

Freie Universität Berlin
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie



**PERV und Xenotransplantation:
Impfstoffe, RNAi und genotypische Selektion**

Dissertation

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

vorgelegt von Danny Kaulitz

Berlin, November 2011

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Kurth

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Tag der Disputation: _____

Zusammenfassung

Die porcinen endogenen Retroviren (PERVs) stellen für die Xenotransplantation derzeit ein schwer einzuschätzendes Risiko dar. Sie besitzen die Fähigkeit, *in vitro* humane Zelllinien zu infizieren und sich an diese zu adaptieren. Jedoch konnte in ersten klinischen Xenotransplantationen sowie in verschiedenen Tiermodellen bislang keine Übertragung von PERVs festgestellt werden. Ihr pathogenes Potential ist weitestgehend unbekannt. Auf Grund ihrer phylogenetischen Verwandtschaft zu pathogenen Retroviren sind Tumore, neurologische Erkrankungen und Immunschwächen zu erwarten. Um eine Übertragung zu verhindern, wurden verschiedene Strategien zur Minimierung des Risikopotentials entwickelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde im ersten Teil die Eignung der viralen Hüllproteine gp70 und p15E als Impfstoff zur Induktion neutralisierender Antikörper gezeigt. Mit den rekombinanten Proteinen konnten in fünf verschiedenen Spezies antigenspezifische Antikörper induziert werden. Durch Epitopkartierungen wurde belegt, dass die immundominanten Bereiche der induzierten p15E-Antikörper in der MPER und der FPPR lokalisiert sind und Ähnlichkeiten zu Epitopen HIV-1-neutralisierender Antikörper aufweisen. In einem Neutralisationsassay auf Basis der Bestimmung der Provirusintegration mittels qRT-PCR konnten die PERV-neutralisierenden Eigenschaften von anti-p15E und anti-gp70 Seren charakterisiert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Inhibition der PERV-Expression *in vivo* und *in vitro* mittels RNA Interferenz untersucht. Es wurden transgene Schweine mit PERV-spezifischer shRNA (pol2) generiert und über einen Zeitraum von zwei Jahren beobachtet. Trotz des Nachweises der shRNA Expression durch ein neues qRT-PCR basierendes System konnten in PBMCs und Fibroblastenkulturen der Tiere keine Reduktion der PERV-Expression im Vergleich zu den Kontrolltieren nachgewiesen werden. Neue *in vitro* Daten sowie eine vergleichbare Studie belegen jedoch die grundsätzliche Funktionalität der Methodik. Eine neue effektive shRNA-Sequenz wurde identifiziert.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden verschiedene PCR basierte Techniken zur Identifizierung PERV-C-freier Tiere charakterisiert. Zwar ist PERV-C nicht humanotrop, doch geht von rekombinanten PERV-Stämmen aus den Subtypen A und C eine besondere Gefahr aus. Da PERV-C im Gegensatz zu PERV-A und PERV-B nicht in allen Schweinen vorkommt, sollten gemäß einer Konsensus-Veröffentlichung der International Xenotransplantation Association

(IXA) für zukünftige Xenotransplantationen ausschließlich PERV-C-freie Tiere verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden transgene und nicht-transgene Hausschweine auf PERV-C-Proviren getestet und 35 von 38 Tieren als positiv identifiziert. In einem Infektionsversuch wurden drei negativ getestete Hausschweine mit einem hochtitrigen rekombinanten PERV-A/C-Stamm inokuliert, wobei keine Replikation über einen Zeitraum von vier Monaten nachgewiesen werden konnte. Bei der Analyse von 125 Wildschweinen wurde durch Anpassung alter und durch Entwicklung neuer PCR-Setups ein neues bisher unbeschriebenes PERV-C-Provirus entdeckt, das phylogenetische Verwandtschaft zu einem im Bartschwein (*Sus barbatus*) gefundenen Provirus zeigt. Interessanterweise wurden in keinem der Wildschweine enge Verwandte des hausschweintypischen PERV-C gefunden.

Schlagwort:

Xenotransplantation, PERV, RNAi, Neutralisierende Antikörper, Prävalenz

Abstract

Porcine endogenous retroviruses (PERVs) are a hard calculable hamper for xenotransplantation. They are able to adopt and to replicate in human cell lines. However in first clinical xenotransplantations and in different animal models transmission was not observed. The potential of pathogenicity of these viruses is mostly unknown. Due to there phylogenetically relationship to other pathogenic retroviruses, tumours, neurological and immunological disorders and immunosuppression are most likely if xenosis occurs. Different strategies to prevent artificial transmission during xenotransplantation are under investigation.

In the first part of this study the recombinant viral envelope proteins gp70 and p15E are shown as potent inducers of neutralising antibodies and promising candidates for an antiviral vaccine. Five model-species were immunised and in all cases a strong humoral response was observed. The epitopes of anti-p15E-antibodies were mapped and shown to be located within the MPER and the FPPR of p15E which is comparable to epitopes of certain HIV-1-neutralising antibodies. The PERV-neutralisation of anti-p15E and anti-gp70 goat sera were characterised using a qRT-PCR based neutralisation assay.

The second part of this study focuses on RNAi mediated inhibition of PERV-expression *in vivo* and *in vitro*. Transgenic pigs harbouring a PERV-shRNA (pol2) were generated by SCNT and monitored over a period of two years. In PBMCs and fibroblast cultures no significant reduction of PERV-expression in reference to control-animals was diagnosable although transcription of the shRNA was confirmed using an innovative qRT-PCR system. The general feasibility of the method is shown with new *in vitro* data and in a comparison to an other *in vivo* study. A new efficient shRNA-sequence was identified.

In the third part of this study different PCR-based techniques to identify PERV-C-free pigs are characterised. Although PERV-C is not human tropic, recombinants of PERV-C and PERV-A are of special concern in xenotransplantation. Unlike PERV-A and PERV-B, PERV-C is not present in all pigs. In reference to the consensus statement of the International Xenotransplantation Association (IXA) only PERV-C-free pigs should be used for future xenotransplantations. In this study transgenic and non-transgenic pigs were tested for the presence of PERV-C-proviruses. 35 of 38 animals were identified as positive. In an infection experiment three negative pigs were inoculated with a high titre recombinant PERV-A/C and no replication was observed over a

period of four months. Additionally PERV-C-prevalence in 125 wild boars was analysed and a currently unpublished PERV-C-provirus was found through adaption and development of old and new PCR-setups. The new provirus is related an A/C-provirus found in bearded pigs (*Sus barbatus*). Interestingly, no relative of the common PERV-C-virus was found in wild boars.

Keywords:

Xenotransplantation, PERV, RNAi, neutralising antibodies, prevalence

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	X
Abbildungsverzeichnis	XII
Tabellenverzeichnis	XIV
1 Einleitung	1
<i>1.1 Transplantation und Organersatz</i>	<i>1</i>
1.1.1 Die Xenotransplantation	3
1.1.2 Xenotransplantation in der Humanmedizin	3
1.1.3 Kompatibilität des Schweins	6
1.1.4 Genetische Manipulation als Vorteil der XT	9
1.1.5 Biologische Risiken der Xenotransplantation	11
<i>1.2 Das porcine endogene Retrovirus</i>	<i>13</i>
1.2.1 Morphologie von PERV	15
1.2.2 Funktion der Env-Proteine	16
1.2.3 Organisation der Erbinformation von PERV	17
1.2.4 Replikationszyklus	19
1.2.5 Pathogenes Potential	20
<i>1.3 Strategien zur Vermeidung einer PERV-Xenose</i>	<i>22</i>
1.3.1 Antiretrovirale Chemotherapie	23
1.3.2 RNAi	23
1.3.3 Impfstoffe	24
1.3.4 Prävalenzanalysen	25
1.3.5 Andere Strategien	26
<i>1.4 Zielsetzung</i>	<i>27</i>

2	Material	28
2.1	<i>Chemikalien</i>	28
2.2	<i>Bakterienstämme</i>	28
2.3	<i>Plasmide</i>	28
2.4	<i>Antikörper/Seren</i>	30
2.5	<i>Peptide und Pepsotmembranen</i>	30
2.6	<i>Enzyme</i>	31
2.7	<i>Primer und Sonden</i>	32
2.8	<i>Software und EDV</i>	35
2.9	<i>GenBank Nummern</i>	36
2.10	<i>Versuchstiere</i>	36
2.11	<i>Kulturmedien</i>	37
2.11.1	Flüssige Nährmedien für <i>E. coli</i>	37
2.11.2	Feste Nährböden für <i>E. coli</i>	38
2.11.3	Kulturmedien für eukaryotische Zellen	38
3	Methoden	39
3.1	<i>Arbeiten mit Nukleinsäuren</i>	39
3.1.1	Isolation von Nukleinsäuren	39
3.1.2	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	39
3.1.3	Molekulares Klonieren	39
3.1.3.1	Gerichtete Klonierung von PCR-Fragmenten	40
3.1.3.2	Ungerichtete Klonierung von PCR-Fragmenten	40
3.1.3.3	Klonierung der shRNA-Oligonukleotide in pSuper MfeI	40
3.1.4	Kolonie PCR	41
3.1.5	PCR-Diagnostik	41
3.1.6	Real-time PCR	42
3.1.6.1	Messung der PERV-Expression	43
3.1.6.2	Nachweis von envC	43
3.1.6.3	shRNA Expression	44
3.1.6.4	Kopienzahlbestimmung	45
3.1.6.5	Relative Quantifizierung	45
3.1.6.6	Effizienzbestimmung	46

3.1.7	Sequenzierung	46
3.1.8	Agarosegelelektrophorese	46
3.2	<i>Arbeiten mit Proteinen und Peptiden</i>	47
3.2.1	Darstellung der Antigene	47
3.2.2	Bestimmung des Proteingehaltes	48
3.2.3	SDS-Page	48
3.3	<i>Immunologische Techniken</i>	49
3.3.1	Western Blot	49
3.3.2	ELISA	50
3.3.3	Immunfluoreszenzmikroskopie	50
3.3.4	Neutralisationsassay	51
3.3.5	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie	52
3.3.6	Epitopkartierungen	52
3.4	<i>Mikrobiologische Methoden</i>	52
3.4.1	Stammhaltung von Bakterien	52
3.4.2	Kultivierung von Bakterien	53
3.4.3	Bestimmung der Zelldichte	53
3.4.4	Transformation	53
3.5	<i>Zellbiologische Methoden</i>	54
3.5.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	54
3.5.2	Kryokonservierung eukaryotischer Zellen	54
3.5.3	Zellzahlbestimmung	55
3.5.4	Anlegen von Kulturen primärer porciner Fibroblasten	55
3.5.5	Isolation von PBMCs	55
3.5.6	Durchflusszytometrie	56
3.5.7	Transfektion	56
3.5.8	Transduktion von PK15-Zellen	56
3.5.9	Herstellung transgener Schweine	57
3.6	<i>Immunisierungsstudien</i>	57
3.6.1	Applikation der Antigene	57
3.6.2	Gewinnung der Seren	58
4	Ergebnisse	59
4.1	<i>Ein Impfstoff gegen eine mögliche PERV-Übertragung</i>	59
4.1.1	Charakterisierung der Expressionsvektoren	59
4.1.2	Aufreinigung der Antigene	61

