

**Porcine endogene Retroviren und
Xenotransplantation:
Evaluierung des Infektionsrisikos und Strategien zur
Hemmung der Virusreplikation mittels
RNA-Interferenz**

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom Biochemiker Alexander Karlas

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:

Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter/innen: 1.
 2.
 3.

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Xenotransplantation	1
1.1.1	Mangel an Allotransplantaten	1
1.1.2	Alternativen zur Allotransplantation	2
1.1.3	Favorisierte Spendertiere für die Xenotransplantation	3
1.1.4	Potentielle Übertragung von porcinen Mikroorganismen	7
1.2	Retroviren	9
1.2.1	Taxonomie der Retroviren	9
1.2.2	Das pathogene Potential von Retroviren	10
1.2.3	Der Aufbau der Retroviren	13
1.2.4	Virusgenom	14
1.2.5	Replikation der Retroviren	15
1.2.6	Porcine endogene Retroviren	18
1.3	RNA-Interferenz (RNAi)	23
1.3.1	Mechanismen der RNA-Interferenz	23
1.3.2	RNAi in Säugetierzellen	27
1.3.3	RNAi-Induktion mittels siRNAs	28
1.3.4	RNAi-Induktion mittels Expression von Haarnadel-RNAs	28
1.4	Lentivirale Expressionssysteme	29
1.5	Zielsetzung	30

2	Material und Methoden	32
2.1	Material	32
2.1.1	Antikörper	32
2.1.2	Plasmide	33
2.2	Molekularbiologische Methoden	33
2.2.1	Synthese von cDNA mittels Reverser Transkriptase	33
2.2.2	Polymerasekettenreaktion	34
2.2.3	Gelelektrophorese	36
2.2.4	Isolierung von linearen DNA-Fragmenten	36
2.2.5	Restriktionsverdau	37
2.2.6	Ligation	37
2.2.7	Herstellung chemokompetenter Bakterien	38
2.2.8	Transformation	38
2.2.9	Isolierung von Plasmid-DNA	39
2.2.10	Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen	39
2.2.11	Gesamt-RNA Isolierung aus eukaryotischen Zellen	39
2.2.12	DNA und RNA Konzentrationsbestimmung	40
2.3	Zellbiologische Methoden	40
2.3.1	Verwendete Zellen	40
2.3.2	Zellkultur	41
2.3.3	Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen	41
2.3.4	Transfektion von Plasmid-DNA	42
2.3.5	Produktion synthetischer siRNAs	43
2.3.6	Transfektion synthetischer siRNAs	43
2.3.7	Herstellung lentiviraler Partikel	43
2.3.8	Virustiterbestimmung	45
2.3.9	Fluoreszenzmikroskopie	46

2.3.10	Durchflusszytometrie	47
2.3.11	Nachweis von Reverser Transkriptase Aktivität	48
2.3.12	Expressionsstudien mittels Dualem Luziferase Assay	48
2.4	Proteinchemische Methoden	49
2.4.1	Rekombinante Proteinexpression	49
2.4.2	Affinitätschromatographie rekombinanter Proteine	49
2.4.3	Proteingewinnung aus eukaryotischen Zellen	50
2.4.4	Proteinbestimmung	50
2.4.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	51
2.4.6	Western-Blot Analysen	52
2.4.7	Immunisierung mit rekombinanten Proteinen	53
3	Ergebnisse	55
3.1	Das Wirtsspektrum von PERV	55
3.1.1	Untersuchung zur PERV Übertragung im Kleintiermodell	55
3.1.2	Risikoevaluierung der PERV-Transmission in einem drei-Spezies-Modell mit Cynomolgus-Affen	61
3.2	Herstellung eines PERV-Moleklarklons	65
3.3	Herstellung von rekombinanten viralen Proteinen - Induktion p27 Gag spe- zifischer Antikörper	73
3.3.1	Klonierung des p27Gag-Expressionsvektors	73
3.3.2	Expression des p27Gag in <i>E. coli</i> Bakterien	73
3.3.3	Immunisierung der Versuchstiere mit rekombinantem p27Gag	74
3.4	Hemmung der Virusreplikation mit Hilfe der RNA-Interferenz (RNAi)	74
3.4.1	Selektion potenter synthetischer siRNAs	74
3.4.2	Expression von inhibierenden „short hairpin RNAs“	83
3.4.3	Lentivirale Expressionsvektoren zur Hemmung von PERV	89

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i>	IV
4 Diskussion	97
4.1 Untersuchungen der PERV-Transmission im Kleintiermodell	97
4.2 Risikoevaluierung der PERV Transmission auf humane Rezipienten durch Xenotransplantation im „drei-Spezies-Modellsystem“	99
4.3 Klonierung eines PERV-A/C-Molekularklons	101
4.4 RNA-Interferenz zur Hemmung der PERV-Expression	103
4.4.1 Auswahl der siRNA-Sequenzen	104
4.4.2 Hemmung der PERV-Expression mittels synthetischer siRNAs . . .	105
4.4.3 Expression von PERV-spezifischen shRNAs	105
4.4.4 Lentiviral vermittelter Transfer von shRNA-Expressionskassetten .	107
5 Zusammenfassung	109
Literaturverzeichnis	111
Anhang	I
DNA-Oligonukleotide	I
Sequenzen der eingesetzten siRNAs	IV
Plasmidkarten	V
Aminosäuresequenz des rekombinanten p27Gag-Proteins	XXII
Publikationen	XXIII
Patente	XXIII
Abstracts	XXIV
Lebenslauf	XXVII
Danksagung	XXVIII
Erklärung	XXIX
Index	XXIX

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb	Abbildung
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> , erworb. Immunschwächesyndrom
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Baasenpaar
bzw	beziehungsweise
C	Cytosin
CA	Capsidprotein
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
CTL	<i>cytotoxic T lymphocyte</i> , zytotoxische T-Lymphozyten
Da	Dalton
DAB	3',3'-Diaminobenziden
DAF	decay-accelerating factor
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	<i>double stranded</i> , doppelsträngig
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ENV	<i>envelope protein</i> , Hüllprotein
FeLV	<i>feline leukemia virus</i> , Katzen-Leukämievirus
FIV	<i>feline immune deficiency virus</i> , Katzen-Immundefizienz Virus
FKS	fötale Kälberserum
G	Guanin

Gag	<i>group specific antigen</i> , gruppenspezifisches Antigen
GAPDH	Glycerinphosphodehydrogenase
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HSV	Herpes Simplex Virus
HTLV	<i>human T-cell lymphotropic virus</i> , humanes T-Zell-Leukämievirus
huCD59	humanes CD59 Protein
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IN	Integrase
IPTG	Isopropyl-D-Thiogalactosid
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MCP	<i>membrane-cofactor-protein</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
miRNA	<i>micro RNA</i>
MMTV	Maus-Mammatumor Virus
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor κB</i>
Ni-NTA	<i>nickel-nitrilotriacetic acid</i>
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
OAS	Oligoadenylatsynthetase
OD	optische Dichte
PAZ	<i>Piwi/Argonaute/Zwille domain</i>
PB	Primerbindungsstelle
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PCV	<i>porcine circovirus</i> , Schweinecircovirus
PERV	porcines endogenes Retrovirus
PKR	Proteinkinase R
PR	Protease
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
SA	Spleißakzeptor
SARS	<i>severe acute respiratory syndrome</i> , schweres akutes Atemnotsyndrom
SD	Spleißdonor
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i> , Natriumdodecylsulfat
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
siRNP	siRNA-Ribonukleoproteinkomplex

SIV	simianes Immundefizienz Virus
SPF	specified pathogen free
ss	<i>single stranded</i> , einzelstängig
SU	<i>surface subunit</i> , Oberflächenhüllprotein
T	Thymin
T_M	Schmelztemperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCID ₅₀	<i>tissue culture infectious dose</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TK	Thymidinkinase
TM	<i>transmembrane subunit</i> , transmembrane Hüllprotein
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
TRITC	Trimethyl Rhodamin Isothiocyanat
tRNA	Transfer RNA
UV	ultraviolettes Licht
v/v	Volumen pro Volumen
VSV-G	G-Protein des Vesikulären Stomatitis Virus
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Xenotransplantation

1.1.1 Mangel an Allotransplantaten

Durch die moderne Transplantationsmedizin ist es inzwischen zur Routine geworden, kranke Organe durch gesunde Transplantate zu ersetzen. Obwohl schon im Jahre 1906 die Hornhaut des Auges (Korneatransplantation) erfolgreich transplantiert werden konnte [Zirm, 1989], erlaubte erst die Entwicklung der modernen Immunsuppressiva - wie das Medikament Azathioprin Mitte der sechziger Jahre - eine Übertragung von durchbluteten humanen Transplantaten auf den Patienten, ohne die ansonsten induzierte Abstossungsreaktionen auszulösen. In den folgenden Jahren wurden immer potentere immunsupprimierende Substanzen entwickelt und auch die Zahl an Allotransplantationen (gr. *allos*: anders) wuchs zunehmend [Dabbs et al., 2000]. In Deutschland wurden in dem Zeitraum von 1963 - 2001 etwa 60.000 Transplantationen durchgeführt, darunter hauptsächlich Nieren, aber auch Leber, Herz, Pankreas oder Lungengewebe [Robert-Koch-Institut, 2003]. Inzwischen ist die Anzahl derer, die auf ein Organ warten, derart angestiegen, dass der Bedarf nicht mehr allein durch Organspender gedeckt werden kann. Trotz europaweiter Koordination und Verteilung von geeigneten Transplantaten verstarben ca. 30% der Patienten auf der „Warteliste“, weil das gewünschte Organ nicht rechtzeitig verfügbar war. Erschwert wird die Spendenbereitschaft vieler potentieller Organspender durch die öffentliche Diskussion über die Definition des Hirntodes, der in vielen Ländern den Zeitpunkt der Organentnahme festsetzt, und die damit verbundene Angst der Bevölkerung vor einer vorzeitigen Extratransplantation [Bowman and Richard, 2003]. Obwohl momentan die Bereitschaft zur

Lebendspende von Niere oder Teilen der Leber vor allem bei Familienangehörigen wächst, so besteht dennoch ein eklatanter Mangel an Allotransplantaten, der die moderne Medizin dazu auffordert, geeignete Alternativen zu finden.

1.1.2 Alternativen zur Allotransplantation

Zur Überwindung lebensbedrohlicher Situationen (z. B. durch akutes Organversagen) wäre es wünschenswert, zumindest die Zeit überbrücken zu können, bis ein geeignetes, menschliches Organ gefunden werden kann. Durch die Forschung der moderne Medizin konnten inzwischen Alternativen zur Allotransplantation entwickelt werden:

Gerade die Funktion des Herzens kann zumindest kurzfristig durch maschinelle „künstliche Herzen“ überbrückt werden [Lederman et al., 2002]. Der Einsatz dieser artifiziellen Organe beschränkt sich aber auf physikalische Aufgaben, wie etwa der Blutversorgung des Organismus. Für Organe mit komplexen Stoffwechselwegen (z.B. der Leber) ist jedoch der Einsatz künstlicher Organe zur Zeit nicht vorstellbar.

Durch „tissue-engineering“ könnte es in ferner Zukunft möglich werden, morphologisch korrekt gestaltete Organe aus humanen Stammzellen zu züchten. Einfache Zellverbände lassen sich bereits heute im großen Maßstab produzieren und so ist der Einsatz der „künstlichen Haut“ bei der Versorgung von Brandopfern schon Realität geworden [Bannasch et al., 2003]. Für eine funktionelle Reproduktion komplexerer Organe wie Herz, Niere oder Leber müssen jedoch erst alle notwendigen zellulären Faktoren ermittelt werden, die die Vorläuferzellen zu der gewünschten Zelle mit der richtigen Funktion ausdifferenzieren lassen. Zudem birgt der Einsatz von Stammzellen auch Gefahren, und so kann heute noch nicht vollkommen ausgeschlossen werden, ob die undifferenzierten Zellen nicht das Entstehen von Karzinomen begünstigen könnten.

Eine weitere Alternative zur Allotransplantation ist der Einsatz von tierischen Zellen oder Organen. Schon seit Beginn des 20. Jahrhunderts versucht man, Organe von Tieren auf Kranke zu übertragen, in der Hoffnung, das tierische Gewebe könne die Funktion des humanen Organs ersetzen. Bei dem ersten dokumentierten Fall solch einer Xenotransplantation (gr. *xenos*: fremd) 1905 versuchte man Teile einer Kaninchenniere in den Körper eines Kindes zu übertragen. Im Jahre 1910 erfolgte die Transplantation einer Rhesusaffenniere in eine Patientin. In beiden Fällen wurde das Xenotransplantat in einer hyperakuten Reaktion vom menschlichen Immunsystem durch Antikörper attackiert und abgestossen [Young, 2002]. Anfang der sechziger Jahre wurden weitere Xenotransplantationen

durchgeführt [Cooper et al., 1991], aber erst durch den Einsatz des oben beschriebenen Immunsuppressivums Azathioprin überlebte 1964 ein Patient 9 Monate nach Transplantation mit Schimpansennieren [Reemtsma et al., 1964]. Allerdings stellt eine Xenotransplantation mit soliden Organen trotz stetig verbesserten Immunsuppressiva und wachsendem Wissen über immunologische Abstoßungsreaktionen (s. u.) noch immer ein großes Risiko für den Patienten dar: 1985 wurde ein Pavian-Herz in ein neugeborenes Baby verpflanzt, das 21 Tage nach diesem Eingriff an einem Multiorganversagen verstarb [Bailey et al., 1985]. In den Jahren 1992 und 1994 fanden erneut Xenotransplantationen von soliden Schweineorganen (Herz und Leber) statt und führten in beiden Fällen zu einer hyperakuten Abstoßung mit letalem Ausgang [Makowka et al., 1994].

Größere medizinische Fortschritte erzielte man bislang mit der Transplantation von Zellen oder Zellverbänden, die bisher bei der Therapie unterschiedlicher Krankheiten und Organversagen zum Einsatz kamen: Verkapselte, fötale porcine Inselzellen substituierten über einen Zeitraum von zwei Jahren die Insulinproduktion bei Diabetes Typ I Patienten [Elliott et al., 2000]. Wegen der Verkapselung und der damit verbundenen, räumlichen Trennung der immunologischen Zellen des Rezipienten und der xenogenen Zellen des Transplantats, erreicht man zum einen eine verminderte immunologische Reaktion, zum anderen bietet sie - bei ausreichend kleiner Porengröße der Mikrokapsel - Schutz vor potentiell übertragbaren Bakterien oder Viren (siehe 1.1.4).

Auch bei der Behandlung neurodegenerativer Krankheiten (z. B. Morbus Parkinson und Morbus Huntington) mit porcinen fötalen Zellen des ventralen Mesencephalon, verbesserten sich die neurologischen Fähigkeiten der transplantierten Patienten [Fink et al., 2000, Schumacher et al., 2000].

Mehrfach erprobt wurde bisher auch der Einsatz porciner Hepatocyten in bioartifiziellen Leberunterstützungssystemen, den sogenannten „Bioreaktoren“, durch die das Blut des Rezipienten zirkulieren kann und dadurch entgiftet wird, bzw. die Durchführung einer Nieren- und Leberperfusion mit porcinen Organen zur Überbrückung lebensbedrohlicher Situationen, ausgelöst durch Leber- oder Nierenversagen [Levy et al., 2000, Sauer et al., 2003].

1.1.3 Favorisierte Spendertiere für die Xenotransplantation

Aus phylogenetischer Sicht stehen nicht-humane Primaten der Altwelt dem Menschen am nächsten und wurden daher in der Vergangenheit oft als Spendertiere für die Xenotrans-

plantation in Betracht gezogen. Die Anatomie und Physiologie der Organe dieser Spezies sind der der Menschen am ähnlichsten und auch das humane Immunsystem akzeptiert diese xenogenen Organe besser, weil eine gewisse Kompatibilität zwischen den Blutgruppen gegeben ist. Die Zucht und Haltung der Altweltaffen gestaltet sich jedoch schwierig, zudem bereiten geringe Zahlen von Nachkommen, lange Gestationszeiten, sowie strenge Artenschutzauflagen Probleme. Desweiteren können Mikroorganismen wegen der nahen Verwandtschaft zwischen Menschenaffen und Menschen leicht übertragen werden. Bei klinischen Xenotransplantationen von Pavianlebern kam es zur Übertragung des simianen Foamy Virus (SFV), des endogenen Pavian Retrovirus (BaEV) und des Cytomegalievirus der Paviane (BCMV) auf den Menschen [Allan et al., 1998, Michaels et al., 2001].

Daher werden momentan Tiere als potentielle Spendertiere für die Xenotransplantation favorisiert, die in ihrer Zucht und Haltung einfacher und billiger, und hinsichtlich einer Xenozoonose (Übertragung von Krankheitserregern von einer Spezies auf eine andere) bei der Organtransplantation auf den Menschen deutlich ungefährlicher sind (siehe 1.1.4). Schweine erfüllen diese Kriterien und weisen zudem eine ähnliche Anatomie und Physiologie zu humanen Organen auf [Hannon et al., 1990]. Dennoch bestehen auch hier ungelöste Schwierigkeiten bei der xenogenen Transplantation von porcinen Organen auf den Menschen.

Ethische und juristische Bedenken

Zu ethischen und juristischen Fragen hinsichtlich der Xenotransplantation gibt es eine Vielzahl von Publikationen, auf die hier nur kurz verwiesen werden soll [Melo et al., 2001, Mani et al., 2003, Sykes et al., 2003, Ravelingien et al., 2004].

Physiologische Probleme bei der Xenotransplantation

Inwiefern die physiologischen Unterschiede zwischen den beiden Spezies Schwein und Mensch gerade bei komplexeren Organen wie der Leber eine Xenotransplantation gestatten, muss erst durch intensive Forschung geprüft werden. So werden beispielsweise von der porcinen Leber mehrere Tausend unterschiedliche Enzyme und Hormone exprimiert, die - nach Transplantation in den menschlichen Körper - zumindest teilweise nicht kompatibel sind und daher lebenswichtige Funktionen nicht mehr ausüben [Schön et al., 1999]. Im Tierversuch konnte bisher gezeigt werden, dass humane Wachstumsfaktoren die Proliferation porciner Zellen anregten, was zur Folge hatte, dass die Organe des Schweins wegen eines fehlenden Antagonisten zum unbegrenzten Wachstum angeregt wurden. Ebenfalls ungeklärt

ist die Frage nach der Anpassung der unterschiedlichen Alterungsgeschwindigkeit porciner Organe im Vergleich zu Alterung menschlichen Gewebes. Ob sich porcine Organe eignen, um komplexere Aufgaben zu erfüllen, bleibt abzuwarten, und so dürfte der physiologische Aspekt eine der größten Hürden der Xenotransplantation darstellen.

Immunologische Probleme bei der Xenotransplantation

Das menschliche Immunsystem ist in der Lage, auf körperfremde Zellen und Erreger zu reagieren. Was ansonsten zur Abwehr pathogener Keime wie Parasiten, Bakterien oder Viren erwünscht ist, schadet bei einer Transplantation körperfremder Zellen oder Organe. Bei Allotransplantationen muss daher das Immunsystem des Empfängers supprimiert werden, um eine Abstoßungsreaktion zu vermeiden. Grund für eine Reaktion auf allogene Transplantate ist eine cytotoxische T-Zell Antwort auf unbekannte MHC-Moleküle (major histocompatibility complex). Wegen des MHC-Polymorphismus sind die MHC-Moleküle in den seltensten Fällen kompatibel: nur bei eineiigen Zwillingen wird das Transplantat gut toleriert, da sie über eine identische genetische Ausstattung verfügen und sich damit auch die MHCs gleichen.

Porcine Zellen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Oberflächenproteine deutlich von humanen Zellen und steigern damit das Ausmaß der Immunantwort im Vergleich zu einer Allotransplantation. Man unterscheidet dabei vier unterschiedliche Reaktionen des Immunsystems auf xenogene Transplantate:

1. Die hyperakute vaskuläre Abstoßung

Zum Schutz vor bakteriellen Infektionen verfügt das menschliche Immunsystem über präformierte Antikörper gegen Epitope von Gal- α -1,3-gal-Resten. Diese Epitope kommen auf der Oberfläche von Bakterien und allen Säugetierzellen vor, mit Ausnahme von humanen Zellen und Zellen von Altweltaffen. Diese Antikörper reagieren nach einer Xenotransplantation mit den Antigenen des porcinen Gefäßendothels und können innerhalb von Minuten eine komplementabhängige Abstoßung bewirken. Wegen des aktivierten Komplement- und Gerinnungssystems kommt es zu einem Gefäßverschluss im Transplantat und damit zum Absterben des Gewebes. Zudem sind komplementregulatorischen Proteine wie CD59, DAF („decay-accelerating factor“, CD55) und MCP („membrane-cofactor-protein“, CD46) artspezifisch und somit stimulieren diese porcine Proteine zusätzlich eine ungewollte Komplementaktivierung [Rosengard et al., 1995].

Inzwischen ist es jedoch gelungen, transgene Schweine zu züchten, denen die beiden Kopien des Gens α -1,3-Galactosyltransferase fehlen, oder in denen die porcinen, komplementregulatorischen Proteine durch humane Varianten ersetzt wurden [Schmoeckel et al., 1997, Phelps et al., 2003]. Kommen Organe dieser transgenen Tiere bei einer Xenotransplantation zum Einsatz, sollte eine hyperakute vaskuläre Abstoßung ausbleiben.

2. Die akut vaskuläre Abstoßung

Die akut vaskuläre Abstoßung tritt erstmals vier bis acht Tagen nach der Xenotransplantation auf und wird ebenfalls durch humane Antikörper gegen Kohlenhydrat-Epitope porciner Zellen induziert. Es folgt eine Komplement- und Endothelzellaktivierung im Transplantat. Dies führt zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen, die eine Anlagerung und Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Monozyten bewirken, und zu einem Verlust der ansonsten anti-thrombogenen Eigenschaft des Endothels, so dass schließlich die Zell-Lyse des porcinen Organs erfolgt [Cooper, 1996]. Bei diesem Typ der Transplantatabstoßung wird häufig ein Titeranstieg von zirkulierenden anti-porcinen IgMs beobachtet, die zum großen Teil im Xenotransplantat lokalisiert sind.

Mittels spezifischer IgM-Depletion (Immunapherese) oder Einsatz von monoklonalen anti-IgM-Antikörpern konnte im Tiermodell bereits die akut vaskuläre Abstoßung zuverlässig verhindert werden [Leventhal et al., 1994, Sato et al., 1999]. Ebenfalls denkbar ist eine Inhibierung der nach spezifischer Antikörperbindung folgenden Komplementaktivierung durch Gabe von C1-Inhibitor oder sCRI („soluble complement receptor type I“) [Davis et al., 1996, Kirschfink, 2002].

3. Die akute T-Zell vermittelte Abstoßung

Durch die Präsentation kurzer Peptidantigene auf der Oberfläche porciner Zellen über das Histokompatibilitätskomplex (MHC)-I-Molekül erfolgt die Erkennung des fremden Gewebes durch die T-Zellen des menschlichen Immunsystems. Darauf folgt eine klonale Expansion CD4-positiver T-Helferzellen und CD8-positiver zytotoxischer T-Lymphozyten (CTLs), die spezifisch gegen diese porcinen Epitope gerichtet sind. Durch Induktion von Apoptose führt dies schließlich zur Degeneration des xenogenen Transplantats und somit zur Abstoßung innerhalb einiger Tage oder Wochen.

Aus Erfahrungen bei der Allotransplantation, bei der ähnliche Phänomene auftreten (obgleich xenogene Zellen vom Schwein auf humane T-Zellen ungleich immunogener

wirken als allogene), konnte man bereits erhebliche Erkenntnisse über erfolgreiche Immunsuppressiva sammeln, die daher auch bei der Xenotransplantation von Nutzen sind und die Gefahr der T-Zell vermittelten Abstoßung minimieren [Brouard et al., 1999, Dorling, 2002].

4. Die chronische Transplantat-Abstoßung

Die chronische Abstoßung des Xenotransplantats, die erst nach Monaten oder Jahren auftritt, wird durch eine zunehmende Verengung der Blutgefäße verursacht. Die Gründe hierfür sind noch weitgehend unklar, allerdings erlauben Erfahrungen von Alлотransplantationen Rückschlüsse auf die stattfindenden Prozesse bei dieser Art der Abstoßung: nach einer Phase mit Entzündungserscheinungen im Bereich des Transplantats kommt es zu einer irreversiblen Proliferation des Gewebes durch freigesetzte Wachstumsfaktoren [Shen et al., 1998]. Die blutversorgenden Gefäße verschließen sich weiter, das Transplantat wird nekrotisch und führt schließlich zu einem Organversagen.

1.1.4 Potentielle Übertragung von porcinen Mikroorganismen

Ein großes Problem bei der Xenotransplantation stellt die mögliche Übertragung von porcinen Erregern auf den Menschen dar. Durch den lange andauernden, direkten Kontakt zwischen dem Organ des Schweins innerhalb des menschlichen Organismus in Verbindung mit erheblicher Immunsuppression erscheint eine Übertragung von Viren, Bakterien oder Parasiten durchaus wahrscheinlich. Viele gefährliche Epidemien entstanden aus der Übertragung tierischer Mikroorganismen auf den Menschen, darunter beispielsweise das humane Immundefizienzvirus (HIV) oder die humanpathogenen Coronaviren, die Erreger des schweren akuten Atemnotsyndroms („severe acute respiratory syndrome“, SARS) [Grimm et al., 2003, Weingartl et al., 2004].

Folgende nicht-virale Erreger des Schweins sind nachweislich auf den Menschen übertragbar und wirken humanpathogen: *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Trichinella spiralis*, *Streptococcus suis*, *Campylobacter coli*, *Mycobacterium avium*, *Leptospira interrogans*, *Brucella suis*, *Listeria*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* [Fishman, 1997, Tucker et al., 2002]. Durch spezielle Zucht und Haltung unter SPF- („specified pathogen free“) Bedingungen lassen sich diese bekannten Erreger allerdings aus den Schweinen eliminieren [Swindle, 1998].

Von größerer Bedeutung hinsichtlich der Risikobewertung der Xenotransplantation sind

Viren, die daher im weiteren Gegenstand der Betrachtung sind. So sind Schweine Wirte der zu den Orthomyxoviren gehörenden Influenzaviren, die wegen ihrer hohen Variabilität stets für jährlich wiederkehrende Neuinfektionen sorgen [Wells et al., 1991, Dowdle, 1997]. Vor allem bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem (ältere Menschen, Kinder, immunsupprimierte Patienten nach Transplantation) können diese Infektionen letal verlaufen. Man vermutet, dass die Übertragung eines Schweineinfluenzavirus Auslöser der sogenannten Spanischen Grippe war, der in den Jahren 1918 und 1919 in Europa über 20 Millionen Menschen zum Opfer fielen [Taubenberger et al., 1997].

Als Nipah-Virus bezeichnet man ein anderes humanpathogenes Schweinevirus, das zu den Paramyxoviren gehört. Es verursachte auf asiatischen Schweinefarmen etliche Todesfälle [Chua et al., 2000, Chua, 2003]. Ebenfalls tödlich verlaufen kann eine Xenozoonosis des zu den Flaviviren gehörenden Japanischen Enzephalitis Virus (JEV), das nach Replikation im Schwein über Stechmücken auf den Menschen übertragbar ist [Joo, 1989]. Andere potentiell übertragbare Viren wie das Vesicular Stomatitis Virus (VSV), das Maul- und Klauenseuchevirus, das Swine Vesicular Disease Virus (SVDV), das Tollwutvirus, das Vacciniavirus, das Schweinepapovirus (PPV), das Schweinepockenvirus, das porcine Enzephalomyocarditisvirus, die Herpesviren, sowie die erst kürzlich entdeckten Schweinehepatitisviren sind bei normaler Immunkompetenz bzw. bei einer prophylaktisch durchgeführten Impfung als eher ungefährlich einzustufen [Borie et al., 1998, Mettenleiter, 1991, Ehlers et al., 1999, Meng et al., 1997]. Die genannten, in Schweinen vorkommenden Viren ließen sich ebenfalls durch keimfreie Züchtung und Haltung aus den für Xenotransplantation vorgesehenen Schweinen entfernen. Komplizierter dürfte dies für die Schweinecircoviren PCV 1 und 2 zu erreichen sein, da angenommen wird, dass die kleinen, widerstandsfähigen Viren transplazentar übertragen werden können [Allan and Ellis, 2000]. Die Infektion der Schweine mit diesen Circoviren wird mit dem sogenannten „Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome“ (PMWS) in Verbindung gebracht [Rovira et al., 2002]. Wegen des breiten Wirtsspektrums der Circoviren besteht durchaus die Möglichkeit einer Xenozoonose.

Desweiteren sind bislang unbekannte Erreger problematisch, die nur schwer zu identifizieren sind, da sie in ihrem natürlichen Wirt aufgrund fehlender pathogener Merkmale nicht erkannt werden. Die fatalen Folgen einer Infektion mit bis dahin unidentifizierten Viren werden am Beispiel des Ebola-, Marburg- und SARS-Virus [Smith et al., 1967, Drosten et al., 2003] oder aber an der Übertragung des simianen Immundefizienzvirus (SIV) auf den Menschen [Gao et al., 1999] deutlich.

Eine weitere Gefahr bei der Xenotransplantation geht von porcinen endogenen Retroviren

(PERV) aus, die als integraler Bestandteil des Genoms in der Keimbahn des Schweins persistieren und sich daher auch durch keimfreie Zucht und Haltung nicht eliminieren lassen [Denner, 1998, Mang et al., 2001].

1.2 Retroviren

Vor fast 100 Jahren wurden Retroviren erstmalig beschrieben. 1908 gelang es Ellermann und Bang die Leukämie der Maus durch Ultrafiltrate auf andere Mäuse zu übertragen, und 1911 infizierte Rous gesunde Hühner mit dem Ultrafiltrat aus Geflügelsarkomen und induzierte dadurch ebenfalls diese Tumorerkrankung. Einen weiteren Hinweis auf das pathogene Potential der Retroviren erhielt man 1936: J.J. Bittner gelang es, den Erreger zu isolieren, der zur Entstehung von maligner Milchdrüsenerkrankung der Maus führt. Dieses als Maus-Mammatumor-Virus (MMTV) bezeichnetes Retrovirus kann neben der konventionellen, horizontalen Übertragung auch über Zellen der Keimbahn vertikal an nachfolgende Generationen übertragen werden. Anfang der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts wurden erstmals humanpathogene Vertreter der Retroviren, wie das humane T-Zell-Leukämie-Virus (HTLV) oder das humane Immundefizienzvirus (HIV) beschrieben [Poiesz et al., 1980, Barre-Sinoussi et al., 1983, Kalyanaraman et al., 1982]. Diese und weitere wichtige Vertreter der Familie der *Retroviridae* sind in der Tabelle 1.1 verzeichnet.

Erst durch moderne molekularbiologische Methoden konnte die Besonderheit der Retroviren entschlüsselt werden: sie verdanken ihren Namen der Tatsache, dass ihr einzelsträngiges RNA-Genom im Gegensatz zu dem sonst üblichen Informationsfluss DNA-RNA-Protein mit Hilfe der für Retroviren charakteristischen „Reversen Transkriptase“ zu doppelsträngigen DNA, der sog. „proviralen Sequenz“ umgeschrieben wird (siehe Kapitel 1.2.5).

1.2.1 Taxonomie der Retroviren

Die Familie der *Retroviridae* ist unterteilt in sieben Genera, die α -, β -, γ -, δ - und ε -Retroviren, sowie die Lentiviren und Spumaviren. Charakteristische Vertreter sind in Tabelle 1.1 aufgeführt. Diese Unterteilung erfolgte nach morphologischen und genetischen Unterschieden, bzw. den Unterschieden in dem Verlauf der viralen Infektion [Modrow, 2003]. Retrovirale Erreger sind überwiegend für Wirbeltiere infektiös und können Krankheiten unterschiedlicher Symptomatik (z. B. Tumorerkrankung, Immundefizienzen, neurologische Defekte) induzieren (siehe 1.2.2).

Zusätzlich zu dem Genus unterscheidet man *exogene* oder *endogene* Retroviren. Erstere besitzen neben allen notwendigen Elementen, die für die Expression der viralen Proteine und somit zur Freisetzung viraler Partikel benötigt werden, manchmal zusätzliche genetische Informationen mit tumorerzeugendem Potential (Onkogene) und können horizontal von Organismus zu Organismus übertragen werden. Endogene Retroviren hingegen sind in allen Zellen eines Wirtes in das Genom integriert und werden vertikal über Keimbahnzellen übertragen. Unter besonderen Einflüssen bilden sie, bei intakter proviraler Sequenz, infektiöse Partikel. Überwiegend defekte endogene Retroviren wurden inzwischen in allen Genomen von Säugern und Vögeln nachgewiesen und auch das menschliche Genom besteht teilweise aus Retrovirus-ähnlichen, beweglichen Elementen, den sog. Retrotransposons [Kazian, 2004].

1.2.2 Das pathogene Potential von Retroviren

Retrovirale Erkrankungen sind mit einer Vielzahl unterschiedlicher Symptome assoziiert, hauptsächlich jedoch mit Tumorentstehung, mit Immundefizienz oder mit der Entstehung neurologischer Defekte. Die Ursachen dieser Krankheitsbilder sind vielseitig und von der genetischen Ausstattung der Viren abhängig.

Unter den onkogenen Retroviren unterscheidet man akut und chronisch transformierende Formen. Wie in Kapitel 1.2.5 näher beschrieben, findet die Integration der Proviren chronisch transformierender Retroviren unspezifisch in den Chromosomen des Wirtes an zufälligen Positionen statt. Tumore, die sich nach einer langen Latenzperiode zwischen Infektion und Transformation bilden, sind monoklonal, d.h. der Tumor entsteht aus einer einzigen transformierten Vorläuferzelle. Grundsätzlich können Tumore durch Aktivierung oder Inaktivierung von Genen induziert werden. Während für die Aktivierung eines Gens die Integration in einem allelen Locus ausreicht, setzt die Ausschaltung eines Gens die Integration in beide allele Loci voraus. Letztere Möglichkeit ist statistisch sehr unwahrscheinlich, und man konnte tatsächlich zeigen, dass in den meisten Fällen die Transformation von Zellen durch Insertionsmutagenese induziert wurde, indem durch Integration von Retroviren transformierende Gene den physiologischen Regulationsmechanismen des Wirts entzogen werden. Die Aktivierung von (normalerweise physiologisch regulierten) Protoonkogenen (z.B. *c-myc*) durch die Promotoraktivität der „long terminal repeats“ (LTR) von benachbarten Retroviren (siehe 1.2.5) bewirkt beispielsweise eine Überexpression des Transkriptionsfaktors und führt schließlich zur Karzinogenese [Klein, 1988].

Genus	Mensch	Tier	Typ
α -Retrovirus		aviäres Leukosevirus (ALV)	exogen
		aviäres Erythroblastosisvirus (AEV)	exogen
		aviäres Myoblastosisvirus (AMV)	exogen
		Rous-Sarkomvirus (RSV)	exogen
		Rous-assoziiertes Virus	exogen
β -Retrovirus		Maus-Mammatumor-Virus (MMTV)	endo/exogen
		ovines Lungenadematosevirus	exogen
		Mason-Pfizer-Affen-Virus (MPMV)	exogen
	HERV-K-Familie		endogen
γ -Retrovirus		porcines endogenes Retrovirus (PERV)	endogen
		felines Leukämievirus (FeLV)	exogen
		felines Sarkomvirus (FeSV)	exogen
		Moloney-Mausleukämievirus (Mo-MLV)	exogen
		Friend-Mausleukämievirus (F-MLV)	exogen
		Affenleukämievirus (SMV)	exogen
		Gibbonleukämievirus (GALV)	exogen
		murines Sarkomvirus (MSV)	exogen
		Harvey-Maussarkomvirus (Ha-MSV)	exogen
		Affen-(Simian-)Sarkomvirus (SSV)	exogen
	ERV-3		endogen
	S71-Familie		endogen
δ -Retrovirus	humane T-Zell- Leukämie-Viren (HTLV-1/HTLV-2)	bovines Leukosevirus (BLV)	exogen
		simianes T-Zell Leukämie Virus (STLV)	exogen
	HRES-1		exogen
			endogen
ϵ -Retrovirus		diverse Fischretroviren	exogen
		Walleye-Dermal-Sarcoma-Virus (WDSV)	exogen
Lentivirus	humane Immun- defizienzviren (HIV-1/HIV-2)	Affenimmundefizienzvirus (SIV)	exogen
		felines Immundefizienzvirus (FIV)	exogen
		bovines Immundefizienzvirus (BIV)	exogen
		Maedi-Visna-Virus der Schafe (MVV)	exogen
		Virus der infektiösen Anämie der Pferde (EIAV)	exogen
		caprines Arthritis-Encephalitis-Virus (CAEV)	exogen
Spumavirus		feline Spumaviren	exogen
		Affenspumaviren	exogen
		bovine Spumaviren	exogen
		equine Spumaviren	exogen

Tabelle 1.1: Charakteristische Vertreter der Retroviren

Aus vielen Tumoren vorwiegend von Vögeln, Katzen und Nagern wurden nach der Gewinnung von Virusisolaten neben retroviralen Elementen zusätzlich auch Sequenzen mit akut transformierender Wirkung entdeckt [Duesberg and Vogt, 1970]. Diese zusätzlichen Gene werden daher als virale Onkogene (*v-onc*) bezeichnet. Die daraus resultierenden Genprodukte führen zu einer Veränderung der Regulation des Zellzyklus und können somit das Tumorstadium induzieren. Da die viralen Onkogene oftmals die retroviralen Strukturgene ersetzen, sind die akut transformierenden Viren in der Regel nicht replikationsfähig. Die viralen Onkogene unterscheiden sich von den zellulären oft durch Deletionen oder Mutationen und stammen aus dem Genom des Wirts. Da für die Entstehung dieser akut transformierender Retroviren mindestens zwei rekombinatorische Ereignisse notwendig sind, sind solche Virusisolate relativ selten.

Oftmals wird bei einer retroviralen Infektion (wie etwa durch HIV) eine Immunsuppression beobachtet, deren Mechanismus noch immer nicht vollständig untersucht ist. Die Infektion immunologisch wichtiger Zellen, wie die der primären T-Lymphozyten, der Makrophagen und Monocyten, die auf ihrer Oberfläche alle die für die Infektion wichtigen Rezeptoren CD4 und CCR5, bzw. CXCR4 exprimieren, reduziert die Anzahl dieser CD4 positiven Zellen und schädigt dadurch das Immunsystem. In der späten Phase der Infektion, nach Ausbruch der Krankheit AIDS, sind die Lymphknoten degeneriert, die Keimzentren aufgelöst, und die noch verbleibenden CD4⁺-T-Zellen produzieren weitere HIV-Partikel. Hinzu kommt eine immunsupprimierende Wirkung des retroviralen transmembranen Hüllproteins, die inzwischen bei den Lentiviren, aber auch den γ -Retroviren nachgewiesen werden konnte. Neben einer verminderten Lymphozytenproliferation [Denner, 1998] kommt es - nach Interaktion des transmembranen Hüllproteins mit peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMCs) - auch zu einer Modulation der Cytokinexpression (gesteigerte Produktion von Interleukin 10 (IL-10) und Interferonen (IFN- α , IFN- γ) und einer gehemmten Produktion von IL-2 und IL-12) [Haraguchi et al., 1995, Denner et al., 1998]. Der genaue molekulare Mechanismus dieser retroviral induzierten Immunsuppression ist noch unerforscht, da die beteiligten zellulären Bindungspartner noch nicht ausreichend identifiziert werden konnten.

Darüber hinaus sind HIV, aber auch andere humanpathogene Retroviren wie HTLV-1, in der Lage, Zellen des zentralen Nervensystems zu infizieren. Nach Ausbruch von AIDS kommt es häufig zur Beeinträchtigung neurologischer Funktionen, wie bei der HIV-assoziierten Demenz [Albright et al., 2003]. Durch Infektion von Makrophagen gelangt HIV über die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn. Makrophagen sind in der Lage, kleine Membran-

vesikel von ihrer Oberfläche abzuschneiden, die den für eine HIV-Infektion wichtigen Co-Rezeptor CCR5 enthalten. Diese Mikropartikel können mit neuronalen Zellen verschmelzen und damit eine Möglichkeit schaffen, die ansonsten nicht suszeptiblen Zellen wie etwa Astrocyten des ZNS zu infizieren. Die Zielzellen von HIV im Gehirn sind jedoch überwiegend die Mikroglia-Zellen, die die HIV-Corezeptoren CCR3 and CCR5 exprimieren [He et al., 1997]. Die Neuropathogenese wird dann durch Expression viraler Proteine wie das Tat-Protein von HIV oder das Oberflächenhüllprotein gp120 ausgelöst, das in neuronalen Zellen Apoptose induziert [Regulier et al., 2004]. Unterstützt wird dieser Effekt durch die cytotoxischen T-Zellen, die über die MHC-Moleküle HIV-infizierte Zellen erkennen und dort ebenfalls Apoptose auslösen können [Yoshioka et al., 1995].

1.2.3 Der Aufbau der Retroviren

Infektiöse retrovirale Partikel haben einen Durchmesser von ca. 100 nm. Das Capsid wird von einer Hüllmembran umgeben, die von der Zytoplasmamembran der Wirtszelle abgeleitet ist. In dieser Hüllmembran ist das virale transmembrane Hüllproteine (TM, „transmembrane subunit“) verankert, das wiederum nicht-kovalent mit dem glykosilierten, viralen Oberflächenprotein (SU, „surface subunit“) verbunden ist. Diese beiden Proteine werden von dem Gen *env* des retroviralen Genoms als ein gemeinsames Vorläuferprotein gebildet und erst später, während der Virusmorphogenese, mittels zellulärer Proteasen gespalten. Bei den porcinen endogenen Retroviren hat das TM Protein ein Molekulargewicht von 15 kDa (p15E), das SU Protein nach Modifikation mit Glykosylresten ein Molekulargewicht von 70 kDa (gp70) (Abb. 1.2).

An der Innenseite der Hüllmembran ist das virale Matrixprotein (MA) über aminoterminal angefügte Myristinsäurereste verankert. Im Inneren eines Partikels befindet sich das Viruscapsid, das je nach Genus des jeweiligen Retrovirus entweder sphärisch-ikosaedrisch, konisch oder exzentrisch angeordnet sein kann. Dieses Viruscore besteht aus den Capsidproteinen (CA), die wie auch die Matrixproteine von dem *gag*-Gen (gruppenspezifisches Antigen) kodiert werden. Innerhalb dieses Cores befinden sich zwei identische einzelsträngige RNA-Moleküle, die die gesamte genetische Information des Virus beinhaltet (siehe 1.2.4). Diese Nukleinsäuren sind an das Nukleocapsidprotein (NC) komplexiert, das ebenfalls prozessierter Bestandteil des Gag-Proteins ist. Desweiteren sind die Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR) Komponenten der retroviralen Partikel, die von dem viralen Gen *pol* kodiert werden und für die Replikation (siehe 1.2.5) und

Morphogenese von Bedeutung sind.

Neben diesen genannten Proteinen, die Bestandteil aller Retroviren sind, gibt es komplexere Retroviren wie etwa Lentiviren oder δ -Retroviren mit zusätzlichen regulatorischen Proteinen (siehe 1.4). Die endogenen Retroviren des Schweins, die den γ -Retroviren angehören, besitzen keine regulatorischen oder akzessorischen Proteine [Czauderna et al., 2000].

1.2.4 Virusgenom

In dem Viruscore sind zwei einzelsträngige RNA-Moleküle lokalisiert, die ähnlich aller eukaryotischen mRNAs eine 5'-Cap-Struktur sowie eine 3'-Polyadenylierung aufweisen. Die Genome aller infektiösen Retroviren weisen die Gene *gag*, *pol* und *env* auf, deren Geneprodukte und Funktionen schon kurz in Kapitel 1.2.3 beschrieben wurden. Die Länge der RNA beträgt bei den porcinen endogenen Retroviren ca. 8100 Nukleotide (nt) [Czauderna et al., 2000], kann jedoch bei anderen Retroviren, wie dem humanen Spumaretrovirus (HSRV), wegen zusätzlicher akzessorischer Gene bis zu 12000 nt lang sein. Direkt an der Cap-Struktur am 5'-Ende angrenzend befindet sich die R-Region (R = redundant), die in identischer Sequenz und Orientierung auch am 3'-Ende des Virusgenoms lokalisiert ist. Benachbart zur R-Region befindet sich eine bei γ -Retroviren etwa 75 nt lange, als U5 (U=*unique*) bezeichnete Sequenz. Wie in Abbildung 1.1 zu sehen, ist die virale RNA an einer als Primerbindungsstelle (PB) bezeichneten Sequenz von 18 Basen mit einer zellulären tRNA hybridisiert, die bei der viralen Replikation eine wichtige Rolle spielt. Im Falle von PERV handelt es sich um tRNA^{Gly}, bei HIV um tRNA^{Lys} [Bartosch et al., 2002]. Zusätzlich ist die virale RNA über die mit ψ bezeichnete Sequenzfolge an dem Nukleocapsidprotein angelagert. Die meisten Retroviren, wie auch die porcinen endogenen Retroviren, bilden im Verlauf der Replikation nur eine gespleißte mRNA (siehe 1.2.5). Die Spleißdonorstelle ist nahe der ψ -Sequenz lokalisiert, der Spleißakzeptor zwischen den Genen *pol* und *env*. Auf das *env* Gen folgt eine purinreiche Sequenz mit mindestens neun Adenosin- und Guanosinresten, die für die Initiation der DNA-Doppelstrang Synthese bei der reversen Transkription wichtig sind. In 3'-Richtung des viralen Genoms schließt sich die U3-Region an, die je nach Retrovirus in ihrer Länge variieren kann. Sie ist - nach Integration ins Wirtsgenom - ein wichtiger Faktor für die Regulation der viralen Expression, da sie Promotoren und cis-aktive Elemente enthält, die von zahlreichen zellulären Proteinen wie der DNA-abhängigen RNA-Polymerase oder unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren gebunden werden.

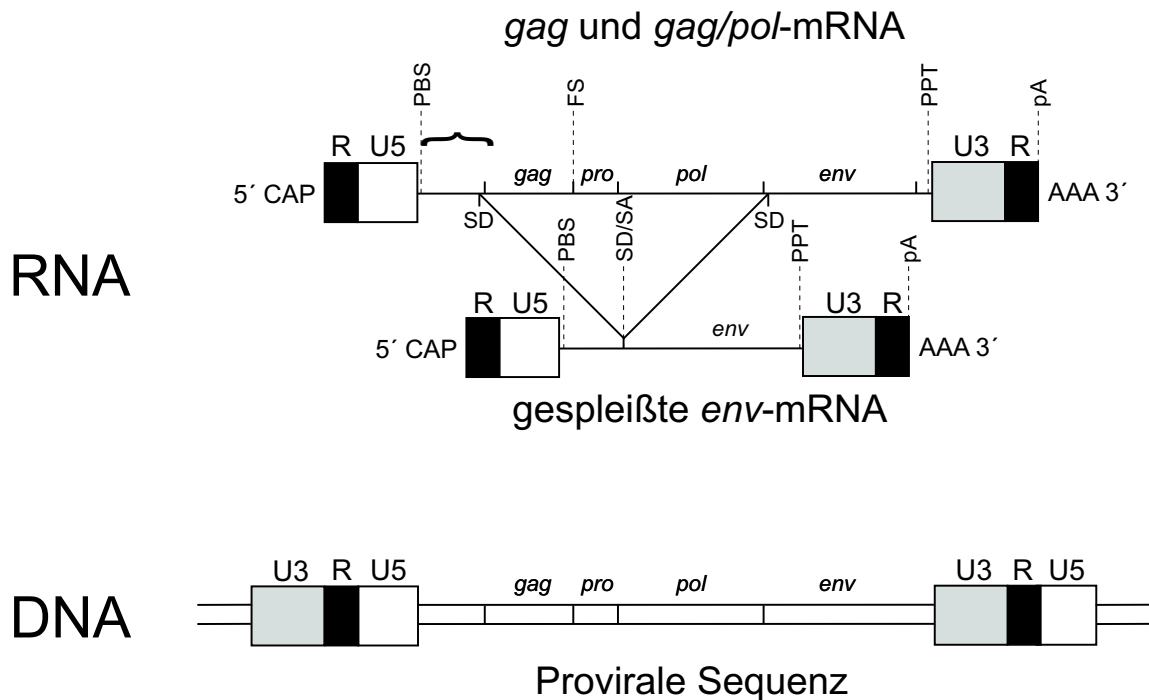


Abbildung 1.1: **Die genomische Organisation der Retroviren.** **Oben:** Die transkribierte virale Vollängen-RNA, kodierend für das Gag-Protein und das Gag-Pol-Fusionsprotein, sowie die gespleißte *env*-mRNA. **Unten:** Die genetische Struktur nach der Integration als Provirus in die zelluläre DNA. Weitere Erläuterungen zu den viralen Elementen, siehe Text.

1.2.5 Replikation der Retroviren

Retroviren können mittels des Oberflächenhüllproteins (SU) spezifisch an zelluläre Oberflächenproteine binden. Für HIV konnte beispielsweise als zellulärer Reaktionspartner der CD4-Rezeptor, ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie, identifiziert werden [Dalglish et al., 1984]. Für die meisten γ -Retroviren stellen häufig Aminosäuretransporter die passenden Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszelle dar [Sommerfelt, 1999]. Der Rezeptor der porcinen endogenen Retroviren wurde ebenfalls vor kurzem identifiziert, jedoch ist dessen zelluläre Funktion unbekannt [Ericsson et al., 2003]. Nach Interaktion der viralen und zellulären Oberflächenmoleküle und Konformationsänderung des SU- und TM-Proteins kommt es zur Aufnahme des Viruscapsids in das zelluläre Zytoplasma mittels Rezeptor vermittelter Endozytose.

Mit Hilfe der in den viralen Partikeln verpackten Reversen Transkriptase (RT) wird das einzelsträngige RNA-Genom in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Dies geschieht in mehreren Schritten mit verschiedenen DNA/RNA-Zwischenprodukten [Coffin et al., 1997].

Zunächst synthetisiert die Reverse Transkriptase - ausgehend von der hybridisierten tRNA - einen zu der U5- und R-Region komplementären DNA-Strang. Mittels RNase Aktivität, die durch eine Untereinheit der Reversen Transkriptase vermittelt wird (RNase-H), wird der RNA-Anteil des kurzen doppelsträngigen DNA/RNA-Hybrids abgebaut. Das mit der tRNA kovalent verbundene DNA-Molekül hybridisiert nun am 3'-Ende des retroviralen RNA-Strangs an der zum 5'-Ende identischen R-Region und katalysiert hier ebenfalls mittels RT die DNA-Synthese des Erststranges. Der RNA-Strang wird anschließend durch RNase-H größtenteils degradiert, allerdings bleibt ein kurzes RNA/DNA-Hybrid bei der purinreichen Region bestehen, das resistent gegenüber der RNase-H ist. Dieses verbliebene RNA-Fragment dient als Primer für den Beginn der nun folgenden Synthese des DNA-Zweitstranges, der sich in 5'-3'-Richtung bis zu der PB-Region mit hybridisierter tRNA erstreckt. Nach Abbau der tRNA entsteht an dieser Stelle ein 3'-Überhang, komplementär zur PB-Region des Erststranges. Die Hybridisierung dieser zwei DNA-Moleküle liefert die Primärstruktur der nachfolgenden Synthese des proviralen Doppelstranges. Nach dem Auffüllen der einzelsträngigen Enden, liegt das Virusgenom als doppelsträngiges DNA-Molekül vor, bei dem die kodierenden Sequenzen *gag*, *pol* und *env* von U3-, R- und U5-Regionen flankiert werden, den sogenannten „long terminal repeats“ (LTR). Wegen der fehlenden Fehlerkorrektur der Reversen Transkriptase kommt es bei der Synthese der beiden DNA-Stränge relativ häufig (bei einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-3} bis 10^{-4}) zu einem Einbau falsch gepaarter Basen, der für die hohen Mutationsraten der Retroviren verantwortlich ist. Die doppelsträngige provirale DNA bleibt - bis zur Virusintegration in das chromosomale Genom der Wirtszelle - mit den viralen Proteinkomponenten verbunden und wird als Präintegrationskomplex in den Zellkern transportiert. Da die Kernporen für den 20 bis 30 nm großen DNA/Proteinkomplex undurchlässig sind, können die meisten Retroviren nur während der Zellteilung infizieren, sobald bei der Mitose die Kernmembran aufgelöst wurde. Lentiviren wie HIV bilden hier eine Ausnahme, da sie über das akzessorische Protein Vpr verfügen, das Teil ihres Präintegrationskomplexes ist und den Transport in den Zellkern katalysiert.

Im Zellkern kommt es mittels Integrase, der dritten enzymatischen Komponente des Pol-Proteinkomplexes, zur Integration in das zelluläre Genom. Die Integrase entfernt ein Dinukleotid von beiden 3'-Enden der viralen DNA und schneidet durch Endonuklease-Aktivität die zelluläre DNA an einer unspezifischen Stelle, so dass jeweils überhängende 5'-Enden gebildet werden. Mittels zellulärer Ligasen werden die 5'-Enden der Wirts-DNA mit den 3'-Enden der viralen DNA verbunden. Bei diesem Vorgang der Integration werden vier bis

sechs Basen der zellulären DNA, die das integrierte Provirus flankieren, dupliziert. Das Virusgenom hingegen verliert seine zwei endständigen Nukleotide.

Nach der Integration kommt es - ähnlich der Expression von Wirts-mRNA - über den zellulären Transkriptionsapparat mit der DNA abhängigen RNA-Polymerase II zur Transkription viraler RNA. Im Zellkern wird bei den γ -Retroviren mittels Spleißdonor und Spleißakzeptor (siehe 1.2.4) ein für das *env*-Gen kodierendes RNA-Molekül gespleißt. Bei den komplexeren Retroviren wie etwa den Lentiviren existieren hingegen mehrere einfach, bzw. mehrfach gespleißte mRNA-Spezies, die für die regulatorischen oder akzessorischen Proteine kodieren. Während die virale Vollängen-mRNA an freien, zytoplasmatischen Ribosomen zu den Gag-Pro/Pol-Fusionsproteinen translatiert wird, wird die gespleißte *env*-mRNA mittels Signalpeptid an der aminoterminalen Domäne an der Membran des endoplasmatischen Retikulums zu dem Vorläufer Env-Protein prozessiert. Im Verlauf des weiteren Transports über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche kommt es zur Glykosylierung und Spaltung des Env-Vorläufer-Proteins in den transmembranen (TM) und den externen (SU) Teil des Glykoproteins.

Die Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine werden am aminoterminalen Ende myristyliert und gelangen bei den meisten Retroviren, darunter auch den γ -Retroviren und den Lentiviren, mittels zellulärer Strukturen wie dem Zytoskelett zur Plasmamembran, an der die Akkumulation aller viraler Proteine und Nukleotide stattfindet [Rhee and Hunter, 1990, Edbauer and Naso, 1984]: Die genomische Vollängen-RNA kann sich, im Gegensatz zur gespleißten *env*-mRNA oder anderen, zellulären mRNAs, wegen des vorhandenen ψ -Verpackungselements spezifisch an das virale Nukleocapsidprotein, das über RNA-bindende Zinkfinger motive verfügt, anlagern [Dorfman et al., 1993, Gorelick et al., 1988]. Wie *in-vitro* Verpackungsexperimente zeigten, steigert die Anwesenheit von viraler RNA das „Virus-Assembly“ durch verbesserte Interaktion innerhalb der Gag-Proteine [Campbell and Vogt, 1995]. Bisher ist unklar, über welchen Mechanismus sichergestellt wird, dass in jedem Viruspartikel zwei RNA-Moleküle verpackt sind [Rein, 1994]. In den Bereichen der Zelloberfläche, an denen sich virale Bestandteile angelagert haben, kommt es zur Ausstülpung von zellulären Membranbereichen und schließlich zur Bildung von sich abschnürenden Vesikeln. Die virale Protease, die noch als Gag-Pro/Pol-Vorläuferprotein vorliegt, kann - bedingt durch den leicht sauren pH von etwa 6,0 bis 6,2 im Inneren des Partikels - ihre enzymatische Aktivität entfalten, spaltet sich zunächst autokatalytisch ab und sorgt schließlich für die Prozessierung der Matrix-, Capsid- und Nukleocapsid-Proteine, sowie von Integrase und Reverser Transkriptase. Während dieses Reifungsprozesses kommt es zugleich zu einer

strukturellen Umlagerung der Capsidproteine, was schließlich zu infektiösen retroviralen Partikeln führt, so dass der Replikationszyklus erneut beginnen kann.

