest untersucht (Abb. 4.33). Ratte 213.2 wurde nicht mit aufgeführt, da von diesem Tier nicht genügend Serum vorhanden war. Nur bei einem Serum der drei mit p15E immunisierten Tieren (213.3) konnte eine deutliche Neutralisation (> 75%) bestimmt werden, jedoch nur bei einer Serumverdünnung von 1:10. Im Gegensatz dazu konnten durch die Immunisierung mit

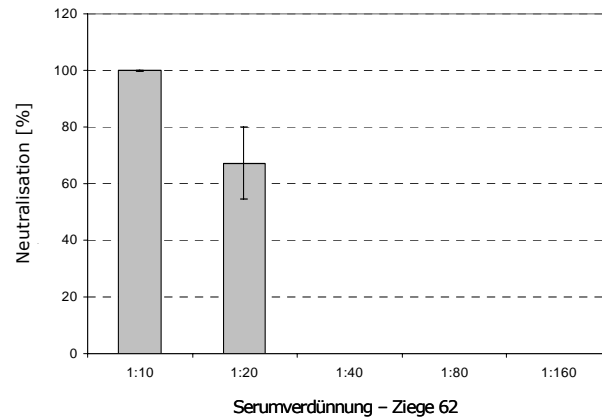
rp52 (Gruppe 214) hohe neutralisierende Titer erhalten werden. Bei zwei von vier Tieren (214.1 und 214.3) zeigten die Seren bis zu einer Verdünnung von 1:160 eine neutralisierende Wirkung von 75 bis 82%. Ab einer Verdünnung von 1:320 konnte kein neutralisierender Effekt mehr detektiert werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4.33: Neutralisierende Effekte der Immunsere der Rattengruppen 213 (p15E) und 214 (rp52)**

Titration der Rattensere 213.1 bis 213.4 (A) und 214.1 bis 214.4 (B) im Neutralisationstest. Zur Bestimmung des Titters an neutralisierenden Antikörpern wurde das Serum mit einer Verdünnungsstufe von 2 ausverdünnt. Seren, deren neutralisierender Effekt 75% übersteigt, werden als signifikant neutralisierend betrachtet. Die dargestellten Neutralisationswerte wurden auf die Werte der Kontrollseren (Rattengruppe 209: Adjuvans) normalisiert.

Die Seren der anderen zwei Tiere dieser Gruppe wirkten bis zu einer Verdünnung von 1:40 (214.4) und 1:80 (214.2) neutralisierend. Die höchste Neutralisation konnte bei dem Serum der Ratte 214.3, das auch in der Western-Blot-Analyse ein sehr starkes Signal zeigte, beobachtet werden. Das Serum der Ziege 62 zeigte einen starken neutralisierenden Effekt (nahezu 100%) bei einer Serumverdünnung von 1:10, der bei der 1:20 Verdünnung jedoch mit 67% nicht mehr signifikant war und ab einer Verdünnung von 1:40 nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.34). Somit enthielt das Serum der Ziege 62 einen wesentlich niedrigeren Titer an neutralisierenden Antikörpern als das Serum der Ziege 52, welche mit den gp70-Proteinfragmenten immunisiert worden war (direkter Vergleich der Neutralisationswerte beider Ziegensere, siehe Abb. 4.39 B). Diese Beobachtungen korrelieren mit dem Ergebnis der Western-Blot-Analyse, in welchem mit dem Ziegenserum 62 eine deutlich schwächere Bindung des gp70 zu erkennen war (Abb. 4.32).

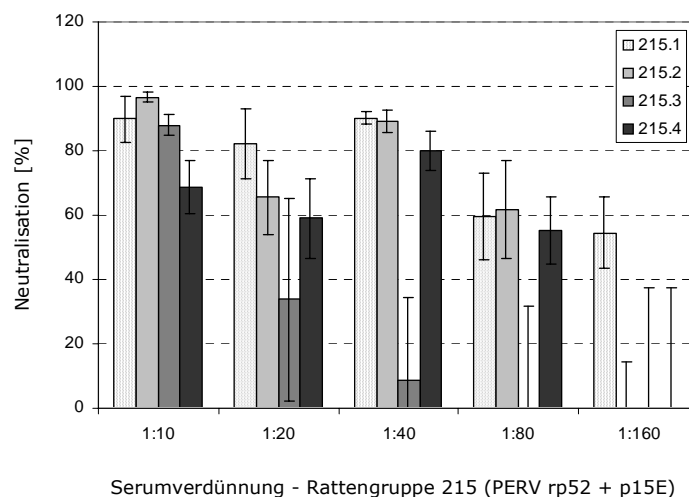


**Abbildung 4.34: Neutralisierende Effekte des Serums der mit PERV-rp52 immunisierten Ziege 62**

Titration des Ziegenserums 62 im Neutralisationstest. Zur Bestimmung des Titer an neutralisierenden Antikörpern wurde das Serum mit einer Verdünnungsstufe von 2 ausverdünnt. Seren, deren neutralisierender Effekt 75% übersteigt, werden als signifikant neutralisierend betrachtet. Die dargestellten Neutralisationswerte wurden auf die Werte des Präimmenserums normalisiert.

### Auswirkungen der Doppelimmunisierung mit den rekombinanten PERV-Hüllproteinen auf neutralisierende Antikörper

Die neutralisierende Wirkung der Seren aus der Rattengruppe 215, die eine Doppelimmunisierung erhielt (Abb. 4.35), war wesentlich stärker als bei einer Einzelimmunisierung mit p15E. Im Vergleich mit der Gruppe 214, die rp52 alleine erhalten hatte, traten für die Neutralisation jedoch geringere Absolutwerte und auch geringere Titer neutralisierender Antikörper auf.



**Abbildung 4.35: Neutralisierende Effekte der Immunsereen der Rattengruppe 215 (rp52 & p15E)**

Titration der Rattenserum 215.1 bis 215.4 im Neutralisationstest. Zur Bestimmung des Titer an neutralisierenden Antikörpern wurde das Serum mit einer Verdünnungsstufe von 2 ausverdünnt. Seren, deren neutralisierender Effekt 75% übersteigt, werden als signifikant neutralisierend betrachtet. Die dargestellten Neutralisationswerte wurden auf die Werte der Kontrollseren (Rattengruppe 209: Adjuvans) normalisiert.



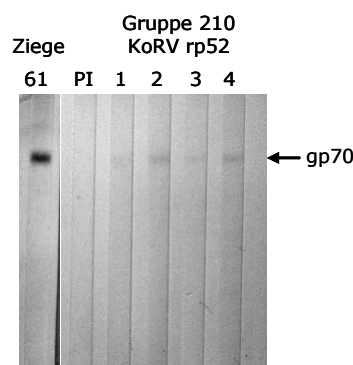
Das Serum der Ratte 215.3, das auch in der Western-Blot-Analyse keine sichtbare Bindung an gp70 zeigte, hatte nur bei einer Verdünnung von 1:10 eine neutralisierende Wirkung. Bei den Seren der anderen drei Tiere der Gruppe konnten bis zu einer Verdünnung von 1:40 relativ hohe Neutralisationen von  $\geq 80\%$  gezeigt werden.

### Induktion bindender Antikörper gegen die rekombinanten KoRV-Hüllproteine rp52 und p15E

Analog zu den Immunisierungsversuchen mit den PERV-Hüllproteinen wurden drei Rattengruppen sowie eine Ziege (61) mit den rekombinanten Hüllproteinen des Koala Retrovirus immunisiert. Die gewonnenen Seren der Rattengruppen 210 (KoRV-rp52), 211 (KoRV-rp52 + p15E) und 212 (KoRV-p15E) sowie der Ziege 61 (KoRV-rp52) wurden mit Hilfe der Western-Blot-Analyse hinsichtlich bindender Antikörper gegen die immunisierten rekombinanten Proteine untersucht. Mit allen Seren konnte das entsprechende Antigen detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren konnte unter Verwendung pelletierter KoRV-Partikel für alle Seren der Rattengruppe 210 (rp52) sowie für das Serum der Ziege 61 mittels Western-Blot-Analyse die Bindung an virales gp70 nachgewiesen werden (Abb. 4.36).

Für die Seren der Rattengruppen 211 (rp52 + p15E) und 212 (p15E) konnte auf Grund des Mangels von weiterem Viruslysate zunächst kein Bindungsnachweis an die viralen Proteine gp70 und p15E erbracht und somit auch kein Vergleich zwischen Einzel- und Kombinationsimmunisierung gezogen werden. In späteren Untersuchungen konnte die Bindung aufgrund der neutralisierenden Effekte dieser Seren jedoch bestätigt werden.



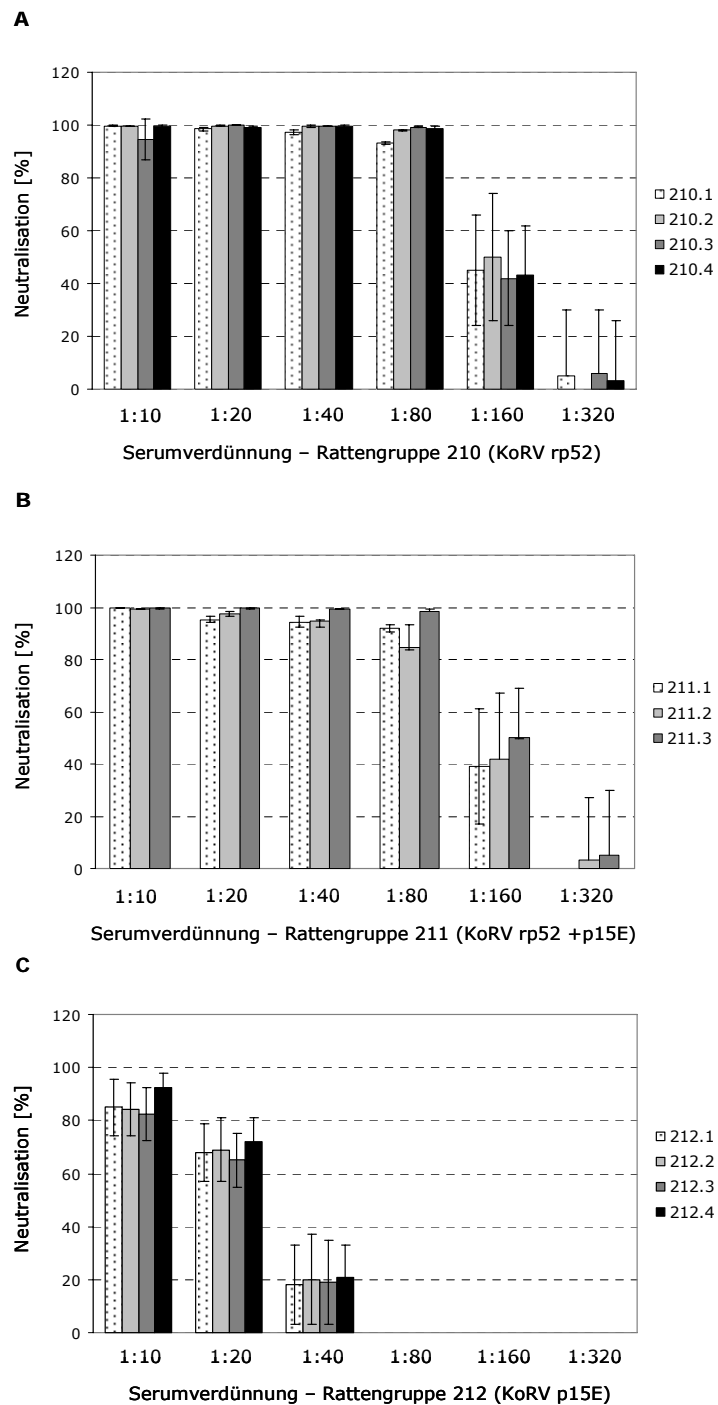
**Abbildung 4.36: Detektion der KoRV-Proteine gp70 und p15E mit den Immunsereen der Rattengruppen 210 und Ziege 61**

Western-Blot-Analyse mit den Seren der mit KoRV-rp52 immunisierten Ratten (210) unter Verwendung pelletierter KoRV-Partikel. Als Negativkontrolle diente das Präimmunsersum (PI) von Ratte 210.1.

### Induktion neutralisierender Antikörper gegen die KoRV-Hüllproteine gp70 und p15E

Mit Hilfe des bereits beschriebenen Neutralisationstests (3.5.2) wurden die Seren der Rattengruppen 210 (KoRV-rp52), 211 (KoRV-rp52 + p15E), 212 (KoRV-p15E) und das Serum der Ziege 61 (KoRV-rp52) hinsichtlich der Fähigkeit, *in vitro* vor einer KoRV-Infektion zu schützen, untersucht (Abb. 4.37). Durch die Immunisierung mit den KoRV-

Hüllproteinen rp52 und der Doppelimmunisierung mit KoRV-rp52 und -p15E konnten hohe Titer neutralisierender Antikörper erhalten werden (Abb. 4.37).



**Abbildung 4.37: Neutralisierende Effekte der Immunsereen der Rattengruppen 210 (KoRV- rp52), 211 (KoRV-rp52 + p15E) und 212 (KoRV-p15E)**

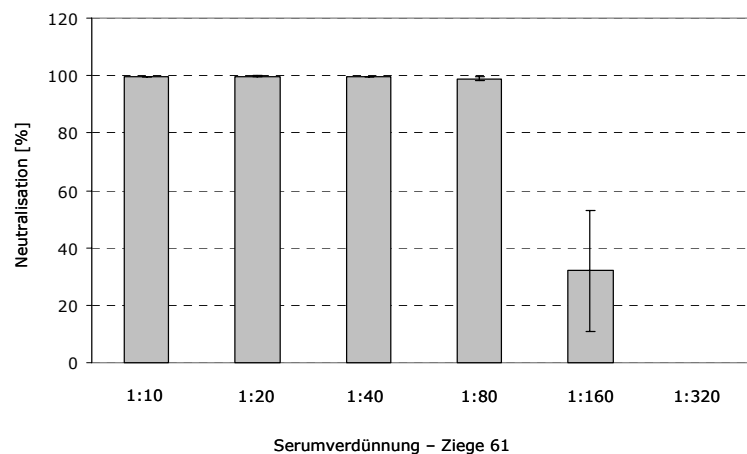
Titration der Rattenseren 210.1 bis 210.4 (A), 211.1 bis 211.3 (B) und 212.1 bis 212.4 (C) im Neutralisationstest. Zur Bestimmung des Titers an neutralisierenden Antikörpern wurde das Serum mit einer Verdünnungsstufe von 2 ausverdünnung. Seren, deren neutralisierender Effekt 75% übersteigt, werden als signifikant neutralisierend betrachtet. Die dargestellten Neutralisationswerte wurden auf die Werte der Kontrollseren (Rattengruppe 209: Adjuvans) normalisiert.

Die Seren aller Tiere der Rattengruppe 210, die mit KoRV-rp52 immunisiert wurden, zeigten bis zu einer Verdünnung von 1:80 eine konstante Neutralisation von über 95% (Abb. 4.37 A). Erst ab einer Verdünnung von 1:160 halbierte sich dieser Effekt.

Auch die Seren der Ratten, denen die Kombination aus rp52 und p15E verabreicht wurde (Rattengruppe 211), neutralisierten bis zu einer Verdünnung von 1:80 konstant bei über 90% (Abb. 4.37 B). Durch die Doppelimmunisierung war somit kein abschwächender Effekt, wie er bei der Doppelimmunisierung der PERV-Hüllproteine zu beobachten war, zu erkennen. Bei der Serumverdünnung von 1:160 sank die neutralisierende Wirkung der Seren auf unter 50%. Das Tier 211.4 verstarb in Folge der Blutabnahme nach der ersten Immunisierung und konnte daher nicht in die Untersuchungen mit einbezogen werden.

Die Seren der Tiere der Rattengruppe 212, die mit KoRV-p15E immunisiert wurden, zeigten nur bei einer Verdünnung von 1:10 einen neutralisierenden Effekt von 80 bis 90% (Abb. 4.37 C). Bereits bei der nächsten Verdünnungsstufe (1:20) lag dieser Effekt unter 70% und war somit nicht mehr signifikant.

Mit dem Serum der mit KoRV-rp52 immunisierten Ziege 61 konnte eine starke Neutralisation von nahezu 100% bis zu einer Serumverdünnung von 1:80 nachgewiesen werden. Bei einer Verdünnungsstufe von 1:160 lag dieser Effekt nur noch bei ca. 35% (Abb. 4.38).



**Abbildung 4.38: Neutralisierende Effekte des Serums der mit KoRV-rp52 immunisierten Ziege 61**

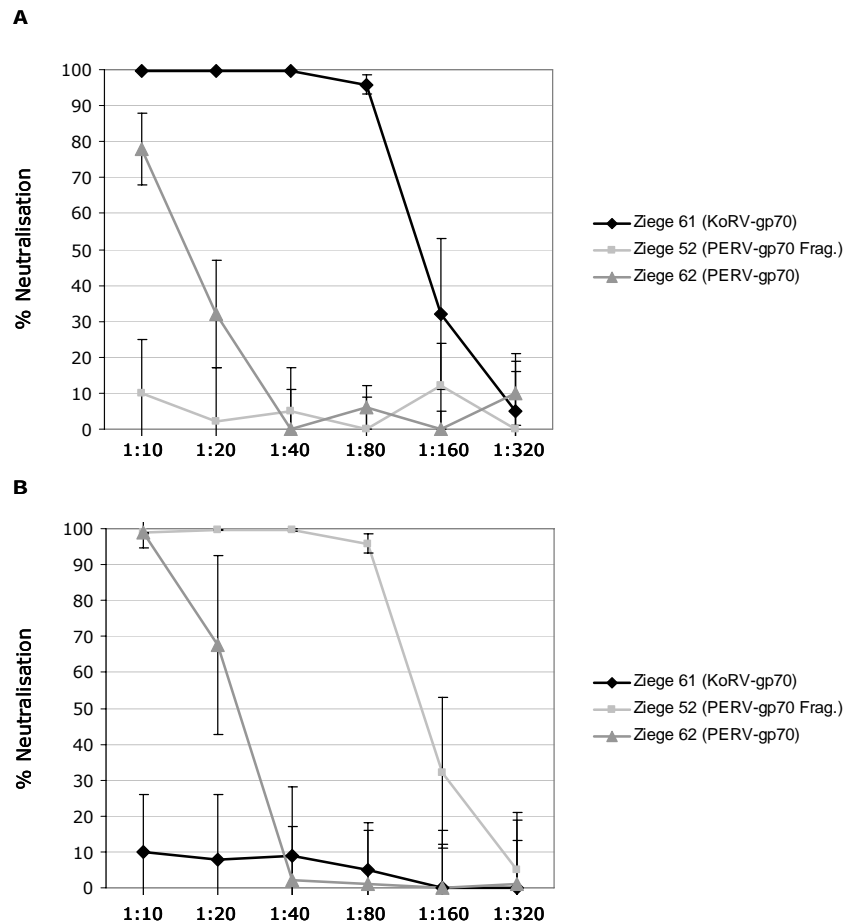
Titration der Ziegenserums 61 im Neutralisationstest. Zur Bestimmung des Titers an neutralisierenden Antikörpern wurde das Serum mit einer Verdünnungsstufe von 2 ausverdünnt. Seren, deren neutralisierender Effekt 75% übersteigt, werden als signifikant neutralisierend betrachtet. Die dargestellten Neutralisationswerte wurden auf die Werte des Präimmunserums normalisiert.

### Kreuzneutralisierende Effekte

Von dem Transmembranprotein p15E ist bereits bekannt, dass durch Immunisierung induzierte Antikörper gegen p15E aufgrund dessen hoher Konservierung, eine kreuzneutralisierende Wirkung auf andere Retroviren wie FeLV, PERV oder KoRV aufweisen können.

Daher wurden die Seren der mit den rekombinanten Proteinen PERV- und KoRV-p52- sowie den PERV-gp70-Proteinfragmenten immunisierten Ziegen 62, 61 und 52 im Neutralisationstest hinsichtlich kreuzneutralisierender Effekte auf das jeweils andere Virus (PERV und KoRV) analysiert.

Für die Seren der Ziegen 52 (immunisiert mit PERV-gp70-Fragmenten) und 61 (immunisiert mit KoRV-rp52) konnten keine Kreuzneutralisation von KoRV bzw. PERV festgestellt werden (Abb. 4.39 A,B). Das Serum der Ziege 62 (immunisiert mit PERV-rp52) zeigte bei einer Verdünnung von 1:10 einen kreuzneutralisierenden Effekt auf KoRV (80%). Dieser Effekt war bei jedoch bei einer Serumverdünnung von 1:20 bereits auf 24% gesunken und somit nicht mehr signifikant (Abb. 4.39 A).



**Abbildung 4.39: Kreuzneutralisierende Effekte der Ziegenserum 52, 61 und 62**

**A:** Titration der Ziegenserum 61, 52 und 62 im KoRV-Neutralisationstest. **B:** Titration der Ziegenserum 61, 52 und 62 im PERV-Neutralisationstest. Zur Bestimmung des Titers an neutralisierenden Antikörpern wurde das Serum mit einer Verdünnungsstufe von 2 ausverdünnt. Seren, deren neutralisierender Effekt 75% übersteigt, werden als signifikant neutralisierend betrachtet.

#### 4.2.3.3 DNA-Vakzinierung mit gp70- und gp85-Konstrukten von PERV und KoRV

Parallel zu der Immunisierung mit den rekombinanten Proteinen erfolgte eine DNA-Vakzinierung mit den gp70- und gp85-Sequenzen beider Viren (PERV und KoRV).

Da für Retroviren gezeigt werden konnte, dass das Hüllprotein in einer trimeren Struktur vorliegt, wurde versucht, diese Trimerisierung mit Hilfe einer Trimerisierungsdomäne zu erreichen. Hierfür wurde die Sequenz der Trimerisierungsdomäne des Fibrinins, das Kragenprotein des Bakteriophagen T4 (TAO et al., 1997), an das C-terminale Ende der *env*-Sequenzen angefügt. Dieses sollte zu einer Stabilisierung der Trimer-Struktur der

exprimierten Proteine führen und zudem deren Löslichkeit erhöhen (YANG et al., 2002, BOWER et al., 2006). Ein weiteres Ziel ist der Erhalt von Konformationsepitopen, welche nur die Trimerstruktur beinhaltet.

### Herstellung und Immunisierung der DNA-Konstrukte

Zur Herstellung der DNA-Konstrukte wurden die in Tabelle 2.3 aufgeführten Primer (Abkürzung „pD“ für pDisplay) konzipiert, die das komplette gp70 sowie das gp85 ohne die Transmembran- und zytoplasmatische Domäne von PERV und KoRV amplifizieren sollten und Schnittstellen für die Klonierung in den eukaryontischen Expressionsvektor pDisplay beinhalteten. N-terminal der pDisplay-MCS sitzt das Hämagglutinin-A-Epitop. Die C-terminale Transmembrandomäne wurde nicht benutzt, da das Protein zur Induktion einer humoralen Immunantwort sezerniert werden sollte. Auf der Basis von genomischer DNA PERV- bzw. KoRV-infizierter 293-Zellen wurden die gp70- und gp85-Sequenzen amplifiziert und in den Vektor pDisplay kloniert. Die Trimerisierungsdomäne des Fibrins wurde durch Hybridisierung der entsprechenden mit Schnittstellen versehenen Oligonukleotide (Tab. 2.3) generiert und C-terminal an die gp70- bzw. gp85-Konstrukte angefügt. Nachfolgend erfolgte die Endotoxin-freie Aufreinigung und Sequenzierung der Plasmide. In den Sequenzierungsergebnissen fanden sich für die Konstrukte die folgenden Punktmutationen, die zu den in Tabelle 4.10 aufgelisteten Aminosäureaustauschen führen.

**Tabelle 4.10: Aminosäureaustausche in Folge von Punktmutationen in den gp70- und gp85-Sequenzen von PERV und KoRV**

Konstrukt	AS-Position	AS-Austausch
pDisplay-PERV-gp70-Fib	232	Arginin → Glycin
	266	Glutamat → Lysin
pDisplay-PERV-gp85-Fib	232	Arginin → Glycin
	266	Glutamat → Lysin
	343	Glycin → Arginin
	509	Asparagin → Aspartat
	589	Glycin → Glutamat
pDisplay-KoRV-gp70-Fib	262	Glycin → Arginin
	408	Arginin → Histidin
pDisplay-KoRV-gp85-Fib	306	Leucin → Phenylalanin
	408	Arginin → Histidin
	459	Serin → Prolin

Die obigen Mutationen von KoRV an Position 408 und 459 sind die bekannten Aminosäureaustausche aus der vom Koala Birubi isolierten Sequenz. Der Austausch an AS-Position 459 (S → P) trat nur im Fall von KoRV gp85. Mit den Plasmiden erfolgte anschließend die DNA-Immunisierung der in Tab. 4.11 aufgeführten Rattengruppen 8 bis 12 mit Hilfe einer GENEGUN (BIORAD).

Tabelle 4.11: Übersicht der DNA-Immunisierungen

Rattengruppe	Antigen
8	pDisplay (Leervektorkontrolle)
9	pDisplay-KoRV-gp70-Fib
10	pDisplay-KoRV-gp85-Fib
11	pDisplay-PERV-gp70-Fib
12	pDisplay-PERV-gp85-Fib

Vier Wochen nach der initialen Immunisierung der Ratten, folgte eine zweite und weitere vier Wochen später eine dritte Immunisierung zur Steigerung der Antikörpertiter. Die Blutabnahmen erfolgten jeweils 2 Wochen nach der zweiten und der dritten Immunisierung.

#### **Induktion bindender Antikörper gegen die PERV- und KoRV-Hüllproteine**

Die zwei Wochen nach der dritten Immunisierung gewonnenen Seren wurden mit Hilfe der Western-Blot-Analyse hinsichtlich bindender Antikörper gegen die rekombinanten Hüllproteine rp52 und p15E beider Viren untersucht. Die rekombinanten Proteine konnten zwar mit allen Seren detektiert werden, jedoch nur in sehr schwachem Ausmaß (Daten nicht gezeigt).

Erwartungsgemäß konnte in einem anschließenden Neutralisationstest auch bei der geringen Verdünnung der Seren von 1:10 keine signifikante Neutralisation nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

## 5 DISKUSSION

Die aktuell in Deutschland geführte Diskussion über eine Neuregelung der Organspende nach dem Vorbild anderer europäischer Länder verdeutlicht die Brisanz des hier zu Lande herrschenden Organmangels.

Jahr für Jahr sterben hunderte Patienten, die durch eine Organtransplantation vermutlich hätten gerettet werden können, für die jedoch nicht rechtzeitig ein Organ zur Verfügung stand. Organmangel stellt zwar ein chronisches Problem der Transplantationsmedizin in allen Ländern dar, in Deutschland ist das Problem jedoch besonders ausgeprägt. Vergleiche zeigen, dass in Deutschland bezogen auf die Zahl der Einwohner weniger Organspenden durchgeführt werden als in anderen Ländern (Stellungnahme zur Organspende des Nationalen Ethikrats, April 2007).

Der Nationale Ethikrat stellte im April diesen Jahres daher die Frage in den Raum, ob es ethisch und verfassungsrechtlich vertretbar sei, die geltende gesetzliche Regelung hinsichtlich der erforderlichen ausdrücklich erklärten Zustimmung der Spender bzw. ihrer Angehörigen zu ändern, um den Organmangel zu lindern. Hierbei wird ein Stufenmodell vorgeschlagen, das Elemente einer Erklärungsregelung mit Elementen einer Widerspruchsregelung verbindet. So liegt es in der Verantwortung des Staats über das häufig tabuisierte Thema Organspende zu informieren und aufzuklären und in der Verantwortung jedes einzelnen sich mit Fragen der Organspende und dem eigenen Tod zu beschäftigen und zu einer verantwortlichen und frühzeitigen eigenen Urteilsbildung zu kommen. Der Wissenschaft obliegt es, durch Verbesserung der Techniken und vor allem durch die Findung geeigneter Alternativen, Leiden zu lindern und Leben zu retten.

Derzeit stehen drei alternative Ansätze im Mittelpunkt der Forschung: die Entwicklung künstlicher Organe, das mit therapeutischem Klonen verbundene *tissue engineering* sowie die Xenotransplantation.

Mit den derzeit verfügbaren künstlichen Organen lässt sich das Leben vieler Patienten zwar verlängern, bis ein Spenderorgan verfügbar wird, doch sind sie noch weit davon entfernt, ein permanenter Ersatz zu werden. Abgesehen von der Schwierigkeit, Organe zu entwickeln, die implantierbar sind, besteht bei der Verwendung künstlicher Organe das Problem, dass sie imstande sein müssen, die Funktionen menschlicher Organe in hinreichender Weise zu übernehmen. Im Falle physiologisch simpler Organe wie des Herzens ist dies eine zu bewältigende, im Falle physiologisch komplexer Organe wie der Leber dagegen eine äußerst schwierige Aufgabe.

Auch das *tissue engineering* auf Basis embryonaler Stammzellen steckt noch in den Kinderschuhen. Bisher ist es gelungen, u.a. Vorläuferzellen von Herzmuskelzellen (HE et al., 2003, MUMMERY et al., 2003), Leberzellen (LAVON et al., 2004, CAI et al., 2007) und Pankreaszellen (HANSSON et al., 2004, SHIM et al., 2007) aus humanen embryonalen Stammzellen zu generieren. Die bisher unternommenen Versuche sind jedoch eher der Grundlagenforschung zuzuschreiben. Hinzu kommt die Regelung durch das 1991 in Kraft getretene Embryonenschutzgesetz, das in Deutschland das Arbeiten mit humanen embryonalen Stammzellen, also die Erzeugung eines Embryos, „zu einem anderen Zweck als der Herbeiführung einer Schwangerschaft“ verbietet. Zudem untersagt es die Verwendung eines Embryos „zu einem nicht seiner Erhaltung dienenden Zweck“ (Embryonenschutzgesetz).