4.1.3	Immunisierung	62
4.1.4	Charakterisierung bindender Antikörper	63
4.1.5	Infektionsversuch von Ratten mit KoRV	66
4.1.6	Neutralisationsassay	67
4.1.7	Hemmung mit Peptiden	69
4.1.8	Epitopkartierung	70
4.1.9	Biacore-Analyse	72
4.1.10	Immuneserum reagiert mit PERV auf der Zelloberfläche	73
4.2	<i>Hemmung von PERV mittels RNAi</i>	75
4.2.1	Generierung und Charakterisierung shRNA transgener Schweine	75
4.2.2	Probenahme bei den transgenen Tieren	76
4.2.3	Nachweis der Transgenintegration	77
4.2.4	PERV-Prävalenz in den transgenen Tieren	79
4.2.5	Expression der shRNA	80
4.2.6	PERV-Hemmung und shRNA-Expression in den Fibroblasten	82
4.2.7	PERV-Hemmung und shRNA-Expression in PBMCs	83
4.2.8	Entwicklung neuer shRNAs	84
4.2.9	Transduktion ausgewählter shRNAs in PK15-Zellen	87
4.3	<i>Prävalenzanalyse von PERV-C</i>	92
4.3.1	Nachweis von PERV-C mit PCR und nested PCR	92
4.3.2	Etablierung einer Real-time PCR	94
4.3.3	Infektionsversuch PERV-C-negativer Tiere mit PERV-A/C	96
4.3.4	PERV-C bei Wildschweinen	99
5	Diskussion	103
5.1	<i>Vakzine auf Basis viraler Hüllproteine</i>	104
5.1.1	Expression der rekombinanten Proteine in <i>E. coli</i>	104
5.1.2	Rekombinantes p15E induziert Antikörper mit ähnlichen Epitopen bei verschiedenen Spezies	106
5.1.3	PERV-Neutralisation durch Seren verschiedener Spezies	107
5.1.4	Präformierte Antikörper bei Ratten	109
5.2	<i>Hemmung der PERV-Expression durch RNA-Interferenz</i>	110
5.2.1	Hemmung der PERV-Expression <i>in vitro</i>	111
5.2.2	Grenzwert der maximal erreichbaren Hemmung	112
5.2.3	Hemmung der PERV-Expression <i>in vivo</i>	115
5.3	<i>Prävalenz von PERV-C in verschiedenen Rassen</i>	118
5.3.1	Transgene und nicht-transgene Hausschweine	118

5.3.2	Keine Infektion mit PERV-A/C beim Schwein	120
5.3.3	Neues PERV-C in Wildschweinen	122
Danksagung		i
Lebenslauf		iii
Eidesstattliche Erklärung		iv
Eigene Publikationen		v
Literaturverzeichnis		vi

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bp	<i>base pair</i>
CBP	calmodulin-bindendes Peptid
Ct	<i>threshold cycle</i>
CTL	zytotoxische T-Lymphozyte
cyp	Cyclophilin
DPF	<i>designated pathogen free</i>
EK	Endkonzentration
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Env	Oberflächenhüllprotein
ERV	Endogenes Retrovirus
FFPR	<i>fusion peptide proximal region</i>
FLI	Friedrich-Löffler-Institut
Gag	Gruppenspezifisches Antigen
Gal	alpha-Gal-Glykosylierung
GaLV	Gibbon-Affen-Leukämievirus
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HAR	hyperakute Abstoßung
HERV	humanes endogenes Retrovirus
IFU	<i>infectious unit</i>
IMF	Immunfluoreszenz
IN	Integrase
IXA	<i>International Xenotransplantation Association</i>
KoRV	Koala-Retrovirus
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
MPER	<i>membrane proximal external region</i>
MuLV	Murines Leukämievirus
NK-Zelle	natürliche Killerzellen
NT	Neutralisation
NW	Nachweis

ORF	<i>open reading frame</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PERV	porzines endogenes Retrovirus
Pol	Polymerase
PRR	prolinreiche Region
qRT-PCR	quantitative Real-time PCR
RKI	Robert Koch-Institut
RNAi	RNA Interferenz
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
RU	<i>Resonanz Unit</i>
SA	Spleiß-Akzeptor
SCNT	<i>somatic cell nuclear transfer</i>
SD	Spleiß-Donor
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
SU	Oberflächen-Hüllprotein
TAH	<i>Total Artificial Heart</i>
TM	transmembranes Hüllprotein
UV	ultravioletter Bereich des Lichts
VAD	<i>Left Ventricular Assist Devices</i>
VIS	visueller Spektralbereich des Lichts
VRA	variabler Bereich A
VRB	variabler Bereich B
WB	Western Blot
XMRV	<i>Xenotropic MLV-related virus</i>
XT	Xenotransplantation

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einordnung der Xenotransplantation innerhalb der Organersatztherapie	2
Abbildung 2: Das α 1,3-Gal Epitop und die hum. Blutgruppenantigene.	7
Abbildung 3: Phylogenetischer Stammbaum der Retroviren.....	13
Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme PERV-produzierender Zellen.	14
Abbildung 5: Schematische Darstellung eines PERV-Partikels.	16
Abbildung 6: Organisation des PERV-Genoms.....	18
Abbildung 7: Sequenzvergleich der ISU-Domäne verschiedener Retroviren.....	21
Abbildung 8: Schematische Darstellung der rekombinanten PERV-Antigene.....	60
Abbildung 9: SDS-Page der aufgereinigten rekombinanten Proteine.....	62
Abbildung 10: Western Blot Analyse der Immunsereen verschiedener Spezies.....	63
Abbildung 11: Analyse der Rattensereen im Western Blot	64
Abbildung 12: ELISA-Daten der Immunisierungen mit gp70 und p15E von PERV.....	65
Abbildung 13: Infektionsversuch von Ratten mit KoRV.....	66
Abbildung 14: Effizienzbestimmung NT-Assay.....	68
Abbildung 15: Test der Neutralisation bei Ziegen.....	68
Abbildung 16: Inhibitionsversuch mit Peptiden und rekombinanten Proteinen.....	70
Abbildung 17: Epitopkartierung verschiedener mit p15E immunisierter Spezies.....	71
Abbildung 18: Biacore-Analyse ausgewählter Seren	73
Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von PERV-A/C 5° infizierten 293-Zellen unter Verwendung eines Ziegensereums gegen p15E von PERV	74
Abbildung 20: Zeitstrahl der Probenahme bei pol2-transgenen Schweinen.....	76
Abbildung 21: Nachweis der Integration von pLVTHM mittels PCR.....	77
Abbildung 22: FM Aufnahmen und FACS Daten der Fibroblastenkulturen	78
Abbildung 23: Bilder zur GFP-Expression in transgenen Schweinen.....	79
Abbildung 24: Nachweis der PERV-Subtypen in den transgenen Tieren	80
Abbildung 25: Schematische Darstellung der One Step qRT-PCR zum Nachweis der pol2-siRNA.....	81
Abbildung 26: Effizienzbestimmung der pol2 One Step qRT-PCR	81
Abbildung 27: Expression von PERV und der pol2-shRNA in den Fibroblasten der transgenen Tiere	83
Abbildung 28: Expression der PERV-mRNA und der pol2-shRNA in den PBMCs der transgenen Tiere	84
Abbildung 29: Lokalisation der Targets neuer anti-PERV-shRNAs.....	85
Abbildung 30: Klonierungsstrategie für multiple shRNA-Vektoren	86
Abbildung 31: Wirkung der shRNAs in stabil transfizierten PK15-Zellen	87
Abbildung 32: PERV und shRNA Expression in transduzierten PK15-Zellen	89
Abbildung 33: Expression von PERV in Kern und Zytoplasma von PK15-Zellen	91
Abbildung 34: Charakterisierung der envC Real-time PCR	95
Abbildung 35: PCR-Analyse der mit PERV/5° infizierten Zellen	97

Abbildung 36: PCR-Analyse der mit PERV/5° inokulierten PERV-C-freien Schweine 97
Abbildung 37: Keine PERV-Antikörper im Serum der mit PERV-A/C inokulierten Schweine 98
Abbildung 38: Primerlokalisierung und Sequenzspezifität der envC-PCRs..... 100
Abbildung 39: Lokalisation der gefundenen AS-Substitutionen..... 101
Abbildung 40: Phylogenetischer Baum der neuen envC-Sequenz 101
Abbildung 41: Lokalisation relevanter TM-Epitope bei PERV, FeLV und HIV-1 107
Abbildung 42: Multialignment von PERV-A-, KoRV- und RaLV-TM..... 109
Abbildung 43: Model der qRT-PCR Messung bei Multi-shRNAs 115

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überlebenszeit nicht-humaner Primaten mit transgenem Schweineorgan	9
Tabelle 2: Zusammenstellung validierter Transgene für die Xenotransplantation	10
Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme	28
Tabelle 4: Liste von Plasmiden und deren Derivat.....	28
Tabelle 5: Benutzte Antikörper und Antiseren	30
Tabelle 6: Peptide	31
Tabelle 7: Sequenz der PepSpot TM -Membran.....	31
Tabelle 8: Verwendete Enzyme	31
Tabelle 9: Primer und Sonden.....	32
Tabelle 10: Verwendete Software	35
Tabelle 11: Wichtige „Accession Numbers“	36
Tabelle 12: Bezugsquelle der Versuchstiere	37
Tabelle 13: Kulturmedien für <i>E. coli</i>	37
Tabelle 14: Kulturlösungen für eukaryotische Zellen.....	38
Tabelle 15: Kits zur Isolation von DNA und RNA.....	39
Tabelle 16: PCRs zur Prävalenzanalyse	42
Tabelle 17: Master-Mix und Programm der PERV-Expression qRT-PCR	43
Tabelle 18: Master-Mix und Programm der PERV-C Real-time PCR.....	44
Tabelle 19: Master-Mix und Programm der shRNA Expressions qRT-PCR;.....	44
Tabelle 20: Master-Mix und Programm für Sequenzierung	46
Tabelle 21: Puffer zur Aufreinigung von rekombinantem gp70.....	48
Tabelle 22: Zusammensetzung der SDS-Gele	49
Tabelle 23: Lösungen für ELISA	50
Tabelle 24: Verwendete Zelllinien	54
Tabelle 25: Applikationsart und -ort der Antigene.....	58
Tabelle 26: Auflistung der hergestellten pSiren Derivate	86
Tabelle 27: Retroviral transduzierte PK15-Zelllinien.....	88
Tabelle 28: Nachweis von PERV-mRNA in verschiedenen RNA-Fractionen	90
Tabelle 29: Häufigkeit von PERV-C in transgenen und nicht-transgenen Schweinen.....	93
Tabelle 30: PERV-Hemmung in verschiedenen Zelllinien	113