1.2.6 Porcine endogene Retroviren

Porcine endogene Retroviren (PERVs) wurden erstmals zu Beginn der siebziger Jahre im Kulturüberstand einer porcinen Nieren-Zelllinie (PK-15) elektronenmikroskopisch identifiziert [Breese, 1970]. Auch bei der Kultivierung anderer porciner Zelllinien konnte die Freisetzung viraler Partikel beobachtet werden, die aufgrund der Morphologie dem Genus der γ -Retroviren entsprechen [Armstrong et al., 1971, Woods et al., 1973, Todaro et al., 1974]. Eine entsprechende Virusreplikation aus primären PBMCs konnte jedoch erst nach Stimulierung mit Mitogenen beobachtet werden [Wilson et al., 1998, Tacke et al., 2003]. Die Viruspartikel haben einen Durchmesser von etwa 100 nm und weisen die für alle Retroviren typischen viralen Proteine Gag, Pol und Env auf (siehe Abb. 1.2). Die Bezeichnungen der viralen Proteine mit den entsprechenden Größenangaben erfolgten nach Analyse des Molekulargewichts anhand der SDS-Gelelektrophorese [Tacke et al., 2000].

Bei der Isolierung intakter porciner endogener Retroviren fand man ausschließlich γ -Retroviren, die in die Subtypen A, B und C eingeteilt wurden. Die Subtypen PERV-A und PERV-B identifizierte man nach Kultivierung von humanen embryonalen Nierenzellen (293) mit dem Überstand der porcinen Nierenzelllinie PK-15. PERV-C wurde hingegen aus den Lymphozyten eines Miniaturschweins („miniature swine lymphocytes“, MSL) isoliert [Akiyoshi et al., 1998]. Dieses ecotrope PERV-C kann nur Zellen der eigenen Spezies (z. B. die porcine Zelllinie ST-IOWA) infizieren [Oldmixon et al., 2002]. Demgegenüber verhalten sich PERV-A und -B polytrop und können sowohl humane Zellen (Abb. 1.3), wie auch Säugetierzellen anderer Spezies infizieren. Umfangreiche Studien wurden zur Untersuchung des Wirtsspektrums porciner endogener Retroviren durchgeführt: eine Vielzahl von humanen primären Zellen und Zelllinien zeigten nach der Infektion mit porcinen endogenen Retroviren unter *in vitro* Bedingungen Virusreplikation und -freisetzung [Patience et al., 1997, Specke et al., 2002b]. Desweiteren ließen sich *in vitro* Zellen von Nerz, Katze, Pavian, und Rhesusaffe mit PERV infizieren [Wilson et al., 2000, Specke et al., 2001b]. Diese Erkenntnisse könnten bei der Etablierung eines Tiermodells zur Untersuchung der Viruspathogenese von Bedeutung sein.

Die Gründe für die verschiedenen Wirtsspektrum der PERV-Subtypen sind die unterschiedlichen Sequenzen des Env-Proteins und damit die unterschiedlichen Bindungsstellen für den

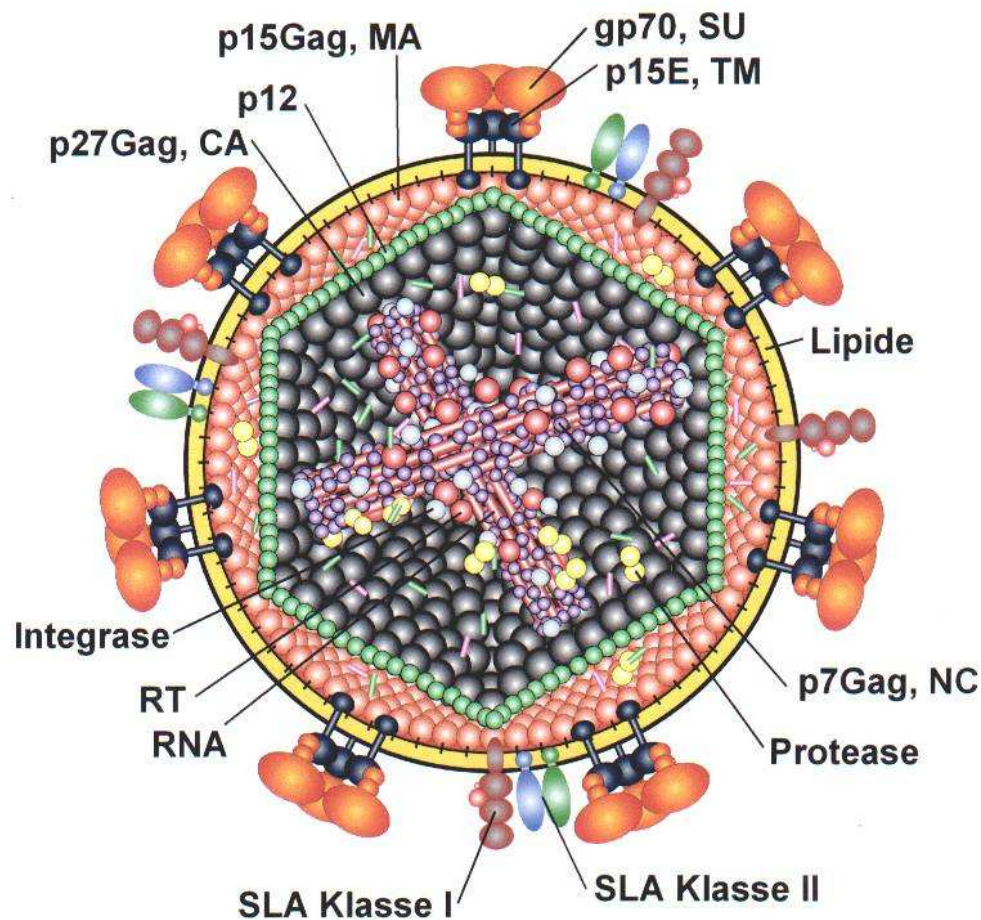


Abbildung 1.2: Die Morphologie des porcinen endogenen Retrovirus schematisch dargestellt. Weitere Angaben zu den viralen Proteinen siehe Text (modifiziert nach Dr. S. Norley, Robert Koch-Institut, Berlin).

zellulären Rezeptor. Zwei humane Rezeptoren für PERV-A („human PERV-A receptor“, huPAR-1/-2) konnten kürzlich identifiziert und kloniert werden, allerdings sind deren zelluläre Funktionen bislang unbekannt [Ericsson et al., 2003].

Southern-Blot Analysen zeigten, dass die Anzahl der proviralen PERV-Integrationsorte je nach Schweinerasse zwischen 10 und 100 liegen kann [Bosch et al., 2000, Herring et al., 2001]. Allerdings weisen die meisten dieser PERV-Proviren Mutationen und Deletionen auf, die vermuten lassen, dass sie keine infektiösen Partikel mehr bilden können [Patience et al., 2001, Lee et al., 2002]. Die identifizierten replikationskompetenten PERVs unterscheiden sich innerhalb des *gag*- und *pol*-Gens kaum, innerhalb des *env*-Gens jedoch deutlich [Tissier et al., 1997]. Aufgrund dieser Sequenzhomologie wird die Rekombination der unterschiedlichen Subtypen erleichtert. So konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass es zur

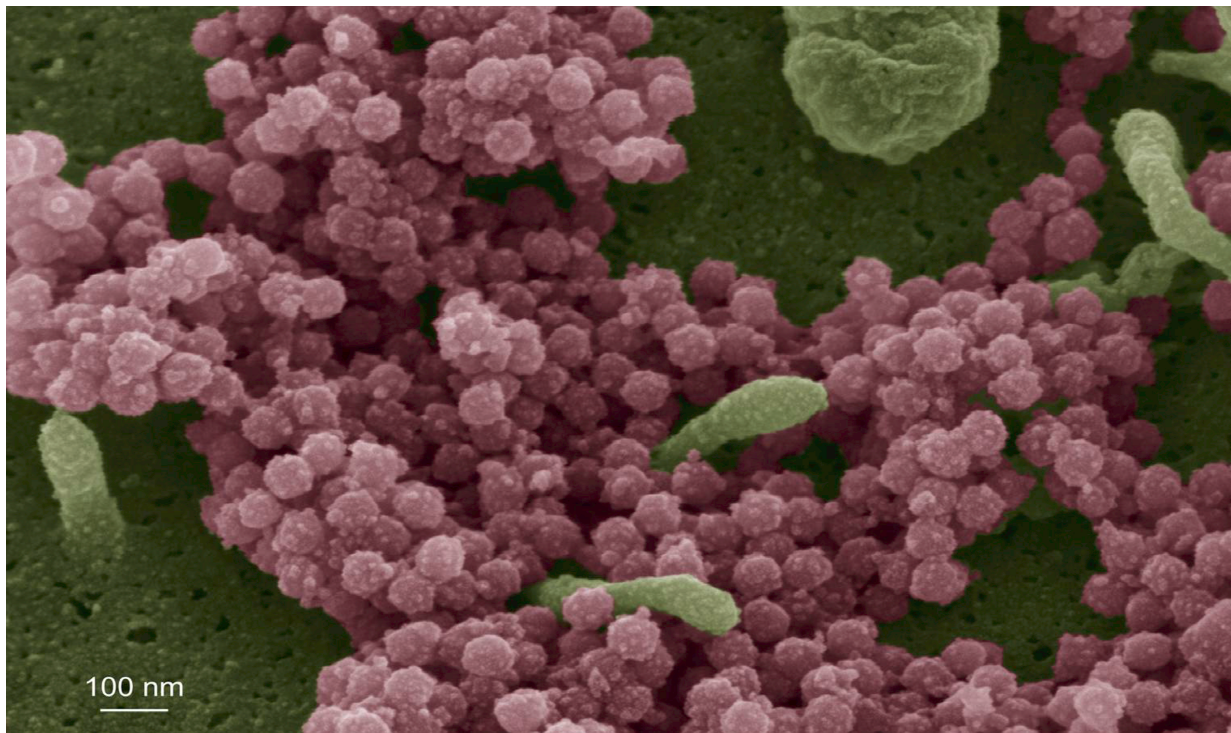


Abbildung 1.3: **Rastertunnelelektronenmikroskopische Aufnahmen von PERV.** Die humanadaptierte PERV-A/C-Rekombinante bei der Knospung („budding“) aus humanen embryonalen Nierenzellen (293) (Dr. M. Özel, Robert Koch-Institut, Berlin).

Bildung von PERV-A/C-Rekombinanten kommen kann [Wilson et al., 1998, Wood et al., 2004]. Dabei können auch exogene Viren entstehen, die in der Lage sind, humane Zellen zu infizieren, da die Rezeptorbindungsstelle von dem PERV-A Anteil kodiert wird.

Durch die Verwendung degenerierter Primer konnten weitere porcine endogene Retroviren im Genom von Schweinezellen unterschiedlicher Rassen identifiziert werden [Patience et al., 2001]. Diese retroviralen Sequenzen besitzen Sequenzhomologien zu den β - oder γ -Retroviren und weisen Mutationen oder Deletionen auf, so dass keine intakten Virionen gebildet werden können. Daher stellen diese retroviralen Elemente nur eine Gefahr bei Rekombination mit anderen endogenen Retroviren dar.

Da die humanotropen PERVs (Subtypen A und B) nahe mit dem Gibbonleukämievirus (GALV) und dem Mausleukämievirus (MLV) verwandt sind, muß befürchtet werden, dass es nach einer potentiellen Übertragung auf den Menschen ebenfalls zu einer Immunsuppression oder einer Induktion von Tumoren kommen könnte [Tissier et al., 1997, Patience et al., 1997, Akiyoshi et al., 1998, Denner, 1998]. Wie auch bei anderen exogenen und endogenen Retroviren kann PERV durch Vervielfältigung bestimmter „Enhancer“-Elemente innerhalb

der LTR die Expression der eigenen viralen RNA steigern. Eine solche Multimerisierung der Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors NF-Y konnte nach mehrfacher Passagierung des Virus in humanen Zellen gezeigt werden [Denner et al., 2003].

Zur Beurteilung der pathogenen Eigenschaften der porcinen endogenen Retroviren wäre ein Tiermodell hilfreich, um überprüfen zu können, ob es zu einer solchen Modulation der Immunantwort oder der Induktion eines anderen Virus-assoziierten Krankheitsbildes durch PERV kommt. Trotz umfangreicher *in vivo* Studien mit nicht-humanen Primaten und vielen Kleintieren, konnte bislang jedoch noch keine *in vivo* Übertragung von PERV bei experimentellen oder klinischen Xenotransplantationen beobachtet werden [Denner et al., 2001, Specke et al., 2001b, Specke et al., 2002b, Specke et al., 2002a]. Die einzigen dokumentierten Fälle einer PERV-Übertragung bei einer Transplantation porciner Inselzellen auf SCID-Mäuse [van der Laan et al., 2000, Deng et al., 2000] sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Mikrochimärismus, bzw. auf die Bildung von Pseudotypen mit den murinen Leukämieviren (MLV) zurückzuführen, da Mäuse bezüglich des identifizierten PERV-A-Rezeptors negativ sind. Gelänge die Herstellung transgener Mäuse mit PERV-Rezeptoren auf der Zelloberfläche, wäre es hingegen denkbar, Mäuse mit PERV zu infizieren und somit die pathogene Wirkung zu analysieren.

Eine Übertragung auf den Menschen bei zukünftigen Xenotransplantationen kann bislang nicht völlig ausgeschlossen werden, und die Gefahr einer Xenose vergrößert sich bei dem Einsatz transgener Schweine, denen - zur besseren Akzeptanz des porcinen Organs - durch doppelten Gen-Knockout der $\alpha 1,3$ -Galaktosyl-Transferase das α -Gal-Epitop fehlt [Phelps et al., 2003]. Dies senkt zwar die Wahrscheinlichkeit einer Abstoßungsreaktion des Transplantats (siehe 1.1.3), erhöht jedoch den Schutz der porcinen endogenen Retroviren vor der humanen Immunantwort: Da nunmehr keine Gal-Epitope in der Hüllmembran der porcinen endogenen Retroviren während das „buddings“ eingelagert werden können, sind die ansonsten xenoreaktiven Antikörper gegen das Gal-Epitop wirkungslos.

Auch die Expression von humanen komplement-regulierenden Proteinen wie CD59, DAF und MCP (siehe 1.1.3) auf der Oberfläche porciner Endothelzellen senkt einerseits die Aktivierung des humanen Komplementsystems und steigert daher die Akzeptanz der xenogenen Organe [Miyagawa et al., 1994, Byrne et al., 1997]. Andererseits muß befürchtet werden, dass durch Inkorporation dieser humanen Proteine in die Hüllmembran der porcinen endogenen Retroviren die Inaktivierung der PERVs durch das Komplementsystem stark eingeschränkt wäre. Somit würde ein wichtiger Bestandteil des menschlichen Immunsystems, der nachweislich in der Lage ist, γ -Retroviren zu inaktivieren, entfallen [Takeuchi

et al., 1996, Fujita et al., 2003].

Momentan werden erste Xenotransplantationen mit transgenen porcinen Organen oder Zellen, die hinsichtlich des α -Gal-Epitops negativ sind, in Pavianen durchgeführt. Die Zellen dieser Tiere besitzen, wie auch die der Menschen, keine α -Gal-Epitope auf der Zelloberfläche und lassen sich zudem *in vitro* mit PERV infizieren [Specke et al., 2001b, Ericsson et al., 2003]. Möglicherweise wären Paviane daher geeignete Tiere für die Untersuchung einer Infektion mit PERV unter *in vivo* Bedingungen. Es bleibt abzuwarten, ob es bei dem Einsatz transgener Organe, die von dem Immunsystem des Wirts über mehrere Monate toleriert werden, zu einer Infektion mit PERV kommt.

Entscheidend für den klinischen Einsatz von Xenotransplantaten, die das Risiko potentiell übertragbarer Viren aufweisen, ist das „Monitoring“ der Patienten nach der Transplantation hinsichtlich einer Xenozoonose. Hauptsächlich indirekte immunologische Nachweissysteme, die die Bildung von Antikörpern gegen virale Epitope nachweisen, wurden entwickelt [Stephan et al., 2001, Tacke et al., 2001, Denner et al., 2002, Fischer et al., 2003]. Als Positiv-Kontrollen, mit denen die Sensitivität der Assays überprüft werden kann, wurden Seren gegen die Struktur- und Hüllproteine von PERV mit Hilfe von isolierten Viruspräparationen oder rekombinanten Virusproteinen gewonnen. Zusätzlich wurden hochempfindliche molekularbiologische Methoden wie die quantitative real time PCR für den Nachweis von PERV etabliert [Argaw et al., 2002, Shah et al., 2003].

Sollte es trotz aller Sicherheitsvorkehrungen zu einer Virusübertragung vom Schwein auf den Menschen kommen, so könnten die bei der antiviralen HIV-Therapie eingesetzten Reverse-Transkriptase-Hemmer zum Einsatz kommen. Es konnte gezeigt werden, dass das Nukleosidanalogen AZT auch die Replikation der porcinen endogenen Retroviren *in vitro* inhibieren kann [Qari et al., 2001, Stephan et al., 2001]. Desweiteren gelang die Induktion neutralisierender Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein von PERV mittels eines rekombinant hergestellten p15env-Immunogens [Fiebig et al., 2003], so dass auch eine Impfung gegen PERV möglich erscheint. Da ein entsprechendes Tiermodell (noch) nicht verfügbar ist, kann über den therapeutischen Nutzen einer medikamentösen antiviralen Therapie oder den prophylaktischen Nutzen einer Impfung jedoch nur spekuliert werden.

1.3 RNA-Interferenz (RNAi)

Bei Eukaryonten wie Pflanzen, Protisten, filamentösen Pilzen, Invertebraten und Vertebraten kann es durch Virusinfektion zu unerwünschten Integrationen in das Wirtsgenom kommen, wobei als Zwischenprodukt häufig doppelsträngige RNAs (dsRNA) produziert wird. Die Zellen dieser Organismen haben einen Abwehrmechanismus entwickelt, der auf dsRNA reagiert und deren Genom vor dem Eindringen fremder Sequenzen schützt. Die dsRNA wird mit Hilfe dieses Abwehrsystems zu kleinen RNA-Doppelsträngen mit distinkter Größe und Morphologie degradiert, die ihrerseits in der Lage sind, die virale mRNA sequenzspezifisch zu schneiden. Diese kleinen dsRNAs werden daher als interferierende RNAs („short interfering RNAs“, siRNAs) bezeichnet, während der gesamte Prozess der posttranskriptionellen Inhibition der Genexpression mit dem Begriff der RNA-Interferenz (RNAi) benannt wurde [Hammond et al., 2001a, Matzke et al., 2001, Sharp, 2001, Hutvagner and Zamore, 2002].

Erste Hinweise auf das Phänomen der RNAi wurden 1990 entdeckt, als versucht wurde, die Blütenblätter der Petunien durch Transfektion eines chimären Chalcon-Synthase Gens besonders violett zu färben. Stattdessen wurde eine unerwartete weiße Pigmentierung entdeckt [Jorgensen, 1990]. Später konnte gezeigt werden, dass die stärkste genspezifische Inhibition durch Einbringen doppelsträngiger RNA erreicht wird, die komplementär zu dem zu unterdrückenden Gen ist [Fire et al., 1998].

Die RNA-Interferenz ist ein wichtiges Instrument geworden, um die Funktion bisher unbekannter Gene zu identifizieren. Hauptsächlich bei *Caenorhabditis elegans* gelang es, mittels Transfektion langer dsRNA die Aktivität vieler zellulärer Gene zu unterdrücken, deren Sequenz zu der eingebrachten dsRNA homolog ist [Hope, 2001, Kim, 2001]. Für ein effektives „gene-silencing“ verwendet man häufig dsRNA mit einer Länge von mehreren Hundert Basenpaaren [Parrish et al., 2000]. Inzwischen konnte die RNAi auch bei vielen anderen Invertebraten zur Aufklärung funktionaler Gene erfolgreich eingesetzt werden [Ngo et al., 1998, Brown et al., 1999].

1.3.1 Mechanismen der RNA-Interferenz

Mittels biochemischer Studien mit Zell- oder Embryoextrakten von *Drosophila melanogaster* konnte der Mechanismus der RNA-Interferenz weitgehend aufgeklärt werden. Die lange dsRNA wird zunächst mit dem Ribonuklease III (RNase III) ähnlichen Enzym Dicer zu siRNAs degradiert. Dicer ist aminoterminal mit einer Helikase-Domäne ausgestattet,

anschließend folgt eine PAZ („Piwi-Argo-Zwille“)-Domäne, zwei tandemartig angeordnete Regionen mit RNase III-Aktivität und, am carboxyterminalen Ende, ein dsRNA bindendes Motiv [Cerutti et al., 2000, Nicholson and Nicholson, 2002]. Doppelsträngige RNA lagert sich über die RNA bindende Domäne an und wird anschließend zu kurzen 21-23 Basenpaar langen siRNAs mit zwei bis drei Nukleotiden Überhang am 3'-Ende verdaut [Zamore et al., 2000, Elbashir et al., 2001b, Elbashir et al., 2001c], die - wie bei allen RNase III Reaktionen - eine Phosphatgruppe am 5'-Ende und einen freien 3'-Hydroxyl-Terminus besitzen [Conrad and Rauhut, 2002]. Der Abbau der dsRNA zu kurzen siRNAs ist ATP-abhängig [Zamore et al., 2000].

Darüberhinaus ist Dicer für die Prozessierung sogenannter microRNAs (miRNAs), einer neuen Klasse von kleinen, regulatorischen RNAs, wichtig, die vor allem bei *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster*, inzwischen aber auch aus murinen und humanen Zellen isoliert wurden [Lau et al., 2001, Lagos-Quintana et al., 2001, Aravin et al., 2003, Lagos-Quintana et al., 2003]. Man nimmt an, dass diese miRNAs an der Regulation der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose maßgeblich beteiligt sind [Ambros, 2001, Eddy, 2001, Bartel, 2004]. Die Isolation und Sequenzierung kleiner dsRNAs aus *Drosophila melanogaster* und *Trypanosoma brucei* zeigen zudem, dass Dicer der Zelle mittels Abbau retroviraler Elemente (Retrotransposons) [Djikeng et al., 2001] einen Schutz vor diesen genetischen Elementen bietet [Jensen et al., 1999b, Jensen et al., 1999a, Ketting et al., 1999].

Die siRNA bindet im weiteren Verlauf an den im Cytoplasma vorkommenden Nukleasekomplex RISC („RNA induced silencing complex“), der die sequenzspezifische Erkennung und Degradation der Ziel-mRNA unterstützt. Die doppelsträngige siRNA muss jedoch zunächst in Anwesenheit von ATP entwunden werden [Nykänen et al., 2001]. Dadurch wird RISC aktiviert und schneidet die zelluläre mRNA an einer definierten Stelle innerhalb der siRNA-Bindungsstelle [Elbashir et al., 2001c, Elbashir et al., 2001b]. Mittels zellulärer RNasen wird die mRNA anschließend komplett degradiert und somit die Bildung des Proteins verhindert.

Das Wissen über die genaue Zusammensetzung des Komplexes „RISC“ mit allen katalytischen Untereinheiten könnte dazu beitragen, die Funktionen besser zu verstehen. Außer den Helikase- und Nuklease-Komponenten aus dem RISC von Schneider 2 (S2) Zellen von *D. melanogaster* konnte ein Protein identifiziert werden, das eine PAZ- und eine Piwi-Domäne mit unbekannter Funktion zeigt und daher per Definition zu der „Argonaute“-Genfamilie gezählt wird [Schwarz and Zamore, 2002]. Mitglieder dieser Genfamilie konnten auch bei *C.*

elegans mit RNAi in Verbindung gebracht werden: Eine Mutation in dem Gen *rde-1* des Fadenwurms verhinderte das Phänomen der RNAi [Tijsterman et al., 2002]. In Säugetierzellen wurden ebenfalls Argonaute-Proteine entdeckt, deren Funktion in den letzten Jahren weiter aufgeklärt werden konnte. Zusätzlich zu dem länger bekannten eIF2C-Protein des Kaninchens, das bei der Initiation der Translation von Bedeutung ist [Zou et al., 1998], gelang es kürzlich, mehrere humane Vertreter der Argonaute-Genfamilie zu identifizieren. Dabei wurden Proteine entdeckt, die - je nach Sequenzmotiv - zu der Unterfamilie Piwi (PiwiL1/Hiwi, PiwiL2/Hili, PiwiL3, PiwiL4/Hiwi2) oder eIF2C/AGO (eIF2C1/hAGO1, eIF2C2/hAGO2, eIF2C3/hAGO3, eIF2C4/hAGO4) zählen und an der Entwicklung von Stammzellen, sowie der Spermatogenese beteiligt sind [Sasaki et al., 2003, Doi et al., 2003, Kuramochi-Miyagawa et al., 2004]. Die Struktur der PAZ-Domäne, die nur bei der Nuklease Dicer und den Proteinen der Argonaute-Familie zu finden ist, konnte kristallographisch aufgeklärt werden. Sie ermöglicht die Bindung an dsRNA mit zwei Nukleotiden Überhang am 3'-Ende, die ein charakteristisches Merkmal für siRNAs sind [Song et al., 2003]. Proteine der Argonaute-Familie mit PAZ-Domänen können so zu einer Wechselwirkung der siRNAs mit anderen Proteinen des RNAi-Signalwegs beitragen und sie sind wahrscheinlich an der Interaktion der siRNAs mit Komponenten des RISC beteiligt [Hammond et al., 2001b]. Zumindest das Argonaute2-Protein wurde inzwischen als das Enzym charakterisiert, das für die Nuklease-Aktivität des RISC verantwortlich ist [Liu et al., 2004, Song et al., 2004].

Der Mechanismus der RNA-Interferenz - von der langen dsRNA bis hin zu der degradierten mRNA - ist in Abbildung 1.4 auf der nächsten Seite schematisch dargestellt.

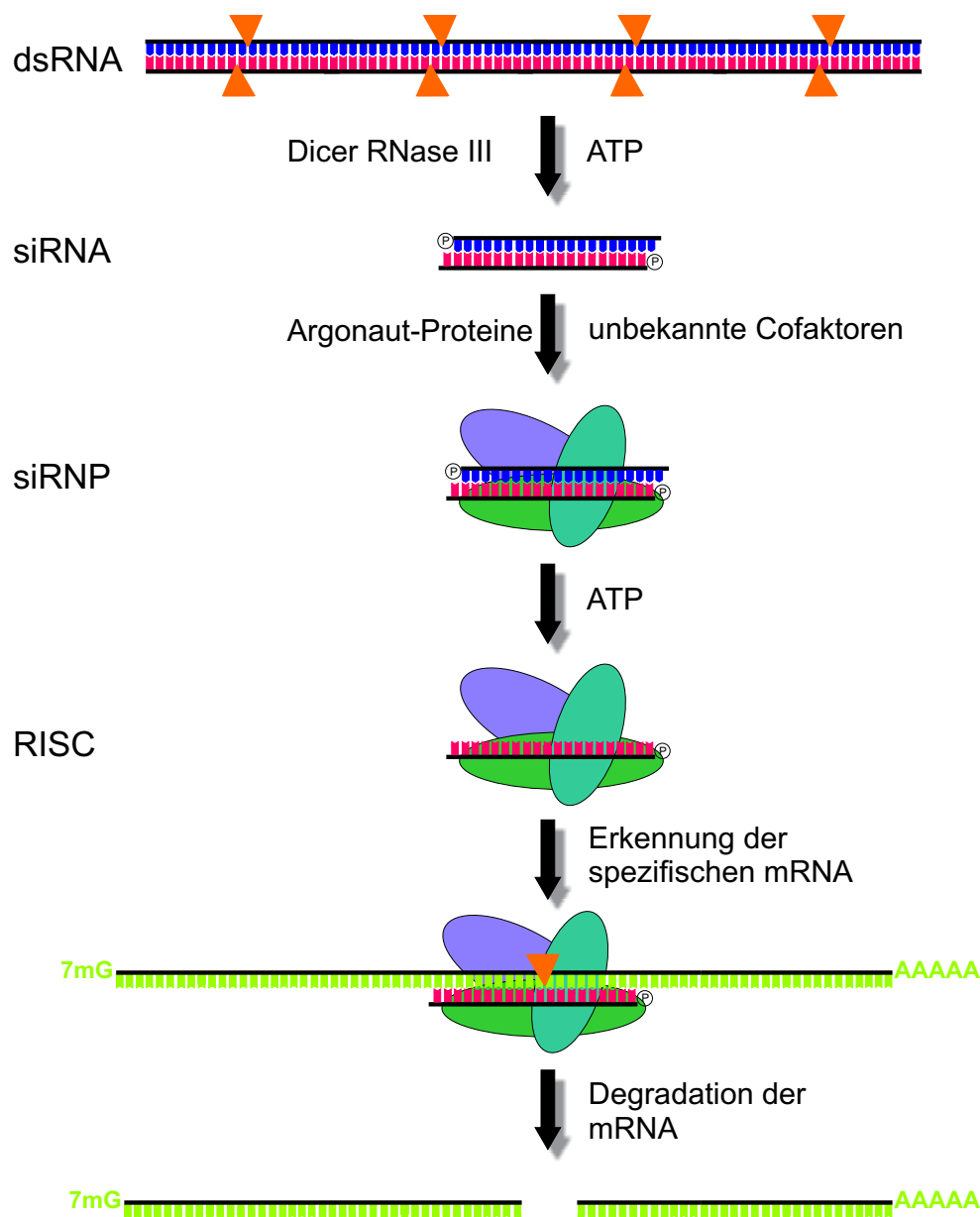


Abbildung 1.4: **Der Mechanismus der RNA-Interferenz.** Die dsRNA wird unter Verbrauch von ATP mittels der Nuklease „Dicer“ mit RNase III-Enzymaktivität zu 21-23 nt siRNAs prozessiert. In Anwesenheit von Proteinen der Argonaut-Genfamilie und noch unidentifizierten Cofaktoren binden diese siRNAs an den sogenannten siRNA-Ribonukleoproteinkomplex (siRNP). Durch eine ATP-abhängige, enzymatische Reaktion wird die doppelsträngige siRNA entwunden. Das führt zu der Aktivierung des „RNA induced silencing complex“ (RISC). Die Endonuklease des RISC degradiert schließlich die mRNA sequenzspezifisch.

1.3.2 RNAi in Säugetierzellen

Der Einsatz doppelsträngiger RNA mit einer Länge von 38 bp bis 1662 bp zur Inhibition zellulärer Gene induziert bei Säugern - im Gegensatz zu den einfacheren Organismen - eine unspezifische Hemmung aller Genprodukte der Zelle [Ui-Tei et al., 2000, Yang et al., 2001, Paddison et al., 2002] und ist nicht geeignet, um funktionelle Gene zu identifizieren, bzw. um diese RNA als Therapeutikum einsetzen zu können [Zhao et al., 2001]. Schon lange ist bekannt, dass doppelsträngige RNA bei Säugetierzellen eine globale Unterdrückung der gesamten Genexpression der Zelle induziert [Hunter et al., 1975]. Man nimmt an, dass dies ebenfalls der Verteidigung vor Viren oder anderen beweglichen, genetischen Elementen dient, die ansonsten in das Wirtsgenom integrieren würden [Marcus, 1983]. Die meisten somatischen Zellen reagieren auf dsRNA mit Aktivierung der Proteinkinase PKR, die ihrerseits den Translationsinitiationsfaktor eIF2 α phosphoryliert, so dass die Translation der Zelle inhibiert ist. Die Aktivierung der Kinase PKR bewirkt zusätzlich, über die Regulation des Transkriptionsfaktors NF- κ B, eine Interferon-Induktion, was wiederum eine Aktivierung der 2',5'-Oligoadenylatsynthetase (2',5'-OAS) zur Folge hat. Als Konsequenz wird die RNase L aktiviert, die dann die gesamte RNA der Zelle unspezifisch schneidet [Barber, 2001, Chawla-Sarkar et al., 2003]. Beides, die Inhibition der Translation, aber auch die Degradation zellulärer RNA führt schließlich zur Apoptose (siehe Abb. 1.5).

Die einzige Ausnahme fand man bei embryonalen Stammzellen oder embryonalen Karzinomzellen der Maus, die nach Transfektion mehrerer hundert Basenpaar langer dsRNA eine spezifische Inhibition eines einzigen Genproduktes zeigten [Billy et al., 2001, Yang et al., 2001].

Für die Analyse funktioneller Gene in adulten Säugetierzellen oder etablierten Zelllinien von Säugetieren mittels genspezifischer RNA-Interferenz ohne unerwünschte Interferon-

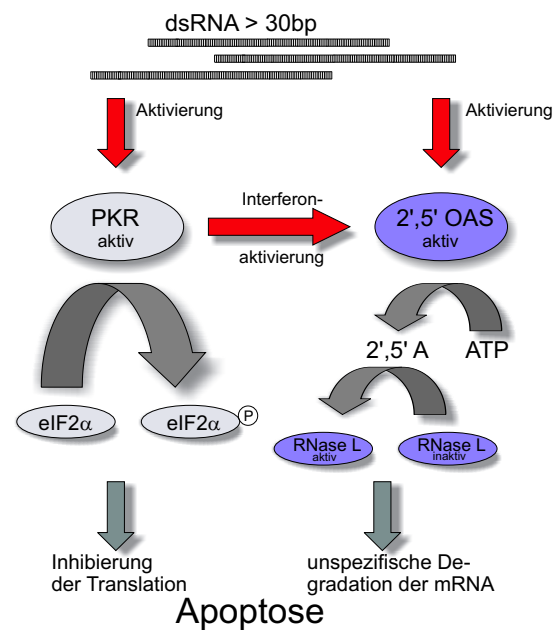


Abbildung 1.5: Die unspezifische Interferonantwort, induziert durch RNAs > 30nt in somatischen Säugetierzellen. Für Erläuterungen, siehe Text, nach [Hannon, 2003].

Antwort, empfiehlt sich jedoch der Einsatz von siRNAs, bzw. kurzen Haarnadel-RNAs („short hairpin RNAs“, shRNAs), die kurz genug sind, um PKR und 2',5'-OAS nicht zu aktivieren.

1.3.3 RNAi-Induktion mittels siRNAs

Als Alternative zur langen dsRNA kann synthetisch produzierte siRNA zur Hemmung zellulärer Gene in Säugetierzellen verwendet werden. Diese chemisch hergestellten siRNAs sind, ebenso wie die Dicer-Spaltprodukte langer dsRNA, meist 21 Nukleotide lang und besitzen einen Überhang (zwei Nukleotide) am 3'-Ende. Wegen ihrer geringen Größe können sie mit einer Effizienz von mehr als 90% in Zellen transfiziert werden, ohne die unerwünschte Interferonantwort auszulösen. Für die Transfektion dieser siRNAs stehen bereits viele kommerzielle, meist auf kationischen Lipiden basierende Transfektionsreagenzien zur Verfügung. Vor allem bei Suspensionszellen stellt auch die Elektroporation von siRNAs eine effiziente Alternative dar [Weil et al., 2002].

Ein Nachteil beim Einsatz synthetischer siRNAs besteht in dem relativ kurzen Zeitraum, in dem die Proteinsynthese gehemmt ist: nach etwa vier bis fünf Tagen fällt die Konzentration funktionaler siRNAs durch Abbau oder wegen weiterer Zellteilungen so weit, dass der Effekt des „gene-silencing“ nicht mehr nachzuweisen ist [Holen et al., 2002]. Erst durch wiederholte Transfektion von siRNAs kann die RNA-Interferenz erneut induziert werden. Ein weiterer Nachteil besteht in den hohen Kosten bei der Synthese der siRNAs.

1.3.4 RNAi-Induktion mittels Expression von Haarnadel-RNAs

Für eine dauerhafte Hemmung der Proteinsynthese eines spezifischen Gens sind synthetisch hergestellte siRNAs aus den genannten Gründen (siehe 1.3.3) ungeeignet. RNA-Moleküle mit Strukturen, die denen der siRNAs ähneln, lassen sich jedoch auch endogen mit Hilfe des Transkriptionsapparates der Zelle exprimieren. Ermöglicht wird dies durch die Klonierung der siRNA-Sequenzen hinter Polymerase III-Promotoren, die in der Lage sind, RNA-Moleküle bis zu einer Länge von etwa 400 Nukleotiden zu transkribieren. Für die Expression dieser Haarnadel-RNAs („short hairpin RNA“, shRNA) werden hauptsächlich die Promotoren der „small nuclear RNA“ U6 und die Promotoren der RNase P RNA H1 verwendet [Hannon et al., 1991]. Die RNA-Transkription wird beendet, sobald die Polymerase III auf eine Ansammlung von vier oder fünf Thyminen trifft [Myslinski et al., 2001]. Dies erlaubt die dauerhafte Expression von shRNAs mit distinkter Größe (siehe Abb. 1.6),

die ähnlich der siRNAs, in der Lage sind, die Genexpression mittels RNAi spezifisch zu inhibieren [Brummelkamp et al., 2002, Paul et al., 2002, Yu et al., 2002].

1.4 Lentivirale Expressionssysteme

Viele virale Vektoren eignen sich wegen der hohen Transfektionseffizienz gut für den Gentransfer in eukaryotische Zellen. Wegen des Potentials der stabilen Integration der Retroviren (siehe 1.2.5) sind abgeleitete retrovirale Vektoren besonders interessant, um Transgene stabil in Zellen exprimieren zu können. Die einfach aufgebauten γ -Retroviren dienen anfänglich in modifizierter Form als Expressionsvektoren. Allerdings stellte man fest, dass diese Art des retroviralen Gentransfers nur bei sich-teilenden Zellen zu beobachten war. Eine Ausnahme unter den Retroviren bilden dabei jedoch die Lentiviren, die auch ruhende Zellen effektiv infizieren können.

Die Herstellung dieser lentiviralen Partikel erfolgt häufig in humanen embryonalen Nierenzellen, die zudem das große T-Antigen der SV40 Viren (Simian Virus 40) exprimieren (293T-Zellen) und dadurch maximale Virusproduktion gestatten. Aus Sicherheitsgründen werden die viralen Elemente des HIV-1 Genoms auf mehrere Plasmide verteilt, die dann in die Verpackungszellen transfiziert werden. Den *gag-pol*- bzw. *rev*-Verpackungsplasmiden wurde das Verpackungssignal ψ entfernt, um zu verhindern, dass die genetische Information von *gag-pol* und *rev* in den gebildeten Virionen weitergegeben werden kann. Zudem wurde die 3'-LTR dieser lentiviralen Expressionsplasmide durch Deletion der U3-Region inaktiviert, so dass zwar infektiöse Partikel gebildet werden können, diese jedoch nicht replikationskompetent sind [Miyoshi et al., 1998, Zufferey et al., 1998, Iwakuma et al., 1999]. Die Plasmide, die für die Produktion lentiviraler Partikel benötigt werden, sind im Anhang auf Seite V abgebildet.

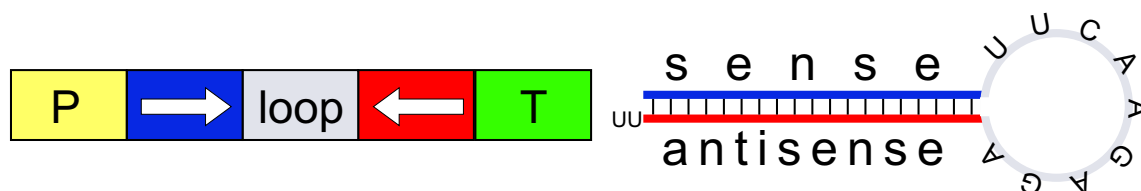


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der shRNA Expressionskassette des Vektors pSuper (links) und die exprimierte shRNA Haarnadelschleife (rechts). (P: Polymerase III H1 Genpromotor; loop: verbindende Sequenz von sense und antisense Strang mit der Sequenz „UCAAGAGA“; T: Terminator mit der Sequenz „TTTTT“).

Das Wirtsspektrum der lentiviralen Vektoren konnte durch die Expression des G-Proteins des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) *in trans* anstelle des konventionellen, lentiviralen Env-Proteins gp41 und gp120 von HIV erheblich erweitert werden und gestattet beispielsweise die Infektion von CD34 positiven hämatopoetischen Vorläuferzellen [Reiser et al., 1996]. Derart pseudotypisierte retrovirale Partikel lassen sich zudem mittels Ultrazentrifugation oder Ultrafiltration besser konzentrieren als der Wildtyp [Reiser, 2000].

Für die Herstellung transgener Tiere sind lentivirale Expressionsvektoren gut geeignet, und die Ausbeute an Tieren, die das Transgen exprimieren, ist im Vergleich zu den Tieren, die mittels DNA-Mikroinjektion erzeugt wurden, um ein Vielfaches höher [Hofmann et al., 2003, Hofmann et al., 2004]. Die lentiviralen Partikel werden dabei mittels Mikroinjektionskanüle in den „perivitellinen Spalt“ unterhalb der „Zona pellucida“ der Oozyten injiziert.

Das Einbringen der shRNA-Expressionskassette in lentivirale Expressionsvektoren ermöglicht es, die Expression spezifischer Gene dauerhaft zu unterbinden. Durch Infektion pseudotypisierter, lentiviraler Partikel gelingt dies auch in Zellen, die ansonsten nur schwer transfizierbar sind. Stabil integriert, werden mittels Polymerase III Promotor ständig shRNAs exprimiert und induzieren dabei RNAi.

1.5 Zielsetzung

Bis es zum Einsatz von Xenotransplantaten als Ersatz von fehlenden Allotransplantaten kommen kann, müssen erst einige Hürden überwunden werden. In den letzten Jahren wurden vor allem große Fortschritte bei der Überwindung der immunologischen Abstoßungsreaktion mittels transgener Spendertiere erzielt, so dass Versuchstiere nach der Transplantation mit porcinen Organen erstmals über einen Zeitraum von mehreren Monaten überleben konnten. Wegen der verbesserten Toleranz dieser humanisierten transgenen Organe steigt jedoch auch die Gefahr einer Xenozoonose. Hauptsächlich die porcinen endogenen Retroviren, die sich - im Gegensatz zu vielen anderen viralen und bakteriellen Erregern - auch durch spezielle Zucht unter keimfreien Bedingungen nicht aus den Schweinen entfernen lassen, bergen ein Sicherheitsrisiko als Infektionsquelle für humane Zellen.

Die vollständige Eliminierung dieser proviralen PERV Sequenzen mittels konventionellem „gene knock-out“ ist wegen der hohen Anzahl an viralen Kopien im Genom nahezu unmöglich. Auch die unternommenen Versuche zur Aufzucht von „low-producer“-Schweinen mit verringerter PERV-Expression sind als unsicher einzustufen, da nicht ausgeschlossen

werden kann, dass es zu Rekombinationen der defekten viralen Kopien kommt, die eine erneute Expression humanotroper Viren zur Folge hat.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher zum einen das Gefährdungspotential einer Xenotransplantation hinsichtlich einer Xenozoonose mit PERV evaluiert werden:

Für die Etablierung eines Kleintiermodells, das es gestatten würde, das pathogene Potential von PERV aufzuklären, sollte eine Infektion muriner Zellen mit den porcinen endogenen Retroviren unter zell-freien Bedingungen, bzw. mittels Zell-Zell-Kontakt durchgeführt werden. Zusätzlich sollte der U3-Promotor des porcinen endogenen Retrovirus in Zellen unterschiedlicher Spezies auf seine Expressionsstärke analysiert werden, um Organismen zu identifizieren, die eine effektive Virusreplikation dank eines geeigneten Transkriptionsapparates gewährleisten und sich daher als Modellsystem eignen. Außerdem sollte über einen Zeitraum von über 400 Tagen in einem Xenotransplantationsmodell mit diabetischen Ratten, deren Insulinproduktion von transplantierten porcinen Inselzellen substituiert wurde, das Serum der transplantierten Tiere auf PERV spezifische Antikörper untersucht werden, um die potentielle PERV-Transmission analysieren zu können.

Zur Gefahrenabschätzung einer PERV Übertragung auf menschliche Zellen unter *in vivo* Bedingungen sollte ein drei-Spezies-Modell eingesetzt werden, das die Situation einer Xenotransplantation beim Menschen simuliert.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollte durch Anwendung der RNA-Interferenz die Expression der porcinen endogenen Retroviren inhibiert werden.

Da die Hemmung der Virusreplikation von der siRNA-Bindungsstelle abhängig ist, die sich nur schwer vorhersagen läßt, sollten zunächst geeignete Zielregionen auf dem Genom des PERV mit Hilfe synthetischer siRNAs identifiziert werden. Diese selektierten siRNAs sollten in der Lage sein, die Expression aller replikationskompetenten porcinen endogenen Retroviren aufgrund von Sequenzhomologie zu hemmen.

Für eine dauerhafte Inhibition von PERV sollte anschließend die entsprechende Sequenz in ein shRNA-Expressionsvektor kloniert, und die Hemmung der Virusreplikation erneut quantifiziert werden. Ein entsprechendes lentivirales Vektorsystem mit shRNA-Expressionskassette sollte für die Herstellung transgener Schweine etabliert werden und unter *in vitro* Bedingungen mit PERV infizierten Zelllinien und auch primären porcinen Zellen analysiert werden. Die Verwendung derartiger transgener Schweine mit stark verminderter PERV-Expression könnte die Gefahr einer Xenozoonose drastisch reduzieren.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

Alle Materialien wurden, sofern nicht anders erwähnt, von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

Die in dieser Arbeit angewandten Methoden sind, sofern nicht anders angegeben, in dem folgenden Laborhandbuch beschrieben: Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York

2.1.1 Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
anti- β -Aktin, monoklonal Klon AC-74	1:500	Sigma-Aldrich, (Taufkirchen, Deutschland)
Kaninchen anti-Ziege IgG TRITC-Konjugat	1:2000	Sigma-Aldrich, (Taufkirchen, Deutschland)
Kaninchen anti-Ratte IgG, polyklonal Peroxidase-Konjugat	1:1000	DakoCytomation (Glostrup, Dänemark)
Kaninchen anti-Ratte IgG, polyklonal Peroxidase-Konjugat	1:1000	DakoCytomation (Glostrup, Dänemark)
Ziege anti-Human IgM, polyklonal Peroxidase-Konjugat	1:2000	Sigma-Aldrich, (Taufkirchen, Deutschland)
Maus-anti p27Gag (FeLV)	1:100	Fitzgerald, Concord, MA, USA

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Ziege anti-p15Env (PERV) Ziegenserum 20	1:100	eigene Arbeitsgruppe
Ziege anti-gp70Env (PERV) Ziegenserum 10	1:100	eigene Arbeitsgruppe

2.1.2 Plasmide

Plasmid	Hersteller
pQE30	Qiagen (Hilden, Deutschland)
pSuper	Oligoengine (Seattle, WA, USA)
pHygEGFP	BD Biosciences (Palo Alto, CA, USA)
pcDNA3.1 (+)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
pLenti6/V5-D-TOPO	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
pLP1	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
pLP2	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
pLP-VSV-G	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
pRL-TK	Promega (Madison, WI, USA)
pGL3-control	Promega (Madison, WI, USA)
pGL3-basic	Promega (Madison, WI, USA)
pLVTHM	Prof. D. Trono (Universität Genf, Schweiz)
psPAX2	Prof. D. Trono (Universität Genf, Schweiz)
pMD2G	Prof. D. Trono (Universität Genf, Schweiz)

Alle Plasmide sind im Anhang detailliert mit einer Vektorkarte aufgeführt (siehe Anhang auf Seite V).

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Synthese von cDNA mittels Reverser Transkriptase

Die Sequenz von RNA-Molekülen kann durch das retrovirale Enzym Reverse Transkriptase in entsprechende DNA-Moleküle umgeschrieben werden. Für diese Reaktion wird neben der Reversen Transkriptase zusätzlich ein Oligonukleotid benötigt, das an der RNA hybridieren kann und den Ort der beginnenden Reaktion kennzeichnet. Für die unspezifische Synthese der gesamten cDNA, ausgehend von einer RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen, empfiehlt sich der Einsatz von „Random“- , bzw. „Oligo-dT“-Primern, die entweder an zufälligen Positionen der zellulären RNA, oder an den PolyA-Terminus der mRNAs binden.

Zumeist wurde die cDNA aus Gesamt-RNA mittels des kommerziellen „Reverser Transcriptase Kits“ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) und Random-Primern (random decamers, Ambion, Austin, TX, USA) nach Herstellerangaben synthetisiert.

Für die cDNA-Synthese von Proben aus einer 96-well Mikrotiterplatte wurde das System „Cells-to-cDNA II“ (Ambion, Austin, TX, USA) verwendet, das - nach Zelllysis und anschließender DNase-Behandlung - die gesamte zelluläre RNA mittels „random“ Primern in cDNA umschreibt. Die Durchführung erfolgte exakt nach Angaben des Herstellers.

2.2.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“, PCR) dient der enzymatischen, exponentiellen Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten mittels zyklischer Veränderung der Reaktionstemperatur [Mullis et al., 1986]. Dabei wird zunächst die Doppelhelix der Template-DNA durch Erhitzen auf 95 °C zu Einzelsträngen aufgespalten. Anschließend können komplementäre Oligonukleotide (Primer) durch Absenken der Temperatur auf 50 °C - 70 °C (je nach verwendetem Oligonukleotid) an die einzelsträngige Template-DNA hybridisieren. In Anwesenheit einer thermostabilen DNA-Polymerase (z. B. Taq-Polymerase) wird das freie 3'-Hydroxylende des Primers bei 72 °C mit Desoxynucleosidtriphosphaten verlängert, und die spezifische Sequenz zwischen den eingesetzten Primern verdoppelt. Durch mehrfache Wiederholungen (25x bis 40x) dieses Zyklus (Denaturierung der DNA, Hybridisierung mit den Oligonukleotiden und Kettenverlängerung) kann eine spezifische Sequenz amplifiziert werden.

Mittels PCR ist es daher möglich, genomische DNA hinsichtlich einer Provirusintegration zu untersuchen. Für den Nachweis einer Integration des porcinen endogenen Retrovirus in das Genom eukaryotischer Zellen wurden *pol*-spezifische Primer (Primerpaar *Pol*-PK 1 und PK 6) eingesetzt (siehe Anhang auf Seite I).

Für eine erleichterte Klonierung von spezifischen DNA-Sequenzen in Expressionsvektoren kann die PCR auch dazu dienen, Restriktionsschnittstellen in lineare DNA-Fragmente einzufügen. Dazu wurden Oligonukleotide gewählt, die einerseits eine komplementäre Sequenz zu der zu amplifizierenden Sequenz enthalten (ca. 20 Nucleotide, je nach T_M -Wert des Primers) und außerdem Sequenzabschnitte (6-8 Nucleotide) beinhalten, die spezifisch von Restriktionsenzymen geschnitten werden. Sollte die amplifizierte DNA in Plasmide kloniert werden, wurde das Enzym „*Pfu* Turbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA)“ verwendet. Diese *Pfu*-Polymerase zeichnet sich wegen ihrer 3'-5'-Exonukleaseaktivität durch

eine geringe Mutationsrate bei der Amplifikation von DNA-Sequenzen aus.

Die Reaktionen erfolgten in dem PCR-Gerät MJ Research PTC-200 von Biozym. Die Annealing-Temperatur wurde ausgehend von der Schmelztemperatur (T_m) der als Primer verwendeten Oligonukleotide gewählt. Für die Abschätzung der Schmelztemperatur gilt:

$$T_m = 4 \cdot N_{(G+C)} + 2 \cdot N_{(A+T)} \quad (\text{N: Anzahl der Basen})$$

Die benötigte Annealing-Temperatur liegt 5 °C unter der Schmelztemperatur. Die Temperatur der Elongation wurde aufgrund des Temperaturoptimums der verwendeten Polymerase gewählt. Nach dem Durchlaufen von 25 - 40 Zyklen wurde der Ansatz auf 4 °C gekühlt. Eine Übersicht der verwendeten Oligonukleotide ist im Anhang 5 auf Seite I zu finden.

Real time PCR

Als eine Sonderform der Polymerasekettenreaktion (PCR) wird die real-time PCR bezeichnet, die eine Quantifizierung eines spezifischen Sequenzabschnitts in einer Probe ermöglicht. Der interkalierende Farbstoff SYBR-Green wird dabei dem PCR Ansatz zugesetzt und erlaubt über die Zunahme der Fluoreszenzintensität die Analyse der neu synthetisierten DNA. Nach jedem Zyklus der PCR kann in einem real-time PCR-Gerät die Fluoreszenz gemessen werden, die somit eine Quantifizierung gestattet. Der interne Farbstoff ROX dient als Referenz. Mit Hilfe der real time PCR kann nicht nur die zelluläre DNA quantifiziert werden, sondern auch die aus RNA umgeschriebene cDNA.

Die real-time PCR diente häufig dazu, die Expression der viralen RNA zu quantifizieren. Dazu wurde die cDNA (siehe 2.2.1) in dem real time PCR-Gerät MX-4000 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) und unter Verwendung des „Brilliant SYBR Green QPCR Master-Mixes“ (Stratagene) nach entsprechenden Herstellerangaben analysiert. Die Menge der viralen RNA wurde mittels der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode zu der exprimierten *GAPDH* (*Glycerinphosphodehydrogenase*) RNA in Relation gebracht [Livak and Schmittgen, 2001].

Ein typischer real time PCR-Ansatz sah folgendermaßen aus:

100 ng	cDNA
0,5 μ l	Primer I (10 pmol/ μ l)
0,5 μ l	Primer II (10 pmol/ μ l)
0,25 μ l	ROX (1 mM, Stratagene, La Jolla, CA, USA)
6 μ l	SYBR Green Master-Mix (Stratagene)
add 12 μ l	H ₂ O

DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde in dem institutseigenem Service-Labor durchgeführt. Das Service-Labor arbeitet mit dem Gerät 370A DNA-Sequencing System von Applied Biosystems nach der Didesoxy-Methode [Sanger et al., 1977]. Die Zusammensetzung eines Sequenzieransatzes und die gewählten Cyclyer-Bedingungen sind der folgenden Tabelle zu entnehmen:

DNA (300 ng/ μ l)	1,0 μ l	1x	96 °C	2 min
Primer (10 μ M)	0,5 μ l	25x	96 °C	10 sec
BigDye-Mix 3.1	2,0 μ l		55 °C	5 sec
Puffer	1,5 μ l		60 °C	4 min
H ₂ O	5,0 μ l	1x	4 °C	∞

Die Sequenzen lagen anschließend als Computer-Datei vor, die mit dem Programm DNA-STAR (Lasergene, Madison, WI, USA) bearbeitet werden konnte.

2.2.3 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agarosegele verwandt, die sich in ihrer Agarosekonzentration je nach Größe des zu trennenden Fragments unterschieden. Für kleinere DNA-Abschnitte (50 - 1000 bp) wurden 2%ige Agarosegele eingesetzt, bei größeren Fragmenten betrug die Konzentration 0,8 % bis 1,0 %. Als Puffer wurde TAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) verwendet, in dem die Agarose aufgekocht wurde. Die Proben werden mit Auftragepuffer (10x; „Blue Juice“, Invitrogen) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zur Abschätzung der Fragmentgrößen diente der Marker „1kb plus“ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Die Laufspannung betrug ca. 90 Volt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 15 Minuten in einem Bad des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid inkubiert und im UV-Licht (360 nm) begutachtet. DNA-Fragmente distinkter Größe konnten noch der Gelelektrophorese aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt werden (siehe 2.2.4).

2.2.4 Isolierung von linearen DNA-Fragmenten

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach der PCR oder zur Isolation spezifischer DNA-Banden aus einem Agarosegel wurden die kommerziellen Kits „QIAquick PCR Purification

Kit“ (Qiagen) und „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) verwendet. Die Aufreinigung der DNA beruht auf der Bindung von Nukleinsäuren an die Silica-Gelmembran unter hohen Salzkonzentrationen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.5 Restriktionsverdau

Für die spezifische Hydrolyse an einer bestimmten Basensequenz eines DNA-Stranges wurden Endonukleasen verwendet. Diese Restriktionsenzyme spalten die DNA spezifisch an der Restriktionsschnittstelle, die für das jeweilige Enzym charakteristisch ist. Die Bedingungen wie Inkubationsdauer und -temperatur, sowie die Wahl des Puffers wurden entsprechend der Herstellerangaben (New England Biolabs) gewählt. Für einen Restriktionsverdau mit mehr als einer Endonuklease wurden die Bedingungen so gewählt, daß die eingesetzten Enzyme mit möglichst hoher Aktivität schneiden. Meist wurden 5 U pro μg DNA eingesetzt und ca. 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle wurden die Proben einer Gelelektrophorese unterzogen.

2.2.6 Ligation

Die T4-DNA Ligase katalysiert bei Anwesenheit von ATP die kovalente Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen freien phosphorylierten 5'-Enden und 3'-Hydroxyenden von DNA-Strängen. Die Ligation wurde nach der Vorschrift des Herstellers „New England Biolabs“ durchgeführt. In dem Reaktionsansatz (20 μl) befanden sich generell 60 fmol Vektor-DNA und die dreifache molare Menge der einzufügenden DNA, sowie 10 μl 2xQuick-Ligase Puffer und 1 μl Quick-Ligase (1 U/ μl). Die Inkubationszeit betrug fünf Minuten bei Raumtemperatur, für Ligationen mit glatten Enden 15 Minuten. Als Kontrolle wurde stets ein Ansatz ohne Insert-DNA verwendet.