Eine vielversprechende Alternative zur Überbrückung des Allotransplantatmangels ist die Xenotransplantation, die zumindest hinsichtlich der Transplantation von Inselzellen, in nahe Zukunft rückt. Der bedeutendste Vorteil der Xenotransplantation ist der, dass sich mit ihrer Hilfe der ständig wachsende Bedarf an transplantierbaren Organen decken ließe. Des Weiteren ist die ständige Verfügbarkeit von Organen, die es zudem erlauben würde, den Patienten immunologisch gezielt auf das Transplantat vorzubereiten, von großer Bedeutung. Zudem würde die Xenotransplantation viele Lebendspenden überflüssig machen. Die Xenotransplantation porziner Zellen, Gewebe oder Organe birgt jedoch das Risiko der Transmission von Mikroorganismen auf den humanen Rezipienten (DENNER, 1998, ONIONS UND WITT, 2000, STOYE et al., 1998, WEISS et al., 1999). Hierbei wird den porzinen endogenen Retroviren eine besondere Bedeutung beigemessen, da sie sich nicht wie die meisten anderen Pathogene durch Zucht und Haltung unter SPF-Bedingungen eliminiert werden können (DENNER, 1998, MANG et al., 2001). Für die Minimierung des Übertragungsrisikos der PERVs ist die Auswahl geeigneter Schweine sowie die Entwicklung von Strategien zur Prävention der Virusübertragung von fundamentaler Bedeutung. Insbesondere nachdem gezeigt werden konnte, dass PERVs in der Lage sind, humane Zellen *in vitro* zu infizieren (PATIENCE et al., 1997).

## **5.1 Evaluierung des PERV-Übertragungsrisikos bei der Xenotransplantation**

### **5.1.1 PERV-C-Provirusintegration in Schweinen verschiedener Rassen sowie transgenen und multitransgenen Schweinen**

Zur Einschätzung des PERV-C-Vorkommens in den Schweinebeständen der Kooperationspartner des DFG-Transregio-Projekts „Xenotransplantation“ Prof. Niemann (Institut für Tierzucht, Mariensee) und Prof. Wolf (Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, München) wurden 184 Schweine verschiedener Rassen und Kreuzungen sowie transgene, für die Xenotransplantation relevante Schweine hinsichtlich ihres PERV-Integrationsstatus untersucht. Ziel dieser Untersuchungen war die Identifizierung PERV-C-negativer Tiere mit der Empfehlung, diese Tiere für die weitere Zucht zu verwenden. Wie bereits beschrieben, besteht aufgrund der hohen Sequenzhomologien zwischen den PERV-Subtypen die Möglichkeit einer Rekombination zwischen PERV-A und PERV-C, die mit einer Adaption an humane Zellen und einer gesteigerten Virusreplikation einhergehen kann (1.2.6, WILSON et al., 1998, WILSON et al., 2000, DENNER et al., 2003a). Als ein weiteres Problem muss die mögliche Rekombination oder die Pseudotypisierung von PERV mit humanen endogenen Retroviren (HERV) angesehen werden. So zeigten Yang und Kollegen, dass PERV-C durch Pseudotypisierung mit dem xenotropen Murinen Leukämie Virus (X-MLV) auf humane Zellen übertragen wurde (YANG et al., 2004). Auch Martina et al. beobachteten, dass der natürliche Tropismus der PERVs durch Pseudotypisierung mit X-MLV erweitert werden kann (MARTINA et al., 2005). Da Hüllproteinsequenzen, die durch die humanen endogenen Retroviren HERV-W (PERRON et al., 2005, CHRISTENSEN et al., 2005), HERV-E (BESSIS et al., 2004) oder HERV-K (FLOCKERZI et al., 2005) kodiert werden, als funktionale Proteine in unterschiedlichen humanen Geweben exprimiert



werden, kann somit eine Pseudotypisierung der PERVs mit diesen Sequenzen im humanen Patienten nach einer Xenotransplantation nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund der großen Sequenzunterschiede der HERV- und PERV-Hüllproteinsequenzen ist eine solche Pseudotypisierung jedoch unwahrscheinlich (BÜSCHER, 2006, SULING et al., 2003).

Die Auswahl PERV-C-negativer Schweine könnte das Risiko solcher Rekombinationen und Pseudotypisierungen minimieren. Die Subtypen PERV-A und -B konnten erwartungsgemäß im Genom aller untersuchten Tiere detektiert werden. Von 63 Tieren, die den Rassen Deutsche Landrasse (DL), Duroc, Duroc/DL und Schwäbisch-Hällisch angehörten, wurde nur ein Tier der Deutschen Landrasse PERV-C-negativ getestet (Tab. 4.1). Unter den 103 transgenen Tieren fanden sich nur vier PERV-C-negativ getestete Tiere, die hinsichtlich ihres genetischen Hintergrunds bis zu 50% DL enthielten (Tab. 4.2).

Während PERV-A und PERV-B im Genom aller bisher untersuchten Schweinearten präsent sind, trifft dies nicht für den Subtyp PERV-C zu. Etwa 50 provirale PERV-Kopien wurden bisher im Schweinegenom mittels Southern-Blot-Analyse detektiert (PATIENCE et al., 1997). PERV-A-Proviren haben daran einen Anteil von 10 bis 23 Kopien und PERV-B-Proviren sind mit 7 bis 12 Kopien (LE TISSIER et al., 1997) vertreten. Im Genom der Schweinerasse Minipig wurden 8 bis 15 Kopien von PERV-C-Proviren beschrieben. Sowohl die Zahl der Kopien als auch die Integrationsorte von PERV-C variieren jedoch beträchtlich zwischen unterschiedlichen Schweine-Stämmen (AKIYOSHI et al., 1998). PCR-Analysen unter Verwendung Subtyp-spezifischer Primer zeigten das Vorhandensein von *env*-Sequenzen der Subtypen A und B in allen Tieren einer französischen „Large White“ Schweineherde, jedoch die Abwesenheit des PERV-Subtyps C in einigen Tieren dieser Herde (BOSCH et al., 2000). Des Weiteren konnten PERV-C-negative Tiere der Rassen hDAF-„Large White“ (HERRING et al., 2001b), Meishan, Middle White, Berkshire und Mexican Hairless (JIN et al., 2000), sowie Chinese Bana Minipig (LI et al., 2006b) und Shaza Ling Pigs (XING et al., 2006) identifiziert werden. Schweine der Deutschen Landrasse, die einen großen Teil der Bestände der Kooperationspartner des DFG-Transregioprojekts „Xenotransplantation“ ausmachen, wurden bis zu Beginn dieser Arbeit noch nicht hinsichtlich des PERV-C-Status untersucht. Weiterhin ist weder die Zahl der Kopien noch die Verteilung auf die Chromosomen sowie die Integrationsorte von PERV-C in dieser Rasse bekannt.

Ausgehend von der Annahme, dass im Genom der Deutschen Landrasse ähnlich viele PERV-C-Proviren verankert sind, wie im Genom des Minipigs (8 bis 15, AKIYOSHI et al., 1998), sind die geringen Prozentsätze PERV-C-negativ getesteter Tiere (5,26% (1/19) und 3,88% (4/103)) ungewöhnlich. Das Alter von PERV-C wird auf 1,5 bis 3,5 Millionen Jahre geschätzt (NIEBERT et al., 2005). Bei diesem Alter ist eine Fixierung im Genom der Schweine sehr wahrscheinlich. Zumindest eines der Elternteile müsste heterozygot sein und PERV-C-negative Allele besitzen. Stammbaumanalysen, weitere Kreuzungen mit diesen Tieren sowie Southern-Blot-Analysen könnten hierbei zur Bestimmung der PERV-C-Kopienzahl und somit zum weiteren Verständnis beitragen. Bei weiteren Kreuzungen dieser Tiere müssten zur Bestätigung der Befunde alle Folgegenerationen ebenfalls PERV-C negativ sein.

Zur Vermeidung falsch negativer Resultate wurde die DNA der negativ getesteten Tiere mit Hilfe eines weiteren *envC*-Primersets sowie einer *envC-real-time* PCR analysiert und die Abwesenheit von PERV-C bestätigt. Die Nachweisgrenze der *envC-real-time* PCR lag bei ca. 100 *envC*-Amplifikaten. DNA aus ca. 15 Zellen würde somit ausreichen um die mit 8 bis 15 Kopien geschätzte Anwesenheit von PERV-C zu detektieren. 1 pg doppelsträngige DNA enthält  $0,978 \times 10^9$  bp (VINOGRADOV et al., 2005). Bei einer Genomgröße des Schweins von  $3 \times 10^9$  bp lässt sich für einen Chromosomensatz des Schweins eine Masse von 3,07 pg berechnen. Da in die PCR-Ansätze mindestens 50 ng eingesetzt wurden, müsste sich sogar eine einzelne *envC*-Kopie pro Genom nachweisen lassen.

Bei Mutationen in der Primerbindungsstelle der *envC*-Region würden vorhandene PERV-C-Kopien nicht detektiert werden können. Bei einer Zahl von 8 bis 15 PERV-C-Kopien erscheint eine solche Mutation in allen Kopien jedoch unwahrscheinlich. Für zukünftige Versuche, PERV-C-negative Tiere zu identifizieren und einzuordnen, wäre, wie bereits erwähnt eine Ausweitung der Kenntnisse über PERV-C-Kopienzahlen in verschiedenen Rassen notwendig. Mittels *real-time* PCR unter der Verwendung eines Plasmid-Standards sowie durch Southern-Blot-Analysen könnte beispielsweise die Kopienzahl bestimmt werden. Mit Hilfe einer Ligations-vermittelten PCR, ließen sich zudem Integrationsorte und somit die Verteilung auf die Chromosomen bestimmen. An die Fragmente enzymatisch geschnittener chromosomaler DNA werden hierbei *linker*-DNA-Sequenzen, die eine Primerbindestelle enthalten, ligiert. Mit Hilfe eines zu dieser Sequenz komplementären Primers sowie eines zur *envC*-Sequenz komplementären Primers lassen sich *envC*-Sequenzen mit entsprechenden flankierenden Sequenzen amplifizieren, die nach Klonierung in einen geeigneten Vektor sequenziert und mit einer Datenbank abgeglichen werden können. Erst mit diesem Wissen werden Selektion, gezielte Zucht und potentielle Herauskreuzung von PERV-C möglich.

### 5.1.2 Normalisierung und relative Quantifizierung von PERV-mRNA

Zur Quantifizierung von PERV-mRNA wurde ein *one-step RT real-time PCR-assay* basierend auf dem SUPERSCRIPT™ III PLATINUM® ONE-STEP QRT-PCR KIT (Invitrogen) etabliert, der die Detektion viraler Vollängen-RNA ermöglicht. Die von Invitrogen empfohlenen Konzentrationen von 10 µM für die jeweiligen Primer und die Sonde erwiesen sich als geeignet, da eine Effizienz von nahezu 100% erreicht werden konnte (Abb. 4.1).

Die Quantifizierung von mRNA benötigt zur Normalisierung einen festen Bezug. Aufgrund unterschiedlicher PCR-Bedingungen kann eine mRNA-Quantifizierung nur bedingt über einen Plasmidstandard normalisiert werden. Daher wird häufig die relative Quantifizierung herangezogen. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgens mit der eines, im Idealfall nicht regulierten und in allen Proben gleichermaßen exprimierten, *house keeping* Gens normalisiert (LIVAK UND SCHMITTGEN, 2001).

Die Vorteile der Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der reversen Transkription innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das *house keeping* Gen betreffen.

Zahlreiche Studien haben jedoch ergeben, dass eine Evaluierung des entsprechenden *house keeping* Gens hinsichtlich der stabilen Expression unter den gegebenen Bedingungen unumgänglich ist (BUSTIN 2002, TRICARICO et al. 2002, VANDESOMPELE et al. 2002, STAHLBERG et al. 2004).

Die Anforderung an ein *house keeping* Gen besteht in einer relativ stabilen Expression des Gens in unterschiedlichen Proben unter verschiedenen experimentellen Konditionen (BUSTIN et al., 2000). Da alle Gene, die als *house keeping* Gene in Betracht kommen, wichtige Funktionen in Zellen erfüllen und unterschiedliche Expressionsregulierungen erfahren, ist ein idealer Kandidat, der in jeder Situation unverändert bleibt, nicht verfügbar (BUSTIN et al., 2000, GIULIETTI et al., 2001, BUSTIN et al., 2002). Tatsächlich konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass alle bisher untersuchten Kandidatengene Variationen des Expressionslevels unter verschiedenen Bedingungen zeigen (SACCO et al., 1996, NEUMANN et al., 1997, FOSS et al., 1998, THELLIN et al., 1999, SCHMITTGEN UND ZAKRAJSEK, 2000, HAMALEINEN et al., 2001, VANDESOMPELE et al. 2002, BAS et al., 2004). In einer von Duvigneau et al. veröffentlichten Arbeit wurde die Eignung unterschiedlicher *house keeping* Gene für Cytokinexpressionsstudien in porzinen PBMCs evaluiert (DUVIGNEAU et al., 2005). Die am häufigsten verwendeten *house keeping* Gene in Expressionsstudien immunologisch relevanter Gene im porzinen System sind GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase), Cyclophilin (Peptidylprolyl Isomerase A) und  $\beta$ -Actin (LEDGER et al., 2004), da deren Expressionsniveaus vergleichbar mit denen der Zielgene sind. Das für die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase, ein Enzym des Purinmetabolismus, kodierende Gen HPRT wird als geeignetes Referenzgen für unterschiedliche porzine Gewebe und Zellen des Immunsystems betrachtet, da es reproduzierbar einen ähnlichen Expressionslevel wie immunologisch relevante Gene aufweist (FOSS et al., 1998, LEDGER et al., 2004). Andere Studien zeigen jedoch, dass die Expression von HPRT stärker durch Stimulation mit ConA und LPS beeinflusst wird als die Expression der *house keeping* Gene GAPDH und Cyclophilin (DUVIGNEAU et al., 2005). Zahlreiche Studien für GAPDH in humanen und Nager-Expressionssystemen zeigten dessen Regulation unter verschiedenen experimentellen Bedingungen. Des Weiteren wurde von Pseudogenen für GAPDH (PIECHACZYK et al., 1984) und HPRT (SELLNER UND TURBETT, 1996) in dieser Spezies berichtet. Diese könnten mit der Interpretation der Expressionsergebnisse interferieren. GAPDH wird dennoch als akzeptable interne Referenz für Studien mit porzinen Immunzellen angesehen (VEZINA et al., 1995, FOSS et al., 1998, DUFOUR et al., 1999). Auch Duvigneau et al. befanden GAPDH auf Grund geringer Variationen zwischen verschiedenen Individuen als geeignet (DUVIGNEAU et al., 2005). Weiterhin wurde Cyclophilin (Peptidylprolyl Isomerase A) in den letzten Jahren immer häufiger als *house keeping* Gen zur RNA-Normalisierung verwendet. Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien und Gewebetypen zeigten, dass die mRNA-Level von Cyclophilin im Vergleich zu GAPDH stabiler sind (FEROZE-MERZOUG et al., 2002).

In dieser Arbeit eignete sich keines der beschriebenen *house keeping* Gene (HPRT, GAPDH und Cyclophilin) uneingeschränkt zur Normalisierung, da deren Expressionslevel zum Teil stark von dem der PERV-Expression abwichen, sich die Expressionslevel in verschiedenen Geweben unterschieden und durch Veränderungen der experimentellen

Konditionen ebenfalls veränderten (Tab. 5.1). Der Level der Expression von HPRT war dem der PERV-Expression am ähnlichsten, die Expression in PBMCs wurde jedoch nach Stimulation durch PHA hochreguliert. Die Expressionslevel der Gene GAPDH und Cyclophilin waren in den meisten Fällen weitaus höher als die von PERV. Normalisierungen auf solche *house keeping* Gene führen meist zu Ungenauigkeiten der Ergebnisse und hohen Standardabweichungen. Auch die Expression dieser Gene in PBMCs unterlag einer Hochregulierung durch PHA-Stimulation. Die geringsten Expressionsvariationen zwischen verschiedenen Organen und Individuen konnte für das Gen Cyclophilin ermittelt werden. Die Art der Normalisierung wurde für somit jeden Versuchsansatz abhängig vom Level der PERV-Expression, der Stabilität der Expression der *house keeping* Gene unter den gewählten Bedingungen sowie der Vergleichbarkeit der *house keeping* Genexpression in den entsprechenden Zellen oder Organen gewählt. Bei Expressionsanalysen in PBMCs wurde zumeist die Normalisierung auf gleiche Mengen eingesetzter Gesamt-RNA bevorzugt. In den meisten Fällen konnten durch Normalisierung auf die *house keeping* Gene HPRT, GAPDH und Cyclophilin jedoch tendenziell ähnliche Ergebnisse ermittelt werden.

**Tabelle 5.1: Vergleich der *house keeping* Gene HPRT, GAPDH und Cyclophilin**

	HPRT	GAPDH	Cyclophilin
Expressionslevel im Vergleich zur PERV-Expression	ähnlich	höher $\Delta CT \cong 4$ bis 6	höher $\Delta CT \cong 6$ bis 9
Einfluss der PHA-Stimulation auf die Expressionslevel in PBMCs	hoch reguliert	hoch reguliert	hoch reguliert
Expressionslevel in unterschiedlichen Organen verschiedener Individuen	Milz: höher Muskel: niedriger	Herz, Milz, Muskel: höher	Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, Muskel: ähnlich
	Herz, Lunge, Leber, Niere: ähnlich	Lunge, Leber, Niere: ähnlich	

### 5.1.2 Variable PERV-Expression in Schweinen verschiedener Rassen sowie transgenen und multitransgenen Schweinen

Die Expression von PERV-mRNA variiert zwischen verschiedenen Schweinestämmen (TACKE et al., 2000b, TACKE et al., 2003). Zur Einschätzung der PERV-Expression in den Schweinebeständen des DFG-Transregioprojekts „Xenotransplantation“ (Prof. Wolf, Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, München) wurden daher Schweine verschiedener Rassen sowie transgene Schweine verschiedener Kreuzungen hinsichtlich ihrer PERV-Expression untersucht. Ziel dieser Untersuchungen war die Identifizierung und Auswahl von Schweinerassen, die wenig PERV exprimieren, um somit das PERV-Übertragungsrisiko hinsichtlich der Xenotransplantation zu reduzieren.

In den untersuchten Würfen der Rassen Deutsche Landrasse (DL), Duroc, Schwäbisch-Hällisch sowie der Kreuzung Duroc x DL konnte mittels RT *real-time* PCR eine variable PERV-Expression ermittelt werden, die im Vergleich zu den hochexprimierenden Zelllinien PK15 und 293/5° unter 2% bzw. 1% lag (Abb. 4.2, Tab. 4.3). Zwischen den getesteten Schweinerassen bzw. Kreuzungen war kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der PERV-Expression zu beobachten (Tab. 4.3). Unter den getesteten Rassen ist somit keine Rasse hinsichtlich geringer PERV-Expression besonders zu favorisieren.

Auch bei den untersuchten transgenen Tiere der unterschiedlichen Kreuzungen (Tab. 4.3, MP x Du x DL, DE x MP x Du x DL, DE x MP x Du) ließ sich eine variable PERV-Expression innerhalb der Würfe feststellen. Die PERV-Expression in diesen transgenen Tieren ist im Vergleich zu den bereits beschriebenen unveränderten Tieren der Rassen Du, DL, Du x DL und SH leicht erhöht und liegt bezogen auf die PERV-Expression der Zelllinien PK15 und 293/5° unter 7% bzw. 2%. Da jedoch keine nicht-transgenen sowie reinrassigen Vergleichstiere zur Verfügung standen, lässt sich hierzu keine zuverlässige Aussage treffen.

Die Transgenität der Schweine wurde durch Mikroinjektion nackter DNA-Konstrukte in den Vorkern, Injektion lentiviraler Partikel, die das Transgen exprimieren, in den perivitellinen Raum des Embryos oder durch Nukleus-Transfer aus bereits transgenen primären Zellen in eine Spendereizelle erreicht. Die Integration des Transgens in die chromosomale DNA erfolgt hierbei rein zufällig. Da Beeinflussungen der benachbarten Gene durch eine Transgenintegration bereits beschrieben wurden (CLARK et al., 1994), ist daher nicht auszuschließen, dass durch die Integration der für die Xenotransplantation relevanten Gene TRAIL, hDAF, und HLA-E, die Möglichkeit einer Beeinflussung der Expression porciner endogener Retroviren besteht.

Über die PERV-Integrationsorte im porcinen Genom ist wenig bekannt. Mittels FISH identifizierten Lee et al. 39 PERV-Integrationsstellen im Genom von Schweinen der Rasse Westran und ordneten diesen auch Positionen auf den Chromosomen zu (LEE et al., 2002). Ähnliche Studien mit Tieren der Rassen Deutsche Landrasse, Duroc, Deutsches Edelschwein und Minipig wurden bisher noch nicht durchgeführt. Daher lässt sich auch nach Bestimmung des Integrationsortes des Transgens bisher nicht klären, ob die Integration des Transgens, mit davor geschaltetem Promotor, in räumliche Nähe zu PERV-Expressionsorten tritt und somit die PERV-Expression beeinflussen könnte.

### **5.1.3 Variable PERV-Expression in unterschiedlichen Organen eines Tieres**

Wie bereits publiziert, variiert die PERV-Expression nicht nur zwischen verschiedenen Schweinestämmen (TACKE et al., 2000b, TACKE et al., 2003), sondern auch in unterschiedlichen Organen und Geweben der Schweine (AKIYOSHI et al., 1998, CLEMENCEAU et al., 1999). Untersuchungen der Organe Thymus, Lunge, Lymphknoten, Milz, Leber, Niere und Herz eines Miniaturschweins mittels Northern-Blot-Analyse zeigten die höchste PERV-Expression im Thymus und der Lunge (AKIYOSHI et al., 1998). Die höchste PERV-Expression in Organen des Large White Schweins wurden in der Niere und im Thymus detektiert (CLEMENCEAU et al., 1999). Für andere Rassen liegen bisher noch keine Daten hinsichtlich einer variablen PERV-Expression in den Organen vor.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Organe von transgenen Tieren der Deutschen Landrasse (DL) und der Kreuzung DL x Minipig sowie nicht-transgene DL-Tiere hinsichtlich der PERV-Expression untersucht. Bei den transgenen Tieren # 366 (DL), #374 (DL x Minipig) und #375 (DL x Minipig) konnte jeweils in der Lunge die höchste PERV-Expression detektiert werden (Abb. 4.3). Dies korreliert mit den Daten, die bereits für Miniatur Schweine erhoben wurden (AKIYOSHI et al., 1998). Biopsien vom Thymus standen nicht zur Verfügung. Bei den nicht-transgenen DL Tieren wurde in der Milz die höchste PERV-Expression bestimmt (Abb. 4.4). Diese Beobachtungen konnten auch bei

der Untersuchung der PERV-Expression in Melanomen und unverändertem Gewebe von Münchner Miniatur Schweinen Troll gemacht werden (Abb. 4.11).

Basierend auf den bisherigen Daten lässt sich eine Organ- bzw. Gewebe-spezifische PERV-Expression vermuten. Die Zahl der untersuchten Tiere in den bisher durchgeführten Studien (AKIYOSHI et al., 1998: 1 Miniatur Schwein, CLEMENCEAU et al., 1999: 14 Large White Schweine) sowie in der vorliegenden Untersuchung ist jedoch zu klein, um eine signifikante Aussage über Gewebe-spezifische Expressionsmuster treffen zu können. Für unterschiedliche Familien der humanen endogenen Retroviren (HERV) wurden bereits Gewebe-spezifische Expressionsmuster beschrieben (SEIFARTH et al., 2005, PICHON et al., 2006).

Organ-spezifische Unterschiede, welche die höchste PERV-Expression im Thymus (AKIYOSHI et al., 1999) und der Milz zeigen (Abb. 4.3 und 4.9), könnten durch die im Vergleich zu anderen Organen größere Zahl von Lymphozyten und einer damit verbundenen immunologischen Stimulation in diesen Geweben erklärt werden. Des Weiteren wurden in Lymphozyten bereits *de novo* Integrationen von exogenen PERV-A/C Rekombinanten, die nicht in der Keimbahn vorhanden sind (WILSON et al., 1998, BARTOSCH et al., 2004, WOOD et al., 2004, SCOBIE et al., 2004) und höhere Virus-Titer sowie genetische Veränderungen aufweisen (WILSON et al., 2000, DENNER et al., 2003, HARRISON et al., 2004) beschrieben.

Da die untersuchten transgenen Schweine nicht unter SPF-Bedingungen gehalten werden, sind Infektionen der Atemwege nicht auszuschließen. Eine mögliche Ursache für eine erhöhte PERV-Expression in der Lunge könnten daher virale Infektionen darstellen, die in einer Aktivierung der porcinen endogenen Retroviren resultiert. Solche Virus-induzierten Transkriptionsaktivierungen wurden bereits für das humane endogene Retrovirus HERV-W, (NELLAKE et al., 2006, RUPRECHT et al., 2006) sowie für HIV-1 gezeigt (FLORY et al., 2000). So führten beispielsweise Influenza-Infektionen zu erhöhten HERV-W- (NELLAKE et al., 2006) sowie HIV-1-Expressionen (FLORY et al., 2000). Auch für Parasiten, wie *Toxoplasma gondii* wurde bereits ein aktivierender Effekt auf Retroviren wie HIV (GAZZINELLI et al., 1996) und unterschiedliche HERV-Familien (FRANK et al., 2006) gezeigt.

In allen untersuchten Schweinen konnte im Pankreas stets die geringste PERV-Expression nachgewiesen werden (AKIYOSHI et al., 1998, CLEMENCEAU et al., 1999, Abb. 4.3). Inselzellen stellen die favorisierten Zellen für erste klinische Xenotransplantationen dar. Durch die Sicherheitsmaßnahme der Alginat-Verkapselung der Insulin produzierenden Inselzellen des Pankreas, welche die Passage kleiner Moleküle wie Insulin und Glukose erlaubt, nicht jedoch den Austritt porciner endogener Retroviren, wird das Risiko für eine PERV-Übertragung bei der Xenotransplantation zudem vermindert.

### **5.1.3 Keine PERV-Freisetzung nach Simulation einer Immunantwort porciner Zellen *in vitro***

Bei jeder Transplantation werden zusammen mit dem Organ PBMCs des Spenders übertragen. Verschiedene Untersuchungen zeigten bereits, dass porcine endogene Retroviren von PBMCs und anderen primären Zellen freigesetzt werden (MARTIN et al., 1998a, TACKE et al., 2000b, WILSON et al., 1998) und zumindest *in vitro* in der Lage sind, humane Zellen zu infizieren (MARTIN et al., 2000, SPECKE et al., 2001b). Durch den

Transfer der porzinen PBMCs in den Körper des Rezipienten, und damit in ein artfremdes Milieu, besteht die Möglichkeit einer Aktivierung der PBMCs. Es konnte gezeigt werden, dass primäre humane Endothelzellen, sowie primäre Fibroblasten mit PERV produktiv infizierbar sind (SPECKE et al., 2001b, MARTIN et al., 2000). Beim Durchströmen des porzinen Xenotransplantats könnten porzine PBMCs in den humanen Blutstrom gelangen, somit über den ganzen Körper des Rezipienten verteilt werden und umgebende suzeptible Endothelzellen der humanen Gefäße infizieren.

Zur Evaluierung der möglichen PERV-Freisetzung aus porzinen PBMCs hinsichtlich des Risikos für die Xenotransplantation wurde mit Hilfe des T-Zell-Mitogens Phytohämagglutinin (PHA) eine Antigen-induzierte Aktivierung der PBMCs simuliert. Hierfür wurden PBMCs zahlreicher transgener, Xenotransplantations-relevanter Schweine aus den Beständen von Prof. Wolf (Institut für Molekulare Tierzucht Tierzucht und Biotechnologie, München) verwendet.

Die Freisetzung endogener Retroviren nach Stimulation von Immunzellen wurde bereits für andere Spezies beschrieben, beispielsweise für Mäuse, nach der Stimulation mit B-Zell-Mitogenen (DE LAMARTER et al., 1981, STOYE et al., 1983), während gemischten Lymphozytenreaktionen und auch *in vivo* während Interaktionsreaktionen zwischen Transplantat und Wirt (HIRSCH et al., 1972) sowie nach Immunisierung mit Antigenen und unterschiedlichen Adjuvanzen (DENNER, 1977). PERVs können durch T-Zell-Mitogene allein aktiviert werden (Tacke et al., 2003). Im Gegensatz dazu konnten murine endogene Retroviren nur aktiviert werden, wenn zusätzlich zu dem T-Zell Mitogen PHA das Thymidinanalogon Bromodeoxyuridin gegeben wurde (STOYE et al., 1983, HIRSCH et al., 1972).

Da bereits Unterschiede hinsichtlich der PERV-Freisetzung zwischen verschiedenen Schweinestämmen sowie Individuen eines Stammes beschrieben wurden (WILSON et al., 1998, TACKE et al., 2000b, TACKE et al., 2003), war das Ziel der vorliegenden Untersuchungen weiterhin die Identifizierung von Schweinen aus den Beständen der Kooperationspartner, die weniger PERV exprimieren und freisetzen und somit für weitere Kreuzungen eingesetzt werden können.

In den meisten Fällen konnte ein Anstieg der PERV-Expression in den PBMCs nach PHA-Stimulation im Vergleich zu den nicht stimulierten PBMCs beobachtet werden. Zwischen den Tieren einer Kreuzung ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede der PERV-Expression, die eine Selektion nach hoch- und niedrig-exprimierenden Tieren ermöglichen, feststellen. Ein Expressionsanstieg der Vollängen-mRNA muss jedoch nicht zwangsläufig zu einer erhöhten Partikel-Freisetzung führen. Mutationen in Bereichen, die für die Virusmorphogenese erforderlich sind, sowie quantitative Unterschiede der exprimierten viralen Proteine könnten eine Ursache für eine fehlende Partikelbildung darstellen. So wurde bereits beschrieben, dass zahlreiche PERV-Proviren Mutationen aufweisen und somit keine intakten Viruspartikel bilden können (PATIENCE et al., 2001, LEE et al., 2002).

Mit Ausnahmen der Tiere 9426 (PHA:  $1,72 \text{ mU/mL} \pm 0,11$ ) und 9432 (PHA:  $2,76 \pm 0,16$ ) konnte in den Überständen der PBMCs keine Reverse Transkriptase-Aktivität detektiert werden (Nachweisgrenze:  $0,02 \text{ mU/ml}$ ) (Tab. 4.4). Die Tiere 9426 und 9432 entstammen einer Kreuzung der Rassen Minipig, Duroc und Deutsche Landrasse. Bei keinem der

getesteten Tiere der anderen Kreuzung (Deutsches Edelschwein x Minipig x Duroc) konnte ein Nachweis Reverser Transkriptase-Aktivität erbracht werden. Dies gilt auch für die PHA-stimulierten PBMCs der Tiere 9075 und 9232, die eine stark erhöhte PERV-Expression zeigten (Tab. 4.4). Mutationen sowie Regulationen der Provirus-Sequenzen im Genom der Tiere mit dem Stammhintergrund Deutsches Edelschwein könnten hierfür eine Erklärung darstellen. Basierend auf dieser Annahme, wären Tiere dieser Kreuzung hinsichtlich des geringeren Risikos der PERV-Übertragung zu bevorzugen.