1 Einleitung

1.1 Transplantation und Organersatz

Die Transplantation von Organen ist vielfach die einzige Möglichkeit, um Menschen mit irreversiblen Organversagen zu retten bzw. die Lebensbedingungen Schwerstkranker dauerhaft zu verbessern. Die Transplantationsmedizin hat sich seit der ersten erfolgreichen Nierenverpflanzung im Jahre 1954, durchgeführt von dem späteren Nobelpreisträger Dr. Murray und seinem Team (MURRAY *et al.* 2001), zu einer etablierten Teildisziplin innerhalb der Medizin entwickelt. Allein in Deutschland wurden im Jahre 2008 insgesamt 6937 Organe (Niere, Leber, Lunge, Herz und Pankreas) verpflanzt (EUROTRANSPLANT 2008). Ermöglicht wurde diese rasante Entwicklung vor allem durch das immer besser werdende Verständnis der Funktionen und der Wirkungsweisen des menschlichen Immunsystems, durch die Entdeckung wirkungsstarker Immunsuppressiva und die Etablierung geeigneter Standards zur Selektion immun-kompatibler Spender. In Folge dessen konnte die Überlebenszeit der Transplantate erheblich gesteigert werden, so dass heute durchschnittlich etwa 70 % der transplantierten Organe noch nach fünf Jahren funktionstüchtig sind (DSO 2010). Limitierend wirkt derzeit einzig der akute Mangel an transplantierbaren Organen. In Deutschland benötigen etwa 12000 Patientinnen und Patienten ein passendes Spenderorgan, über 8000 von ihnen eine Niere. Der Bedarf an Spendernieren kann derzeit nur zu ca. einem Viertel gedeckt werden (DSO 2010).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, defekte Organe oder Gewebe zu ersetzen. Grundsätzlich kann man zwischen der Implantation künstlicher Systeme und der Implantation organischen Materials unterscheiden (Abbildung 1). Der Einsatz technischer Geräte ist eine der Möglichkeiten, die Funktion von Organen zu unterstützen bzw. zu ersetzen. Als populäre Beispiele aus der Kardiologie sind die VADs „Left Ventricular Assist Devices“ und die TAHs „Total Artificial Hearts“ zu nennen (BOILSON *et al.* 2010). Bei den VADs handelt es sich um Pumpensysteme, die die Herzfunktion unterstützen und die Zeit bis zur Verfügbarkeit eines Spenderherzens überbrücken können. Es konnte gezeigt werden, dass die Mortalitätsrate von Menschen auf der Warteliste durch den Einsatz solcher Geräte im Vergleich zur bestmöglichen medikamentösen Behandlung um 48 % gesenkt werden kann (ROSE *et al.* 2001). Im Gegensatz zu den VADs wird bei der Implantation eines TAHs das gesamte Herz ersetzt. Das modernste Gerät, das sich derzeit in klinischer Testung befindet ist das AbioCor™ (ABIOMED®, Inc.;

Danvers, Mass) (DOWLING *et al.* 2004; SAMUELS *et al.* 2004). Es ist vollständig implantierbar, reagiert auf physiologische Veränderungen im Körper und kann kabellos über ein spezielles Energietransfersystem durch die Haut mit Strom versorgt werden (DELGADO *et al.* 2006). Trotz dieses technischen Fortschrittes bleibt die Transplantation des allogenen Herzens der Goldstandard in der Langzeit Herzersatz Therapie (BIRKS *et al.* 2004). Technische Geräte für den vollständigen Ersatz anderer Organe stehen noch nicht zur Verfügung.

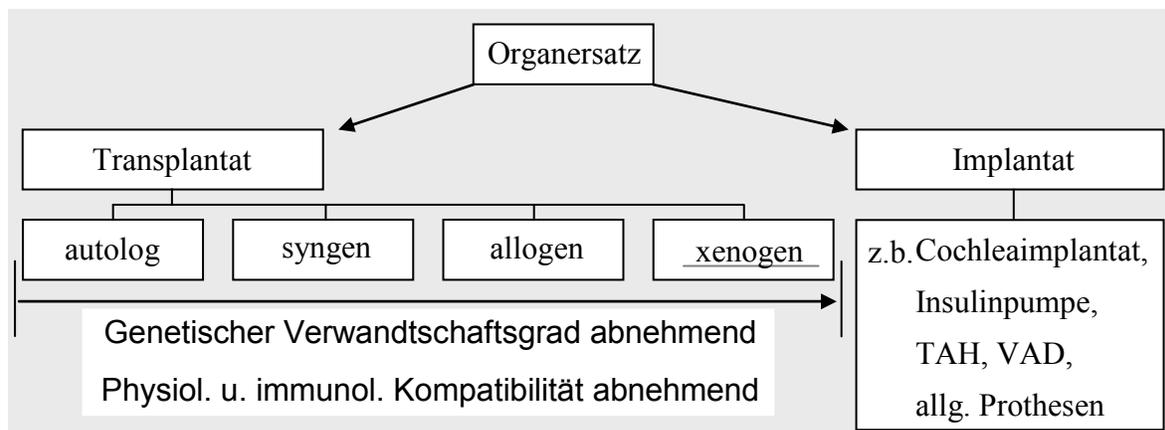


Abbildung 1: Einordnung der Xenotransplantation innerhalb der Organersatztherapie

In der Organersatztherapie können Materialien mit biologischem (Transplantat) oder technischen Ursprung (Implantat) verwendet werden. Auf Grund der phylogenetischen Verwandtschaft zwischen Spender und Empfänger wird zwischen autologen, syngenen, allogenen und xenogenen Transplantaten unterschieden.

Intensiv wird die Möglichkeit der regenerativen Organogenese erforscht. Die Technologie des „tissue engineering“ bietet die Aussicht, Gewebe und Organe aus patienteneigenen Zellen zu generieren. *In vitro* gezüchtete Haut und Knorpel finden bereits Anwendung (ENDRES *et al.* 2007; KUROYANAGI *et al.* 1993). Innerhalb der regenerativen Medizin werden ebenfalls große Erwartungen an die Stammzelltherapie gestellt. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen in der Lage sind, die Herzfunktion nach Infarkten zu verbessern (MIN *et al.* 2002; ORLIC *et al.* 2001). Weitere Anwendungen von Stammzellen werden zukünftig bei der Immuntherapie, der Gentherapie, der Behandlung neuronaler Schädigungen und der Heilung von autoimmunologischen Krankheiten zu finden sein (BRIGNIER and GEWIRTZ 2010).

Im Rahmen der regenerativen und der Transplantationsmedizin wird ebenfalls die Möglichkeit erforscht, lebende Gewebe und Organe nicht humaner Spezies auf den Menschen zu übertragen (Xenotransplantation). Durch die Entwicklung von neuen noch spezifischeren und

wirkungsvolleren Immunsuppressiva (DELL-OLIO and KELLY 2010) sowie die Herstellung gentechnisch veränderter Schweine (KLYMIUK *et al.* 2010) und den medizin-technischen Fortschritt, stellt dieser Ansatz eine weitere vielversprechende Möglichkeit zur Reduktion des Organmangels dar.

1.1.1 Die Xenotransplantation

Nach Definition ist Xenotransplantation die Übertragung von Zellen, Geweben oder ganzen Organen zwischen artfremden Individuen. Man unterscheidet aufgrund phylogenetischer und immunologischer Verwandtschaft von Spender und Empfänger, die konkordante und die diskordante Xenotransplantation (CALNE 1970).

Im Fall der konkordanten Xenotransplantation ist der Verwandtschaftsgrad hoch und das Auftreten einer hyperakuten Abstoßungsreaktion unwahrscheinlich. Als Tiermodelle werden unter anderem die Spender-Empfänger-Paare Ratte-Hamster (WANG *et al.* 2005), Maus-Ratte (LUKES *et al.* 2005) oder Rhesusaffe-Pavian (ASANO *et al.* 2003) genutzt. Im Gegensatz dazu ist bei der diskordanten Xenotransplantation der Verwandtschaftsgrad zwischen Spender- und Empfängerspezies gering. Typischerweise tritt beim Empfänger innerhalb von wenigen Minuten oder Stunden eine hyperakute Abstoßungsreaktion auf, die ohne Behandlung letal verläuft. Durch die Erforschung diskordanter Tiermodelle konnten wichtige Einsichten über die Mechanismen der immunologischen Abstoßung gewonnen werden. Diskordante Herztransplantationen wurden unter anderem mit den Spender-Empfänger-Kombinationen Schwein-Pavian (YAMAMOTO *et al.* 2005) oder Schwein-Rhesusaffe (FISCHEL *et al.* 1991) durchgeführt.

1.1.2 Xenotransplantation in der Humanmedizin

In der Humanmedizin kommen als konkordante Spender einzig die nicht-humanen Primaten in Frage. Hinsichtlich der anatomischen, immunologischen und physiologischen Voraussetzungen sind die Großprimaten aus der Familie der Hominidae (Schimpanse, Gorilla, Pavian usw.) am besten geeignet. Einige wenige Studien am Menschen belegen, dass die Verpflanzung prinzipiell funktionieren könnte (REEMTSMA *et al.* 1964; STARZL *et al.* 1964), doch gibt es gewichtige Gründe, die ihre Verwendung einschränken bzw. ausschließen. So sind die meisten der in Frage kommenden Vertreter vom Aussterben bedroht (SOIN *et al.* 2000). Ethisch-moralische

Erwägungen auf Basis der hohen Entwicklungsstufe (phylogenetische Verwandtschaft, charakteristisches Verhalten, Intelligenz) schließen ebenfalls eine breite Anwendung aus. Durch den hohen Verwandtschaftsgrad und die damit verbundenen Ähnlichkeiten im Immunsystem und anderen Restriktionssystemen werden Xenosen (Interspezies-Übertragungen von pathogenen Organismen unter artifiziellen Bedingungen) mit spenderspezifischen Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten begünstigt (MILLARD and MUELLER 2010; MUELLER and FISHMAN 2004). Die langen Generationsintervalle, die limitierte Anzahl von Nachkommen und die hohen Aufwendungen für Haltung und Pflege würden zu überproportionalen Kosten führen (COZZI and ANCONA 2003).