Zur Herstellung glatter Enden (“blunt ends”) wurde das Enzym „Mung Bean Nuclease“ (New England Biolabs) benutzt. Um Religationen der Vektor-DNA zu vermeiden, wurde die Vektor-DNA vor der Ligation generell mit dem Enzym „Antarctic Phosphatase“ (New England Biolabs) nach Herstellerangaben dephosphoryliert. Sollten synthetisch hergestellte Oligonukleotide direkt in Plasmide ligiert werden, wurden die Oligonukleotide entweder mit einer 5'-Phosphat-Modifikation bestellt, oder mittels T4 Polynukleotid Kinase (New England Biolabs) phosphoryliert.

2.2.7 Herstellung chemokompetenter Bakterien

Die *E. coli* Stämme M15 (Qiagen, Hilden), TOP-10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) und XL10-Gold (Stratagene, La Jolla, CA, USA) mußten vor der Transformation chemisch kompetent gemacht werden, um zu gewährleisten, daß die Plasmid-DNA aufgenommen wird. Dazu wurde nach einem Protokoll von Qiagen zur Herstellung chemisch kompetenter M15 *E. coli* verfahren (QIAexpressionist, S.39 [Qiagen, 2003]).

Bakterien:

M15 (Qiagen, Hilden, Deutschland): *E. coli* [*pREP4*], *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rk-mk+)* *supE44 relA1, NaI^S, Str^S, Rif^S, Thi⁻, Lac⁻, Ara⁺, Gal⁺, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺*

TOP-10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA): *E. coli mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80Δ-lacΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, araD139 Δ(ara, leu), 7697, galU, galK, rpsL, endA1, mupG*

XL10-Gold (Stratagene, La Jolla, CA, USA) *E. coli Tet^r D(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [Fϕ proAB lacI^qZDM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]*

2.2.8 Transformation

Mittels Transformation kann Plasmid-DNA in entsprechend vorbereitete (elektro- oder chemokompetente, siehe 2.2.7) Bakterien eingebracht werden. Die kompetenten Bakterien (meist 100 µl Aliquots) wurden 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe des Ligationsansatzes wurde weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert, dann kurzzeitig (45 Sekunden) im Heizblock auf 42 °C erhitzt und sofort für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Vorgewärmtes LB- oder SOC-Medium (700 µl) wurde hinzugegeben und die Zellsuspension wurde 60 Minuten bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Zellen konnten anschließend auf LB-Platten mit einem geeigneten Antibiotikum (Ampicillin, 100 µg/ml final, und Kanamycin, 50 µg/ml final) ausgestrichen werden.

LB-Medium	10 g/l Bacto-Pepton	SOC-Medium	20 g/l Bacto-Pepton
	5 g/l Hefeextrakt		5 g/l Hefeextrakt
	10 g/l NaCl		5 g/l NaCl
			20 mM Glucose

2.2.9 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe kommerzieller Kits von Genomed („JET-QUICK Plasmid Miniprep Spin Kit“ und „JETSTAR Plasmid Purification Kit“) und Qiagen („QIAprep Spin Miniprep Kit“ und „QIAfilter Plasmid Maxi Kit“), die alle auf der Bindung der bakteriellen DNA an einer Silica-Matrix beruhen. Verunreinigungen, wie bakterielle Proteine oder Lipide, können durch Waschschriffe entfernt werden. Anschließend wurde die eluierte Plasmid-DNA mittels Ethanol präzipitiert, und das DNA-Pellet wurde meist in 100 μl TE-Puffer aufgenommen. Für die Transfektion der Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen wurde die DNA mit dem kommerziellen Kit „EndoFree Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen) isoliert, um eine maximale Transfektionseffizienz gewährleisten zu können.

2.2.10 Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

Für die Isolation genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen wurde das kommerzielle Kit „QIAmp DNA Blood Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Ca. 1×10^6 Zellen wurden pelletiert und in PBS resuspendiert. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten nach Angaben des Herstellers. Die genomische DNA wurde mit 200 μl Nuklease-freiem Wasser eluiert.

2.2.11 Gesamt-RNA Isolierung aus eukaryotischen Zellen

Die RNA-Isolation erfolgte mittels „TRI-Reagent“ (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und dem „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland). Für den Zellaufschluss wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen, sedimentiert (1000 g, 10 min., 4 °C) und in 1 ml TRI-Reagent resuspendiert. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 μl Chloroform (Merck, Darmstadt, Deutschland) zugegeben und mindestens 15 Sekunden geschüttelt. Nach erneuter Inkubation (15 min., Raumtemp.) wurde das Zellysate zentrifugiert (12000 g, 15 min., 4 °C), anschließend wurde die RNA-haltige obere Phase vorsichtig entnommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Das entsprechende Volumen an 70% Ethanol (in DEPC Wasser) wurde zugegeben, vermischt und auf eine Säule des „RNeasy Mini Kits“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) gegeben. Durch Zentrifugation (10000 g, 1 min., 4 °C) konnte die RNA an die Matrix der Säule binden. Die Säule wurde durch Zugabe des Puffer RW1 (Qiagen) gewaschen und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Um eine eventuelle Kontamination der RNA mit DNA

zu vermeiden, wurde diese durch Zugabe von 30 Units DNase (gelöst in 80 μl RPE-Puffer (Qiagen)) direkt auf der Säulenmatrix für 15 Minuten bei Raumtemperatur verdaut. Es folgten Waschschrte nach Angaben des Herstellers. Die Gesamt-RNA wurde schließlich mit 30 μl Nuklease-freiem Wasser eluiert und - bis zur weiteren Verwendung - bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.12 DNA und RNA Konzentrationsbestimmung

Die DNA bzw. RNA Menge wurde bestimmt, indem die Extinktion bei 260 nm in einer Quarzküvette (Schichtdicke = 1 cm) gemessen wurde. Dabei entspricht eine Extinktion $E_{260\text{ nm}} = 1$ einer DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, bzw einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Gleichzeitig wurde auf eventuelle Verunreinigungen mit Proteinen geachtet, die bei einer Wellenlänge $\lambda = 280\text{ nm}$ detektierbar sind. Bei einer Ratio $\frac{260\text{ nm}}{280\text{ nm}} = 1,9$ geht man von einer reinen DNA-, bzw. RNA-Lösung aus.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Verwendete Zellen

Zelllinien

Name	Organismus	Zelltyp	Besonderheit	Hersteller
293	human	embr. Nierenzellen	-	ATCC
293 FT	human	embr. Nierenzellen	SV40 „large T antigen“	Invitrogen
293 PERV-B	human	embr. Nierenzellen	PERV-B	-
293 PERV-5 ⁰	human	embr. Nierenzellen	PERV-A/C; 5. Passage	-
3T3	Maus	Fibroblasten		ATCC
Rat1	Ratte	Fibroblasten		ATCC
FE-8	Ratte	Fibroblasten	<i>HRAS</i> transformierte Zelllinie 208F	Dr. Schäfer (Charité, Berlin, Deutschland [Zuber et al., 2000])

Tabelle 2.2: Zelllinien

Primäre Zellen

Name	Organismus	Zelltyp	Hersteller
SE101	Schwein	embr. Fibroblasten	Prof. Niemann (Institut für
SE105	Schwein	embr. Fibroblasten	Tierzucht, Neustadt, Deutschland)

Tabelle 2.3: Primäre Zellen

2.3.2 Zellkultur

Alle immortalisierten eukaryotischen Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert. Das Medium für die Kultivierung der primären porcinen embryonalen Fibroblasten enthielt zusätzlich 0,1 mM β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 1% „non essential amino acids“ (Sigma-Aldrich), 1% „vitamin solution“ (Sigma-Aldrich). Alle 3-4 Tage wurden die Zellen passagiert, indem das Medium abgenommen wurde, die Zellen einmal mit 10 ml PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin (0,25%) von der Zellkulturschale abgelöst wurden. Nach 10 Minuten wurde die Trypsinierung durch die Zugabe von 10 ml Medium inhibiert und die Zellsuspension im Verhältnis 1:5 auf neue Zellkulturschalen oder -flaschen verteilt.

Zusammensetzung des Zellkulturmediums DMEM:

500 ml	DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
10% (v/v)	FKS (Biochrom, Berlin, Deutschland)
10 ml	L-Glutamin (200 mM, Biochrom)
7,5 ml	HEPES-Puffer (1 M, Biochrom)
5 ml	Penicillin (10000 U/ml), Streptomycin (10 mg/ml, Biochrom)

2.3.3 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

Für die langfristige Lagerung eukaryotischer Zellen ist eine Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C erforderlich. Die Bildung von Eiskristallen wird durch Zugabe von DMSO verhindert.

Ca. 5×10^6 - 1×10^7 Zellen wurden sedimentiert (1000 g, 10 Minuten, Raumtemp.), das Pellet wurde in 1 ml FKS mit 10% DMSO resuspendiert und in ein Kryo-Röhrchen überführt. Nach einer Inkubation von 16 Stunden bei -80 °C (in einer Styroporbox, um ein langsames Abkühlen zu gewährleisten) wurden die Zellen in den flüssigen Stickstoff eingelagert.

Kryokonservierte Zellen wurden im Wasserbad (37 °C) erwärmt und sofort in eine vorbereitete Kulturflasche mit 20 ml DMEM überführt. Um das toxische DMSO zu entfernen, wurde nach Adhäsion der Zellen an die Oberfläche der Kulturflasche das Medium gewechselt.

2.3.4 Transfektion von Plasmid-DNA

Als Transfektion wird das Einbringen von DNA und RNA in eukaryotische Zellen bezeichnet. Es existieren mehrere Möglichkeiten der Transfektion, aber vor allem für adhärenente Zellen empfiehlt sich der Einsatz der Lipofektion oder der Calciumphosphatpräzipitation. Durch die negative Ladung der Nukleinsäuren kommt es zu elektrostatischen Wechselwirkungen der kationischen Lipide mit der DNA, und der DNA-Liposomen-Komplex kann mit der Zellembbran fusionieren. Bei der Calciumphosphatpräzipitation hingegen bilden sich aus der Plasmid-DNA, Calcium und Phosphat nach Inkubation bei Raumtemperatur Kristalle, die von der Zelle per Endozytose aufgenommen werden können. Zur Transfektion von eukaryotischen Zellen mittels kationische Liposome wurden die kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenzien „Lipofectamine 2000“ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), bzw. „TransFast“ (Promega, Madison, WI, USA) verwendet. Die Zellen waren einen Tag zuvor passagiert worden (siehe 2.3.2) und zeigten unmittelbar vor der Transfektion eine Konfluenz von ca. 90%. Das Medium wurde erneut gewechselt und durch „Opti-MEM I“ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) mit 10% FKS ersetzt. Die Transfektion mittels Lipofectamine 2000 und TransFast erfolgte nach Herstellerangaben.

Die Zellen, die mittels Calciumphosphatpräzipitation transfiziert werden sollten, wurden einen Tag zuvor ausgesät (2×10^6 Zellen pro 10 cm Petrischale), so dass sie am Tag der Transfektion zu ca. 30% konfluent waren. Die Calcium Phosphat-DNA Suspension wurde unter sterilen Bedingungen vorbereitet. Vorgelegt wurden 40 μg Plasmid-DNA (gelöst in 250 μl Hepes-Puffer (2,5 mM)) und 250 μl CaCl_2 -Lösung (500 mM) in einem 15 ml Falcon-Röhrchen. Diese DNA- CaCl_2 -Lösung wurde tropfenweise auf 500 μl HEPES-Puffer (280 mM NaCl, 50 mM Hepes, 0,5 mM Na_2HPO_4 , pH 7,0) gegeben, während gleichzeitig mit einer Pasteur-Pipette Luftblasen in die Suspension geblasen wurden, um eine homogene Verteilung zu erzielen. Anschließend wurde die Suspension 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, und die Bildung der Präzipitate im Mikroskop überprüft. Die Calciumphosphat-DNA-Lösung wurde tropfenweise auf die Zellen der Petrischale gegeben, die Petrischale wurde anschließend vorsichtig geschüttelt, um eine gute Verteilung zu erzielen. Die Zel-

len wurden mit der Transfektionslösung 24 Stunden bei 37 °C inkubiert, dann wurde mit PBS-Puffer gewaschen und das Medium gewechselt. Weitere 24 Stunden später konnten die Zellen auf die Expression des Transgens analysiert werden.

War eine stabile Transfektion erwünscht, so wurden die Zellen mit einem Plasmid (z. B. pHygEGFP, pcDNA3.1(+), siehe Plasmidkarten im Anhang auf Seite V) transfiziert, das über ein entsprechendes Resistenzgen verfügt. Nach mindestens 14-tägiger Kultivierung mit den entsprechenden Selektionsantibiotika (200 µg/ml Hygromycin B bzw. 500 µg/ml G418) wurden Zellklone mit Hilfe von Trypsin-getränkten „Cloning discs“ (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) isoliert und immunologisch oder molekularbiologisch charakterisiert.

2.3.5 Produktion synthetischer siRNAs

Die siRNAs gag1, pol2, pol4 und pol5 wurden von der Firma Dharmacon synthetisiert. Die siRNAs gag2, pol1, pol3, pol4, env1, env2 und die Kontroll siRNA (markiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin) wurden von der Firma Qiagen erworben. Die siRNAs wurden in Annealing-Puffer (100 mM NaCl; 50 mM Tris; pH 7,5; in RNase-freiem Wasser) gelöst und auf eine Konzentration von 20 µM eingestellt. Alle siRNA-Sequenzen sind im Anhang auf Seite I verzeichnet.

2.3.6 Transfektion synthetischer siRNAs

Die Transfektion von „short interfering RNAs“ erfolgte mit dem speziell für siRNAs entwickelten Reagenz GeneEraser (Stratagene). Einen Tag vor Transfektion wurden 7500 Zellen pro well in einer 96-well Mikrotiterplatte kultiviert. Am nächsten Tag wurde mit 1 µl GeneEraser pro well bei einer finalen siRNA-Konzentration von zumeist 20 nM transfiziert. Zur Kontrolle wurden kommerzielle, fluoreszenzmarkierte siRNAs (Qiagen, Hilden, Deutschland) ohne spezifisches Zielgen verwendet, um die Transfektionseffizienz ermitteln zu können. Ansonsten wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.

2.3.7 Herstellung lentiviraler Partikel

Der Einsatz lentiviraler Partikel erlaubt einen effektiven Gentransfer selbst in schwer transfizierbaren eukaryotische Zellen (siehe 1.4). Aus Sicherheitsgründen ist die genetische Information der viralen Proteine und die des Transgens auf mehrere Plasmide verteilt, um

Rekombinationen zu verhindern. Diese Plasmide müssen für die Herstellung entsprechender Virionen in die Zellen der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293 FT transfiziert werden.

Dafür wurden einen Tag vor der Transfektion 5×10^6 293 FT-Zellen in 10 cm Petrischalen ausgesät. Die Transfektion erfolgte entweder mittels Calciumphosphatpräzipitation (siehe 2.3.4) oder mittels „Lipofectamine 2000“ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) nach Herstellerangaben. Die verwendeten Mengen an Plasmid-DNA sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Plasmid	Trono-Lab		Invitrogen	
	Bezeichnung	Menge	Bezeichnung	Menge
Transfervektor	pLVTHM	20 μg	pLenti6/V5-D-TOPO	3 μg
Verpackungsplasmid	psPAX2	15 μg	pLP1, pLP2	jeweils 3 μg
VSV-G-Plasmid	pMD2G	5 μg	pLP-VSV-G	3 μg

Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen auf Syncytienbildung (siehe Abb. 2.1) im Mikroskop untersucht, und das Medium erneuert. Der Überstand der Zellen wurde

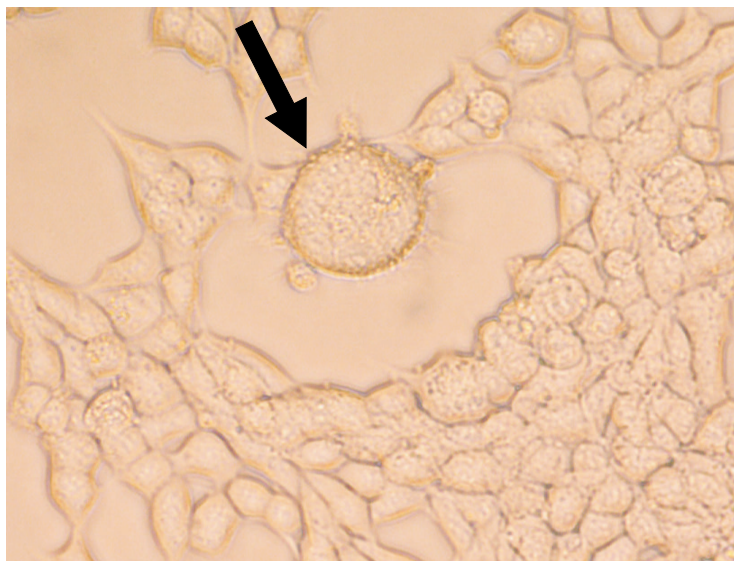


Abbildung 2.1: **Die Bildung von Syncytien (Pfeil) wird durch die Expression des G-Proteins des Vesikulären Stomatitis Virus induziert.** Die Bildung der Syncytien nach 24 - 48 Stunden nach der Transfektion ist ein Anzeichen für einen erfolgreichen Gentransfer in die Verpackungszellen 293 FT.

48 Stunden nach Transfektion entnommen und zentrifugiert (3000 rpm, 15 min., 4 °C), um restliche Zellen in der Suspension zu sedimentieren. Der Überstand wurde anschließend steril filtriert (Porengröße 0,45 μm , Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) und bis zur

Verwendung in 2 ml Aliquots bei -80 °C gelagert.

Für Virussuspensionen mit höherer MOI („multiplicity of infection“) wurden die Überstände durch Ultrazentrifugation konzentriert. Dazu wurden 4 ml einer 20% Saccharose-Lösung in Zentrifugenröhrchen vorgelegt und vorsichtig mit dem Virus-Überstand überschichtet. Die Virionen wurden mit 90000 g in einem SW-28 Rotor für 90 Minuten bei 4 °C sedimentiert, und das Medium wurde entfernt. Das Viruspellet wurde über Nacht mit 100 μ l eiskaltem PBS inkubiert, anschließend resuspendiert und zu 30 μ l Aliquots bei -80 °C eingefroren.

2.3.8 Virustiterbestimmung

Der Virustiter in den Überständen PERV-infizierter Zellen wurde mittels Endpunktbestimmung analysiert.

Dazu wurde der zu untersuchende Überstand steril filtriert (Porengröße 0,45 μ m, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) und 5000 uninfizierte humane embryonale Nierenzellen (293) wurden mit je 50 μ l Virusüberstand in mehreren 1:2 Verdünnungen in 96 well-Platten für vier Tage inkubiert. Die Titration wurde stets mit vier Replikaten durchgeführt. Die Überstände wurden anschließend entfernt und die Zellen wurden dreimaligem Einfrieren/Auftauen und nachfolgender Inkubation mit Proteinase K in PCR-Puffer bei 56 °C für drei Stunden lysiert. Die Proteinase K wurde durch Inkubation bei 95 °C für 20 Minuten inaktiviert. Dieses Zellysate wurde auf Provirusintegration mittels PCR unter Verwendung *pol*-spezifischer Primer (*Pol*-PK1/6, siehe Anhang auf Seite I) und der „AmpliAq Gold Polymerase“ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) untersucht.

Mit Hilfe der Spearman-Kärber-Methode konnte ein TCID₅₀-Wert errechnet werden. Die Formel lautet wie folgt:

$$\text{TCID}_{50} = \frac{\left(\frac{N_+}{N_{\text{Replikate}}}\right)^{+0,5}}{\left(\frac{1}{D_0}\right) \times D_S \times \left(\frac{V}{1000}\right)}$$

N_+ = die Anzahl der positiven wells; $N_{\text{Replikate}}$ = Anzahl der Replikate;

D_S = Verdünnungsstufe; D_0 = erste Verdünnung; V = Volumen/well

Die Virustitration der lentiviralen Vektoren wurde dadurch erleichtert, dass alle verwendeten lentiviralen Partikel das Gen EGFP in die Zielzellen transferieren. Die Expression dieses grün fluoreszierenden Proteins kann dann mittels Durchflusszytometrie (siehe 2.3.10)

sehr einfach für jede einzelne Zelle überprüft und ein entsprechender Titer kann berechnet werden.

Für die Titration der lentiviralen Partikel wurden 4×10^5 humane embryonale Nierenzellen (293) pro well in 6-well Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen, und der isolierte und eventuell aufkonzentrierte lentivirale Überstand (siehe 2.3.7) wurde in 1:10 Verdünnungen zu den Zellen in Anwesenheit von Polybrene ($8 \mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) gegeben. Nach 16 Stunden wurde das Medium erneut gewechselt. Die Zellen wurden nach mindestens 48 Stunden von der 6-well Platte gelöst und mit 3% Paraformaldehyd fixiert. Die EGFP-Expression der Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe 2.3.10). Der Virustiter wurde näherungsweise nach folgender Formel anhand von Zellen einer Virusverdünnung bestimmt, in der 0,1% - 10% der Zellen EGFP exprimierten:

$$\text{Viruspartikel}/\mu\text{l} = \frac{\text{Prozent. Anteil EGFP}^+\text{Zellen}}{100} \times \text{eingesetzte Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.3.9 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie erlaubt die Detektion spezifischer Proteine auf der Zelloberfläche, bzw. in den inneren Kompartimenten der Zelle durch die Verwendung geeigneter fluoreszenzmarkierter Antikörper. Um die Zellstrukturen über längere Zeit unversehrt erhalten zu können, empfiehlt sich eine Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd. Detergenzien wie Triton X-100 permeabilisieren die Zellmembran und ermöglichen eine intrazelluläre Bindung des Antikörpers mit dem spezifischen Antigen. Die Fluorochrome der Antikörper werden durch das UV-Licht einer Quecksilberdampfampe angeregt und emittieren energieärmeres Licht mit längerer Wellenlänge. Für die Fluoreszenzmikroskopie stehen viele Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen Emissionswellenlängen zur Verfügung, so dass - bei Verwendung eines entsprechenden Filtersystems - gleichzeitig mehrere Proteine unabhängig von einander lokalisiert werden können. Durch Expression fluoreszierender Proteine wie das „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) können transgene Zellen auch direkt ohne Einsatz von fluoreszenzmarkierten Antikörpern detektiert werden.

Die eukaryotischen Zellen wurden mindestens 24 Stunden auf Deckgläschen kultiviert, anschließend mit PBS gewaschen und mit 3% Paraformaldehyd fixiert. Reste des Paraformaldehyds wurden mit PBS abgewaschen. Um die Zellen zu permeabilisieren, wurden sie 30 Minuten mit 1% Triton X-100 inkubiert und erneut mit PBS gewaschen.

Alle Zellen wurden mit 3% BSA (in PBS) eine Stunde überschichtet, um später unspezifi-

sche Bindungen des Antikörpers zu vermeiden. Der primäre Antikörper wurde meist 1:100 bis 1:2000 in 1% BSA (in PBS) verdünnt und für eine Stunde auf die Zellen gegeben. Der sekundäre, fluoreszenzmarkierte Antikörper wurde ebenfalls eine Stunde in einer Verdünnung von 1:2000 (in 1% BSA in PBS) mit den Zellen inkubiert, nachdem die Zellen 5x mit PBS gewaschen worden waren. Anschließend wurden sie erneut 5x mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden aus der 6-well Schale genommen und luftblasenfrei auf einen Objektträger aufgelegt. Um ein Abklingen der Fluoreszenz während der Anregung mit UV-Licht zu verhindern, wurde das Eindeckmedium „ProLong“ (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) verwendet. Die Objektträger wurden bis zur Verwendung im Fluoreszenzmikroskop Eclipse 600 (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) im Dunkeln aufbewahrt.

2.3.10 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie („Fluorescence Activated Cell Sorting“, FACS) ist es möglich, die physikalischen und molekularen Eigenschaften einzelner Zellen in einem Flüssigkeitsstrom zu analysieren. Neben der Bestimmung von Zellgröße und Granularität des Zytoplasmas kann mittels FACS-Analysen auch die Expression fluoreszierender Proteine (z. B. EGFP) quantifiziert werden. Durch Anregung dieser Proteine mittels eines monochromatischen Lasers emittieren diese Licht einer spezifischen Wellenlänge, das mit Photomultipliern verstärkt wird. So ist es möglich, unterschiedliche Fluoreszenzproteine oder Fluorochrome unabhängig von einander zu analysieren. Die Intensität des emittierten Lichts verhält sich proportional zur Menge an exprimiertem fluoreszierendem Protein, so dass die Expressionsrate dieses Proteins einer einzelnen Zelle innerhalb einer gemischten Zellpopulation gemessen werden kann.

Für die FACS-Analyse wurden meist 1×10^6 - 5×10^6 Zellen (überwiegend 293) eingesetzt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, für 30 Minuten bei Raumtemperatur in 3% Paraformaldehyd fixiert und erneut mit PBS gewaschen. Da die humanen embryonalen Nierenzellen (293) dazu neigen, Aggregate mit anderen Zellen zu bilden, wurde die Zellsuspension mit den „Pre-Separation Filters“ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) filtriert, um eine einzellige Suspension zu erhalten. Die Fluoreszenz der Zellen wurde am Zytometer „FACSCalibur“ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) gemessen, die Auswertung der Durchflusszytometrie erfolgte mit der Software „CellQuest Pro“ (BD Biosciences).

2.3.11 Nachweis von Reverser Transkriptase Aktivität

Retroviren besitzen als charakteristisches Merkmal das Enzym „Reverse Transkriptase“ (RT), das ihr RNA-Genom während der Replikation in provirale DNA-Sequenzen umschreibt (siehe 1.2.5). Zum Nachweis retroviraler Infektionen, bzw. zur Quantifizierung der freigesetzten Virionen kann die Menge dieses Enzyms im Überstand von kultivierten Zellen mittels der enzymatischen Aktivität gemessen werden.

Das „C-type RT Activity Kit“ (Cavidi, Uppsala, Schweden) ermöglicht die Quantifizierung der Mangan-abhängigen RT-Aktivität von γ -Retroviren. Dieses System beruht auf der Kopplung von Poly-r(A), einem Substrat der Reversen Transkriptase, an die Oberfläche einer 96-well Mikrotiterplatte. Je nach Konzentration von Reverser Transkriptase kommt es zu einer Verlängerung des Oligo-dT-Primers mit Bromodesoxyuridin, das wiederum mittels eines spezifischen Antikörpers (gekoppelt mit alkalischer Phosphatase) und einer Substratlösung photometrisch gemessen und quantifiziert werden kann.

Der RT-Assay wurde strikt nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.12 Expressionsstudien mittels Dualem Luziferase Assay

Die eukaryotische Genexpression kann inzwischen durch eine Vielzahl unterschiedlicher genetischer Reportersysteme untersucht werden. Eines der sensitivsten ist das kommerzielle System des „Dualen Luciferase Assays“ (Promega, Madison, WI, USA), das zudem durch die unabhängige Expression zweier lichtemittierender Reporterenzyme in der Lage ist, Abweichungen durch veränderte Versuchsbedingungen besser auszugleichen: die Expression der „firefly“ (*Photinus pyralis*) Luziferase korreliert mit der Stärke des Promotors, der in das Plasmid pGL3-basic (Promega) kloniert wurde. Die Expression der Renilla (*Renilla reniformis*) Luziferase wird hingegen von dem Thymidinkinase (TK)-Promotor des Herpes Simplex Virus (HSV) durch das Plasmid pRL-TK (Promega) induziert und dient der internen Kontrolle. Als Positiv-Kontrolle wurde das Plasmid pGL3-control verwendet, das die „firefly“-Luziferase mit Hilfe des SV40-Promotors exprimiert.

Für den dualen Luziferase Assay wurden am ersten Tag 3×10^4 Zellen/well in einer 96-well Mikrotiterplatte ausgesät. Die Transfektion erfolgte am dritten Tag mit dem Transfektionsreagenz „TransFast“ (Promega, Madison, WI, USA) nach Angaben des Herstellers (siehe auch 2.3.4). Folgende Plasmidmengen wurden bei der Transfektion eingesetzt:

Plasmid	eingesetzte Menge
pGL3-basic + Insert	0,2 $\mu\text{g}/\text{well}$
pGL3-control	0,2 $\mu\text{g}/\text{well}$
pRL-TK	0,02 $\mu\text{g}/\text{well}$

Etwa 48 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium vorsichtig (ohne die Zellen von der Oberfläche der Mikrotiterplatte zu lösen) entfernt und die Zellen wurden mit dem 22 μl „Passive Lysis Buffer“ (Promega, Madison, WI, USA) nach Herstellerangaben lysiert. Die Zellysate wurden mittels Multikanalpipette auf eine für Lumineszenz-geeignete Platte überführt. Die Detektion des emittierten Lichts durch Firefly und Renilla Luziferase erfolgte in dem Luminometer „WinGlow 1.24“ (Berthold, Pforzheim, Deutschland), nachdem 100 μl der entsprechenden Substratlösungen „Luciferase assay substrate II“ und „Stop and glow“ (Promega) jeweils für 10 Sekunden durch das Luminometer auf die Mikrotiterplatte gegeben worden waren.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Rekombinante Proteinexpression

Die rekombinanten Proteine wurden in dem *E. coli* Stamm M15 (siehe 2.2.7) exprimiert, nachdem dieser mit der gewünschten Plasmid-DNA transformiert worden war. Je nach benötigter Proteinmenge wurden 10 - 1000 ml LB-Medium inklusive Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ final) und Kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ final) mit einer Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterien wurden im Schüttler bei 37 °C solange inkubiert, bis eine $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0.6 erreicht war. Die Expression der Proteine wurde mit IPTG (finale Konzentration: 1 mM) induziert, die Bakterien weitere 4 Stunden im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde sedimentiert (4000 g, 20 min., 4 °C) und das Pellet wurde in Lysispuffer (8 M Harnstoff, 0,1 M NaH_2PO_4 ; 0,01 M Tris/HCl; pH 8,0) resuspendiert (5 ml/g Pellet). Die Zellen wurden zur Lysis 60 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt, die unlöslichen Zellbestandteile wurden sedimentiert (10000 g, 30 min., Raumtemp.) und verworfen.

2.4.2 Affinitätschromatographie rekombinanter Proteine

Rekombinant exprimierte Proteine, die am N- oder C-Terminus mit einem 6xHis-Tag, einer Sequenz von sechs Histidinen in Folge, ausgestattet sind, können mittels Affinitätschroma-

tographie von bakteriellen Proteinen getrennt werden. Die an die Matrix gebundene Nitrioloessigsäure („nitrilotriacetic acid“, NTA) ist mit einem Nickel(II)-Ion komplexiert. Dieses Metallkation kann über zwei weitere freie Interaktionsstellen in hoher Affinität an zwei Stickstoffatome aus dem Imidazolring zweier benachbarter Histidine binden. Die Elution erfolgt über Erniedrigung des pH-Wertes (die Histidinereste werden protoniert, so dass die Chelatbindung zerstört wird) oder durch kompetitive Hemmung mit Imidazol.

Eine Chromatographiesäule (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA) wurde mit 3 ml „ProBond“ Ni-NTA-Sepharose (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) gefüllt und mit Lysispuffer (5x Säulenvolumen, Zusammensetzung, siehe 2.4.1) äquilibriert. Das Proteinlysate wurde auf die Säule gegeben, über Nacht bei einer Flussrate von 1 ml/min rezirkuliert und anschließend mit 20x Säulenvolumen Waschpuffer (8 M Harnstoff, 0,1 M NaH₂PO₄; 0,01 M Tris/HCl; pH 6,3) gewaschen. Die Elution erfolgte mittels pH-Wert-Verringerung durch den Elutionspuffer (8 M Harnstoff, 0,1 M NaH₂PO₄; 0,01 M Tris/HCl; pH 4,0). Die proteinreichen Fraktionen wurden gepoolt und konnten elektrophoretisch analysiert werden.

2.4.3 Proteingewinnung aus eukaryotischen Zellen

Die eukaryotischen Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit eiskaltem RIPA Puffer (150 mM NaCl; 10 mM Tris; pH 7,2; 0,1% SDS; 1% Triton X-100; 1% Deoxycholat; 5 mM EDTA, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid; 10 mM Benzamidin; 2 µg/ml Leupeptin; 100 µM Natriumorthovanadat; 10 mM p-Nitrophenylphosphat) zehn Minuten auf Eis inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden sedimentiert (10000 g, 10 min., 4 °C), und der Proteingehalt des Überstands wurde für die weitere Verwendung quantifiziert (siehe 2.4.4) .

2.4.4 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford bestimmt. Zur Herstellung einer Eichgeraden dienen BSA-Standards mit den Konzentrationen 1,2 µg/ml, 10 µg/ml, 0,8 µg/ml, 0,6 µg/ml, 0,4 µg/ml und 0,2 µg/ml. Die Verdünnung der zu messenden Proben variierte je nach erwarteter Proteinmenge. In einer 96-well-Mikrotiterplatte wurden zu den BSA-Standards, den Nullkontrollen und den Proben jeweils 200 µl Bradford-Reagenz (Biorad, Hercules, CA, USA) zugegeben. Nach fünf Minuten wurden die Extinktionen bei einer Wellenlänge von 595 nm im ELISA-Reader bestimmt, und die unbekannte Proteinkonzentration über die Eichgerade ermittelt.

2.4.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Elektrophoretische Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese angewandt. Das Gel setzt sich aus einem Sammelgel (oberes Drittel) und einem Trenngel zusammen. Die beiden Geltypen unterscheiden sich in ihrer Konzentration an Acrylamid, sowie in dem pH-Wert. Die Proteine konzentrieren sich an der Grenze zum Trenngel auf, wodurch eine schärfere Auftrennung erzielt wird. Je nach Größe des zu trennenden Proteins wurden verschiedene Trenngele verwendet. Gewöhnlich wurde ein 15 % Gel bei einem Trennungsbereich von 12 - 43 kDa und ein 10 % Gel bei einem Bereich von 16 - 68 kDa angewendet. Für die Herstellung der Gele wurden folgende Lösungen benutzt, die Angaben reichen für zwei Gele mit 1 mm Dicke in der Gelapparatur Protean II von Biorad:

Sammelgel, 4%		Trenngel, 10%	
1,40 ml	Gelpuffer	3,5 ml	Gelpuffer
2,24 ml	H ₂ O	3,5 ml	H ₂ O
0,56 ml	Acrylamid (30%)	3,5 ml	Acrylamid (30%)
7 μ l	TEMED	7 μ l	TEMED
70 μ l	Ammoniumpersulfat (10%)	70 μ l	Ammoniumpersulfat (10%)

Gelpuffer:	0,1 M 0,3% (w/v) pH 8,4	Tris-HCl SDS
Probenpuffer:	50 mM 12% (v/v) 4% (w/v) 0,01% (v/v) 5% (v/v)	Tris-HCl Glycerin SDS Coomassie Blue G-250 β -Mercaptoethanol
Kathodenpuffer:	100 mM 100 mM 0,1% pH 8,25	Tris-Base Tricin SDS
Anodenpuffer:	200 mM pH 8,9	Tris-HCl

Rotiphorese-	30%	Acrylamid (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Acrylamid Gel 30	0,8%	Bisacrylamid

Das Proteinlysate wurde je nach Konzentration (siehe 2.4.4) weiter verdünnt und zur Denaturierung der Proteine mit $\frac{1}{5}$ Volumen Probenpuffer versetzt und sieben Minuten bei 95 °C inkubiert. Die Proben (meist 20 μ l / Tasche) wurden, wie auch der Proteinmarker „SeeBlue Plus II“ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (7 μ l / Tasche), in die Taschen des Gels gegeben.

Coomassie-Färbung

Die Proteinbanden auf den SDS-Polyacrylamidgelen wurden nachgewiesen, indem das Gel zunächst fünf Minuten in Coomassie-Färbelösung und anschließend zweimal eine Stunde in der Entfärbelösung (25% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure in ddH₂O) inkubiert wurde. Zur Aufbewahrung wurde das Gel über Nacht in H₂O gewässert, in der „Gel-dry Drying Solution“ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) entwässert und zwischen zwei Zellophan-Folien getrocknet.

2.4.6 Western-Blot Analysen

Die Proteine in den SDS-Polyacrylamidgelen wurden durch Wanderung im elektrischen Feld auf PVDF-Membrane übertragen, mittels Antikörper selektiv markiert und durch eine enzymgekoppelte Farbreaktion detektiert.

Nach der Polyacrylamidgelelektrophorese wurde das Trenngel zehn Minuten in Transfer-Puffer (20% (v/v) Methanol; 192 mM Glycin; 25 mM Tris; 0,02% (w/v) SDS) äquilibriert. Die Membran wurde in Methanol angefeuchtet und zusammen mit vier Whatman-Filterpapieren ebenfalls in Transferpuffer getränkt. Die Proteine des SDS-Gels wurden mit Hilfe der „Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell“-Apparatur (Biorad, Hercules, CA, USA) auf die Membran übertragen. Die Apparatur wurde nach Anleitung des Herstellers aufgebaut, und der Proteintransfer erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter konstanter Spannung (18 V).

Um den erfolgreichen Proteintransfer des Western-Blots überprüfen zu können, wurde das Trenngel mit Coomassie angefärbt. Die Membran wurde zweimal zehn Minuten mit PBS

gewaschen, anschließend eine Stunde in Blockierungslösung (3% BSA in PBS) inkubiert und erneut gewaschen (2x10 min., in PBS). Der primäre Antikörper (meist aus Antiseren der immunisierten Ziegen und Ratten) wurde mit 1% BSA in PBS verdünnt ([Serum 1:100 - 1:2000]) und mit der Membran eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C geschwenkt. Nach drei Waschschritten (3x 10 min.; 0,05% Tween 20 in PBS) wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper (Meerrettichperoxidase-Konjugat) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zweitantikörper waren meist 1:1000 bis 1:2000 mit 1% BSA in PBS verdünnt. Anschließend wurde erneut gewaschen (5x 10 min.; 0,05% Tween 20 in PBS). Die DAB-Substratlösung (1 Spatelspitze Diaminiobenzidin, 50 μ l H₂O₂ auf 20 ml Tris-Puffer (25 mM, pH 8,0)) wurde auf die Membran gegeben. Die Farbreaktion wurde abgebrochen, sobald eine sichtbare Bande zu erkennen war. Die DAB-Substratlösung wurde mit H₂O abgewaschen, und die Membranen konnten zwischen Filterpapier getrocknet und aufbewahrt werden.

Zur Analyse unterschiedlicher Seren hinsichtlich ihrer Immunreaktion gegen identische Antigene wurde die Apparatur „Mini-Protean II Multiscreen Apparatus“ (Biorad, Hercules, CA, USA) verwendet. Die Membran wurde nach dem Proteintransfer und der Blockierung mit BSA in diese Kammer eingespannt. Die Inkubation mit den unterschiedlichen Seren (meist 1:100 verdünnt) erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht. Anschließend wurde gewaschen (5x 10 min.; 0,05% Tween 20 in PBS) und die Membran wurde aus der Apparatur entnommen. Die Verwendung des sekundären Antikörpers erfolgte entsprechend der obigen Vorschrift.

2.4.7 Immunisierung mit rekombinanten Proteinen

Für die Immunisierung der Versuchstiere zur Antikörpergewinnung wurde das rekombinante Antigen (siehe 2.4.2) zweimal für jeweils 24 Stunden gegen den Dialysepuffer (500 mM NaCl, 10% Glycerin, in PBS) dialysiert. Dieser Puffer musste gewählt werden, da das virale Gag-Protein bei der Dialyse gegen PBS ausfiel. Unmittelbar vor der Immunisierung wurde das Antigen 1:1 mit dem öligen Adjuvans „Freund's Incomplete Adjuvant“ (Pierce, Rockford, IL, USA) vermischt und solange durch eine Kanüle (\emptyset 0,6 mm) resuspendiert, bis eine sahnige Konsistenz erreicht war.

Für die Immunisierung wurden weibliche Wistar Ratten verwendet, denen jeweils 250 μ g Antigen intramuskulär (in die Muskulatur der Hinterläufe) und subkutan unter das Nackenfell appliziert wurden. Bei der Immunisierung der Ziegen wurden 2x 500 μ g des rekombinanten Antigens, ebenfalls in öligerem Adjuvans, in die Oberschenkelmuskulatur injiziert. Alle Versuchstiere wurden mindestens zwei weitere Male im Abstand von 3-5 Wochen mit iden-

tischem Antigen und nach gleichem Applikationsschema immunisiert („Boost“).

Die Blutentnahme der Ratten erfolgte durch retrobulbäre Punktion. Den Ziegen wurden das Blut an der Halsvene entnommen. Das Serum wurde gewonnen, indem das Blut über Nacht bei 4 °C inkubiert und das entstandene Koagulat sedimentiert (16000 g, 45 min., 4 °C) wurde. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die gewonnenen Seren wurden mittels Western-Blot (siehe 2.4.6) charakterisiert.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Das Wirtsspektrum von PERV

Bei der Xenotransplantation von porcinen Organen auf den Menschen kann eine Übertragung porciner endogener Retroviren bislang nicht vollkommen ausgeschlossen werden, da eine *in vitro*-Transmission auf humane Zellen nachweislich möglich ist [Patience et al., 1997, Specke et al., 2001a]. Bislang unklar ist jedoch, ob es zu einer PERV-Infektion von Transplantat-Empfängern in Anwesenheit eines komplexen Immunsystems kommen kann, und ob die porcinen endogenen Retroviren im Falle einer Infektion ähnliche pathogene Merkmale aufweisen, wie verwandte γ -Retroviren. Diese Fragestellung ist mit Hilfe geeigneter Tiermodelle zu analysieren.

3.1.1 Untersuchung zur PERV Übertragung im Kleintiermodell

Die Infektion muriner Zellen *in vitro*

Um zu klären, ob sich Ratten als Versuchstiere für die PERV-Transmission unter *in vivo* Bedingungen eignen, sollte analysiert werden, ob immortalisierte Zelllinien der Ratte suszeptibel für PERV-Infektionen sein können. Etliche Infektionsversuche von primären Rattenzellen und Zelllinien wurden vorab mit zellfreiem PERV-Virusüberstand der Subtypen A und B, sowie der PERV-Rekombinanten A/C durchgeführt, ohne eine Provirusintegration zu zeigen [Wilson et al., 1998, Specke et al., 2001b], obwohl auf Rattenzellen das Vorhandensein eines zellulären Rezeptors für PERV-B durch Pseudotypisierung nachgewiesen werden konnte [Takeuchi et al., 1998]. Da die Transmission von Retroviren über

Zell-Zell-Kontakt unter Umständen effektiver erfolgen kann als eine zellfreie Virusapplikation, wurde eine Methode der Kokultivierung virusinfizierter „Donorzellen“ mit den zu untersuchenden Rattenzellen etabliert. Um die Wahrscheinlichkeit einer Virustransmission weiter zu steigern, wurden *hras*-transformierte Fibroblasten als „Targetzellen“ eingesetzt, da gezeigt wurde, dass sich murine 3T3-Zellen nach Transformation mit verschiedenen Onkogenen, wie dem aktivierten *v-erbB*, *sos* oder *ras*, leichter mit Herpes simplex Viren (HSV-1) infizieren lassen als entsprechende Wildtyp-Zellen [Farassati et al., 2001].

Derartige Ratten-Fibroblasten (Zelllinie FE-8, [Zuber et al., 2000]), wurden mit dem Vektor pcDNA3.1(+) transfiziert und waren somit resistent gegenüber einer Kultivierung mit Neomycin-haltigem Medium. Diese FE-8^{neo+}-Zellen (10^5 Zellen) wurden über einen Zeitraum von fünf Tagen mit gleicher Menge an virusfreisetzenden 293 PERV-B, bzw. 293 PERV-5⁰ (PERV-A/C) mit und ohne Polybrene (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) kokultiviert. Nach fünf Tagen begann die Selektion mit G418, um die Virusdonorzellen ohne Neomycin-Resistenzgen zu entfernen. Von den verbleibenden FE-8^{neo+}-Zellen wurde nach 20 Tagen Selektion die genomische DNA isoliert (siehe 2.2.10). Zur Kontrolle wurde der Infektionsversuch zugleich mit zellfreiem Virus (PERV infizierte Donorzellen waren mittels Virus-durchlässiger Membran (Transwell, Corning, NY, USA, Porengröße 0,45 μm) von den FE-8^{neo+}-Zellen getrennt) unter ansonsten identischen Versuchsbedingungen durchgeführt. Die unterschiedlichen Proben wurden mittels PCR und *pol* spezifischen Oligonukleotiden auf PERV-Provirusintegration untersucht. Lediglich bei den FE-8^{neo+}-Zellen, die mit den 293 PERV-5⁰-Zellen kokultiviert worden waren (sowohl mit, als auch ohne Polybrene), war ein *pol* spezifisches Amplifikat nachweisbar (Abb. 3.1 A), das allerdings bei nachfolgenden Untersuchungen vier Wochen später nicht mehr detektiert werden konnte (nicht gezeigt). Dies könnte entweder auf eine transiente Infektion hinweisen (d. h. die provirale DNA liegt episomal in der Zelle vor und wurde nicht in das Chromosom der Rattenzelle integriert), oder auf einen Verlust der PERV infizierten Rattenzellen, die möglicherweise hinsichtlich ihres Wachstums den uninfizierten Zellen unterlegen waren. Die dritte Möglichkeit wäre eine Kontamination mit genomischer DNA der eliminierten PERV infizierten Donorzellen, die dadurch für ein falsch positives PCR-Amplifikat verantwortlich sein könnte. Um diese Möglichkeit ausschließen zu können, wurden Oligonukleotide entwickelt, die geeignet sind, um spezifisch die genomische DNA der PERV infizierten 293-Zellen nachweisen zu können. Da 293-Zellen ursprünglich mit Hilfe von Adenoviren immortalisiert worden waren, ist ein charakteristisches Merkmal dieser Zellen die Integration des adenoviralen Gens Ad5. Da der genaue Integrationsort innerhalb des Genoms der 293-Zellen bekannt war [Louis et al., 1997], konnte mit Hilfe dieser

Oligonukleotide der Übergang des viralen mit dem zellulären Bereich amplifiziert werden. In der genomischen DNA der potentiell infizierten FE-8^{neo+}-Zellen war jedoch kein solches PCR-Produkt nachweisbar (Abb. 3.1 B). Allerdings ist die Sensitivität dieser PCR etwa um den Faktor 10 geringer als die PCR mit *pol* spezifischen Oligonukleotiden, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass dennoch restliche genomische DNA von 293-Zellen vorhanden war.

Daher wurde zusätzlich die Reverse Transkriptase-Aktivität des Überstands der FE-8^{neo+}-Zellen, die eine temporäre Provirusintegration von PERV nach Kokultivierung mit den 293-Donorzellen zeigten, bestimmt. Der Überstand dieser Zellen zeigte keine signifikant erhöhten RT-Werte, verglichen mit den uninfizierten unbehandelten FE-8^{neo+}-Zellen (Abb. 3.2). Die nachgewiesene RT-Aktivität ist demnach auf endogene Retroviren der Rattenzellen zurückzuführen. Somit sind auch nach Durchführung des RT-Assay keine Hinweise auf die Expression porciner retroviraler Proteine vorhanden.

Analyse der PERV LTR-Promotoraktivität in murinen Zellen

Voraussetzung für die Replikation der Retroviren ist unter anderem ein starker viraler Promotor, der die Transkription der viralen RNA induziert. Diese Promotoraktivität der Retroviren ist einerseits von der Sequenz der U3-Region innerhalb der 5'-LTR abhängig, zum anderen jedoch auch von der Beschaffenheit der virusinfizierten Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass in humanen embryonalen Nierenzellen eine stärkere Virusreplikation stattfindet, wenn in der U3-Region der PERV-LTR durch Multimerisierung eines 37 bp-Sequenzabschnitts die Anzahl der Bindungsstellen eines humanen Transkriptionsfaktors (NF-Y) erhöht war [Denner et al., 2003].

Um zu überprüfen, ob diese porcinen endogenen Retroviren mit verlängerter LTR auch eine gesteigerte Virusreplikation in murinen Zellen erlauben, wurde mit Hilfe des dualen Luziferase Assays die Promotoraktivität analysiert. Getestet wurden die LTRs mit drei, bzw. fünf der 37 bp-Sequenzabschnitten (3x, bzw. 5x „repeats“), die unmittelbar vor das *firefly-Luciferase* Gen kloniert wurden. Während sich die Expressionsrate des Konstrukts mit 5x „repeats“ nach Transfektion in 293-Zellen erwartungsgemäß mehr als verdoppelte (verglichen mit dem Konstrukt mit 3x „repeats“), war die Expression der Firefly-Luziferase nach Transfektion muriner Zellen mit dem Plasmid der verlängerten LTR deutlich reduziert (Abb. 3.3). Als Positiv-Kontrolle wurde die Expression des *firefly-Luciferase*-Gens in 293- und Rat1-Zellen mit Hilfe eines dritten Plasmids (pGL3-control) in einem unabhängigen Ansatz mittels SV40-Promotor induziert. Die murinen Zellen zeigten dabei sogar eine stärkere Expression der Firefly-Luziferase als die 293-Zellen (Abb. 3.3).

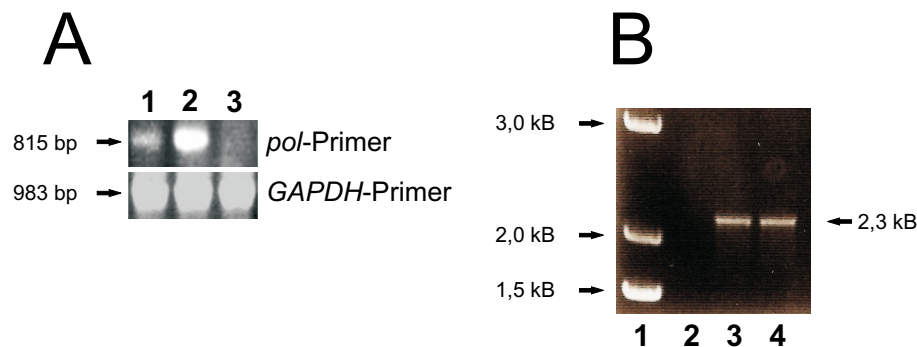


Abbildung 3.1: (A) Nachweis von PERV Sequenzen in FE-8^{neo+}Zellen nach Kokultivierung mit PERV produzierenden 293-PERV-5⁰-Zellen mittels PCR (Spur 1: Kokultivierung ohne Polybrene; Spur 2: Kokultivierung mit Polybrene (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$); Spur 3: uninfiizierte Zellen). Für den Nachweis wurden pol-, bzw. GAPDH-spezifische Oligonukleotide eingesetzt. (B) Nach Selektion mit G418 konnten mit Hilfe von Adenovirus-spezifischen Oligonukleotiden (siehe Text) keine PERV produzierenden 293 PERV-5⁰-Donorzellen unter den PERV infizierten FE-8^{neo+}Zellen nachgewiesen werden (Spur 1: DNA-Marker; Spur 2: FE-8^{neo+}Zellen, kokultiviert mit 293 PERV-5⁰-Zellen; Spur 3: uninfiizierte 293-Zellen; Spur 4: PERV infizierte 293 PERV-5⁰-Zellen).

Untersuchung der PERV-Transmission bei einem Langzeitversuch mit transplantierten porcinen Inselzellen in diabetischen Ratten

Zur Simulation der Xenotransplantation im Kleintiermodell wurde in Kooperation mit der Universität Würzburg die Übertragung der porcinen endogenen Retroviren unter *in vivo*-Bedingungen nach Transplantation von porcinen Inselzellen in Ratten untersucht. Ein denkbares Anwendungsgebiet der Xenotransplantation wäre der Einsatz solcher porciner Inselzellen bei Diabetes mellitus erkrankter Patienten, um das fehlende Insulin durch porcine Zellen produzieren zu lassen (siehe 1.1.2).

Für die Xenotransplantation im Rattenmodell wurden Langerhanssche Inselzellen aus dem Pankreas der Schweine mittels des Enzymgemisches Liberase PI isoliert und durch Gradientenzentrifugation aufgereinigt. Um unerwünschte Abstoßungsreaktionen gegen das Transplantat durch das Immunsystem des Empfängers zu verhindern [Duvivier-Kali et al., 2001], wurden die isolierten Zellen teilweise mit Barium-Alginat verkapselt. Bei den Transplantats-Empfängern (Wistar-Ratten) wurde mittels Streptozotocin-Applikation künstlich eine Diabetes-Erkrankung (Glucose-Gehalt des Blutes $\geq 300 \text{ mg}/\text{dl}$) induziert. Diese Tiere erhielten anschließend ohne Immunsuppression intraperitoneal zwischen 1500 und 2500 Mikrokapseln (entspricht etwa 6000-10000 Inselzell-Äquivalenten). Eine Übersicht über die Versuchstiere, inklusive Applikationsschema und Funktionalität der porcinen Inselzellen ist in Tabelle 3.2

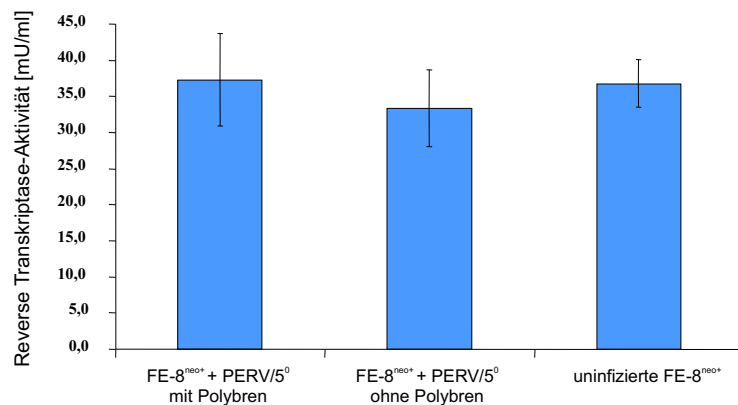


Abbildung 3.2: **Keine signifikante Erhöhung der Reversen Transkriptase-Aktivität im Überstand der FE-8^{neo+}-Zellen, die mit den 293 PERV-5⁰-Donorzellen kokultiviert worden waren, verglichen mit den uninfizierten Zellen.** Die verbleibende RT-Aktivität läßt sich auf endogene Retroviren der Ratte zurückführen.

aufgeführt.

Mehrere Tiere (A35, A33, A40) tolerierten das Xenotransplantat und wiesen über mehr als 200 Tage einen normalen Glucosespiegel auf. Eine Ratte (A35) konnte sogar 460 Tage ohne Zugabe von Insulin überleben, ein Anzeichen für funktionell aktive Insulin-produzierende porcine Inselzellen im Empfänger-Organismus. Das Serum dieser Tiere und das der Kontrolltiere (Transplantation von Mikrokapseln ohne Zellen, bzw. unbehandelte Tiere) wurde mittels Western-blot Assay unter Verwendung einer PVDF-Membran mit Virusproteinlysate auf PERV-spezifische Antikörper untersucht. In keinem der Seren konnten PERV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden, obgleich die Kontrollseren gegen die PERV-Proteine p27Gag und p15E, sowie gegen das gp70 positiv mit dem Antigen auf der Membran reagierten (Abb. 3.4). Somit kann eine Infektion der Versuchstiere mit PERV selbst nach einer Langzeit-Behandlung mit porcinen Zellen ausgeschlossen werden. Auch bei jenem Tier (A72), welches unverkapselte Inselzellen erhielt, konnten keine PERV-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden, so dass ausgeschlossen werden kann, dass das Ausbleiben einer anti-PERV Immunantwort allein auf die Verkapselung mit Barium-Alginat zurückzuführen ist.

Für den Nachweis einer Immunantwort gegen das Xenotransplantat wurde ein Western blot Assay mit Gesamtproteinlysate von Milzzellen deutscher Landrasseschweine als Antigen auf der Membran eingesetzt. Erwartungsgemäß konnten Antikörper gegen porcine Antigene in verschiedenen Ratten, beispielsweise bei Ratte A82 (Serum A14/A15) und Ratte A84 (Serum A18/A19) nachgewiesen werden (Abb. 3.5).