#### **5.1.4 Keine PERV-Übertragung nach Transplantation porziner Inselzellen auf Cynomolgus-Affen**

In einer prospektiven Studie wurde die *in vivo* Übertragung porziner endogener Retroviren und anderer porziner Viren nach Transplantation porziner Inselzellen auf diabetische Cynomolgus-Affen untersucht. Den porzinen endogenen Retroviren wurde hierbei ein besonderer Stellenwert beigemessen, da sie im Genom aller Schweine vertreten sind (PATIENCE et al., 1997), viele  $\gamma$ -Retroviren in der Lage sind, Leukämien und Immundefizienzen auszulösen und PERVs nicht wie die meisten anderen Pathogene durch SPF-Zucht eliminiert werden können.

Die Studie erfolgte in Kooperation mit der Firma Living Cell Technologies Ltd in Auckland, Neuseeland (Dr. Garkavenko). Bei acht männlichen Cynomolgus-Affen wurde Diabetes induziert. Drei Wochen nach dieser Diabetes-Induktion erfolgte die Transplantation der Affen mit Alginat-verkapselten porzinen Inselzellen. Sieben Tiere überlebten mehr als 3 Monate und deren Insulin-Bedarf war 30% geringer als bei einer Kontrollgruppe. Mit keiner der verwendeten Methoden (PCR (durchgeführt von Living Cell Technologies Ltd), ELISA, Western-Blot-Analyse, Test auf RT-Aktivität) konnte ein Hinweis auf eine PERV-Infektion der Affen erbracht werden (Tab. 4.5, Abb. 4.5).

Die Verkapselung der transplantierten Inselzellen erlaubt die Passage kleiner Moleküle wie Insulin und Glukose, nicht jedoch den Eintritt von zytotoxischen T-Zellen und Antikörpern, sowie die Freisetzung porziner Mikroorganismen. Diese Tatsache reduziert das Infektionsrisiko der Affen erheblich. Sollten einige dieser Kapseln während der Applikation oder der Überlebenszeit im Tier Schaden nehmen, ist die Menge der freigesetzten PERVs und somit das Infektionsrisiko gering, da bereits gezeigt wurde, dass die Injektion großer Mengen replikationskompetenter PERV-Partikel nicht zu einer Infektion von nicht-humanen Primaten führte (DENNER, 2003b, SPECKE et al., 2002b). Ein Kritikpunkt an dieser Studie ist, dass noch immer nicht geklärt ist, ob Cynomolgus-Affen suszeptibel für porzine endogene Retroviren sind, da keine der vorherigen Versuche einer *in vitro* Übertragung zu einer Infektion führten (SPECKE et al., 2001a, RITZHAUPT et al., 2002). Diese Tatsache induzierte z.B. die Etablierung eines Drei-Spezies-Modells zur weiteren Untersuchung der PERV-Übertragung (WINKLER et al., 2005). Auch in diesen Experimenten wurde keine PERV-Übertragung von porzinen Zellen auf humanes Gewebe in den Cynomolgus-Affen beobachtet.

Auch in vorherigen präklinischen Studien mit nicht-humanen Primaten wurde bisher keine PERV-Übertragung berichtet (MARTIN et al., 1999, MARTIN et al., 2000, SWITZER et al., 2001, ELLIOT et al., 2002, MARTIN et al., 2002, SIMON et al., 2003, GARKAVENKO et al., 2004). Injektionen eines an humane Zellen adaptierten porzinen endogenen Retrovirus in drei verschiedene Spezies nicht-humaner Primaten (Rhesusaffen: *Macaca mulatta*,



*Macaca nemestrina* und Paviane: *Papio papio*), die unter starker pharmazeutischer Immunsuppression standen, führten auch nicht zu einer PERV-Übertragung (DENNER, 2003b, SPECKE et al., 2002b). Ähnliche Resultate ergaben Applikationen von PERV in immunsupprimierte sowie immunkompetente Kleintiere (SPECKE et al., 2001a, SPECKE et al., 2002a, SPECKE et al., 2002b). Da bislang keine Positivkontrolle in Form eines Serums eines infizierten Tieres vorliegt, bleibt in zukünftigen Experimenten zu klären, ob unter den gewählten Versuchsbedingungen tatsächlich keine PERV-Partikel freigesetzt wurden, oder ob verwendeten Methoden nicht sensitiv genug waren, um DNA, Protein, RT sowie PERV-spezifische Antikörper zu detektieren.

Bis heute wurden in klinischen Studien mehr als 200 Patienten einem Kontakt mit porzinen Zellen ausgesetzt und kein Hinweis auf eine PERV-Infektion erbracht (PARADIS et al., 1999, TACKE et al., 2001, IRGANG et al., 2003, GARKAVENKO et al., 2004). Die Abwesenheit von Hinweisen auf die Infektion mit porzinen Viren in dieser präklinischen Studie schließt jedoch die Möglichkeit derselben in zukünftigen klinischen Xenotransplantationen nicht aus. Fraglich bleibt, ob die relativ geringe Lebenszeit der Versuchstiere mit dem Transplantat ausreichte, um die Virus-Sicherheit von Xenotransplantationen realistisch beurteilen zu können. Daher sollten transplantierte Patienten einer engmaschigen Überwachung unterzogen werden.

#### **5.1.5 Erhöhte PERV-Expression in Melanomen der Münchner Miniatur Schweine Troll**

Expression und biologische Funktion der porzinen endogenen Retroviren in normalen Schweinen sowie in porzinen Tumoren wurden bislang noch nicht umfassend untersucht. Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Untersuchungen geben einen ersten Hinweis auf eine erhöhte PERV-Expression in Melanomen (Abb. 4.11, DIECKHOFF et al., 2007b) der selektiv gezüchteten Münchner Miniatur Schweine (MMS) Troll, die durch eine hohe Prävalenz für kutane Melanome charakterisiert sind. Melanome dieser Tiere und auch anderer Schweine-Stämme (PEREZ et al., 2002) repräsentieren ein gutes Modell für Untersuchungen des genetischen Hintergrundes, der Involvierung endogener Retroviren und der immunologischen Reaktionen des Wirts.

Mittels RT *real-time* PCR konnte im Vergleich zu unveränderten Geweben eine erhöhte Expression von PERV-Vollängen-mRNA in porzinen Melanomen (Abb 4.11) gezeigt werden. Diese Daten korrelieren mit Ergebnissen, die eine gesteigerte Expression des humanen endogenen Retrovirus HERV-K in humanen Melanomen (MUSTER et al., 2003) beschreiben. Das transmembrane Hüllprotein TM des HERV-K wurde von 50% der getesteten primären Tumoren exprimiert (BUSCHER et al., 2005).

Weiterhin konnten im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen erstmals rekombinante PERV-A/C-Proviren, die in Milzzellen, jedoch nicht in anderen Zellen desselben Tieres integriert sind, beschrieben werden (4.9 B, C). Exogene PERV-A/C Rekombinanten, die nicht in der Keimbahn vorhanden sind, wurden bereits beobachtet (BARTOSCH et al., 2004, WOOD et al., 2004, SCOBIE et al., 2004, MARTIN et al., 2006). Solche PERV-A/C-Rekombinanten waren assoziiert mit höheren Virus-Titern und genetischen Veränderungen im Genom (WILSON et al., 2000, DENNER et al., 2003a, HARRISON et al., 2004). Eine Anwesenheit solcher Rekombinanten in der Milz, jedoch nicht in den Melanomen deutet, wie bereits beschrieben, auf eine Aktivierung, Rekombination und

*de novo* Integration hauptsächlich in den Lymphozyten hin (WILSON et al., 1998, WOOD et al., 2004). Dies korreliert mit Daten, die eine erhöhte PERV-Expression in stimulierten porzinen Lymphozyten (TACKE et al., 2000b, TACKE et al., 2003) sowie eine erhöhte Expression des murinen endogenen Retrovirus in stimulierten Mäusen zeigen (HIRSCH et al., 1972, DENNER UND DORFMAN, 1977). Die hohe PERV-Expression in den Milzzellen mit und ohne Metastasen der Tiere mit Melanomen (Abb. 4.9) könnte auf der immunologischen Stimulierung durch den Tumor basieren.

Eine erhöhte PERV-Expression und sogar eine gesteigerte PERV-Freisetzung wurde des Weiteren in Lungenmetastasen-abgeleiteten Zellkulturen beobachtet (Abb. 4.12, Abb. 4.16 A). Diese Zellkulturen waren, nachdem sie ihre Fähigkeit zur Melaninproduktion während der ersten Passagen verloren hatten, amelanotisch (BUETTNER et al., 1991). Durch die Detektion der RT-Aktivität (Abb. 4.16 A) sowie durch Elektronenmikroskopie (Abb. 4.17) konnte gezeigt werden, dass die gesteigerte PERV-Expression in dieser Zelllinie in der Freisetzung von PERV-Partikeln resultierte. Im pelletierten Überstand der Zellkulturen wurde die Präsenz von PERV-A, -B und C-Genomen detektiert (Abb. 4.16 B). Die gesteigerte PERV-Expression war jedoch nicht automatisch mit der Immortalisierung der porzinen Zellen assoziiert, da die PERV-Expression in späten Passagen dieser Zellkultur weitaus höher war als in der gut charakterisierten Zelllinie PK-15 (Abb. 4.12). Im Gegensatz dazu, exprimierte die Epithelzelllinie IPEC-J2 nur geringe Mengen PERV-mRNA. Die von der Melanomzelllinie freigesetzten Partikel waren nicht in der Lage, humane 293-Zellen zu infizieren, was z.B. durch defekte Partikel oder eine zu geringe Menge an PERV-Partikeln zu erklären wäre. Im Gegensatz dazu infizierte der Überstand von PERV-infizierten 293-Zellen (293/5°), der als Positivkontrolle verwendet worden war, 293 Zellen.

Erhöhte PERV-Expression und die Freisetzung von Viruspartikeln wurde auch für andere porzine Tumorzellen gezeigt, z.B. sowohl für unbehandelte Lymphomzellen (SUZUKA et al., 1985; SUZUKA et al., 1986) als auch für mit BrdU oder DMSO behandelte (SANDSTRÖM et al., 1973, MOENNING et al., 1974) sowie für mit PHA und 5-Azacytidin behandelte Lymphomzellen (KAEFFER et al., 1990) und auch für Leukämie-Zellen (FRAZIER et al., 1985). Zusätzlich wurde die PERV-Produktion bei Ovidukt-Zellen (BOUILANT et al., 1975a,b,c) und bei porzinen primären Aortaendothelzellen (PAEC) (MARTIN et al., 1998 a) beschrieben. Eine Virusproduktion wurde des Weiteren für PAEC von Deutschen, Russischen und Französischen Landzuchten sowie für Schweine der Rassen Yucatan Micropig sowie Göttinger Minipig gezeigt (MARTIN et al., 1998a). Die Produktion von Partikeln der Subtypen PERV-A, PERV-B, PERV-C sowie der Rekombinanten PERV-A/C wurde bei Mitogen-stimulierten porzinen PBMCs beschrieben (WILSON et al., 1998, WILSON et al., 2000, TACKE et al., 2003).

Da die Analyse der von porzinen PBMCs-abgeleiteten PERV-A/C-Rekombinanten (WILSON et al., 1998), sowie deren Passagierung auf humanen 293-Zellen zeigte, dass der Anstieg des Virustiters mit dem Anstieg der Zahl der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B-Bindungsstellen in den LTRs des Virus assoziiert war (WILSON et al., 2000, DENNER et al., 2003a), wurde die Länge der proviralen LTRs in den Melanomzellkulturen untersucht (Abb. 4.13). Es konnte jedoch keine Multimerisierung der LTRs beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass Veränderungen im Expressionsmuster der Transkriptionsfaktoren oder Demethylierung

einen Grund für die erhöhte Expression darstellen könnten. Für die Methylierung der CpG Dinukleotide wurde eine regulierende Wirkung auf die Expression des humanen endogenen Retrovirus HERV-K in primären humanen Testistumoren gezeigt (GOTZINGER et al., 2006).

Die mittels Western-Blot-Analyse und Immunfluoreszenz gezeigte Expression des viralen p15E-Proteins in den MMS Melanomen (Abb. 4.14 A) und der Lungenmetastasen-abgeleiteten Zellkultur (Abb. 4.14 B, 4.15), könnte von großer Bedeutung für die Tumorprogression sein. Für verschiedene Retroviren wie z.B. das murine Leukämievirus (MuLV) und die Immundefizienzviren (HIV-1 und HIV-2) wurde die Induktion von Immundefizienzen im infizierten Wirt gezeigt (Review, siehe DENNER, 1998). Der Mechanismus, wie Retroviren solche Immundefizienzen induzieren, ist bislang unklar. Einige Hinweise deuten auf eine Involvierung der transmembranen Hüllproteine hin, p15E im Falle von MuLV und PERV, gp41 im Fall von HIV-1 (OOSTENDORP et al., 1993, DENNER, 2000). Kürzlich wurde gezeigt, dass die Expression des p15E-Proteins eines endogenen Maus Retrovirus für das Melanom-Wachstum *in vivo* erforderlich ist (MANGENEY et al., 2005). Die Expression des TM-Proteins gp37 des HERV-K wurde auf der Oberfläche von humanen Melanomzellen lokalisiert (BUSCHER et al., 2005). Für die TM-Proteine verschiedener Retroviren inklusive HIV-1 wurde die Induktion einer gesteigerten IL-10-Produktion gezeigt (DENNER, 1998). Erhöhte IL-10-Level wurden auch in Melanom-Patienten beschrieben (Dummer et al., 1995).

Des Weiteren könnte PERV (und im Fall humaner Melanome HERV-K) aktiv an der malignen Transformation partizipieren. Da PERVs keine Onkogene enthalten, könnte die Transformation nur ein Resultat einer Insertionsmutagenese sein, durch Zerstörung eines Tumorsuppressorgens oder durch Aktivierung eines zellulären Protoonkogens das am Multistep-Prozess der Karzinogenese beteiligt ist.

Ein murines Retrovirus, das mit Melanomen in C57BL/6 Mäusen assoziiert ist, enthält beispielsweise ebenfalls kein Onkogen. Es wurde jedoch eine Insertion in das c-maf-Protoonkogen transformierter Zellen beschrieben (LI et al., 1999). Die Situation ist bei HERV-K, das zwei potentielle Onkogene, rec und np9, enthält, eine andere. Rec kodiert für ein 14 kDa großes Protein, das im Nukleolus HERV-K-Partile-produzierender GH-Teratokarzinomzellen lokalisiert ist (LOWER et al., 1995). Das Rec-Protein ist dem HIV Rev-Protein in strukturellen Eigenschaften, sowie der intrazellulären Lokalisation und Funktion ähnlich (MAGIN et al., 2000). In Nacktmäusen exprimiertes Rec unterstützt das Tumorwachstum (BOESE et al., 2000). Das 9 kDa-Protein Np9 wurde in Biopsien von Mammakarzinomen und Keimzelltumoren, sowie in transformierten Zelllinien nachgewiesen, nicht jedoch in normalen Geweben (ARMBRUESTER et al., 2002).

Für die immunhisochemische Analyse humaner Melanome wurden bereits zahlreiche Marker beschrieben (GUO et al., 1998, PEREZ et al., 2000, REINKE et al., 2005). Zu diesen zählt der Antikörper HMB45, der das gp100-Protein erkennt (ADEMA et al., 1994, BAKKER et al., 1994). HMB45 wurde bereits erfolgreich für die Immunfärbung porziner Melanome verwendet (Abb. 4.7 C, D). Zusätzlich wurde ein *real-time* PCR-Assay entwickelt und zur Analyse der porzinen Melanome verwendet (Abb. 4.8). Da die porzinen Sequenzen für die als humane Melanommarker bekannten Gene MIA, MART-1 und gp100 nicht bekannt waren und die Primer, für die humanen Gene dieser Melanommarker (PEREZ et al., 2000)

im porzinen System nicht funktionierten, wurde eine Sybr Green-basierte *real-time* PCR für die porzine Tyrosinase etabliert. Die Bedeutung der Tyrosinase als Marker für Melanome wird kontrovers diskutiert. In Untersuchungen von 35 humanen Melanomen und anderen Tumorproben, konnte eine Sensitivität von 80%, eine Spezifität von 100% und eine Genauigkeit von 88% ermittelt werden (Guo et al., 1998). Eine andere Studie berichtet von einer Sensitivität von 71%, einer Spezifität von 49% und einer Genauigkeit von 56% (PEREZ et al., 2000). Die Erfahrungen mit der Tyrosinase im porzinen System in dieser Arbeit sind jedoch positiv. Es konnte stets eine höhere Tyrosinase-Expression in Melanomen und metastatischen Lymphknoten ermittelt werden als in normaler Haut, Lymphknoten und der Milz (Abb. 4.8). Die geringe Tyrosinase-Expression in den Milzen deutet darauf hin, dass die untersuchten Organstücke nicht viele Metastasen enthielten und die erhöhte PERV-Expression, die mit der Rekombination und der *de novo* Integration der PERV-A/C-Rekombinanten assoziiert war auf eine Immunaktivierung zurückzuführen ist.

## 5.2 Prävention der PERV-Übertragung bei der Xenotransplantation

Weder in Transplantations- und Infektionsstudien mit Kleintieren und nicht-humanen Primaten noch in ersten klinischen Xenotransplantationen konnte bisher der Nachweis einer PERV-Übertragung erbracht werden (vgl. 4.2), humane Zellen lassen sich jedoch *in vitro* infizieren (PATIENCE et al., 1997, WILSON et al., 1998, SPECKE et al., 2001b). So kann eine Infektion nach einer Xenotransplantation nicht ausgeschlossen werden, da sich das Transplantat in einem direkten Kontakt mit den Zellen des immunsupprimierten Rezipienten befindet.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zwar mit zwei Ausnahmen für keines der getesteten Tiere eine PERV-Freisetzung nach Stimulation deren PBMCs gezeigt werden, die Ergebnisse deuten jedoch daraufhin, dass die PERV-Expression in Tieren eines Wurfes und sogar in unterschiedlichen Organen des gleichen Tieres sehr variabel ist. Davon ausgehend gestaltet sich die lange Zeit in Betracht gezogene Sicherheitsmaßnahme, die Selektion von Tieren mit besonders geringer PERV-Expression in allen für die Xenotransplantation relevanten Organen, schwierig. Basierend auf diesen Tatsachen gilt es Strategien zur Prävention einer potentiellen PERV-Übertragung zu entwickeln. Vielversprechende Strategien stellen hierbei die Hemmung der PERV-Expression durch RNA-Interferenz sowie die Entwicklung eines Impfstoffes dar.

### 5.2.1 RNA-Interferenz-vermittelte Hemmung der PERV-Expression in porzinen Zellen

Im Rahmen dieses Versuches konnte zum ersten Mal eine signifikante Hemmung der PERV-Expression in primären porzinen Zellen sowie einer porzinen Nierenzelllinie (PK-15) durch lentivirale Vektor-vermittelte RNA-Interferenz gezeigt werden (DIECKHOFF et al., 2007a).

Diese Daten basieren auf früheren Ergebnissen der Arbeitsgruppe, in denen eine siRNA (pol2), die komplementär zu einer hochkonservierten Sequenz des viralen *pol*-Gens ist,

identifiziert wurde und erfolgreich zur Hemmung der PERV-Expression infizierter 293-Zellen eingesetzt wurde (KARLAS et al., 2004). Da die Unterteilung der PERV-Subtypen ausschließlich auf Unterschieden im *env*-Gen beruhen, sollte die Ziel-Sequenz in allen funktionellen PERV-Subtypen identisch und die siRNA somit in der Lage sein, die Expression aller drei Subtypen zu hemmen. Für den PERV-Subtyp B sowie die Rekombinante A/C konnte dies bereits von Karlas et al. gezeigt werden. Durch die Insertion der pol2-siRNA in den Expressionsvektor pSuper wurde eine permanente Expression der entsprechenden pol-spezifischen shRNA und eine effiziente Hemmung der PERV-Expression in 293-Zellen erreicht (KARLAS et al., 2004, KARLAS, 2004).

Die Voraussetzung für eine spätere Erzeugung shRNA-transgener Schweine mit einer verminderten PERV-Expression war die effiziente Hemmung der PERV-Expression in primären porzinen Zellen. Da sich primäre Zellen jedoch nur schwer und mit schlechter Effizienz mit Expressionsvektoren wie pSuper transfizieren lassen, wurden die Versuche im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe zweier verschiedener lentiviraler Vektoren unternommen (pLVTHM-pol2, RRL-pGK-GFP-pol2, 4.2.1.1, Abb. 4.18). Zur Produktion von lentiviralen Partikeln wurde die Verpackungszelllinie 293T (3.4.7) mit den jeweiligen lentiviralen Vektoren sowie zwei weiteren Verpackungsplasmiden ko-transfiziert. Die Unterschiede zwischen den erhaltenen Titern für die lentiviralen Vektoren pLVTHM-pol2 und RRL-pGK-GFP-pol2 um drei Zehnerpotenzen sind auf unterschiedliche Produktionsmethoden zurückzuführen (3.4.7, 4.2.1.1, HOFMAN et al., 2003, PFEIFER et al., 2000).

Durch Transduktion der porzinen Fibroblasten SE 101, SE 105 und P1 F10 mit den lentiviralen Partikeln konnte eine pol2-shRNA-vermittelte Hemmung der PERV Vollängen-RNA-Expression von bis zu 94,8% ermittelt werden, die bei ca. 95% über Monate (171 Tage) stabil blieb (Abb. 4.21). Im Vergleich dazu konnten Miyagawa et al. in einer porzinen Endothelzelllinie mit zwei unterschiedlichen *gag*-spezifischen siRNAs hingegen nur eine Hemmung der PERV-B-Expression von 28% bis 52% zeigen (MIYAGAWA et al., 2005).

Für die porzinen PK-15-Zellen wurde nur eine Hemmung der PERV-Expression von bis zu 73,5% bestimmt (Abb. 4.22). Dies könnte zum einen auf die nur 95%-ige Transduktionseffizienz und zum anderen auf das höhere PERV-Expressionsniveau in diesen Zellen im Vergleich zu den Fibroblasten zurückzuführen sein. Bereits 5% nicht-transduzierter Zellen, die eine nicht beeinträchtigte PERV-Expression aufweisen, können erheblich zu einer Verfälschung des *knockdown*-Ergebnisses beitragen. In Zukunft empfiehlt es sich, auch für diese Zellen eine Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung durchzuführen. Weiterhin wurde die PERV-Expression in PHA-stimulierten PBMCs um 75% gehemmt. Diese Zellen lassen sich nur sehr schlecht transduzieren, was sich in einer sehr geringen Transduktionseffizienz widerspiegelt. Auch nach dreimaliger Transduktion mit den lentiviralen Partikeln, bei welchen die PBMCs zusätzlich jeweils 1,5 Stunden bei 32°C zentrifugiert wurden (MUHLEBACH et al., 2003), konnte nur eine Transduktionseffizienz von ca. 1% erreicht werden. Auch bei diesen Zellen könnte ein höheres PERV-Expressionsniveau im Vergleich zu den Fibroblasten zu einer verminderten Inhibitionseffizienz führen. Denkbar wäre weiterhin eine variable Expression der für die RNA-Interferenz erforderlichen Proteine Dicer und RISC in unterschiedlichen Zelltypen.

Möglicherweise könnte die Verwendung von mehreren shRNAs, die gegen unterschiedliche Ziele der viralen RNA gerichtet sind, zu einer insgesamt stärkeren Hemmung führen. Hierfür erscheint beispielsweise die von Karlas et al. publizierte Sequenz der siRNA pol5 vielversprechend, da sie nach Transfektion von PERV-B-infizierten 293-Zellen die Menge an viraler RNA um ca. 70% reduzierte und zudem eine komplette Homologie zu allen PERV-Subtypen aufweist (KARLAS et al., 2004). Diese von Karlas et al. publizierten Sequenzen wurden mit den ersten verfügbaren *software*-gestützten Algorithmen konzipiert. Es würde sich daher anbieten, weitere Sequenzen für hocheffektive shRNAs zu suchen, die sich mit Hilfe von verbesserter *software* und neuen thermodynamischen Kriterien leicht identifizieren lassen. Bei dieser Strategie muss jedoch bedacht werden, dass die Effizienz der verwendeten shRNAs auch durch zelluläre Faktoren, wie begrenzte Mengen an RNAi-relevanten Enzymen (z.B. Dicer) limitiert werden kann.

Der Level der shRNA-Expression nach Transduktion ist abhängig von der Zahl der integrierten Vektoren pro Zelle und der Promotoraktivität. Ein Vorteil des *double copy* lentiviralen Vektors pLVTHM-pol2 ist die Verdopplung der Expressionskassette nach der Integration des Vektors in das Wirtszellgenom (WIZNEROWICZ UND TRONO, 2003). Trotz dieser Verdopplung konnte jedoch kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der *knockdown*-Effizienz im Vergleich zum lentiviralen Vektor RRL-pGK-GFP-pol2 (Abb. 4.21) detektiert werden. Aufgrund des starken Polymerase III H1-RNA Gen-Promotors, der die ubiquitäre Expression der shRNA ermöglicht, scheint eine einzelne shRNA Expressionskassette pro lentiviralem Vektor für eine ausreichende shRNA-Expression zur Reduktion der PERV-mRNA zu einem Minimum sorgen.

Die reduzierte Expression viraler mRNA in den PK-15-Zellen führte erwartungsgemäß auch zu einer reduzierten Expression des viralen Proteins p27 Gag (Abb. 4.23), sowie zu einer reduzierten viralen RT-Aktivität in den Zellkulturüberständen. Die Gag-Proteine werden zusammen mit den durch die *pol*-Region kodierten Proteinen von der viralen Vollängen-mRNA als gemeinsames Vorläuferprotein translatiert und erst während der Virusmorphogenese von der viralen Protease in die einzelnen Komponenten gespalten. Eine shRNA, welche die *pol*-mRNA degradiert (pol2), führt somit auch zur Degradierung der *gag*-mRNA. Karlas et al. konnten zeigen, dass die gespleißte *env*-mRNA hingegen nicht durch die Expression der pol2-shRNA beeinflusst wird (KARLAS et al., 2004).

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnte für die porzinen Fibroblasten auch nach Verwendung großer Gesamtproteinmengen (80 µg) kein Gag-Protein in den nicht-transduzierten Kontrollzellen detektiert werden, was darauf hindeutet, dass die PERV-Expression in diesen Zellen unter der Nachweisgrenze liegt. Dies wird durch die Tatsache bestätigt, dass die PERV-Expression in den porzinen Fibroblasten im Vergleich zu der in PK15-Zellen nur 0,2% betrug (4.2.1.5). In allen getesteten Fibroblastenkulturen konnten jedoch sowohl mRNAs der PERV-Subtypen A, B und C sowie gespleißte *env*-mRNA detektiert werden (Abb. 4.19). Die Präsenz gespleißter *env*-mRNA weist auf die Möglichkeit der Env-Protein-Translation und der Viruspartikel-Bildung hin. In den Überständen der porzinen Fibroblasten P1 F10 konnte jedoch keine RT-Aktivität detektiert werden, was ebenfalls den geringen PERV-Expressionslevel bestätigt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die PERV-Expression in primären porzinen Zellen (Fibroblasten, PBMCs) sowie in einer porzinen Zelllinie (PK-15) mittels RNA-Interferenz unter der Verwendung lentiviraler Vektoren drastisch reduziert werden. Somit sind die Voraussetzungen für die Generierung shRNA-transgener Schweine mit stark verminderter PERV-Expression erfüllt. Über die PERV-Expression in verschiedenen Geweben und Organen normaler und transgener Schweine ist nicht viel bekannt (4.1.4, AKIYOSHI et al., 1998). Diese Daten deuten jedoch darauf hin, dass die PERV-Expression in verschiedenen Zelltypen inklusive Lymphozyten, die eine Bedeutung bei der Verwendung von Zellen und Organen bei der Xenotransplantation haben, gehemmt werden kann.

### 5.2.2 Hemmung der PERV-Expression in shRNA-transgenen Schweinen

Da porzine endogene Retroviren mit mehr als 50 Kopien im porzinen Genom integriert sind (BOSCH et al., 2000, HERRING et al., 2001b), ist ein konventioneller Gen-*knockout* schwierig. Die RNA-Interferenz bietet hierfür eine erfolgsversprechende Alternative. Diese Methode wurde bereits *in vitro* zur Hemmung zahlreicher Viren wie des Humanen Immundefizienzvirus HIV-1 (COBURN UND CULLEN, 2002, JACQUE et al., 2002, BANERJEA et al., 2003, CHRISTENSEN et al., 2007), des Hepatitis B Virus (HBV) (RADHAKRISHNAN et al., 2004, KAYHAN et al., 2007), des Coxsackie Virus B3 (FECHNER et al., 2007) sowie des West Nil Virus (KACHKO et al., 2006) genutzt. Des Weiteren wurde die RNA-Interferenz beispielsweise zur Hemmung der HBV-Expression bei Mäusen *in vivo* angewendet. So konnte eine langfristige Hemmung der HBV-Expression durch Applikation der shRNAs mittels adeno-assoziierten Vektoren erreicht werden (CHEN et al., 2007). In transgenen Mäusen führte die shRNA-Expression zur Hemmung des für eine N-Glykosylase kodierenden *Neil1* Gens in allen getesteten Organen (CARMELL et al., 2003).

Mit der erfolgreichen Hemmung der PERV-Expression in primären porzinen Zellen (4.2.1, DIECKHOFF et al., 2007a) war die Basis zur Herstellung solcher shRNA-transgenen Schweine geschaffen. In Kooperation mit Prof. Niemann (Institut für Tierzucht, Mariensee) konnten im Rahmen dieser Arbeit, basierend auf den bereits beschriebenen, mit den lentiviralen Partikeln pLVTHM-pol2 transduzierten Fibroblasten P1 F10 shRNA-transgene Schweine generiert werden, die eine erheblich verminderte PERV-Expression *in vivo* aufweisen (4.2.2, Abb. 4.27).