Aus diesen und weiteren Gründen wurden Alternativen zur Verwendung konkordanter Spezies gesucht und gefunden. Als bestmöglicher diskordanter Spenderorganismus wird seit einigen Jahrzehnten das Hausschwein (*Sus scrofa*) betrachtet, da die Physiologie und Anatomie der inneren Organe der des Menschen ähnlich sind (HANNON *et al.* 1990; SACHS 1994). Durch die kurze Gestationsdauer von durchschnittlich 115 Tagen, die großen Würfe von teilweise über 10 Ferkeln und die frühe Geschlechtsreife ist die Reproduktion der Tiere unproblematisch (COZZI and ANCONA 2003). Weiterhin besteht die attraktive Möglichkeit, die Tiere klonen und gentechnisch den speziellen Bedürfnissen der Xenotransplantation anpassen zu können (POLEJAEVA *et al.* 2000). Durch die Möglichkeit die Tiere „designated pathogen free“ zu halten (DPF-Bedingungen), können Xenosen weitgehend vermieden werden. Zudem gibt es aus ethischer und moralischer Sicht im christlichen Kulturkreis nur wenige Einwände gegen die Verwendung als Spendertiere, da Schweine historisch gesehen zu den ältesten Nutztieren zählen und in großen Stückzahlen zur Lebensmittelerzeugung gehalten werden (TALLACCHINI 2008). Allein in Deutschland wurden im Jahr 2009 ca. 27 Millionen Schweine für die Fleischindustrie gehalten (BAUERNVERBAND 2010).

Die Xenotransplantation porciner Gewebe auf den Menschen hat sich in den letzten Jahren positiv entwickelt und es wurden bereits einige vielversprechende und richtungweisende klinische Studien durchgeführt. Unter anderem stellte sich heraus, dass die Implantation fötaler porciner Gewebe aus dem Mittelhirn (Mesencephalon) in Patienten mit Morbus Parkinson oder der Huntington'schen Krankheit zu einer Reduktion der Symptome und somit auch zur Verbesserung der Lebensqualität der Patienten führen kann (FINK *et al.* 2000; SCHUMACHER *et al.* 2000). Sehr aussichtsreich entwickelt sich die Technologie zur Verpflanzung porciner insulin-

produzierender Langerhans-Inseln. Eine Schlüsselrolle spielt hierbei die Verkapselung der Zellen mit Biopolymeren wie z.B. Alginat oder Collagen (ELLIOTT *et al.* 2000; VALDES-GONZALEZ *et al.* 2005). Die Verkapselung schützt das Transplantat vor der Immunreaktion des Patienten, erlaubt aber gleichzeitig die Diffusion von Insulin, Nährstoffen und Gasen. Die neuseeländische Biotechnologie-Firma LCT (Living Cell Technology) ist weltweit die erste Firma, die ein auf dieser Technologie basierendes Produkt (DIABECELL[®]) im Rahmen klinischer Studien an Patienten testet (HEALTH 2011). Allein in Deutschland gibt es derzeit ca. 7 Millionen registrierte Diabetiker, von denen ca. 2 Millionen von einer Insulinapplikation abhängig sind (DDS 2008) und von einem solchen Implantat profitieren könnten.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit porziner Zellen und Gewebe sind bioartifizielle Lebersysteme. Es handelt sich meist um Bioreaktoren, in denen gentechnisch modifizierte (z.B. hCD55/hCD59) porcine Hepatozyten angesiedelt werden. In Notfallsituationen können solche Systeme extrakorporal an den Blutkreislauf der Patienten angeschlossen werden und bis zur Transplantation eines humanen Organs kurzfristig die Funktion der Leber übernehmen (LEVY *et al.* 2000; SAUER *et al.* 2003).

Die Verpflanzung komplexer porziner Organe wie zum Beispiel Herz, Leber oder Niere ist aktuell nicht möglich. Um Xenotransplantationen ganzer Organe erfolgreich durchführen zu können, sind noch sehr komplexe Hürden zu überwinden. Dazu zählen aus medizinischer Sicht die immunologische Abstoßungsreaktion, verschiedene physiologische und endokrinologische Inkompatibilitäten sowie die möglichen Risiken einer Xenose durch endogenisierte, replikationsfähige virale Sequenzen, die einen integralen Bestandteil des porcinen Genoms darstellen.

Während porcine Gewebe weiterhin in klinischen Studien getestet werden, muss die Transplantation ganzer Organe noch präklinisch validiert werden. Nach einer Einschätzung der ISHLT (Internationale Gesellschaft für Herz und Lungentransplantation) könnten die ersten klinischen orthotrophen Transplantationen porciner Herzen durchgeführt werden, sobald im Tierexperiment 60 % der Tiere (mindestens 9 Individuen) wenigstens 3 Monate überleben können (COOPER *et al.* 2000).

1.1.3 Kompatibilität des Schweins

Die größten Probleme bei der Xenotransplantation vaskularisierter Organe verursacht die immunologische Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger. Bei den letzten beiden mit Menschen durchgeführten Xenotransplantationen (1992 Herz und 1994 Leber) verstarben beide Patienten innerhalb der ersten 24 Stunden an den Folgen der immunologischen Abstoßungsreaktionen (MAKOWKA *et al.* 1994). Bevor die Xenotransplantation solider Organe medizinische Realität werden kann, müssen die zugrunde liegenden Mechanismen vollständig verstanden sein und Möglichkeiten bestehen, die Ursachen bzw. die Folgen zu vermeiden. In Hinblick auf den zeitlichen Verlauf sowie die zu Grunde liegenden pathogenetischen Mechanismen und deren Morphologie werden

1. die hyperakute Abstoßung (HAR)
2. die akute vaskuläre Abstoßung
3. die T-Zell vermittelte Abstoßung und
4. die chronische Abstoßung

unterschieden. Die hyperakute Abstoßung wird im Wesentlichen durch vorbestehende Antikörper ausgelöst. Sie kann sich innerhalb weniger Minuten oder nach Stunden und Tagen entwickeln und führt praktisch ausnahmslos zum Verlust des Transplantats. Bei der Allotransplantation kann die HAR durch inkompatible Gruppen- (ABO; Abbildung 2) oder Histokompatibilitätsantigene aktiviert werden. Im Blutkreislauf des Empfängers befinden sich in diesem Fall Antikörper, die Epitope auf den Endothelzellen des fremden Organs spezifisch binden. Mit der Bildung des Antigen Antikörperkomplexes wird das Komplementsystem aktiviert und innerhalb von wenigen Minuten bis zu einigen Stunden schwillt das betroffene Organ an, zeigt eine dunkle blau-rote Verfärbung und entwickelt hämorrhagische Nekrosen, die durch Fibrinthromben in den kleinen Gefäßen entstehen und das Organ funktionsunfähig machen (BÖCKER *et al.* 2008). Bei der Xenotransplantation ist die Mehrheit (ca. 80 %) der HAR verursachenden Antikörper spezifisch für „körperfremde“ porcine Glykolipide. Typische Epitope besitzen eine oder mehrere terminale Galaktosylgruppen, die über eine alpha-1,3-glykosydische Bindung verbunden sind (PARKER *et al.* 1994). Das am besten untersuchte xenoreaktive porcine Antigen stellt die alpha-Gal-Glykosylierung ($\text{Gal}\alpha 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}$; Gal) dar (Abbildung 2). Sie ist in der Natur ubiquitär zu finden und kommt nur bei einigen wenigen Säugetieren wie den Primaten aus der Gattung der

Schmalnasenaffen (Catarrhini), zu denen auch der Mensch gehört, nicht vor (COOPER 1998; GALILI and SWANSON 1991). Durch den ständigen Kontakt z.B. über die Nahrung oder durch Pathogene bilden diese Spezies früh in ihrer Individualentwicklung hohe Titer an anti-Gal-Antikörpern. Etwa 1 % der Gesamtpopulation zirkulierender IgGs sind beim Menschen gegen dieses spezielle Antigen gerichtet (GALILI *et al.* 1988; GALILI *et al.* 1984).

Die Pathogenese der HAR ist abhängig von der Aktivierung des Komplementsystems. Die Aktivierung kann außer durch Bindung xenoreaktiver Antikörper auch durch die Erkennung der körperfremden Zelloberflächen (alternativer Pathway) und/oder Unstimmigkeiten der Komplementregulationssystemen zwischen Wirt und dem fremden Organ ausgelöst werden. Durch geeignete Maßnahmen konnte die HAR im Tiermodell bereits überwunden werden (PLATT and BACH 1991).

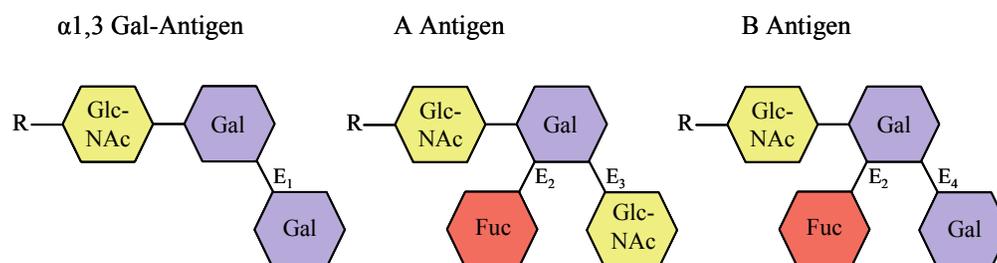


Abbildung 2: Das α 1,3-Gal Epitop und die hum. Blutgruppenantigene.

Das humane Antigen B und das porcine alpha 1,3-Gal-Epitop unterscheiden sich durch die 1,2 Fucosylierung. Diese Substitution verhindert eine Kreuzreaktion mit anti-gal Antikörpern. Für die Biosynthese der Epitope werden die Enzyme alpha1,3-Galaktosyltransferase (E1, E4), N-acetyl-galactosaminyl-transferase (E2) oder die alpha(1,2)-fucosyl-transferase benötigt. Im Unterschied zu E1 benötigt E4 zwingend fucosylierte Galaktose als Substrat. Für die Generierung von Gal-KO Tieren ist das Gen von E1 das präferierte Target.