Versuchstier	Serum-Nummer	Anzahl der Inselzell-Äquivalente*	Induktion von Diabetes	Barium-Alginat verkapselt	Blutabnahme ^Ø	Aktivität des Xenotransplantats bis Tag	Immunantwort gegen porcine Antigene [∇]
A35	A1	12000	Ja	Ja	+279	+461	-
A75	A2	10000	Ja	Ja	+152	+201	++
A100	A3	-	Nein	Nein	0	Nein	-
A99	A4	-	Nein	Nein	0	Nein	-
A87	A5	-	Nein	Nein	0	Nein	-
A72 [§]	A6	5x 10000	Nein	Nein	+138	Nein	+++
A91	A7	-	Nein	Ja	+49	Nein	-
A33	A8	10000	Ja	Ja	+248	+240	-
A40	A9	10000	Ja	Ja	+245	+232	-
	A10				+224		-
K1 [^]	A11	-	Nein	Nein	0	Nein	-
A76	A12	10000	Ja	Ja	-1	+17	-
	A13				+33		-
A82 [‡]	A14	2x 10000	Ja	Ja	-1	+4 und +2	-
	A15				+70		++
A83	A16	10000	Ja	Ja	-1	+3	-
	A17				+57		+
A84 [∞]	A18	2x 10000	Ja	Ja	-1	+5 und +2	-
	A19				+84		++++
A85	A20	10000	Ja	Ja	-1	zunächst	-
	A21				+41	inaktiv	-
A94	A22	10000	Ja	Ja	-1	+6	-
	A23				+9		-

Tabelle 3.2: **Übersicht über die Versuchstiere bei der Xenotransplantation mit porcinen Langerhansschen Inselzellen.** *Ein Inselzell-Äquivalent entspricht einer Insel von 150 μm Durchmesser; ^Ø der Zeitpunkt der Blutabnahme vor (-) oder nach (+) der Xenotransplantation; [∇] als porcines Antigen wurde Gesamtproteinlysate von porcinen Milzzellen eingesetzt; [§] das Versuchstier A72 wurde innerhalb von 193 Tagen fünf mal mit unterschiedlicher Anzahl unverkapselter porciner Inselzellen behandelt. Das Serum A6 wurde sechs Tage nach der 4. Transplantation am Tag +138 gewonnen; [^] Das Versuchstier K1 war zum Zeitpunkt der Blutabnahme ein Jahr alt und somit sieben Monate älter als die übrigen Kontrolltiere A99, A100 und A87; [‡] das Versuchstier A82 wurde am Tag +58 retransplantiert und das Serum A15 zwölf Tage später isoliert; [∞] das Versuchstier A84 wurde am Tag +72 retransplantiert und das Serum A19 zwölf Tage später isoliert

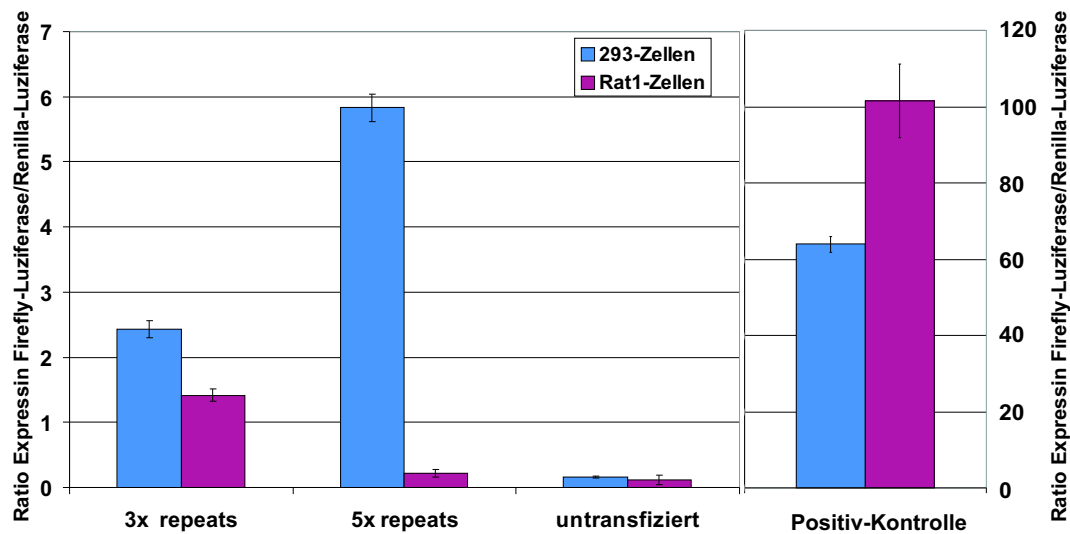


Abbildung 3.3: Analyse der Promotoraktivität der PERV LTR mit unterschiedlicher Anzahl an 37 bp „repeats“ in humanen embryonalen Nierenzellen und Fibroblasten der Ratte. Gemessen wurde die Ratio aus exprimierter Firefly-Luziferase zu exprimierter Renilla-Luziferase (siehe 2.3.12). Zur Kontrolle des Assays wurde die Expression beider Luziferasen von untransfizierten, sowie von Zellen, die mit dem Plasmid pGL-3 control transfiziert worden waren (rechter Bildabschnitt), gemessen.

3.1.2 Risikoevaluierung der PERV-Transmission in einem drei-Spezies-Modell mit Cynomolgus-Affen

Trotz vieler Vorteile der Risikoevaluierung im Kleintiermodell (einfachere Haltung, geringere ethische Bedenken) ist die Erkenntnis zur Virussicherheit bei der Xenotransplantation hinsichtlich der großen phylogenetischen Distanz zum Menschen nur bedingt aussagekräftig. Daher ist es unumgänglich, nicht-humane Primaten in die Untersuchung der Pathogenität der porcinen endogenen Retroviren mit einzubeziehen, zumal gezeigt werden konnte, dass viele Zellen der Primaten (wie z. B. Rhesus und Pavian) mit PERV unter *in vitro* Bedingungen infizierbar sind [Wilson et al., 2000, Specke et al., 2001b].

In Kooperation mit der Universität Hannover wurde eine Studie durchgeführt, in der porcine Nieren auf Cynomolgus-Affen transplantiert wurden. Um die Situation einer Xenotransplantation im Menschen besser simulieren zu können, und da es bislang nicht gelungen war, Zellen des Cynomolgus-Affen *in vitro* mit PERV zu infizieren, wurde zusätzlich ein Stück einer menschlichen Vene (*Vena saphena*) zwischen porciner Niere und dem Kreislaufsystem des Affen verpflanzt (siehe Abb. 3.6). Eventuell auftretende Infektionen dieser

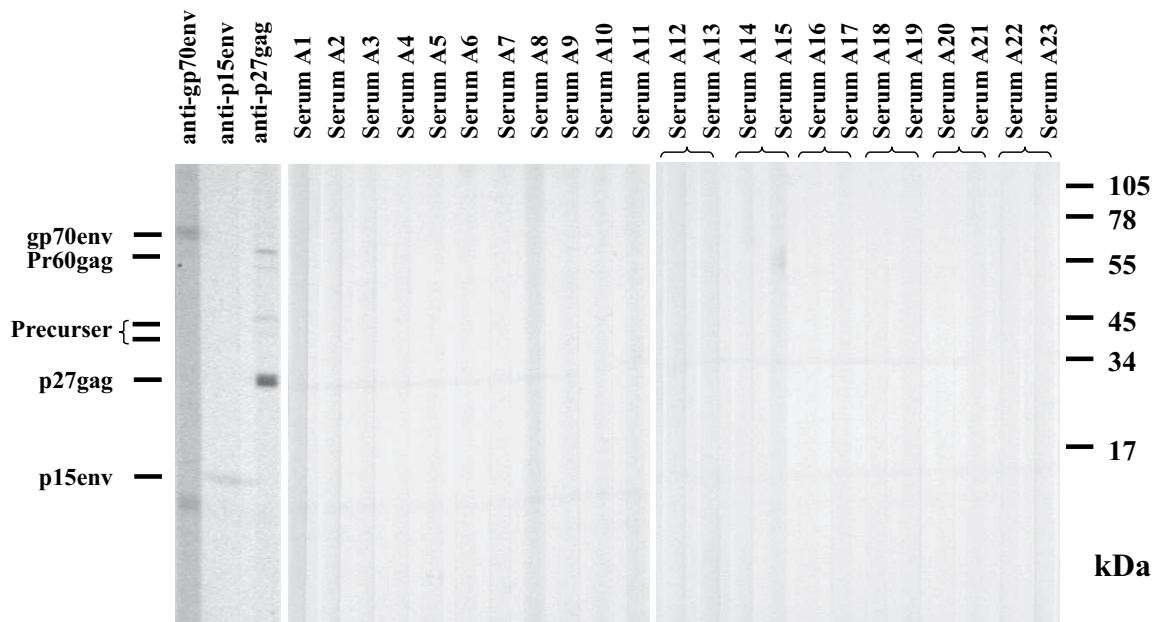


Abbildung 3.4: **Screening auf PERV-spezifische IgG-Antikörper in den Seren der Versuchstiere.** Das für die Serumherstellung verwendete Blut wurde den Ratten zu den angegebenen Zeitpunkten (Tabelle 3.2) entnommen. Virusproteinlysat von PERV/5⁰ diente als Antigen auf der PVDF-Membran. Sowohl die spezifischen Kontrollseren gegen das p27Gag-Protein (kreuzreagierender anti-FeLV-Antikörper), und die Env-Proteine gp70Env (Ziegenserum 10) und p15Env (Ziegenserum 20), als auch die eingesetzten Rattenserum wurden 1:100 verdünnt. Die Detektion der murinen Antikörper erfolgte mittels anti-Ratte-Antikörper (Peroxidase-Konjugat; 1:1000 verdünnt), die der Kontrollseren mittels Protein G (Peroxidase-Konjugat; 1:5000 verdünnt). Geschweifte Klammern zeigen die Seren identischer Tiere zu unterschiedlichen Blutabnahmezeitpunkten.

suszeptiblen Endothelzellen könnten dann Aufschluß über die Infektiösität der porcinen endogenen Retroviren unter *in vivo* Bedingungen liefern. Einem Teil der Affen wurden die Nieren transgener Schweine, die das humane Komplement-regulierende Protein CD59 auf der Oberfläche exprimieren (siehe 1.1.3), transplantiert, den restlichen Tieren wurden Nieren unbehandelter Schweine eingepflanzt. Um eine Abstoßungsreaktion des Affens auf das humane und porcine Transplantat zu vermeiden, wurde als Immunsuppression eine Kombinationstherapie mit Cyclophosphamid, Cyclosporin A, Steroiden, Mycophenolsäure und C1-Inhibitor eingesetzt.

Die Gruppe umfaßte sechs Tiere, die alle kurze Zeit nach der Transplantation an den Folgen der starken Immunsuppression verstarben, bzw. wegen der starken Nebenwirkungen der Medikamente euthanasiert werden mußten. Am längsten lebte der Affe 31-679 mit 19 Tagen

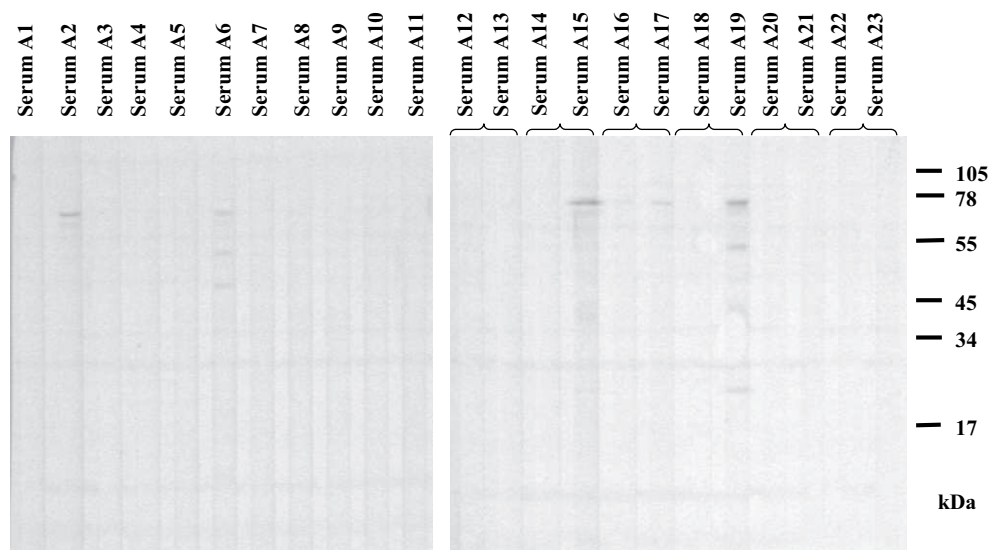


Abbildung 3.5: **Western-blot Assay der getesteten Rattenserum auf spezifische Antikörper gegen porcine Epitope.** Gesamtproteinlysate von porcinen Milzzellen dienten als Antigen. Die Detektion der murinen Antikörper erfolgte mittels anti-Ratte-Antikörper (Peroxidase-Konjugat; 1:1000 verdünnt). Geschweifte Klammern zeigen die Seren identischer Tiere zu unterschiedlichen Blutabnahmezeitpunkten.

nach der Transplantation. Aus allen Tieren wurde das humane Gefäßstück explantiert und mittels PCR unter Verwendung *pol*-spezifischer Oligonukleotide auf Provirus-Integration detektiert. Weder dort, noch in den Organen der Cynomolgus-Affen konnten Hinweise auf eine Infektion mit PERV nachgewiesen werden, ohne gleichzeitig auch genetisches Material von porcinen Zellen mittels Cytochromoxidase II spezifischer Oligonukleotide zu detektieren [Winkler et al., 2005].

Da trotz starker Immunsuppression die Möglichkeit bestand, dass das Immunsystem der Affen Antikörper gegen Epitope der porcinen endogenen Retroviren nach einer stattgefundenen Infektion gebildet hatte, wurde das Serum der Affen, das an verschiedenen Tagen abgenommen worden war, auf PERV-spezifische Antikörper analysiert. In Western-Blot Assays mit Membranen, auf die Virusproteinlysate transferiert worden waren, wurden die Affenserum hinsichtlich PERV-spezifischer IgGs untersucht (Abb. 3.7). Da nach einer viralen Infektion zunächst spezifische Antikörper des Typs IgM sezerniert werden, wurde das Serum zusätzlich - in Anbetracht der kurzen Zeit zwischen Transplantation und dem Tod der Tiere - auf PERV-spezifische IgMs analysiert (Abb. 3.8). In beiden Western-Blot Assays gelang der Nachweis viraler Gag- bzw. Env-Proteine mit Hilfe der generierten Kontrollseren, die Affenserum hingegen wiesen keine PERV-spezifischen Antikörper auf.

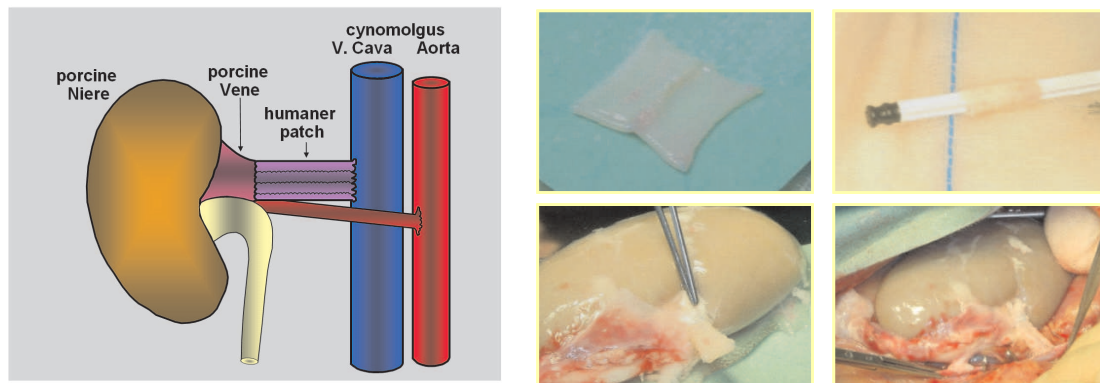


Abbildung 3.6: **Analyse der PERV-Übertragung in einem drei-Spezies-Xenotransplantationsmodell.** Links: Die porcine Niere wird über ein Fragment einer humanen Vene an den Blutkreislauf des Cynomolgus-Affen angeschlossen. Rechts: Ein Teil der humanen *Vena saphena* wird zu einem passenden Verbindungsstück vernäht und an das porcine Organ angeschlossen.

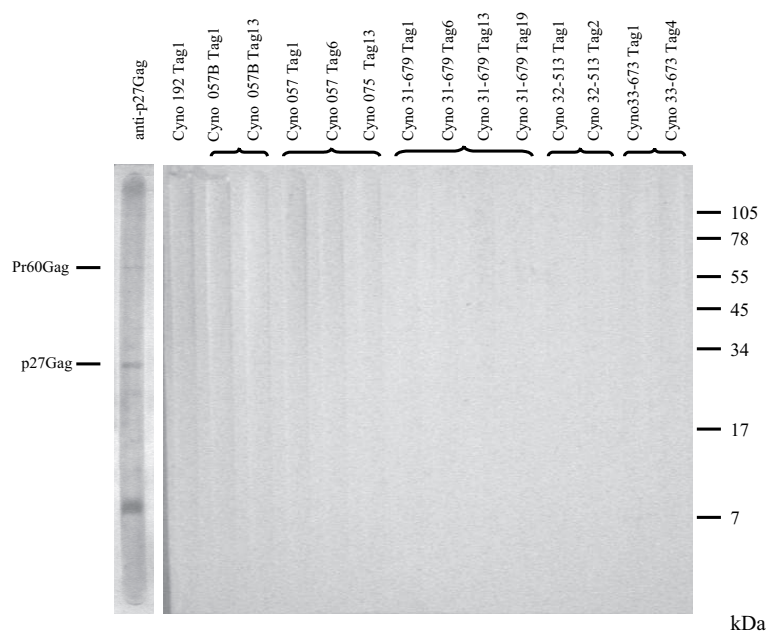


Abbildung 3.8: **Nachweis auf früh sezernierte, PERV spezifische IgM-Antikörper in den Seren der Versuchstiere.** Das für die Serumherstellung verwendete Blut wurde den Cynomolgusaffen zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Virusproteinlysat von PERV/5⁰ diente als Antigen auf der PVDF-Membran. Sowohl das spezifische Kontrollserum gegen das p27Gag-Protein (Ziegen Serum 18), als auch die eingesetzten Affenserum wurden 1:100 verdünnt. Die Detektion der simianen IgMs erfolgte mittels kreuzreagierenden polyklonalen anti-human IgM Serum (Peroxidase-Konjugat; 1:2000 verdünnt), das Ziegen Serum wurde mittels Protein G (Peroxidase-Konjugat; 1:5000 verdünnt) detektiert. Geschweifte Klammern zeigen die Seren identischer Tiere zu unterschiedlichen Blutabnahmezeitpunkten.

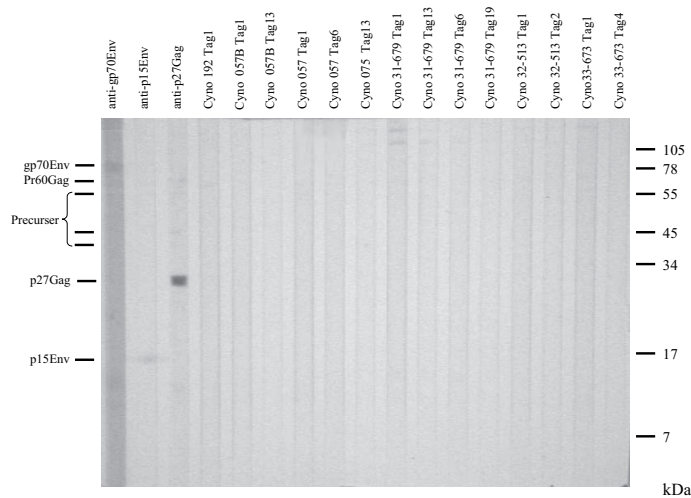


Abbildung 3.7: **Screening auf PERV-spezifische IgG-Antikörper in den Seren der Versuchstiere.** Das für die Serumherstellung verwendete Blut wurde den Cynomolgusaffen zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Virusproteinlysate von PERV/5⁰ dienten als Antigen auf der PVDF-Membran. Sowohl die spezifische Kontrollseren gegen das p27Gag-Protein (kreuzreagierender anti-FeLV-Antikörper) und die Env-Proteine gp70Env (Ziegen Serum 10) und p15Env (Ziegen Serum 20) als auch die eingesetzten Affenseren wurden 1:100 verdünnt. Die Detektion aller Antikörper erfolgte mittels Protein G (Peroxidase-Konjugat; 1:5000 verdünnt).

Zusätzlich wurde in allen Affenseren die RT-Aktivität bestimmt, da bei einer eventuell aufgetretenen Infektion mit PERV die Reverse Transkriptase mit Hilfe des hochsensitiven RT-Assays nachzuweisen sein könnte (siehe 2.3.11). Die RT-Aktivität der meisten Seren blieb unterhalb der Nachweisgrenze. Lediglich die Tiere 32-513 und 33-673 zeigten am ersten Tag nach der Transplantation einen minimal erhöhten, nicht signifikanten RT-Wert, der am darauffolgenden Tag abnahm, bzw. nicht mehr nachweisbar war (Abb. 3.9).

3.2 Herstellung eines PERV-Moleklarklons

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die Rekombinanten der Subtypen A und C der porcinen endogene Retroviren humane Zellen besonders gut infizieren können [Wilson et al., 1998, Scobie et al., 2004]. Diese „exogenen“ PERVs, die in dieser Form nicht im Genom der porcinen Zellen existieren, rekombinieren in der Nähe der Rezeptorbindungsstelle der „variable region A“ (VRA) des *env*-Gens und können sich - nach Infektion menschlicher Zellen - an die veränderten Transkriptionsbedingungen der humanen Zellen anpassen [Denner et al., 2003]. Diese Adaptation erfolgt durch Multimerisierung kurzer Sequenzabschnitte

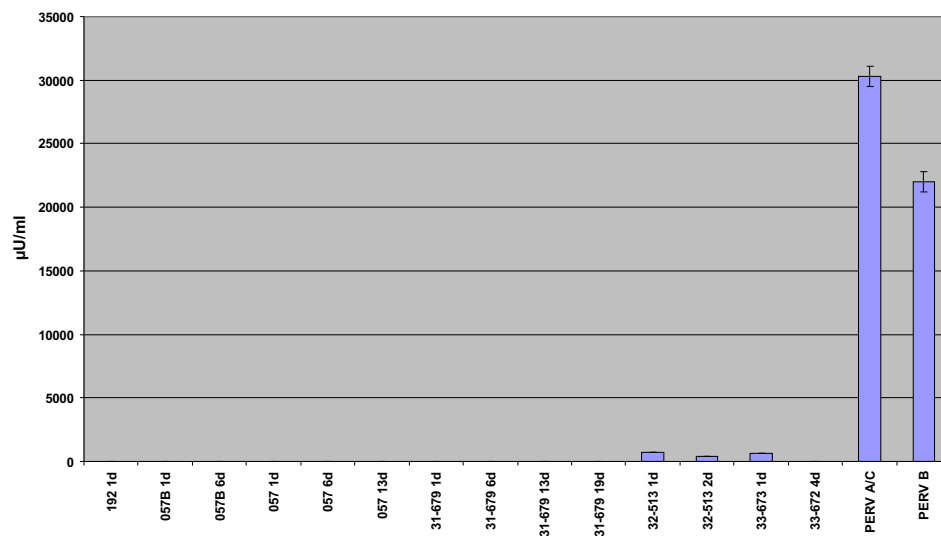


Abbildung 3.9: Nachweis der Reversen Transkriptase Aktivität in den Seren der sechs Versuchstiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Als Kontrolle des RT-Assays wurde der Überstand von PERV-A/C, bzw. PERV-B infizierten 293-Zellen hinsichtlich RT-Aktivität untersucht.

(37 bp) innerhalb der LTR und erlaubt dadurch eine gesteigerte Bindung humaner Transkriptionsfaktoren (z. B. des „nuclear factor Y“, NF-Y), mit dem Ergebnis einer erhöhten Virusreplikation: Während das ursprüngliche Genom des PERV-Subtyp C nur eine dieser Nukleotidsequenz enthält [Akiyoshi et al., 1998], erhöht sich die Zahl dieser Sequenzen nach der fünften Passagierung des viralen Überstandes auf humane embryonale Nierenzellen (293-PERV-5⁰) auf bis zu fünf „repeats“.

Um diese exogenen Retroviren, die bei der Risikoevaluierung der Xenotransplantation eine entscheidende Rolle spielen, besser charakterisieren zu können, sollte ein replikationskompetenter PERV-A/C-Molekularklon generiert werden.

Klonierung des PERV-A/C-Molekularklons

Die provirale Nukleotidsequenz des PERV-A/C Genoms sollte mittels PCR aus 293-PERV-5⁰ Zellen amplifiziert werden und in ein geeignetes Vektorsystem kloniert werden. Um eine starke virale Expression zu erreichen, wurde auf die U3-Region der 5'-LTR der proviralen Sequenz zugunsten eines CMV-Promotors verzichtet, und daher der eukaryotische Expressionsvektor pcDNA3.1(+) ausgewählt. Die nicht benötigte Neomycin-Resistenz-Expressionskassette wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Not* I und *Bst*Z17 I entfernt, um die Klonierung des ansonsten ca. 13 kb großen Vektors (inklusive PERV-Insert) zu erleichtern.

Da die beiden „long terminal repeats“ (LTR) am 5'- und 3'-Ende des viralen Genoms identisch sind, konnte die ca. 9 kB große provirale Sequenz nicht mit einer einzelnen PCR amplifiziert werden. Stattdessen wurde zunächst ein Bereich von der R-Region am 5'-Terminus bis zu dem *env*-Gen der proviralen Sequenz mittels PCR amplifiziert. Dabei wurden die Oligonukleotide PERV-LTR-R_Spe I und PERV-gp70-blunt_down verwendet, so dass das 5'-Ende des PCR-Amplifikats mit dem Restriktionsenzym *Spe* I verdaut werden konnte. Zusätzlich wurde innerhalb des Amplifikats (etwa an Position 7000 bp) mit der Endonuklease *Kpn* I an einer im PERV-Genom nur einmal vorkommenden *Kpn* I-Schnittstelle geschnitten. Der Vektor pcDNA3.1(+)^{neo-} wurde an der „multiple cloning site“ (MCS) mit *Nhe* I und *Kpn* I geschnitten, über die kompatiblen Enden mit dem verdauten Insert (s. o.) ligiert und in die chemokompetenten *E. coli* Bakterien „XL10-Gold“ transformiert. Die Plasmid-DNA wurde vor der zweiten Klonierungsrunde aus diesen Bakterien aufgereinigt und mit dem Restriktionsenzym *Kpn* I geschnitten. Eine zweite PCR wurde mit den Oligonucleotiden PERV-gp70-mid-Sac L_{up} und PERV-3'-LTR-*Kpn* L_{down} mit genomischer DNA aus 293-PERV-5⁰ Zellen durchgeführt, das PCR-Produkt an der internen und eingefügten Schnittstelle mit *Kpn* I verdaut, in den entsprechend geschnittenen Vektor ligiert und transformiert (Abb. 3.10). Da diese Ligation ungerichtet verlief, mußten die individuellen Klone mittels Restriktionsverdau hinsichtlich der korrekten Orientierung des zweiten Inserts überprüft werden. Für die genaue Charakterisierung des PERV-A/C-Molekularklons wurde die gesamte eingefügte provirale Sequenz mit den im Anhang angegebenen Oligonukleotiden sequenziert. Die zu einem Stopp-Codon führende Mutation bei Position 3225 (G→T Austausch) wurde per Mutagenese-PCR unter Verwendung der im Anhang angegebenen Oligonukleotiden ersetzt.

Sequenzanalyse des PERV-A/C-Molekularklons

Aufgrund der durchgeführten Sequenzierungen des kompletten proviralen Genoms des PERV-A/C-Molekularklons konnte die Aminosäuresequenz des exprimierten viralen Env-Proteins mit anderen PERV-Subtypen verglichen werden (Abb. 3.11). Zusätzlich wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt, um die Unterschiede innerhalb der PERV-Subtypen bzw. innerhalb der γ -Retroviren darzustellen. Verglichen wurden die Aminosäure-Sequenz des Polyproteins Gag-Pol, sowie des env-Proteins (Abb. 3.12). Nach erfolgter Mutagenese-PCR war das Leseraster aller viralen Proteine des Molekularklons durchgängig, und es konnten keine Stoppcodons innerhalb der kodierenden Sequenzen identifiziert werden.

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA ergab, wie auch eine zusätzlich durchgeführte PCR

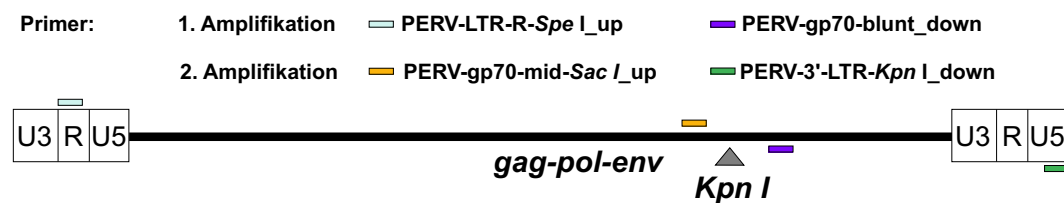


Abbildung 3.10: **Klonierung des PERV-A/C-Molekularklons.** In der ersten Amplifikationsrunde wurde mit den Oligonukleotiden PERV-LTR-R-Spe I_{up} und PERV-gp70-blunt_{down} der Bereich von der R-Region am 5'-Ende der proviralen Sequenz bis zur env-Region (3'-Ende des gp70-Gens) amplifiziert. Mit der zweiten PCR unter Verwendung der Oligonukleotide PERV-gp70-mid-Sac I_{up} und PERV-3'-LTR-Kpn I_{down} wurde der restliche Bereich inklusive einer überlappenden Sequenz im env-Gen amplifiziert. Mit Hilfe der internen Kpn I-Schnittstelle konnten beide Fragmente miteinander ligiert werden. Nähere Erläuterungen siehe Text.

mit Oligonukleotiden LTR_{up/down}, dass die 3'-LTR des Molekularklons vier der 37 bp Sequenzabschnitte (Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors NF-Y) enthielt (Abb. 3.13) und somit - in humanen Zellen - auch in der zweiten Replikationsrunde (die ehemalige 3'-LTR übernimmt an 5'-Position die Promotorfunktion, siehe 1.2.5) eine erhöhte Expressionsrate aufweisen sollte.

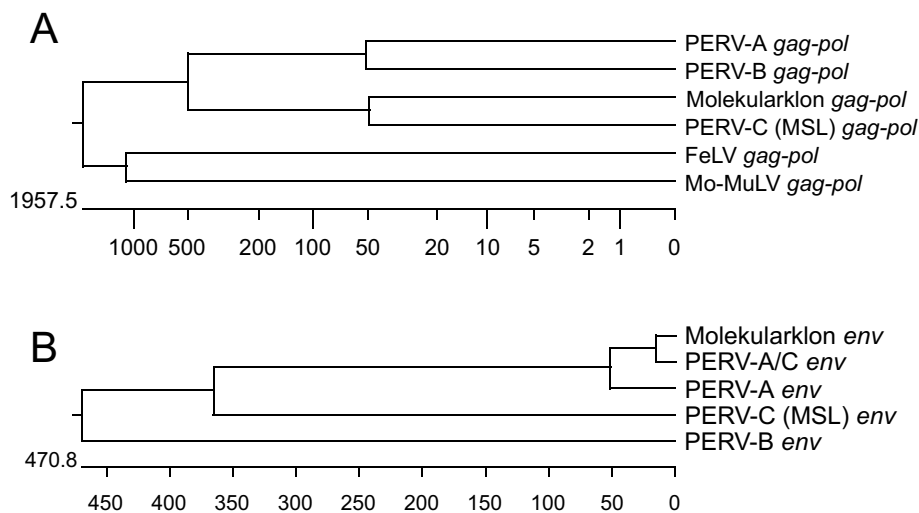
Transfektion eukaryotischer Zellen

Transgene Ratten oder Mäuse mit dem kürzlich identifizierten humanen PERV-Rezeptor [Ericsson et al., 2003] könnten als Tiermodell bei der Charakterisierung der pathogenen Eigenschaften der porcinen endogenen Retroviren von Bedeutung sein. Dennoch ist unklar, ob andere wichtige Faktoren, wie etwa bestimmte zelluläre Proteine, die für die Expression, bzw. das korrekte Spleißen der viralen mRNA benötigt werden, in murinen Zellen vorhanden sind. Daher wurden Zellen von Maus und Ratte mit der Plasmid-DNA des PERV-A/C-Molekularklons transfiziert (siehe 2.3.4), um klären zu können, ob die Zellen der einzelnen Spezies geeignet sind, die einzelnen Schritte der Virusreplikation zu durchlaufen und infektiöse Partikel freizusetzen. Zusätzlich wurden humane embryonale Nierenzellen transfiziert, um die Funktionalität des Molekularklons analysieren zu können.

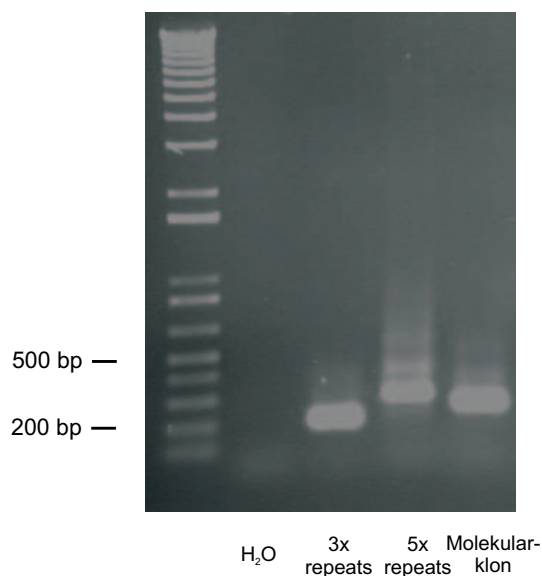
Dazu wurde zum einen 48 Stunden nach der Transfektion der 293-Zellen die Reverse Transkriptase Aktivität des Überstands bestimmt (siehe 2.3.11). Verglichen mit den unbehandelten Zellen konnte eine deutliche Steigerung der RT-Aktivität festgestellt werden (siehe Abb. 3.14). Zum anderen konnte das virale p27Gag-Protein, sowie auch der Gag-Precursor, im Zelllysate transfizierter 293-Zellen mittels Western-Blot Assays identifiziert werden (Abb. 3.15). Daher ist anzunehmen, dass die CMV-vermittelte Expression der viralen Proteine stattfindet.

1	MHPTLSRRHLPIRGGKPKRLKIPLSFASIAWFLTLSITSQVNGKRLVDSPPNSHKPLSLTWLLTDSGTGININSTQGEAPL	Molekularklon
1N.....T.M.IG..L.....I.....N.....	PERV-C (MSL)
1R.....P.....	PERV-A
1P.....	PERV-A/C
81	GTWWPELYVCLRSVIPGLNDQATPPDVLRAYGFYVCPGPPNNEEYCGNPQDFFCQWSCVTSNDGNWKPVSQQDRVSYS	Molekularklon
81D.....S.--TS...I.H.H.....GKH...R.....N.....Y...T.....F.	PERV-C (MSL)
81	PERV-A
81	PERV-A/C
161	FVNNPTSYNQFNYGHGRWKDWQQRVQKDVNRNKQISCHSLDDLKISFTEKQKQENIQKWVNGMSWGIVVYGGSGRKKGS	Molekularklon
158	Y..TY..SG....-----LT.-----I.TGSPK.SPS.....L.....M.....KQP..	PERV-C (MSL)
161	PERV-A
161R.....	PERV-A/C
241	VTIIRLRIETQMEPPVAIGPNKGLAEQGPPIQEQRPSNPSPDYNTTSRSVPTPEPNITIKTGAKLFNLIQGAFAQLNSTTP	Molekularklon
226	I.....K.-N.L...M.....TV.TG.R..T.---G.G..S-.I..G.D...SSS.T.M....S.....	PERV-C (MSL)
241G.....	PERV-A
241G.....	PERV-A/C
321	EATSSCWLCLASGPPYYEGMARGGKFNVTKHRDQCTWGSQNKLTLETVSGKGTICGMVPPSHQHLNHTAFNRTSSEQ	Molekularklon
300R.....K.....Q.....	PERV-C (MSL)
321	PERV-A
321	PERV-A/C
401	YLVPGYDGWWACNTGLTPCVSTLVFNQTKDFCVMVQIVPRVYYYPEKAVLDEYDYRYNRPKREPISLTLAVMLGLGVAAG	Molekularklon
380R.....I.....I.....NH.Q.....	PERV-C (MSL)
401R.....	PERV-A
401R.....	PERV-A/C
481	VGTGTAALITGPQOLEKGLSNLHRIVTEDLQALEKSVSNLEESLTSLSEVVLQNRRLDLLFLKEGGLCVLKEECCFYV	Molekularklon
460V.....T.....	PERV-C (MSL)
481	PERV-A
481N.....	PERV-A/C
561	DHSGAIRDSMNKLRERLEKRRREKETTQGWFEWGFNRSPWLATLLSALTGPLIVLLLLLLTVGPCIINKLIAFIRERISAV	Molekularklon
540L.....	PERV-C (MSL)
561S.....HK...AG.....K...VT.....VI.....L..RFV..V..QV...	PERV-A
561	PERV-A/C
641	QIMVLRQQYQSPSSREAGR.	Molekularklon
620	PERV-C (MSL)
641	R.....GLP.	PERV-A
641	PERV-A/C

Abbildung 3.11: Sequenzvergleich des *env*-Gens des hergestellten Molekularklons mit den *env*-Sequenzen von PERV-C (MSL, NCBI Accession Nummer NC_001940), PERV-A (AY288779) und der PERV-Rekombinanten A/C (AF130444).



Abbildungung 3.12: **Darstellung des phylogenetischen Stammbaums verschiedener porciner endogener Retroviren, anderer γ -Retroviren und der viralen Sequenzen des PERV-A/C-Molekularklons.** Als Grundlage des Vergleichs wurde jeweils die Aminosäuresequenz des Gag-Pol-Polypeptids (Abb. A) und des Env-Proteins (Abb. B) verwendet. Die Sequenzen PERV-A (Accession Nummer AY288779), PERV-B (AJ133818) und PERV-C (MSL, AF038600), sowie FeLV (NC_001940) und Moloney-MuLV (J02255) stammen von der Sequenzdatenbank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).



Abbildungung 3.13: **Analyse der LTR-Länge mittels PCR unter Verwendung LTR-spezifischer Oligonukleotide.** Als Kontrollen wurden bei der PCR Plasmide eingesetzt, die die PERV-LTR mit drei, bzw. fünf der 37 bp Sequenzabschnitte enthielten. Als Negativkontrolle wurde anstelle der Template-DNA Wasser eingesetzt.

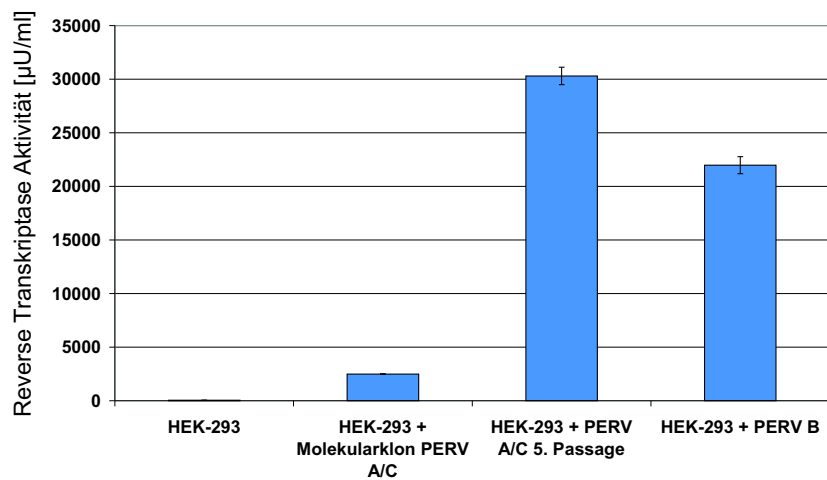


Abbildung 3.14: Messung der Reversen Transkriptase-Aktivität im Überstand von 293-Zellen nach der Transfektion mit Plasmid-DNA des PERV-A/C-Molekularklons. Zum Vergleich sind die entsprechenden RT-Aktivitäten unbehandelter sowie PERV-5⁰ und PERV-B-infizierter Zellen dargestellt.

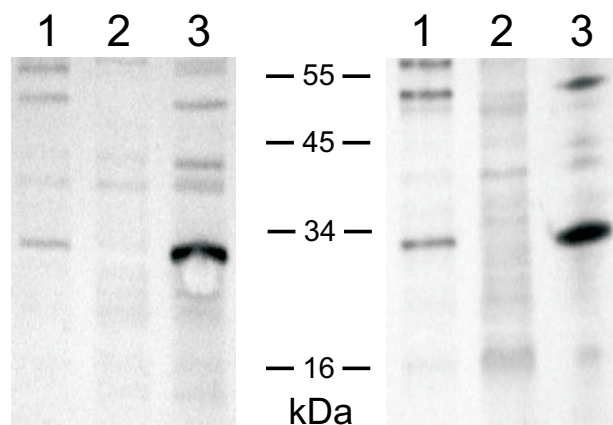


Abbildung 3.15: Western-Blot Assay zum Nachweis des exprimierten p27Gag-Proteins nach Transfektion von 293-Zellen mit Plasmid-DNA des PERV-A/C-Molekularklons. Die Detektion des p27Gag-Proteins erfolgte mittels Ziegen Serum 14 (links), bzw. Rattenserum 1 (rechts). Spur 1: Zellysate von 293-Zellen nach Transfektion mit Plasmid-DNA des PERV-A/C-Molekularklons. Spur 2: Zellysate von nicht transfizierten und nicht infizierten 293-Zellen. Spur 3: Zellysate von PERV-B-infizierten 293-Zellen.

Zur Analyse der exprimierten bzw. der gespleißten mRNA in murinen Zellen, wurde 48 Stunden nach der Transfektion dieser Zellen mit der Plasmid-DNA des PERV-A/C-Molekularklons die zelluläre RNA isoliert. Unter Verwendung von Oligonukleotiden, die nahe der

Spleiß- Donor-(SD_{up/down}), bzw. Spleiß-Akzeptor-Stelle (SA_{down}) binden, kann durch RT-PCR die Vollängen-mRNA (ein PCR-Produkt von ca. 200 bp) und die gespleißte *env*-mRNA (PCR-Produkt von ca. 500 bp) unabhängig voneinander detektiert werden. Demnach wurde die virale Vollängen-mRNA bei humanen 293-, aber auch bei den murinen Zellen 3T3 und Rat1 exprimiert (siehe Abb. 3.16). Die gespleißte *env*-mRNA hingegen konnte lediglich bei den 293- und den Fibroblasten der Maus (3T3), nicht jedoch bei den Rat1-Zellen nachgewiesen werden.

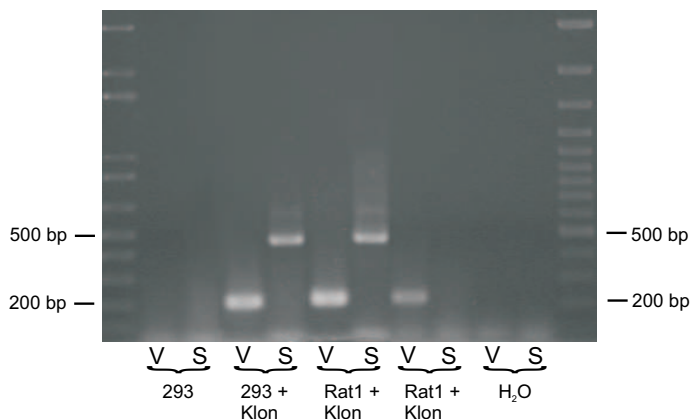


Abbildung 3.16: **Das Expressionsmuster der Voll-Längen-mRNA und der gespleißten *env*-mRNA nach Transfektion von Zellen unterschiedlicher Spezies mit dem PERV-A/C-Molekularklon.** Mittels RT-PCR konnte mit Hilfe von Oligonukleotiden, die Spleißdonor und Spleißakzeptor flankieren, zwischen der viralen Gesamt-mRNA (Amplifikat bei ca. 200 bp, Spur V = Voll-Länge) und der gespleißten *env*-mRNA (Amplifikat von ca. 500 bp, Spur S = Spleiß) unterschieden werden.

Mehrfach wurde versucht, die produktive Infektion nach Transfektion humaner embryonaler Nierenzellen mit Plasmid-DNA des PERV-A/C-Molekularklons nachzuweisen. Dazu wurde der Überstand der Zellen in unterschiedlichen Abständen nach der Transfektion (48 Stunden - 2 Wochen) abgenommen, steril filtriert und auf uninfizierte Zellen in Anwesenheit von Polybrene (6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gegeben. Der Nachweis einer PERV-Infektion erfolgte mittels PCR unter Verwendung pol-spezifischer Oligonukleotide (PK-1/6). Häufig auftretende Kontamination mit Plasmid-DNA des Molekularklons konnten dabei ebenfalls mittels PCR detektiert werden, indem Oligonukleotide eingesetzt wurden, die zum einen mit der proviralen PERV-Sequenz, zum anderen mit der DNA des Vektors pcDNA3.1(+)^{neo}-hybridisierten. Eine tatsächliche provirale Integration von PERV konnte dabei nie nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.3 Herstellung von rekombinanten viralen Proteinen - Induktion p27 Gag spezifischer Antikörper

Viele direkte und indirekte Nachweismethoden zur Analyse viraler Erreger funktionieren mit spezifischen Antikörpern gegen das virale Antigen. Um die virale Expression - auch hinsichtlich der Fragestellung einer Replikationshemmung mittels RNAi - quantifizieren zu können, sollte ein spezifisches p27Gag-Serum mit Hilfe eines rekombinant hergestellten Antigens generiert werden.

3.3.1 Klonierung des p27Gag-Expressionsvektors

Um größere Mengen des viralen Antigens gewinnen zu können, wurde die virale Sequenz des p27Gag-Proteins in ein bakterielles Expressionsplasmid kloniert. Für die Aufreinigung des Antigens empfiehlt sich die Verwendung eines Vektors, der mit einem His-“Tag“ (6x Histidin am N-Terminus) ausgestattet ist und dadurch nur ein geringes immunogenes Potential besitzt.

Die p27Gag-Sequenz wurde mittels PCR aus genomischer DNA von PERV-B infizierten humanen Nierenzellen (293) amplifiziert. Dazu wurden Oligonukleotide verwendet, die neben der Sequenzhomologie zu *gag* auch mit den Schnittstellen *Sac* I und *Hind* III (p27Gag_*Sac* I_{up} und p27Gag_*Hind* III_{down}) ausgestattet waren. Nach Verdau des gereinigten PCR-Produktes und des Vektors pQE30 mit den entsprechenden Endonukleasen wurden Vektor und Insert ligiert, und diese DNA wurde in die chemokompetenten Bakterien TOP-10 transformiert. Positive Klone konnten identifiziert werden, und das Insert wurde nach Aufreinigung der Plasmid-DNA eines Klons (Klon 5) mit den Primern pQE und pQE-rev vollständig von 5'-3'- und 3'-5'-Richtung sequenziert. Die Nukleotidsequenz der Oligonukleotide und des sequenzierten *gag*-Fragments ist im Anhang aufgeführt. Das Konstrukt zeigte ein vollständiges Insert im richtigen Leseraster.

3.3.2 Expression des p27Gag in *E. coli* Bakterien

Die Plasmid-DNA pQE30-p27Gag Klon 5 (siehe 3.3.1) wurde in die *E. coli* Bakterien M15 transformiert, mit IPTG induziert und nach vier Stunden lysiert. Das rekombinante p27Gag-Protein wurde mittels Säulenchromatographie unter Verwendung von Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Das Protein-Lysat wurde in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

aufgetrennt und das SDS-Gel wurde mit Coomassie-Reagenz angefärbt. Das rekombinante Protein konnte erfolgreich von den übrigen bakteriellen Proteinen getrennt werden (siehe Abb. 3.17). Da das rekombinante Protein neben den Aminosäuren des p27Gags zusätzliche funktionale Gruppen (His-Tag) enthält, zeigte es ein zu erwartendes Molekulargewicht von 29 kDa.

Für die Immunisierung der verschiedenen Versuchstiere mit diesem rekombinanten Antigen wurde der im Protein-Lysat enthaltene Harnstoff mittels Dialyse entfernt. Da das rekombinante p27Gag in reinem PBS-Puffer ausfiel, wurden dem Dialyse-Puffer zusätzlich NaCl (500 mM) und Glycerin (10%) zugesetzt (siehe 2.4.7).

3.3.3 Immunisierung der Versuchstiere mit rekombinantem p27Gag

Zwei Ziegen und drei Ratten wurde das virale Antigen p27Gag nach dem in Kapitel 2.4.7 angegebenen Immunisierungsschema appliziert. Die Seren wurde vor und nach der Immunisierung gewonnen und im Western-Blot-Assay hinsichtlich spezifischer anti-p27Gag-Antikörper untersucht. Als geblottetes Antigen diente das rekombinante p27Gag-Protein, das Gesamt-Proteinlysate einer Viruspräparation nach Ultrazentrifugation oder das Proteinlysate PERV-infizierter Zellen. Wie in Abbildung 3.18 zu sehen ist, erkennen die PERV-spezifischen Antikörper nicht nur das virale Antigen p27Gag, sondern auch Gag-Precursor-Proteine mit Molekulargewichten von etwa 49 kDa und 60 kDa.

Das gewonnene Serum wurde in der Arbeitsgruppe als Positiv-Kontrolle beispielsweise bei der Analyse von Patienten-Seren hinsichtlich PERV-spezifischer Antikörper genutzt [Irgang et al., 2002].

3.4 Hemmung der Virusreplikation mit Hilfe der RNA-Interferenz (RNAi)

3.4.1 Selektion potenter synthetischer siRNAs

Die siRNAs, die in der Vergangenheit von den verschiedenen Arbeitsgruppen verwendet wurden, zeigten, dass das Ausmaß der Hemmung zellulärer Proteine mittels RNAi je nach Sequenz unterschiedlich ausfallen kann. Neben einer vollständigen Homologie der siRNA-Sequenz zu der zu hemmenden kodierenden Sequenz scheinen andere Faktoren von Bedeutung zu sein, die die Funktionalität der siRNAs bestimmen. Im Laufe der letzten Jahre

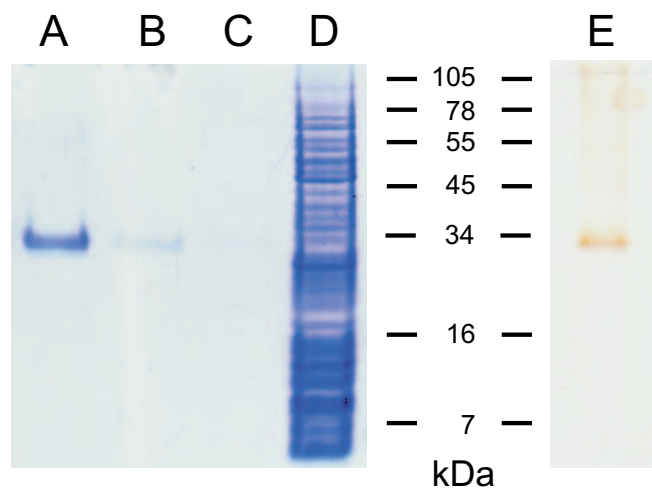


Abbildung 3.17: **Charakterisierung des rekombinanten p27Gag nach der Affinitätschromatographie im SDS-Gel (links) und im Western-Blot Assay (rechts).** Im Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgel (links) sind die einzelnen Elutions-Fraktionen nach der Säulenchromatographie dargestellt (Spur A, B und C), sowie der Durchlauf mit ungebundenen *E. coli*-Proteinen (D). Im rechten Abschnitt wurde das aufgereinigte Gag-Protein (5 µg/lane) mit dem kreuzreagierenden anti-FeLV-Antikörper (1:100 verdünnt) unter Verwendung von Protein G (1:2000) detektiert.

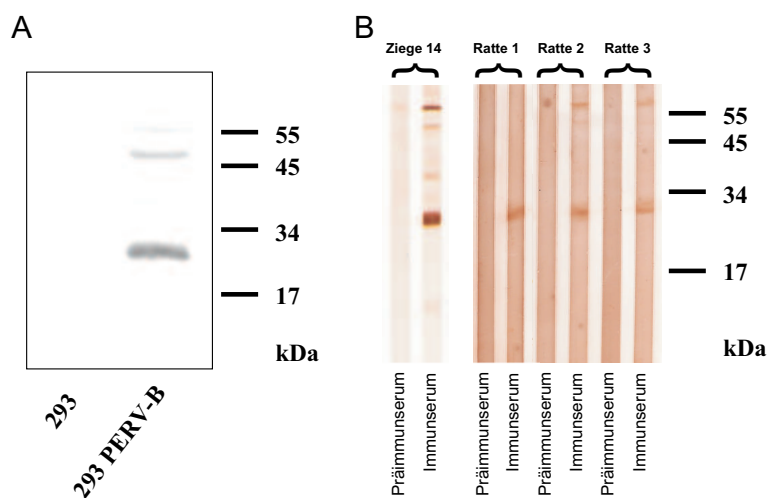


Abbildung 3.18: **Nachweis spezifischer anti-p27Gag-Antikörper im Serum der immunisierten Versuchstiere.** Abbildung A: Als Antigen im Western-Blot diente Protein-Lysat (jeweils 10 µg / lane) von uninfizierten, bzw. PERV-infizierten humanen embryonalen Nierenzellen. Die Detektion erfolgte mittels Serum von Ziege 14. Abbildung B: Die Seren der Versuchstiere (Ziege 14, Ratte 1-3) vor- und nach der Immunisierung. Als Antigen diente Virusproteinlysat (jeweils 10 µg / lane), isoliert von PERV-A/C infizierten 293-Zellen. Alle Seren wurden in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt.

fand man bestimmte Übereinstimmungen gut funktionierender siRNAs, und faßte sie zu Regeln zusammen. Die Auswahl der siRNAs zur Replikationshemmung der porcinen endogenen Retroviren erfolgte daher nach den Selektionsregeln von Prof. T. Tuschl [Elbashir et al., 2002]. Diese besagen, dass siRNA-Sequenzen ausgewählt werden sollen, die

1. innerhalb der kodierenden Region liegen (keine Sequenzen innerhalb von Introns)
2. mindestens 50 - 100 bp vom Start- und Stopcodon entfernt lokalisiert sind
3. einen GC-Gehalt von ca. 50% aufweisen
4. das Sequenzmotiv 5'-AA(N_{19nt})UU enthalten
5. keine Hemmung anderer essentieller Proteine bewirken (dazu muß eine Suche nach homologen Gensequenzen mittels „BLAST-Search“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) durchgeführt werden)

Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass keine Ansammlung mehrerer gleicher Basen in Folge auftrat. Vor allem die Sequenz „TTTTT“ würde bei einer späteren Klonierung in eine shRNA-Expressionskassette zur Termination der shRNA-Expression führen.

Gleichzeitig wurden möglichst siRNAs ausgewählt, die aufgrund ihrer Sequenzhomologie in der Lage sind, die Expression sowohl des Subtyps PERV-A, PERV-B und PERV-C zu inhibieren.

Es wurden insgesamt neun unterschiedliche siRNAs ausgewählt. Davon binden zwei (gag1 - gag2) innerhalb des gag-Gens, fünf (pol1 - pol5) innerhalb des pol-Gens und zwei siRNAs (env1 - env2) binden an der env-mRNA. Da die Degradation der RNA genau an der siRNA-Bindungsstelle stattfindet, empfiehlt es sich, bei der Quantifizierung des RNAi-Effektes, solche Oligonukleotid-Primer zu verwenden, die diese siRNA-Bindungsstelle flankieren. Voraussetzung für den Einsatz dieser Primer zur Quantifizierung in der real time PCR mittels $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode ist eine effektive Amplifikation von etwa 100%. Dies bedeutet, dass das spezifische Amplifikat pro Zyklus einmal verdoppelt wird. Nachgewiesen wurde die Effizienz der Oligonukleotid-Primer unter Verwendung einer real time PCR mit unterschiedlichen Verdünnungen von cDNA (Template-DNA). Dargestellt sind die ct-Werte in Abhängigkeit zu der Konzentration der eingesetzten cDNA (Abb. 3.19). Auf der Basis der Steigung der Geradengleichungen kann die Effizienz nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Effizienz } E = 10^{\left(\frac{-1}{\text{Steigung}}\right)} - 1$$

Alle verwendeten Oligonukleotid-Primer zeigten bei der Amplifikation der cDNA mit unterschiedlichen Verdünnungen in der graphischen Darstellung eine parallele Steigung mit einer Effizienz von etwa 100% und waren somit für die Quantifizierung der exprimierten viralen mRNA geeignet.

Die Verteilung der siRNAs und der Oligonukleotid-Primer, die für den Nachweis der Hemmung mittels real time PCR eingesetzt wurden, ist in Abbildung 3.20 dargestellt.

Die verwendeten neun synthetischen siRNAs wurden mit einer finalen Konzentration von 20 nM in 7500 PERV-B-infizierte humane embryonale Nierenzellen (293) mittels des Transfektionsreagenzes „GeneEraser“ in 96-well Mikrotiterplatten transfiziert. Nach 48 Stunden wurde die cDNA mit Hilfe des „cells to cDNA-Kits“ (siehe 2.2.1) gewonnen, und die Expression der viralen PERV-mRNA in der real time PCR mit den entsprechenden Oligonukleotid-Primern analysiert. Für jede Probe wurde gleichzeitig die Expressionsrate der *Glycerinphosphodehydrogenase* (GAPDH) gemessen und die Werte wurden darauf normalisiert. Als Kontrolle diente eine fluoreszenzmarkierte (Rhodamin) siRNA, die unter identischen Bedingungen in PERV-B-infizierte 293-Zellen transfiziert wurde (siehe 2.3.5). Die Expressionrate dieser - mit Kontroll-siRNA transfizierter Zellen - wurde auf 100% gesetzt. Mindestens drei unabhängige Transfektionen wurden durchgeführt und die Werte wurden mittels real time PCR analysiert. Die prozentuale Darstellung der viralen Expressionraten nach Transfektion unterschiedlicher siRNAs wurde mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode berechnet.