Die nach der üblichen Tragzeit von 116 Tagen geborenen sieben Ferkel wiesen keine sichtbaren Anomalien auf. Eines starb direkt nach der Geburt, vier weitere aufgrund einer nicht-behandelbaren Agalaktie der Muttersau. Da die Tiere vollständig entwickelt waren und normale Geburtsgewichte von ca. 1.3 kg aufwiesen und aufgrund der Sequenzspezifität des Mechanismus der RNA-Interferenz ist die Wahrscheinlichkeit einer Hemmung lebenswichtiger zellulärer Proteine in den transgenen Ferkeln sehr gering. Ein Restrisiko bleibt jedoch bestehen, da solche *off-target* Effekte, die neben dem Zielgen zusätzlich noch andere Gene beeinflussen, schon beobachtet wurden (JACKSON et al., 2003, JACKSON et al., 2004, PERSENGIEV et al., 2004, SCACHERI et al., 2004).

In allen Ferkeln konnte sowohl der Nachweis der Transgenintegration und der shRNA-Expression erbracht werden (Abb. 4.25, 4.26). Der Nachweis eines inhibitorischen Effekts der pol2-shRNA auf die PERV-Expression *in vivo* erfordert einen geeigneten Bezug. Zur Erzeugung einer geeigneten Kontrolle wurden daher mit Hilfe des Nukleustransfers Schweine generiert, deren Genom dem der Ursprungszellen P1 F10 entspricht. Somit

konnten Organe von fünf Tieren mit derselben genetischen Ausstattung erhalten werden und als Kontrolle eingesetzt werden. Da bereits beschrieben wurde, dass die PERV-Expression in Schweinen unterschiedlicher Rassen (4.1.3) und sogar in Tieren eines Wurfes derselben Rasse (4.1.3) sowie gewebsspezifisch variiert (4.1.4), schied ein Tier der gleichen Rasse (Deutsche Landrasse) als Bezugskontrolle aus. Aufgrund der gewebsspezifischen PERV-Expression konnten auch die Ursprungszellen nicht als Referenz herangezogen werden.

Eine weitere Frage, die für den Nachweis eines inhibitorischen Effekts der pol2-shRNA auf die PERV-Expression *in vivo* geklärt werden musste, ist die nach der geeigneten Normalisierung der Expressionsdaten. In Kapitel 5.1.2 wurde bereits näher auf die Eignung und Verwendung der *house keeping* Gene GAPDH, HPRT und Cyclophilin eingegangen. Zur Normalisierung in diesem Fall war keines der beschriebenen *house keeping* Gene optimal geeignet (Tab. 5.1). Jedoch aufgrund der ähnlichen Expressionsniveaus von HPRT und PERV wurde HPRT neben der Normalisierung auf eingesetzte Mengen Gesamt-RNA als Referenzgen verwendet.

Somit konnte in allen getesteten Organen der transgenen Ferkel 6 und 7 eine Hemmung der PERV-Expression von bis zu 95% nachgewiesen werden (Abb. 4.27, normalisiert auf Gesamt-RNA). Die auf die HPRT-Expressionen aber auch auf die GAPDH sowie Cyclophilin-Expressionen normalisierten Daten ergaben ein tendenziell ähnliches Expressions- bzw. Hemmungsmuster. Mit Ausnahme der Nieren waren zwischen den beiden shRNA-transgenen Tieren keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Hemmung der PERV-Expression zu beobachten. Drastische Unterschiede hinsichtlich der Vektorintegration der einzelnen Zellen der ursprünglichen Fibroblastenkultur sind daher unwahrscheinlich. Die Integration des lentiviralen Vektors in das Genom der diesen Versuchen zu Grunde liegenden Fibroblasten erfolgte rein zufällig. Aufgrund der Sortierung der transduzierten Fibroblasten über die Expression des Reportergens *gfp* wurde eine annähernd 100%ig transduzierte Fibroblastenkultur erreicht, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass jede Zelle zumindest ein Vektorintegrat enthielt. Über die exakte Zahl der Vektorintegrationen kann hierbei jedoch keine Aussage getroffen werden. Es ist somit durchaus möglich, dass eine Zelle nur ein Integrat beinhaltet, während eine andere mehrere Integrate enthält. Um bei weiteren Versuchen eine einheitliche Vektorintegration in der Fibroblastenkultur zu garantieren, empfiehlt sich eine Einzelzellklonierung.

Aufgrund der bereits beschriebenen Verluste der transgenen Ferkel durch die Agalaktie der Muttersau, waren in der vorliegenden Untersuchung keine Langzeitbeobachtungen des inhibitorischen Effekts sowie weiterführende Kreuzungsexperimente möglich. Diese ersten Ergebnisse zeigen jedoch einen hemmenden Effekt von bis zu 95% in allen getesteten Organen der untersuchten Tiere. Für zukünftige Erzeugungen transgener Schweine wäre die Verwendung eines lentiviralen Vektorsystems mit Antibiotika-induzierbarer Expression der shRNA denkbar (SZULC et al., 2006). Das von Szulc et al. entwickelte System, das die vielversprechende Repressionsaktivität der KRAB (*Krüppel-associated box*), die in vielen Transkriptionsregulatoren von Vertebraten gefunden wurde, und den Tetracyclin-Repressor (*tetR*) von *E. coli* miteinander verbindet (SZULC et al., 2006), wurde bereits *in vitro* und auch *in vivo* erfolgreich eingesetzt. Eine solche



konditionelle, durch die Applikation von Doxycyclin induzierte, shRNA-Expression würde die Untersuchung des inhibitorischen Effekts innerhalb eines Tieres ermöglichen. Weiterhin wäre zu überlegen, ob die Hemmung der PERV-Expression durch die Verwendung von mehreren shRNAs, die gegen unterschiedliche Ziele der viralen RNA gerichtet sind, gesteigert werden kann (siehe 5.2.1).

Die im Rahmen dieser Arbeit verfolgte Strategie resultierte in shRNA-transgenen Schweinen, die eine verminderte PERV-Expression um bis zu 95% zeigten und eröffnet damit die Möglichkeit der Generierung mikrobiologisch sicherer Xenotransplantate.

### 5.2.3 Induktion neutralisierender Antikörper gegen PERV und KoRV

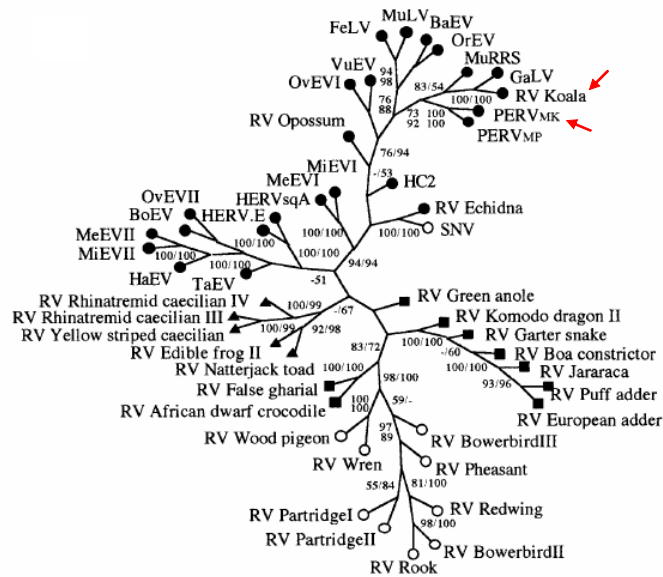
Im Gegensatz zur Humanmedizin sind  $\gamma$ -Retroviren in der Veterinärmedizin als Pathogene weit verbreitet (z.B. FeLV, MuLV, KoRV). Kürzlich wurde die *in vivo* Transspezies-Übertragung des sowohl exogen als auch endogen vorkommenden Koala Retrovirus auf Wistar-Ratten beschrieben, die eine humorale Immunantwort auslöste und zur Induktion eines Tumors führte (FIEBIG et al., 2006). Die durch eine KoRV-Infektion hervorgerufene Symptomatik in Koalas geht mit Leukämien, Tumoren sowie Immunsuppression einher und führt bei 15% der freilebenden Koalas zum Tode (MCKEE, 2005).

Sequenzvergleiche zeigen sehr hohe Homologien zu dem exogenen Gibbon-Affen-Leukämie Virus (GaLV), so dass für die Entstehung des KoRV eine erst kürzlich (in den letzten 200 Jahren) erfolgte Transspeziesübertragung angenommen wird. Hierbei werden als mögliche Überträger Nagetiere vermutet, da Gibbon-Affen und Koalas geographisch nicht in Kontakt stehen. GaLV-verwandte Sequenzen konnten demnach auch in verschiedenen asiatischen Maus- und Rattenarten detektiert werden (MARTIN et al., 1999b).

Auf einigen Inseln Australiens haben sich seit Beginn des 20. Jahrhunderts isolierte Koala-Populationen etabliert, die keine KoRV-Infektion aufweisen (TARLINGTON et al., 2006). Daher wird eine erst kürzlich, vor ca. 100 Jahren erfolgte Endogenisierung des KoRV in das Genom der Koalas vermutet (TARLINGTON et al., 2006).

Der in Abbildung 5.1 dargestellte phylogenetische Stammbaum (MARTIN et al., 1999b), der basierend auf Sequenzvergleichen einer 280 Aminosäure langen Region einer retroviralen Protease erstellt wurde, zeigt die phylogenetische Verwandtschaft des Koala Retrovirus mit den porzinen endogenen Retroviren. Die Tatsache, dass ein Endogenisierungsereignis eines phylogenetisch mit PERV eng verwandten  $\gamma$ -Retroviren erst vor ca. 100 Jahren stattgefunden hat (TARLINGTON et al., 2006) und die Transspeziesübertragung dieses Virus auf Ratten zur Induktion von Tumoren führt (FIEBIG et al., 2006), fordert zusätzliche Sicherheitsvorkehrungen hinsichtlich der PERV-Übertragung bei der Xenotransplantation.

Bisher konnte zwar weder in Transplantations- und Infektionsstudien mit Kleintieren und nicht-humanen Primaten noch in ersten klinischen Xenotransplantationen eine Nachweis einer PERV-Übertragung erbracht werden (4.2), humane Zellen lassen sich jedoch *in vitro* infizieren (PATIENCE et al., 1997, WILSON et al., 1998, SPECKE et al., 2001b).



**Abbildung 5.1: Phylogenetischer Stammbaum einiger Retroviren**

Der Stammbaum wurde basierend auf Sequenzvergleichen einer 280 Aminosäuren langen Region einer retroviralen Protease erstellt. Die roten Pfeile zeigen die phylogenetische Verwandtschaft von KoRV und PERV (MARTIN et al., 1999b)

Ausgehend von dieser Tatsache und in Anbetracht der besonderen Situation während einer Xenotransplantation (Exposition porziner Organe im immunsupprimierten Organismus über mehrere Jahre), kann somit die Möglichkeit einer Adaptation an den Menschen mit daraus folgendem pathogenen Verlauf nicht sicher ausgeschlossen werden. Auch die Erfahrungen mit anderen tierischen Viren, wie z.B. SIV/HIV, welche Epidemieartig die Spezies Mensch infiziert haben (GAO et al., 1999), sollten im Fall der Xenotransplantation begründete Vorsicht walten lassen.

Eine Strategie zur Eingrenzung des Risikos einer PERV-Übertragung auf den Menschen stellt die Entwicklung eines Impfstoffes dar. Für den Einsatz eines solchen Impfstoffes wären zwei Möglichkeiten denkbar: Die präventive Vakzinierung zukünftiger Transplantatempfänger sowie die Eingrenzung einer potentiellen Pandemie, sollte es trotz aller Vorsichtsmaßnahmen zu einer PERV-Übertragung auf den Menschen kommen.

Das feline Leukämievirus ist bisher das einzige Retrovirus, gegen welches kommerzielle Impfstoffe erhältlich sind. Sie basieren auf inaktivierten Viruspartikeln, viralen gp70-Proteinen (z.B. Leucocell 2, Pfizer Inc., USA) oder aus rekombinantem p45 (Leucogen, Virbac AG, Schweiz; unglykosyliertes Oberflächenprotein des FeLV-A, exprimiert in *E.coli*).

Virale Transmembran- und Oberflächenhüllproteine sind entscheidend an der Infektion der Zielzelle beteiligt, da über sie der Kontakt und die Fusion des Virus mit der Zellmembran erfolgt. Neben unterschiedlichen von der Wirtszellmembran abgeleiteten Proteinen, sind sie die einzigen viralen Proteine, die auf der Oberfläche der Retroviren präsentiert werden und stellen somit die bevorzugte Zielstruktur für die Induktion neutralisierender Antikörper dar. Hinsichtlich der Entwicklung eines Impfstoffkandidaten gegen PERV wurde im Rahmen dieser Arbeit daher das virale Hüllprotein gp70 als

Zielstruktur zur Antikörperinduktion gewählt. Hierfür wurden drei unterschiedliche Ansätze verfolgt:

- die Generierung und Immunisierung mit gp70-Proteinfragmenten
  - die Herstellung und Immunisierung des rekombinanten Oberflächenhüllproteins
  - die Konstruktion eines auf den Sequenzen gp70 und gp85 basierenden DNA-Impfstoffs
- Durch die Immunisierung sollte des Weiteren die Generierung eines Kontrollserums gegen das PERV-gp70-Protein für immunologische Nachweissysteme einer PERV-Infektion erzielt werden.

Die Erprobung eines Impfstoffkandidaten erfordert ein Tiermodell, in dem die Tiere nach der Immunisierung mit dem entsprechenden Pathogen infiziert werden können, um somit die protektive Wirkung des Impfstoffs zu testen. Bisher konnte für PERV allerdings kein Kleintiermodell etabliert werden. Kürzlich wurde jedoch die Generierung transgener Mäuse, die den HuPAR-2-Rezeptor für PERV-A tragen und produktiv mit PERV-A infizierbar waren, beschrieben (MARTINA et al., 2006). Im Rahmen dieser Arbeit war der Erhalt dieser Tiere leider nicht möglich. Da Wistar-Ratten produktiv mit KoRV infizierbar sind (FIEBIG et al., 2006), stellen diese somit ein Tiermodell zur Erprobung von Impfstoffansätzen gegen ein phylogenetisch eng mit PERV verwandtes Virus dar. Aus diesem Grund wurde die Herstellung der gp70-Proteine von PERV und KoRV parallel angestrebt.

#### **5.2.3.1 Induktion bindender und neutralisierender Antikörper gegen PERV-gp70-Proteinfragmente**

Ein Ansatz zur Induktion neutralisierender Antikörper gegen das PERV-gp70 basierte auf der Teilung der gp70-Sequenz in Untereinheiten. Neben der Induktion von Antikörpern, sollte die Immunisierung mit den Proteinfragmenten hauptsächlich den Vergleich unterschiedlicher Bereiche des viralen gp70, hinsichtlich Immunogenität und Potential, neutralisierende Antikörper zu induzieren, ermöglichen.

#### **Induktion bindender Antikörper gegen PERV-gp70-Proteinfragmente**

Mit Ausnahme des Fragmentes 2 konnte durch die Immunisierung mit allen Fragmenten die Induktion bindender Antikörper erreicht und rekombinantes sowie virales gp70 detektiert werden (Abb. 4.28). Damit wurde ein Ziel der Arbeiten, die Generierung eines weiteren Antigens sowie eines Kontrollserums gegen das PERV-gp70-Protein für immunologische Nachweissysteme einer PERV-Infektion, erreicht.

Unklar ist, inwieweit sich das zur Immunisierung eingesetzte rekombinante Konstrukt als Antigen in einem solchen Nachweissystem eignet, da nach dem derzeitigen Stand der Arbeiten nicht vorausgesagt werden kann, ob die während einer möglichen PERV-Infektion (bisher stehen keine Seren infizierter Individuen zur Verfügung) gebildeten gp70-spezifischen Antikörper das rekombinante Konstrukt binden können. Da zum Nachweis von Infektionen eng verwandter Viren (FeLV) und anderer Retroviren bereits ähnliche Antigene erfolgreich eingesetzt werden, ist dies jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit zu erwarten. Vorrangiges Ziel der Arbeiten war jedoch die Induktion neutralisierender Antikörper gegen das gp70-Protein von PERV und KoRV, daher wurden hierzu keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

Die Proteinfragmente lagen fusioniert mit dem 26 kDa großem GST (Gluthathion-S-Transferase)-*tag* vor. Leider war es nicht möglich, das GST-*tag* von dem rekombinaten Protein zu trennen, da diese nach der Aufreinigung in unlöslicher Form vorlag. Mit einer Größe von 11 bis 17 kDa sind die Proteinfragmente somit kleiner als die Gluthathion-S-Transferase. Mit Seren der Tiere, die mit dem GST-Proteinfragment-2 immunisiert wurden, konnte das immunisierte Antigen, jedoch nicht das virale gp70 detektiert werden. Der Grund dafür könnte die Maskierung des Fragments durch GST sein, das gegenüber dem Proteinfragment eine Immundominanz ausbildet, oder eine fehlende Immunogenität des Fragmentes.

Als Antigen wurden in der durchgeführten Western-Blot-Analyse pelletierte Viruspartikel verwendet. Die Seren wurden somit hinsichtlich ihrer Bindung gegen glykosiliertes Protein untersucht. Da die rekombinant in Bakterien hergestellten Proteine nicht glykosiliert waren, besteht die Möglichkeit, dass Epitope, deren Bindungsstellen von Glykosilierungen maskiert sind, nicht detektiert werden konnten.

Mit den Seren der Rattengruppen, die mit den Proteinfragmenten immunisiert wurden, sowie eines Tieres der Rattengruppe 214 konnten in der Western-Blot-Analyse starke Signale auf der Höhe des viralen p15E detektiert werden (4.28). Die Sequenzen der gp70-Fragmente zeigten jedoch keinerlei Homologie zur Sequenz des p15E. In einer weiteren Western-Blot-Analyse (Daten nicht gezeigt) mit rekombinantem p15E konnte eine spezifische Bindung des p15E bestätigt werden. Aufgrund eines parallel laufenden KoRV-Infektionsversuchs bestand die Vermutung, dass sich die Ratten mit KoRV infiziert haben könnten. Die Sequenzen des PERV-p15E und KoRV-p15E zeigen eine hohe Homologie von 87% und das für PERV-p15E gefundene Epitop E2 (FEGWFN, FIEBIG et al., 2003) ist mit Ausnahme der ersten Aminosäure identisch zu dem des KoRV-p15E (YEGWFN). Des Weiteren ist das Epitop des mAk 7C4 von Chiang et al. (CHIANG et al., 2007), welches mit der immunsuppressiven Domäne überlappt, in beiden Viren bis auf einen Aminosäureaustausch identisch.

Basierend auf diesen Beobachtungen wurde die Auswertbarkeit der durchgeführten Neutralisationstests überprüft. Da die Rattenserum nicht kreuzneutralisierend auf eine *in vitro*-KoRV-Infektion wirkten, ist eine KoRV-Infektion unwahrscheinlich. Eine potentielle Aktivierung eines endogenen Ratten Retrovirus könnte eine Erklärung der spezifischen p15E-Banden darstellen. In einem späteren Neutralisationstest konnte zudem gezeigt werden, dass Antikörper gegen das KoRV-rp52 keine neutralisierende Wirkung auf eine PERV-Infektion haben. Bei zwei von vier getesteten Ratten der Gruppe 211 (immunisiert mit KoRV-rp52 + p15E) konnten jedoch geringe kreuzneutralisierende Effekte (40% und 60%) nachgewiesen werden. Das gp70-Proteinfragment 2 induzierte keine bindenden Antikörper und konnte somit als zusätzliche Negativkontrolle dienen. Des Weiteren bestätigten die stark neutralisierenden Seren der mit PERV-rp52 bzw. den PERV-gp70-Proteinfragmenten immunisierten Ziegen (52 und 62), die definitiv keine KoRV-Infektion aufwiesen, das Potential der verwendeten Antigene zur Induktion neutralisierender Antikörper. Zusammengefasst war es somit möglich die Neutralisationstests auszuwerten und die Unterschiede der Gruppen zu analysieren, um damit zumindest Tendenzen in den einzelnen Immunantworten festzustellen.

### Identifikation neutralisierender Bereiche in der PERV-Env-Sequenz

Die Seren des Proteinfragments 1 wurden aufgrund zytotoxischer Effekte nicht in die Auswertung des Neutralisationsassays mit einbezogen. Neutralisierende Antikörper sind vermutlich vor allem gegen die exponierten Bereiche des gp70 gerichtet, z.B. gegen die Rezeptorbindestellen. Die Rezeptorbindedomäne befindet sich im N-terminalen Bereich des gp70 (Abb. 1.3) und besteht aus dem konservierten PHQ-Motiv sowie den variablen Regionen A (VRA) und B (VRB). Im Anschluss folgt eine prolinreiche Region (PRR). Die Subtypen PERV-A, -B und -C unterscheiden sich maßgeblich in diesen drei Regionen (WATANABE et al., 2005). Die Sequenz des PERV-gp70-Fragment 1 reicht bis in die ersten Aminosäuren der VRA-Region und beinhaltet das für die Infektion wichtige PHQ-Motiv. Dieses Motiv ist bei PERV degeneriert, kann jedoch mit Peptiden transaktiviert werden und eine rezeptorunabhängige Infektion vermitteln (LAVILLETTE UND KABAT, 2004). Basierend auf diesen Tatsachen besitzt das Fragment 1 ein hohes Potential zur Induktion neutralisierender Antikörper.

Wie bereits beschrieben, konnten durch die Immunisierung mit Fragment 2 keine bindenden Antikörper und somit erwartungsgemäß auch keine neutralisierenden Antikörper induziert werden. Die Sequenz des gp70-Fragments 2 beginnt mit der VRA und endet im hinteren Drittel der VRB. Zwischen den zwei variablen Regionen befindet sich bei dem Subtyp PERV-A, im Vergleich zu den Subtypen PERV-B und -C, ein Aminosäureaustausch von Valin zu Isoleucin, welcher u.a. für die hohe Infektivität der PERV-A/C Rekombinante, mit der im Rahmen dieser Untersuchung gearbeitet wurde, verantwortlich ist (HARRISON et al., 2004). Eine erneute Expression und Immunisierung des Proteinfragments mit einem anderen Fusions-*tag* (z.B. Calmodulin-Binde-Protein) könnte zu einer Induktion von Antikörpern führen.

Mit den Seren der mit Fragment 3 immunisierten Ratten konnte keine signifikante Neutralisation erreicht werden. Die Sequenz des Fragments 3 beginnt innerhalb der VRB und reicht bis in die PRR hinein. Die PRR ist ein weiterer Grund für die hohe Infektiosität der PERV-A/C und könnte für die Rezeptorbindung von Bedeutung sein, da eine kompetitive Hemmung der Infektion mit dem N-terminalen SU-Bereich (incl. PHQ, VRA und VRB) alleine nicht erreicht werden konnte (WATANABE et al., 2005).

Das Fragment 4 beginnt in der PRR und endet in der relativ konservierten C-terminalen Region des gp70. Die Sequenz des von Wang et al. beschriebenen rekombinanten Env-Proteins beginnt in diesem Bereich (WANG et al., 2004). Interessanterweise gibt es ein FeLV-Peptid, das ebenso wie Leucogen (p45) eine schützende Immunantwort (über nABs) auslöst und Katzen vor einer Infektion mit FeLV schützen konnte (WEIJER et al., 1993). Nach einem Vergleich der Peptid-Sequenz mit der PERV-gp70-Sequenz konnte ein großer homologer Bereich von AS 260–332 identifiziert werden. Dies entspricht nahezu der Sequenz des Fragmentes 4 bis zum Beginn des Proteins von Wang et al. (270–333). Fragment 4 könnte somit eine bedeutende Rolle bei der Induktion neutralisierender Antikörper spielen. Eine Expression von Fragment 4 ist daher sehr interessant. Möglicherweise könnte der Export des Proteinfragments in das Periplasma von *E. coli* durch ein Signalpeptid eine Expression ermöglichen und so den proteolytischen Abbau oder eine potenzielle Zytotoxizität verhindern.

Das Fragment 5 repräsentiert das C-terminale Ende der SU von PERV. Interessanterweise konnten Chiang et al. (CHIANG et al., 2007) durch Immunisierung mit dem Protein von Wang et al. (WANG et al., 2004) zwei neutralisierende monoklonale Antikörper herstellen, von denen der eine, wie bereits beschrieben, in der p15E-Region und der zweite (8E10) am C-terminalen Ende der Sequenz des hier verwendeten gp70-Fragments 5 bindet. Nur mit einem Serum der vier mit dem PERV-gp70-Fragment 5 immunisierten Ratten konnte ein neutralisierender Effekt detektiert werden. Die Induktion von neutralisierenden Antikörpern gegen das Epitop von 8E10 scheint dementsprechend nicht die Regel zu sein.

Ein signifikanter neutralisierender Effekt konnte nur durch die Immunisierung mit dem Proteinfragment 123 erreicht werden (mit Ausnahme Ratte 150.3, Abb. 4.29). Dieses Kombinationsfragment beinhaltet alle bekannten Regionen die für die Rezeptorbindung erforderlich sind.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Ziege 52 mit den gp70-Fragmenten 123 und 5 immunisiert. Hierdurch wurden signifikante neutralisierende Antikörper induziert, welche die PERV-Infektion der 293-Zellen bis zu einer Verdünnung von 1:40 zu nahezu 100% neutralisierten (Abb. 4.31).

Durch Immunisierung mit dem Kombinationsfragment 123 bzw. mit der, mit Ausnahme des Fragments 4, kompletten gp70-Sequenz konnten in zwei Spezies (Wistar-Ratte, Ziege) Seren mit erheblich höheren neutralisierenden Effekten induziert werden als mit den Einzelfragmenten. Daher wurde in den weiteren Versuchen die Generierung des gesamten gp70-Proteins angestrebt, um somit zusätzlich Antikörper gegen eventuelle Konformationsepitope zu induzieren.

### **5.2.3.2 Induktion bindender und neutralisierender Antikörper gegen PERV- und KoRV-gp70 auf Basis des rekombinanten p52**

Bei dem phylogenetisch eng mit PERV und KoRV verwandten FeLV war es bereits gelungen, das Hüllprotein, einschließlich der ersten 34 AS der Transmembranproteins p15E, rekombinant herzustellen und als protektiven Impfstoff zu verwenden (MARCIANI et al., 1991). Auf Basis dieser Sequenz des unglykosilierten Proteins (p45) erfolgte die Konzeption, Klonierung und Expression der Hüllproteine von PERV und KoRV. Durch Immunisierung von Ratten und Ziegen mit den PERV- und KoRV-rp52-Proteinen konnten in allen Seren bindende Antikörper gegen die viralen gp70-Proteine sowie hohe Titer an neutralisierenden Antikörpern (90 bis 100%) induziert werden (Abb. 4.37 A, 4.33, 4.38, 4.34).

Auch durch Immunisierung mit dem transmembranen Hüllprotein p15E der Viren PERV, FeLV und KoRV wurden bereits neutralisierende Antikörper induziert (FIEBIG et al., 2003, LANGHAMMER et al., 2005, LANGHAMMER et al., 2006a, FIEBIG et al., 2006). Nach Immunisierung mit FeLV-p15E zeigten z.B. drei von sechs Katzen über einen Zeitraum von 2 Jahren eine protektive Immunantwort. Die Kombination von p15E mit Leucogen (p45) könnte somit einen verbesserten Impfstoff darstellen (LANGHAMMER, 2006b). Für das murine Leukämie Virus (MuLV) konnte ebenso gezeigt werden, dass Immunisierungen mit den Proteine gp70 und p15E zusammen effektiver sind als mit dem gp70-Protein allein (SCHWARZ et al., 1984). Basierend auf diesen Beobachtungen erfolgte zusätzlich eine Immunisierung von Ratten mit den p15E-Proteinen von PERV- und KoRV

jeweils einzeln und in Kombination mit den rp52-Proteinen. Durch Immunisierung mit dem rekombinanten PERV-p15E-Protein konnte nur im Serum eines Tieres signifikant neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 4.33). Dies steht im Widerspruch zu Daten von Fiebig et al., die hohe Neutralisation durch Immunisierung mit PERV-p15E erreichten (FIEBIG et al., 2003, FIEBIG, 2007). Weiterhin muss in diesem Zusammenhang eine mögliche Beeinflussung des Ergebnisses durch ein endogenes Ratten Retrovirus bedacht werden (vgl. 5.2.3.1). Durch die Doppelimmunisierung (PERV-rp52 und -p15E) gelang die Induktion neutralisierender Antikörper in drei von vier Tieren nur bis zu einer Serumverdünnung von 1:40 (Abb. 4.35). Die Doppelimmunisierung konnte die durch PERV-rp52 induzierten neutralisierenden Effekte (über 90%, bis zu einer Serumverdünnung von 1:80) somit nicht steigern.

Mit dem rekombinanten KoRV-p15E-Protein konnte bei allen getesteten Tieren nur bei einer Serumverdünnung von 1:10 eine signifikante Neutralisation der KoRV-Infektion bestimmt werden (Abb. 4.37 C). Im Gegensatz dazu wurden durch die Doppelimmunisierung mit KoRV-rp52 und KoRV-15E wie bei der Einzelimmunisierung mit KoRV-rp52 in allen Tieren neutralisierende Antikörper induziert. Deren Aktivität war bis zu einer Serumverdünnung von 1:80 signifikant nachzuweisen jedoch geringfügig schwächer als die durch die Einzelimmunisierung induzierten neutralisierenden Antikörper (Abb. 4.37 B).

Vergleichend lässt sich feststellen, dass im Rahmen dieser Untersuchung durch die Einzelimmunisierung mit den rekombinanten p52-Proteinen bessere Resultate hinsichtlich neutralisierender Aktivitäten erreicht wurden und sich die Daten von Schwarz et al. und Langhammer et al. hinsichtlich einer gesteigerten Neutralisation durch Immunisierung beider Antigene (gp70 und p15E, SCHWARZ et al., 1984, LANGHAMMER et al., 2006b) somit nicht uneingeschränkt auf die neutralisierenden Effekte auf eine *in vitro* Infektion mit PERV und KoRV übertragen lassen. Da die Untersuchungen jedoch in unterschiedlichen Systemen (Katze ↔ Ratte, natürlicher Wirt ↔ nicht natürlicher Wirt, unterschiedliche Adjuvansien) durchgeführt wurden und zudem eine Aktivierung eines endogenen Rattenvirus in den Versuchstieren nicht auszuschließen ist, ist ein direkter Vergleich nicht möglich.