Bleibt eine hyperakute Abstoßungsreaktion aus, so sind das Organ und der Empfänger durch eine mögliche akute humorale/vaskuläre Abstoßungsreaktion (AHR) gefährdet. Die ersten Symptome sind nach etwa 24 h zu erwarten. Die AHR ist pathologisch gekennzeichnet durch die Zersetzung des Endothels, eine allgemeine Schwellung des Organs sowie durch Ischämie und Thrombose. Oft ist eine Infiltration mononuklearer Leukozyten und neutrophiler Granulozyten zu beobachten. Die AHR wird bisweilen auch als „verzögerte Transplantatabstoßung“ bezeichnet, obwohl sie sich in wichtigen Punkten von der HAR unterscheidet. Im Gegensatz zur HAR tritt die AHR auch in Rezipienten mit inhibiertem bzw. defektem Komplementsystem auf und lässt sich durch die

Gabe von antileukozyten Antikörpern unterdrücken. Wie auch bei der HAR sind xenoreaktive Antikörper eine Grundbedingung für die Induktion der Abstoßung (CANDINAS *et al.* 1996; MIYAGAWA *et al.* 2010). Im Gegensatz zur HAR sind die Antikörper jedoch nicht präformiert, sondern werden als Reaktion des Immunsystems auf das Transplantat induziert, erkennbar an dem posttransplantationalen Titeranstieg von anti-Donor-IgMs. Diese führen zu einer Aktivierung des Endothels und leiten die Pathogenese ein. Durch eine Depletion der entsprechenden Antikörper kann die AHR vermieden werden.

Neben den humoralen Immunantworten HAR und AHR kann auch eine T-Zell-vermittelte Abstoßungsreaktion das Transplantat gefährden. In diesem Szenario erkennen T-Zellen porcine MHC-I-präsentierte Peptidantigene auf der Oberfläche der xenogenen Endothelzellen als fremdartig und aktivieren CD8 positive zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs). Als Folge wird die Apoptose der xenogenen Endothelzellen und somit das Absterben des gesamten Organs eingeleitet. Durch die Gabe von Immunsuppressiva kann dieser Prozess verzögert werden.

Auch langwierige chronische Prozesse können zum Verlust des Organs führen. Aus der Allotransplantation ist bekannt, dass sich die Blutgefäße in Transplantaten mit zunehmendem Alter verengen, innerhalb eines Zeitrahmens von einigen Monaten bis zu mehreren Jahren nekrotisch werden können und letztlich das betreffende Organ versagt. Die Mechanismen sind noch nicht vollständig geklärt, aber es ist zu erwarten, dass ähnliche Prozesse auch bei der Xenotransplantation stattfinden werden. Empirische Daten aus Tierversuchen stehen auf Grund der limitierten Funktionszeit der Organe aktuell nicht zur Verfügung.

Es gibt eine Vielzahl von Möglichkeiten, die Abstoßungsreaktionen zu inhibieren bzw. zu kontrollieren. Unter anderem können durch Immunapherese, Anti-B-Zell-Agentien, Anti-idiotyp-Antikörper oder lösliche Antigene xenoreaktive Antikörper aus dem Blutstrom des Rezipienten entfernt bzw. deren Wirkung inhibiert werden. Auch um das Komplementsystem zu manipulieren, stehen eine Reihe proteinogener Wirkstoffe wie z.B. der Cobra Venom Factor, der lösliche Komplement-Rezeptor Typ1 (SCR1) und Antikörper zur Verfügung (KROSHUS *et al.* 1995; LAM *et al.* 2005; PRUITT *et al.* 1997). Auch die Induktion von Toleranz steht im Fokus der Forschung (THIVOLET 1998).

1.1.4 Genetische Manipulation als Vorteil der XT

Trotz der größeren immunologischen Inkompatibilität zwischen Rezipienten- und Donorspezies besitzt die Xenotransplantation neben der besseren Verfügbarkeit der Organe gegenüber der Allotransplantation einen weiteren entscheidenden Vorteil. Durch die Anwendung des somatischen Kerntransfers (SCNT) ist es heute möglich die Spendertiere zu klonen und durch gezielte gentechnische Eingriffe den speziellen Bedürfnissen der Xenotransplantation anzupassen. Diese Möglichkeit ist aus verständlichen Gründen bei der Allotransplantation nicht durchführbar.

Die ersten transgenen Schweine konnten 1985 durch DNA-Mikroinjektion in Eizellen hergestellt werden (BREM *et al.* 1985; HAMMER *et al.* 1985). Die Technik hat sich seitdem stetig weiter entwickelt. Heute stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, die es erlauben, Gene an zufälligen (DNA-Mikroinjektion, retroviraler Gentransfer, SMGT, SCNT) oder definierten Positionen (homologe Rekombination mit anschließendem SCNT) in die Keimbahn oder somatische Zellen von Schweinen einzubringen (WOLF *et al.* 2000). Durch die Generierung transgener Schweine speziell für die Xenotransplantation konnte die Überlebenszeit vaskularisierter Organe im diskordanten Tiermodell bedeutend erhöht werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Überlebenszeit nicht-humaner Primaten mit transgenem Schweineorgan

Autor	Organ	Transgen	Empfänger	Max. Überlebenszeit [d]
(CHEN <i>et al.</i> 2006)	Niere	hDAF	Pavian	75
(KUWAKI <i>et al.</i> 2005)	Herz	Gal-KO	Pavian	179
(YAMADA <i>et al.</i> 2005)	Niere	Gal-KO	Pavian	83
(CHEN <i>et al.</i> 2005)	Niere	Gal-KO	Pavian	16
(KUWAKI <i>et al.</i> 2004)	Herz	hDAF	Pavian	139
(MCGREGOR <i>et al.</i> 2004)	Herz	hCD46	Pavian	113
(BALDAN <i>et al.</i> 2004)	Niere	hDAF	Makake	90
(VIAL <i>et al.</i> 2000)	Herz	hDAF	Pavian	39
(BHATTI <i>et al.</i> 1999)	Herz	hDAF	Pavian	99
(MCCURRY <i>et al.</i> 1995)	Herz	hCD59	Pavian	30 [h]

Die Überlebenszeit der Rezipienten hat sich von wenigen Stunden oder einigen Tagen auf den Zeitraum von Wochen und Monaten ausgedehnt und viele der Tiere sterben nun nicht mehr an den direkten Folgen der immunologischen Abstoßung (BAUER *et al.* 2010).

Eine der wichtigsten gentechnischen Veränderungen ist die „Humanisierung“ des porzinen Glykosylierungsmusters. Durch diese Anpassung werden Epitope für xenoreaktive Antikörper eliminiert und die HAR und AHR in Folge dessen abgeschwächt. Im Wesentlichen wurden zwei Strategien verfolgt:

1. Ausschalten der alpha-1,3-Galactosyltransferase (kodiert vom Gen GGTA1) bzw.
2. Kompetitive-Glykosylierung durch Einbringung zusätzlicher Transferasen wie der humanen alpha-1,2-Fucosyltransferase (alpha-1,2-FT) oder der beta-1,4-N-AcetylglucosaminyltransferaseIII (GnT-III)

Andere Transgene zielen auf die Manipulation des Komplement bzw. des Gerinnungssystems ab. In den letzten Jahren wurde eine ganze Reihe modifizierter Schweinelinien für die Xenotransplantation etabliert (Tabelle 2).

Tabelle 2: Zusammenstellung validierter Transgene für die Xenotransplantation

Transgen im Schwein	Ziel	Referenz
Gal-KO	Glykosylierung	(WATT <i>et al.</i> 2006)
Alpha-1,2-FT	Glykosylierung	(COSTA <i>et al.</i> 1999)
GnT-III	Glykosylierung	(MIYAGAWA <i>et al.</i> 2001)
CD46 (MCP)	Komplement	(LOVELAND <i>et al.</i> 2004)
CD55 (DAF)	Komplement	(MURAKAMI <i>et al.</i> 2002)
CD59 (MIRL)	Komplement	(NIEMANN <i>et al.</i> 2001)
THBD (Thrombomodulin)	Gerinnung	(PETERSEN <i>et al.</i> 2009)
TRAIL	Lymphozyten	(KLOSE <i>et al.</i> 2005)
HLA-E	NK-Zellen	(WEISS <i>et al.</i> 2009)
CTLA-4Ig	T-Zellen	(MARTIN <i>et al.</i> 2005)
humanes Serum Albumin	funkt. Kompatibilität	(NARUSE <i>et al.</i> 2005)
anti-PERV-shRNA	Biologische Sicherheit	(DIECKHOFF <i>et al.</i> 2008)
Transgen im Kleintiermodell (Maus)		
CD39 (Ecto-ADPase),	Gerinnung	(DWYER <i>et al.</i> 2006)
HO-1 (heme oxygenase 1)	Gerinnung	(HUANG <i>et al.</i> 2010)

Während biologische Effekte für einzelne Modifikationen bereits gezeigt werden konnten, wird es für die klinische Anwendung notwendig werden, multitransgene Schweinerassen zu generieren, um die Vorteile mehrerer Transgene in einem Tier zu vereinigen. In diesem Zusammenhang erscheint die Entwicklung ganzer künstlicher Chromosomen nützlich (CAVALIERE *et al.* 2009; POGGIALI *et al.* 2002).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Xenotransplantation porziner Organe und Gewebe mittelfristig klinische Realität werden kann. Es stehen eine ganze Reihe technischer, medizinischer und biotechnologischer Möglichkeiten zur Verfügung, um die immunologischen Abstoßungsreaktionen zu minimieren und physiologische Anpassungen vorzunehmen (D'APICE and COWAN 2009). Die Kompatibilität der porzinen Xenotransplantate kann durch genetische Veränderungen entscheidend erhöht werden.

1.1.5 Biologische Risiken der Xenotransplantation

Eine allgegenwärtige Gefahr in der Transplantationsmedizin stellt die Übertragung pathogener Erreger vom Spender auf den Empfänger dar. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahrzehnten verlässliche Tests und Vorschriften entwickelt, die das Übertragungsrisiko minimieren sollen. Die in Frage kommenden Pathogene lassen sich bei den Bakterien, Viren Pilzen, Mykobakterien und Parasiten finden (PATEL and PAYA 1997). Als Hauptrisiko-Pathogene gelten in der humanen Transplantationsmedizin die HI-Viren, die Hepatitis Viren B und C sowie das CMV. Ist ein Spenderorgan von einem solchen Pathogen befallen, ist die Übertragung auf den gesamten Organismus sehr wahrscheinlich, da passive Schutzmechanismen wie z.B. die Haut und Schleimhäute umgangen werden und es zum direkten Kontakt mit dem Blutkreislauf kommen kann. Weitere begünstigende Faktoren sind Immunsuppression, Implantate, krankheitsbedingte Stoffwechselstörungen sowie Infektionen mit immunmodulierenden Pathogenen wie z.B. HIV oder CMV (PATEL and PAYA 1997).