Demnach wird die Expression der PERV mRNA durch die siRNAs „gag1“ und „pol3“ kaum beeinträchtigt. Die siRNA „pol1“, „pol5“ und „env2“, vor allem aber „pol2“ zeigen eine deutliche Hemmung der viralen RNA um bis zu 82% (Abb. 3.21).

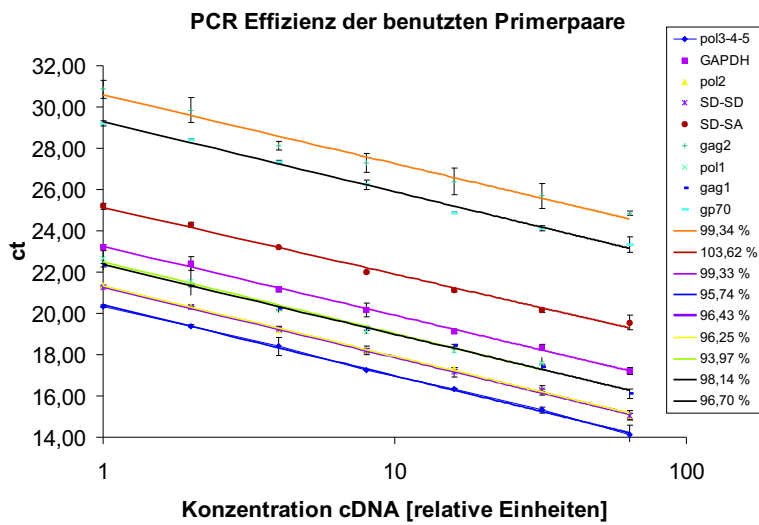


Abbildung 3.19: Analyse der Amplifikationsrate aller Oligonukleotid-Primer, die für die Quantifizierung der PERV-Expression mittels real time RT-PCR eingesetzt wurden. Für die Bestimmung der PCR-Effizienz wurde cDNA (umgeschrieben aus Gesamt-RNA von PERV-B infizierten 293-Zellen mittels random-Primern) in 1:2-Schritten ausverdünnt und in der real time PCR eingesetzt.

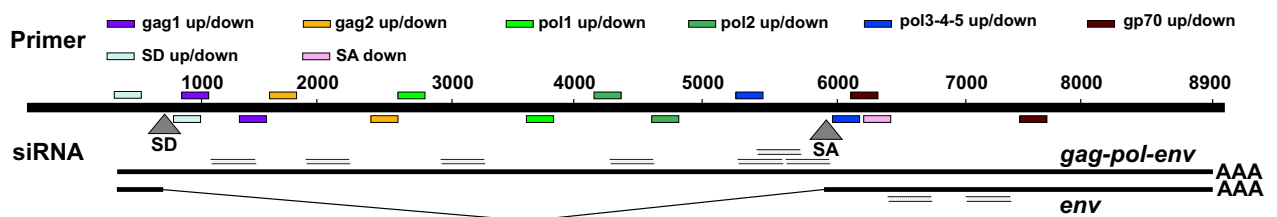


Abbildung 3.20: Die genomische Organisation von PERV mit der Lokalisation ausgewählter siRNAs und real time Primer-Paaren. Die neun siRNAs sind schematisch als Doppelstrang dargestellt und binden die virale RNA innerhalb der gag- pol und env-Region. SD und SA zeigen die Spleiß-Donor- und Spleiß-Akzeptor-Regionen des viralen Genoms.

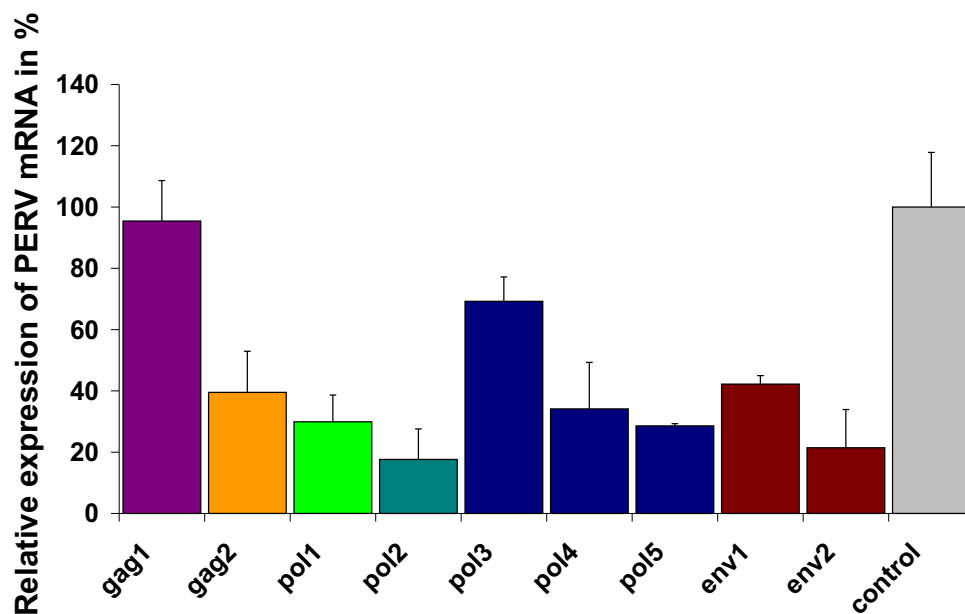


Abbildung 3.21: **Hemmung der PERV-Expression durch Transfektion synthetischer siRNAs.** Die relative Expression wurde mittels real time RT-PCR unter Verwendung von Oligonukleotid-Primern, die die siRNA-Bindungsstelle flankieren, bestimmt. Der Farbcode entspricht dem der Oligonukleotid-Primer in Abbildung 3.20.

Der Nachweis der durch RNA-Interferenz induzierten Hemmung der PERV-Expression auf der Proteinebene blieb hingegen erfolglos, weil die viralen Proteine eine zu lange Halbwertszeit aufweisen. Nach der Transfektion verdünnen sich die siRNA-Moleküle durch Zellteilung relativ schnell oder werden durch RNAsen abgebaut und sind daher nach vier bis fünf Tagen nicht mehr nachweisbar (siehe 1.3.3). Der Abbau der siRNA, der mRNA und des Proteins erfolgt nach der Transfektion zum Zeitpunkt T unterschiedlich schnell (Abb.3.22). Um eine verminderte virale Proteinexpression nachweisen zu können, mußte daher eine stabile Expression von shRNAs mit identischer Sequenz erreicht werden (siehe 3.4.2).

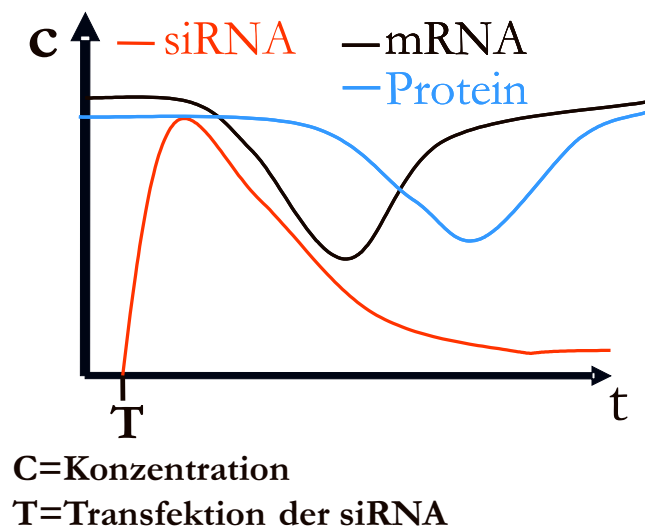
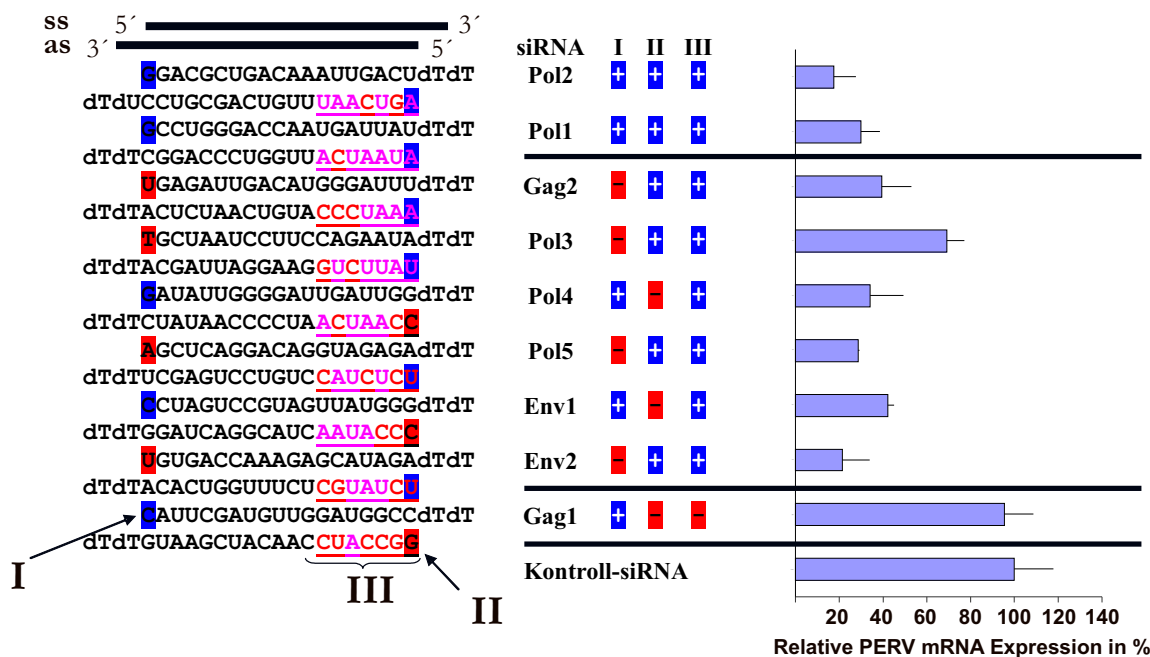


Abbildung 3.22: Die Veränderungen der Konzentrationen von siRNA, mRNA und Protein im zeitlichen Verlauf schematisch dargestellt. „T“ kennzeichnet den Beginn der Transfektion mit siRNAs, „C“ die Konzentration in Abhängigkeit der Zeit „t“.

Im Nachhinein, nach der erfolgten Auswahl der siRNAs zur Hemmung der PERV Replikation, erschienen von mehreren Autoren Publikationen, die neue Kriterien für die Auswahl potentester siRNAs vorschlagen [Schwarz et al., 2003, Ui-Tei et al., 2004]. Demnach sind vor allem die 5'-Positionen des sense- und antisense-Stranges von größerer Bedeutung:

1. Die erste Base des 5'-Endes des sense-Stranges sollte ein Guanin oder Cytosin enthalten.
2. Die erste Base des 5'-Endes des antisense-Stranges sollte ein Adenin oder Uracil enthalten.
3. Unter den letzten sieben Nukleotiden des 5'-Endes des antisense-Stranges sollten zumindest vier Basen mit Adenin oder Uracil vorhanden sein.

Diese Kriterien wurden daraufhin auf die ausgewählten und verwendeten PERV-siRNAs angewandt, und die Ergebnisse zeigten, dass die siRNAs, bei denen die drei Kriterien erfüllt sind („pol2“ und „pol1“), tatsächlich mit einer guten Inhibition der viralen Expression korrelieren (Abb. 3.23). Die siRNA „gag1“ hingegen, bei der nur ein einziges dieser Kriterien erfüllt ist, zeigte nach der Quantifizierung der PERV-Expression nur eine geringfügige Hemmung.



Abbildungung 3.23: **Kriterien für die Auswahl potenter siRNAs.** Links dargestellt sind die neun ausgewählten siRNAs mit der sense- und antisense-Sequenz. Die Pfeile markieren die Kriterien I, II und III (zur näheren Erklärung, siehe Text). In der Mitte sind die erfüllten Kriterien der einzelnen siRNA tabellarisch aufgeführt und links ist die gemessene PERV-Expression nach Transfektion dieser siRNAs in PERV-B infizierten 293-Zellen verzeichnet.

Desweiteren scheint die Sekundärstruktur der zu hemmenden RNA darüber zu entscheiden, wie effizient die RNA-Interferenz durch die entsprechende siRNA induziert wird. Das im Internet verfügbare Programm „sfold“ (<http://sfold.wadsworth.org/sirna.pl>) gestattet die Berechnung der RNA-Sekundärstruktur und bietet dadurch die erleichterte Auswahl an geeigneten siRNAs [Ding and Lawrence, 2001, Ding and Lawrence, 2003, Ding et al., 2004]. Ein Zusammenhang zwischen der errechneten Struktur der mRNA und dem Erfolg der siRNA-vermittelten Hemmung der Genexpression konnte gezeigt werden [Far and Sczakiel, 2003]. Die virale RNA *gag-pol* wurde daher ebenfalls mit dem Programm „sfold“ analysiert und die thermodynamisch günstigste Struktur der RNA berechnet (Abb. 3.24). Der Bereich von 3157 nt - 3176 nt ist komplementär zu dem antisense-Strang der „pol2“-siRNA-Sequenz und ist dadurch gekennzeichnet, dass überwiegend ungepaarte Basen vorhanden sind (siehe Abb. 3.25). Dadurch vergrößert sich die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Bindung mit der spezifischen siRNA.



Abbildung 3.24: Die energetisch günstigste Sekundärstruktur der viralen *gag-pol* - mRNA, berechnet mit dem Programm „sfold“. Die Wert der errechneten freien Energie ΔG_{37}^0 wird in kcal/mol angegeben [Ding et al., 2004].

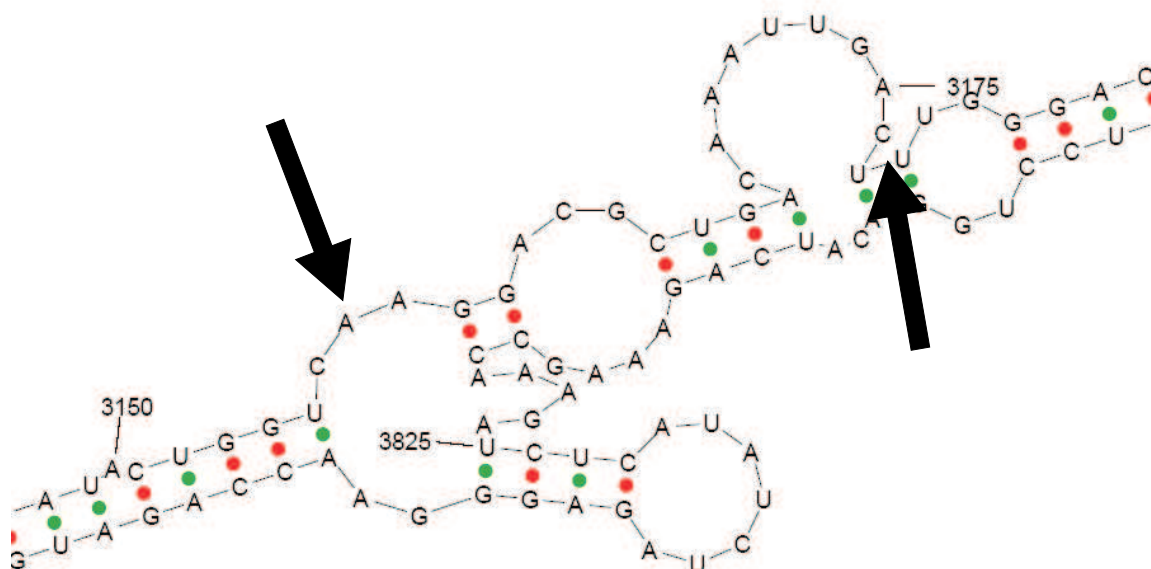


Abbildung 3.25: Eine vergrößerte Ansicht der *pol2-siRNA*-Bindungsstelle der viralen *gag-pol* mRNA. Die Pfeile kennzeichnen den Beginn und das Ende der homologen Sequenzen zu der siRNA. Wie in der Abbildung zu sehen ist, binden lediglich sechs Basen der siRNA-Bindungsstelle an den gegenüberliegenden RNA-Strang, die restlichen Basen liegen ungepaart vor und können mit der siRNA interagieren.

3.4.2 Expression von inhibierenden „short hairpin RNAs“

Um eine dauerhafte Inhibition der porcinen endogenen Retroviren mittels RNA-Interferenz zeigen zu können, wurde im folgenden mit Expressionsvektoren gearbeitet, die eine endogene Expression von shRNAs (short hairpin RNAs) erlauben. Eines der ersten publizierten Systeme mit shRNA-Expressionskassette war der Vektor pSuper, der die inhibierenden Haarnadel-RNAs mit Hilfe eines Polymerase III-Promotors der RNase H1 exprimiert (siehe 1.3.4, [Brummelkamp et al., 2002]). Dieser Vektor wurde zur endogenen Expression von shRNAs mit homologer Sequenz zu der pol2-siRNA verwendet, die sich als siRNA mit der besten inhibierenden Wirkung auf die Replikation der PERVs erwies (siehe 3.4.1). Diese pol2-siRNA, und somit auch die entsprechend exprimierte shRNA mit homologer Sequenz, sollte, aufgrund der konservierten Regionen innerhalb der pol-Sequenz des PERV-Genoms, in der Lage sein, die Expression aller PERV-Subtypen zu hemmen.

Klonierung des pSuper-pol2

Für die Klonierung des Plasmids pSuper-pol2 wurden zwei Oligonukleotide (pSuper-pol2 sense/antisense, Sequenz siehe Anhang auf Seite I) miteinander hybridisiert und in den mit *Bgl* II und *Hind* III verdauten Vektor pSuper ligiert. Die shRNA-Expressionskassette der aufgereinigten Plasmid-DNA wurde unter Verwendung des Primers H1_up (Sequenz siehe Anhang auf Seite I) sequenziert und zeigte eine korrekte Basenanordnung.

Transfektion und Isolation von Zellklonen

Die aufgereinigte Plasmid-DNA pSuper-pol2 (12 μg) wurde in 5×10^6 PERV-B infizierte humane embryonale Nierenzellen (293) mittels des Transfektionsreagenzes „TransFast“ transfiziert. Da auf dem Vektor pSuper kein Resistenzgen für die Selektion eukaryotischer Zellen vorhanden ist, wurde bei der Transfektion zugleich der Vektor pHygEGFP (1 μg) eingesetzt. Etwa 48 Stunden nach der Transfektion begann die Selektion der transfizierten Zellen mit dem Antibiotikum Hygromycin B (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), und nach zehn Tagen konnten 20 individuelle Klone isoliert und kultiviert werden.

Für die Identifizierung von Zellklonen mit RNAi-induzierter Inhibition der PERV Expression, wurde aus diesen Klonen das Gesamtproteinlysate hergestellt (siehe 2.4.3) und mittels Western-Blot Assay unter Verwendung des anti-p27Gag-Serums der Ziege 18 (siehe 3.3.3) analysiert. Das zelluläre Protein β -Aktin wurde dabei ebenfalls detektiert, um eine gleichmäßige Beladung des SDS-Gels nachweisen zu können.

Einige dieser PERV-B-infizierten Zellklone zeigten auch nach wochenlanger Kultivierung eine deutlich verminderte Expression des p27Gag-Proteins. Eine starke Hemmung von ca. 90% konnte im Western-Blot Assay für den Zellklon A5 detektiert werden (Abb. 3.26). Da die exprimierte shRNA innerhalb der pol-Region des PERV-Genoms bindet, und somit die gesamte ungespleißte *gag-pol-env* mRNA degradiert wird, kommt es in den transfizierten Zellen nicht nur zu einer Abnahme des Gag-Proteins, sondern auch zu einer Verminderung der Reversen Transkriptase und der viralen Protease. Dies führt schließlich zu einer Akkumulation des Gag-Precursors (60 kDa), da die Prozessierung der einzelnen Gag-Proteine wegen der fehlenden Protease nicht erfolgen kann (Abb. 3.26).

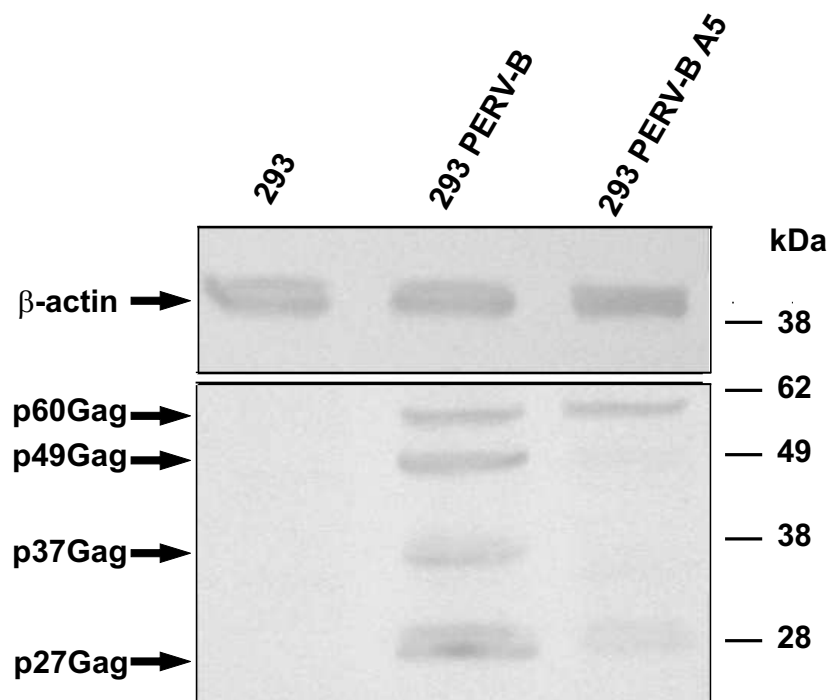


Abbildung 3.26: **Hemmung der p27Gag-Expression nach der stabilen Transfektion mit dem shRNA-Expressionsvektor pSuper-pol2.** Der Gehalt an p27Gag in uninfizierten 293-Zellen, in PERV-B-infizierten 293-Zellen und in PERV-B infizierten 293-Zellen, die stabil mit pSuper-pol2 transfiziert wurden, konnten mittels des Ziegenserums 18 (anti-p27Gag, 1:100 verdünnt) detektiert werden. Aufgetragen wurden jeweils gleiche Mengen des Gesamtproteinlysats (10 μ g), zu erkennen auch an der gleichmäßigen Menge von β -Aktin.

Für eine weitergehende Charakterisierung der inhibierten Expression des porcinen endogenen Retrovirus, wurde die zelluläre RNA des Zellklons A5 isoliert (siehe 2.2.11), und die PERV-Expressionsrate mit Hilfe der real time RT-PCR im Vergleich zu dem Wildtyp (PERV-B-infizierte 293) analysiert. Für den Nachweis wurden Oligonukleotide ein-

gesetzt, die innerhalb der *pol*-Region des PERV-Genoms hybridisieren und die shRNA-Bindungsstelle flankieren. Auch hier zeigte sich, wie auch bei den Ergebnissen des Western-Blot Assays, eine deutlich verminderte Expression der viralen RNA bei Zellen des Zellklons. Auch bei der Verwendung von Oligonukleotiden, die in Richtung 5'-Ende (Gag1), bzw. 3'-Ende (Pol3-4-5) von der siRNA-Bindungsstelle hybridisieren, war eine Hemmung der viralen mRNA um mehr als 80% zu detektieren (Abb. 3.27). Dies weist auf einen schnellen Abbau der gesamten PERV mRNA nach Induktion der RNA-Interferenz hin.

Die gehemmte Expression der porcinen endogenen Retroviren war auch nach Kultivierung der Zellen über Monate zu beobachten. Die Anwesenheit des Plasmids pSuper konnte mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide H1_up und M13_down in den Zellen des Klons A5 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

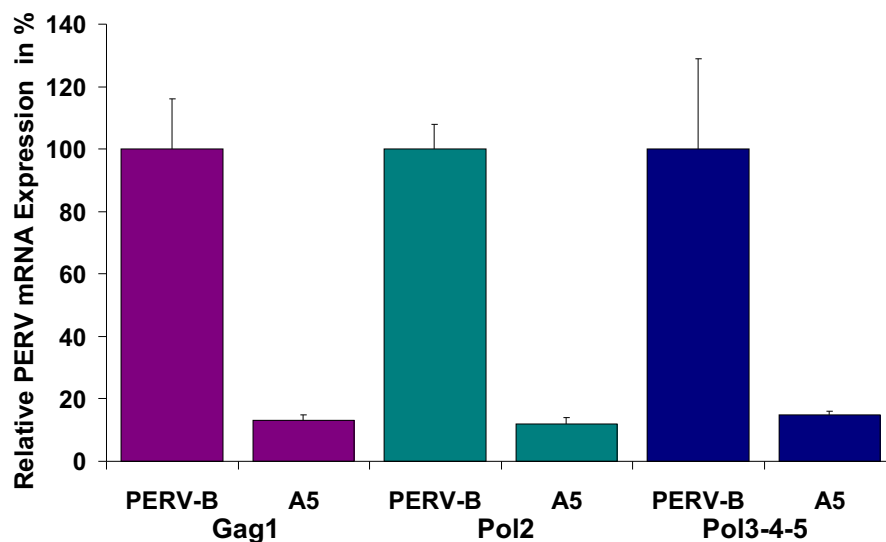


Abbildung 3.27: **Abbau der viralen mRNA nach der stabilen Transfektion mit dem shRNA-Expressionsvektor pSuper-pol2.** Die Expressionrate der porcinen endogenen Retroviren wurde mittels real time RT-PCR unter Verwendung von gag1 up/down (violett), pol2 up/down (grün) und pol-3-4-5 up/down (blau) detektiert. Die PERV Expression wurde prozentual zu der exprimierten viralen mRNA in PERV-B-infizierten 293-Zellen berechnet.

Immunfluoreszenz-Assay zur Bestätigung der verminderten PERV-Expression

Um die Hemmung der viralen Genexpression der porcinen endogenen Retroviren in den Zellen des Zellklons A5 auf Proteinebene bestätigen zu können, wurde ein Immunfluoreszenz-Assay durchgeführt. Erneut wurden uninfizierte, und PERV-B-infizierte 293-Zellen zum

Vergleich herangezogen. Die Zellen wurden unter gleichen Bedingungen kultiviert und für die Immunfluoreszenz vorbereitet (siehe 2.3.9). Der Nachweis des exprimierten p27Gag erfolgte immunologisch mittels spezifischer p27Gag-Antikörper des Ziegenserums 18. Aufgrund der Kotransfektion der Zellen mit dem Plasmid pHygEGFP, das die später durchgeführte Selektion mit Hygromycin B erlaubte, exprimierten die Zellen des Zellklons A5 das „enhanced green fluorescent protein“ (Emissionswellenlänge: 507 nm). Daher wurde für den indirekten Nachweis des viralen Gag-Proteins ein TRITC-markierter anti-Ziege IgG-Antikörper eingesetzt, der nach UV-Anregung im Fluoreszenzmikroskop Licht im rötlichen Bereich (570 nm) abstrahlte. Wie zu erwarten, exprimierten die stabil transfizierten 293-Zellen das EGFP, zeigten jedoch nur eine geringe Expression an viralem Gag-Protein, die mit den uninfizierten 293-Zellen nahezu vergleichbar ist (Abb. 3.28).

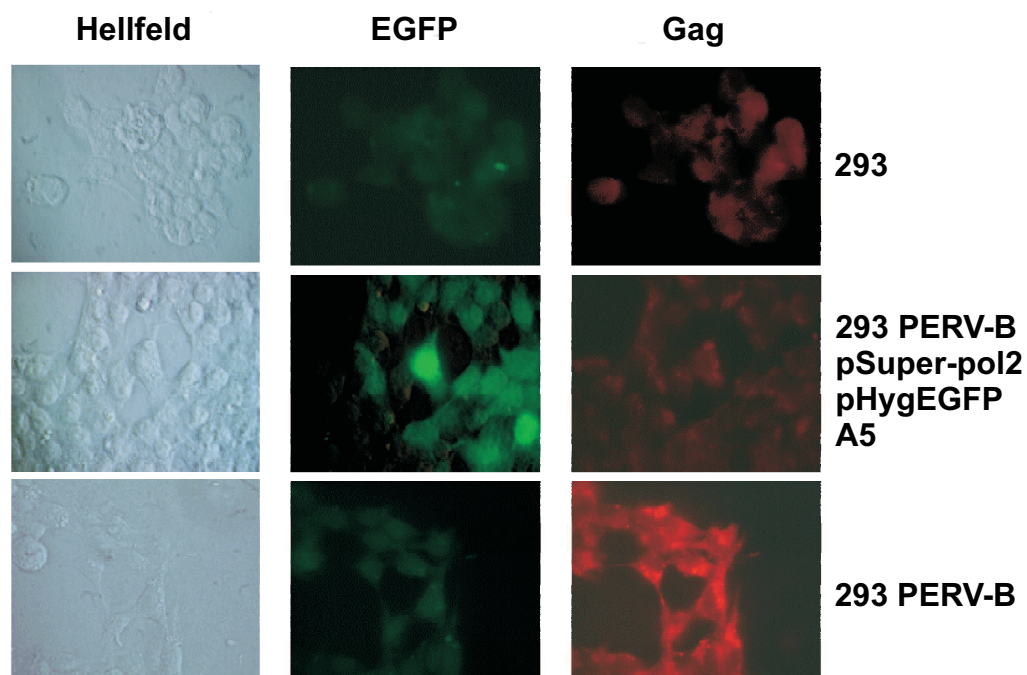


Abbildung 3.28: Immunfluoreszenz-Assay für den Nachweis der gehemmten PERV-Expression nach stabiler Transfektion mit dem shRNA-Expressionsvektor pSuper-pol2 in PERV-B-infizierten 293-Zellen im Vergleich zu unbehandelten PERV-B infizierten 293-Zellen. Linke Spalte: Zellen im Hellfeld. Mittlere und rechte Spalte: der jeweils identische Bildausschnitt, aufgenommen mit unterschiedlichen Filtersystemen. Die Detektion des viralen Gag-Proteins erfolgte mittels Ziegenserums 18 (anti-p27Gag Antikörper; 1:100) und entsprechendem Sekundärantikörper (anti-Ziege IgG TRITC-Konjugat; 1:2000). Die stabil transfizierten Zellen 293 PERV-B pSuper-pol2 exprimieren das EGFP wegen der Kotransfektion mit pHygEGFP.

Wirkung der pol2-shRNA auf ungespleißte und gespleißte virale mRNA

Das Zytoplasma scheint der Ort zu sein, an dem es nach Induktion der RNA-Interferenz zu dem spezifischen Abbau der Ziel-mRNA kommt [Zeng and Cullen, 2002]. Mit Hilfe der real time RT-PCR und unter Verwendung von Oligonukleotiden, die nahe der Spleiß-Donor und Spleiß-Akzeptor-Stelle binden (siehe Abb. 3.20), kann die Expression der gesamten *gag-pol-env* mRNA und der gespleißten *env* mRNA unabhängig voneinander quantifiziert werden. Dadurch ist es möglich, nachzuweisen, ob die endogen exprimierte pol2-shRNA tatsächlich spezifisch die virale Voll-Längen mRNA prozessiert oder auch unspezifisch die im Zellkern gespleißte *envelope*-RNA degradiert. Für diese Fragestellung wurden erneut PERV-B infizierte 293-Zellen mit den Zellen des isolierten Zellklons A5 hinsichtlich unterschiedlicher Expression von ungespleißter- und gespleißter mRNA verglichen.

Wie erwartet, beträgt der Anteil viraler Gesamt-RNA weniger als 20%, verglichen mit den unbehandelten PERV-B-infizierten 293-Zellen. Die Menge an gespleißter *env* mRNA hingegen ist bei beiden Zellpopulationen nahezu identisch. Dadurch zeigt sich zum einen die Spezifität der RNA-Interferenz. Andererseits wird deutlich, dass die katalytische Aktivität des „RNA induced silencing complex“ (RISC) auf das Zytoplasma begrenzt ist (Abb. 3.29).

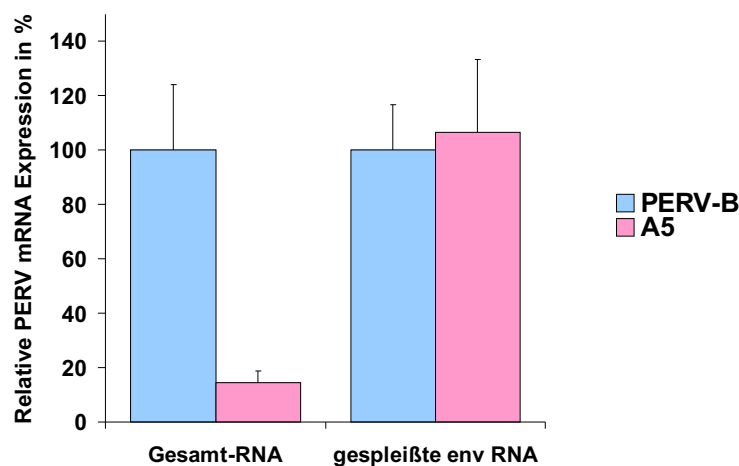


Abbildung 3.29: **Expressionsrate der gespleißten und ungespleißten viralen mRNA, verglichen in PERV-B infizierten 293-Zellen und in Zellen des Klons A5.** Weitere Erläuterungen, siehe Text. Die Quantifizierung erfolgte mittels real time RT-PCR unter Verwendung von Oligonukleotiden, die den Spleiß-Donor flankieren (Nachweis der viralen Gesamt-RNA), bzw. stromaufwärts des Spleißdonors und stromabwärts des Spleiß-Akzeptors hybridisieren (Nachweis der gespleißten *env* mRNA).

Verminderter Virus-Titer nach Transfektion mit pol2-shRNA-Expressionsvektor

Durch den Einsatz der RNA-Interferenz soll die PERV-Virusreplikation porciner Zellen transgener Schweine derart unterdrückt werden, dass humane Zellen nach einer Transplantation xenogenen Materials vor einer PERV Infektion geschützt sind.

Da die Abnahme der Expression der viralen mRNA nur ein indirekter Nachweis auf eine reduzierte Infektiosität darstellt, wurde der Virus-Titer des Zellklons A5 (PERV-B infizierte 293, stabil transfiziert mit dem shRNA-Expressionsvektor pSuper-pol2) im Vergleich zu den unbehandelten PERV-B infizierten 293-Zellen analysiert (Durchführung, siehe 2.3.8). Die Zellen wurden unter identischen Bedingungen kultiviert und die Virus-enthaltenden Überstände nach drei Tagen abgenommen.

Ein Teil dieser Überstände wurde auch verwendet, um die Reverse Transkriptase-Aktivität mittels RT-Assay messen zu können (siehe 2.3.11). Entsprechend der oben genannten Ergebnisse zeigt sich auch in diesem Ansatz eine deutliche Hemmung der freigesetzten Reversen Transkriptase im Vergleich zu den unbehandelten PERV-B infizierten Zellen ohne endogen exprimierter shRNAs gegen PERV (Abb.3.30).

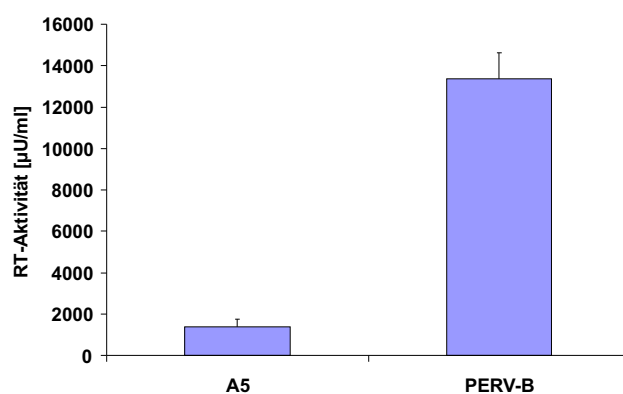


Abbildung 3.30: **Hemmung der Freisetzung der Reversen Transkriptase in Zellen des Klons A5, verglichen mit unbehandelten PERV-B infizierten 293-Zellen.**

Die Überstände der PERV-B-infizierten Zellen und Zellen des Klons A5 wurden auf uninfizierten humanen embryonalen Nierenzellen (293) titriert. Der TCID₅₀-Wert der Zellen, die die shRNA-pol2 endogen exprimierten, war um mehr als das Zehnfache geringer, als in den unbehandelten Zellen (Tab. 3.3).

Zellen	TCID ₅₀
PERV-B infizierte 293-Zellen	190
A5	17

Tabelle 3.3: Titer der freigesetzten infektiösen Viren im Überstand von PERV-B-infizierten Zellen und Zellen des Klons A5.

3.4.3 Lentivirale Expressionsvektoren zur Hemmung von PERV

Der Ansatz, die PERV-Replikation mittels RNAi zu inhibieren, zielt letztendlich darauf ab, transgene Schweine mit verminderter PERV-Freisetzung zu generieren. Für die Herstellung transgener Schweine existieren mehrere Methoden. Eine davon, die auch bei anderen Tieren erfolgreich zum Einsatz kam, ist die Mikroinjektion der transgenen DNA in den Zellkern der Blastocyste mit Hilfe einer sehr feinen Glaskapillare. Eine andere, zum Teil umstrittene Methode ist der Sperma-vermittelte Gentransfer, der aber auf den Einsatz bei Schweinen begrenzt zu sein scheint und dessen Mechanismus noch unbekannt ist [Lavitrano et al., 2002, Lavitrano et al., 2003]. Die dritte Möglichkeit, transgene Schweine zu generieren, besteht in der Verwendung von lentiviralen Vektoren, die ebenfalls mit einer Glaskapillare in Blastocysten unterhalb der „Zona pellucida“ injiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass bei Schweinen diese Art des Gentransfers der der Mikroinjektion (DNA in den Zellkern der Blastocyste) deutlich überlegen ist [Hofmann et al., 2003]. Daher wurde im Folgenden versucht, die shRNA-Expressionskassette in einen lentiviralen Expressionsvektor zu klonieren.

Klonierung des Vektors pLenti6/V5-D-TOPO mit shRNA-Expressionskassette

Der Expressionsvektor „pLenti6/V5-D-TOPO“ des ersten kommerziell angebotenen lentiviralen Expressionssystems „ViraPower Lentiviral Expression System“ (Invitrogen) wurde für die Verwendung als RNAi-Vektor entsprechend modifiziert: in 3'-Orientierung des CMV-Promotors wurde mittels Topoisomerase I das „enhanced green fluorescent protein“ kloniert, um positiv transformierte Zellen leicht identifizieren zu können. Die Sequenz des EGFPs wurde zuvor mit den Oligonukleotiden EGFP_TOPO_up und EGFP_TOPO_down mittels PCR aus dem Plasmid pHygEGFP amplifiziert. Zusätzlich wurde die shRNA-Expressionskassette, die die endogene Expression der inhibierenden Haarnadel-RNA pol2 induzieren sollte, über die Restriktionsschnittstellen *SanD* I und *Cla* I des Expressionsvektors unmittelbar vor dem CMV-Promotor einligiert (pLenti-pol2). Auch hier diente ein PCR-Amplifikat (PCR von pSuper-pol2 mit den Oligonukleotiden H1_*SanD* I_up und

M13_down, anschließend verdaut mit den Restriktionsenzymen *SanD* I und *Cla* I) als Insert. In einem weiteren Ansatz wurde anstelle der pol2-shRNA-Expressionskassette eine Sequenz verwendet, die geeignet sein sollte, um die Expression der „firefly“-Luziferase zu inhibieren (pLenti-luc). Die Klonierung dieses Vektors erfolgte analog zu der Herstellung des pol2-Konstruktes.

Beide Vektoren wurden in die *E. coli* Bakterien „TOP-10“ transformiert, die Plasmid-DNA wurde aufgereinigt und anschließend mit Hilfe des Primers H1_up sequenziert. Es zeigten sich weder Mutationen noch Deletionen innerhalb der shRNA-Expressionskassette.

Die lentiviralen Partikel wurden unter Verwendung dieser beiden Plasmide in den Verpackungszellen „293 FT“ hergestellt (siehe 2.3.7) und ohne Aufkonzentration auf unbehandelte humane embryonale Nierenzellen (293) in Anwesenheit von Polybrene (6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gegeben. Beide zeigten eine Transfektionseffizienz von etwa 40% (Abb. 3.31).

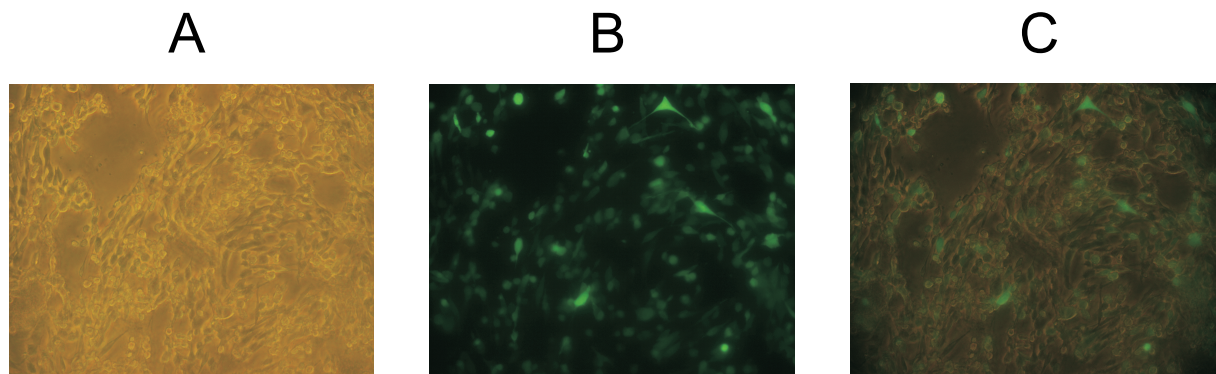


Abbildung 3.31: **Charakterisierung der humanen embryonalen Nierenzellen (293) nach Transduktion mit dem Vektor pLenti-pol2.** Dargestellt ist der jeweils identische Bildausschnitt im Durchlicht (A), bei Anregung des EGFPs mit UV-Licht (B) und einer Kombination aus beidem (C). Die Transduktionseffizienz der hergestellten lentiviralen Vektoren pLenti-luc (nicht gezeigt) und pLenti-pol2 betrug jeweils ca. 40%.

Die inhibierende Wirkung des lentiviralen pol2-Vektors wurde in PERV-B-infizierten 293-Zellen analysiert. Nach Transduktion mit den hergestellten Virusartikeln wurde nach 48 Stunden das zelluläre Protein isoliert, und die Menge des viralen Gag-Proteins wurde immunologisch im Western-Blot Assay quantifiziert. Als Kontrolle dienten uninfizierte, PERV-B-infizierte 293-Zellen, bzw. PERV-B-infizierte 293-Zellen, die mit dem lentiviralen Vektor pLenti-luc transduziert worden waren. Es konnte keine Reduktion des viralen Gag-Proteins nach Transduktion mit den lentiviralen Partikel des Konstruktes pLenti-pol2 beobachtet werden (Abb. 3.32).

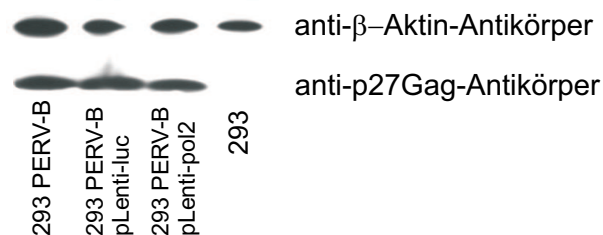


Abbildung 3.32: **Fehlende Reduktion der PERV-Expression nach Transduktion mit pLenti-pol2.** Die Menge des exprimierten p27Gag-Proteins wurde im Western-Blot-Assay immunologisch mit Hilfe der anti-p27Gag-Antikörper (Ziege 18, 1:100 verdünnt) detektiert. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung des Gels diente ein anti- β -Aktin-Antikörper.

Zusätzlich wurde das lentivirale shRNA-Expressionssystem mittels des dualen Luziferase-Assays untersucht (siehe 2.3.12). In Zellen, die mit den Plasmiden pGL3-control und pRL-TK transfiziert wurden und in denen die Expression der „firefly-Luziferase“ wegen der Transduktion mit pLenti-luc gehemmt war, sollte der Wert der Ratio $\frac{Expression_{firefly-Luziferase}}{Expression_{Renilla-Luziferase}}$ abnehmen. Daher wurden murine Fibroblasten (3T3-Zellen), die vorher mit den lentiviralen Vektoren pLenti-luc, bzw. pLenti-pol2 transduziert worden waren, mit den beiden Plasmiden pGL3-control und pRL-TK transfiziert und anschließend wurde die oben genannte Ratio bestimmt. Auch hier konnte im Vergleich zu der Kontrolle pLenti-pol2 keine spezifische Reduktion des Zielgens gezeigt werden (Abb. 3.33).

Da der Titer der lentiviralen Vektoren nur eine Transduktion von ca. 40% der Zellen zuließ, wurden die EGFP⁺-3T3-Zellen zusätzlich mit Hilfe eines FACS-Sorters (durchgeführt an der „FACS Core Facility“ des Max-Planck-Instituts für Infektionsbiologie) angereichert. Nach Kultivierung dieser sortierten Zellen fanden sich bei der Analyse im Durchflusszytometer ca. 90% EGFP⁺-3T3-Zellen im Vergleich zu unbehandelten 3T3-Zellen (Abb. 3.34). Der duale Luziferase Assay wurde erneut durchgeführt, aber auch der Einsatz einer fast homologen EGFP⁺-Population zeigte nur eine geringfügige Veränderung der Ratio $\frac{Expression_{firefly-Luziferase}}{Expression_{Renilla-Luziferase}}$ (Abb. 3.35). Aus diesem Grund wurde bei den folgenden Untersuchungen nur mit den etablierten lentiviralen shRNA-Expressionsvektoren von Prof. D. Trono und Prof. A. Pfeifer gearbeitet, deren EGFP-Expression nicht durch den CMV-Promotor induziert wird.

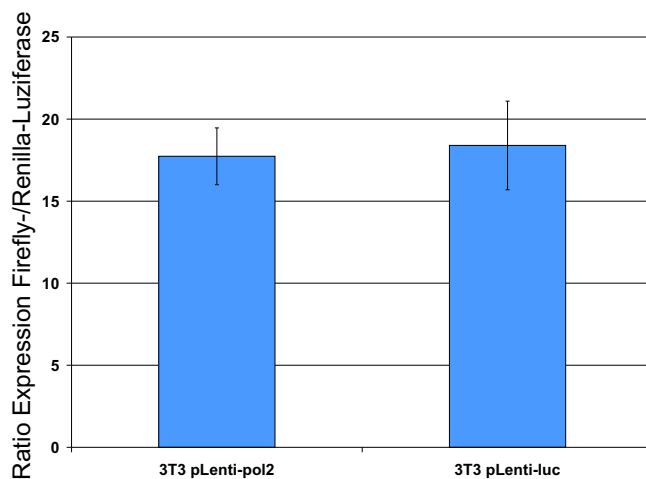


Abbildung 3.33: **Ratio der exprimierten „Firefly“-Luziferase zu der „Renilla“-Luziferase nach Transduktion der 3T3-Zellen mit pLenti-luc und nach Transfektion mit den Plasmiden pGL3-control und pRL-TK.** Verglichen mit den 3T3-Zellen, die mit dem lentiviralen Vektor pLenti-pol2 transduziert worden waren, ergab sich keine Hemmung der „Firefly“-Luziferase.

Klonierung des Vektors pLVTHM mit shRNA-Expressionskassette gegen PERV

Der lentivirale Vektor pLVTHM induziert die Expression des Reportergens *EGFP* nicht durch einen CMV-, sondern mittels eines EF1- α -Promotors und wurde daher als Alternative für den Vektor pLenti6/V5-D-TOPO verwendet, da die Kombination aus H1- und CMV-Promotor möglicherweise für die fehlende RNA-Interferenz verantwortlich ist.

Für die Klonierung des Vektors pLVTHM-pol2 wurde die shRNA-Expressionskassette aus dem Plasmid pSuper-pol2 mit Hilfe der Restriktionsenzyme *EcoR* I und *Cla* I herausgeschnitten und in den entsprechend verdauten Vektor pLVTHM ligiert. Die Sequenzen aller Oligonukleotide sind im Anhang auf Seite I aufgelistet.

Die lentiviralen Partikel wurden in der Verpackungszelllinie 293 FT gewonnen (siehe 2.3.7), und der Überstand wurde auf 293-Zellen in unterschiedlichen Verdünnungen (Verdünnungsstufe 1:10) in 6-well Platten gegeben, um den Anteil infektiöser Partikel pro ml Überstand ermitteln zu können. Die errechneten Titer der lentiviralen Vektoren mit leerer shRNA-Expressionskassette bzw. pol2-shRNA-Expressionskassette betragen $3,3 \times 10^5$ TU/ml bzw. $8,3 \times 10^5$ TU/ml.

Der Virustiter der lentiviralen pLVTHM-pol2 Vektoren konnte durch Ultrazentrifugation auf $1,0 \times 10^7$ TU/ml bis $2,5 \times 10^7$ TU/ml gesteigert werden, dennoch wurde im Folgenden zur Hemmung der PERV Expression mit dem lentiviralen Vektor RRL-pGK-GFP mit höherem Titer gearbeitet (s. u.).

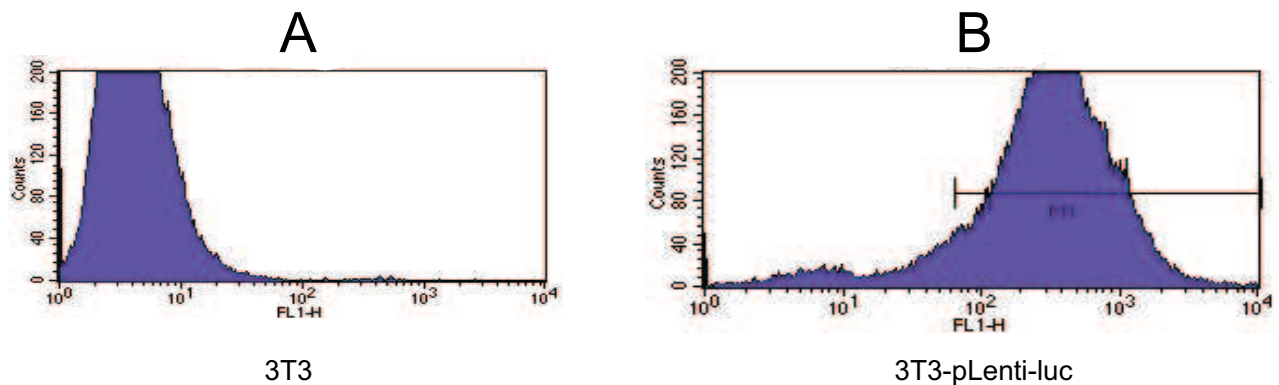


Abbildung 3.34: Analyse der unbehandelten (A) und der transduzierten 3T3-Zellen nach der Sortierung im Durchflusszytometer (B). Der Anteil der EGFP-positiven Zellen (Zellen innerhalb der Region M1) betrug 90%.

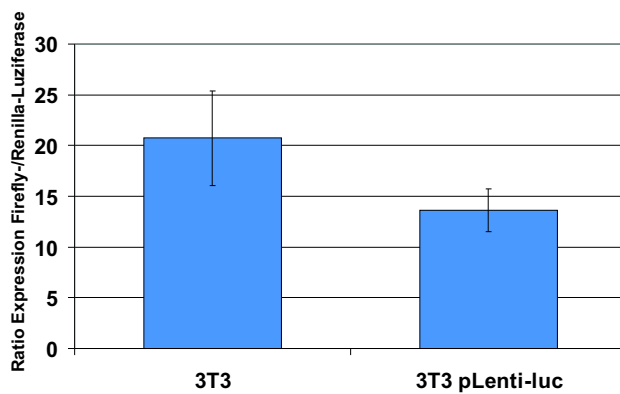


Abbildung 3.35: Ratio „Firefly“-Luziferase zur „Renilla“-Luziferase nach Sortierung von EGFP-positiven 3T3-Zellen, die mit pLenti-luc transduziert worden waren. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Klonierung des Vektors RRL-pGK-GFP mit pol2-shRNA-Expressionskassette

Die Klonierung des lentiviralen shRNA-Expressionssystems RRL-pGK-GFP-pol2 erfolgte unter Verwendung der shRNA-Expressionskassette aus dem Plasmid pSuper-pol2, die mit Hilfe der Restriktionsenzyme *EcoR* I und *Hind* III herausgeschnitten worden waren und in den entsprechend verdauten lentiviralen Vektor kloniert wurden (mit freundlicher Unterstützung durch Prof. A. Pfeifer). Die im Anschluss hergestellten lentiviralen Partikel waren vor der weiteren Verwendung durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert worden (Titer: $5,0 \times 10^7$ TU/ml).

Dieses Viruskonzentrat ($5 \mu\text{l}$) wurde in 6-well Platten zum einen mit embryonalen porcinen

Fibroblasten, zum anderen mit uninzierten bzw. mit PERV-B-oder PERV-A/C-infizierten 293-Zellen (jeweils $1,0 \times 10^5$ Zellen pro well) in Anwesenheit von Polybrene ($6 \mu\text{g}/\text{ml}$) für 24 Stunden kultiviert. Zellen mit EGFP-Expression konnten mittels Fluoreszenzmikroskop detektiert werden (Abb. 3.36). Die Anzahl der EGFP⁺ embryonalen porcinen Fibroblasten

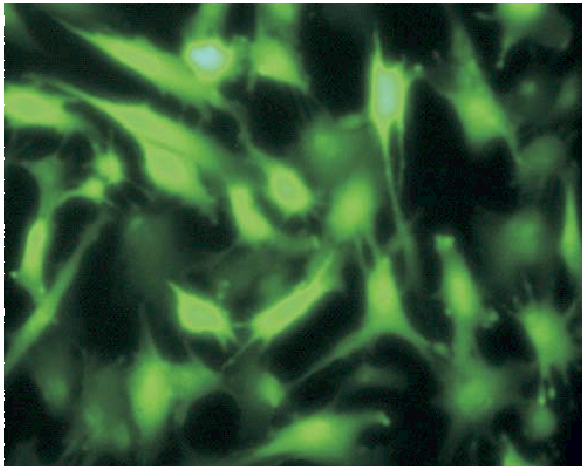


Abbildung 3.36: Immunfluoreszenz-Analyse porciner embryonaler Fibroblasten nach der Transduktion mit RRL-pGK-GFP-pol2.

wurde 48 Stunden nach der Transduktion mittels Durchflusszytometrie bestimmt, dabei zeigte sich im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine Transduktionsrate von etwa 90% (Abb. 3.37). Aus diesen Zellen wurde die zelluläre RNA isoliert und die PERV-Expression

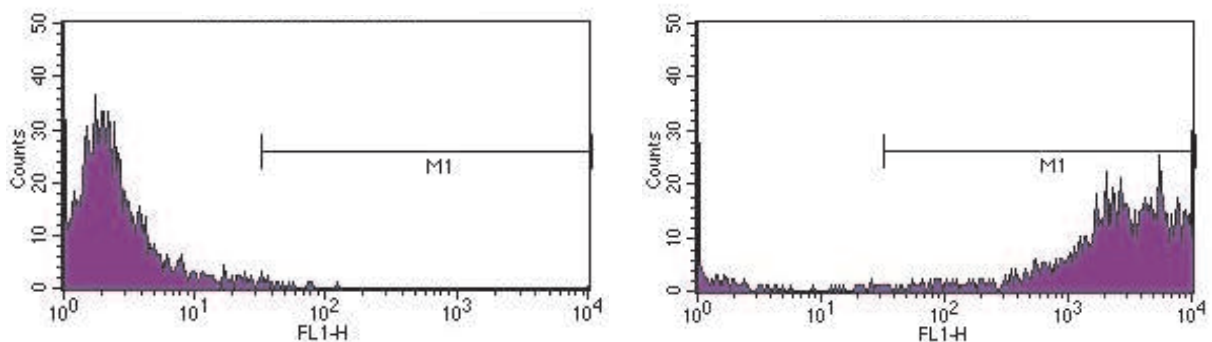


Abbildung 3.37: Anstieg des Anteils EGFP-positiver porciner embryonaler Fibroblasten nach Transduktion mit RRL-pGK-GFP-pol2 auf 90% im Vergleich zu den untransduzierten Zellen.

wurde mittels real time RT-PCR analysiert. Die Hemmung der viralen RNA betrug, verglichen mit unbehandelten embryonalen porcinen Fibroblasten, mehr als 80% (Abb. 3.38).