### **Präventive Vakzinierung zukünftiger Transplantatempfänger mit rp15E?**

Die in diesem Projekt durchgeführten Arbeiten zur Induktion PERV-neutralisierender Antikörper zeigten, dass ein Impfschutz gegen PERV auf Basis des gp70-Proteins möglich ist. Ob jedoch die allgemeinen Anforderungen an einen effektiven Impfstoff, wie die Induktion eines nahezu 100%igen Schutzes der Impflinge vor der Infektion durch möglichst alle Varianten des Erregers, lebenslanger Schutz mit nur minimalen Nebenwirkungen, kostengünstig produzierbar sowie leicht zu transportieren, zu lagern und zu applizieren, erfüllt werden, ist noch unklar. Nach derzeitigem Stand der Experimente erfüllt das zur Immunisierung eingesetzte rp52-Konstrukt jedoch die grundlegende Anforderung:

Bei 100% der Versuchstiere konnten Seren mit neutralisierender Aktivität induziert werden. Dieser Versuch wurde jedoch in einem artifiziellem System durchgeführt. Da kein geeignetes Tiermodell zur Verfügung stand, kann mit den erfolgten Versuchen keine

Aussage getroffen werden, ob die induzierten Antikörper einen effektiven Schutz vor einer Infektion des Organismus bieten. Mit dem im Rahmen dieser Arbeit rekombinant hergestellten KoRV-gp70-Protein sowie dem von Fiebig et al. beschriebenen KoRV-p15E bietet sich jedoch die Möglichkeit, die protektive Wirkung der Antigene für ein mit PERV phylogenetisch eng verwandtes Virus in einem Infektionsversuch mit Wistar-Ratten zu testen.

Porzine endogene Retroviren sind, wie bereits beschrieben, ein integraler Bestandteil des Genoms aller porziner Zellen (LE TISSIER et al., 1997). Obwohl aus PBMCs zahlreich getesteter Schweine auch nach Stimulation der PBMCs mit einem T-Zellmitogen keine porzinen endogenen Retroviren freigesetzt wurden (4.1.5), könnte eine Immunisierung gegen porzine Proteine möglicherweise zu unerwünschten Abstoßungsreaktionen des Transplantats führen.

### 5.2.3.3 DNA-Vakzinierung mit gp70 und gp85 von PERV und KoRV

DNA-Impfstoffe bieten den Vorteil, neben der Induktion von Antikörpern auch das zelluläre Immunsystem zu aktivieren. Die Präsentation der Antigene als MHC I -Komplex auf der Zelloberfläche führt zur Induktion einer zytotoxischen T-Zell-Antwort (JECHLINGER, 2006). Weitere Vorteile der DNA-Vakzinen sind deren zeitsparende und kostengünstige Produktion, sowie eine möglichst native Form des Antigens im Vergleich zum natürlichen viralen Protein. Durch die Expression des Antigens in den Zellen des Impflings durchläuft dieses z.B. die gleiche Glykosylierung wie das natürliche virale Protein im Zuge eines Replikationszyklus. In der Veterinärmedizin sind bereits einige DNA-Vakzine zu gelassen, wie z.B. ein DNA-basierter Impfstoff gegen das West Nil Virus für Pferde (POWELL, 2004). Auch in der Humanmedizin befinden sich derzeit zahlreiche DNA-Impfstoffe, wie z.B. gegen Melanome, in klinischen Studien (clinicaltrials.org, MD Anderson Cancer Center, Universität Texas).

Zur Induktion einer Immunantwort gegen eine trimere Form der viralen Hüllproteine, wodurch auch etwaige Konformationsepitope erkannt werden könnten, erfolgte eine DNA-Vakzinierung mit den gp70- und gp85-Sequenzen beider Viren (PERV, KoRV). Die Trimerisierung der PERV- und KoRV-gp70- und gp85-Proteine sollte durch die C-terminale Fusion der Trimerisierungsdomäne des Fibritins erreicht werden (TAO et al., 1997, LETAROV et al., 1999, YANG et al., 2000b, YANG et al., 2002). Für Retroviren wie HIV-1 wurde gezeigt, dass durch Immunisierung mit Hüllproteinen, die als Trimer vorliegen, höhere neutralisierende Antikörpertiter erzielt werden können als mit Monomeren (GRUNDNER et al., 2005, BOWER et al., 2006, LI et al., 2006a).

Durch DNA-Vakzinierung der beschriebenen Konstrukte konnten zwar in den Seren aller getesteten Tiere bindende Antikörper gegen die rekombinanten Proteine (PERV-p15E und -gp70 bzw. KoRV-p15E und -gp70) detektiert werden, jedoch nur sehr geringe Titer. Erwartungsgemäß wurde in einem anschließenden Neutralisationstest auch bei der geringen Verdünnung der Seren von 1:10 keine signifikante Neutralisation nachgewiesen. In den Sequenzierungsergebnissen der hergestellten Konstrukte fanden sich einige Punktmutationen, die zu Aminosäureaustauschen führten (Tab. 4.10). Zwei der Aminosäureaustausche (KoRV: Position 408 und 459) wurden bereits bei der aus dem Koala Birubi isolierten KoRV-Sequenz beschrieben (FIEBIG et al., 2006). Aufgrund der beschriebenen Aminosäureaustausche besteht die Möglichkeit der strukturellen



Veränderung potentiell für die Induktion von Antikörpern relevanter Epitope. Solche Veränderungen könnten die Induktion geringerer Antikörpertiter zur Folge haben.

Da bei DNA-Immunisierungen gegen HIV-1 bereits hohe neutralisierende Aktivitäten für sezernierte trimere Env-Proteine induziert werden konnten (SRIVASTAVA et al., 2003), wurden die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte so konzipiert, dass die Präsentation der gp70- und gp85-Trimere nicht auf der Zelloberfläche erfolgt, sondern diese von der Zelle sezerniert werden. Ein Nachweis der Trimerisierung *in vitro* im Zellkulturüberstand von 293-Zellen, die mit den verwendeten Konstrukten transfiziert wurden, befindet sich derzeit in der Durchführung. Durch weitere Versuche mit Konstrukten, welche aufgrund einer Transmembrandomäne zur Präsentation der gebildeten Proteintrimere auf der Zelloberfläche führen, könnte eine mögliche ursächliche Wirkung auf die niedrigen Antikörpertiter durch die Sekretion der Proteintrimere analysiert werden. Die untersuchten Seren wurden zwei Wochen nach der dritten Immunisierung gewonnen. Möglicherweise könnten weitere Immunisierungen zu einem höheren Titer an Antikörpern führen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY

### 6.1 Zusammenfassung

Die Xenotransplantation porziner Zellen, Gewebe und Organe bietet eine Möglichkeit, den immensen Mangel an geeigneten allogenen Transplantaten zu überbrücken. Die Grundvoraussetzung ist hierbei neben der Lösung immunologischer und physiologischer Probleme hinsichtlich Akzeptanz und Funktionalität des Xenotransplantats im Rezipienten, die mikrobiologische Sicherheit.

Den zu den  $\gamma$ -Retroviren, von welchen viele in der Lage sind, Leukämien und Immundefizienzen auszulösen, gehörenden porzinen endogenen Retroviren wird dabei eine besondere Bedeutung beigemessen, da sie im Genom aller Schweine integriert sind und nicht wie die meisten anderen Pathogene durch SPF-Zucht eliminiert werden können. Auch die Entfernung der Viren durch *knock-out*-Verfahren wird als äußerst schwierig angesehen, da PERVs mit mehr als 50 Kopien an verschiedenen Loci des porzinen Genoms integriert sind. Obwohl PERVs humane Zellen *in vitro* infizieren können, wurde weder in Infektionsstudien noch in ersten experimentellen Xenotransplantationen eine PERV-Übertragung beobachtet. In Anbetracht der besonderen Situation bei einer Xenotransplantation, der Exposition porziner Zellen und Organe im immunsupprimierten Organismus über mehrere Jahre, ist das Risiko einer PERV-Übertragung auf den Rezipienten nicht auszuschließen.

Vor diesem Hintergrund war das Ziel der vorliegenden Arbeit, einen Beitrag zur Evaluierung der Virussicherheit sowie zur Prävention der Virusübertragung bei der Xenotransplantation zu leisten.

Nachdem im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die PERV-Expression in unterschiedlichen Schweinerassen, innerhalb eines Wurfes derselben Rasse sowie gewebsspezifisch variiert und die Selektion geeigneter Schweine mit einer stabilen und geringen PERV-Expression somit schwierig ist, wurden weitere Strategien zur Prävention der PERV-Übertragung entwickelt.

Basierend auf dem Mechanismus der RNA-Interferenz wurden shRNA-transgene Schweine mit um 95% verminderter PERV-Expression generiert, die in Zukunft zu mikrobiologisch sicheren Xenotransplantaten beitragen könnten.

Weiterhin erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Entwicklung von Impfstoffstrategien zur Prävention der PERV-Übertragung. Auf Basis des viralen Hüllproteins konnten in zwei Spezies (Ratten und Ziegen) neutralisierende Antikörper gegen PERV sowie das phylogenetisch eng verwandte Koala Retrovirus (KoRV) induziert werden, die in der Lage waren eine PERV- bzw. KoRV-Infektion *in vitro* zu 100% zu neutralisieren. Ein solcher Impfstoff könnte nach Klärung eventueller negativer Auswirkungen auf die Akzeptanz des Transplantats zur Impfung der Rezipienten eingesetzt werden.

Weiterhin konnten im Rahmen dieser Arbeit erste Hinweise auf eine erhöhte PERV-Expression in porzinen Melanomen gewonnen werden. Diese Beobachtung demonstriert die große Bedeutung der bisher unternommenen Anstrengungen geeignete Strategien zur Prävention der PERV-Übertragung zu entwickeln.

## 6.2 Summary

Xenotransplantation of porcine cells, tissues and organs may offer a solution to the severe shortage of suitable allografts. In addition to overcoming immunological rejection and problems with the physiological functionality of the xenograft, a basic requirement for xenotransplantation is to ensure microbiological safety.

Porcine endogenous retroviruses that belong to the family of  $\gamma$ -retroviruses of which many members are able to induce leukemias and immunodeficiencies are of particular importance. They are an integrated part of the porcine genome and cannot be eliminated by selective breeding under SPF conditions, as is the case for most other pathogens. Eliminating these viruses may prove difficult due to the fact that over 50 PERV copies are integrated into the porcine genome at different loci.

Although PERVs are able to infect human cells *in vitro*, PERV transmission has not been observed during infectivity studies or following the first experimental xenotransplantations. However, given the special situation during xenotransplantation, i.e. the presence of porcine cells and organs within an immunosuppressed host over a period of several years, the risk of a PERV transmission cannot be excluded.

Against this background, the aim of this dissertation was to contribute to the evaluation of safety as well as to the prevention of virus transmission during xenotransplantation.

The demonstration of variable PERV expression in different breeds of pig, in litters of the same race and even in different tissues of individual animals, indicates that selection of pigs with a low and stable level of PERV expression may prove difficult. Additional strategies for preventing PERV transmission were therefore developed.

Based on the mechanism of RNA interference, shRNA transgenic pigs demonstrating a drastically (95%) reduction of PERV expression were generated. Such animals could provide a source of virologically safe xenografts in the future.

In addition, as part of this work, vaccine strategies to prevent PERV transmission were addressed. Antibodies able to fully neutralize both PERV and the phylogenetically related koala retrovirus (KoRV) *in vitro* were induced in two species using an immunogen based on the viral envelope protein. After resolving the negative consequences on xenograft acceptance that potentially might occur, such a vaccine could be used to pre-vaccinate xenograft recipients.

Finally, this work provides the first evidence of elevated PERV expression in porcine melanomas, again demonstrating the importance of developing appropriate measures to prevent PERV transmission to humans.

## LITERATURVERZEICHNIS

- ADEMA, G. J., DE BOER, A. J., VOGEL, A. M., LOENEN, W. A., AND FIGDOR, C. G. (1994). Molecular Characterization of the Melanocyte Lineage-Specific Antigen Gp100. *J Biol Chem* 269, 20126-20133.
- AKIYOSHI, D. E., DENARO, M., ZHU, H., GREENSTEIN, J. L., BANERJEE, P., AND FISHMAN, J. A. (1998). Identification of a Full-Length cDNA for an Endogenous Retrovirus of Miniature Swine. *J Virol* 72, 4503-4507.
- ALLAN, G. M., AND ELLIS, J. A. (2000). Porcine Circoviruses: A Review. *J Vet Diagn Invest* 12, 3-14.
- ALLAN, J. S. (1998). The Risk of Using Baboons as Transplant Donors. Exogenous and Endogenous Viruses. *Ann N Y Acad Sci* 862, 87-99.
- ARGAW, T., RITZHAUPT, A., AND WILSON, C. A. (2002). Development of a Real Time Quantitative PCR Assay for Detection of Porcine Endogenous Retrovirus. *J Virol Methods* 106, 97-106.
- ARMBRUESTER, V., SAUTER, M., KRAUTKRAEMER, E., MEESE, E., KLEIMAN, A., BEST, B., ROEMER, K., AND MUELLER-LANTZSCH, N. (2002). A Novel Gene from the Human Endogenous Retrovirus K Expressed in Transformed Cells. *Clin Cancer Res* 8, 1800-1807.
- ARMSTRONG, J. A., PORTERFIELD, J. S., AND DE MADRID, A. T. (1971). C-Type Virus Particles in Pig Kidney Cell Lines. *J Gen Virol* 10, 195-198.
- ATHAS, G. B., LOBELLE-RICH, P., AND LEVY, L. S. (1995). Function of a Unique Sequence Motif in the Long Terminal Repeat of Feline Leukemia Virus Isolated from an Unusual Set of Naturally Occurring Tumors. *J Virol* 69, 3324-3332.
- BAILEY, L. L., NEHLSSEN-CANNARELLA, S. L., CONCEPCION, W., AND JOLLEY, W. B. (1985). Baboon-to-Human Cardiac Xenotransplantation in a Neonate. *Jama* 254, 3321-3329.
- BAKKER, A. B., SCHREURS, M. W., DE BOER, A. J., KAWAKAMI, Y., ROSENBERG, S. A., ADEMA, G. J., AND FIGDOR, C. G. (1994). Melanocyte Lineage-Specific Antigen Gp100 Is Recognized by Melanoma-Derived Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *J Exp Med* 179, 1005-1009.
- BANERJEA, A., LI, M. J., BAUER, G., REMLING, L., LEE, N. S., ROSSI, J., AND AKKINA, R. (2003). 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* 8, 62-71.
- BANNASCH, H., HORCH, R. E., TANCZOS, E., AND STARK, G. B. (2000). [Treatment of Chronic Wounds with Cultured Autologous Keratinocytes as Suspension in Fibrin Glue]. *Zentralbl Chir* 125, 79-81.
- BARRE-SINOUSSE, F., CHERMANN, J. C., REY, F., NUGEYRE, M. T., CHAMARET, S., GRUEST, J., DAUGUET, C., AXLER-BLIN, C., VEZINET-BRUN, F., ROUZIOUX, C., et al. (1983). Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (Aids). *Science* 220, 868-871.
- BARTOSCH, B., WEISS, R. A., AND TAKEUCHI, Y. (2002). PCR-Based Cloning and Immunocytological Titration of Infectious Porcine Endogenous Retrovirus Subgroup a and B. *J Gen Virol* 83, 2231-2240.
- BARTOSCH, B., STEFANIDIS, D., MYERS, R., WEISS, R., PATIENCE, C., AND TAKEUCHI, Y. (2004). Evidence and Consequence of Porcine Endogenous Retrovirus Recombination. *J Virol* 78, 13880-13890.
- BAS, A., FORSBERG, G., HAMMARSTROM, S., AND HAMMARSTROM, M. L. (2004). Utility of the Housekeeping Genes 18s rRNA, Beta-Actin and Glycerinaldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase for Normalization in Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Human T Lymphocytes. *Scand J Immunol* 59, 566-573.
- BATTINI, J. L., KAYMAN, S. C., PINTER, A., HEARD, J. M., AND DANOS, O. (1994). Role of N-Linked Glycosylation in the Activity of the Friend Murine Leukemia Virus Su Protein Receptor-Binding Domain. *Virology* 202, 496-499.
- BESSIS, D., MOLES, J. P., BASSET-SEGUIN, N., TESNIERE, A., ARPIN, C., AND GUILHOU, J. J. (2004). Differential Expression of a Human Endogenous Retrovirus E Transmembrane Envelope Glycoprotein in Normal, Psoriatic and Atopic Dermatitis Human Skin. *Br J Dermatol* 151, 737-745.
- BILLY, E., BRONDANI, V., ZHANG, H., MULLER, U., AND FILIPOWICZ, W. (2001). Specific Interference with Gene Expression Induced by Long, Double-Stranded RNA in Mouse Embryonal Teratocarcinoma Cell Lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14428-14433. Epub 2001 Nov.
- BLUSCH, J. H., PATIENCE, C., TAKEUCHI, Y., TEMPLIN, C., ROOS, C., VON DER HELM, K., STEINHOFF, G., AND MARTIN, U. (2000). Infection of Nonhuman Primate Cells by Pig Endogenous Retrovirus. *J Virol* 74, 7687-7690.

- BOESE, A., SAUTER, M., GALLI, U., BEST, B., HERBST, H., MAYER, J., KREMMER, E., ROEMER, K., AND MUELLER-LANTZSCH, N. (2000). Human Endogenous Retrovirus Protein Corf Supports Cell Transformation and Associates with the Promyelocytic Leukemia Zinc Finger Protein. *Oncogene* 19, 4328-4336.
- BORIE, D. C., CRAMER, D. V., PHAN-THANH, L., VAILLANT, J. C., BEQUET, J. L., MAKOWKA, L., AND HANNOUN, L. (1998). Microbiological Hazards Related to Xenotransplantation of Porcine Organs into Man. *Infect Control HospEpidemiol* 19, 355-365.
- BOSCH, S., ARNAULD, C., AND JESTIN, A. (2000). Study of Full-Length Porcine Endogenous Retrovirus Genomes with Envelope Gene Polymorphism in a Specific-Pathogen-Free Large White Swine Herd. *J Virol* 74, 8575-8581.
- BOUILLANT, A. M., DULAC, G. C., WILLIS, N., GIRARD, A., GREIG, A. S., AND BOULANGER, P. (1975a). Viral Susceptibility of a Cell Line Derived from the Pig Oviduct. *Can J Comp Med* 39, 450-456.
- BOUILLANT, A. M., GENEST, P., AND GREIG, A. S. (1975b). Growth Characteristics of a Cell Line Derived from the Pig Oviduct. *Can J Microbiol* 21, 2094-2097.
- BOUILLANT, A. M., AND GREIG, A. S. (1975c). Type C Virus Production by a Continuous Line of Pig Oviduct Cells (Pft). *J Gen Virol* 27, 173-180.
- BOWER, J. F., LI, Y., WYATT, R., AND ROSS, T. M. (2006). HIV-1 Envgp140 Trimers Elicit Neutralizing Antibodies without Efficient Induction of Conformational Antibodies. *Vaccine* 24, 5442-5451. Epub 2006 Apr.
- BOWMAN, K. W., AND RICHARD, S. A. (2003). Culture, Brain Death, and Transplantation. *Prog Transplant* 13, 211-215; quiz 216-217.
- BRADFORD, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- BREESE, S. S., JR. (1970). Virus-Like Particles Occurring in Cultures of Stable Pig Kidney Cell Lines. Brief Report. *Arch Gesamte Virusforsch* 30, 401-404.
- BROUARD, S., GAGNE, K., BLANCHO, G., AND SOULILLOU, J. P. (1999). T Cell Response in Xenorecognition and Xenografts: A Review. *Hum Immunol* 60, 455-468.
- BRUMMELKAMP, T. R., BERNARDS, R., AND AGAMI, R. (2002). A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. *Science* 296, 550-553. Epub 2002 Mar.
- BUETTNER, M., WANKE, R., OBERMANN, B., 1991. Natural killer (NK) cell activity of porcine blood lymphocytes against allogeneic melanoma target cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 29, 89-103
- BUSCHER, K., TREFZER, U., HOFMANN, M., STERRY, W., KURTH, R., AND DENNER, J. (2005). Expression of Human Endogenous Retrovirus K in Melanomas and Melanoma Cell Lines. *Cancer Res* 65, 4172-4180.
- BUSCHER, K. (2006). Expression und biologische Funktion von humanen endogenen Retroviren (HERVs), insbesondere von HERV-K. Dissertation. Humboldt Universität zu Berlin.
- BUSTIN, S. A. (2000). Absolute Quantification of mRNA Using Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays. *J Mol Endocrinol* 25, 169-193.
- BUSTIN, S. A. (2002). Quantification of mRNA Using Real-Time Reverse Transcription PCR (RT-PCR): Trends and Problems. *J Mol Endocrinol* 29, 23-39.
- BYRNE, G. W., MCCURRY, K. R., MARTIN, M. J., MCCLELLAN, S. M., PLATT, J. L., AND LOGAN, J. S. (1997). Transgenic Pigs Expressing Human CD59 and Decay-Accelerating Factor Produce an Intrinsic Barrier to Complement-Mediated Damage. *Transplantation* 63, 149-155.
- CAI, J., ZHAO, Y., LIU, Y., YE, F., SONG, Z., QIN, H., MENG, S., CHEN, Y., ZHOU, R., SONG, X., et al. (2007). Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Functional Hepatic Cells. *Hepatology* 45, 1229-1239.
- CAPLEN, N. J., PARRISH, S., IMANI, F., FIRE, A., AND MORGAN, R. A. (2001). Specific Inhibition of Gene Expression by Small Double-Stranded RNAs in Invertebrate and Vertebrate Systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9742-9747. Epub 2001 Jul.
- CARMELL, M. A., ZHANG, L., CONKLIN, D. S., HANNON, G. J., AND ROSENQUIST, T. A. (2003). Germline Transmission of RNAi in Mice. *Nat Struct Biol* 10, 91-92.
- CHACKERIAN, B., RUDENSEY, L. M., AND OVERBAUGH, J. (1997). Specific N-Linked and O-Linked Glycosylation Modifications in the Envelope V1 Domain of Simian Immunodeficiency Virus Variants That Evolve in the Host Alter Recognition by Neutralizing Antibodies. *J Virol* 71, 7719-7727.
- CHEN, C. C., KO, T. M., MA, H. I., WU, H. L., XIAO, X., LI, J., CHANG, C. M., WU, P. Y., CHEN, C. H., HAN, J. M., et al. (2007). Long-Term Inhibition of Hepatitis B Virus in Transgenic Mice by Double-Stranded Adeno-Associated Virus 8-Delivered Short Hairpin RNA. *Gene Ther* 14, 11-19. Epub 2006 Aug .

- CHESTER, N., AND MARSHAK, D. R. (1993). Dimethyl Sulfoxide-Mediated Primer Tm Reduction: A Method for Analyzing the Role of Renaturation Temperature in the Polymerase Chain Reaction. *Anal Biochem* 209, 284-290.
- CHIANG, C. Y., PAN, Y. R., CHOU, L. F., FANG, C. Y., WANG, S. R., YANG, C. Y., AND CHANG, H. Y. (2007). Functional Epitopes on Porcine Endogenous Retrovirus Envelope Protein Interacting with Neutralizing Antibody Combining Sites. *Virology* 9, 9.
- CHIEN, A., EDGAR, D. B., AND TRELA, J. M. (1976). Deoxyribonucleic Acid Polymerase from the Extreme Thermophile *Thermus Aquaticus*. *J Bacteriol* 127, 1550-1557.
- CHRISTENSEN, H. S., DAHER, A., SOYE, K. J., FRANKEL, L. B., ALEXANDER, M. R., LAINE, S., BANNWARTH, S., ONG, C. L., CHUNG, S. W., CAMPBELL, S. M., et al. (2007). Small Interfering Rnas against the Tar RNA Binding Protein, Trbp, a Dicer Cofactor, Inhibit Human Immunodeficiency Virus Type 1 Long Terminal Repeat Expression and Viral Production. *J Virol* 81, 5121-5131. Epub 2007 Mar.
- CHRISTENSEN, T. (2005). Association of Human Endogenous Retroviruses with Multiple Sclerosis and Possible Interactions with Herpes Viruses. *Rev Med Virol* 15, 179-211.
- CHUA, K. B. (2003). Nipah Virus Outbreak in Malaysia. *J Clin Virol* 26, 265-275.
- CHUA, K. B., BELLINI, W. J., ROTA, P. A., HARCOURT, B. H., TAMIN, A., LAM, S. K., KSIAZEK, T. G., ROLLIN, P. E., ZAKI, S. R., SHIEH, W., et al. (2000). Nipah Virus: A Recently Emergent Deadly Paramyxovirus. *Science* 288, 1432-1435.
- CLARK, A. J., BISSINGER, P., BULLOCK, D. W., DAMAK, S., WALLACE, R., WHITELAW, C. B., AND YULL, F. (1994). Chromosomal Position Effects and the Modulation of Transgene Expression. *Reprod Fertil Dev* 6, 589-598.
- CLEMENCEAU, B., LALAIN, S., MARTIGNAT, L., AND SAI, P. (1999). Porcine Endogenous Retroviral mRNAs in Pancreas and a Panel of Tissues from Specific Pathogen-Free Pigs. *Diabetes Metab* 25, 518-525.
- COBURN, G. A., AND CULLEN, B. R. (2002). Potent and Specific Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication by RNA Interference. *J Virol* 76, 9225-9231.
- COFFIN, M., HUGHES, J.H., VARMUS, E.H. (1997) Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press. E-print. Cohen, S. N., Chang, A. C., and Hsu, L. (1972). Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia Coli* by R-Factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 2110-2114.
- COOPER, D. K. (1996). Xenotransplantation--State of the Art. *Front Biosci* 1, d248-265.
- COOPER, D. K. (2003). Clinical Xenotransplantation--How Close Are We? *Lancet* 362, 557-559.
- CZAUDERNA, F., FISCHER, N., BOLLER, K., KURTH, R., AND TONJES, R. R. (2000). Establishment and Characterization of Molecular Clones of Porcine Endogenous Retroviruses Replicating on Human Cells. *J Virol* 74, 4028-4038.
- DAI, Y., VAUGHT, T. D., BOONE, J., CHEN, S. H., PHELPS, C. J., BALL, S., MONAHAN, J. A., JOBST, P. M., MCCREATH, K. J., LAMBORN, A. E., et al. (2002). Targeted Disruption of the Alpha1,3-Galactosyltransferase Gene in Cloned Pigs. *Nat Biotechnol* 20, 251-255.
- DE VITO DABBS, A., DAUBER, J. H., AND HOFFMAN, L. A. (2000). Rejection after Organ Transplantation: A Historical Review. *Am J Crit Care* 9, 419-429.
- DELAMARTER, J. F., MONCKTON, R. P., AND MORONI, C. (1981). Transcriptional Control of Endogenous Virus Genes in Murine Lymphocytes. *J Gen Virol* 52, 371-375.
- DENG, Y. M., TUCH, B. E., AND RAWLINSON, W. D. (2000). Transmission of Porcine Endogenous Retroviruses in Severe Combined Immunodeficient Mice Xenotransplanted with Fetal Porcine Pancreatic Cells. *Transplantation* 70, 1010-1016.
- DENNER, J. (1998). Immunosuppression by Retroviruses: Implications for Xenotransplantation. *Ann N Y Acad Sci* 862, 75-86.
- DENNER, J. (2000). How Does HIV Induce Aids? The Virus Protein Hypothesis. *J Hum Virol* 3, 81-82.
- DENNER, J. (2003b). Porcine Endogenous Retroviruses (PERVs) and Xenotransplantation: Screening for Transmission in Several Clinical Trials and in Experimental Models Using Non-Human Primates. *Ann Transplant* 8, 39-48.
- DENNER, J., AND DORFMAN, N. A. (1977). Small Virus-Like Particles in Leukosis-Like Syndrome Induced by Certain Antigens and Immunostimulators. *Acta Biol Med Ger* 36, 1451-1458.