Bei der Xenotransplantation kann ebenfalls ein weites Spektrum an Pathogenen auf den Empfänger übertragen werden. Eine solche Übertragung würde eine „künstlich herbeigeführte“ Transspeziesübertragung darstellen und birgt besondere Risiken. Da Transspeziesübertragungen auch in der Natur vorkommen wurde zur besseren Abgrenzung der Begriff Xenozoonose oder kurz Xenose eingeführt. Auf Grund der Unterschiede zwischen altem und neuen Wirt kann bei einer Xenose das pathogene Potential des Erregers verloren gehen (z.B. fehlende Rezeptoren für

Viren), bestehen bleiben oder sich erhöhen (z.B. durch fehlende Restriktionsfaktoren). Die Koevolution zwischen Wirt und Erreger führt in der Regel dazu, dass sich Pathogene, die den Wirt nur minimal schädigen, gegenüber ihren pathogenen Verwandten durch wechselseitige Anpassung langfristig durchsetzen (ARNAUD *et al.* 2008). Aus diesem Grund sind Pathogene, die in einer Population länger zirkulieren, oft weniger pathogen als Erreger, die durch eine Transspeziesübertragung gerade endemisch werden. Beispiele, für human pathogene Erreger, die aus einer Transspeziesübertragung resultierten, sind die HI-Viren vom Typ 1 und 2 sowie verschiedene Stämme der Influenzaviren.

Um eine Xenose im Zuge der Xenotransplantation zu vermeiden, stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Unerlässlich ist in jedem Fall der Aufbau einer standardisierten und sensitiven Diagnostik, mit der sich in Frage kommende Pathogene sicher aufspüren lassen. Weiterhin lassen sich durch die Haltung der Tiere unter sterilen Bedingungen nahezu keimfreie Bestände aufbauen (TUCKER *et al.* 2002). Selbst latent persistierende porcine Herpesviren können eliminiert werden (FISHMAN and PATIENCE 2004).

Eine Sonderstellung bei der Betrachtung möglicher Xenosen bei der Xenotransplantation nehmen die porcinen endogenen Retroviren ein. Sie sind ein integraler Bestandteil des Genoms aller Schweine und lassen sich nicht durch Medikation oder Selektion aus den Herden entfernen. In *in vitro* durchgeführten Versuchen wurde zudem gezeigt, dass diese Viren humane Zellen infizieren können und in diesen ebenfalls replizieren. Aus diesem Grund ist das von ihnen ausgehende Gefahrenpotential Gegenstand aktueller Forschungen.

1.2 Das porcine endogene Retrovirus

Das porcine endogene Retrovirus gehört zur Familie der Gammaretroviren. Retroviren sind behüllte Viren, bei denen positiv orientierte, einzelsträngige RNA (ss(+)RNA) als Träger der Erbinformation dient. Im Verlauf des Replikationszyklus wird die ss(+)RNA durch das virale Enzym Reverse Transkriptase (RT) in DNA umgeschrieben und enzymatisch (Integrase) in das Genom der Wirtszelle als Provirus integriert (MODROW *et al.* 2010). Taxonomisch werden die Retroviren, nach Beschluss internationalen Komitees für Virustaxonomie (ICTV), auf Grund ihrer phylogenetischen Verwandtschaft in zwei Unterfamilien und sieben Gattungen unterteilt.

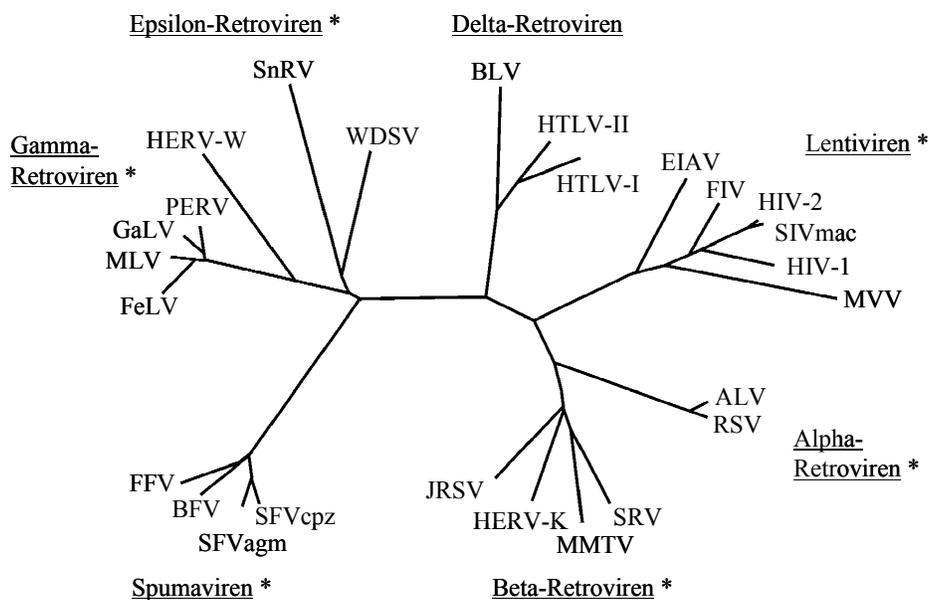


Abbildung 3: Phylogenetischer Stammbaum der Retroviren

Endogene Vertreter wurden in allen Genera (mit Asterisk) außer bei den Delta-Retroviren identifiziert (WEISS 2006). Als human pathogene Retroviren sind HTLV-1 und 2, sowie HIV-1 und 2 bekannt. Die HERV-Familie steht im Verdacht, verschiedene Krebserkrankungen hervorzurufen.

Man unterscheidet zwischen der Unterfamilie der Orthoretroviren, zu denen die Gattungen der Alpha -, Beta -, Gamma -, Delta -, Epsilon und Lentiviren gehören, und der Unterfamilie der Spumaretroviren, zu der die Gattung der Foamyviren zählt (Abbildung 3). Retroviren sind in der Wirbeltierwelt allgegenwärtig. Neben den exogenen Retroviren fand man in allen bisher untersuchten Spezies endogene Retroviren (ERVs), die vertikal über die Keimbahn vererbt werden. Für alle Gattungen außer für die Deltaretroviren sind Vertreter beschrieben. Zwar handelt

es sich bei der Mehrzahl um defekte bzw. rudimentäre Proviren, doch können diese einen beachtlichen Teil des Gesamtgenoms ausmachen.

Eine eindrucksvolle Erkenntnis des Humangenomprojektes war, dass der Sequenzanteil der humanen endogenen Retroviren (HERV) den der proteinkodierenden Gene übertrifft. Nach heutigen Schätzungen sind 5-8 % des gesamten humanen Genoms auf HERV Proviren zurück zu führen. Man fand über 31 distinkte Familien, von denen die größte HERV-H aus mindestens 1000 Vollängen-Kopien besteht (KATZOURAKIS *et al.* 2005; YI *et al.* 2006).

Das Genom des Schweins wurde noch nicht vollständig sequenziert, doch ist zu erwarten, dass der Anteil endogener retroviraler Sequenzen ähnlich hoch ist. Der Nachweis retroviraler Partikel in Überständen verschiedener porziner Zelllinien (Abbildung 4) gelang bereits in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts (ARMSTRONG *et al.* 1971; BREESE 1970; WOODS *et al.* 1973).

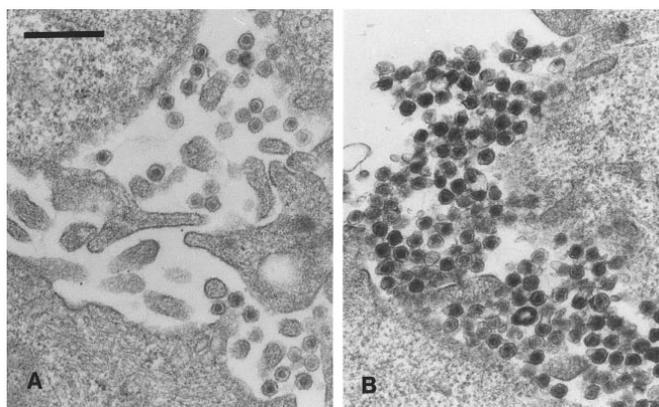


Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme PERV-produzierender Zellen.

Bild A zeigt PERV-produzierende porzine PK15-Zellen. Im Bild B sind humane 293T-Zellen zu sehen, die mit virenhaltigen Zellkulturüberständen der Zelllinie PK15 infiziert wurden und nun selbst produktiv PERV-Virionen freisetzen. Der Größenbalken entspricht 500 nm. (SPECKE *et al.* 2001b).

Bis heute konnten drei endogene replikationskompetente PERV-Subtypen (PERV-A, -B, -C) nachgewiesen werden (ERICSSON *et al.* 2001; LE TISSIER *et al.* 1997; MANG *et al.* 2001; PATIENCE *et al.* 2001). Sie werden taxonomisch der PERV-gamma1-Familie zugeordnet und unterscheiden sich in ihren Sequenzen von anderen replikationsinkompetenten porzinen endogenen Proviren der Gamma- und der anderen Gattungen (KLYMIUK *et al.* 2002; KLYMIUK *et al.* 2008).

Durch die Analyse von Punktmutationen in den Long Terminal Repeats (LTRs) konnte ihr Endogenisierungszeitpunkt eingegrenzt werden. Die Integration der ältesten LTRs vom Subtyp A

fand demnach vor $7,6 \times 10^6$ Jahren statt und korreliert mit der stammesgeschichtlichen Aufspaltung der gemeinsamen Vorfahren in Wildschweine (Suidae, *Sus scrofa*) und die amerikanischen Pekaris (Tayassuidae, *Pecari tajacu*) vor etwa $7,4 \times 10^6$ Jahren (TONJES and NIEBERT 2003). Grundvoraussetzung für die Endogenisierung war die Integration des PERV-Provirus in das Genom von Keimzellen bzw. deren Vorläuferzellen. Aus diesen Zellen haben sich im Weiteren lebensfähige Nachkommen entwickelt, die nun in jeder Zelle das Provirus tragen und es wiederum nach den Mendelschen Regeln und den Gesetzmäßigkeiten der Evolution auf ihre Nachkommen vererbt haben. Die Mechanismen einer solchen Endogenisierung sind gut am Beispiel des Koala Retrovirus (KoRV) zu verfolgen, das derzeit erfolgreich in das Genom der Koalabären endogenisiert. KoRV ist eng verwandt mit dem Murinen Leukämievirus (MLV) und dem Gibbon Affen Leukämievirus (GaLV) und wurde wahrscheinlich über Nager nach Australien verschleppt und auf die Koalas übertragen (DENNER 2007). Heute findet man im Norden Australiens Koalas sowohl mit Proviren endogenen als auch exogenen Ursprungs während man im Süden Australiens, speziell auf Kangaroo Island, auch Koalas gänzlich ohne KoRV-Infektion findet.

Seit der ersten Endogenisierung von PERV hat sich die Anzahl der Proviren weiter erhöht. Als Mechanismen kommen Reinfektionen und intrazelluläre Transpositionereignisse in Frage, wie sie auch für HERV beschrieben sind (BENIT *et al.* 1999; TURNER *et al.* 2001). Abhängig von der Rasse sind heute im Durchschnitt 50 Proviren der Familie Gamma1 im porzinen Genom enthalten (PATIENCE *et al.* 2001). Ihre biologische Funktion und ihr pathogenes Potential sind noch weitestgehend unbekannt.