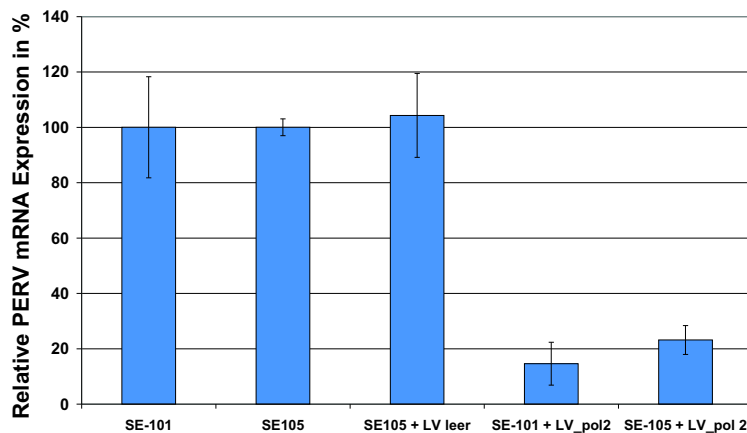


Abbildung 3.38: **Hemmung der PERV-Expression in porcinen embryonalen Fibroblasten (SE-101 und SE105) nach Transduktion mit RRL-pGK-GFP-pol2.** Die Quantifizierung erfolgte mittels real time RT-PCR unter Verwendung der Oligonukleotide pol2_up/down. Als Negativ-Kontrolle wurde zusätzlich der „Leervektor“ RRL-pGK-GFP unter identischen Bedingungen in die Zellen SE-105 transfiziert, und es wurde die relative PERV mRNA Expression gemessen.

Die Transduktion der PERV-infizierten (sowohl mit PERV-B, als auch mit PERV-A/C) 293-Zellen erfolgte analog zu der Transduktion der porcinen Fibroblasten mit einer ähnlichen Transduktionseffizienz von nahezu 90%. Der Nachweis der durch RNA-Interferenz vermittelten Hemmung der viralen mRNA wurde ebenfalls mittels real time RT-PCR unter Verwendung zweier unterschiedlicher Oligonukleotidprimerpaare (pol2_up/down und pol3-4-5_up/down) quantifiziert. Dabei zeigten die transduzierten und mit PERV-B-infizierten 293-Zellen eine Hemmung der PERV-Expression von ca. 60%, verglichen mit den unbehandelten infizierten Zellen. Der Abbau der viralen mRNA in PERV-A/C infizierten 293-Zellen war um einige Prozentpunkte geringer (Abb. 3.39). Es konnte nach erfolgter real time RT-PCR kein signifikanter Unterschied der detektierten PERV mRNA bei dem Einsatz der beiden verschiedenen Primerpaare festgestellt werden.

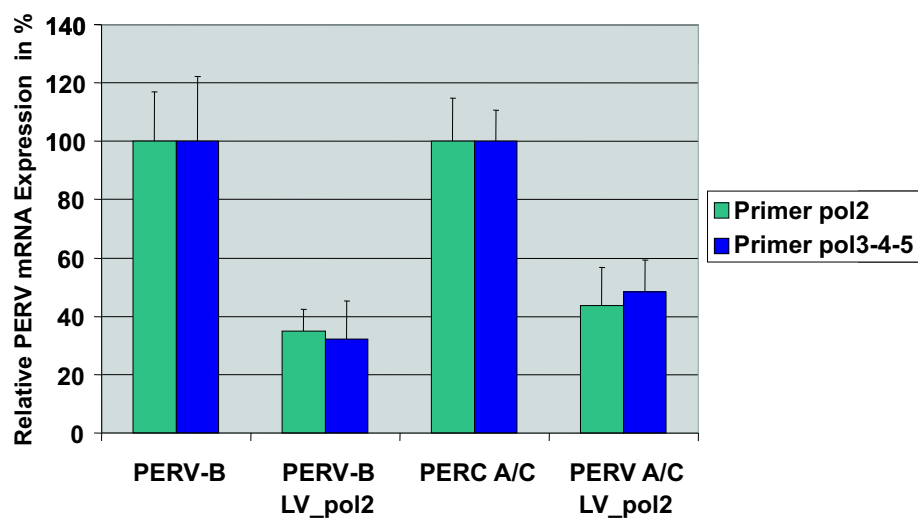


Abbildung 3.39: **Hemmung der PERV-Expression bei PERV-infizierten humanen embryonalen Nierenzellen (293) nach Transduktion mit RRL-pGK-GFP-pol2.** Die Quantifizierung erfolgte mittels real time RT-PCR unter Verwendung der Oligonukleotid-Primer pol2_up/down (grün) und pol3-4-5_up/down (blau).

Kapitel 4

Diskussion

Neben immunologischen und physiologischen Schwierigkeiten bei der Xenotransplantation von porcinen Zellen, Zellverbänden oder Organen besteht zudem die Gefahr der Transmission von pathogenen Mikroorganismen auf den humanen Rezipienten. Vor allem Infektionen mit porcinen endogenen Retroviren sind zu befürchten, da diese fest im Genom aller Schweinerassen verankert sind [Akiyoshi et al., 1998] und sich daher auch durch Zucht unter keimfreien Bedingungen nicht eliminieren lassen [Denner, 1998, Mang et al., 2001]. In *in vitro* Infektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass humane Zellen für PERVs suszeptibel sind [Patience et al., 1997, Specke et al., 2002b], da auf der Oberfläche der humanen Zellen zumindest zwei unterschiedliche PERV-A Rezeptoren lokalisiert sind [Ericsson et al., 2003].

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit zum einen die PERV-Transmission in unterschiedlichen *in vitro* und *in vivo* Infektionsversuchen zur Analyse des Gefahrenpotentials der Xenotransplantation analysiert, zum anderen wurde ein auf RNA-Interferenz beruhender Ansatz vorgestellt, der aufzeigt, wie die PERV Freisetzung in transgenen Schweinen effektiv unterdrückt werden könnte.

4.1 Untersuchungen der PERV-Transmission im Kleintiermodell

Zu Beginn der Arbeit im Juni 2001 waren die PERV-Rezeptoren noch nicht identifiziert und es herrschte Unklarheit, welche Tiere (vorzugsweise Kleintiere, wie Ratten, Mäuse oder Hamster) sich zur Untersuchung der PERV-Transmission und PERV-Pathogenese

als Modellsystem eignen würden. Erste Hinweise auf PERV-suszeptible Rattenzellen fand man durch *in vitro* Infektionsversuche mit PERV-B pseudotypisierten Retroviren [Takeuchi et al., 1998]. Dennoch gelang es nicht, Rattenzellen (weder Zellinien, noch primäre Rattenzellen) durch zellfrei applizierten Virusüberstand von PK-15- oder PERV-infizierten 293-Zellen zu infizieren [Specke et al., 2001b].

Um die Virustransmission effektiver und realitätsnäher zu gestalten, wurden bei dem erneuten Versuch, Rattenzellen zu infizieren, die PERV-infizierten Zellen mit den murinen Zellen gemeinsam kultiviert. Bei dieser Kokultivierung infizierter 293-Zellen mit den murinen FE-8^{neo+}-Zellen konnte allerdings keine produktive Infektion nachgewiesen werden, obgleich nach Kokultivierung mit PERV/5⁰-Zellen für kurze Zeit mit Hilfe einer PCR mit *pol* spezifischen Oligonukleotiden ein Amplifikat nachweisbar war. Die Amplifikation des Polymerase-Gens läßt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Reste von DNA aus den PERV-Producer Zellen erklären.

Wie die Ergebnisse der Promotorstudien mit Hilfe des dualen Luziferase Assay zeigten, bestätigte sich zudem, dass der *in vitro* Infektionsversuch mit Viren aus PERV/5⁰-Zellen eher ungünstig gewählt war, da die Promotoraktivität der human adaptierten LTR des Virus in murinen Zellen geringere Aktivität aufwies als das Wildtyp-Virus. Für zukünftige Inokulationen von PERV in Versuchstiere empfiehlt sich daher, die Promotoraktivität der PERV-LTR in Zellen der entsprechenden Spezies zu testen.

Desweiteren konnte nach der Transfektion von Fibroblasten der Ratte mit dem PERV-A/C Molekularklon im Gegensatz zur Transfektion humaner Zellen keine gespleißte *env* mRNA detektiert werden, so dass möglicherweise die Prozessierung der viralen RNA aufgrund fehlender zellulärer Proteine gestört war. Ein ähnliches Phänomen wurde nach Transfektion eines Rous-Sarkomvirus Molekularklons in NIH 3T3 Zellen beobachtet. Dabei wurde die fehlende gespleißte *env* mRNA als ein Grund für die mangelnde Virusreplikation in Säugetierzellen angesehen [Berberich et al., 1990]. Ob die PERV Replikation in allen unterschiedlichen Zelltypen der Ratte wegen gestörter RNA Prozessierung gehemmt ist, müßte in nachfolgenden Untersuchungen analysiert werden.

Da zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden konnte, dass PERV-suszeptible Zellen in den Versuchstieren existieren, wurden die Ratten mit porcinen Inselzellen transplantiert und über einen längeren Zeitraum überwacht. Ungeachtet der interessanten Erkenntnis, dass die verkapselten porcinen Transplantate ohne Immunsuppression bis zu 400 Tage in den Versuchstieren aktiv waren und die Insulinversorgung der Ratten sicherstellten, konnten keine PERV-spezifischen Antikörper detektiert werden. Allerdings waren nach erfolgter

Xenotransplantation in manchen Tieren Antikörper gegen porcine zelluläre Antigene nachweisbar, die die Funktionalität des murinen Immunsystems bestätigten. Eine Infektion der Ratten mit PERV konnte somit ausgeschlossen werden. Sowohl diese Ergebnisse, als auch die des *in vitro* Infektionsversuches lassen vermuten, dass auf der Oberfläche von Rattenzellen keine Rezeptoren für porcine endogene Retroviren vorhanden sind. Möglicherweise kann eine PERV-Infektion jedoch nach Transfektion des humanen PERV-A Rezeptors in die murinen Zellen gelingen, wenn andere zelluläre Faktoren, wie z. B. die benötigte zelluläre Protease, die Virusreplikation dort ebenfalls begünstigen.

4.2 Risikoevaluierung der PERV Transmission auf humane Rezipienten durch Xenotransplantation im „drei-Spezies-Modellsystem“

Da alle bislang durchgeführten Tierversuche zur Untersuchung des Gefährdungspotentials der PERV-Transmission auf den Menschen nur sehr eingeschränkt der tatsächlichen klinischen Xenotransplantation unter Immunsuppression entsprechen, wurden in diesem Versuchsansatz erstmals porcine Organe zusammen mit Teilen einer humanen Vene unter realistischen Bedingungen auf Affen transplantiert. Mit Hilfe dieses „drei Spezies-Modellsystem“, bei dem die porcine Niere direkt an das humane Gefäßstück angeschlossen wurde, konnte die potentielle PERV Transmission auf suszeptibles humanes Endothelgewebe analysiert werden. Derartige Endothelzellen waren in der Vergangenheit unter *in vitro* Bedingungen produktiv infiziert worden [Martin et al., 2000]. Da in diesem Versuchsansatz neben den Immunsuppressiva Cyclophosphamid, Cyclosporin A, Steroiden und Mycophenolsäure auch der C1-Esterase Inhibitor eingesetzt wurde, um das Komplementsystem des Transplantatempfängers zu unterdrücken, konnte erwartet werden, dass die vom porcinen Organ freigesetzten PERV Virionen nur geringfügig durch Komplementfaktoren inaktiviert werden können. Dieser Effekt sollte durch den Einsatz transgener huCD59 Schweine, die in diesem Versuch zum Teil als Organspender zum Einsatz kamen, unterstützt werden.

Dennoch konnte an keinem Zeitpunkt nach der Xenotransplantation eine signifikant erhöhte Reverse Transkriptase Aktivität im Serum nachgewiesen werden. Auch mittels RT-PCR waren keine retroviralen Partikel nachweisbar (Experimente durchgeführt in Kooperation mit der Medizinischen Hochschule Hannover). In zukünftigen Experimenten bleibt zu klären, ob unter diesen Versuchsbedingungen tatsächlich keine PERV-Virionen freigesetzt

werden können, oder ob die Nachweisgrenze der beiden Assays nicht sensitiv genug war, um Viruspartikel zu detektieren. Ebenfalls Anzeichen für eine ausbleibende Virusfreisetzung bzw. sofortige Inaktivierung des Virus ist das Fehlen einer Immunantwort gegen PERV-Proteine, wie in Western-Blot Analysen gezeigt werden konnte. Trotz der kurzen Dauer des Versuchs hätte man bei einer starken Virusreplikation zumindest anti-PERV IgMs im Serum der Cynomolgus-Affen erwartet. Allerdings war die Immunantwort der Tiere aufgrund der starken Immunsuppression deutlich unterdrückt und es bleibt fraglich, ob unter derartigen Bedingungen B-Zellen aktiviert werden können, um Immunglobuline zu sezernieren [Morschheuser et al., 1997]. Für das Auftreten einer humoralen Immunantwort spräche der Vergleich mit HIV infizierten Patienten, die trotz der viral induzierten Immunsuppression wenige Wochen nach Infektion eine starke Freisetzung von HIV-spezifischen Immunglobulin aufweisen.

Die explantierten humanen Gefäßstücke wurden nach dem Tod der Cynomolgus-Affen mittels PCR unter Verwendung *pol* spezifischer Primer auf provirale PERV Integrationsorte untersucht. Die meisten untersuchten Gewebeteile waren bezüglich der PERV-Sequenzen negativ. Bei den wenigen positiv getesteten Proben konnte der Ursprung der PERV-DNA eindeutig auf Kontamination mit porcinen Zellen des Spenderorgans zurückverfolgt werden, wie die PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für die porcine Cytochromoxidase II und die porcine Centromer-Region zeigte.

Das „drei-Spezies-Modellsystem“ bot hinsichtlich der Risikoevaluierung der Xenotransplantation ein erhebliches Potential, da eine direkte Transmission porciner endogener Retroviren auf humanes Gewebe *in vivo*, unter Immunsuppression untersucht werden konnte. In diesem speziellen Fall konnte eine Übertragung von PERV nicht festgestellt werden. Fraglich bleibt allerdings, ob die geringe Überlebensdauer der Versuchstiere ausreichte, um die Sicherheit von Xenotransplantationen realistisch beurteilen zu können. In einem verwandten „drei-Spezies-Modellsystem“, bei dem humanes und porcines Gewebe in immundefiziente NOD/SCID-Mäuse transplantiert wurde, konnte auch nach 25 Wochen keine direkte Übertragung der porcinen endogenen Retroviren auf die humanen Zellen nachgewiesen werden [Yang et al., 2004].

Vor allem die Verwendung von Spenderorganen transgener Schweine mit Gen-Knockout der $\alpha 1,3$ -Galaktosyl-Transferase könnte die Überlebensrate in zukünftigen Transplantationen in ähnlichen *in vivo* Versuchen erheblich vergrößern und damit die Aussagekraft des Versuchs hinsichtlich der Virussicherheit bei der Xenotransplantation erhöhen.

4.3 Klonierung eines PERV-A/C-Molekularklons

Die Gefahr einer Infektion humaner Zellen geht ausschließlich von den humantropen PERV Subtypen A und B aus. Das ecotrope PERV-C kann sehr wahrscheinlich aufgrund fehlender Rezeptoren auf der Zelloberfläche humaner Zellen kein menschliches Gewebe infizieren: das Wirtsspektrum von PERV-C ist begrenzt auf porcine Zellen. Durch die in der Vergangenheit durchgeführten vielfachen Infektionsversuche humaner Zellen mit primären porcinen Zellen, zeigte sich, dass hauptsächlich PERV-A auf humane Zielzellen übertragen wurde. PERV-B wird - im Gegensatz zu immortalisierten porcinen Zelllinien - von primären Schweinezellen nur schwach bzw. gar nicht exprimiert. Neue Ergebnisse bei der Infektion humaner Zellen mit dem Kulturüberstand primärer Zellen von gezüchteten „low-producer“-Miniatur-Schweinen zeigten, dass ausschließlich eine rekombinierte Form aus PERV-A und PERV-C, die im Genom dieser Schweine nicht enthalten ist, auf die humanen Zellen übertragen wird [Oldmixon et al., 2002]. Durch diese Rekombination wird ein Teil des envelope-Gens von PERV-A (die hochvariable VRA-Region) auf PERV-C übertragen. Die PERV-A/C-Rekombinante weist somit den gleichen Tropismus auf wie PERV-A. Diese exogene Form von PERV ist hinsichtlich der Xenotransplantation Besorgnis erregend, da gezeigt wurde, dass dessen LTR - nach Kultivierung auf humanen 293-Zellen - mehrere Multimerisierungsdomänen enthält, die die Expressionsrate dieser Viren um ein Vielfaches erhöht, verglichen mit der Expression der Wildtyp-Virus-mRNA [Denner et al., 2003].

Aus diesem Grund empfiehlt sich die Klonierung eines PERV-A/C Molekularklons, um nach Transfektion von Targetzellen unter definierten Bedingungen Aussagen über das molekulare Verhalten dieser Rekombinante gewinnen zu können.

Die Amplifikation der PERV-A/C Sequenz gelang per PCR in zwei hintereinander folgenden Amplifikationsrunden. Um eine maximale Expression der viralen mRNA sicherzustellen, wurde das PCR-Amplifikat ab der R-Region der 5'-LTR unmittelbar „downstream“ des CMV-Promotor des verkürzten Vektors pcDNA3.1(+) kloniert. Trotz Einsatz von thermostabilen Polymerasen mit Nuklease-Aktivität wurde nach Sequenzierung eine Mutation identifiziert, die den Stopp der Proteintranslation zur Folge hätte. Per Mutagenese-PCR konnte diese Mutation erfolgreich behoben werden. Andere Unterschiede, verglichen mit der PERV-MSL-Sequenz (NCBI-Accession Nummer: AF038600) wurden vernachlässigt, da nicht bekannt war, welche Mutation die PERV Replikation funktionell beeinträchtigen könnte. Leider ist von dieser publizierten PERV-MSL Sequenz nicht bekannt, ob sie von einem replikationskompetenten Virus stammt. Auch gelang es nicht, die LTR mit fünf

Multimerisierungssequenzen aus den 293/5⁰-Zellen zu amplifizieren. Offensichtlich hatte sich aufgrund der langen Kultivierungszeit der Zellen eine stabilere PERV-Variante mit vier „repeats“ durchgesetzt. Möglicherweise ist die Kapazität der PERV-Virionen auf eine bestimmte Länge des viralen Genoms limitiert, so dass sich selbst PERV-Varianten mit einem stärkeren Promotor nicht behaupten können, obwohl sie ein nur 37 bp längeres Genom besitzen.

Nach Transfektion von 293-Zellen konnten zwar gespleißte und ungespleißte virale mRNA nachgewiesen werden, und auch auf Proteinebene wurden Reverse-Transkriptase und das virale Gag-Protein (mit dem korrekten Molekulargewicht) nachgewiesen. Allerdings gelang es nicht, mit dem Überstand dieser transfizierter Zellen eine produktive PERV-Infektion in uninfizierten Zielzellen zu induzieren. Die entscheidende Mutation für die fehlende Replikationsfähigkeit des Moleklarklons konnte nicht identifiziert werden, da bislang keine vergleichbare Sequenz mit funktionell aktivem PERV-A/C publiziert wurde. Im Anhang ist auf Seite XII ein Sequenzvergleich mit den publizierten PERV-A, bzw. PERV-MSL aufgeführt, der potentielle Mutationen kennzeichnet. Jede dieser Mutationen könnte für die mangelnde Infektion verantwortlich sein.

Ein defektes virales Gen könnte möglicherweise entdeckt werden, indem Zellen mit einzelnen viralen Genen in Verbindung mit dem Moleklarklon transfiziert werden würden. Beispielsweise könnte das retrovirale Envelope-Protein durch das VSV-G Protein ersetzt werden. Läßt sich auch durch eine derartige Komplementation keine produktive Infektion erzielen, so könnten mutierte Bereiche innerhalb der Ψ -Verpackungssequenz des Moleklarklons Grund für die mangelnde Infektiosität sein.

Dennoch kann der erstellte PERV-A/C Moleklarklon herangezogen werden, um durch Transfektion von Zellen unterschiedlicher Spezies solche zu finden, die sich zum Studium der porcinen endogenen Retroviren im Tierversuch eignen. So konnte gezeigt werden, dass die Rattenzellen nicht in der Lage waren, die *env* mRNA aus der viralen Vollängen-mRNA zu spleißen, bzw. die *envelope* mRNA wurde in den analysierten Rattenzellen durch noch unbekannte Faktoren unterdrückt.

Zudem konnte erstmals die gesamte Sequenz einer PERV-A/C Rekombinanten ermittelt werden. Da jede Sequenzabschnitt des Klons mindesten zweimal sequenziert wurde, liefern die Sequenzanalysen verlässliche Daten.

4.4 RNA-Interferenz zur Hemmung der PERV-Expression

Da trotz aller bislang durchgeführten *in vitro* und *in vivo* Versuchsansätze zur Risikoevaluierung der PERV Transmission kein absolute Sicherheit bei der Xenotransplantation gewährleistet werden kann, wurde in diesem zweiten Teil der Arbeit versucht, die PERV Freisetzung durch neue molekularbiologische Methoden zu inhibieren. In der Vergangenheit war man bei dem Versuch, endogen exprimierte Proteine zu inhibieren, auf aufwendig durchzuführende Gen-Knockouts beschränkt (Reviews, siehe [Mueller, 1999, Gong and Rong, 2003]) Diese genetischen Manipulation können durchgeführt werden, wenn das zu hemmende Gen in einfacher oder doppelter Ausführung im Genom lokalisiert ist. Bei den porcinen endogenen Retroviren stellt sich jedoch das Problem, dass etwa 50 unterschiedliche Integrationsorte im Genom des Schweins verankert sind [Bosch et al., 2000, Herring et al., 2001]. Obwohl viele dieser Provirus-Sequenzen mutiert oder deletiert sind und daher nicht für die Expression intakter Viren zur Verfügung stehen, kann dennoch nicht völlig ausgeschlossen werden, dass es durch homologe Rekombination dieser Sequenzelemente zur Komplementation intakter Virusgenome kommen kann. Andere Arbeitsgruppen versuchten daher durch konventionelle Zuchtmethoden Schweine heranzuziehen, die in ihrem Genom keine Variante des humanotropen PERV-A/C Subtyps enthalten [Oldmixon et al., 2002]. Diese Schweine setzen nach Angaben der Autoren keine humanotropen PERV Virionen frei. Allerdings konnte kürzlich gezeigt werden, dass selbst porcine Zellen, die in ihrer genomischen DNA keine proviralen Sequenzen für humanotrope replikationskompetente PERV-A/C Rekombinanten enthalten, in der Lage sind, nach Rekombination derartige Virionen zu exprimieren, die dann humane Zellen infizieren können [Scobie et al., 2004, Wood et al., 2004].

Aus diesem Grund wurde nach Alternativen zu der konventionellen knockout-Methode gesucht. Eine Möglichkeit, die Funktion endogen exprimierter Proteine zu inhibieren, besteht in der intrazellulären Expression spezifischer „single-chain“-Antikörper gegen das gewünschte Zielprotein [Rondon and Marasco, 1997]. Eine andere Möglichkeit, die PERV Replikation auf RNA-Ebene zu unterbinden, bestünde in der Expression von antisense-RNA, die mit der Target-mRNA hybridisiert. Zelluläre RNasen (RNase-H) degradieren das nun doppelsträngige RNA-Molekül und verhindern dadurch die Proteintranslation. Auch bestimmte RNA-Moleküle mit enzymatischer Nuklease-Aktivität (Ribozyme) sind in der Lage, an distinkte mRNAs sequenzspezifisch zu binden und diese zu verdauen [Peracchi, 2004]. All

diese innovativen Methoden haben jedoch den Nachteil, dass der Aufwand, effektive Konstrukte zu klonieren und zu identifizieren, erheblich ist. Andere Nachteile bestehen in der Induktion von Interferon durch den Einsatz längerer antisense-RNA Moleküle, oder in der unspezifischen Bindung von zellulären Proteinen [Scherer and Rossi, 2003].

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die 2001 erstmals bei Säugetierzellen beschriebene RNA-Interferenz als Methode eingesetzt, um eine effektive Technik zur Hemmung der PERV Expression bereitstellen zu können [Elbashir et al., 2001a]. Diese Methode wurde bereits *in vitro* zur Hemmung der HIV eingesetzt [Coburn and Cullen, 2002, Jacque et al., 2002, Novina et al., 2002, Banerjee et al., 2003], aber auch die Proteinexpression anderer viraler Erreger, wie beispielsweise die der Hepatitis Viren konnte inhibiert werden [Radhakrishnan et al., 2004]. Zudem wurde gezeigt, dass die Expression von shRNAs *in vivo* durch lentiviralen Gentransfer induziert werden kann. Die dadurch erzeugten transgenen Mäuse zeigten eine dauerhafte Hemmung des unterdrückten Zielgens mit einer Effizienz von teilweise bis zu 100% [Rubinson et al., 2003].

4.4.1 Auswahl der siRNA-Sequenzen

Zahlreiche Publikationen zeigten, dass die Effizienz des Gen-Knockouts mittels RNA-Interferenz stark von der Auswahl der siRNA abhängig ist [Chalk et al., 2004, Reynolds et al., 2004]. Vor Kurzem konnten einige Gemeinsamkeiten bei gut funktionierenden siRNAs festgestellt werden [Schwarz et al., 2003, Khvorova et al., 2003, Krol et al., 2004, Ui-Tei et al., 2004], so dass bei Beachtung dieser Kriterien inzwischen bei ca. 80% der ausgewählten siRNAs mit einer Hemmung des Zielgens um mehr als 70% zu rechnen ist.

Da diese neueren Kriterien zu dem Zeitpunkt der Auswahl noch nicht zur Verfügung standen, wurden insgesamt neun unterschiedliche siRNAs zur Inhibierung der PERV Expression bestellt. Die meisten dieser siRNAs wurden so ausgewählt, dass sie in der Lage sein sollten, alle PERV Subtypen, deren Sequenz bislang publiziert wurde, zu hemmen. Im Anhang (Tabelle 5.2 auf Seite IV) sind die Sequenzen der siRNAs mit den entsprechenden Homologien zu den PERV-Subtypen aufgelistet. Da die Varianz zwischen PERV-A, -B und -C vor allem innerhalb des *envelope*-Gens beträchtlich ist, war es unmöglich in dieser Region siRNAs auszuwählen, die zum einen den geforderten „Tuschl-Regeln“ (siehe 3.4.1) entsprechen, und zusätzlich vollständig homolog zu allen PERV Subtypen sind.

Im Nachhinein zeigte die Analyse der ausgewählten siRNAs hinsichtlich der neuen Kriterien für effektives „gene-silencing“, dass die siRNA „pol2“ alle geforderten Bedingungen erfüllte.

Mit Hilfe der neuen Auswahlkriterien könnten zusätzliche siRNA für die Hemmung der PERV Replikation identifiziert und in zukünftigen Analysen validiert werden.

4.4.2 Hemmung der PERV-Expression mittels synthetischer siRNAs

Nach Transfektion der synthetischen siRNAs in PERV-B infizierte 293-Zellen zeigte sich, dass die Effizienz der siRNAs tatsächlich stark variieren kann. Allerdings wies die siRNA „pol2“, die die geforderten thermodynamischen Bedingungen als einzige erfüllte, tatsächlich auch die stärkste Hemmung der viralen mRNA auf. Diese siRNA bindet zudem an der viralen RNA in einem Bereich, der sich hauptsächlich durch ungepaart vorliegende Basen auszeichnet. Somit korreliert die durch den Computer vermittelte Auswahl an siRNA-Bindungsstellen hervorragend mit der tatsächlichen Effizienz der RNAi induzierten Hemmung. Die Menge an transfizierter siRNA wurde entsprechend publizierter Daten so gewählt, dass unspezifische Effekte oder die Induktion einer Interferon-Antwort minimiert sein sollten [Sledz et al., 2003].

Zusätzlich zu der Quantifizierung des „gene-silencing-Effekts“ mittels real-time RT-PCR wurde die Hemmung auf Proteinebene analysiert. Hierbei konnten bei Western-Blot Assays keine Unterschiede zu unbehandelten Zellen bzw. zu Zellen, die mit der Kontroll-siRNA transfiziert worden waren, festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Verantwortlich dafür dürfte wahrscheinlich die Stabilität des viralen Gag-Proteins und die damit verbundene lange Halbwertszeit sein. Gegebenenfalls könnte man durch mehrfache Transfektion der PERV-spezifischen siRNAs im Abstand mehrerer Tage eine verringerte Gag-Proteinmenge nachweisen.

4.4.3 Expression von PERV-spezifischen shRNAs

Für die Herstellung einer stabilen Zelllinie mit kontinuierlicher Expression der PERV-spezifischen shRNA wurde daher im Folgenden die Sequenz der effektiv inhibierenden synthetischen siRNA „pol2“ herangezogen, und die entsprechende Sequenz in den shRNA-Expressionsvektor pSuper kloniert.

Nach stabiler Transfektion dieses Konstrukts in PERV-B infizierte 293-Zellen und nachfolgender Isolation von Zellklonen konnte der Effekt der RNA-Interferenz nicht nur mittels real-time-RT-PCR, sondern auch mittels Western-Blot Analysen oder Immunfluoreszenz

auf Proteinebene nachgewiesen werden [Karlas et al., 2004]. Das Serum der mit rekombinantem p27Gag-Protein immunisierten Ziege erwies sich für den Nachweis des viralen Proteins im Zellysat bzw. mittels Immunfluoreszenz als gut geeignet.

Entsprechend reduzierte sich nach Transfektion dieses Plasmids pSuper-pol2 auch die Menge an sezernierter Reverser-Transkriptase im Überstand der infizierten Zellen deutlich, und auch der Titer der transfizierten Zellen verringerte sich um mehr als das Zehnfache. Leider konnte auch nach Selektion von shRNA-exprimierender Zellen kein Zellklon identifiziert werden, der eine komplette Hemmung der PERV Expression aufwies. Allerdings sind die wenigsten publizierten shRNAs in der Lage, die Menge des Zielproteins komplett auf 0% zu reduzieren. Möglicherweise könnte durch Transfektion mehrerer unterschiedlicher PERV spezifischer shRNA-Expressionsvektoren die PERV Replikation vollständig inhibiert werden. Die Sequenz der synthetische siRNA „pol5“ erscheint hierfür vielversprechend, da sie nach Transfektion in PERV-B infizierte 293-Zellen die Menge an viraler mRNA um ca. 70% reduzierte und zudem eine komplette Homologie zu allen PERV Subtypen aufweist. Zusätzlich würde es sich anbieten, neue Sequenzen für shRNAs zu suchen, da mit Hilfe der neuen thermodynamischen Kriterien hocheffektive shRNA sehr leicht identifiziert werden können.

Interessant erschien in diesem Zusammenhang auch die Fragestellung, ob die exprimierten pol2-shRNAs tatsächlich sequenzspezifisch nur die virale Vollängen-mRNA degradieren. Da nach stabiler Transfektion des Plasmids pSuper-pol2 tatsächlich lediglich die Menge der virale RNA *gag-pol-env* limitiert war, die gespleißte *env*-mRNA jedoch in ähnlicher Menge (verglichen zu der Kontrolle) exprimiert wurde, konnte bestätigt werden, dass der Ort der RNA-Interferenz auf das Zytoplasma beschränkt ist [Zeng and Cullen, 2002]. Allerdings konnte vor kurzem gezeigt werden, dass es nach der Transfektion von siRNAs in Säugetierzellen zur spezifischen Methylierung der DNA des Zielgens kam [Kawasaki and Taira, 2004, Morris et al., 2004]. Demnach müssen zumindest geringe Mengen an siRNAs, bzw. shRNAs auch in dem Nukleus lokalisiert sein, um dort über Hybridisierung an spezifischen DNA-Sequenzen die Methylierung zu katalysieren. Wahrscheinlich wird die dort transkribierte RNA nur deshalb nicht im Zellkern degradiert, weil der „RNA induced silencing complex“ (RISC) mit seiner Nuklease-Aktivität strikt auf das Zytoplasma beschränkt zu sein scheint.

4.4.4 Lentiviral vermittelter Transfer von shRNA-Expressionskassetten

Da das langfristige Ziel darin besteht, transgene Schweine mit verminderter PERV Expression zu generieren, wurde die identische shRNA-Sequenz von pSuper-pol2 in ein lentivirales Expressionsplasmid kloniert. Vor allem bei der Herstellung transgener Schweine zeigte der Einsatz von lentiviraler Infektion Vorteile gegenüber der konventionellen Mikroinjektion [Hofmann et al., 2003, Hofmann et al., 2004].

Ergebnisse aus der Kombination von lentiviral vermitteltem Gentransfer mit einer shRNA-Expressionskassette waren bis Mitte 2002 noch nicht publiziert worden. Daher wurde im Folgenden versucht, ein solches Vektorsystem zu etablieren. Leider erwies sich die Kombination aus dem CMV-Polymerase II-Promotor und dem H1-Polymerase III-Promotor als ungünstig: Obwohl die Zellen nach Infektion der lentiviralen Partikel GFP exprimierten, konnte scheinbar keine spezifisch wirkende shRNA gebildet werden, die die Expression der viralen PERV mRNA, bzw. der mRNA der Firefly Luziferase reduzierte.

Erst Ende 2002 bis Mitte 2003 erschienen mehrere Publikationen, in denen ein lentivirales shRNA Expressionssystem beschrieben wurde [Abbas-Terki et al., 2002, Rubinson et al., 2003, Wiznerowicz and Trono, 2003]. Somit konnte die entsprechende shRNA-Expressionskassette aus pSuper-pol2 ausgeschnitten und in den lentiviralen Vektor pLVTHM kloniert werden, der uns freundlicherweise von Prof. D. Trono zur Verfügung gestellt wurde.

Gleichzeitig wurde diese Expressionskassette in den lentiviralen Vektor RRL-pGK-GFP kloniert, lentivirale Partikel wurden in 293T-Zellen produziert und mittels Ultrazentrifugation konzentriert.

Durch die Infektion der gebildeten lentiviralen Partikel gelang es, nicht nur humane, PERV infizierte Zelllinien, sondern auch primäre porcine Zelle mit einer Effizienz von mehr als 90% zu transduzieren, wie die Expression des *GFP*-Reportergens zeigte. Auffällig war, dass die Hemmung der PERV-Expression der transduzierten porcinen Fibroblasten größer war, als die der PERV infizierten 293-Zellen: Da nur etwa 90% der Zellen mit den Lentiviren infiziert worden waren, ist die tatsächliche Hemmung der porcinen Fibroblasten sogar noch größer anzusehen, als die nachgewiesenen Hemmung von ca. 15-20%. Dieser deutlich stärkere Effekt der RNA-Interferenz könnte die Folge der stärkeren PERV Expression in den 293-Zellen sein. Bei der Quantifizierung der Hemmung der PERV Expression bei den 293-Zellen zeigte sich durch den Einsatz der beiden unterschiedlichen real-time Primern, dass der Verdau der viralen mRNA tatsächlich nicht nur auf die Bindungsstelle der shRNA

begrenzt ist, sondern das gesamte RNA Molekül betrifft.

Da in porcinen Organen, verglichen mit der Expressionsrate der 293-Zellen, nur eine minimale PERV-Replikation stattfindet, könnte die virale RNA mittels pol2-shRNA positiver transgener Schweine möglicherweise komplett inhibiert werden. Aus diesem Grund sollte im Folgenden versucht werden, mit Hilfe des klonierten lentiviralen Vektors RRL-pGK-GFP-pol2, bzw. pLVTHM-pol2 transgene Schweine zu generieren. Um die Hemmung der viralen Replikation auch unter diesen *in vivo* Bedingungen quantifizieren zu können, muss vorher geklärt werden, wie weit die PERV Expression unbehandelter Schweine von einander abweicht. Je nach Schweinerasse, aber auch innerhalb einer Rasse, kann es deutliche Abweichungen geben [Tacke et al., 2003], die den Effekt der RNA-Interferenz verfälschen könnten. Sollten die Schwankungen auch bei unbehandelten Tieren deutlich sein, müsste eventuell auf geklonte Schweine zurückgegriffen werden, deren PERV Expression tatsächlich konstant sein sollte.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Der anhaltende Engpass an Alлотransplantaten macht die Suche nach einer geeigneten Alternative dringend notwendig. Ein Lösungsansatz besteht in der Transplantation porciner Zellen oder Organe auf den Menschen. Derartige Xenotransplantationen bergen momentan jedoch noch etliche Risiken, wie immunologische Abstoßungsreaktionen oder physiologische Unverträglichkeiten. Zudem besteht die Gefahr einer Übertragung von porcinen Mikroorganismen auf den humanen Rezipienten. Im Unterschied zu den meisten bakteriellen und viralen Erregern des Schweins, die durch Zucht unter keimfreien Bedingungen eliminiert werden können, ist das Genom der porcinen endogenen Retroviren mit zahlreichen Kopien stabil im Genom des Schweins integriert. Phylogenetisch verwandte Retroviren, wie die Leukämieviren der Maus (MuLV) und der Katze (FeLV) induzieren im infizierten Tier Leukämien, Tumore und Immundefizienzen und zeigen somit das Gefährdungspotential einer möglichen PERV-Infektion humaner Rezipienten.

Zur Risikoevaluierung von Xenotransplantationen wurden daher im Rahmen dieser Arbeit *in vivo* Infektionsversuche durchgeführt. Bei den Untersuchungen mit Cynomolgusaffen wurde vor allem darauf geachtet, zukünftige Xenotransplantationen beim Menschen weitestgehend zu simulieren: So wurden vergleichbare pharmakologische Immunsuppressiva appliziert, zusätzlich wurde das porcine Organ in direkter Nähe zu suszeptiblem humanem Gewebe transplantiert. Bei keinem der Tiere konnte eine PERV-Infektion des simianen oder humanen Gewebes festgestellt werden. Allerdings war die Überlebensdauer der Versuchstiere zu kurz, um verlässliche Aussagen über die Virustransmission machen zu können, da porcine Zellen, Gewebe und Organe bei künftigen Xenotransplantationen funktionell bis zu mehreren Jahren im Körper des Patienten verbleiben sollen. Auch bei einem zweiten *in vivo* Infektionsversuch, bei dem porcine Langerhanssche Inselzellen in Ratten mit che-

misch induziertem Diabetes transplantiert worden waren, konnte keine PERV-Transmission nachgewiesen werden. Im Laufe weiterer Untersuchungen stellte sich allerdings heraus, dass zumindest die analysierten Ratten-Fibroblasten unter *in vitro* Bedingungen nicht für porcine endogene Retroviren permissiv sind.

Um Xenotransplantationen in Zukunft sicherer gestalten zu können, wurde erstmals das Potential des relativ neu entdeckten Phänomens der RNA-Interferenz hinsichtlich einer antiviralen Strategie gegen die Replikation von PERV analysiert: Anhand von neun unterschiedlichen synthetischen siRNAs gelang es, eine optimale Target-Sequenz in der pol-Region des PERV-Genoms (pol2) zu identifizieren, so dass die PERV Expression in PERV infizierten humanen 293-Zellen um mehr als 80% inhibiert werden konnte.

Ausgehend von dieser pol2 siRNA-Sequenz wurde ein Plasmid mit einer shRNA-Expressions-kassette konstruiert, das nach stabiler Transfektion eine starke und dauerhafte Hemmung der PERV-Expression hervorrief. Sowohl die mRNA, die viralen Proteine und vor allem die Menge freigesetzter infektiöser Viruspartikel war reduziert.

Für die Herstellung transgener Schweine mit verminderter PERV-Expression empfiehlt sich der Einsatz lentiviraler Expressionsvektoren, um die shRNA-Expressionskassette effektiv in porcine Blastocysten transferieren zu können. Es gelang, ein entsprechendes auf HIV-1 basierendes lentivirales Vektorsystem herzustellen. Durch Infektion mit solchen nicht-replizierenden Viren konnte die Expression von PERV in humanen, aber auch in primären porcinen Zellen um 90% inhibiert werden. Somit konnte erstmals die Hemmung endogener Retroviren mittels RNA-Interferenz gezeigt werden. Mit diesen Ergebnissen ist der Grundstein für die Herstellung entsprechender transgener Tiere gelegt.

Durch die Klonierung und Expression des p27Gag-Proteins und der Generierung spezifischer Antikörper gegen das rekombinante Gag-Protein sowie der Klonierung und Sequenzierung eines PERV-A/C Molekularklons wurden weitere Voraussetzungen geschaffen, um das Risikopotential zukünftiger Xenotransplantationen hinsichtlich einer Virustransmission mit den porcinen endogenen Retroviren besser einschätzen zu können.

Literaturverzeichnis

- [Abbas-Terki et al., 2002] Abbas-Terki, T., Blanco-Bose, W., Deglon, N., Pralong, W., and Aebischer, P. (2002). Lentiviral-mediated RNA interference. *Hum Gene Ther*, 13(18):2197–201.
- [Akiyoshi et al., 1998] Akiyoshi, D., Denaro, M., Zhu, H., Greenstein, J., Banerjee, P., and Fishman, J. (1998). Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine. *J Virol*, 72(5):4503–4507.
- [Albright et al., 2003] Albright, A. V., Soldan, S. S., and lez Scarano, F. (2003). Pathogenesis of human immunodeficiency virus-induced neurological disease. *J Neurovirol*, 9(2):222–7.
- [Allan and Ellis, 2000] Allan, G. and Ellis, J. (2000). Porcine circoviruses: a review. *J Vet Diagn Invest*, 12(1):3–14.
- [Allan et al., 1998] Allan, J. S., Broussard, S. R., Michaels, M. G., Starzl, T. E., Leighton, K. L., Whitehead, E. M., Comuzzie, A. G., Lanford, R. E., Leland, M. M., Switzer, W. M., and Heneine, W. (1998). Amplification of simian retroviral sequences from human recipients of baboon liver transplants. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 14(10):821–4.
- [Ambros, 2001] Ambros, V. (2001). microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*, 107(7):823–6.
- [Aravin et al., 2003] Aravin, A. A., Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., Meyer, J., and Tuschl, T. (2003). The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell*, 5(2):337–50.
- [Argaw et al., 2002] Argaw, T., Ritzhaupt, A., and Wilson, C. (2002). Development of a real time quantitative PCR assay for detection of porcine endogenous retrovirus. *J Virol Methods*, 106(1):97.

- [Armstrong et al., 1971] Armstrong, J., Porterfield, J., and Madrid, A. D. (1971). C-type Virus Particles in Pig Kidney Cell Lines. *J Gen Virol*, 10:195–198.
- [Bailey et al., 1985] Bailey, L. L., Nehlsen-Cannarella, S., Conception, W., and Jolley, W. B. (1985). Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate. *JAMA*, 254:3321–9.
- [Banerjea et al., 2003] 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(1):62–71.
- [Bannasch et al., 2003] Bannasch, H., Fohn, M., Unterberg, T., Bach, A., Weyand, B., and Stark, G. (2003). Skin tissue engineering. *Clin Plast Surg*, 30(4):573–9.
- [Barber, 2001] Barber, G. (2001). Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ*, 8(2):113–26.
- [Barre-Sinoussi et al., 1983] Barre-Sinoussi, F., Chermann, J., Rey, F., Nugeyre, M., Chameret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599):868–71.
- [Bartel, 2004] Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2):281–97.
- [Bartosch et al., 2002] 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(Pt 9):2231–40.
- [Berberich et al., 1990] Berberich, S., Macias, M., Zhang, L., Turek, L., and Stoltzfus, C. (1990). Comparison of Rous sarcoma virus RNA processing in chicken and mouse fibroblasts: evidence for double-spliced RNA in nonpermissive mouse cells. *J Virol*, 64(9):4313–20.
- [Billy et al., 2001] Billy, E., Brondani, V., Zhang, H., Mller, 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(25):14428–33.
- [Borie et al., 1998] Borie, D., Cramer, D., Phan-Thanh, L., Vaillant, J., Bequet, J., Makowska, L., and Hannoun, L. (1998). Microbiological hazards related to xenotransplantation of porcine organs into man. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 19(5):355–65.
- [Bosch et al., 2000] 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(18):8575–81.
- [Bowman and Richard, 2003] Bowman, K. W. and Richard, S. A. (2003). Culture, brain death, and transplantation. *Prog Transplant*, 13(3):211–5; quiz 216–7.
- [Breese, 1970] Breese, S. (1970). Virus-like Particles Occurring in Cultures of Stable Pig Kidney Cell Lines. *Archiv fr die gesamte Virusforschung*, pages 401–404.
- [Brouard et al., 1999] Brouard, S., Gagne, K., Blancho, G., and Souillou, J. (1999). T cell response in xenorecognition and xenografts: a review. *Hum Immunol*, 60(6):455–68.
- [Brown et al., 1999] Brown, S., Mahaffey, J., Lorenzen, M., Denell, R., and Mahaffey, J. (1999). Using RNAi to investigate orthologous homeotic gene function during development of distantly related insects. *Evol Dev*, 1(1):11–5.
- [Brummelkamp et al., 2002] Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 296(5567):550–3.
- [Byrne et al., 1997] Byrne, G., McCurry, K., Martin, M., McClellan, S., Platt, J., and Logan, J. (1997). Transgenic pigs expressing human CD59 and decay-accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement-mediated damage. *Transplantation*, 63(1):149–55.
- [Campbell and Vogt, 1995] Campbell, S. and Vogt, V. (1995). Self-assembly in vitro of purified CA-NC proteins from Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 69(10):6487–97.
- [Cerutti et al., 2000] Cerutti, L., Mian, N., and Bateman, A. (2000). Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem Sci*, 25(10):481–2.

- [Chalk et al., 2004] Chalk, A. M., Wahlestedt, C., and Sonnhammer, E. L. L. (2004). Improved and automated prediction of effective siRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 319(1):264–74.
- [Chawla-Sarkar et al., 2003] Chawla-Sarkar, M., Lindner, D., Liu, Y.-F., Williams, B., Sen, G., Silverman, R., and Borden, E. (2003). Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis*, 8(3):237–49.
- [Chua et al., 2000] Chua, K., Bellini, W., Rota, P., Harcourt, B., Tamin, A., Lam, S., Ksiazek, T., Rollin, P., Zaki, S., Shieh, W., Goldsmith, C., Gubler, D., Roehrig, J., Eaton, B., Gould, A., Olson, J., Field, H., Daniels, P., Ling, A., Peters, C., Anderson, L., and Mahy, B. (2000). Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science*, 288(5470):1432–5.
- [Chua, 2003] Chua, K. B. (2003). Nipah virus outbreak in Malaysia. *J Clin Virol*, 26(3):265–75.
- [Coburn and Cullen, 2002] 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(18):9225–31.
- [Coffin et al., 1997] Coffin, J., Hughes, S., and Varmus, H. (1997). Retroviruses. *Cold Spring Harb Laboratory*.
- [Conrad and Rauhut, 2002] Conrad, C. and Rauhut, R. (2002). Ribonuclease III: new sense from nuisance. *Int J Biochem Cell Biol*, 34(2):116–29.
- [Cooper, 1996] Cooper (1996). Xenotransplantation - State of the art. *Front Biosci*, 1:d248–65.
- [Cooper et al., 1991] Cooper, D., Ye, Y., Rolf, L. J., and Zhudi, N. (1991). The pig as potential organ donor for man. in: *Cooper DKC, Kemp E, Reemtsma K, White DJG, eds. Xenotransplantation, Springer, New York*, pages 481–500.
- [Czauderna et al., 2000] 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(9):4028–38.
- [Dabbs et al., 2000] Dabbs, A. D. V., Dauber, J., and Hoffman, L. (2000). Rejection after organ transplantation: a historical review. *Am J Crit Care*, 9(6):419–29.

- [Dalglish et al., 1984] Dalglish, A., Beverley, P., Clapham, P., Crawford, D., Greaves, M., and Weiss, R. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, 312(5996):763–7.
- [Davis et al., 1996] Davis, E., Pruitt, S., Greene, P., Ibrahim, S., Lam, T., Levin, J., Baldwin, W., and Sanfilippo, F. (1996). Inhibition of complement, evoked antibody, and cellular response prevents rejection of pig-to-primate cardiac xenografts. *Transplantation*, 62(7):1018–23.
- [Deng et al., 2000] Deng, Y., Tuch, B., and Rawlinson, W. (2000). Transmission of porcine endogenous retroviruses in severe combined immunodeficient mice xenotransplanted with fetal porcine pancreatic cells. *Transplantation*, 70(7):1010–1016.
- [Denner, 1998] Denner, J. (1998). Immunosuppression by retroviruses: implications for xenotransplantation. *Ann N Y Acad Sci.*, 862:75–86. Dec 30.
- [Denner et al., 1998] Denner, J., Sadtler, S., Chen, A., Lttkopf, D., and Kurth, R. (1998). Immunosuppression by retroviruses: Role of the transmembrane envelope protein and implications for AIDS and xenotransplantation. *J Mol Med*, 76:B3.
- [Denner et al., 2001] Denner, J., Specke, V., Schwendemann, J., and Tacke, S. (2001). Porcine endogenous retroviruses (PERVs): adaptation to human cells and attempts to infect small animals and non-human primates. *Ann Transplant*, 6(3):25–33.
- [Denner et al., 2003] Denner, J., Specke, V., Thiesen, U., Karlas, A., and Kurth, R. (2003). Genetic alterations of the long terminal repeat of an ecotropic porcine endogenous retrovirus during passage in human cells. *Virology*, 314(1):125–33.
- [Denner et al., 2002] Denner, J., Tacke, S., Specke, V., Stephan, O., Boller, K., and Schwendemann, J. (2002). Entwicklung von Testsystemen zum Nachweis porciner endogener Retroviren. *in: Xenotransplantation, Grundlagen - Chancen - Risiken, Ed: Helmut Grimm, Schattauer Verlag*, pages 259–279.
- [Ding et al., 2004] Ding, Y., Chan, C. Y., and Lawrence, C. E. (2004). Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acids. *Nucleic Acids Res*, 32(Web Server issue):W135–41.

- [Ding and Lawrence, 2001] Ding, Y. and Lawrence, C. (2001). Statistical prediction of single-stranded regions in RNA secondary structure and application to predicting effective antisense target sites and beyond. *Nucleic Acids Res*, 29(5):1034–46.
- [Ding and Lawrence, 2003] Ding, Y. and Lawrence, C. E. (2003). A statistical sampling algorithm for RNA secondary structure prediction. *Nucleic Acids Res*, 31(24):7280–301.
- [Djikeng et al., 2001] Djikeng, A., Shi, H., Tschudi, C., and Ullu, E. (2001). RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs. *RNA*, 7(11):1522–30.
- [Doi et al., 2003] Doi, N., Zenno, S., Ueda, R., Ohki-Hamazaki, H., Ui-Tei, K., and Saigo, K. (2003). Short-interfering-RNA-mediated gene silencing in mammalian cells requires Dicer and eIF2C translation initiation factors. *Curr Biol*, 13(1):41–6.
- [Dorfman et al., 1993] Dorfman, T., Luban, J., Goff, S. P., Haseltine, W. A., and Göttlinger, H. G. (1993). Mapping of functionally important residues of a cysteine-histidine box in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *J Virol*, 67(10):6159–69.
- [Dorling, 2002] Dorling, A. (2002). Clinical xenotransplantation: pigs might fly? *Am J Transplant*, 2(8):695–700.
- [Dowdle, 1997] Dowdle, W. (1997). Pandemic influenza: confronting a re-emergent threat. The 1976 experience. *J Infect Dis*, 176 Suppl 1:S69–72.
- [Drosten et al., 2003] Drosten, C., Günther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H.-R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R. A. M., Berger, A., Burguiere, A.-M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J.-C., Müller, S., Rickerts, V., Stürmer, M., Vieth, S., Klenk, H.-D., Osterhaus, A. D. M. E., Schmitz, H., and Doerr, H. W. (2003). Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 348(20):1967–76.
- [Duesberg and Vogt, 1970] Duesberg, P. and Vogt, P. (1970). Differences between the ribonucleic acids of transforming and nontransforming avian tumor viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 67(4):1673–80.

- [Duvivier-Kali et al., 2001] Duvivier-Kali, V., Omer, A., Parent, R., O'Neil, J., and Weir, G. (2001). Complete protection of islets against allorejection and autoimmunity by a simple barium-alginate membrane. *Diabetes*, 50(8):1698–705.
- [Edbauer and Naso, 1984] Edbauer, C. and Naso, R. (1984). Cytoskeleton-associated Pr65gag and assembly of retrovirus temperature-sensitive mutants in chronically infected cells. *Virology*, 134(2):389–97.
- [Eddy, 2001] Eddy, S. (2001). Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat Rev Genet*, 2(12):919–29.
- [Ehlers et al., 1999] Ehlers, B., Ulrich, S., and Goltz, M. (1999). Detection of two novel porcine herpesviruses with high similarity to gammaherpesviruses. *J of General Virology*, 80:971–978.
- [Elbashir et al., 2001a] Elbashir, S., 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(6836):494–8.
- [Elbashir et al., 2001b] Elbashir, S., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001b). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J*, 20(23):6877–88.
- [Elbashir et al., 2002] Elbashir, S. M., Harborth, J., Weber, K., and Tuschl, T. (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*, 26(2):199–213.
- [Elbashir et al., 2001c] Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001c). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 15(2):188–200.
- [Elliott et al., 2000] 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(6):895–901.
- [Ericsson et al., 2003] 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., Miyazawa, T., Salomon, D. R., Weiss, R. A., and Patience, C. (2003). Identification of receptors for pig endogenous retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(11):6759–64.

- [Far and Sczakiel, 2003] Far, R. K.-K. and Sczakiel, G. (2003). The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, 31(15):4417–24.
- [Farassati et al., 2001] Farassati, F., Yang, A., and Lee, P. (2001). Oncogenes in Ras signalling pathway dictate host-cell permissiveness to herpes simplex virus 1. *Nat Cell Biol*, 3(8):745–50.
- [Fiebig et al., 2003] 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(2):406–13.
- [Fink et al., 2000] Fink, J., Schumacher, J., Ellias, S., Palmer, E., Saint-Hilaire, M., Shannon, K., Penn, R., Starr, P., VanHorne, C., Kott, H., Dempsey, P., Fischman, A., Raineri, R., Manhart, C., Dinsmore, J., and Isacson, O. (2000). Porcine xenografts in Parkinson’s disease and Huntington’s disease patients: preliminary results. *Cell Transplant*, 9(2):273–278.
- [Fire et al., 1998] 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(6669):806–11.
- [Fischer et al., 2003] Fischer, N., Krach, U., Niebert, M., and Tönjes, R. R. (2003). Detection of porcine endogenous retrovirus (PERV) using highly specific antisera against Gag and Env. *Virology*, 311(1):222–8.
- [Fishman, 1997] Fishman, J. (1997). Xenosis and xenotransplantation: addressing the infectious risks posed by an emerging technology. *Kidney Int Suppl*, 58:S41–5.
- [Fujita et al., 2003] 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. *Hepatol Res*, 26(2):106–113.
- [Gao et al., 1999] Gao, F., Bailes, E., Robertson, D., Chen, Y., Rodenburg, C., Michael, S., Cummins, L., Arthur, L., Peeters, M., Shaw, G., Sharp, P., and Hahn, B. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*, 397(6718):436–441.

- [Gong and Rong, 2003] Gong, M. and Rong, Y. S. (2003). Targeting multi-cellular organisms. *Curr Opin Genet Dev*, 13(2):215–20.
- [Gorelick et al., 1988] Gorelick, R., Henderson, L., Hanser, J., and Rein, A. (1988). Point mutants of Moloney murine leukemia virus that fail to package viral RNA: evidence for specific RNA recognition by a β inc finger-likeprotein sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(22):8420–4.
- [Grimm et al., 2003] 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(4):362–9.
- [Hammond et al., 2001a] Hammond, S., Caudy, A., and Hannon, G. (2001a). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet*, 2(2):110–9.
- [Hammond et al., 2001b] Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R., and Hannon, G. J. (2001b). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, 293(5532):1146–50.
- [Hannon et al., 1991] Hannon, G., Chubb, A., Maroney, P., Hannon, G., Altman, S., and Nilsen, T. (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(34):22796–9.
- [Hannon, 2003] Hannon, G. J., editor (2003). *RNAi - A Guide to Gene Silencing*. John Inglis.
- [Hannon et al., 1990] Hannon, J., Bossone, C., and Wade, C. (1990). Normal physiological values for conscious pigs used in biomedical research. *Lab Anim Sci*, 40(3):293–8.
- [Haraguchi et al., 1995] Haraguchi, S., Good, R., and Day, N. (1995). Immunosuppressive retroviral peptides: cAMP and cytokine patterns. *Immunol Today*, 16(12):595–603.
- [He et al., 1997] He, J., Chen, Y., Farzan, M., Choe, H., Ohagen, A., Gartner, S., Busciglio, J., Yang, X., Hofmann, W., Newman, W., Mackay, C., Sodroski, J., and Gabuzda, D. (1997). CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature*, 385(6617):645–9.