- DENNER, J., SPECKE, V., SCHWENDEMANN, J., AND TACKE, S. J. (2001). Porcine Endogenous Retroviruses (PERVs): Adaptation to Human Cells and Attempts to Infect Small Animals and Non-Human Primates. *Ann Transplant* 6, 25-33.
- DENNER, J., SPECKE, V., THIESEN, U., KARLAS, A., AND KURTH, R. (2003a). Genetic Alterations of the Long Terminal Repeat of an Ecotropic Porcine Endogenous Retrovirus During Passage in Human Cells. *Virology* 314, 125-133.
- DIECKHOFF, B., KARLAS, A., HOFMANN, A., KUES, W. A., PETERSEN, B., PFEIFER, A., NIEMANN, H., KURTH, R., AND DENNER, J. (2007a). Inhibition of Porcine Endogenous Retroviruses (PERVs) in Primary Porcine Cells by RNA Interference Using Lentiviral Vectors. *Arch Virol* 152, 629-634. Epub 2006 Nov.
- DIECKHOFF, B., PUHLMANN, J., BUSCHER, K., HAFNER-MARX, A., HERBACH, N., BANNERT, N., BUTTNER, M., WANKE, R., KURTH, R., AND DENNER, J. (2007b). Expression of Porcine Endogenous Retroviruses (PERVs) in Melanomas of Munich Miniature Swine (MMS) Trol. *Vet Microbiol* 27, 27.
- DORLING, A. (2002). Clinical Xenotransplantation: Pigs Might Fly? *Am J Transplant* 2, 695-700.
- DUESBERG, P. H., AND VOGT, P. K. (1970). Differences between the Ribonucleic Acids of Transforming and Nontransforming Avian Tumor Viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 67, 1673-1680.
- DUFOUR, V., ARNAULD, C., LANTZ, O., PEGUILLET, I., MORVILLIERS, K., EMMANUEL, A., AND JESTIN, A. (1999). Quantification of Porcine Cytokine Gene Expression Using RT-PCR, a Homologous Internal Control and Chemiluminescence for Microplate Detection. *J Immunol Methods* 229, 49-60.
- DUMMER, W., BECKER, J. C., SCHWAAF, A., LEVERKUS, M., MOLL, T., AND BROCKER, E. B. (1995). Elevated Serum Levels of Interleukin-10 in Patients with Metastatic Malignant Melanoma. *Melanoma Res* 5, 67-68.
- DUVIGNEAU, J. C., HARTL, R. T., GROISS, S., AND GEMEINER, M. (2005). Quantitative Simultaneous Multiplex Real-Time PCR for the Detection of Porcine Cytokines. *J Immunol Methods* 306, 16-27. Epub 2005 Sep.
- EHLERS, B., ULRICH, S., AND GOLTZ, M. (1999). Detection of Two Novel Porcine Herpesviruses with High Similarity to Gammaherpesviruses. *J Gen Virol* 80, 971-978.
- EINFELD, D., AND HUNTER, E. (1988). Oligomeric Structure of a Prototype Retrovirus Glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8688-8692.
- ELBASHIR, S. M., HARBORTH, J., LENDECKEL, W., YALCIN, A., WEBER, K., AND TUSCHL, T. (2001a). Duplexes of 21-Nucleotide RNAs Mediate RNA Interference in Cultured Mammalian Cells. *Nature* 411, 494-498.
- ELBASHIR, S. M., LENDECKEL, W., AND TUSCHL, T. (2001b). RNA Interference Is Mediated by 21- and 22-Nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200.
- ELBASHIR, S. M., MARTINEZ, J., PATKANIOWSKA, A., LENDECKEL, W., AND TUSCHL, T. (2001c). Functional Anatomy of siRNAs for Mediating Efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* Embryo Lysate. *Embo J* 20, 6877-6888.
- ELLIOTT, R. B., ESCOBAR, L., GARKAVENKO, O., CROXSON, M. C., SCHROEDER, B. A., MCGREGOR, M., FERGUSON, G., BECKMAN, N., AND FERGUSON, S. (2000). No Evidence of Infection with Porcine Endogenous Retrovirus in Recipients of Encapsulated Porcine Islet Xenografts. *Cell Transplant* 9, 895-901.
- ELLIOTT, R. B., ESCOBAR, L., TAN, P. L., GARKAVENKO, O., CALAFIORE, R., BASTA, P., VASCONCELLOS, A. V., EMERICH, D. F., THANOS, C., AND BAMBRA, C. (2005). Intraperitoneal Alginate-Encapsulated Neonatal Porcine Islets in a Placebo-Controlled Study with 16 Diabetic Cynomolgus Primates. *Transplant Proc* 37, 3505-3508.
- ELLIOTT, R. B., GARKAVENKO, O., ESCOBAR, L., AND SKINNER, S. (2002). Concerns Expressed About the Virological Risks of Xenotransplantation. *Xenotransplantation* 9, 422-424.
- ERICSSON, T., OLDMIXON, B., BLOMBERG, J., ROSA, M., PATIENCE, C., AND ANDERSSON, G. (2001). Identification of Novel Porcine Endogenous Betaretrovirus Sequences in Miniature Swine. *J Virol* 75, 2765-2770.
- ERICSSON, T. A., TAKEUCHI, Y., TEMPLIN, C., QUINN, G., FARHADIAN, S. F., WOOD, J. C., OLDMIXON, B. A., SULING, K. M., ISHII, J. K., KITAGAWA, Y., et al. (2003). Identification of Receptors for Pig Endogenous Retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6759-6764. Epub 2003 May.
- FECHNER, H., PINKERT, S., WANG, X., SIPO, I., SUCKAU, L., KURRECK, J., DORNER, A., SOLLERBRANT, K., ZEICHHARDT, H., GRUNERT, H. P., et al. (2007). Coxsackievirus B3 and Adenovirus Infections of Cardiac Cells Are Efficiently Inhibited by Vector-Mediated RNA Interference Targeting Their Common Receptor. *Gene Ther* 22, 22.
- FENAUX, M., HALBUR, P. G., GILL, M., TOTH, T. E., AND MENG, X. J. (2000). Genetic Characterization of Type 2 Porcine Circovirus (PCV-2) from Pigs with Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome in Different Geographic Regions of North America and Development of a Differential PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay to Detect and Differentiate between Infections with PCV-1 and PCV-2. *J Clin Microbiol* 38, 2494-2503.

- FEROZE-MERZOUG, F., BERQUIN, I. M., DEY, J., AND CHEN, Y. Q. (2002). Peptidylprolyl Isomerase a (Ppia) as a Preferred Internal Control over Gapdh and Beta-Actin in Quantitative RNA Analyses. *Biotechniques* 32, 776-778, 780, 782.
- FIEBIG, U., STEPHAN, O., KURTH, R., AND DENNER, J. (2003). Neutralizing Antibodies against Conserved Domains of P15e of Porcine Endogenous Retroviruses: Basis for a Vaccine for Xenotransplantation? *Virology* 307, 406-413.
- FIEBIG, U., HARTMANN, M. G., BANNERT, N., KURTH, R., AND DENNER, J. (2006). Transspecies Transmission of the Endogenous Koala Retrovirus. *J Virol* 80, 5651-5654.
- FIEBIG, U. (2007). Induktion neutralisierender Antikörper gegen transmembrane Hüllproteine von Retroviren. Dissertation. Humboldt Universität zu Berlin.
- FINK, J. S., SCHUMACHER, J. M., ELLIAS, S. L., PALMER, E. P., SAINT-HILAIRE, M., SHANNON, K., PENN, R., STARR, P., VANHORNE, C., KOTT, H. S., et al. (2000). Porcine Xenografts in Parkinson's Disease and Huntington's Disease Patients: Preliminary Results. *Cell Transplant* 9, 273-278.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E., AND MELLO, C. C. (1998). Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- FISCHER, N., KRACH, U., NIEBERT, M., AND TONJES, R. R. (2003). Detection of Porcine Endogenous Retrovirus (PERV) Using Highly Specific Antisera against Gag and Env. *Virology* 311, 222-228.
- FISHMAN, J. A. (1997). Xenosis and Xenotransplantation: Addressing the Infectious Risks Posed by an Emerging Technology. *Kidney Int Suppl* 58, S41-45.
- FLOCKERZI, A., BURKHARDT, S., SCHEMPF, W., MEESE, E., AND MAYER, J. (2005). Human Endogenous Retrovirus Herv-K14 Families: Status, Variants, Evolution, and Mobilization of Other Cellular Sequences. *J Virol* 79, 2941-2949.
- FLORY, E., KUNZ, M., SCHELLER, C., JASSOY, C., STAUBER, R., RAPP, U. R., AND LUDWIG, S. (2000). Influenza Virus-Induced Nf-Kappab-Dependent Gene Expression Is Mediated by Overexpression of Viral Proteins and Involves Oxidative Radicals and Activation of Ikappab Kinase. *J Biol Chem* 275, 8307-8314.
- FOLLENZI, A., AILLES, L. E., BAKOVIC, S., GEUNA, M., AND NALDINI, L. (2000). Gene Transfer by Lentiviral Vectors Is Limited by Nuclear Translocation and Rescued by HIV-1 Pol Sequences. *Nat Genet* 25, 217-222.
- FOSS, D. L., BAARSCH, M. J., AND MURTAUGH, M. P. (1998). Regulation of Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and Beta-Actin mRNA Expression in Porcine Immune Cells and Tissues. *Anim Biotechnol* 9, 67-78.
- FRANK, O., JONES-BRANDO, L., LEIB-MOSCH, C., YOLKEN, R., AND SEIFARTH, W. (2006). Altered Transcriptional Activity of Human Endogenous Retroviruses in Neuroepithelial Cells after Infection with *Toxoplasma Gondii*. *J Infect Dis* 194, 1447-1449. Epub 2006 Oct.
- FRAZIER, M. E. (1985). Evidence for Retrovirus in Miniature Swine with Radiation-Induced Leukemia or Metaplasia. *Arch Virol* 83, 83-97.
- FUJITA, F., YAMASHITA-FUTSUKI, I., EGUCHI, S., KAMOHARA, Y., FUJIOKA, H., YANAGA, K., FURUI, J., MORIUCHI, R., KANEMATSU, T., AND KATAMINE, S. (2003). Inactivation of Porcine Endogenous Retrovirus by Human Serum as a Function of Complement Activated through the Classical Pathway. *Hepato Res* 26, 106-113.
- FYNAN, E. F., WEBSTER, R. G., FULLER, D. H., HAYNES, J. R., SANTORO, J. C., AND ROBINSON, H. L. (1995). DNA Vaccines: A Novel Approach to Immunization. *Int J Immunopharmacol* 17, 79-83.
- GAO, F., BAILES, E., ROBERTSON, D. L., CHEN, Y., RODENBURG, C. M., MICHAEL, S. F., CUMMINS, L. B., ARTHUR, L. O., PEETERS, M., SHAW, G. M., et al. (1999). Origin of HIV-1 in the Chimpanzee *Pan Troglodytes Troglodytes*. *Nature* 397, 436-441.
- GARKAVENKO, O., CROXSON, M. C., IRGANG, M., KARLAS, A., DENNER, J., AND ELLIOTT, R. B. (2004). Monitoring for Presence of Potentially Xenotic Viruses in Recipients of Pig Islet Xenotransplantation. *J Clin Microbiol* 42, 5353-5356.
- GAZZINELLI, R. T., SHER, A., CHEEVER, A., GERSTBERGER, S., MARTIN, M. A., AND DICKIE, P. (1996). Infection of Human Immunodeficiency Virus 1 Transgenic Mice with *Toxoplasma Gondii* Stimulates Proviral Transcription in Macrophages in Vivo. *J Exp Med* 183, 1645-1655.
- GIULIETTI, A., OVERBERGH, L., VALCKX, D., DECALONNE, B., BOUILLON, R., AND MATHIEU, C. (2001). An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Methods* 25, 386-401.
- GOTZINGER, N., SAUTER, M., ROEMER, K., AND MUELLER-LANTZSCH, N. (1996). Regulation of Human Endogenous Retrovirus-K Gag Expression in Teratocarcinoma Cell Lines and Human Tumours. *J Gen Virol* 77, 2983-2990.



- GRIMM, T. A., BEER, B. E., HIRSCH, V. M., AND CLOUSE, K. A. (2003). Simian Immunodeficiency Viruses from Multiple Lineages Infect Human Macrophages: Implications for Cross-Species Transmission. *J Acquir Immune Defic Syndr* 32, 362-369.
- GRUNDNER, C., LI, Y., LOUDER, M., MASCOLA, J., YANG, X., SODROSKI, J., AND WYATT, R. (2005). Analysis of the Neutralizing Antibody Response Elicited in Rabbits by Repeated Inoculation with Trimeric HIV-1 Envelope Glycoproteins. *Virology* 331, 33-46.
- GUO, J., CHENG, L., WEN, D. R., HUANG, R. R., AND COCHRAN, A. J. (1998). Detection of Tyrosinase mRNA in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Archival Sections of Melanoma, Using the Reverse Transcriptase in Situ Polymerase Chain Reaction. *Diagn Mol Pathol* 7, 10-15.
- HAMALAINEN, H. K., TUBMAN, J. C., VIKMAN, S., KYROLA, T., YLIKOSKI, E., WARRINGTON, J. A., AND LAHESMAA, R. (2001). Identification and Validation of Endogenous Reference Genes for Expression Profiling of T Helper Cell Differentiation by Quantitative Real-Time RT-PCR. *Anal Biochem* 299, 63-70.
- HAMMOND, S. M., CAUDY, A. A., AND HANNON, G. J. (2001). Post-Transcriptional Gene Silencing by Double-Stranded RNA. *Nat Rev Genet* 2, 110-119.
- HANAHAH, D. (1983). Studies on Transformation of Escherichia Coli with Plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- HANGER, J. J., BROMHAM, L. D., MCKEE, J. J., O'BRIEN, T. M., AND ROBINSON, W. F. (2000). The Nucleotide Sequence of Koala (*Phascolarctos Cinereus*) Retrovirus: A Novel Type C Endogenous Virus Related to Gibbon Ape Leukemia Virus. *J Virol* 74, 4264-4272.
- HANNON, G. J., CHUBB, A., MARONEY, P. A., HANNON, G., ALTMAN, S., AND NILSEN, T. W. (1991). Multiple Cis-Acting Elements Are Required for RNA Polymerase Iii Transcription of the Gene Encoding H1 RNA, the RNA Component of Human RNase P. *J Biol Chem* 266, 22796-22799.
- HANNON, J. P., BOSSONE, C. A., AND WADE, C. E. (1990). Normal Physiological Values for Conscious Pigs Used in Biomedical Research. *Lab Anim Sci* 40, 293-298.
- HANSSON, M., TONNING, A., FRANDBEN, U., PETRI, A., RAJAGOPAL, J., ENGLUND, M. C., HELLER, R. S., HAKANSSON, J., FLECKNER, J., SKOLD, H. N., et al. (2004). Artificial Insulin Release from Differentiated Embryonic Stem Cells. *Diabetes* 53, 2603-2609.
- HARRISON, I., TAKEUCHI, Y., BARTOSCH, B., AND STOYE, J. P. (2004). Determinants of High Titer in Recombinant Porcine Endogenous Retroviruses. *J Virol* 78, 13871-13879.
- HE, J. Q., MA, Y., LEE, Y., THOMSON, J. A., AND KAMP, T. J. (2003). Human Embryonic Stem Cells Develop into Multiple Types of Cardiac Myocytes: Action Potential Characterization. *Circ Res* 93, 32-39. Epub 2003 Jun.
- HENEINE, W., TIBELL, A., SWITZER, W. M., SANDSTROM, P., ROSALES, G. V., MATHEWS, A., KORSGREN, O., CHAPMAN, L. E., FOLKS, T. M., AND GROTH, C. G. (1998). No Evidence of Infection with Porcine Endogenous Retrovirus in Recipients of Porcine Islet-Cell Xenografts. *Lancet* 352, 695-699.
- HERRING, C., CUNNINGHAM, D. A., WHITTAM, A. J., FERNANDEZ-SUAREZ, X. M., AND LANGFORD, G. A. (2001a). Monitoring Xenotransplant Recipients for Infection by PERV. *Clin Biochem* 34, 23-27.
- HERRING, C., QUINN, G., BOWER, R., PARSONS, N., LOGAN, N. A., BRAWLEY, A., ELSOME, K., WHITTAM, A., FERNANDEZ-SUAREZ, X. M., CUNNINGHAM, D., et al. (2001b). Mapping Full-Length Porcine Endogenous Retroviruses in a Large White Pig. *J Virol* 75, 12252-12265.
- HIGUCHI, R., DOLLINGER, G., WALSH, P. S., AND GRIFFITH, R. (1992). Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Biotechnology (N Y)* 10, 413-417.
- HIRSCH, M. S., PHILLIPS, S. M., SOLNIK, C., BLACK, P. H., SCHWARTZ, R. S., AND CARPENTER, C. B. (1972). Activation of Leukemia Viruses by Graft-Versus-Host and Mixed Lymphocyte Reactions in Vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 1069-1072.
- HOFMANN-LEHMANN, R., CATTORI, V., TANDON, R., BORETTI, F. S., MELI, M. L., RIOND, B., PEPIN, A. C., WILLI, B., OSSENT, P., AND LUTZ, H. (2006). Vaccination against the Feline Leukaemia Virus: Outcome and Response Categories and Long-Term Follow-Up. *Vaccine* 28, 28.
- HOFMANN, A., KESSLER, B., EWERLING, S., WEPPERT, M., VOGG, B., LUDWIG, H., STOJKOVIC, M., BOELHAUVE, M., BREM, G., WOLF, E., AND PFEIFER, A. (2003). Efficient Transgenesis in Farm Animals by Lentiviral Vectors. *EMBO Rep* 4, 1054-1060. Epub 2003 Oct.
- HOLKER, M., PETERSEN, B., HASSEL, P., KUES, W. A., LEMME, E., LUCAS-HAHN, A., AND NIEMANN, H. (2005). Duration of in Vitro Maturation of Recipient Oocytes Affects Blastocyst Development of Cloned Porcine Embryos. *Cloning Stem Cells* 7, 35-44.
- HUNTER, T., HUNT, T., JACKSON, R. J., AND ROBERTSON, H. D. (1975). The Characteristics of Inhibition of Protein Synthesis by Double-Stranded Ribonucleic Acid in Reticulocyte Lysates. *J Biol Chem* 250, 409-417.

- HUTVAGNER, G., AND ZAMORE, P. D. (2002). RNAi: Nature Abhors a Double-Strand. *Curr Opin Genet Dev* 12, 225-232.
- IRGANG, M., SAUER, I. M., KARLAS, A., ZEILINGER, K., GERLACH, J. C., KURTH, R., NEUHAUS, P., AND DENNER, J. (2003). Porcine Endogenous Retroviruses: No Infection in Patients Treated with a Bioreactor Based on Porcine Liver Cells. In *J Clin Virol*, pp. 141-154.
- JACKSON, A. L., BARTZ, S. R., SCHELTER, J., KOBAYASHI, S. V., BURCHARD, J., MAO, M., LI, B., CAVET, G., AND LINSLEY, P. S. (2003). Expression Profiling Reveals Off-Target Gene Regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21, 635-637. Epub 2003 May.
- JACKSON, A. L., AND LINSLEY, P. S. (2004). Noise Amidst the Silence: Off-Target Effects of siRNAs? *Trends Genet* 20, 521-524.
- JACQUE, J. M., TRIQUES, K., AND STEVENSON, M. (2002). Modulation of HIV-1 Replication by RNA Interference. *Nature* 418, 435-438. Epub 2002 Jun.
- JARRETT, O., AND GANIERE, J. P. (1996). Comparative Studies of the Efficacy of a Recombinant Feline Leukaemia Virus Vaccine. *Vet Rec* 138, 7-11.
- JECHLINGER, W. (2006). Optimization and Delivery of Plasmid DNA for Vaccination. *Expert Rev Vaccines* 5, 803-825.
- JIN, H., INOSHIMA, Y., WU, D., MOROOKA, A., AND SENTSUI, H. (2000). Expression of Porcine Endogenous Retrovirus in Peripheral Blood Leukocytes from Ten Different Breeds. *Transpl Infect Dis* 2, 11-14.
- KACHKO, A. V., IVANOVA, A. V., PROTOPOPOVA, E. V., NETESOV, V., AND LOKTEV, V. B. (2006). Inhibition of West Nile Virus Replication by Short Interfering RNAs. *Dokl Biochem Biophys* 410, 260-262.
- KAEFFER, B., BOTTREAU, E., PHAN THANH, L., OLIVIER, M., AND SALMON, H. (1990). Histocompatible Miniature, Boar Model: Selection of Transformed Cell Lines of B and T Lineages Producing Retrovirus. *Int J Cancer* 46, 481-488.
- KALYANARAMAN, V. S., SARNGADHARAN, M. G., ROBERT-GUROFF, M., MIYOSHI, I., GOLDE, D., AND GALLO, R. C. (1982). A New Subtype of Human T-Cell Leukemia Virus (HTLV-II) Associated with a T-Cell Variant of Hairy Cell Leukemia. *Science* 218, 571-573.
- KARLAS, A., KURTH, R., AND DENNER, J. (2004). Inhibition of Porcine Endogenous Retroviruses by RNA Interference: Increasing the Safety of Xenotransplantation. *Virology* 325, 18-23.
- KARLAS, A. (2004) Porcine endogene Retroviren und Xenotransplantation: Evaluierung des Infektionsrisikos und Strategien zur Hemmung der Virusreplikation mittels RNA-Interferenz. Dissertation. Humboldt Universität zu Berlin.
- KAYHAN, H., KARATAYLI, E., TURKYLMAZ, A. R., SAHIN, F., YURDAYDIN, C., AND BOZDAYI, A. M. (2007). Inhibition of Hepatitis B Virus Replication by shRNAs in Stably HBV Expressed Hepg2 2.2.15 Cell Lines. *Arch Virol* 152, 871-879. Epub 2007 Jan.
- KAZAZIAN, H. H., JR. (2004). Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution. *Science* 303, 1626-1632.
- KLEIN, G. (1988). Immunological Aspects of B-Cell Derived Tumors in Humans and Rodents. *Princess Takamatsu Symp* 19, 3-13.
- KLEIN, G. (1988). Immunological Aspects of B-Cell Derived Tumors in Humans and Rodents. *Princess Takamatsu Symp* 19, 3-13.
- LAI, L., AND PRATHER, R. S. (2002). Progress in Producing Knockout Models for Xenotransplantation by Nuclear Transfer. *Ann Med* 34, 501-506.
- LANGHAMMER, S., FIEBIG, U., KURTH, R., AND DENNER, J. (2005). Neutralising Antibodies against the Transmembrane Protein of Feline Leukaemia Virus (Felv). *Vaccine* 23, 3341-3348.
- LANGHAMMER, S., HUBNER, J., KURTH, R., AND DENNER, J. (2006a). Antibodies Neutralizing Feline Leukaemia Virus (Felv) in Cats Immunized with the Transmembrane Envelope Protein P15e. *Immunology* 117, 229-237.
- LANGHAMMER, S. (2006b). Neutralisierende Antikörper gegen die transmembranen Hüllproteine von Retroviren. Dissertation, Freie Universität, Berlin.
- LAVILLETTE, D., AND KABAT, D. (2004). Porcine Endogenous Retroviruses Infect Cells Lacking Cognate Receptors by an Alternative Pathway: Implications for Retrovirus Evolution and Xenotransplantation. *J Virol* 78, 8868-8877.
- LAVON, N., YANUKA, O., AND BENVENISTY, N. (2004). Differentiation and Isolation of Hepatic-Like Cells from Human Embryonic Stem Cells. *Differentiation* 72, 230-238.

- LE TISSIER, P., STOYE, J. P., TAKEUCHI, Y., PATIENCE, C., AND WEISS, R. A. (1997). Two Sets of Human-Tropic Pig Retrovirus. *Nature* 389, 681-682.
- LEDERMAN, D. M., KUNG, R. T., AND MCNAIR, D. S. (2002). Therapeutic Potential of Implantable Replacement Hearts. *Am J Cardiovasc Drugs* 2, 297-301.
- LEDGER, T. N., PINTON, P., BOURGES, D., ROUMI, P., SALMON, H., AND OSWALD, I. P. (2004). Development of a Macroarray to Specifically Analyze Immunological Gene Expression in Swine. *Clin Diagn Lab Immunol* 11, 691-698.
- LEE, J. C., IHLE, J. N., AND HUEBNER, R. (1977). The Humoral Immune Response of Nih Swiss and Swr/J Mice to Vaccination with Formalinized AKR or Gross Murine Leukemia Virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 343-347.
- LEE, J. H., WEBB, G. C., ALLEN, R. D., AND MORAN, C. (2002). Characterizing and Mapping Porcine Endogenous Retroviruses in Westran Pigs. *J Virol* 76, 5548-5556.
- LEE, L. G., CONNELL, C. R., AND BLOCH, W. (1993). Allelic Discrimination by Nick-Translation PCR with Fluorogenic Probes. *Nucleic Acids Res* 21, 3761-3766.
- LETAROV, A. V., LONDER, Y. Y., BOUDKO, S. P., AND MESYANZHINOV, V. V. (1999). The Carboxy-Terminal Domain Initiates Trimerization of Bacteriophage T4 Fibrin. *Biochemistry (Mosc)* 64, 817-823.
- LEVENTHAL, J. R., SAKIYALAK, P., WITSON, J., SIMONE, P., MATAS, A. J., BOLMAN, R. M., AND DALMASSO, A. P. (1994). The Synergistic Effect of Combined Antibody and Complement Depletion on Discordant Cardiac Xenograft Survival in Nonhuman Primates. *Transplantation* 57, 974-978.
- LEVY, M. F., CRIPPIN, J., SUTTON, S., NETTO, G., MCCORMACK, J., CURIEL, T., GOLDSTEIN, R. M., NEWMAN, J. T., GONWA, T. A., BANCHEREAU, J., et al. (2000). Liver Allograft Transplantation 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* 69, 272-280.
- LI, M., HUANG, X., ZHU, Z., AND GORELIK, E. (1999). Sequence and Insertion Sites of Murine Melanoma-Associated Retrovirus. *J Virol* 73, 9178-9186.
- LI, Y., LUO, L., RASOOL, N., AND KANG, C. Y. (1993). Glycosylation Is Necessary for the Correct Folding of Human Immunodeficiency Virus Gp120 in CD4 Binding. *J Virol* 67, 584-588.
- LI, Y., SVEHLA, K., MATHY, N. L., VOSS, G., MASCOLA, J. R., AND WYATT, R. (2006a). Characterization of Antibody Responses Elicited by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Primary Isolate Trimeric and Monomeric Envelope Glycoproteins in Selected Adjuvants. *J Virol* 80, 1414-1426.
- LI, Z., PING, Y., SHENGFU, L., YOUPIG, L., JINGQIU, C., AND HONG, B. (2006b). In Vivo Screening of Porcine Endogenous Retrovirus in Chinese Banna Minipig Inbred. *Transplant Proc* 38, 2261-2263.
- LI, Z., PING, Y., SHENGFU, L., YOUPIG, L., JINGQIU, C., AND HONG, B. (2006c). The Lack of Inhibition of Porcine Endogenous Retrovirus by Small Interference RNA Designed from the Long Terminal Regions. *Transplant Proc* 38, 2258-2260.
- LIVAK, K. J., AND SCHMITTGEN, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods* 25, 402-408.
- LOSS, M., ARENDS, H., WINKLER, M., PRZEMECK, M., STEINHOFF, G., RENSING, S., KAUP, F. J., HEDRICH, H. J., WINKLER, M. E., AND MARTIN, U. (2001). Analysis of Potential Porcine Endogenous Retrovirus (PERV) Transmission in a Whole-Organ Xenotransplantation Model without Interfering Microchimerism. *Transpl Int* 14, 31-37.
- LOWER, R., TONJES, R. R., KORBMACHER, C., KURTH, R., AND LOWER, J. (1995). Identification of a Rev-Related Protein by Analysis of Spliced Transcripts of the Human Endogenous Retroviruses Htdv/Herv-K. *J Virol* 69, 141-149.
- MAGIN, C., HESSE, J., LOWER, J., AND LOWER, R. (2000). Corf, the Rev/Rex Homologue of HTDV/HERV-K, Encodes an Arginine-Rich Nuclear Localization Signal That Exerts a Trans-Dominant Phenotype When Mutated. *Virology* 274, 11-16.
- MAKOWKA, L., WU, G. D., HOFFMAN, A., PODESTA, L., SHER, L., TUSO, P. J., BREDI, M., CHAPMAN, F. A., COSENZA, C., YASUNAGA, C., and et al. (1994). Immunohistopathologic Lesions Associated with the Rejection of a Pig-to-Human Liver Xenograft. *Transplant Proc* 26, 1074-1075.
- MANG, R., MAAS, J., CHEN, X., GOUDSMIT, J., AND VAN DER KUYL, A. C. (2001). Identification of a Novel Type C Porcine Endogenous Retrovirus: Evidence That Copy Number of Endogenous Retroviruses Increases During Host Inbreeding. *J Gen Virol* 82, 1829-1834.
- MANGENEY, M., POTLICHET, J., RENARD, M., DUCOS, B., AND HEIDMANN, T. (2005). Endogenous Retrovirus Expression Is Required for Murine Melanoma Tumor Growth in Vivo. *Cancer Res* 65, 2588-2591.

- MANKERTZ, A., HATTERMANN, K., EHLERS, B., AND SOIKE, D. (2000). Cloning and Sequencing of Columbidae Circovirus (Cocv), a New Circovirus from Pigeons. *Arch Virol* 145, 2469-2479.
- MANKERTZ, A., PERSSON, F., MANKERTZ, J., BLAESS, G., AND BUHK, H. J. (1997). Mapping and Characterization of the Origin of DNA Replication of Porcine Circovirus. *J Virol* 71, 2562-2566.
- MARCIANI, D. J., KENSIL, C. R., BELTZ, G. A., HUNG, C. H., CRONIER, J., AND AUBERT, A. (1991). Genetically-Engineered Subunit Vaccine against Feline Leukaemia Virus: Protective Immune Response in Cats. *Vaccine* 9, 89-96.
- MARCUS, P. I. (1983). Interferon Induction by Viruses: One Molecule of dsRNA as the Threshold for Interferon Induction. *Interferon* 5, 115-180.
- MARTIN, J., HERNIOU, E., COOK, J., O'NEILL, R. W., AND TRISTEM, M. (1999b). Interclass Transmission and Phyletic Host Tracking in Murine Leukemia Virus-Related Retroviruses. *J Virol* 73, 2442-2449.
- MARTIN, S. I., WILKINSON, R., AND FISHMAN, J. A. (2006). Genomic Presence of Recombinant Porcine Endogenous Retrovirus in Transmitting Miniature Swine. *Virol J* 3, 91.
- MARTIN, U., KIESSIG, V., BLUSCH, J. H., HAVERICH, A., VON DER HELM, K., HERDEN, T., AND STEINHOFF, G. (1998a). Expression of Pig Endogenous Retrovirus by Primary Porcine Endothelial Cells and Infection of Human Cells. *Lancet* 352, 692-694.
- MARTIN, U., STEINHOFF, G., KIESSIG, V., CHIKOBAVA, M., ANSSAR, M., MORSCHHEUSER, T., LAPIN, B., AND HAVERICH, A. (1998b). Porcine Endogenous Retrovirus (PERV) Was Not Transmitted from Transplanted Porcine Endothelial Cells to Baboons in Vivo. *Transpl Int* 11, 247-251.
- MARTIN, U., TACKE, S. J., SIMON, A. R., SCHRODER, C., WIEBE, K., LAPIN, B., HAVERICH, A., DENNER, J., AND STEINHOFF, G. (2002). Absence of PERV Specific Humoral Immune Response in Baboons after Transplantation of Porcine Cells or Organs. *Transpl Int* 15, 361-368. Epub 2002 Jun.
- MARTIN, U., WINKLER, M. E., ID, M., RADEKE, H., ARSENIYEV, L., TAKEUCHI, Y., SIMON, A. R., PATIENCE, C., HAVERICH, A., AND STEINHOFF, G. (2000). Productive Infection of Primary Human Endothelial Cells by Pig Endogenous Retrovirus (PERV). *Xenotransplantation* 7, 138-142.
- MARTINA, Y., KURIAN, S., CHERQUI, S., EVANOFF, G., WILSON, C., AND SALOMON, D. R. (2005). Pseudotyping of Porcine Endogenous Retrovirus by Xenotropic Murine Leukemia Virus in a Pig Islet Xenotransplantation Model. *Am J Transplant* 5, 1837-1847.
- MARTINA, Y., MARCUCCI, K. T., CHERQUI, S., SZABO, A., DRYSDALE, T., SRINIVASAN, U., WILSON, C. A., PATIENCE, C., AND SALOMON, D. R. (2006). Mice Transgenic for a Human Porcine Endogenous Retrovirus Receptor Are Susceptible to Productive Viral Infection. *J Virol* 80, 3135-3146.
- MATZKE, M., MATZKE, A. J., AND KOOTER, J. M. (2001). RNA: Guiding Gene Silencing. *Science* 293, 1080-1083.
- MCINTYRE, M. C., KANNAN, B., SOLANO-AGUILAR, G. I., WILSON, C. A., AND BLOOM, E. T. (2003). Detection of Porcine Endogenous Retrovirus in Cultures of Freshly Isolated Porcine Bone Marrow Cells. *Xenotransplantation* 10, 337-342.
- MCKEE, J. (2005). Viruses, Koalas and Leukemias. National Wildlife Rehabilitation Conference, University of Queensland.
- MENG, X. J., PURCELL, R. H., HALBUR, P. G., LEHMAN, J. R., WEBB, D. M., TSAREVA, T. S., HAYNES, J. S., THACKER, B. J., AND EMERSON, S. U. (1997). A Novel Virus in Swine Is Closely Related to the Human Hepatitis E Virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9860-9865.
- METTENLEITER, T. C. (1996). Immunobiology of Pseudorabies (Aujeszky's Disease). *Vet Immunol Immunopathol* 54, 221-229.
- MICHAELS, M. G., JENKINS, F. J., ST GEORGE, K., NALESNIK, M. A., STARZL, T. E., AND RINALDO, C. R., JR. (2001). Detection of Infectious Baboon Cytomegalovirus after Baboon-to-Human Liver Xenotransplantation. *J Virol* 75, 2825-2828.
- MIKKERS, H., AND BERNIS, A. (2003). Retroviral Insertional Mutagenesis: Tagging Cancer Pathways. *Adv Cancer Res* 88, 53-99.
- MIYAGAWA, S., NAKATSU, S., NAKAGAWA, T., KONDO, A., MATSUNAMI, K., HAZAMA, K., YAMADA, J., TOMONAGA, K., MIYAZAWA, T., AND SHIRAKURA, R. (2005). Prevention of PERV Infections in Pig to Human Xenotransplantation by the Rna Interference Silences Gene. *J Biochem (Tokyo)* 137, 503-508.
- MIYAGAWA, S., SHIRAKURA, R., IZUTANI, H., MATSUMIYA, G., NAKATA, S., MATSUDA, H., IWATA, K., NAGASAWA, S., TERADO, A., MATSUMOTO, M., and et al. (1994). Effect of Transfectant Molecules, Mpc, Daf, and Mpc/Daf Hybrid on Xenogeneic Vascular Endothelium. *Transplant Proc* 26, 1253-1254.