1.2.1 Morphologie von PERV

PERV-Virionen besitzen den für Gammaretroviren typischen Aufbau. Die Partikelgröße beträgt etwa 100 nm (Abbildung 5). Im Zentrum der Virionen befindet sich die Erbinformation in Form zweier identischer positiv orientierter einzelsträngiger RNA Moleküle sowie die viralen Enzyme Integrase, Reverse Transkriptase und Protease. Umgeben sind diese von den Capsidproteinen die konformationsbedingt und auf Grund verschiedener Protein-Protein-Interaktionen die Form eines Polyeders einnehmen und in ihrer Gesamtheit das Capsid darstellen. Umschlossen wird das Capsid von den Matrixproteinen, die über Myristinsäure-Reste mit der Hüllmembran in Kontakt stehen. Die Lipid- bzw. Proteinstruktur der Hüllmembran ähnelt der der Wirtszelle. In der

Membran verankert befinden sich in hoher Dichte die viralen Hüllproteine (Env), die die Infektiösität und den Tropismus determinieren. Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind sie als „Spikes“ erkennbar und stellen in der Quartärstruktur ein Multimer aus dem Oberflächenhüllprotein und dem transmembranen Hüllprotein dar.

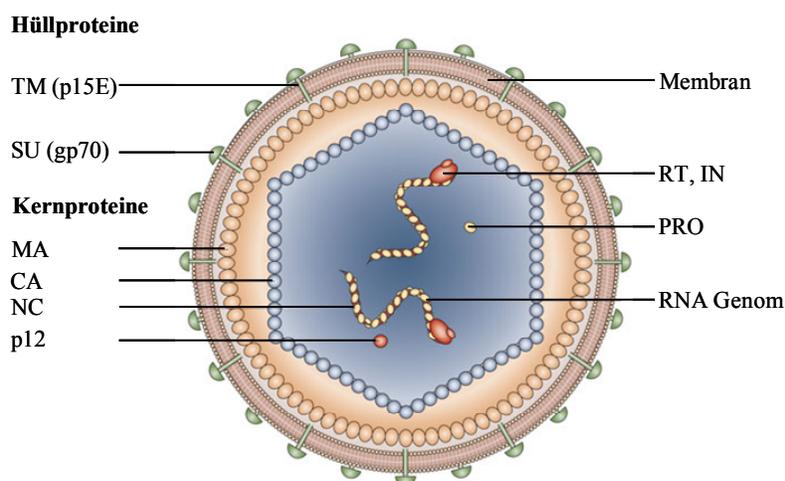


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines PERV-Partikels.

Wirtsspezifische Lipiddoppelmembran, Oberflächenhüllproteine (surface unit = SU), Transmembranen Hüllprotein (TM) Reverse Transkriptase (RT) Integrase (IN), Protease (PRO), Nukleocapsid (NC), Capsid (CA), Matrixproteine (MA). Modifiziert nach einer Abbildung von XMRV (SILVERMAN *et al.* 2010b).

1.2.2 Funktion der Env-Proteine

Ein p15E- und ein gp70-Molekül bilden jeweils ein Dimer, das sich mit zwei weiteren dieser Heterodimere zu einer trimären Gesamtstruktur zusammenlagert. Das Oberflächenhüllprotein spielt eine maßgebliche Rolle bei der Rezeptorerkennung, und die transmembranen Hüllproteine verankern den Gesamtkomplex in der Membran und übernehmen wichtige Funktionen bei der Membranfusion im Zuge des Infektionszyklus. Das SU Protein ist wirtsspezifisch glykosyliert. Essentiell für die Infektiösität von PERV und von Retroviren im Allgemeinen ist speziell die N-Glykosylierung. Als Beispiel sei das gp120 von HIV genannt. Es besitzt 24 putative N-Glykosylierungsstellen, von denen sich fünf in der aminoterminalen Hälfte befinden und für die Bindung an den CD4 Rezeptor unentbehrlich sind. Die Hüllproteine von PERV-A und PERV-B besitzen sieben und fünf N-Glykosylierungsstellen (LE TISSIER *et al.* 1997). Sie sind strukturgebend für gp70 und analog zu HIV notwendig für die Rezeptorbindung (ERICSSON *et al.*

2003). Eine Veränderung des Glykosylierungsmusters der Wirtszelle kann zum Verlust der Infektiosität führen.

Im Allgemeinen wird der Tropismus von PERV durch das Oberflächenhüllprotein gp70 determiniert. Während das transmembrane Hüllprotein bei den drei PERV-Subtypen A, B und C als homolog angesehen werden kann, beinhaltet das Oberflächenhüllprotein einen Bereich mit spezifischen Sequenzunterschieden. Dieser Bereich wird als Rezeptorbindedomäne bezeichnet. Auf Grund dieser Unterschiede sind die Partikel von PERV-A und PERV-B in der Lage, sowohl humane als auch nichthumane Zellen zu infizieren (polytrop), wohingegen PERV-C nur porcine Zellen infizieren kann (ecotrop). Die beiden Bereiche mit der höchsten Varianz innerhalb der Rezeptorbindedomäne sind als variabler Bereiche A (VRA) und B (VRB) definiert (Abbildung 38).

Neben den endogenen Proviren der Typen A, B und C konnten vorrangig in lymphatischen Zellen von Schweinen und in diversen Zellkulturen chimäre, *de novo* integrierte PERV-Proviren nachgewiesen werden. Sequenzanalysen ergaben, dass es sich um rekombinante PERVs der Subtypen PERV-A und PERV-C handelte. Die sogenannten PERV-A/C-Rekombinanten besitzen die Rezeptorbindedomäne von PERV-A und sind wie dieser Subtyp in der Lage, ein breites Spektrum an humanen und nichthumanen Zellen zu infizieren (DENNER *et al.* 2001; WILSON *et al.* 2000). PERV-A/C-Rekombinanten konnten bislang noch nicht in der Keimbahn nachgewiesen werden und gilt als ausschließlich exogen vorkommend.

Neben der rezeptorvermittelten Infektion kann ebenfalls eine rezeptorunabhängige Infektion ohne Beteiligung der Env-Proteine stattfinden (LAVILLETTE and KABAT 2004).

1.2.3 Organisation der Erbinformation von PERV

Die Proviren von PERV haben eine charakteristische Organisation. Der größte Teil der Proviren liegt verstreut über alle Chromosomen endogen integriert (d. h. mit konstanter Lokalisation) im Genom vor. Für die *de novo* integrierten Proviren konnten keine präferierten Insertionsorte definiert werden, jedoch wurde festgestellt, dass Sequenzabschnitte mit erhöhtem CpG Aufkommen bevorzugt werden (MOALIC *et al.* 2009). PERV-Proviren haben eine Länge von ca. 9 kbp. An beiden Enden befinden sich sequenzidentische direkte, repetitive Sequenzen, die als Long terminal Repeats (LTRs) bezeichnet werden. Die LTRs übernehmen verschiedene Funktionen. Zum einen sind sie essentiell für die Reverse Transkription des RNA-Genoms und

die Integration des Provirus in die Wirtszelle, zum anderen dienen sie als Promotoren für die Transkription der viralen Gene innerhalb des Provirus. Zwischen beiden LTRs befinden sich zwei offene Leserahmen. Der erste kodiert die gruppenspezifischen Antigene (*gag*) sowie die viralen Proteine Reverse Transkriptase, Integrase und Protease (*gag/pol*). Der zweite Leserahmen kodiert die viralen Hüllproteine (Abbildung 6). Weitere Leserahmen für akzessorische Proteine, wie sie zum Beispiel im HIV-Provirus vorhanden sind, konnten im PERV-Genom nicht nachgewiesen werden. Das PERV-Provirus beinhaltet jedoch weitere funktionale Sequenzbereiche. Zu diesen gehören die Primer Bindestelle (komplementär zu den letzten 18 Nukleotiden der tRNA_{Gly}) (BARTOSCH *et al.* 2002), das virale Verpackungssignal, der Spleißdonor, der Spleißakzeptor, die Polypurinstelle sowie verschiedene cis aktive Elemente (z.B. NFY Bindestelle innerhalb der LTRs). PERV besitzt zwei Spleißvarianten. Beide werden ausgehend von der 5' LTR transkribiert. Die erste Spleißvariante umfasst das gesamte Genom und dient zum einen als ss (+) RNA Genom für neue Virionen und zum anderen als Matrize für die Transkription der viralen *gag* bzw. *gag/pol* Gene. Die zweite Spleißvariante kodiert ausschließlich die Env-Proteine.

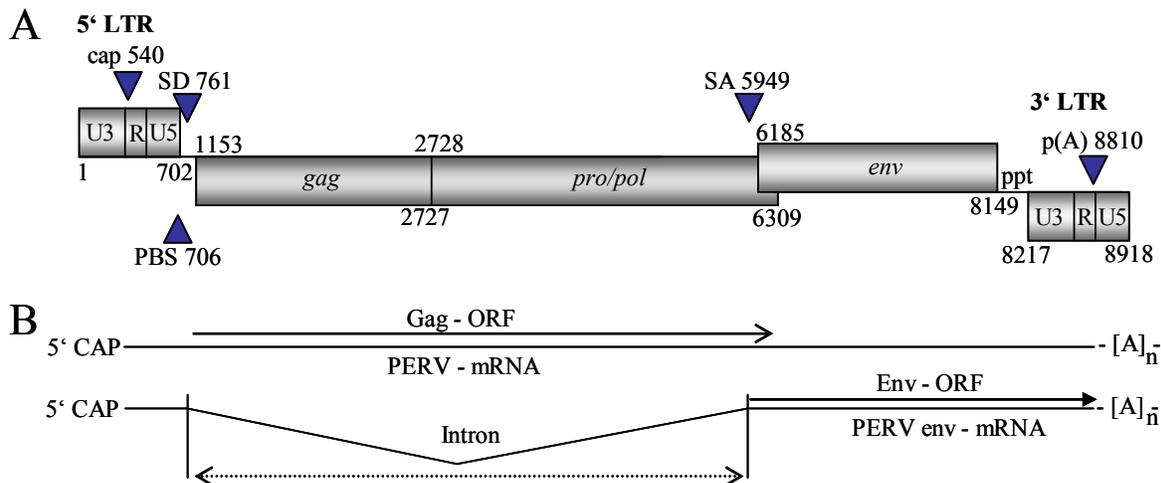


Abbildung 6: Organisation des PERV-Genoms

Bild A zeigt schematisch das PERV-A-Provirus AJ293656 und Bild B die von der 5' LTR beginnend transkribierten RNA-Moleküle. Bei der Transkription von PERV werden Vollängen-RNA (die für die Gag-, Pro-, Pol- und In-Proteine kodiert sowie in neue Partikel verpackt wird) und eine Spleißvariante (die ausschließlich die Env Proteine kodiert) gebildet. Modifiziert nach (KRACH *et al.* 2001).