- [Herring et al., 2001] Herring, C., Cunningham, D., Whittam, A., Fernandez-Suarez, X., and Langford, G. (2001). Monitoring xenotransplant recipients for infection by PERV. *Clin Biochem*, 34(1):23–27.
- [Hofmann et al., 2003] 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(11):1054–60.
- [Hofmann et al., 2004] Hofmann, A., Zakhartchenko, V., Weppert, M., Sebald, H., Wenigerkind, H., Brem, G., Wolf, E., and Pfeifer, A. (2004). Generation of Transgenic Cattle by Lentiviral Gene Transfer into Oocytes. *Biol Reprod*.
- [Holen et al., 2002] Holen, T., Amarzguioui, M., Wiiger, M. T., Babaie, E., and Prydz, H. (2002). Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res*, 30(8):1757–66.
- [Hope, 2001] Hope, I. (2001). Broadcast interference - functional genomics. *Trends Genet*, 17(6):297–9.
- [Hunter et al., 1975] Hunter, T., Hunt, T., Jackson, R., and Robertson, H. (1975). The characteristics of inhibition of protein synthesis by double-stranded ribonucleic acid in reticulocyte lysates. *J Biol Chem*, 250(2):409–17.
- [Hutvagner and Zamore, 2002] Hutvagner, G. and Zamore, P. D. (2002). RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev*, 12(2):225–32.
- [Irgang et al., 2002] Irgang, M., Sauer, I. M., Karlas, A., Zeilinger, K., Gerlach, J., Kurth, R., Neuhaus, P., and Denner, J. (2002). Porcine endogenous retroviruses (PERVs): No infection in patients treated with a bioreactor based on porcine liver cells.
- [Iwakuma et al., 1999] Iwakuma, T., Cui, Y., and Chang, L. (1999). Self-inactivating lentiviral vectors with U3 and U5 modifications. *Virology*, 261(1):120–32.
- [Jacque et al., 2002] Jacque, J. M., Triques, K., and Stevenson, M. (2002). Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature*, 418(6896):435–8.
- [Jensen et al., 1999a] Jensen, S., Gassama, M., and Heidmann, T. (1999a). Cosuppression of I transposon activity in *Drosophila* by I-containing sense and antisense transgenes. *Genetics*, 153(4):1767–74.

- [Jensen et al., 1999b] Jensen, S., Gassama, M., and Heidmann, T. (1999b). Taming of transposable elements by homology-dependent gene silencing. *Nat Genet*, 21(2):209–12.
- [Joo, 1989] Joo, H. S. (1989). Japan encephalitis virus. *Virus Infections of Porcines*, pages 131–136.
- [Jorgensen, 1990] Jorgensen, R. (1990). Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. *Trends Biotechnol*, 8(12):340–4.
- [Kalyanaraman et al., 1982] Kalyanaraman, V., Sarngadharan, M., Robert-Guroff, M., Miyoshi, I., Golde, D., and Gallo, R. (1982). A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science*, 218(4572):571–3.
- [Karlas et al., 2004] Karlas, A., Kurth, R., and Denner, J. (2004). Inhibition of porcine endogenous retroviruses by RNA interference: increasing the safety of xenotransplantation. *Virology*, 325(1):18–23.
- [Kawasaki and Taira, 2004] Kawasaki, H. and Taira, K. (2004). Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature*, 431(7005):211–7.
- [Kazazian, 2004] Kazazian, H. H. (2004). Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science*, 303(5664):1626–32.
- [Ketting et al., 1999] Ketting, R., Haverkamp, T., van Luenen, H., and Plasterk, R. (1999). Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell*, 99(2):133–41.
- [Khvorova et al., 2003] Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115(2):209–16.
- [Kim, 2001] Kim, S. (2001). Functional genomics: the worm scores a knockout. *Curr Biol*, 11(3):R85–7.
- [Kirschfink, 2002] Kirschfink, M. (2002). C1-inhibitor and transplantation. *Immunobiology*, 205(4-5):534–41.
- [Klein, 1988] Klein, G. (1988). Oncogenes and tumor suppressor genes. *Acta Oncol*, 27(4):427–37.

- [Krol et al., 2004] Krol, J., Sobczak, K., Wilczynska, U., Drath, M., Jasinska, A., Kaczynska, D., and Krzyzosiak, W. J. (2004). Structural features of microRNA precursors and their relevance to miRNA biogenesis and siRNA/shRNA design. *J Biol Chem*.
- [Kuramochi-Miyagawa et al., 2004] Kuramochi-Miyagawa, S., Kimura, T., Ijiri, T. W., Iso-be, T., Asada, N., Fujita, Y., Ikawa, M., Iwai, N., Okabe, M., Deng, W., Lin, H., Matsuda, Y., and Nakano, T. (2004). Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development*, 131(4):839–49.
- [Lagos-Quintana et al., 2001] Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543):853–8.
- [Lagos-Quintana et al., 2003] Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A., and Tuschl, T. (2003). New microRNAs from mouse and human. *RNA*, 9(2):175–9.
- [Lau et al., 2001] Lau, N., Lim, L., Weinstein, E., and Bartel, D. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543):858–62.
- [Lavitrano et al., 2002] Lavitrano, M., Bacci, M. L., Forni, M., Lazzereschi, D., Stefano, C. D., Fioretti, D., Giancotti, P., Marfe, G., Pucci, L., Renzi, L., Wang, H., Stoppacciaro, A., Stassi, G., Sargiacomo, M., Sinibaldi, P., Turchi, V., Giovannoni, R., Casa, G. D., Seren, E., and Rossi, G. (2002). Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- [Lavitrano et al., 2003] Lavitrano, M., Forni, M., Bacci, M. L., Stefano, C. D., Varzi, V., Wang, H., and Seren, E. (2003). Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake. *Mol Reprod Dev*, 64(3):284–91.
- [Lederman et al., 2002] Lederman, D. M., Kung, R. T. V., and McNair, D. S. (2002). Therapeutic potential of implantable replacement hearts. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2(5):297–301.
- [Lee et al., 2002] 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(11):5548–5556.

- [Leventhal et al., 1994] Leventhal, J., Sakiyalak, P., Witson, J., Simone, P., Matas, A., Bolman, R., and Dalmaso, A. (1994). The synergistic effect of combined antibody and complement depletion on discordant cardiac xenograft survival in nonhuman primates. *Transplantation*, 57(6):974–8.
- [Levy et al., 2000] Levy, M., Chrippin, J., Sutton, S., Netto, G., McCormack, J., Curiel, T., Goldstein, R., Newman, J., Gonwa, T., Banchereau, J., Diamond, L., Byrne, G., Logan, J., and Klintmalm, G. (2000). Liver Allotransplantation After Extracorporeal Hepatic Support with Transgenic (hCD55/hCD59) Porcine Livers. *Transplantation*, 69:272–280.
- [Liu et al., 2004] Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J.-J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G. J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 305(5689):1437–41.
- [Livak and Schmittgen, 2001] Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, 25(4):402–8.
- [Louis et al., 1997] Louis, N., Eveleigh, C., and Graham, F. L. (1997). Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology*, 233(2):423–9.
- [Makowka et al., 1994] Makowka, L., Wu, G. D., Hoffman, A., Podesta, L., Sher, L., Tusio, P. J., Breda, 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(3):1074–5.
- [Mang et al., 2001] Mang, R., Maas, J., Chen, X., Goudsmit, J., and van Der Kuyl, A. (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(Pt 8):1829–34.
- [Mani et al., 2003] Mani, V., Mathew, R., and Homer-Vanniasinkam, S. (2003). Xenotransplantation: animal rights and human wrongs. *Ethics Med*, 19(1):55–61.
- [Marcus, 1983] Marcus, P. (1983). Interferon induction by viruses: one molecule of dsRNA as the threshold for interferon induction. *Interferon*, 5:115–80.

- [Martin et al., 2000] Martin, U., Winkler, M., Id, M., Radeke, H., Arseniev, L., Takeuchi, Y., Simon, A., Patience, C., Haverich, A., and Steinhoff, G. (2000). Productive infection of primary human endothelial cells by pig endogenous retrovirus (PERV). *Xenotransplantation*, 7(2):138–142.
- [Matzke et al., 2001] Matzke, M., Matzke, A. J., and Kooter, J. M. (2001). RNA: guiding gene silencing. *Science*, 293(5532):1080–3.
- [Melo et al., 2001] Melo, H., Brandao, C., Rego, G., and Nunes, R. (2001). Ethical and legal issues in xenotransplantation. *Bioethics*, 15(5-6):427–42.
- [Meng et al., 1997] Meng, X., Purcell, R., Halbur, P., Lehman, J., Webb, D., Tsareva, T., Haynes, J., Thacker, B., and Emerson, S. (1997). A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci*, 94:9860–9865.
- [Mettenleiter, 1991] Mettenleiter, T. (1991). Molecular biology of pseudorabies (Aujeszky's disease) virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 14(2):151–63.
- [Michaels et al., 2001] Michaels, M., Jenkins, F., George, K. S., Nalesnik, M., Starzl, T., and Rinaldo, C. (2001). Detection of infectious baboon cytomegalovirus after baboon-to-human liver xenotransplantation. *J Virol*, 75(6):2825–8.
- [Miyagawa et al., 1994] Miyagawa, S., Shirakura, R., Iwata, K., Nakata, S., Matsumiya, G., Izutani, H., Matsuda, H., Terado, A., Matsumoto, M., and Nagasawa, S. (1994). Effects of transfected complement regulatory proteins, MCP, DAF, and MCP/DAE hybrid, on complement-mediated swine endothelial cell lysis. *Transplantation*, 58(7):834–40.
- [Miyoshi et al., 1998] Miyoshi, H., Blömer, U., Takahashi, M., Gage, F. H., and Verma, I. M. (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol*, 72(10):8150–7.
- [Modrow, 2003] Modrow, S.; Falke, D. (2003). *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag.
- [Morris et al., 2004] Morris, K. V., Chan, S. W.-L., Jacobsen, S. E., and Looney, D. J. (2004). Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science*, 305(5688):1289–92.

- [Morschheuser et al., 1997] Morschheuser, T., Steinhoff, G., Indzhia, L., Heiser, A., Hein, M., Lapin, B., and Haverich, A. (1997). Successful down-regulation of natural and xenoreactive antibodies in pig-to-baboon xenotransplantation by high-dose cyclophosphamide. *Transplant Proc*, 29(1-2):970–2.
- [Mueller, 1999] Mueller, U. (1999). Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech Dev*, 82(1-2):3–21.
- [Mullis et al., 1986] Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1:263–73.
- [Myslinski et al., 2001] Myslinski, E., Krol, J. A. A., and Carbon, P. (2001). An unusually compact external promoter for RNA polymerase III transcription of the human H1RNA gene. *Nucleic Acids Res*, 29(12):2502–9.
- [Ngo et al., 1998] Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K., and Ullu, E. (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(25):14687–92.
- [Nicholson and Nicholson, 2002] Nicholson, R. H. and Nicholson, A. W. (2002). Molecular characterization of a mouse cDNA encoding Dicer, a ribonuclease III ortholog involved in RNA interference. *Mamm Genome*, 13(2):67–73.
- [Novina et al., 2002] Novina, C. D., Murray, M. F., Dykxhoorn, D. M., Beresford, P. J., Riess, J., Lee, S. K., Collman, R. G., Lieberman, J., Shankar, P., and Sharp, P. A. (2002). siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med*, 8(7):681–6.
- [Nykänen et al., 2001] Nykänen, A., Haley, B., and Zamore, P. D. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, 107(3):309–21.
- [Oldmixon et al., 2002] 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(6):3045–8.

- [Paddison et al., 2002] 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(3):1443–8.
- [Parrish et al., 2000] Parrish, S., Fleenor, J., Xu, S., Mello, C., and Fire, A. (2000). Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol Cell*, 6(5):1077–87.
- [Patience et al., 2001] Patience, C., Switzer, W., Takeuchi, Y., Griffiths, D., Goward, M., Heneine, W., Stoye, J., and Weiss, R. (2001). Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species. *J Virol*, 75(6):2771–2775.
- [Patience et al., 1997] Patience, C., Takeuchi, Y., and Weiss, R. (1997). Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med*, 3(3):282–286.
- [Paul et al., 2002] 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(5):505–8.
- [Peracchi, 2004] Peracchi, A. (2004). Prospects for antiviral ribozymes and deoxyribozymes. *Rev Med Virol*, 14(1):47–64.
- [Phelps et al., 2003] 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., Jobst, P. M., Sharma, S. B., Lamborn, A. E., Garst, A. S., Moore, M., Demetris, A. J., Rudert, W. A., Bottino, R., Bertera, S., Trucco, M., Starzl, T. E., Dai, Y., and Ayares, D. L. (2003). Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science*, 299(5605):411–4.
- [Poiesz et al., 1980] Poiesz, B., Ruscetti, F., Gazdar, A., Bunn, P., Minna, J., and Gallo, R. (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(12):7415–9.
- [Qari et al., 2001] Qari, S., Magre, S., Garcia-Lerma, J., Hussain, A., Takeuchi, Y., Patience, C., Weiss, R., and Heneine, W. (2001). Susceptibility of the porcine endogenous retrovirus to reverse transcriptase and protease inhibitors. *J Virol*, 75(2):1048–1053.
- [Qiagen, 2003] Qiagen, editor (2003). *QIAexpressionist*. Qiagen.

- [Radhakrishnan et al., 2004] Radhakrishnan, S. K., Layden, T. J., and Gartel, A. L. (2004). RNA interference as a new strategy against viral hepatitis. *Virology*, 323(2):173–81.
- [Ravelingien et al., 2004] Ravelingien, A., Mortier, F., Mortier, E., Kerremans, I., and Braeckman, J. (2004). Proceeding with clinical trials of animal to human organ transplantation: a way out of the dilemma. *J Med Ethics*, 30(1):92–8.
- [Reemtsma et al., 1964] Reemtsma, K., McCracken, B., Schlegel, J., and Pearl, M. (1964). Heterotransplantation of the kidney: Two clinical experiences. *Science*, 143:700–2.
- [Regulier et al., 2004] Regulier, E. G., Reiss, K., Khalili, K., Amini, S., Rappaport, J., Zagury, J.-F., and Katsikis, P. D. (2004). T-cell and neuronal apoptosis in HIV infection: implications for therapeutic intervention. *Int Rev Immunol*, 23(1-2):25–59.
- [Rein, 1994] Rein, A. (1994). Retroviral RNA packaging: a review. *Arch Virol Suppl*, 9:513–22.
- [Reiser, 2000] Reiser, J. (2000). Production and concentration of pseudotyped HIV-1-based gene transfer vectors. *Gene Ther*, 7(11):910–3.
- [Reiser et al., 1996] Reiser, J., Harmison, G., Kluepfel-Stahl, S., Brady, R., Karlsson, S., and Schubert, M. (1996). Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(26):15266–71.
- [Reynolds et al., 2004] Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W. S., and Khvorova, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol*, 22(3):326–30.
- [Rhee and Hunter, 1990] Rhee, S. and Hunter, E. (1990). A single amino acid substitution within the matrix protein of a type D retrovirus converts its morphogenesis to that of a type C retrovirus. *Cell*, 63(1):77–86.
- [Robert-Koch-Institut, 2003] Robert-Koch-Institut (2003). Organtransplantation und Organspende. *Gesundheitsberichterstattung des Bundes; Heft 17*.
- [Rondon and Marasco, 1997] Rondon, I. and Marasco, W. (1997). Intracellular antibodies (intrabodies) for gene therapy of infectious diseases. *Annu Rev Microbiol*, 51:257–83.

- [Rosengard et al., 1995] Rosengard, A., Cary, N., Langford, G., Tucker, A., Wallwork, J., and White, D. (1995). Tissue expression of human complement inhibitor, decay-accelerating factor, in transgenic pigs. A potential approach for preventing xenograft rejection. *Transplantation*, 59(9):1325–33.
- [Rovira et al., 2002] 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(7):3232–9.
- [Rubinson et al., 2003] Rubinson, D. A., Dillon, C. P., Kwiatkowski, A. V., Sievers, C., Yang, L., Kopinja, J., Rooney, D. L., Ihrig, M. M., McManus, M. T., Gertler, F. B., Scott, M. L., and Parijs, L. V. (2003). A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet*, 33(3):401–6.
- [Sanger et al., 1977] Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12):5463–7.
- [Sasaki et al., 2003] Sasaki, T., Shiohama, A., Minoshima, S., and Shimizu, N. (2003). Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome small star, filled. *Genomics*, 82(3):323–30.
- [Sato et al., 1999] Sato, K., Takigami, K., Miyatake, T., Czismadia, E., Latinne, D., Bazin, H., Bach, F., and Soares, M. (1999). Suppression of delayed xenograft rejection by specific depletion of elicited antibodies of the IgM isotype. *Transplantation*, 68(6):844–54.
- [Sauer et al., 2003] Sauer, I., Kardassis, D., Zeillinger, K., Pascher, A., Gruenwald, A., Pless, G., Irgang, M., Kraemer, M., Puhl, G., Frank, J., Mller, A., Steinmller, T., Denner, J., Neuhaus, P., and Gerlach, J. (2003). Clinical extracorporeal hybrid liver support–phase I study with primary porcine liver cells. *Xenotransplantation*, 10(5):460–9.
- [Scherer and Rossi, 2003] Scherer, L. J. and Rossi, J. J. (2003). Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nat Biotechnol*, 21(12):1457–65.
- [Schmoeckel et al., 1997] 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(7):758–64.

- [Schön et al., 1999] Schön, 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(3):230–9.
- [Schumacher et al., 2000] Schumacher, J., Ellias, S., Palmer, E., Kott, H., Dinsmore, J., Dempsey, P., Fischman, A., Thomas, C., Feldman, R., Kassissieh, S., Raineri, R., Manhart, C., Penney, D., Fink, J., and Isacson, O. (2000). Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD. *Neurology*, 54(5):1042–1050.
- [Schwarz et al., 2003] Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115(2):199–208.
- [Schwarz and Zamore, 2002] Schwarz, D. S. and Zamore, P. D. (2002). Why do miRNAs live in the miRNP? *Genes Dev*, 16(9):1025–31.
- [Scobie et al., 2004] 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(5):2502–9.
- [Shah et al., 2003] Shah, C. A., Böni, J., Bisset, L. R., Seebach, J. D., and Schüpbach, J. (2003). Ultra-sensitive and specific detection of porcine endogenous retrovirus (PERV) using a sequence-capture real-time PCR approach. *J Virol Methods*, 109(2):209–16.
- [Sharp, 2001] Sharp, P. A. (2001). RNA interference–2001. *Genes Dev*, 15(5):485–90.
- [Shen et al., 1998] Shen, J., Chong, A., Xiao, F., Liu, W., Huang, W., Blinder, L., Foster, P., Sankary, H., Jensik, S., McChesney, L., Mital, D., and Williams, J. (1998). Histological characterization and pharmacological control of chronic rejection in xenogeneic and allogeneic heart transplantation. *Transplantation*, 66(6):692–8.
- [Sledz et al., 2003] Sledz, C. A., Holko, M., de Veer, M. J., Silverman, R. H., and Williams, B. R. G. (2003). Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol*, 5(9):834–9.
- [Smith et al., 1967] Smith, C., Simpson, D., Bowen, E., and Zlotnik, I. (1967). Fatal human disease from vervet monkeys. *Lancet*, 2(7526):1119–21.

- [Sommerfelt, 1999] Sommerfelt, M. (1999). Retrovirus receptors. *J Gen Virol*, 80 (Pt 12):3049–64.
- [Song et al., 2003] Song, J.-J., Liu, J., Tolia, N. H., Schneiderman, J., Smith, S. K., Martienssen, R. A., Hannon, G. J., and Joshua-Tor, L. (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol*, 10(12):1026–32.
- [Song et al., 2004] Song, J.-J., Smith, S. K., Hannon, G. J., and Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 305(5689):1434–7.
- [Specke et al., 2002a] 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(2):305–19.
- [Specke et al., 2001a] Specke, V., Rubant, S., and Denner, J. (2001a). Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses. *Virology*, 285(2):177–180. Jul 5.
- [Specke et al., 2002b] 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(2-4):281–8.
- [Specke et al., 2001b] Specke, V., Tacke, S., Boller, K., Schwendemann, J., and Denner, J. (2001b). Porcine endogenous retroviruses: in vitro host range and attempts to establish small animal models. *J Gen Virol*, 82(Pt 4):837–44.
- [Stephan et al., 2001] Stephan, O., Schwendemann, J., Specke, V., Tacke, 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(4):310–316.
- [Swindle, 1998] Swindle, M. (1998). Defining appropriate health status and management programs for specific-pathogen-free swine for xenotransplantation. *Ann N Y Acad Sci*, 862:111–20.

- [Sykes et al., 2003] Sykes, M., d'Apice, A., Sandrin, M., and Sandrin, M. (2003). Position paper of the Ethics Committee of the International Xenotransplantation Association. *Xenotransplantation*, 10(3):194–203.
- [Tacke et al., 2001] Tacke, S., 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(2):125–135. May.
- [Tacke et al., 2000] Tacke, S., Kurth, R., and Denner, J. (2000). Porcine endogenous retroviruses inhibit human immune cell function: risk for xenotransplantation? *Virology*, 268(1):87–93. Mar 1.
- [Tacke et al., 2003] Tacke, S., Specke, V., and Denner, J. (2003). Differences in release and determination of subtype of porcine endogenous retroviruses (PERV) produced by stimulated normal pig blood cells. *Intervirology*, 46:17–24.
- [Takeuchi et al., 1998] Takeuchi, Y., Patience, C., Magre, S., Weiss, R., Banerjee, P., Tissier, P. L., and Stoye, J. (1998). Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus. *J Virol*, 72(12):9986–9991.
- [Takeuchi et al., 1996] 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(6560):85–8.
- [Taubenberger et al., 1997] 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(5307):1793–6.
- [Tijsterman et al., 2002] Tijsterman, M., Ketting, R., Okihara, K. L., Sijen, T., and Plasterk, R. H. A. (2002). RNA helicase MUT-14-dependent gene silencing triggered in *C. elegans* by short antisense RNAs. *Science*, 295(5555):694–7.
- [Tissier et al., 1997] Tissier, P. L., Stoye, J., Takeuchi, Y., Patience, C., and Weiss, R. (1997). Two sets of human-tropic pig retrovirus. *Nature*, 389:681–682.

- [Todaro et al., 1974] Todaro, G., Benveniste, R., Lieber, M., and Sherr, C. (1974). Characterization of a Type C Virus Released from the Porcine Cell Line PK (15). *Virology*, 58:65–74.
- [Tucker et al., 2002] 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(3):191–202.
- [Ui-Tei et al., 2004] Ui-Tei, K., Naito, Y., Takahashi, F., Haraguchi, T., Ohki-Hamazaki, H., Juni, A., Ueda, R., and Saigo, K. (2004). Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res*, 32(3):936–48.
- [Ui-Tei et al., 2000] Ui-Tei, K., Zenno, S., Miyata, Y., and Saigo, K. (2000). Sensitive assay of RNA interference in *Drosophila* and Chinese hamster cultured cells using firefly luciferase gene as target. *FEBS Lett*, 479(3):79–82.
- [van der Laan et al., 2000] 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(6800):90–4.
- [Weil et al., 2002] Weil, D., Garcon, L., Harper, M., Dumenil, D., Dautry, F., and Kress, M. (2002). Targeting the kinesin Eg5 to monitor siRNA transfection in mammalian cells. *Biotechniques*, 33(6):1244–8.
- [Weingartl et al., 2004] 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(2):179–84.
- [Wells et al., 1991] Wells, D., Hopfensperger, D., Arden, N., Harmon, M., Davis, J., Tipple, M., and Schonberger, L. (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(4):478–81.
- [Wilson et al., 2000] Wilson, C., Wong, S., VanBrocklin, M., and Federspiel, M. (2000). Extended analysis of the in vitro tropism of porcine endogenous retrovirus. *J Virol*, 74(1):49–56.

- [Wilson et al., 1998] 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(4):3082–7.
- [Winkler et al., 2005] Winkler, M., Winkler, M., Burian, R., Hecker, J., Loss, M., Przemek, M., Lorenz, R., Patience, C., Karlas, A., Sommer, S., Denner, J., and Martin, U. (2005). Analysis of pig-to-human porcine endogenous retrovirus transmission in a triple-species kidney xenotransplantation model. *Transpl Int*.
- [Wiznerowicz and Trono, 2003] Wiznerowicz, M. and Trono, D. (2003). Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol*, 77(16):8957–61.
- [Wood et al., 2004] Wood, J. C., Quinn, G., Suling, K. M., Oldmixon, B. A., Tine, B. A. V., Cina, R., Arn, S., Huang, C. A., Scobie, L., Onions, D. E., Sachs, D. H., Schuurman, H.-J., Fishman, J. A., and Patience, C. (2004). Identification of exogenous forms of human-tropic porcine endogenous retrovirus in miniature Swine. *J Virol*, 78(5):2494–501.
- [Woods et al., 1973] Woods, W., Papas, T., Hirumi, H., and Chirigos, M. (1973). Antigenic and Biochemical Characterization of the C-type Particle of the Stable Porcine Kidney Cell Line PK-15. *J of Virology*, 12:1184–1186.
- [Yang et al., 2001] 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(22):7807–16.
- [Yang et al., 2004] 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(5):695–700.
- [Yoshioka et al., 1995] Yoshioka, M., Bradley, W., Shapshak, P., Nagano, I., Stewart, R., Xin, K., Srivastava, A., and Nakamura, S. (1995). Role of immune activation and cytokine expression in HIV-1-associated neurologic diseases. *Adv Neuroimmunol*, 5(3):335–58.
- [Young, 2002] Young, H. H. (2002). The early diagnosis and radical cure of carcinoma of the prostate. Being a study of 40 cases and presentation of a radical operation which was carried out in four cases. 1905. *J Urol*, 168(3):914–21.

- [Yu et al., 2002] Yu, J. Y., DeRuiter, S. L., and Turner, D. L. (2002). RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(9):6047–52.
- [Zamore et al., 2000] Zamore, P., Tuschl, T., Sharp, P., and Bartel, D. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101(1):25–33.
- [Zeng and Cullen, 2002] Zeng, Y. and Cullen, B. R. (2002). RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *RNA*, 8(7):855–60.
- [Zhao et al., 2001] Zhao, Z., Cao, Y., Li, M., and Meng, A. (2001). Double-stranded RNA injection produces nonspecific defects in zebrafish. *Dev Biol*, 229(1):215–23.
- [Zirm, 1989] Zirm, E. (1989). Eine erfolgreiche totale Keratoplastik (A successful total keratoplasty). 1906. *Refract Corneal Surg*, 5(4):258–61.
- [Zou et al., 1998] Zou, C., Zhang, Z., Wu, S., and Osterman, J. (1998). Molecular cloning and characterization of a rabbit eIF2C protein. *Gene*, 211(2):187–94.
- [Zuber et al., 2000] Zuber, J., Tchernitsa, O., Hinzmann, B., Schmitz, A., Grips, M., Hellriegel, M., Sers, C., Rosenthal, A., and Schafer, R. (2000). A genome-wide survey of RAS transformation targets. *Nat Genet*, 24(2):144–152.
- [Zufferey et al., 1998] Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., and Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol*, 72(12):9873–80.

Anhang

DNA-Oligonukleotide

Oligonukleotide für die Polymerasekettenreaktion

Name	Oligonukleotidsequenz in 5'-3'-Orientierung
EGPP_TOPO_up	CACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
EGPP_TOPO_down	ACTTTTCTTGTACAGCTCGTCCAT
Gag1 up	TCCAGGGCTCATAATTTGTC
Gag1 down	TGATGGCCATCCAACATCGA
Gag2 up	ACCGCTGCGCACCTATGGCCCT
Gag2 down	AAATTCTTCTCTTGCCGTCTATCA
Gp70 up	ATGCATCCCACGTTAAGCC
Gp70 down	CTCTTTTTGGTCGGTTATACCGAT
H1_up	GTGTCACTAGGCGGGAACAC
H1_SanD_Lup	TTTAAGGGACCCGAATTCGAACGCTGACGTC
LTR_up	TCTTGGTGACAACATGTCTC
LTR_down	AGTGTGGAGTCGGGACAGCT
p27Gag_Hind III_down	TTTAAGCTTAAATTCTTCTCTTGCCGTCTATCA
p27Gag_Sac Lup	ATTTAAAAGGAGCTCCCGCTGCGCACCTATGGCCCT
PERV-LTR-R_Spe I	AATTACTAGTGCGTGGTGTACGACTGTGGG
PERV-3'-LTR-Kpn I_down	TCTCGGTACCGATGCAAACAGCAAGAGGAT
PERV-gp70-blunt_down	TCTTTTTGGCCGATTATATCT
pig_centromer_up	TAGCCATGCTGCATGTAATGC
pig_centromer_down	GGAGCGTGGCCCAAT

Name	Oligonukleotidsequenz in 5'-3'-Orientierung
M13_down	CAGGAAACAGCTATGAC
PK-1	TTGACTTGGGAGTGGGACGGGTAAC
PK-6	GAGGGTCACCTGAGGGTGTGGAT
Pol1 up	GCTACAACCATTAGGAAAATAAAAG
Pol1 down	GAGGGTCACCTGAGGGTGTGGAT
Pol2_up	ACCCTTTATGTGGATGAGCG
Pol2_down	CGTTGGTCATCCATCGGTCT
Pol3-4-5_up	TCAGGATGGGTAGAGGCTTA
Pol3-4-5_down	GTAAGGGTCTCTTTAATGG
pQE	CGGATAACAATTTACACAG
pQE-rev	CATTACTGGATCTATCAACAGG
SA down	ATGGAGGCGAAGCTTAAGGGGA
SD up	TGCTGTTTGCATCAAGACCGC
SD down	ACAGACACTCAGAACAGAGAC

Tabelle 5.1: **Verwendete Oligonukleotide.** Alle Sequenzen sind in 5'-3'-Orientierung angegeben.

Oligonukleotide für die Sequenzierung des PERV-Moleklarklons

Name	Oligonukleotidsequenz in 5'-3'-Orientierung
T7_forward	TAATACGACTCACTATAGGG
SD_up	TCTGTTTGCATCAAGACCGC
PK-29	ATCAGCAGACGTGCTAGGAGGATC
gag-1	TCAGGGCTCATAATTTGTC
SEQ1956	TGAAGGGAAAAGCAATACGG
PK-1	TTGACTTGGGAGTGGGACGGGTAAC
pol_up	TCAGGATGGGTAGAGGCTTA
SA_up	ATATTGGATAGCTCTCCTGC
envA_for	TTGAAAGATTGGCAACAGCG
SEQ-2	CACTAGCCAACCACTTTTTG
SEQ-3	GACAGCAGGTATGCCTTTG
SEQ-4	CTGGATTAACCCCTTGTGTT
Stop-außen_up	GATGCCTTTTCTGCCTGAG
PERV-B-pol3_up	AGATACATCGTCTCACCCAC
gag-real_down	TGATGGCCATCCAACATCGA
gag1_down	TAATGTCGCGATCTCGTCTG
gag4-MluI_down	ATAACGCGTCAATCATCCCAAGTAGGCTG
gag2-MluI_down	ATAACGCGTTACGTCTTTCCTCCCTTTCC
PK-6	GAGGGTCACCTGAGGGTGTTGGAT
pol_down	GTAAGGGTCTCTTTAATGG
SA_down	ATGGAGGCGAAGCTTAAGGGGA
gp70-blunt_down	TCTTTTTTGGCCGATTATATCT
gp70-mid-PstI_up	CCCAACTGCAGTGAGTTTCTATTCTGAGGCG
PK-28-SpeI	AAATATACTAGTCCACGCAGGGGTAGAGGACTGCGG
LTR26	ACGCACAAGACAAAGACACACGAA
envA_down	AGTGATGTTAGGCTCAGTGG
stop-innen_down	GAGGTATAGCAGGTCCCTTCC
stop-außen_down	GCAGGATTTCTTCCCATCT

Oligonukleotide für die Mutagenese-PCR des PERV-Moleklarklons (eingefügte Mutation in Großbuchstaben)

Name	Oligonukleotidsequenz in 5'-3'-Orientierung
Stop-außen_up	gatgccttttctgcctgag
Stop-antisense	cagacaattccagcagtagtgccttcgtgcctC taagcagtctgtttggtggctcccgccagaagcag
Stop-sense	ctgcttctggcgggagccaccaaacaggactgcttaG aaggcacgaaggcactactgctggaattgtctg
Stop-außen_down	gcaggatttccttcccatct

Oligonukleotide für die Klonierung der pol2-shRNA-Expressionskassette (Target-Region in Großbuchstaben)

Name	Oligonukleotidsequenz in 5'-3'-Orientierung
pSuper-pol2-sense	gatccccGGACGCTGACAAATTGACTttcaagaga AGTCAATTTGTCAGCGTCCtttttgaaa
pSuper-pol2-antisense	agcttttccaaaaGGACGCTGACAAATTGACT tctctgaaAGTCAATTTGTCAGCGTCCggg

Sequenzen der eingesetzten siRNAs

siRNA	Zielsequenz	Position [†]	Homologie zu [±]		
			A	B	C
Gag1	5'-AACATTCGATGTTGGATGGCC-3'	1285	- [‡]	+	- [‡]
Gag2	5'-AATGAGATTGACATGGGATTT-3'	2027	-	+	+
Pol1	5'-AAGCCTGGGACCAATGATTAT-3'	3389	-	+	-
Pol2	5'-AAGGACGCTGACAAATTGACT-3'	4343	+	+	+
Pol3	5'-AATGCTAATCCTTCCAGAATA-3'	5381	+	+	- [⊗]
Pol4	5'-AAGATATTGGGGATTGATTGG-3'	5675	+	+	+
Pol5	5'-AAAGCTCAGGACAGGTAGAGA-3'	5721	+	+	+
Env1	5'-AACCTAGTCCGTAGTTATGGG-3'	6498	-	+	-
Env2	5'-AATGTGACCAAAGAGCATAGA-3'	7218	-	+	-
Kontroll-siRNA	5'-AATTCTCCGAACGTGTCACGT-3'	-	-	-	-

Tabelle 5.2: **Verwendete siRNA Sequenzen.** Alle siRNAs wurden entsprechend der publizierten Sequenz von PERV Subtyp B (Genbank AJ133816) ausgewählt. [†]Die Position der jeweiligen siRNA-Bindungsstelle bezüglich PERV Subtyp B (Genbank AJ133816). [±]Manche siRNAs weisen zudem eine vollständige Sequenzhomologie zu PERV Subtyp A (NCBI AJ293656) und C (NCBI AF038600) auf (gekennzeichnet mit '+'). [‡]Lediglich das erste Nukleotid (5'-Ende) der Zielsequenz ist nicht homolog zu der siRNA. [⊗]Lediglich das letzte Nukleotid (3'-Ende) der Zielsequenz ist nicht homolog zu der siRNA.

Plasmidkarten

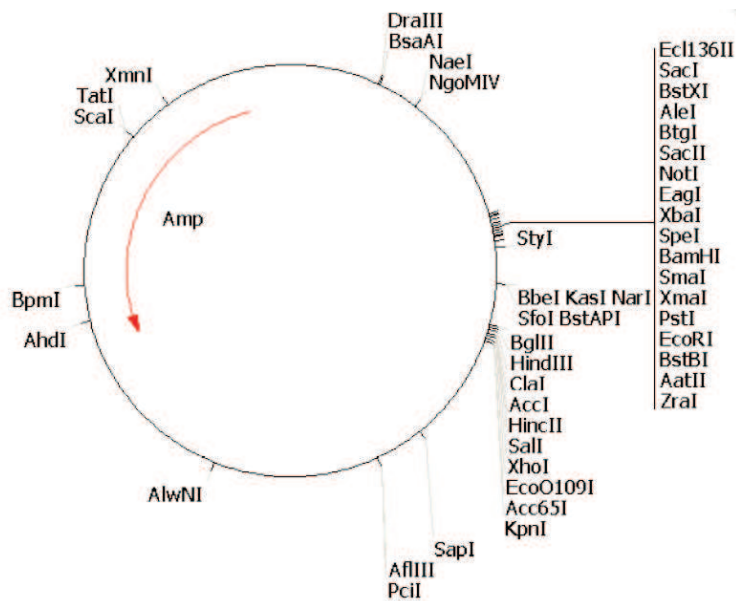


Abbildung 5.1: pSuper (Oligoengine, Seattle, WA, USA)

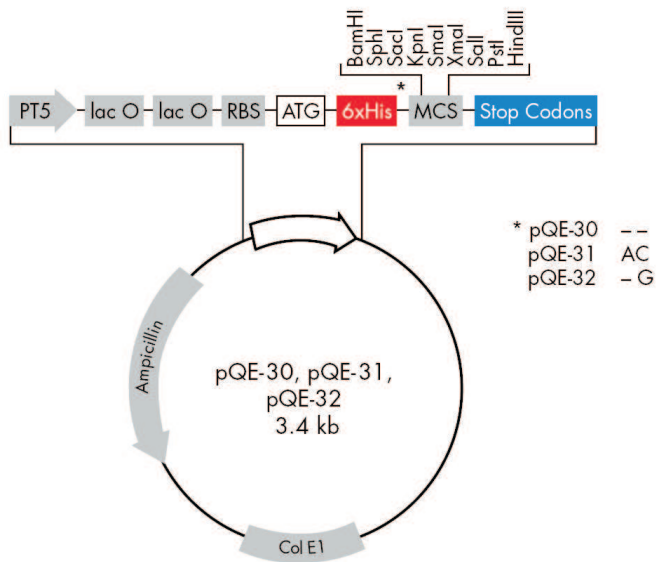


Abbildung 5.2: pQE30 (Qiagen, Hilden, Deutschland)

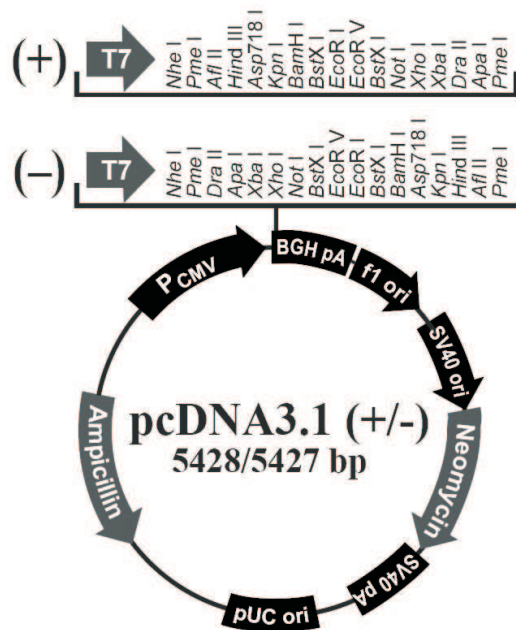


Abbildung 5.3: pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

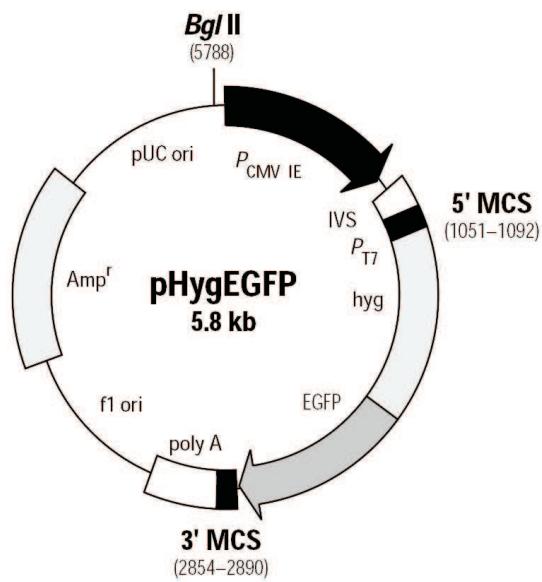


Abbildung 5.4: pHygEGFP (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA)

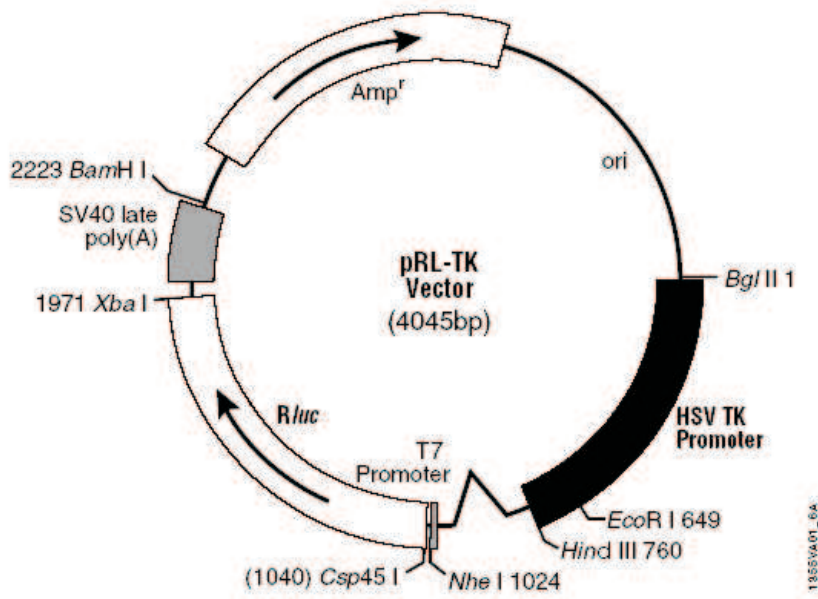


Abbildung 5.5: pRL-TK (Promega, Madison, WI, USA)

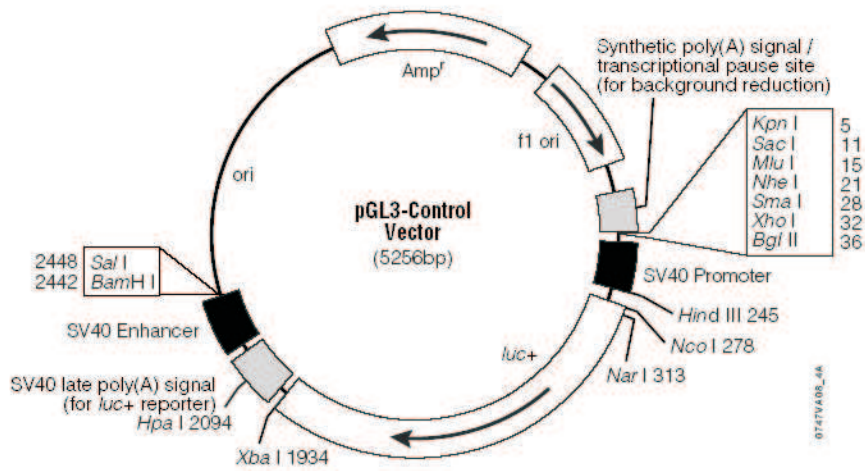


Abbildung 5.6: pGL3-control (Promega, Madison, WI, USA)

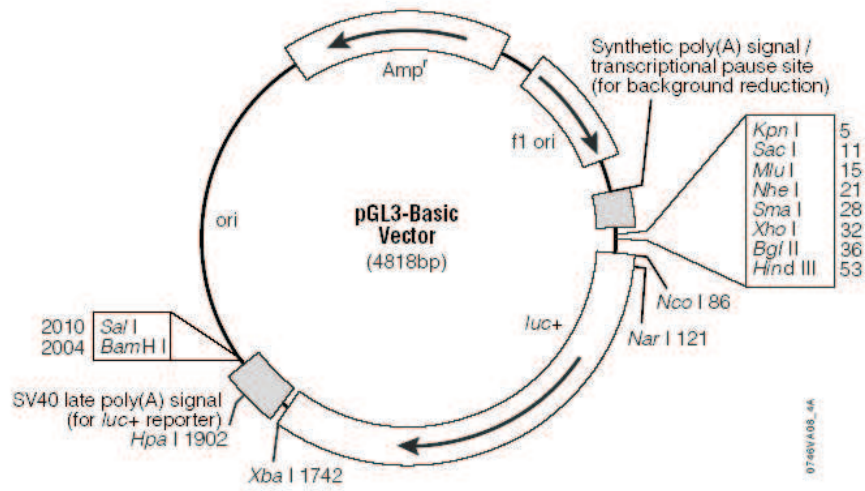


Abbildung 5.7: pGL3-basic (Promega, Madison, WI, USA)

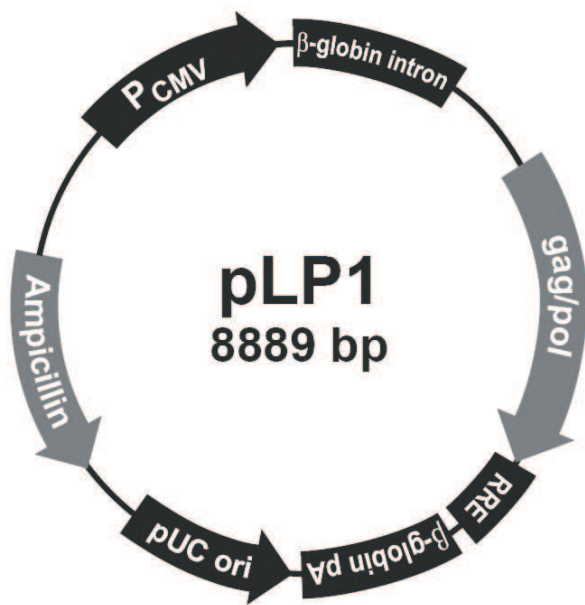


Abbildung 5.8: pLP1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

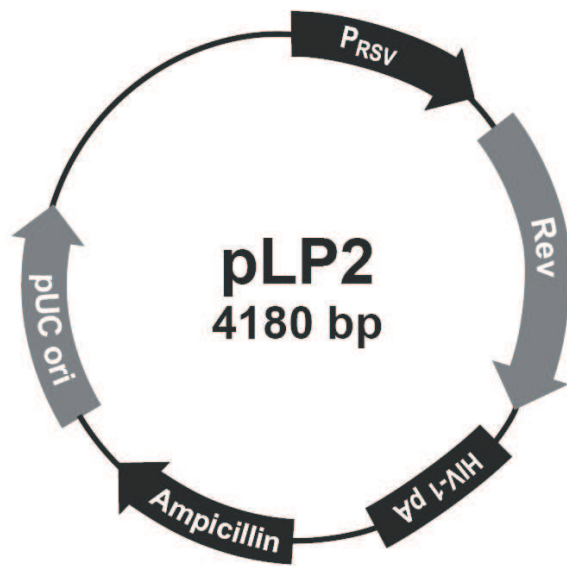


Abbildung 5.9: pLP2 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

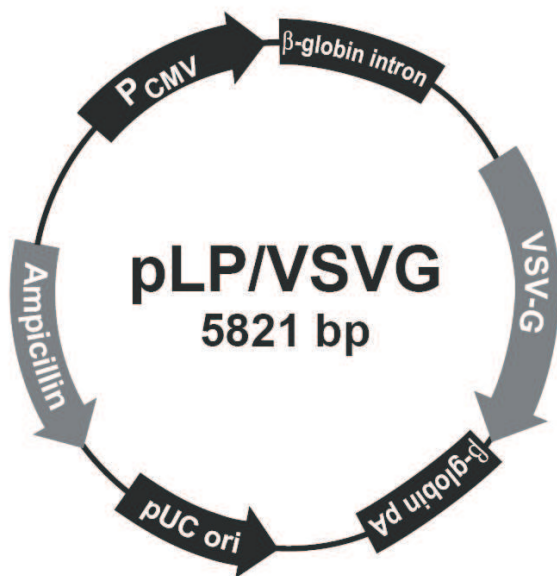


Abbildung 5.10: pLP-VSV-G (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

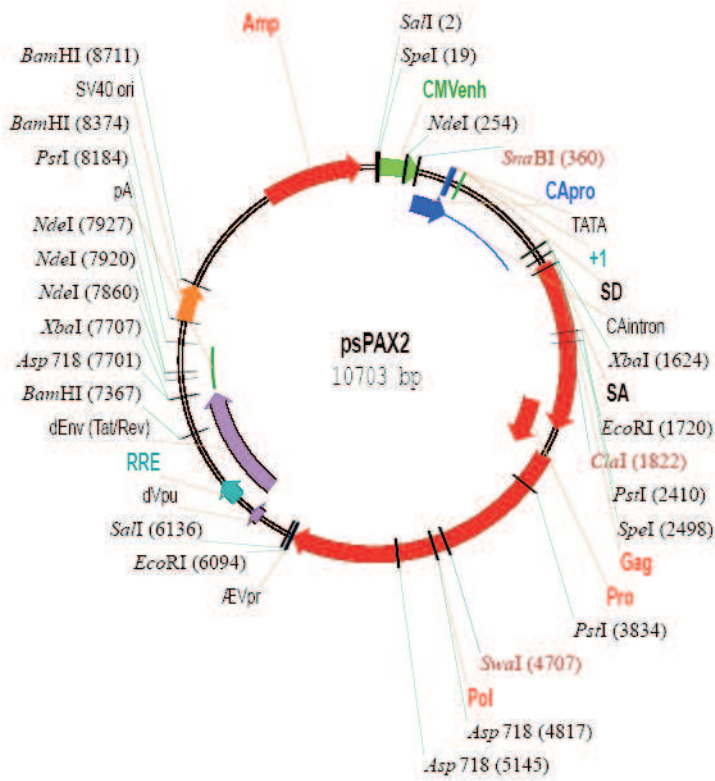


Abbildung 5.11: psPAX2 (Prof. D. Trono, Universität Genf, Schweiz)

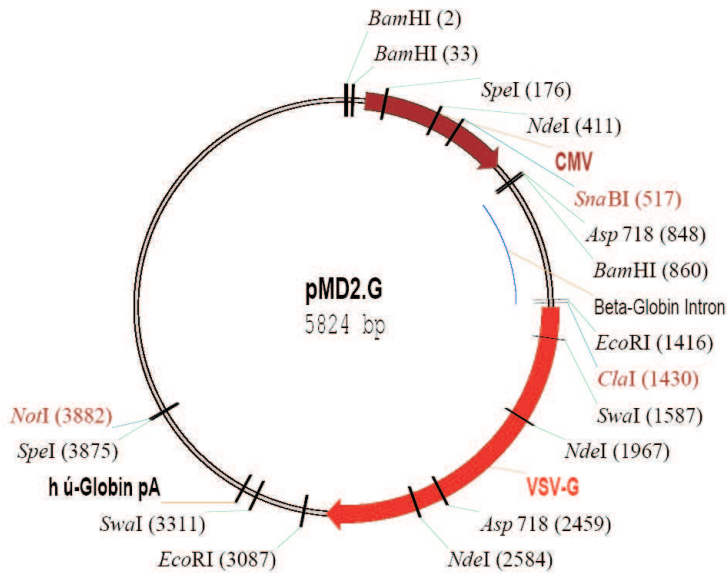


Abbildung 5.12: pMD2G (Prof. D. Trono, Universität Genf, Schweiz)

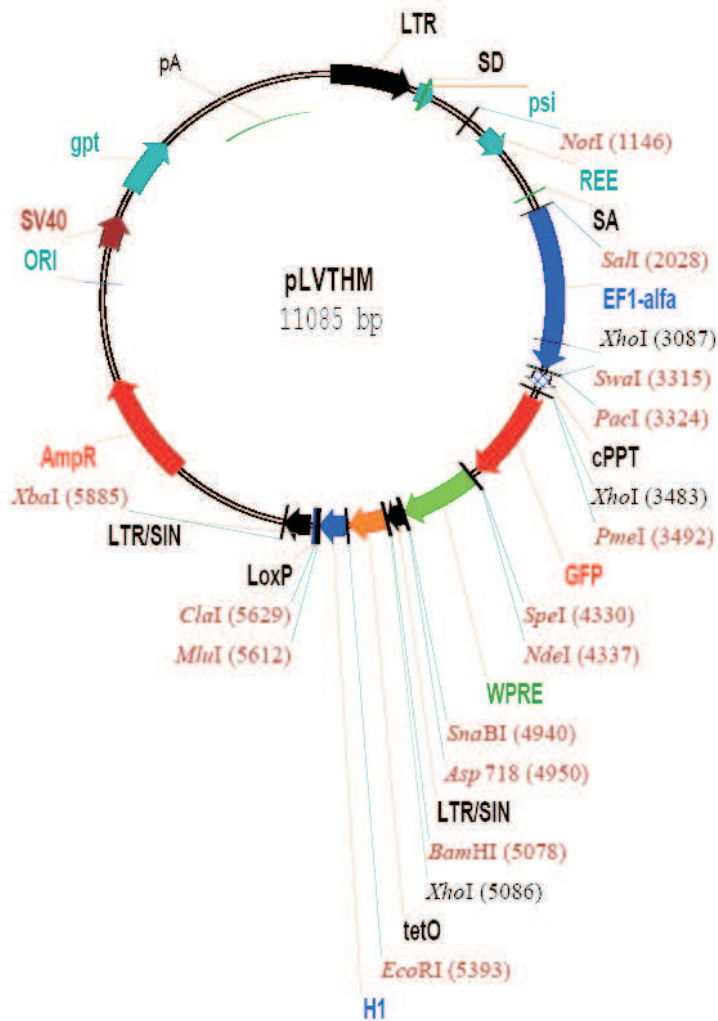


Abbildung 5.13: pLVTHM (Prof. D. Trono, Universität Genf, Schweiz)

Die schematische Übersicht der eingesetzten Plasmide wurden von den jeweiligen Herstellern bezogen.

Nukleinsäuresequenz des PERV-A/C-Molekularklons

	-----Majority-----									
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1	-----PERV_CMV.seq-----									
1	-----PERV_MSL.SEQ-----									
1	CCCGAATTACAGACCCCTGCTGGCTGCCAGTAAATAGGTAGAAAGGTCACACTTCTATTGTTCCAGGGCCCTGCTATCTGGCCTAAGTAAGATAACAGGAA									
	-----Majority-----									
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
1	-----PERV_CMV.seq-----									
1	-----PERV_MSL.SEQ-----									
101	ATGAGTTGACTAATCGCTTATCTGGATTCTGTAAAAGTACTGGCACCATAGAAAGAAATGATTACACATGACAGCCCTAGTGACCTATCTCAACTGCCAA									
	-----Majority-----									
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
1	-----PERV_CMV.seq-----									
1	-----PERV_MSL.SEQ-----									
201	TCGTGCTACTCTGCCAGGAGCCACGCAGATGCGGACCTCCGGAGCTATTTTAAAATGATTGGTCCACGGAGCGGGGCTCTCGATATTTTAAAATGATT									
	-----Majority-----									
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
1	-----PERV_CMV.seq-----									
1	-----PERV_MSL.SEQ-----									
301	GGTCCATGGAGCGGGGCTCTCGATATTTTAAAATGATTGGTTTGTGACGCACAGGCTTTGTTGTAACCCATAAAAAGCTGTCCGATCCGCACTCGG									
	-----Majority-----									
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
1	-----PERV_CMV.seq-----									
1	-----PERV_MSL.SEQ-----									
401	GGCGCCGCGAGTCCCTCTACCCCT.....T..									
	-----Majority-----									
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
78	-----PERV_CMV.seq-----									
78	-----PERV_MSL.SEQ-----									
501T.....T.....C.....C.....CGAGGGG.A..GTTC...A...C...T.....T.CA.T.G.....AA.CCT...A....									
	-----Majority-----									
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
169	-----PERV_CMV.seq-----									
169	-----PERV_MSL.SEQ-----									
600	...T.....G-.....C.....GG.....G..TG...--.....G..									
	-----Majority-----									
	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
269	-----PERV_CMV.seq-----									
269	-----PERV_MSL.SEQ-----									
697	.A.....G.....G.....TG.....									
	-----Majority-----									
	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
369	-----PERV_CMV.seq-----									
369	-----PERV_MSL.SEQ-----									
797G.....									