- MOALIC, Y., BLANCHARD, Y., FELIX, H., AND JESTIN, A. (2006). Porcine Endogenous Retrovirus Integration Sites in the Human Genome: Features in Common with Those of Murine Leukemia Virus. *J Virol* *80*, 10980-10988. Epub 2006 Aug.
- MODROW, S., FALKE, D., TRUYEN, U. (2002). *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2. Auflage.
- MOENNIG, V., FRANK, H., HUNSMANN, G., OHMS, P., SCHWARZ, H., AND SCHAFER, W. (1974). C-Type Particles Produced by a Permanent Cell Line from a Leukemic Pig. II. Physical, Chemical, and Serological Characterization of the Particles. *Virology* *57*, 179-188.
- MUHLEBACH, M. D., SCHMITT, I., STEIDL, S., STITZ, J., SCHWEIZER, M., BLANKENSTEIN, T., CICHUTEK, K., AND UCKERT, W. (2003). Transduction Efficiency of MLV but Not of HIV-1 Vectors Is Pseudotype Dependent on Human Primary T Lymphocytes. *J Mol Med* *81*, 801-810. Epub 2003 Oct.
- MULLENBACH, R., LAGODA, P. J., AND WELTER, C. (1989). An Efficient Salt-Chloroform Extraction of DNA from Blood and Tissues. *Trends Genet* *5*, 391.
- MUMMERY, C., WARD-VAN OOSTWAARD, D., DOEVEDANS, P., SPIJKER, R., VAN DEN BRINK, S., HASSINK, R., VAN DER HEYDEN, M., OPTHOF, T., PERA, M., DE LA RIVIERE, A. B., et al. (2003). Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Cardiomyocytes: Role of Coculture with Visceral Endoderm-Like Cells. *Circulation* *107*, 2733-2740. Epub 2003 May.
- MUSTER, T., WALTENBERGER, A., GRASSAUER, A., HIRSCHL, S., CAUCIG, P., ROMIRER, I., FODINGER, D., SEPPELE, H., SCHANAB, O., MAGIN-LACHMANN, C., et al. (2003). An Endogenous Retrovirus Derived from Human Melanoma Cells. *Cancer Res* *63*, 8735-8741.
- MYSLINSKI, E., AME, J. C., KROL, A., AND CARBON, P. (2001). An Unusually Compact External Promoter for RNA Polymerase Iii Transcription of the Human H1RNA Gene. *Nucleic Acids Res* *29*, 2502-2509.
- NELLAKE, C., YAO, Y., JONES-BRANDO, L., MALLET, F., YOLKEN, R. H., AND KARLSSON, H. (2006). Transactivation of Elements in the Human Endogenous Retrovirus W Family by Viral Infection. *Retrovirology* *3*, 44.
- NEUMANN, H., SCHMIDT, H., CAVALIE, A., JENNE, D., AND WEKERLE, H. (1997). Major Histocompatibility Complex (Mhc) Class I Gene Expression in Single Neurons of the Central Nervous System: Differential Regulation by Interferon (Ifn)-Gamma and Tumor Necrosis Factor (Tnf)-Alpha. *J Exp Med* *185*, 305-316.
- NIEBERT, M., AND TONJES, R. R. (2005). Evolutionary Spread and Recombination of Porcine Endogenous Retroviruses in the Suiformes. *J Virol* *79*, 649-654.
- NIEMANN, H. (2001). Current Status and Perspectives for the Generation of Transgenic Pigs for Xenotransplantation. *Ann Transplant* *6*, 6-9.
- OLDMIXON, B. A., WOOD, J. C., ERICSSON, T. A., WILSON, C. A., WHITE-SCHARF, M. E., ANDERSSON, G., GREENSTEIN, J. L., SCHUURMAN, H. J., AND PATIENCE, C. (2002). Porcine Endogenous Retrovirus Transmission Characteristics of an Inbred Herd of Miniature Swine. *J Virol* *76*, 3045-3048.
- ONIONS, D. E., AND WITT, C. J. (2000). Xenotransplantation: An Overview of Microbiological Risks and Potentials for Risk Management. *Rev Sci Tech* *19*, 289-301.
- OOSTENDORP, R. A., MEIJER, C. J., AND SCHEPER, R. J. (1993). Immunosuppression by Retroviral-Envelope-Related Proteins, and Their Role in Non-Retroviral Human Disease. *Crit Rev Oncol Hematol* *14*, 189-206.
- PADDISON, P. J., CAUDY, A. A., AND HANNON, G. J. (2002). Stable Suppression of Gene Expression by RNAi in Mammalian Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 1443-1448. Epub 2002 Jan.
- PARADIS, K., LANGFORD, G., LONG, Z., HENEINE, W., SANDSTROM, P., SWITZER, W. M., CHAPMAN, L. E., LOCKEY, C., ONIONS, D., AND OTTO, E. (1999). Search for Cross-Species Transmission of Porcine Endogenous Retrovirus in Patients Treated with Living Pig Tissue. The Xen 111 Study Group. *Science* *285*, 1236-1241.
- PATIENCE, C., SWITZER, W. M., TAKEUCHI, Y., GRIFFITHS, D. J., GOWARD, M. E., HENEINE, W., STOYE, J. P., AND WEISS, R. A. (2001). Multiple Groups of Novel Retroviral Genomes in Pigs and Related Species. *J Virol* *75*, 2771-2775.
- PATIENCE, C., TAKEUCHI, Y., AND WEISS, R. A. (1997). Infection of Human Cells by an Endogenous Retrovirus of Pigs. *Nat Med* *3*, 282-286.
- PAUL, C. P., GOOD, P. D., WINER, I., AND ENGELKE, D. R. (2002). Effective Expression of Small Interfering RNA in Human Cells. *Nat Biotechnol* *20*, 505-508.
- PAUL, P. S., HALBUR, P., JANKE, B., JOO, H., NAWAGITGUL, P., SINGH, J., AND SORDEN, S. (2003). Exogenous Porcine Viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* *278*, 125-183.

- PEREZ, J., GARCIA, P. M., BAUTISTA, M. J., MILLAN, Y., ORDAS, J., AND MARTIN DE LAS MULAS, J. (2002). Immunohistochemical Characterization of Tumor Cells and Inflammatory Infiltrate Associated with Cutaneous Melanocytic Tumors of Duroc and Iberian Swine. *Vet Pathol* 39, 445-451.
- PEREZ, R. P., ZHANG, P., BOSSERHOFF, A. K., BUETTNER, R., AND ABU-HADID, M. (2000). Expression of Melanoma Inhibitory Activity in Melanoma and Nonmelanoma Tissue Specimens. *Hum Pathol* 31, 1381-1388.
- PERRON, H., LAZARINI, F., RUPRECHT, K., PECHOUX-LONGIN, C., SEILHEAN, D., SAZDOVITCH, V., CREANGE, A., BATTAIL-POIROT, N., SIBAI, G., SANTORO, L., et al. (2005). Human Endogenous Retrovirus (Herv)-W Env and Gag Proteins: Physiological Expression in Human Brain and Pathophysiological Modulation in Multiple Sclerosis Lesions Correlation between Disease Severity and in Vitro Cytokine Production Mediated by MsrV (Multiple Sclerosis Associated Retroviral Element) Envelope Protein in Patients with Multiple Sclerosis. *J Neurovirol* 11, 23-33.
- PERSENGIEV, S. P., ZHU, X., AND GREEN, M. R. (2004). Nonspecific, Concentration-Dependent Stimulation and Repression of Mammalian Gene Expression by Small Interfering RNAs (siRNAs). *RNA* 10, 12-18.
- PETERS, R. L., DONAHOE, R. M., AND KELLOFF, G. J. (1975). Assay in the Mouse for Delayed-Type Hypersensitivity to Murine Leukemia Virus. *J Natl Cancer Inst* 55, 1089-1095.
- PFEIFER, A. (2004). Lentiviral Transgenesis. *Transgenic Res* 13, 513-522.
- PFEIFER, A., IKAWA, M., DAYN, Y., AND VERMA, I. M. (2002). Transgenesis by Lentiviral Vectors: Lack of Gene Silencing in Mammalian Embryonic Stem Cells and Preimplantation Embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2140-2145.
- PHELPS, C. J., KOIKE, C., VAUGHT, T. D., BOONE, J., WELLS, K. D., CHEN, S. H., BALL, S., SPECHT, S. M., POLEJAEVA, I. A., MONAHAN, J. A., et al. (2003). Production of Alpha 1,3-Galactosyltransferase-Deficient Pigs. *Science* 299, 411-414. Epub 2002 Dec.
- PICHON, J. P., BONNAUD, B., CLEUZIAT, P., AND MALLET, F. (2006). Multiplex Degenerate PCR Coupled with an Oligo Sorbent Array for Human Endogenous Retrovirus Expression Profiling. *Nucleic Acids Res* 34, e46.
- PIECHACZYK, M., BLANCHARD, J. M., RIAAD-EL SABOUTY, S., DANI, C., MARTY, L., AND JEANTEUR, P. (1984). Unusual Abundance of Vertebrate 3-Phosphate Dehydrogenase Pseudogenes. *Nature* 312, 469-471.
- POIESZ, B. J., RUSCETTI, F. W., GAZDAR, A. F., BUNN, P. A., MINNA, J. D., AND GALLO, R. C. (1980). 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* 77, 7415-7419.
- POPP, S. K., MANN, D. A., MILBURN, P. J., GIBBS, A. J., MCCULLAGH, P. J., WILSON, J. D., TONJES, R. R., AND SIMEONOVIC, C. J. (2007). Transient Transmission of Porcine Endogenous Retrovirus to Fetal Lambs after Pig Islet Tissue Xenotransplantation. *Immunol Cell Biol* 76, 16.
- POWELL, K. (2004). DNA Vaccines--Back in the Saddle Again? *Nat Biotechnol* 22, 799-801.
- QARI, S. H., MAGRE, S., GARCIA-LERMA, J. G., HUSSAIN, A. I., TAKEUCHI, Y., PATIENCE, C., WEISS, R. A., AND HENEINE, W. (2001). Susceptibility of the Porcine Endogenous Retrovirus to Reverse Transcriptase and Protease Inhibitors. *J Virol* 75, 1048-1053.
- QIAGEN: THE EXPRESSIONIST. (2003) [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins.
- RADHAKRISHNAN, S. K., LAYDEN, T. J., AND GARTEL, A. L. (2004). RNA Interference as a New Strategy against Viral Hepatitis. *Virology* 323, 173-181.
- RAO, M. K., AND WILKINSON, M. F. (2006). Tissue-Specific and Cell Type-Specific RNA Interference in Vivo. *Nat Protoc* 1, 1494-1501.
- REEMTSMA, K., MCCRACKEN, B. H., SCHLEGEL, J. U., AND PEARL, M. (1964). Heterotransplantation of the Kidney: Two Clinical Experiences. *Science* 143, 700-702.
- REINKE, S., KONIGER, P., HERBERTH, G., AUDRING, H., WANG, H., MA, J., GUO, Y., STERRY, W., AND TREFZER, U. (2005). Differential Expression of Mart-1, Tyrosinase, and Sm5-1 in Primary and Metastatic Melanoma. *Am J Dermatopathol* 27, 401-406.
- RITZHAUPT, A., VAN DER LAAN, L. J., SALOMON, D. R., AND WILSON, C. A. (2002). Porcine Endogenous Retrovirus Infects but Does Not Replicate in Nonhuman Primate Primary Cells and Cell Lines. *J Virol* 76, 11312-11320.
- ROSENGARD, A. M., CARY, N. R., LANGFORD, G. A., TUCKER, A. W., WALLWORK, J., AND WHITE, D. J. (1995). Tissue Expression of Human Complement Inhibitor, Decay-Accelerating Factor, in Transgenic Pigs. A Potential Approach for Preventing Xenograft Rejection. *Transplantation* 59, 1325-1333.

- ROVIRA, A., BALASCH, M., SEGALES, J., GARCIA, L., PLANA-DURAN, J., ROSELL, C., ELLERBROK, H., MANKERTZ, A., AND DOMINGO, M. (2002). Experimental Inoculation of Conventional Pigs with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Porcine Circovirus 2. *J Virol* *76*, 3232-3239.
- RUPRECHT, K., OBOJES, K., WENGEL, V., GRONEN, F., KIM, K. S., PERRON, H., SCHNEIDER-SCHAULIES, J., AND RIECKMANN, P. (2006). Regulation of Human Endogenous Retrovirus W Protein Expression by Herpes Simplex Virus Type 1: Implications for Multiple Sclerosis. *J Neurovirol* *12*, 65-71.
- SACCO, R. E., NIBBELINK, S. K., BAARSCH, M. J., MURTAUGH, M. P., AND WANNEMUEHLER, M. J. (1996). Induction of Interleukin (II)-1beta and II-8 mRNA Expression in Porcine Macrophages by Lipopolysaccharide from *Serpulina Hyodysenteriae*. *Infect Immun* *64*, 4369-4372.
- SACHS, D. H. (1994). The Pig as a Potential Xenograft Donor. *Vet Immunol Immunopathol* *43*, 185-191.
- SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A., AND ARNHEIM, N. (1985). Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* *230*, 1350-1354.
- SAMBRAUS, H.H. (1987). Münchner Miniaturschwein Troll. In *Atlas der Nutztierassen*, p.248. Edited by H.H. Sambraus. 2nd Edition, Ulmer, Stuttgart.
- SANDSTRÖM, H., VEIJALAINEN, P., MOENNIG, V., HUNSMAN, G., SCHWARZ, H., SCHAFER W., (1973). C type particles produced by a permanent cell line from a leukemic pig. I. Origin and properties of the host cells and some evidence for the occurrence of C-type-like particles. *Virology*, *57*:175-178.
- SANGER, F., NICKLEN, S., AND COULSON, A. R. (1992). DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. 1977. *Biotechnology* *24*, 104-108.
- SATO, K., TAKIGAMI, K., MIYATAKE, T., CZISMADIA, E., LATINNE, D., BAZIN, H., BACH, F. H., AND SOARES, M. P. (1999). Suppression of Delayed Xenograft Rejection by Specific Depletion of Elicited Antibodies of the Igm Isotype. *Transplantation* *68*, 844-854.
- SAUER, I. M., KARDASSIS, D., ZEILLINGER, K., PASCHER, A., GRUENWALD, A., PLESS, G., IRGANG, M., KRAEMER, M., PUHL, G., FRANK, J., et al. (2003). Clinical Extracorporeal Hybrid Liver Support--Phase I Study with Primary Porcine Liver Cells. *Xenotransplantation* *10*, 460-469.
- SCACHERI, P. C., ROZENBLATT-ROSEN, O., CAPLEN, N. J., WOLFSBERG, T. G., UYAM, L., LEE, J. C., HUGHES, C. M., SHANMUGAM, K. S., BHATTACHARJEE, A., MEYERSON, M., AND COLLINS, F. S. (2004). 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* *101*, 1892-1897. Epub 2004 Feb.
- SCHAGGER, H., AND VON JAGOW, G. (1987). Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 Kda. *Anal Biochem* *166*, 368-379.
- SCHMITTGEN, T. D., AND ZAKRAJSEK, B. A. (2000). Effect of Experimental Treatment on Housekeeping Gene Expression: Validation by Real-Time, Quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* *46*, 69-81.
- SCHMOECKEL, M., COZZI, E., CHAVEZ, G., DUNNING, J. J., WALLWORK, J., AND WHITE, D. J. (1999). [Xenotransplantation of hDAF-Transgenic Swine Hearts]. *Zentralbl Chir* *124*, 604-608.
- SCHMOECKEL, M., NOLLERT, G., SHAHMOHAMMADI, M., MULLER-HOCKER, J., YOUNG, V. K., KASPER-KONIG, W., WHITE, D. J., HAMMER, C., AND REICHART, B. (1997). Transgenic Human Decay Accelerating Factor Makes Normal Pigs Function as a Concordant Species. *J Heart Lung Transplant* *16*, 758-764.
- SCHON, M. R., HEIL, W., LEMMENS, H. P., PADVAL, D., MATTHES, M., PUHL, G., NEUHAUS, P., AND HAMMER, C. (1999). Xenogeneic, Extracorporeal Liver Perfusion in Primates Improves the Ratio of Branched-Chain Amino Acids to Aromatic Amino Acids (Fischer's Ratio). *Eur Surg Res* *31*, 230-239.
- SCHUMACHER, J. M., ELLIAS, S. A., PALMER, E. P., KOTT, H. S., DINSMORE, J., DEMPSEY, P. K., FISCHMAN, A. J., THOMAS, C., FELDMAN, R. G., KASSISSIEH, S., et al. (2000). Transplantation of Embryonic Porcine Mesencephalic Tissue in Patients with Pd. *Neurology* *54*, 1042-1050.
- SCHWARZ, H., THIEL, H. J., WEINHOLD, K. J., BOLOGNESI, D. P., AND SCHAFER, W. (1984). [Stimulation of Immunoreactivity against Endogenous Retroviruses and Protection against Leukemia in Aged Akr Mice after Vaccination with Antibodies to Viral Surface Components. The Role of Antibodies to P15(E)]. *Z Naturforsch [C]* *39*, 1199-1202.
- SCOBIE, L., TAYLOR, S., WOOD, J. C., SULING, K. M., QUINN, G., MEIKLE, S., PATIENCE, C., SCHUURMAN, H. J., AND ONIONS, D. E. (2004). Absence of Replication-Competent Human-Tropic Porcine Endogenous Retroviruses in the Germ Line DNA of Inbred Miniature Swine. *J Virol* *78*, 2502-2509.
- SEIFARTH, W., FRANK, O., ZEILFELDER, U., SPIESS, B., GREENWOOD, A. D., HEHLMANN, R., AND LEIB-MOSCH, C. (2005). Comprehensive Analysis of Human Endogenous Retrovirus Transcriptional Activity in Human Tissues with a Retrovirus-Specific Microarray. *J Virol* *79*, 341-352.

- SELLNER, L. N., AND TURBETT, G. R. (1996). The Presence of a Pseudogene May Affect the Use of HPRT as an Endogenous mRNA Control in RT-PCR. *Mol Cell Probes* 10, 481-483.
- SHAH, C. A., BONI, J., BISSET, L. R., SEEBACH, J. D., AND SCHUPBACH, J. (2003). Ultra-Sensitive and Specific Detection of Porcine Endogenous Retrovirus (PERV) Using a Sequence-Capture Real-Time PCR Approach. *J Virol Methods* 109, 209-216.
- SHARP, P. A. (2001). RNA Interference--2001. *Genes Dev* 15, 485-490.
- SHEN, J., CHONG, A. S., XIAO, F., LIU, W., HUANG, W., BLINDER, L., FOSTER, P., SANKARY, H., JENSIK, S., MCCHESENEY, L., et al. (1998). Histological Characterization and Pharmacological Control of Chronic Rejection in Xenogeneic and Allogeneic Heart Transplantation. *Transplantation* 66, 692-698.
- SHIM, J. H., KIM, S. E., WOO, D. H., KIM, S. K., OH, C. H., MCKAY, R., AND KIM, J. H. (2007). Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells Towards a Pancreatic Cell Fate. *Diabetologia* 50, 1228-1238. Epub 2007 Apr .
- SIMON, A. R., TEMPLIN, C., SCHRODER, C., LAAFF, G., TESSMANN, R., WINKLER, M. E., TACKE, S., DENNER, J., LAPIN, B., CHIKOBAVA, M., et al. (2003). No Evidence for Productive PERV Infection of Baboon Cells in in Vivo Infection Model. *Ann Transplant* 8, 24-34.
- SMITH, C. E., SIMPSON, D. I., BOWEN, E. T., AND ZLOTNIK, I. (1967). Fatal Human Disease from Vervet Monkeys. *Lancet* 2, 1119-1121.
- SORDEN, S. D., HARMS, P. A., NAWAGITGUL, P., CAVANAUGH, D., AND PAUL, P. S. (1999). Development of a Polyclonal-Antibody-Based Immunohistochemical Method for the Detection of Type 2 Porcine Circovirus in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue. *J Vet Diagn Invest* 11, 528-530.
- SPARKES, A. H. (1997). Feline Leukaemia Virus: A Review of Immunity and Vaccination. *J Small Anim Pract* 38, 187-194.
- SPARKES, A. H. (2003). Feline Leukaemia Virus and Vaccination. *J Feline Med Surg* 5, 97-100.
- SPECKE, V., PLESKER, R., COULIBALY, C., BOLLER, K., AND DENNER, J. (2002a). Productive Infection of a Mink Cell Line with Porcine Endogenous Retroviruses (PERVs) but Lack of Transmission to Minks in Vivo. *Arch Virol* 147, 305-319.
- SPECKE, V., RUBANT, S., AND DENNER, J. (2001b). Productive Infection of Human Primary Cells and Cell Lines with Porcine Endogenous Retroviruses. *Virology* 285, 177-180.
- SPECKE, V., SCHUURMAN, H. J., PLESKER, R., COULIBALY, C., OZEL, M., LANGFORD, G., KURTH, R., AND DENNER, J. (2002b). Virus Safety in Xenotransplantation: First Exploratory in Vivo Studies in Small Laboratory Animals and Non-Human Primates. *Transpl Immunol* 9, 281-288.
- SPECKE, V., TACKE, S. J., BOLLER, K., SCHWENDEMANN, J., AND DENNER, J. (2001a). Porcine Endogenous Retroviruses: In Vitro Host Range and Attempts to Establish Small Animal Models. *J Gen Virol* 82, 837-844.
- SRIVASTAVA, I. K., STAMATATOS, L., KAN, E., VAJDY, M., LIAN, Y., HILT, S., MARTIN, L., VITA, C., ZHU, P., ROUX, K. H., et al. (2003). Purification, Characterization, and Immunogenicity of a Soluble Trimeric Envelope Protein Containing a Partial Deletion of the V2 Loop Derived from Sf162, an R5-Tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolate. *J Virol* 77, 11244-11259.
- STAHLBERG, A., HAKANSSON, J., XIAN, X., SEMB, H., AND KUBISTA, M. (2004). Properties of the Reverse Transcription Reaction in mRNA Quantification. *Clin Chem* 50, 509-515. Epub 2004 Jan.
- STEPHAN, O., SCHWENDEMANN, J., SPECKE, V., TACKE, S. J., BOLLER, K., AND DENNER, J. (2001). Porcine Endogenous Retroviruses (PERVs): Generation of Specific Antibodies, Development of an Immunoperoxidase Assay (Ipa) and Inhibition by Azt. *Xenotransplantation* 8, 310-316.
- STEWART, M. A., WARNOCK, M., WHEELER, A., WILKIE, N., MULLINS, J. I., ONIONS, D. E., AND NEIL, J. C. (1986). Nucleotide Sequences of a Feline Leukemia Virus Subgroup A Envelope Gene and Long Terminal Repeat and Evidence for the Recombinational Origin of Subgroup B Viruses. *J Virol* 58, 825-834.
- STOYE, J. P., LE TISSIER, P., TAKEUCHI, Y., PATIENCE, C., AND WEISS, R. A. (1998). Endogenous Retroviruses: A Potential Problem for Xenotransplantation? *Ann N Y Acad Sci* 862, 67-74.
- STOYE, J. P., AND MORONI, C. (1983). Endogenous Retrovirus Expression in Stimulated Murine Lymphocytes. Identification of a New Locus Controlling Mitogen Induction of a Defective Virus. *J Exp Med* 157, 1660-1674.
- SUI, G., SOOHOO, C., AFFAR EL, B., GAY, F., SHI, Y., FORRESTER, W. C., AND SHI, Y. (2002). A DNA Vector-Based Rnai Technology to Suppress Gene Expression in Mammalian Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5515-5520.
- SULING, K., QUINN, G., WOOD, J., AND PATIENCE, C. (2003). Packaging of Human Endogenous Retrovirus Sequences Is Undetectable in Porcine Endogenous Retrovirus Particles Produced from Human Cells. *Virology* 312, 330-336.



- SUZUKA, I., SEKIGUCHI, K., AND KODAMA, M. (1985). Some Characteristics of a Porcine Retrovirus from a Cell Line Derived from Swine Malignant Lymphomas. *FEBS Lett* 183, 124-128.
- SUZUKA, I., SHIMIZU, N., SEKIGUCHI, K., HOSHINO, H., KODAMA, M., AND SHIMOTOHNO, K. (1986). Molecular Cloning of Unintegrated Closed Circular DNA of Porcine Retrovirus. *FEBS Lett* 198, 339-343.
- SWINDLE, M. M. (1998). Defining Appropriate Health Status and Management Programs for Specific-Pathogen-Free Swine for Xenotransplantation. *Ann N Y Acad Sci* 862, 111-120.
- SWITZER, W. M., MICHLER, R. E., SHANMUGAM, V., MATTHEWS, A., HUSSAIN, A. I., WRIGHT, A., SANDSTROM, P., CHAPMAN, L. E., WEBER, C., SAFLEY, S., et al. (2001). Lack of Cross-Species Transmission of Porcine Endogenous Retrovirus Infection to Nonhuman Primate Recipients of Porcine Cells, Tissues, or Organs. *Transplantation* 71, 959-965.
- SZULC, J., WIZNEROWICZ, M., SAUVAIN, M. O., TRONO, D., AND AEBISCHER, P. (2006). A Versatile Tool for Conditional Gene Expression and Knockdown. *Nat Methods* 3, 109-116.
- TACKE, S., SPECKE, V., STEPHAN, O., SEIBOLD, E., BODUSCH, K., AND DENNER, J. (2000a). Porcine Endogenous Retroviruses: Diagnostic Assays and Evidence for Immunosuppressive Properties. *Transplant Proc* 32, 1166.
- TACKE, S. J., BODUSCH, K., BERG, A., AND DENNER, J. (2001). Sensitive and Specific Immunological Detection Methods for Porcine Endogenous Retroviruses Applicable to Experimental and Clinical Xenotransplantation. *Xenotransplantation* 8, 125-135.
- TACKE, S. J., KURTH, R., AND DENNER, J. (2000b). Porcine Endogenous Retroviruses Inhibit Human Immune Cell Function: Risk for Xenotransplantation? *Virology* 268, 87-93.
- TACKE, S. J., SPECKE, V., AND DENNER, J. (2003). Differences in Release and Determination of Subtype of Porcine Endogenous Retroviruses Produced by Stimulated Normal Pig Blood Cells. *Intervirolgy* 46, 17-24.
- TAKEUCHI, Y., PATIENCE, C., MAGRE, S., WEISS, R. A., BANERJEE, P. T., LE TISSIER, P., AND STOYE, J. P. (1998). Host Range and Interference Studies of Three Classes of Pig Endogenous Retrovirus. *J Virol* 72, 9986-9991.
- TAKEUCHI, Y., PORTER, C. D., STRAHAN, K. M., PREECE, A. F., GUSTAFSSON, K., COSSET, F. L., WEISS, R. A., AND COLLINS, M. K. (1996). Sensitization of Cells and Retroviruses to Human Serum by (Alpha 1-3) Galactosyltransferase. *Nature* 379, 85-88.
- TAO, Y., STRELKOV, S. V., MESYANZHINOV, V. V., AND ROSSMANN, M. G. (1997). Structure of Bacteriophage T4 Fibrin: A Segmented Coiled Coil and the Role of the C-Terminal Domain. *Structure* 5, 789-798.
- TARLINTON, R. E., MEERS, J., AND YOUNG, P. R. (2006). Retroviral Invasion of the Koala Genome. *Nature* 442, 79-81.
- TAUBENBERGER, J. K., REID, A. H., KRAFFT, A. E., BIJWAARD, K. E., AND FANNING, T. G. (1997). Initial Genetic Characterization of the 1918 "Spanish" Influenza Virus. *Science* 275, 1793-1796.
- THELLIN, O., ZORZI, W., LAKAYE, B., DE BORMAN, B., COUMANS, B., HENNEN, G., GRISAR, T., IGOUT, A., AND HEINEN, E. (1999). Housekeeping Genes as Internal Standards: Use and Limits. *J Biotechnol* 75, 291-295.
- TODARO, G. J., SHERR, C. J., BENVENISTE, R. E., LIEBER, M. M., AND MELNICK, J. L. (1974). Type C Viruses of Baboons: Isolation from Normal Cell Cultures. *Cell* 2, 55-61.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T., AND GORDON, J. (1989). Immunoblotting in the Clinical Laboratory. *J Clin Chem Clin Biochem* 27, 495-501.
- TRICARICO, C., PINZANI, P., BIANCHI, S., PAGLIERANI, M., DISTANTE, V., PAZZAGLI, M., BUSTIN, S. A., AND ORLANDO, C. (2002). Quantitative Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction: Normalization to rRNA or Single Housekeeping Genes Is Inappropriate for Human Tissue Biopsies. *Anal Biochem* 309, 293-300.
- TUCKER, A., BELCHER, C., MOLOO, B., BELL, J., MAZZULLI, T., HUMAR, A., HUGHES, A., McARDLE, P., AND TALBOT, A. (2002). The Production of Transgenic Pigs for Potential Use in Clinical Xenotransplantation: Microbiological Evaluation. *Xenotransplantation* 9, 191-202.
- UI-TEI, K., NAITO, Y., AND SAIGO, K. (2007). Guidelines for the Selection of Effective Short-Interfering RNA Sequences for Functional Genomics. *Methods Mol Biol* 361, 201-216.
- VAN DER LAAN, L. J., LOCKEY, C., GRIFFETH, B. C., FRASIER, F. S., WILSON, C. A., ONIONS, D. E., HERING, B. J., LONG, Z., OTTO, E., TORBETT, B. E., AND SALOMON, D. R. (2000). Infection by Porcine Endogenous Retrovirus after Islet Xenotransplantation in Scid Mice. *Nature* 407, 90-94.
- VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A., AND SPELEMAN, F. (2002). Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RT-PCR Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes. *Genome Biol* 3, RESEARCH0034. Epub 2002 Jun.