	GGCCGTCGGACTCTTTTGCCTGCTTGTGGAAGACGCGGACGGGTCCGCTGTGTCTGGATCTGTGGTTTCIGTTTTGTGTGTCTTTGCTTTGTCGCTCT										Majority
	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	
469										PERV_CMV.seq
469	.A.....T.....A.....T.....										PERV_MSL.SEQ
897C.....										PERV_A.seq
	TGCTACAGTTTTAATAATGGGACAGACGGTGACGACCCCTCTTAGTTGACTCTCGACCAITGGACTGAAGTTAAATCCAGGGCTCATAATTGTCAGTT										Majority
	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100	
569										PERV_CMV.seq
569										PERV_MSL.SEQ
997A.....T.....C.....G.....										PERV_A.seq
	CAGGTTAAGAAGGGACCTTGGCAGACTTCTGTGTCTCTGAATGGCCGACATTCGATGTTGGATGGCCATCAGAGGGACCTTTAATTCTGAGATTATCC										Majority
	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200	
669										PERV_CMV.seq
669										PERV_MSL.SEQ
1097C.....A.....A.....										PERV_A.seq
	TGGCTGTTAAGCAATTATTTTCAGACTGGACCCGGCTCTCATCCCGATCAGGAGCCCTATATCCTTACGTGGCAAGATTGGCAGAGGATCTCCGCC										Majority
	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	
769A.....										PERV_CMV.seq
769G.....										PERV_MSL.SEQ
1197G.....C.....T.....A.....										PERV_A.seq
	ATGGGTAAACCATGGCTGAATAAGCCAAAGAAAGCCAGGTCGCCGAATTCGGCTCTGGAGAGAAAAACAACACTCGGCTGAAAAAGTCAAGCCCTCT										Majority
	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	
869T.....										PERV_CMV.seq
869										PERV_MSL.SEQ
1297A.....A.....C.....C.....G.....										PERV_A.seq
	CCTCATACTACCCCGAGATTGAGGACCCGGCTTGGCCGGAACCCCAATCTGTTCCCCACCCCTTATCTGGCACAGGGTGTGCGAGGGGACCT										Majority
	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	
969										PERV_CMV.seq
969A.....C.....										PERV_MSL.SEQ
1397G.....C.....A.....C.....CA.....T.....										PERV_A.seq
	CTGCCCTCCTGGAGCTCCGGCGTGGAGGGACCTGCTGCAGGACTCGGAGCGGAGGGGGCCACCCCGAGCGGACAGACGATCGCGACATTACC										Majority
	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600	
1069										PERV_CMV.seq
1069	T.....										PERV_MSL.SEQ
1497T.....C.....A.....T.....										PERV_A.seq
	GCTGCGCAGTACGGCCCTCCACACCCGGGGCCAAATTGCAGCCCTCCAGTATTGGCCCTTTTCTTCTGCAGATCTCTATAATTGGAAAATAACCAT										Majority
	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690	1700	
1169										PERV_CMV.seq
1169										PERV_MSL.SEQ
1597C..T.....TG..A.....										PERV_A.seq
	CCCCCTTTCTCGGAGGATCCCCAACGCCCTCAGGGGTTGGTGGAGTCCCTTATGTTCTCTCACCAGCCTACTTGGGATGATTGCAACAGCTGCTGCAGA										Majority
	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800	
1269										PERV_CMV.seq
1269										PERV_MSL.SEQ
1697										PERV_A.seq

	CACTCTTCACAACCGAGGAGCGGAGAGAGAATTCTGTAGAGGCTAGAAAAAATGTTCC2TGGGGCCGACGGGCGACCCACGCAGTTGCAAAATGAGATTGA Majority									
	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900
1369 PERV_CMV.seq									
1369A.....G..... PERV_MSL.SEQ									
1797 PERV_A.seq									
	CATGGGATTTCCCTTGACTCGCCCGGTGGGACTACAACACGGCTGAAGTAGGAGAGCTTGAAAATCTATCGCCAGGCTCTGGTGGCGGGTCTCCGG Majority									
	1910	1920	1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000
1469 PERV_CMV.seq									
1469A..... PERV_MSL.SEQ									
1897 PERV_A.seq									
	GGCGCCTCAAGACGGCCCACTAATTTGGCTAAGGTAAGAGAAGTGATGCAGGGACCGAATGAACCCCTCTGTTTTCTTTGAGAGGCTCTTGGGAAGCCT Majority									
	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070	2080	2090	2100
1569C.....T..... PERV_CMV.seq									
1569 PERV_MSL.SEQ									
1997G.....C.....T.....G..A.....A..... PERV_A.seq									
	TCAGGCGGTACACCCCTTTTGTATCCCACTCAGAGGCCAAAAGCCCTCAGTGGCTTTGGCTTTATAGGACAGTCAGCCTTGGATATTAGAAAGAAGCT Majority									
	2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200
1669 PERV_CMV.seq									
1669 PERV_MSL.SEQ									
2097T.....T.....G.....CC.....C..T..G....G..TC.....C..G.....A.. PERV_A.seq									
	TCAGAGACTTGAAGGGTTACAGGAGGCTGAGTTACGTGATCTAGTGAAGGAGGCAGAGAAGTATATTACAAAAGGAGACAGAAGAAGAAAGGGAACAA Majority									
	2210	2220	2230	2240	2250	2260	2270	2280	2290	2300
1769 PERV_CMV.seq									
1769 PERV_MSL.SEQ									
2197GA.....G..G.....G.....G..G.A.....G PERV_A.seq									
	AGAAAAGAGAGAGAAGAGAGGAAAGCGGAGGAAAGACGTAATAAACCGCAAGAGAAGAATTTGACTAAGATCTTGGCTGCAGTGGTTGAAGGGAAAAGCA Majority									
	2310	2320	2330	2340	2350	2360	2370	2380	2390	2400
1869 PERV_CMV.seq									
1869 PERV_MSL.SEQ									
2297A.AG..G....A.....G...G.....C.....G.... PERV_A.seq									
	ATACGGAAAGAGAGAGATTTTAGGAAAATTAGTTCAGGCCCTAGACAGTCAGGGAACCTGGGCAATAGGACCCCACTCGACAAGGACCAATGTGCATA Majority									
	2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470	2480	2490	2500
1969 PERV_CMV.seq									
1969 PERV_MSL.SEQ									
2397	GC.GA..G.....G.....G.... PERV_A.seq									
	TTGTAAGAAAAGGACACTGGGCAAGGAACTGCCCAAGAAGGGAAACAAAGGACCGAAGGTCTAGCTCTAGAGAAGATAAAGATTAGGGGAGACGG Majority									
	2510	2520	2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590	2600
2069T.....T.....C.....A..... PERV_CMV.seq									
2069G.....A.G.A..... PERV_MSL.SEQ									
2497 PERV_A.seq									
	GGTTCGGACCCCTCCCGAGCCAGGGTAACTTTGAAGGTGGAGGGCAACCAGTTGAGTTCTGGTTGATACCGGAGCGAAACATTAGTCTACTACTAC Majority									
	2610	2620	2630	2640	2650	2660	2670	2680	2690	2700
2169 PERV_CMV.seq									
2169 PERV_MSL.SEQ									
2597G.G.....G.... PERV_A.seq									

	<u>AGCCATTAGGAAAACATAAAAGATAAAAAATCCTGGGTGATGGGTGCCACAGGGCAACAACAGTATCCATGGACTACCCGAAGAACAGTTGACTTGGGAGT</u> Majority									
	2710	2720	2730	2740	2750	2760	2770	2780	2790	2800
2269									
2269									
2697	.A.....A.....GG.....C.....									
	<u>GGGACGGGTAACCCACTCGTTTCTGGTCATACCTGAGTGCCAGCACCCCTCTTAGGTAGAGACTTATTGACCAAGATGGGAGCACAAATTTCTTTTGA</u> Majority									
	2810	2820	2830	2840	2850	2860	2870	2880	2890	2900
2369C.....									
2369									
2797C.....T.....TC.....C.....T.....									
	<u>CAAGGGAACCCAGAAGTGTCTGCAAATAACAAACCTATCACTGTGTGACCCCTCCAATTAGATGACGAATATCGACTATACTCTCCCCTAGTAAAGCCTG</u> Majority									
	2910	2920	2930	2940	2950	2960	2970	2980	2990	3000
2469									
2469									
2897	.A.G.....TG.....C.....T.....T.....A.....									
	<u>ATCAAATATACAATTCTGGTTGGAACAGTTTCCCAAGCCTGGGCAGAAACCCAGGGATGGGTTTGGCAAAGCAAGTTCCCCACAAGTTATTCAACT</u> Majority									
	3010	3020	3030	3040	3050	3060	3070	3080	3090	3100
2569									
2569									
2997	.G.....G.C.....G.....G.....G.....T.....T.....G.....									
	<u>GAAGGCCAGTGCCACACCAGTGTCTAGTCAGACAGTACCCCTTGAGTAAAGAAGCTCAAGAAGGAATTCGGCCGCATGTCCAAGATTAATCCAACAGGGC</u> Majority									
	3110	3120	3130	3140	3150	3160	3170	3180	3190	3200
2669									
2669									
3097T.....A.....G...G...G.....T.....T.....									
	<u>ATCTAGTTCCTGTCCAATCTCCCTGGAATACTCCCTGCTACCCGTTAGAAAGCCTGGGACTAATGACTATCGACCAGTACAGGACTTGAGAGAGGTCA</u> Majority									
	3210	3220	3230	3240	3250	3260	3270	3280	3290	3300
2769									
2769									
3197C..T.....G.....C...T.....									
	<u>ATAAAGGGTGCAGGATATACACCCCAACAGTCCCGAACCTTATAACCTCTTGTGTCTCTCCACCCCAACGGAGCTGGTATACAGTATTGGACTTAA</u> Majority									
	3310	3320	3330	3340	3350	3360	3370	3380	3390	3400
2869									
2869									
3297	.A.....C.....G.....A.C..C...G..TG...A.....C.....									
	<u>GGATGCCTTCTTCTGCCTGAGATTACACCCCACTAGCCAACCACTTTTTCCTTCGAATGGAGAGATCCAGGTACGGGAAGAACCAGGGCAGCTCACCTGG</u> Majority									
	3410	3420	3430	3440	3450	3460	3470	3480	3490	3500
2969T.....									
2969									
3397	A.....									
	<u>ACCCGACTGCCCAAGGGTTCAAGAACTCCCGACCATCTTTGACGAAGCCCTACACAGAGACCTGGCCAACTTCAGGATCCAACACCCCTCAGGTGACCC</u> Majority									
	3510	3520	3530	3540	3550	3560	3570	3580	3590	3600
3069									
3069									
3497G.....									

	<u>TCCTCCAGTACGTGGATGACCTGCTTCTGGCGGGAGCCACCAAAACAGGACTGCTTAGAAGGCACGAAGGCCTACTGCTGGAATTGCTGACCTAGGCTA</u> Majority									
	3610	3620	3630	3640	3650	3660	3670	3680	3690	3700
3169T.....									
3169									
3597T.....									
	<u>CAGAGCCTCTGCTAAGAAGGCCAGATTIGCAGGAGAGGTAACATACTTGGGGTACAGTTTTCGGGACGGGCACCGATGGCTGACGGAGGCACCGAAG</u> Majority									
	3710	3720	3730	3740	3750	3760	3770	3780	3790	3800
3269									
3269A.....									
3697G.....									
	<u>AAAACGTAGTCCAGATACCGGCCCAACCACAGCCAAACAAGTGAGAGAGTTTTTGGGGACAGCTGGATTTTGCAGACTGTGGATCCCGGGGTTTGCGA</u> Majority									
	3810	3820	3830	3840	3850	3860	3870	3880	3890	3900
3369									
3369A.....									
3797									
	<u>CCTTAGCAGCCCCACTCTACCCGCTAACCAAGAAAAGGGGAATTCCTCTGGGCTCCTGAGCACCAGAAGGCATTGATGCTATCAAAGGCCCTGCT</u> Majority									
	3910	3920	3930	3940	3950	3960	3970	3980	3990	4000
3469A.....									
3469									
3897G.....									
	<u>GAGCGCACCTGCTCTGGCCCTCCCTGACGTAACATAACCCCTTTACCCCTTTATGGGATGAGCGTAAGGGAGTAGCCCGGGAGTTTTAACCACCAACCCTA</u> Majority									
	4010	4020	4030	4040	4050	4060	4070	4080	4090	4100
3569									
3569									
3997A.....									
	<u>GGACCATGGAGGAGACCTGTTGCCTACCTGTCAAAGAAGCTCGATCCTGTAGCCAGTGGTTGGCCCGTATGCCTGAAGGCTATCGCAGCTGTGGCCATAC</u> Majority									
	4110	4120	4130	4140	4150	4160	4170	4180	4190	4200
3669									
3669A.....C.....A.....									
4097T.....T.....									
	<u>TGGTCAAGGACGCTGACAAATTGACTTTGGGACAGAAATATACTGTAAATAGCCCCCATGCATTGGAGAACATCGTTCGGCAGCCCCAGACCGATGGAT</u> Majority									
	4210	4220	4230	4240	4250	4260	4270	4280	4290	4300
3769G.....									
3769									
4197									
	<u>GACCAACGCCCGCATGACCCACTATCAAAGCCTGCTTCTCACAGAGAGGGTCACGTTCGCTCCACCAGCCGCTCTCAAACCCTGCCACTCTTCGCTGAA</u> Majority									
	4310	4320	4330	4340	4350	4360	4370	4380	4390	4400
3869									
3869									
4297T.....									
	<u>GAGACTGATGAACCAGTACTCATGATTGCCATCAACTATTGATTGAGGAGACTGGGGTCCGCAAGGACCTTACAGACATACCGCTGACTGGAGAAGTGC</u> Majority									
	4410	4420	4430	4440	4450	4460	4470	4480	4490	4500
3969T.....									
3969									
4397									

TAACCTGGTTCACTGACGGAAGCAGCTATGTGGTGAAGGTAAGAGGATGGCTGGGGCGCGGTGGTGGACGGGACCCGACGATCTGGGCCAGCAGCCT Majority										
	4510	4520	4530	4540	4550	4560	4570	4580	4590	4600
4069									PERV_CMV.seq
4069									PERV_MSL.SEQ
4497A.....									PERV_A.seq
GCCGGAAGGAACTTCAGCACAAAAGCCTGAGCTCATGGCCCTCACGCAAGCTTIGCGGCTGGCCGAGGGAAATCCATAAACATTTATACGGACAGCAGG Majority										
	4610	4620	4630	4640	4650	4660	4670	4680	4690	4700
4169A.....									PERV_CMV.seq
4169G.....									PERV_MSL.SEQ
4597G.....									PERV_A.seq
TATGCCTTTGCGACTGCACACGTACACGGGCCATCTATAAACAAAGGGGTGCTTACCTCAGCAGGGAGGAAATAAAGAACAAGAGGAAATTCTAA Majority										
	4710	4720	4730	4740	4750	4760	4770	4780	4790	4800
4269G.....									PERV_CMV.seq
4269T.....									PERV_MSL.SEQ
4697									PERV_A.seq
GCCTATTAGAACCTTACATTGCCCCAAAAGGCTAGCTATTATACACTGTCCCTGGACATCAGAAAGCCAAGATCTCATATCCAGAGGGAACCAGATGGC Majority										
	4810	4820	4830	4840	4850	4860	4870	4880	4890	4900
4369C.....									PERV_CMV.seq
4369G.....A.....T.....A.....									PERV_MSL.SEQ
4797T.....									PERV_A.seq
TGACCGGGTTGCCAAGCAGGCAGCCAGGGTGTAACTTCTGCCTATAATAGAAACGCCCAAGCCCGAACCAGACAGTACACCCCTAGAAGAC Majority										
	4910	4920	4930	4940	4950	4960	4970	4980	4990	5000
4469G.....A.....G.....									PERV_CMV.seq
4469T.....									PERV_MSL.SEQ
4897C.....									PERV_A.seq
TGGCAAGAGATAAAAAAGATAGACCAGTTCTCTGAGACTCCGGAAGGACCTGCTATACCTCAGATGGGAAGGAAATCCTGCCCCACAAGAAGGGTTAG Majority										
	5010	5020	5030	5040	5050	5060	5070	5080	5090	5100
4569									PERV_CMV.seq
4569									PERV_MSL.SEQ
4997G.....T.....									PERV_A.seq
AATATGTCCAACAGATACATCGTCTAACCCACCTAGGAACTAAACACCTGCAGCAGTTGGTCAGAACATCCCCTTATCATGTTCTGAGGCTACCAGGAGT Majority										
	5110	5120	5130	5140	5150	5160	5170	5180	5190	5200
4669T.....									PERV_CMV.seq
4669									PERV_MSL.SEQ
5097									PERV_A.seq
GGCTGACTCGGTGGTCAACATGTGTGCCCTGCCAGCTGGTAAATGCTAATCCTCCAGAATACCTCCAGGAAAGAGACTAAGGGGAAGCCACCCAGGC Majority										
	5210	5220	5230	5240	5250	5260	5270	5280	5290	5300
4769T.....C.....									PERV_CMV.seq
4769G.....G.....									PERV_MSL.SEQ
5197									PERV_A.seq
GCTCACTGGGAAGTGGACTTCACTGAGGTAAGCCGGCTAAATACGGAAACAATATCTATTGGTTTTTTGTAGACACCTTTTCAGGATGGGTAGAGGCTT Majority										
	5310	5320	5330	5340	5350	5360	5370	5380	5390	5400
4869									PERV_CMV.seq
4869C.....									PERV_MSL.SEQ
5297									PERV_A.seq

ATCCTACTAAGAAAAGAGACTTCAACCGTGGTGGCTAAGAAAATACTGGAGGAAATTTTCCAAGATTGGGAATACCTAAGGTAATAGGGTCAGACAATGG Majority											
	5410	5420	5430	5440	5450	5460	5470	5480	5490	5500	
4969										PERV_CMV.seq
4969A.....A.....										PERV_MSL.SEQ
5397										PERV_A.seq
TCCAGCTTTCGTTGCCAGGTAAGTCAGGGACTGGCCAAGATATTGGGGATTGATTGGAACTGCATTGTGCATACAGACCCCAAGCTCAGGACAGGTA Majority											
	5510	5520	5530	5540	5550	5560	5570	5580	5590	5600	
5069										PERV_CMV.seq
5069T.....C.....										PERV_MSL.SEQ
5497										PERV_A.seq
GAGAGGATGAATAGAACCATTAAGAGACCCTTACTAAATTGACCGCGGAGACTGGGGTTAATGATTGGATAGCTCTCCTGCCCTTTGTGCTTTTITAGGG Majority											
	5610	5620	5630	5640	5650	5660	5670	5680	5690	5700	
5169										PERV_CMV.seq
5169										PERV_MSL.SEQ
5597C.....A.A.....A.....G.....										PERV_A.seq
TTAGGAACACCCCTGGACAGTTTGGGCTGACCCCTATGAATTACTCTACGGGGACCCCCCATTGGTAGAAATGCTTCTGTACATAGTGTGATGT Majority											
	5710	5720	5730	5740	5750	5760	5770	5780	5790	5800	
5269										PERV_CMV.seq
5269C.....C.....										PERV_MSL.SEQ
5697G.....G.....G....C.....C.T..C.....										PERV_A.seq
GCTGCTTTCAGCCTTTGTTCCTAGGCTCAAGGCACTTGAGTGGGTGAGACAACGAGCGTGGAGGCAACTCCGGGAGGCTACTCAGGAGGAGGAGAC Majority											
	5810	5820	5830	5840	5850	5860	5870	5880	5890	5900	
5369										PERV_CMV.seq
5369										PERV_MSL.SEQ
5797G..C.....G..G.....A..G.....										PERV_A.seq
TTGAGATCCACATCGTTTCCAAGTGGGAGATTGAGTCTACGTTAGACGCCACCGTGCAGAAACCTCGAGACTCGGTGGGAGGGCCCTTATCTCGTAC Majority											
	5910	5920	5930	5940	5950	5960	5970	5980	5990	6000	
5469										PERV_CMV.seq
5469A.....										PERV_MSL.SEQ
5894AG.T.....C.....T.....T.....T.....A.....										PERV_A.seq
TTTGGACCACCAACGGCTGTGAAAGTCGAAGGAATCTCCACCTGGATCCATGCATCCACGTTAAGCGGGCCCACTCCCGAATCGGGGTGGAAAGC Majority											
	6010	6020	6030	6040	6050	6060	6070	6080	6090	6100	
5569										PERV_CMV.seq
5569A.....										PERV_MSL.SEQ
5994C.....										PERV_A.seq
CGAAAAGACTGAAAATCCCCTTAAGCTTCGCTCCATCGCGTGGTTCCTTACTCTGTCAATAACTTCTCAAGTTAATGGTAAACGCCTTGTGGACAGCCC Majority											
	6110	6120	6130	6140	6150	6160	6170	6180	6190	6200	
5669										PERV_CMV.seq
5669C.....GAC.....TG...A.A.GA.....T										PERV_MSL.SEQ
6094C.....										PERV_A.seq
GAAGCTCCATAAACCTTATCTCTCACCTGGTTACTTACTGACTCCGGTACAGGTATTAATATTAAACAGCACTCAAGGGGAGGCTCCCTTGGGGACCTGG Majority											
	6210	6220	6230	6240	6250	6260	6270	6280	6290	6300	
5769										PERV_CMV.seq
5769A.....C.....C.....A.....T..A..A.....										PERV_MSL.SEQ
6194										PERV_A.seq

TGGCCTGAATTATATGCTCTGCCCTTCGATCAGTAATCCCTGGTCTCAATGACCCAGGCCACACCCCGGATGTAATCCGTGCTTACGGGTTTTACGTTTGCC Majority										
	6310	6320	6330	6340	6350	6360	6370	6380	6390	6400
5869									
5869TC...C..T...CA.....T..T..A.....-----A..T.....A..A.C...A...C...A...T.....									
6294									
CAGGACCCCAATAATGAAGAATATGTTGGAAATCCTCAGGATTTCTTTTGCAAGCAATGGAGCTGCGTAACTTCTAATGATGGGAATTGGAAATGGCC Majority										
	6410	6420	6430	6440	6450	6460	6470	6480	6490	6500
5969									
5960A.....G.A..C...C.....CAGA.....T..A.....A..T...C.....AT.....									
6394									
AGTCTCTCAGCAAGACAGTAGTAACTTACTCTTTTGTAAACAATCCTACCAGTTATAATCAATTTAATTAATGGCCATGGGAGATGGAAAGATTGGCAACAG Majority										
	6510	6520	6530	6540	6550	6560	6570	6580	6590	6600
6069									
6060AC.....G..T..G.....TT...A...C...CCTA.....C.C.GGA.....C--T----.CC.....A...T.....									
6494									
CGGGTACAAAAGATGTACGAAATAAGCAAATAAGCTGTCATTTCGTAGACCTAGATTACTTAAAAATAAGTTTCACTGAAAAGGAAAACAGAAAATA Majority										
	6610	6620	6630	6640	6650	6660	6670	6680	6690	6700
6169									
6149GAA.CC.-----...G.--.C..C...--.....C.....G.....									
6594									
TTCAAAGTGGGTAAATGGTATGCTCTTGGGGAATAGTGTACTATGGAGGCTCTGGGAGAAAGAAAGGATCTGTTCTGACTATTGCGCTCAGAAATAGAAAC Majority										
	6710	6720	6730	6740	6750	6760	6770	6780	6790	6800
6269									
6224C.T..A.....G..A..T.....G..T.A.C.ACC...C..CA...A.....A...A....									
6694									
TCAGATGGAACCTCCGGTTGCTATAGGACCAATAAGGGTTTGGCCGAACAAGGACCTCCAATCCAAGAACAGAGGCCATCTCCTAACCCCTCTGATTAC Majority										
	6810	6820	6830	6840	6850	6860	6870	6880	6890	6900
6369									
6321C...C...G...AA.G.....C..TC...A.G.GT...A...C...C...G..CAG.A....CT.....									
6794									
AATACAACCTCTGGATCAGTCCCACTGAGCCTAACATCACTATTAACAGGGGCGAAACTTTTAGCCTCATCCAGGGAGCTTTTCAAGCTCTTAACT Majority										
	6910	6920	6930	6940	6950	6960	6970	6980	6990	7000
6469A.....									
6409-T...T.....A.....T..G..G..G.C...TG...A.....									
6894									
CCACGACTCCAGAGGCTACCTCTTCTGTGGCTTTGCTTAGCTTCGGGCCACCTTACTATGAGGGAAATGGCTAGAGGAGGGAAATCAATGTGACAAA Majority										
	7010	7020	7030	7040	7050	7060	7070	7080	7090	7100
6569									
6506A.....A.....A.....									
6994									
AGAACATAGAGACCAATGTACATGGGGATCCCAAATAAGCTTACCCCTTACTGAGGTTTCTGGAAAAGGCACCTGCATAGGGATGTTCCCCCATCCAC Majority										
	7110	7120	7130	7140	7150	7160	7170	7180	7190	7200
6669G.....									
6606C.....A.A.....									
7094									

CAACACCTTTGTAACCACACTGAAGCCTTTAATCGAACCTCTGAGAGTCAATATCTGGTACCTGGTTATGACAGGTGGTGGGCATGTAATACTGGATTAA Majority										
	7210	7220	7230	7240	7250	7260	7270	7280	7290	7300
6769G.....G.....									PERV_CMV.seq
6706A.....									PERV_MSL.SEQ
7194									PERV_A.seq
CCOCTTGTGTTTCCACCTTGGTTTTCAACCAAACTAAAGACTTTTTCGCTTATGGTCCAAATGTCCCCCGGGTGTACTACTATCCCGAAAAAGCAGTCTCT Majority										
	7310	7320	7330	7340	7350	7360	7370	7380	7390	7400
6869									PERV_CMV.seq
6806T.....T.....A.....T.....A.....T.....A.....									PERV_MSL.SEQ
7294									PERV_A.seq
TGATGAATATGACTATAGATATAATCGGCCAAAAAGAGAGCCCATATCCCTGACACTAGCTGTAATGCTCGGATTGGGAGTGGCTGCAGGCGTGGGAACA Majority										
	7410	7420	7430	7440	7450	7460	7470	7480	7490	7500
6969									PERV_CMV.seq
6906C...A..C...A.A..G...A.....T.....T.....G.....C.T.....A...T.A.....									PERV_MSL.SEQ
7394									PERV_A.seq
GGAACGGCTGCCCTAATCACAGGACCGCAACAGCTGGAGAAAGGACTTAGTAACCTACATCGAATTGTAACGGAGATCTCCAAGCCCTAGAAAAATCTG Majority										
	7510	7520	7530	7540	7550	7560	7570	7580	7590	7600
7069									PERV_CMV.seq
7006A.....GG...G...A..G...A..A.C.....A.....									PERV_MSL.SEQ
7494A.....									PERV_A.seq
TCAGTAACTGGAGGAATCCCTAACTCCTTATCTGAAGTGGTCTACAGAACAGAGGGGGTTAGATCTGTTATTCTAAAAGAAGGAGGATTATGTGT Majority										
	7610	7620	7630	7640	7650	7660	7670	7680	7690	7700
7169									PERV_CMV.seq
7106A..C.....T.....A.....T.A.....									PERV_MSL.SEQ
7594G.....									PERV_A.seq
AGCCTTGAAGGAGGAATGCTGTTTTTATGTGGATCATTTCAGGGGCCATCAGAGACTCCATGAACAAGCTTAGAGAAAGGTTGGAGAAGCGTCGAAGGGAA Majority										
	7710	7720	7730	7740	7750	7760	7770	7780	7790	7800
7269									PERV_CMV.seq
7206									PERV_MSL.SEQ
7694A..A.....C..C...A...C...A.....G.....A...G.....									PERV_A.seq
AAGGAACTACTCAAGGGTGGTTTGGGGATGGTTCACAGGTCTCCTTGGTGGCTACCCTACTTTCTGCTTTAACAGGACCCCTTAATAGTCCCTCCTCC Majority										
	7810	7820	7830	7840	7850	7860	7870	7880	7890	7900
7369C.....									PERV_CMV.seq
7306T.....									PERV_MSL.SEQ
7794	GA..GG..GAC..G.....A.....A..A.C.....G.....C.G..G..G...C.G.....G.....									PERV_A.seq
TGTTACTCACAGTGGGCCATGTATTATTAACAAGTTAATTCGCTCATTAGAGAACGAATAAGTGCAGTCCAGATCATGGTACTTAGACAACAGTACCA Majority										
	7910	7920	7930	7940	7950	7960	7970	7980	7990	8000
7469									PERV_CMV.seq
7406									PERV_MSL.SEQ
7894T.....T..CT.A...T.G...TG.....TG.....G.G.....G.....									PERV_A.seq
AAGCCCGTCTAGC---AGAGAAGCTGGCCGCTAGCTCTACCAGTCTAAGATTAGAACTATTAAACAAGAGAAGAAGTGGGGAATGAAAGGATGAAAATGC Majority										
	8010	8020	8030	8040	8050	8060	8070	8080	8090	8100
7569									PERV_CMV.seq
7506---.G.....A.....									PERV_MSL.SEQ
7994	G...TTCTG...CAAG...A..A..T...CT.C.....C.....									PERV_A.seq

AACCTXACXCTCCAGAACCCAGGAAGTTAATAAGAAGCTCTAAATGCCCCGAATTCAGACCCCTGTTCCCTATAGGTAAAAGATTAGAXTTTTTGCTG Majority										
	8110	8120	8130	8140	8150	8160	8170	8180	8190	8200
7666G..T.....T.....C.T.C.....	PERV_CMV.seq
7603-.....C...G.....TA...TGTT.T.....GTT.....T.....GT.....	PERV_MSL.SEQ
8094A..C.....A.....C.GG..GCCA.....TAGG.....	PERV_A.seq
TTTTAGGXCATGCTTXXCTXXXTI-TXCAXXXCXIXXITGGAAGXXXAAAXXCAGGCCCTGAGTAXGTGXCTCTATGCXGTGAACTTCTTGAAACTGXIXC Majority										
	8210	8220	8230	8240	8250	8260	8270	8280	8290	8300
7766G.T.....T..GC.C.G.A..AAA.T.TG.....GGG...AA.....T...C.....T.....C.C.	PERV_CMV.seq
7684AAAT.....TAA...-T.....CA..T.....G..A.....AT.TG	PERV_MSL.SEQ
8184-..T..CA...C..AT.G.-.C..GGG.C.GC.-.....TC.T...-..A...A.....AACA.G..A.....G.GT..A--	PERV_A.seq
TAATXGCTTGTXTGGXTTCTGTAAAAGCTGTGXXTAXCATA-----GAAAAATTGATTGCXXAXGX--CCAGXAAGAXCXGTGTACC-XXAAAT Majority										
	8310	8320	8330	8340	8350	8360	8370	8380	8390	8400
7866	...CT.....	...T...C.....	...C.....	...CA..AG...AAAAGAG..G..G.CA.....	...CT.AC.GACC...T...T.GG.....	...ACA...	PERV_CMV.seq
7756	AG..AA.AA.AAAA.GGAG.T.CT.....	...TT..G.T.CT-----	...T...C..G...G-----	...TA.....	...TG....	PERV_MSL.SEQ
8253	...C...A.C..A.....	...AC..-GC.C...-----	...G.....	...A.AC.TT.A-----	...C---C.TA.....	PERV_A.seq
GTTGAXACACATACTTGGTGACAACATGTCTCCCCACCCCGAAACATGCGCAAATGTGTAACCTTAAACAAATT-AAATTAATTGGTCCACGAAGCG Majority										
	8410	8420	8430	8440	8450	8460	8470	8480	8490	8500
7966A.....	PERV_CMV.seq
7832T.....	PERV_MSL.SEQ
8329	-----CAACTG...TC.....	...A.T.T-G...A.G.G.CCA.....	...G...C.G.C...CGG.G.T...T...A.G.....	...G....	PERV_A.seq
CGGGCTCTCGATATTTTAAATGATTTGGTTTGTXAAGCCGGGCTXT--XIATTTTAAATGATTTGGTXXXTXXAGCCGGGCTXT-GATATTTTGAAT Majority										
	8510	8520	8530	8540	8550	8560	8570	8580	8590	8600
8065T.-.....G.....C...A.....T.-G.....G.....TTG.AA.....T.-.....	PERV_CMV.seq
7931AG.....T..C.....	PERV_MSL.SEQ
8417CCACG.....C.CGA.....A.....CCA.GG.....C.C.....A...	PERV_A.seq
GATTGGTTTGTAAAGCGGGCTTTTGTGTGAACCCATAAAAGCTGTCCGACTCCACACTCGGGGCCGAGTCTCTACCCCTGCGTGGTGTACGACT Majority										
	8610	8620	8630	8640	8650	8660	8670	8680	8690	8700
8159T.....	PERV_CMV.seq
7977	PERV_MSL.SEQ
8517G.C..A.A.....T..G.....	PERV_A.seq
GTGGGCCCGAGCGGCTTGGAAATAAAATCCTCTTGTCTTTGCATCAAXAXX Majority										
	8710	8720	8730	8740	8750	8760	8770	8780	8790	
8259	PERV_CMV.seq
8077A.-----	...AAA.	PERV_MSL.SEQ
8617G.CCGCTTCTGTG.GTG.TTGGGGGTGCGCCTCTCCGAGCCCGGAC	PERV_A.seq

Die Nukleinsäuresequenz des PERV-A/C-Molekularklons im Sequenzvergleich zu den PERV Subtypen A und C. Übereinstimmende Nukleotide sind mit einem Punkt (.) markiert, Abweichungen mit (-).

Aminosäuresequenz des rekombinanten p27Gag-Proteins

Die exprimierte Aminosäuresequenz des rekombinanten p27Gag-Proteins inklusive His-Tag am N-Terminus:

MRGSHHHHHHGSPLRTYGPPMPGGQLQPLQYWPFSADLYNWKTNHPPFSEDPQ-
RLTGLVESLMFSHQPTWDDCQQLLQTLFTTEERERILLEARKNVPGADGRPTQLQ-
NEIDMGFPLTRPGWDYNTAEGRESLKIYRQALVAGLRGASRRPTNLAKVREVMQG-
PNEPPSVFLERLMEAFRRFTPFDPTSEAQKASVALAFIQSALDIRKKLQRLEGLQE-
AELRDLVREAQKVVYRRETEEEKEQRKEKEREEREERRDRRQEKNSLIS.

Publikationen

1. Irgang, M., Sauer, I.M., Karlas, A., Zeilinger, K., Gerlach, J. C., Kurth, R., Neuhaus, P., Denner, J.
Porcine endogenous retroviruses (PERVs): No infection in patients treated with a bioreactor based on porcine liver cells. *J. Clin. Virol.*, 28, 141-154 (2003)
2. Denner, J., Specke, V., Thiesen, U, Karlas, A., Kurth, R.
Genetic alterations of the long terminal repeat of an ecotropic porcine endogenous retrovirus during passage in human cells. *Virology*, 314, 125-33 (2003)
3. Karlas, A., Kurth, R., Denner, J.
Inhibition of porcine endogenous retroviruses by RNA interference: Increasing the safety of xenotransplantation. *Virology*, 325, 18-23 (2004)
4. Garkavenko, O., Croxson, M. C., Irgang, M., Karlas, A., Denner, J., Elliott, R. B.
Monitoring for presence of potentially xenotic viruses in recipients of pig islet xenotransplantation. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 11, 5353-6 (2004)
5. Irgang, M., Karlas, A., Laue, C., Specke, V., Tacke, S. J., Kurth, R., Schrezenmeir, J., Denner, J.
Porcine endogenous retroviruses PERV-A and PERV-B infect neither mouse cells in vitro nor SCID mice in vivo. *Intervirology*, 48, 167-73 (2005)
6. Winkler, M.E., Winkler, M., Burian, R., Hecker, J., Loss, M., Michael Przemeck, M., Karlas, A., Lorenz, R., Patience, C., Sommer, S., Denner, J., Martin, U.
Analysis of pig-to-human PERV transmission in a triple-species kidney xenotransplantation model. *Int. Transpl.*, in press
7. Denner, J., Specke, V., Plesker, R., Coulibaly, C., Langford, G., Schuurmann, H.-J., Bühler, C., Meyer, T., Breuer, S., Ulrichs, K., Karlas, A.
Porcine Endogenous Retroviruses and Xenotransplantation: Lack of Infection in Small Animals and Non-human Primates Despite Immunosuppression and Long-Term Exposure. *Transpl. Proc.*, in press
8. Denner, J., Karlas, A., Fiebig, U.
Strategien zur Verhinderung der Übertragung porciner endogener Retroviren (PERVs) bei der Xenotransplantation TxMed, submitted

Patente

Fiebig, U., Schmolke, M., Denner, J., Kurth, R., Karlas, A.
Induktion antiviraler neutralisierender Antikörper beim Menschen und beim Tier.
Internationales Patent; *Aktenzeichen PCT/DE2004/001897*

Karlas, A., Denner, J., Kurth, R.,
Inhibition von PERV durch RNAi.
Europäisches Patentamt; *Patentnummer 05090046.3*

Abstracts

Denner, J., Specke, V., Ulrichs, K., Tacke, S., Plesker, R., Coulibaly C., Langford, G., Schuurmann, H., Bühler, C., Meyer, T., Breuer, S., Patience, C., Fiebig, U., Karlas A., Irgang, M.
Porcine endogene Retroviren (PERVs) und Xenotransplantation: Biologische Eigenschaften und Tiermodelle
5. Symposium für innovativen Organersatz, Schloss Rauischholzhausen 22.-23.09.2001

Denner, J., Specke, V., Plesker, R., Coulibaly, C., Langford, G., Schuurmann, H., Bühler, C., Meyer, T., Breuer, S., Ulrichs, K., Karlas, A.
Porcine endogene Retroviren und Xenotransplantation: Keine Infektion bei Kleintieren und nicht-humanen Primaten trotz Immunsuppression und Langzeitexposition
10. Jahrestagung der deutschen Transplantationsgesellschaft, Heidelberg, 22.-24.11.2001
Transplantationsmedizin, Suppl., 105-106

Karlas, A., Martin U, Bühler C, Meyer T, Breuer S, Kurth R, Winkler M, Ulrichs K, Denner J
Lack of Transmission of Porcine Endogenous Retroviruses (PERVs) to Cynomolgus Monkeys Receiving Humanised Pig Transplants or to Diabetic Rats Successfully Treated with Pig Islet Cells
Annual Meeting of the "Gesellschaft für Virologie", Erlangen 08.-11.04.2002

Martin, U., Winkler, ME., Wiebe, K., Burian, R., Loss, M., Appiah, R., Lorenz, R., Przemec, M., Sommer, S., Karlas, A., Denner, J., Winkler M.
Analysis of Pig-to-human PERV transmission in a triple-species kidney and lung xenotransplantation model
XIX International Congress of the Transplantation Society, Miami, Florida 25.08.-30.08.2002, Abstract 0368

Martin, U., Winkler, E., Wiebe, K., Burian, R., Loss, M., Appiah, R., Lorenz, R., Przemec, M., Sommer, S., Karlas, A., Denner, J., Winkler, M.

Analyse potentieller PERV-Transmission auf humanes Gewebe in einem "Drei-Spezies" Nieren und Lungen-Xenotransplantationsmodell

11. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft, 24.-26. Oktober 2002, Tx Med Supp., 87

Karlas A., Stawrakakis A., Neitzel S., Denner, J.

Porcine endogenous retroviruses (PERVs): Inhibition of replication by siRNAs

Annual Meeting of the "Gesellschaft für Virologie", Berlin, 26.-29.3.2003

Irgang, M., Sauer I. M., Karlas A., Zeilinger K., Gerlach J. C., Reinhard Kurth R., Neuhaus P., Denner J.

Porcine endogenous retroviruses (PERVs): No infection in patients treated with a bioreactor based on porcine liver cells

Annual Meeting of the "Gesellschaft für Virologie", Berlin, 26.-29.3.2003

Denner J., Specke, V., Schuurman, H.-J., Tacke, S., Irgang, M., Patience, C., Fiebig, U., Karlas, A., Ulrichs, K., Winkler M. E., Martin, U., Plesker, R., Coulibaly, C., Sauer, I. M., Galbraith, D., Onions, D., Gerlach, J., Winkler, M., Neuhaus, P., Kurth, R.

Porcine Endogenous Retroviruses (PERVs): Biological characterisation and evaluation of their risk for xenotransplantation

2nd International Workshop Retrotransposons and genome evolution, Sochi, Russia, 20.-22.4.2003

Denner J. , Karlas, A., Fiebig, U., Kurth, R.

Porcine Endogenous Retroviruses (PERVs): Strategies to Prevent Transmission Following Xenotransplantation

Seventh International Xenotransplantation Congress 2003, Glasgow, 30.9.-4.10.2003

Denner J., Irgang, M., Sauer, I. M., Karlas, A., Gerlach, J.C., Neuhaus, P., Kurth, R.

A New Retrospective Study on Transmission of Porcine Endogenous Retroviruses (PERVs) in Patients Treated with a Bioreactor Based on Porcine Liver Cells

Seventh International Xenotransplantation Congress 2003, Glasgow, 30.9.-4.10.2003

Karlas, A., Kurth, R., Denner, J.

Inhibiting porcine endogenous retroviruses by RNA interference: Increased safety of xenotransplantation

Annual Meeting of the "Gesellschaft für Virologie", Tübingen, 17.-20.3.2004

Kluge, B., Karlas, A., Votteler, J., 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.-19.3.2005

Alexander Karlas

Berlin, 8. Mai 2005

Lebenslauf

<u>Persönliche Daten:</u>	Name:	Alexander Karlas
	geboren:	am 15.11.1973 in Donauwörth
	Familienstand:	verheiratet
<u>Schulbildung:</u>	09/1980 - 07/1993	Grundschule, Gymnasium, Nürnberg
	09/1984 - 07/1993	Sigmund-Schuckert-Gymnasium, Nürnberg abgeschlossen mit Abitur
<u>Zivildienst</u>	09/1993 - 09/1994	
<u>Studium</u>	10/1994 - 01/2000	Studium der Biochemie/Molekularbiologie an der Universität Hamburg Diplomarbeit am Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie, Hamburg "Die Spleiß-Varianten des p53-verwandten KET-Proteins: Herstellung von spezifischen Antikörpern durch DNA-Vakzinierung"
	01/2000	Verleihung des akademischen Grades Diplom Biochemiker/Molekularbiologie
<u>Praktikum</u>	08/2000 - 02/2001	Praktikum am Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA
<u>Promotion</u>	06/2001 - 06/2004	Promotion am Robert Koch-Institut, Berlin: „Porcine endogene Retroviren und Xeno- transplantation: Evaluierung des Infektions- risikos und Strategien zur Hemmung der Virus- replikation mittels RNA-Interferenz“
<u>Berufliche Erfahrungen</u>	Seit 07/2004	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck- Institut für Infektionsbiologie, Berlin

Alexander Karlas
Berlin, 8. Mai 2005

Danksagung

Besonders danke ich Herrn Dr. Denner für die Überlassung des interessanten Themas, für die ständige Diskussionsbereitschaft und die Freiheit, die Richtung der Doktorarbeit mitbestimmen zu können.

Herrn Prof. Dr. Reinhardt Kurth möchte ich für die fachliche und finanzielle Unterstützung danken.

Der gesamten Arbeitsgruppe, insbesondere Kristina Buescher, Uwe Fiebig, Markus Irngang, Britta Kluge, Stefan Langhammer, Nils Rademacher, Mirco Schmolke und Dr. Volker Specke danke ich für die tolle Zusammenarbeit und die hilfreichen Diskussionen. Stephanie Neitzel möchte ich wegen ihrer ständigen Hilfsbereitschaft und der tatkräftigen Unterstützung vor allem bei Zellkulturarbeiten dankend erwähnen.

Bei Anastasia Stawrakakis und Jörg Votteler bedanke ich mich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und für ihren unermüdlichen Einsatz während ihrer Diplomarbeit.

Mein Dank gilt auch der ganzen Arbeitsgruppe P22 des Robert Koch-Instituts. Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dr. Stephen Norley für die Durchsicht der englisch-sprachigen Abstracts, Poster und Publikationen bedanken.

Meinem Freund und Kollegen Dr. Jürgen Wittmann danke ich besonders für die unzähligen Diskussionen und dem Austausch so mancher Reagenzien. Der heiße Draht nach Erlangen war in vielerlei Hinsicht unbezahlbar.

Ebenso sei allen anderen Freunden in Nürnberg, Hamburg und Berlin gedankt, die trotz der zeitweiligen Vernachlässigung meinerseits, die Freundschaft aufrecht erhalten haben.

Den Korperationspartnern Prof. Dr. Didier Trono, Prof. Dr. Alexander Pfeifer und Prof. Dr. Heiner Niemann möchte ich für die Bereitstellung der viralen Vektoren bzw. der porcinen Fibroblasten danken.

Mein größter Dank richtet sich an meine Familie: meinen Eltern danke ich für ihre liebevolle und außergewöhnliche Unterstützung während des Studiums und der Doktorarbeit. Gleichmaßen möchte ich mich bei meiner Frau Stefanie für ihr enormes Verständnis (wenn's im Labor mal wieder a bissel später wurde) und die tolle gemeinsame Zeit bedanken. Besonders glücklich und stolz machte mich die Geburt unserer Tochter Nina, die mich trotz mancher „kurzen Nacht“ unheimlich motivierte, diese Arbeit zu vollenden.

Erklärung

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

Alexander Karlas

Berlin, 8. Mai 2005

Index

- 1,3-Galactosyltransferase, 5
- 1,3-Galaktosyl-Transferase, 20, 100
- 2⁻ $\Delta\Delta^{CT}$ -Methode, 35, 76, 77
- 2',5'-Oligoadenylatsynthetase, 27
- 293 FT-Zellen, 40
- 293-Zellen, 40, 72
- 3'-5'-Exonukleaseaktivität, 34
- 3T3-Zellen, 40, 72

- Abkürzungsverzeichnis, V
- Abstoßungsreaktion, 3, 20
 - akut vaskuläre, 5
 - chronische, 6
 - hyperakute vaskuläre, 5
 - T-Zell vermittelte, 6
- Abstracts, XXIV
- Acrylamid, 51
- Ad5, 56
- Adaptation, 65
- Adenovirus, 56
- Affinitätschromatographie, 49
- akzessorischer Gene, 13
- Allotransplantat, 2
- Allotransplantation, 1, 2
- Aminosäuresequenz, XXII
- Aminosäuretransporter, 14
- Anatomie, 4
- Anhang, I
- Anodenpuffer, 51

- Antikörper, 32
- Apoptose, 6, 12, 24, 27
- Applikationsschema, 54
- Argonaute, 24
- Argonaute-Genfamilie, 24
- Argonaute2-Protein, 25
- Azathioprin, 1, 2
- AZT, 21

- Barium-Alginat, 58, 59
- Blut-Hirn-Schranke, 12
- Bradford, 50
- Brucella suis, 7
- Budding, 20

- c-myc, 11
- C1-Esterase Inhibitor, 99
- C1-Inhibitor, 62
- Caenorhabditis elegans, 23, 24
- Calciumphosphatpräzipitation, 42
- Campylobacter coli, 7
- Cap-Struktur, 13
- Capsid, 12
- Capsidprotein, 13, 17
- CCR3, 12
- CCR5, 11, 12
- CD34, 29
- CD4, 11
- CD55, 5, 21
- CD59, 5, 21

- cDNA-Synthese, 33
Centromer-Region, 100
Chalcon-Synthase, 23
Chelatbindung, 50
chemokompetente Bakterien, 38
 M15, 38, 49, 73
 TOP-10, 38
 XL10-Gold, 38, 67
Circovirus, 8
cis-aktive Elemente, 14
Coomassie-Färbung, 52
Coronavirus, 7
Cryptosporidium parvum, 7
CXCR4, 11
Cyclophosphamid, 62, 99
Cyclosporin A, 62, 99
Cynomolgus-Affe, 100
Cynomolgus-Affen, 61
Cytochromoxidase II, 63, 100
Cytomegalievirus der Paviane, 4

DAF (decay accelerating factor), *siehe* CD55
Danksagung, XXVIII
Dicer, 23–26
Dideoxy-Methode, 36
Diskussion, 97
DNA-abhängigen RNA-Polymerase, 14
DNA-Mikroinjektion, 30
DNA-Oligonukleotide, I
DNA-Sequenzierung, 36
doppelsträngige RNA, 23
Drei-Spezies-Modell, 30, 61
Drei-Spezies-Modellsystem, 99, 100
Drosophila melanogaster, 23, 24
Dualer Luziferase Assay, 48
Durchflusszytometrie, 47
eIF2C-Protein, 24
embryonalen Karzinomzellen, 27
embryonalen Stammzellen, 27
endogenes Pavian Retrovirus, 4
endoplasmatischen Retikulums, 16
Endozytose, 14
Enzephalomyocarditisvirus, 8
Ergebnisse, 55
Erklärung, XXIX
Erysipelothrix rhusiopathiae, 7
Ethidiumbromid, 36

FE-8 Zellen, 40, 56
Fehlerkorrektur, 15
filamentöse Pilze, 23
Firefly Luziferase, 48, 57
Fluoreszenzmikroskopie, 46

GC-Gehalt, 76
Gelelektrophorese, 36
Gelpuffer, 51
gene-silencing, 23, 28
GeneEraser, 77
Gibbonleukämievirus, 20
Glycerinphosphodehydrogenase, 35, 77
Glykosilierung, 16
Golgi-Apparat, 16

H1 RNase P RNA Promotor, 28
Hüllmembran, 12
Haarnadel-RNA, 28
Hepatocyten, 3
Herpes simplex Virus, 48, 56
Herpesvirus, 8

- HIV, *siehe* humanes Immundefizienzvirus
HIV-Corezeptoren, 12
huCD59 Schweine, 99
human PERV-A receptor, 19, 68
humanes Immundefizienzvirus, 7, 9, 11, 12,
14, 16, 29, 104
- IgM-Depletion, 6
Imidazolring, 50
Immunapherese, 6
Immunfluoreszenz-Assay, 85
Immunglobulinsuperfamilie, 14
Immunsisierung, 53, 74
Immunkompetenz, 8
immunologische Nachweissysteme, 21
Immunsuppression, 12, 63
Immunsuppressivum, 2, 99
Impfung, 21
Influenzavirus, 7
Inselzellen, 3
Verkapselung, 3
Insertionsmutagenese, 11
Integrase, 13, 16, 17
Interferonantwort, 27, 28
IPTG, 49
- Japanische Enzephalitis Virus, 7
- künstliches Herz, 2
Karzinogenese, 11
Kathodenpuffer, 51
keimfreie Züchtung, 8
Kernpore, 16
Komplementsystem, 21
Kryokonservierung, 41
Langerhanssche Inselzellen, 58
Lebenslauf, XXVII
Leberunterstützungssystemen, 3
Leberversagen, 3
lentivirale Expressionssysteme, 29, 30
Lentivirus, 9, 16
Leptosira interrogans, 7
Liberase PI, 58
Ligation, 37
Lipofektion, 42
Liposome, 42
Listeria, 7
LTR-Promotoraktivität, 57
Luziferase, 48
Luziferase Assay, 57
- Makrophagen, 12
Material und Methoden, 32
Matrixprotein, 13
Maul- und Klauenseuchevirus, 8
Maus-Mammatumor-Virus, 8
Mausleukämievirus, 20
membrane-cofactor-protein, 5, 21
Mesencephalon, 3
MHC-Molekül, 5
MHC-Polymorphismus, 5
microRNA, 24
Mikroglia-Zellen, 12
Mikrokapsel, 58, 59
Miniaturschwein, 17
Molekularbiologische Methoden, 33
Morbus Huntington, 3
Morbus Parkinson, 3
Mutationsraten, 16
Mycobacterium avium, 7
Mycophenolsäure, 62, 99

- Myristinsäurereste, 13
- Neuropathogenese, 12
- neutralisierender Antikörper, 21
- NF-Y, *siehe* nuclear factor Y
- Ni-NTA-Agarose, 73
- Nierenversagen, 3
- Nipah-Virus, 7
- Nitriloessigsäure, 50
- nuclear factor Y, 20, 57, 66, 68
- Nukleocapsidprotein, 13
- Nukleosidanalogen, 21
- OAS, *siehe* 2',5'-Olihgoadenylatsynthetase
- Oberflächenprotein, 12
- Onkogen, 9, 11, 56
- Oozyte, 30
- Organspender, 1
- Organversagen, 2
- Orthomyxovirus, 7
- Paramyxovirus, 7
- Patente, XXIV
- PAZ-Domäne, 23–25
- pcDNA3.1, VI, 33, 72, 101
- perivitelliner Spalt, 30
- PERV, 93
- Übertragung im Kleintiermodell, 55
 - Moleklarklones, 65
 - Transmission, 58, 97
 - Wirtsspektrum, 55
- PERV-A/C-Moleklarklon, XII, 72, 100
- PERV-Integrationsort, 19
- PERV-Proviren, 19
- Pfu-Polymerase, 34
- pGL3-basic, VIII, 33
- pGL3-control, VII, 33
- pHygEGFP, VI, 33
- Physiologie, 4
- Piwi-Argo-Zwille-Domäne, 23
- PK-15, 17
- Plasmid-DNA, 39
- Plasmide, 33
- Plasmidkarten, V
- pLenti6/V5-D-TOPO, 33, 89
- pLP-VSV-G, IX, 33
- pLP1, VIII, 33
- pLP2, IX, 33
- pLVTHM, XI, 33, 44, 93
- pMD2G, X, 33, 44
- Polymerase III, 28, 30
- Polymerasekettenreaktion, 34
- Porcine endogene Retroviren, 17
- posttranskriptionellen Inhibition, 23
- pQE30, 33
- Präintegrationskomplex, 16
- Primäre Zellen, 41
- Primerbindungsstelle, 14
- pRL-TK, VII, 33
- Probenpuffer, 51
- Protease, 13, 17
- Protein Kinase PKR, 27
- Proteinbestimmung, 50
- Proteinexpression, 49
- Protisten, 23
- Protoonkogen, 11
- Provirus, 16
- Provirusintegration, 34
- Pseudotypisierung, 20, 30, 55, 97
- psPAX2, X, 33, 44

- pSuper, V, 33
Publikationen, XXIII
- Rat1-Zellen, 40, 57, 72
rde-1, 24
Real time PCR, 35
real time PCR, 21
Reifungsprozess, 17
Renilla Luziferase, 48
Replikationszyklus, 17
Restriktionsschnittstelle, 34
Restriktionsverdau, 37
retrobulbäre Punktion, 54
Retrotransposons, 9, 24
Retrovirus, 8, 9, 13, 14, 30, 34, 84
 Aufbau, 12
 pathogenes Potential, 8
 Replikation, 14
 Taxonomie, 9
 Virusgenom, 13
Reverse Transkriptase, 13, 14, 17, 33, 48
Reverse Transkriptase-Aktivität, 57
RISC, *siehe* RNA induced silencing complex
RNA induced silencing complex, 24–26, 87, 106
RNA-Interferenz, 23, 28
 Hemmung der Virusreplikation, 74, 102, 104
 in Säugetierzellen, 27
 Induktion durch shRNAs, 28
 Induktion durch siRNAs, 28
 Mechanismus, 23
RNA-Isolation, 39
RNAi, *siehe* RNA-Interferenz
RNase, 14
RNase III, 24
RNase L, 27
ROX, 35
RRL-pGK-GFP, 93, 107
RT-Aktivität, 65
- Säulenchromatographie, 73
Sammelgel, 51
SARS, 7, 8
Schneider 2 Zellen, 24
Schweinecircovirus, 8
Schweinehepatitisvirus, 8
Schweineinfluenzavirus, 7
Schweinepapovirus, 8
Schweinepockenvirus, 8
SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, 17, 51
Sequenzanalyse, 67
Sequenzen siRNAs, IV
short interfering RNA, 23, 28, 43, 74
shRNA, *siehe* short hairpin RNA, 105
shRNA-Expressionskassette, 30, 106
Signalpeptid, 16
simianes Foamy Virus, 4
simianes Immundefizienzvirus, 8
siRNA, *siehe* short interfering RNA
siRNA-Ribonukleoproteinkomplex, 26
siRNA-Sequenz, 104
siRNP, 26
Southern-Blot Analyse, 19
Spanische Grippe, 7
Spendertiere, 3, 4
Spermatogenese, 25
SPF-Bedingungen, 7
Spleißakzeptor, 14, 16, 72

- Spleißdonor, 16, 72
Spleißdonorstelle, 14
Spumavirus, 9
Steroide, 62, 99
Streptococcus suis, 7
Streptozotocin, 58
SV40 Viren, 29
SV40-Promotor, 57
Swine Vesicular Disease Virus, 8
SYBR-Green, 35
- T-Antigen, 29
T-Lymphozyte, 6
T-Lymphozyten
 CD4-positive, 6
 CD8-positive, 6
T-Zell-Leukämie-Virus, 9
Tat, 12
Thymidinkinase-Promotor, 48
tissue-engineering, 2
Tollwutvirus, 8
Toxoplasma gondii, 7
Transfektion, 42, 43
Transfektionseffizienz, 43
Transfektionsreagenz, 42
Transformation, 38
Transkriptionsfaktoren, 14
Transplantationsmedizin, 1
Trenngel, 51
Trichinella spiralis, 7
tRNA, 14, 15
Trypanosoma brucei, 24
Tumorerkrankung, 8
- U3-Region, 14, 29
U5-Region, 13
U6-Promotor, 28
- Vaccinaivirus, 8
Vesicular Stomatitis Virus, 8
Vesikulären Stomatitis Virus, 29
 G-Protein, 29
Virus-Assembly, 17
Virusintegration, 16
Virusmorphogenese, 13
Viruspathogenese, 18
Virusreplikation, 18, 57
Virustiterbestimmung, 45
- Wachstumsfaktoren, 4
Western-Blot Analyse, 52
- xenoreaktiven Antikörper, 21
xenos, 2
Xenose, 20
Xenotransplantation, 1, 2, 4, 55, 58, 61
 Ethische Bedenken, 4
 Immunologische Probleme, 5
 Physiologische Probleme, 4
Xenozoonose, 4, 8, 21, 30
- Zell-Zell-Kontakt, 55
Zellkultur, 41
Zelllinien, 40
Zielsetzung, 30
Zinkfingermotiv, 17
Zusammenfassung, 108