- VEZINA, S. A., ROBERGE, D., FOURNIER, M., DEA, S., OTH, D., AND ARCHAMBAULT, D. (1995). Cloning of Porcine Cytokine-Specific Cdnas and Detection of Porcine Tumor Necrosis Factor Alpha, Interleukin 6 (II-6), and II-1 Beta Gene Expression by Reverse Transcription PCR and Chemiluminescence Hybridization. *Clin Diagn Lab Immunol* 2, 665-671.
- VINOGRADOV, A. E. (2005). Genome Size and Chromatin Condensation in Vertebrates. *Chromosoma* 113, 362-369. Epub 2005 Jan.
- WANG, S. R., CHANG, J. T., LIN, M. S., CHIANG, C. Y., AND CHANG, H. Y. (2004). Establishing the Reactivity of Monoclonal Antibodies against Porcine Endogenous Retrovirus Envelope Protein. *Intervirolgy* 47, 93-101.
- WANKE, R., BEIN, J., HERMANN, W. (1998). Munich miniature swine Troll (UM-line): a porcine model of hereditary cutaneous melanoma. *J Invest. Dermatol* 110, 722
- WATANABE, R., MIYAZAWA, T., AND MATSUURA, Y. (2005). Cell-Binding Properties of the Envelope Proteins of Porcine Endogenous Retroviruses. *Microbes Infect* 7, 658-665. Epub 2005 Mar.
- WEIJER, K., PFAUTH, A., VAN HERWIJNEN, R., JARRETT, O., MELOEN, R. H., TOME, C., AND OSTERHAUS, A. D. (1993). Induction of Feline Leukaemia Virus-Neutralizing Antibodies by Immunization with Synthetic Peptides Derived from the Felv Env Gene. *Vaccine* 11, 946-956.
- WEINGARTL, H. M., COPPS, J., DREBOT, M. A., MARSZAL, P., SMITH, G., GREN, J., ANDOVA, M., PASICK, J., KITCHING, P., AND CZUB, M. (2004). Susceptibility of Pigs and Chickens to Sars Coronavirus. *Emerg Infect Dis* 10, 179-184.
- WEISS, R. A. (1999). Xenografts and Retroviruses. *Science* 285, 1221-1222.
- WEISS, R. A. (1999). Xenografts and Retroviruses. *Science* 285, 1221-1222.
- WELLS, D. L., HOPFENSBERGER, D. J., ARDEN, N. H., HARMON, M. W., DAVIS, J. P., TIPPLE, M. A., AND SCHONBERGER, L. B. (1991). Swine Influenza Virus Infections. Transmission from Ill Pigs to Humans at a Wisconsin Agricultural Fair and Subsequent Probable Person-to-Person Transmission. *Jama* 265, 478-481.
- WILSON, C. A., WONG, S., MULLER, J., DAVIDSON, C. E., ROSE, T. M., AND BURD, P. (1998). Type C Retrovirus Released from Porcine Primary Peripheral Blood Mononuclear Cells Infects Human Cells. *J Virol* 72, 3082-3087.
- WILSON, C. A., WONG, S., VANBROCKLIN, M., AND FEDERSPIEL, M. J. (2000). Extended Analysis of the in Vitro Tropism of Porcine Endogenous Retrovirus. *J Virol* 74, 49-56.
- WINKLER, M. E., WINKLER, M., BURIAN, R., HECKER, J., LOSS, M., PRZEMECK, M., LORENZ, R., PATIENCE, C., KARLAS, A., SOMMER, S., et al. (2005). Analysis of Pig-to-Human Porcine Endogenous Retrovirus Transmission in a Triple-Species Kidney Xenotransplantation Model. *Transpl Int* 17, 848-858. Epub 2005 Apr.
- WIZNEROWICZ, M., AND TRONO, D. (2003). Conditional Suppression of Cellular Genes: Lentivirus Vector-Mediated Drug-Inducible Rna Interference. *J Virol* 77, 8957-8961.
- WOLGAMOT, G., AND MILLER, A. D. (1999). Replication of Mus Dundi Endogenous Retrovirus Depends on Promoter Activation Followed by Enhancer Multimerization. *J Virol* 73, 9803-9809.
- WOOD, J. C., QUINN, G., SULING, K. M., OLDMIXON, B. A., VAN TINE, B. A., CINA, R., ARN, S., HUANG, C. A., SCOBIE, L., ONIONS, D. E., et al. (2004). Identification of Exogenous Forms of Human-Tropic Porcine Endogenous Retrovirus in Miniature Swine. *J Virol* 78, 2494-2501.
- WOODS, W. A., PAPAS, T. S., HIRUMI, H., AND CHIRIGOS, M. A. (1973). Antigenic and Biochemical Characterization of the C-Type Particle of the Stable Porcine Kidney Cell Line PK-15. *J Virol* 12, 1184-1186.
- XING, X. W., XUE, L. Q., MO, Z. H., HUANG, S. Q., AND WANG, W. (2006). [Porcine Endogenous Retrovirus in Daweizi Pigs in Hunan]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 31, 838-842.
- XU, H., SHARMA, A., OKABE, J., CUI, C., HUANG, L., WEI, Y. Y., WAN, H., LEI, Y., LOGAN, J. S., LEVY, M. F., AND BYRNE, G. W. (2003). Serologic Analysis of Anti-Porcine Endogenous Retroviruses Immune Responses in Humans after Ex Vivo Transgenic Pig Liver Perfusion. *Asaio J* 49, 407-416.
- YANG, D., LU, H., AND ERICKSON, J. W. (2000a). Evidence That Processed Small dsRNAs May Mediate Sequence-Specific mRNA Degradation During RNAi in Drosophila Embryos. *Curr Biol* 10, 1191-1200.
- YANG, S., TUTTON, S., PIERCE, E., AND YOON, K. (2001). Specific Double-Stranded RNA Interference in Undifferentiated Mouse Embryonic Stem Cells. *Mol Cell Biol* 21, 7807-7816.
- YANG, X., FARZAN, M., WYATT, R., AND SODROSKI, J. (2000b). Characterization of Stable, Soluble Trimers Containing Complete Ectodomains of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoproteins. *J Virol* 74, 5716-5725.
- YANG, X., LEE, J., MAHONY, E. M., KWONG, P. D., WYATT, R., AND SODROSKI, J. (2002). Highly Stable Trimers Formed by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoproteins Fused with the Trimeric Motif of T4 Bacteriophage Fibrin. *J Virol* 76, 4634-4642.

YANG, Y. G., WOOD, J. C., LAN, P., WILKINSON, R. A., SYKES, M., FISHMAN, J. A., AND PATIENCE, C. (2004). Mouse Retrovirus Mediates Porcine Endogenous Retrovirus Transmission into Human Cells in Long-Term Human-Porcine Chimeric Mice. *J Clin Invest* *114*, 695-700.

YANG, Y. Y., TOJO, A., WATANABE, N., AND AMANUMA, H. (1990). Oligomerization of Friend Spleen Focus-Forming Virus (Sffv) Env Glycoproteins. *Virology* *177*, 312-316.

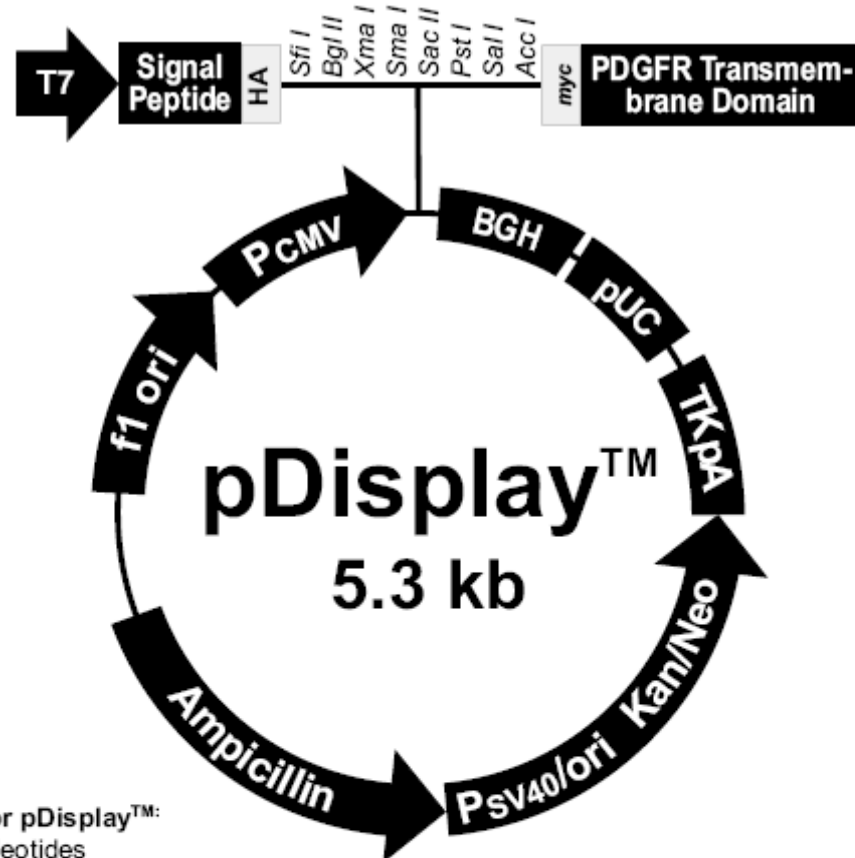
YING, R. S., ZHU, C., FAN, X. G., LI, N., TIAN, X. F., LIU, H. B., AND ZHANG, B. X. (2007). Hepatitis B Virus Is Inhibited by Rna Interference in Cell Culture and in Mice. *Antiviral Res* *73*, 24-30. Epub 2006 Jun.

ZAMORE, P. D., TUSCHL, T., SHARP, P. A., AND BARTEL, D. P. (2000). Rnai: Double-Stranded RNA Directs the Atp-Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals. *Cell* *101*, 25-33.

ZHU, P., CHERTOVA, E., BESS, J., JR., LIFSON, J. D., ARTHUR, L. O., LIU, J., TAYLOR, K. A., AND ROUX, K. H. (2003). Electron Tomography Analysis of Envelope Glycoprotein Trimers on HIV and Simian Immunodeficiency Virus Virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 15812-15817. Epub 2003 Dec.



## pDisplay, Invitrogen



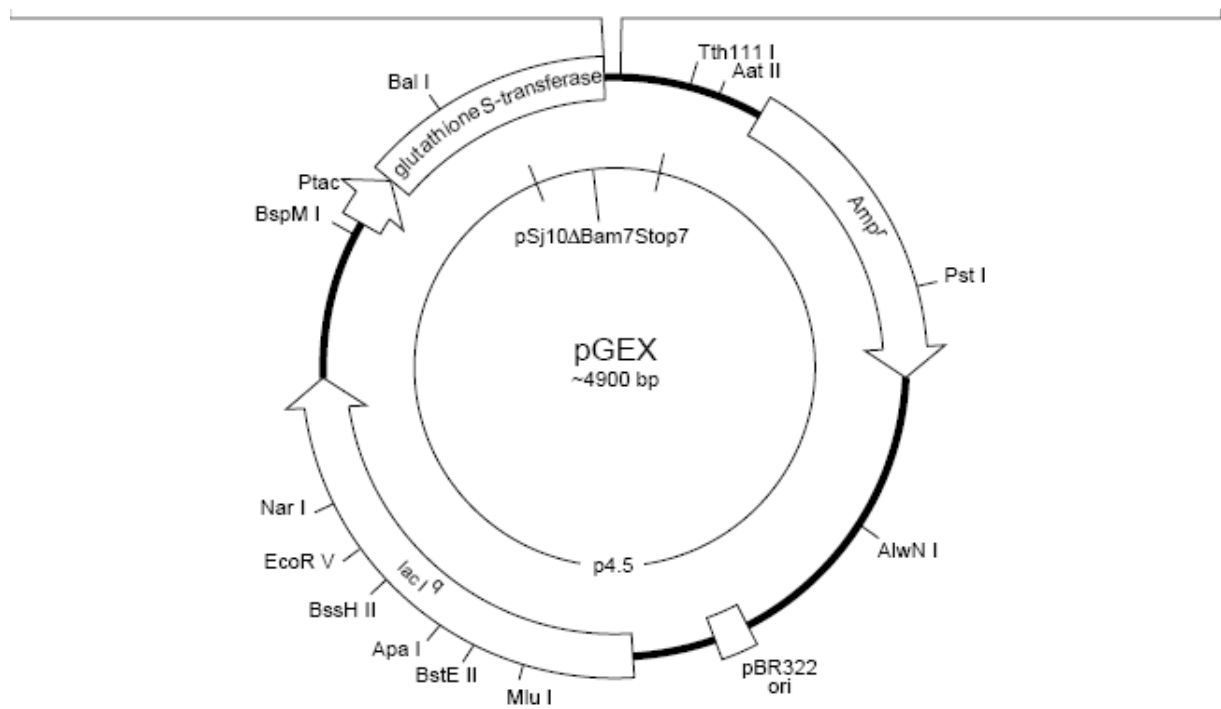
CMV promoter: bases 1-596  
 T7 promoter: bases 638-657  
 Murine Ig kappa-chain V-J2-C signal peptide: bases 737-799  
 Hemagglutinin A epitope: bases 800-826  
 Multiple Cloning Site: bases 827-873  
 myc epitope: bases 874-903  
 PDGFR transmembrane domain: bases 907-1056  
 Bovine growth hormone polyadenylation signal: bases 1069-1288  
 pUC origin: bases 1378-2051  
 Thymidine kinase polyadenylation site: bases 2458-2187  
 Neomycin/Kanamycin resistance gene: bases 3421-2366  
 SV40 origin and promoter: bases 3797-3456

pGEX-5x-1, Stratagene

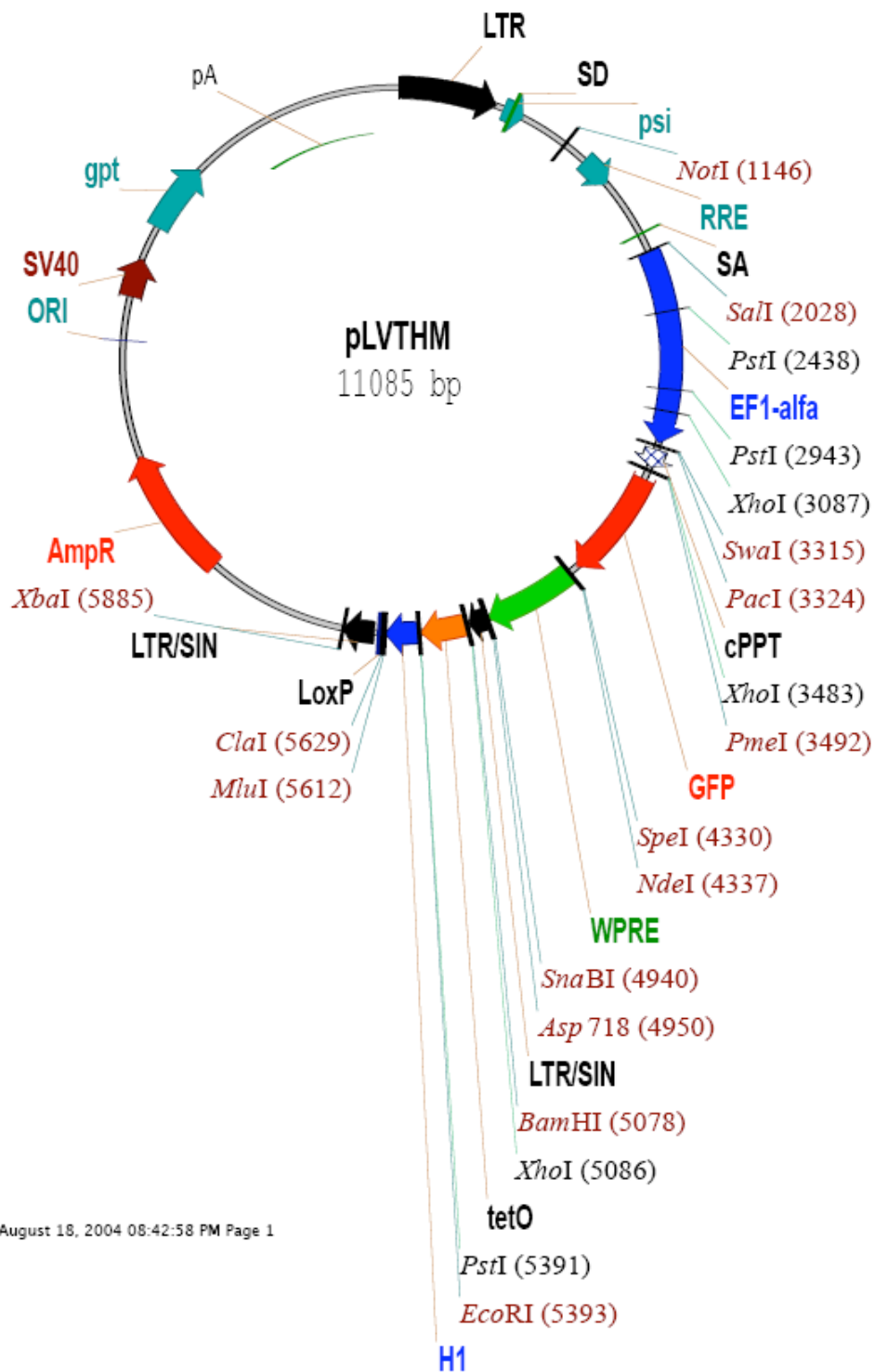
**pGEX-5X-1 (27-4584-01)**

Factor Xa

Ile	Glu	Gly	Arg	Gly	Ile	Pro	Glu	Phe	Pro	Gly	Arg	Leu	Glu	Arg	Pro	His	Arg	Asp	
ATC	GAA	GGT	CGT	GGG	ATC	CCC	GAA	TTC	CCG	GGT	CGA	CTC	GAG	CGG	CCG	CAT	CGT	GAC	TGA
				BamH I		EcoR I		Sma I		Sal I		Xho I		Not I					Stop codons

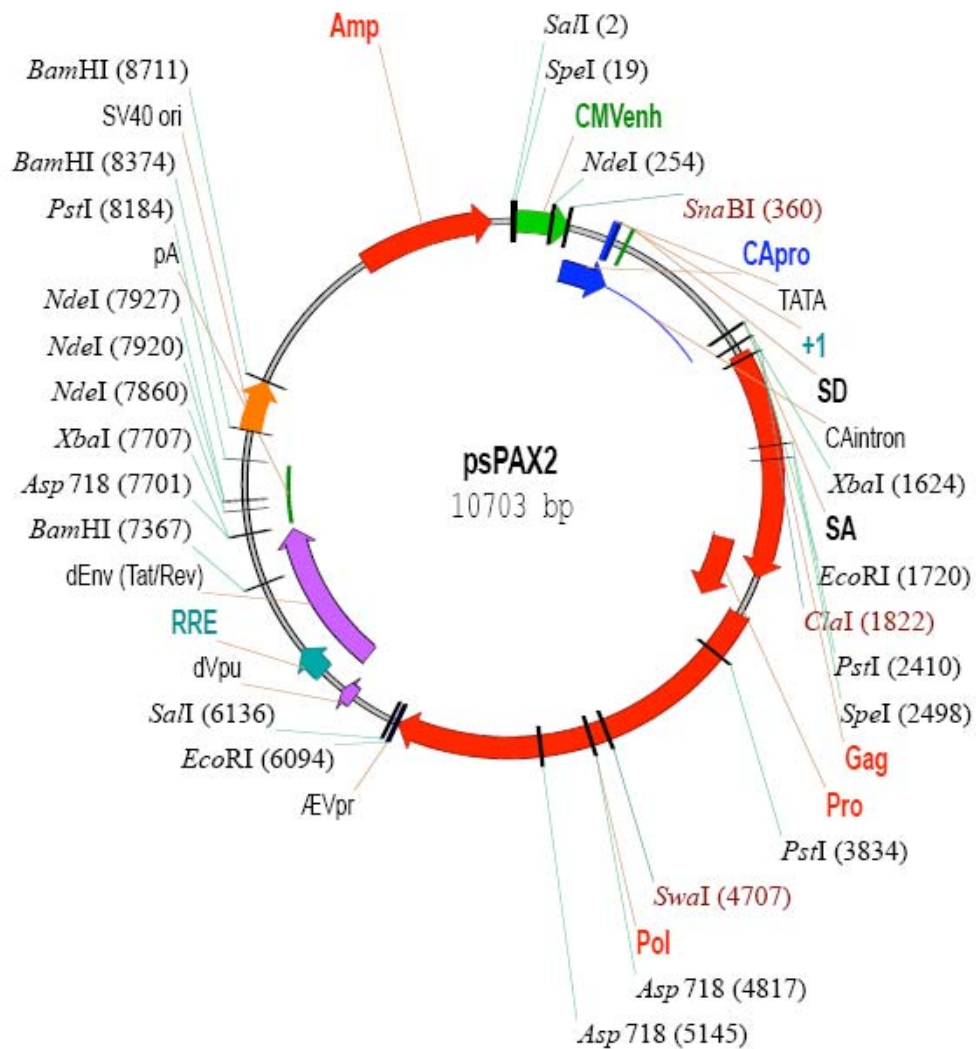


pLVTHM, lentiweb.com



Wednesday, August 18, 2004 08:42:58 PM Page 1

## psPax2, lentiweb.com





## PUBLIKATIONEN

- KLUGE, B., SCHLAGER, M., PAIRAN, A., AND BRUSS, V. (2005). Determination of the Minimal Distance between the Matrix and Transmembrane Domains of the Large Hepatitis B Virus Envelope Protein. *J Virol* 79, 7918-7921.
- DIECKHOFF, B., KARLAS, A., HOFMANN, A., KUES, W. A., PETERSEN, B., PFEIFER, A., NIEMANN, H., KURTH, R., AND DENNER, J. (2007). Inhibition of Porcine Endogenous Retroviruses (PERVs) in Primary Porcine Cells by RNA Interference Using Lentiviral Vectors. *Arch Virol* 152, 629-634. Epub 2006 Nov.
- DIECKHOFF, B., PUHLMANN, J., BUSCHER, K., HAFNER-MARX, A., HERBACH, N., BANNERT, N., BUTTNER, M., WANKE, R., KURTH, R., AND DENNER, J. (2007). Expression of Porcine Endogenous Retroviruses (PERVs) in Melanomas of Munich Miniature Swine (Mms) Troll. *Vet Microbiol* 27, 27.
- GARKAVENKO, O., DIECKHOFF, B., DENNER, J., ELLIOTT, R. B., TAN, P., CROXSON, M. C. (2007). Absence of Transmission of Potentially Xenotic Viruses in a Prospective Pig to Primate Islet Xenotransplantation Study. *Transplantation*, submitted
- DIECKHOFF, B., PETERSEN, B., KUES, W. A., KURTH, R., NIEMANN, H., DENNER, J. (2007). Porcine endogenous retroviruses (PERVs) are knocked down in transgenic pigs expressing PERV-specific shRNA. *Xenotransplantation*, in preparation

## ABSTRACTS

- KLUGE, B., KARLAS, A., PFEIFER, A., NIEMANN, H., KURTH, R., DENNER, J.  
RNA interference mediated inhibition of porcine endogenous retroviruses in porcine fetal fibroblasts.  
Annual Meeting of the Gesellschaft für Virologie, Hannover, 16.-19.03.2005, RET 7, 92 (2005)
- DENNER, J., KARLAS, A., FIEBIG, U., KLUGE, B., PFEIFER, A., NIEMANN, H., KURTH, R.  
Development of strategies to prevent transmission of porcine endogenous retroviruses (PERVs) following xenotransplantation.  
8th Congress of the International Xenotransplantation Association, Göteborg, 10.-14.09.2005, O8:2 (2005)
- KLUGE, B., KARLAS, A., FIEBIG, U., PFEIFER, A., KURTH, R., NIEMANN, H., DENNER, J.  
Weiterentwicklung von Strategien zur Verhinderung der Übertragung porciner endogener Retroviren (PERVs) bei der Xenotransplantation.  
14. Jahrestagung Deutsche Transplantationsgesellschaft, Rostock, 22.-24.09.2005, 108-109 (2005)
- KLUGE, B., PUHLMANN, J., BÜSCHER, K., HAFNER-MARX, A., HERBACH, N., BÜTTNER, M., WANKE, R., KURTH, R., DENNER, J.  
Expression of porcine endogenous retroviruses (PERVs) in melanomas of MMS Troll pigs.  
Annual Meeting of the Gesellschaft für Virologie, München, 15-18.03.2006, 305 (2006)

## **LEBENS LAUF**

---

Britta Alexandra Dieckhoff  
Geboren am 11.02.1980 in Schweinfurt  
Verheiratet, geborene Kluge

### **Promotion**

---

**08/2004 – 07/2007**                      **Robert Koch-Institut, Berlin**  
Projektgruppe: Retrovirus-induzierte  
Immunsuppression  
„Xenotransplantation und porcine endogene  
Retroviren (PERV): Evaluierung des Risikos  
und Prävention der Virusübertragung “

### **Studium**

---

**10/1999 - 06/2004**                      **Georg-August-Universität Göttingen**  
Studium der Biologie (Note: sehr gut)  
Studienschwerpunkte: Mikrobiologie, Humangenetik  
und Immunologie  
Diplomarbeit in der Virologie, Zentrum für  
Hygiene und Humangenetik des Universitäts-  
klinikums Göttingen  
„Bestimmung des minimalen Abstandes zwischen  
Matrix- und Transmembrandomäne des großen  
Hepatitis B Virus Hüllproteins“

### **Praktika und berufliche Erfahrung**

---

**01/2003 – 05/2004**                      **Georg-August-Universität Göttingen**  
wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für  
Mikrobiologie und Genetik, G2L: *Goettingen Genomics  
Laboratory*

**08/2001 – 09/2001**                      **Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin,  
Hamburg**  
Praktikum in der Abteilung Immunologie

**07/2000 – 12/2002**                      **Ärztegemeinschaft Wagner und Partner,  
Göttingen**  
praktische Tätigkeiten im Labor für medizinische  
Mikrobiologie/Bakteriologie

**10/1997**                                      **EUROIMMUN – Labor für experimentelle  
Immunologie, Lübeck**  
Praktikum in den Abteilungen Zellkultur und ELISA-  
Diagnostik

### **Schulbildung**

---

**08/1990 – 06/1999**                      **Lauenburgische Gelehrtenschule Ratzeburg**  
**08/1986 – 08/1990**                      **Grundschule Ratzeburg**

## DANKSAGUNG

Bei Prof. Dr. Reinhard Kurth bedanke ich mich für die Betreuung meiner Dissertation am Robert Koch-Institut.

Für die externe Betreuung der Arbeit danke ich Prof. Dr. Rupert Mutzel von der Freien Universität Berlin.

Herrn Dr. Joachim Denner danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas im Rahmen des DFG-Transregio-Projekts Xenotransplantation.

Bei meiner Arbeitsgruppe P13, insbesondere Debora, Magdalena, Uwe und Kristina, möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, die hilfreichen Anregungen und das entspannte Arbeitsklima bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Magdalena Konczal für ihr gewissenhaftes Korrekturlesen des Manuskripts, die vielen hilfreichen Tips und ihre stete Unterstützung.

Besonders gedankt sei auch PD Dr. Sven Krappmann für seine treffenden Verbesserungsvorschläge.

Dr. Alexander Karlas danke ich für seine fachliche und tatkräftige Unterstützung.

Bei Jenny Puhmann und Christian Wurzbacher möchte ich mich für ihren Einsatz während ihrer Diplomarbeiten bedanken.

Dr. Steve Norley danke ich für die Durchsicht der englischen Texte.

Dank gilt folgenden Kooperationspartnern:

Dr. Björn Petersen vom Institut für Tierzucht in Mariensee für das Klonen der „grünen“ Schweine.

Dr. Barbara Keßler vom Institut für molekulare Tierzucht und Biotechnologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München für die Versorgung mit porzinem Untersuchungsmaterial.

Dr. Norbert Bannert und Gudrun Holland für die Anfertigung der TEM-Aufnahmen, und Herrn Madela für die Unterstützung bei der Immunfluoreszenz.

Annette Dietrich und dem gesamten Team des Tierstalls im Robert Koch-Institut für die Unterstützung bei den Rattenversuchen.

Dr. Wolf und seinem Team vom Institut für Risikobewertung in Berlin-Marienfelde für die Unterstützung bei den Ziegenversuchen.

Besonderer Dank gilt meinem „Eltern-Quartett“ für ihre liebevolle Unterstützung und das Vertrauen, das sie in mich setzen.

Ich danke meinem Mann Patrick, der am intensivsten die Höhen und Tiefen mit mir durchlebt hat, der mir mit aller Kraft den Rücken stärkte.