1.2.4 Replikationszyklus

Die Infektion der Zielzelle erfolgt in den meisten Fällen rezeptorvermittelt. Der externe Teil des Hüllproteinkomplexes sorgt dabei für die Adsorption der Virionen an die Zielzelle.

Im Jahr 2003 wurden erstmals zwei zelluläre Membranproteine beschrieben, die für PERV-A als Rezeptor fungieren können (ERICSSON *et al.* 2003). Beide Proteine sind sequenzverwandt und erhielten die Namen humaner PERV-A-Rezeptor 1 und 2 (HuPAR-1; HuPAR-2). Die entsprechenden Gene sind auf den humanen Chromosomen 8 und 17 lokalisiert. Ihre biologischen Funktionen sind noch weitestgehend unbekannt. Ihre Expression konnte jedoch in einer Vielzahl humaner Gewebe und in PBMCs nachgewiesen werden (ERICSSON *et al.* 2003). Bei HuPAR-1 handelt es sich wahrscheinlich um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor für Gamma-hydroxybutyrat, der eine Rolle im Gehirnstoffwechsel spielt (ANDRIAMAMPANDRY *et al.* 2007). Infektionsstudien haben gezeigt, dass die virale Rezeptorfunktion von HuPAR-2 elf mal höher als die von HuPAR-1 ist (MARCUCCI *et al.* 2009).

Durch die Bindung der viralen Hüllproteine an die zellulären Rezeptoren werden Konformationsänderungen eingeleitet, die zur Fusion von zellulärer und viraler Membran führen. Das Capsid gelangt auf diese Weise in das Zytoplasma der Wirtszelle. Anschließend dissoziieren die Capsidproteine voneinander und geben die enthaltenen Enzyme sowie die virale RNA frei. Es erfolgt nun die Reverse Transkription der einzelsträngigen RNA in doppelsträngige DNA, und es entsteht der 20-30 nm große Präintegrationskomplex. Da PERV keine akzessorischen Proteine besitzt, kann der Präintegrationskomplex nur während der mitotischen Teilung mit der Wirts DNA interagieren. Während der Integration entfernt die Integrase jeweils zwei Nukleotide von der doppelsträngigen DNA, so dass auf beiden Seiten 5' Überhänge entstehen. Im Anschluss schneidet die Integrase die zelluläre DNA an einer willkürlichen Stelle in einer Weise, dass auch hier überhängende 5' Enden entstehen. Die 5' Enden der zellulären DNA und die viralen 3' Enden werden durch die Ligaseaktivität der Integrase verbunden und Basenfehlpaarungen bzw. Lücken über die zellulären Reparaturmechanismen beseitigt. Das Provirus ist nun in die Zelle integriert und eine Expression der viralen Gene kann stattfinden.

Ausgehend von der 5' LTR werden beide viralen Leserahmen transkribiert (Abbildung 6). Die Translation der env-mRNA findet am rauen endoplasmatischen Retikulum statt. Nach der Translokation des Vorläuferproteins in das Lumen des ER und der Verankerung in der Membran

über den transmembranen Bereich von TM-Anteil erfolgt die Glykosylierung und die proteolytische Spaltung in gp70 und p15E durch die zelluläre Furinprotease. Anschließend lagert sich der Hüllproteinkomplex zusammen und wird über den Golgi-Apparat auf die extrazelluläre Seite der Zellmembran transportiert.

Die Translation der Vollängen-RNA erfolgt im Zytoplasma an freien Ribosomen. Durch eine Verschiebung des ribosomalen Leserasters am uridinreichen 3' Ende des Gag Leserahmens kann ebenfalls ein Gag-Vorläuferprotein mit translational fusionierten Pol, IN, Pro Proteinen entstehen (Gag/Pol). Das Verhältnis zwischen Gag und Gag/Pol Fusionsprodukt liegt bei etwa 95:5. Die Gag-Vorläuferproteine akkumulieren auf Grund intermolekularer Wechselwirkungen und den c-terminalen Myristinsäure-Rest im Bereich der Zellmembran. Ein kleiner Teil der Vollängen-RNA-Population wird dabei über psi-Elemente und Zinkfinger motive in die sich bildenden Gag-Vesikel eingebaut, die sich anschließend von der Zellmembran abknospen (Budding). In den Partikeln herrscht, bedingt durch die AS-Zusammensetzung der Gagvorläufer, ein leicht saures Milieu, das die Gag/Pol Dimerisierung im Bereich der Proteasedomäne begünstigt und deren Aktivität steigert. Die virale Protease wird freigesetzt und spaltet die Gag-Vorläuferproteine in ihre entsprechenden Untereinheiten, die vermittelt durch Protein-Protein-Wechselwirkungen in konzertierter Weise die Form eines Polyeders einnehmen. Die Reifung und Morphogenese neuer viraler Partikel ist mit diesem letzten Schritt abgeschlossen. Befindet sich auf der Oberfläche der entstandenen Partikel genügend Env, so ist das neue Partikel potentiell infektiös und ein neuer Infektionszyklus kann beginnen.

1.2.5 Pathogenes Potential

Viele exogene Retroviren induzieren im infizierten Wirt eine Immundefizienz (AIDS). Für die meisten Familien der Retroviren konnten Vertreter beschrieben werden, die eine Immunschwäche durch eine Verringerung der CD4 positiven T-Zellen verursachen und in Folge dessen den Wirt anfällig für opportunistische Infektionen machen. Der Mechanismus der Immundefizienz ist noch weitgehend ungeklärt, allerdings gibt es Daten, die den Schluss nahe legen, dass die transmembranen Hüllproteine einen direkten immunsuppressiven Effekt besitzen (TACKE *et al.* 2000). In den transmembranen Hüllproteinen verschiedener Retroviren wurde ein konservierter Bereich identifiziert, dem immunsuppressive Eigenschaften zugeordnet werden konnten und der als immunsuppressive Domäne (ISU-Domäne) bezeichnet wird (DENNER 1998; DENNER *et al.*

1994; DENNER *et al.* 1996). Die ISU-Domäne der Viren FeLV, MuLV, GaLV und KoRV ist identisch zu der von PERV (siehe Abbildung 7), und alle der genannten Vertreter induzieren im Wirt eine Immundefizienz (TACKE *et al.* 2000). Aus diesem Grund scheint es naheliegend, dass auch PERV das Potential besitzt AIDS-ähnliche Symptome zu verursachen. Im natürlichen Wirt, also dem Hausschwein, konnte dieser Effekt bislang noch nicht nachgewiesen werden, jedoch gelten die immunsuppressiven Eigenschaften von PERV-p15E zumindest *in vitro* als gesichert (TACKE *et al.* 2000).

PERV-A	532	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L	C
PERV-B	529	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	R	E	G	G	L	C
PERV-C	511	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L	C
Tsukuba-1	511	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L	C
GaLV	559	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L	C
MuLV	538	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L	C
FeLV	514	L	Q	N	R	R	G	L	D	I	L	F	L	Q	E	G	G	L	C
BaEV	440	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	T	A	E	Q	G	G	I	C
HTLV-1	376	A	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	W	E	Q	G	G	L	C
HIV-1	576	L	Q	A	R	I	L	A	V	E	R	Y	L	K	D	Q	Q	L	L

Abbildung 7: Sequenzvergleich der ISU-Domäne verschiedener Retroviren

Die ISU-Domäne ist ein konservierter Bereich innerhalb des TM-Proteins verschiedener Retroviren und ist mit immunsupprimierenden Eigenschaften assoziiert. PERV-A, Y12238; PERV-B, Y12239; PERV-C, AF038600; Tsukuba-1, AF038599; FeLV, M18247; MuLV, J02255; GALV, M26927; BaEV, 218569; HTLV-I, J02029; HIV-1, K03455; nach (TACKE *et al.* 2000)

Auch andere Retroviren induzieren im natürlichen Wirt keine Immunsuppression, sondern entfalten ihr pathogenes Potential erst nach einer Transspeziesübertragung. Als prominentes Beispiel sei an dieser Stelle HIV-1 genannt, das trotz hoher Titer im natürlichen Wirt keine Symptome verursacht, allerdings beim Menschen und Pavian eine starke Immunsuppression hervorruft. Der zu Grunde liegende Mechanismus ist Gegenstand intensiver Forschungen.

Ein weiteres Pathogenitätsmerkmal einer Vielzahl von Retroviren ist ihr Tumor-induzierendes Potential. Da die Integration der Proviren während einer Infektion in den meisten Fällen zufällig erfolgt, besteht eine geringe Wahrscheinlichkeit, dass eines der Proviren durch Insertion ein Tumorsuppressorgen inaktiviert bzw. durch Integration vor ein Onkogen dessen Transkription verstärkt und auf diese Weise eine Tumorentstehung induziert.

Viele der nächsten Verwandten von PERV verursachen z.B. Leukämien. Diesem Umstand wurde bereits bei der entsprechenden Namensgebung Rechnung getragen (LV=leukemia virus; z.B. FeLV, GaLV, MLV; Abbildung 3). In malignen Tumoren von Schweinen der Rasse Troll konnte kürzlich eine erhöhte Expression von PERV und *de novo* Integrate einer A/C-Rekombinante nachgewiesen werden (DIECKHOFF *et al.* 2007b). Ob die erhöhte Expression von PERV die Entstehung der Tumore bedingt bzw. die PERV-Expression in Tumoren generell erhöht ist, konnte bislang noch nicht nachgewiesen werden (DIECKHOFF *et al.* 2007b). Ein Zusammenhang zwischen Tumorneogenese und Expression endogener retroviraler Sequenzen scheint naheliegend und wird auch im Kontext der HERVs untersucht.

Sollte trotz aller Vorkehrungen eine Transspeziesübertragung mit produktiver PERV-Infektion möglich sein bzw. stattfinden, so könnte das pathologische Erscheinungsbild durch eine induzierte Immunschwäche und Lymphomentstehung geprägt sein.

1.3 Strategien zur Vermeidung einer PERV-Xenose

Die Übertragung von PERV auf Empfänger von Xenotransplantaten stellt ein derzeit schwer einzuschätzendes Risiko dar. Auf der einen Seite konnten in verschiedenen Infektionsstudien (DENNER *et al.* 2001; MARTIN *et al.* 2002; SPECKE *et al.* 2002a; SPECKE *et al.* 2002b) und ersten klinischen Xenotransplantationen (GARKAVENKO *et al.* 2004; IRGANG *et al.* 2003; SAUER *et al.* 2003) keine PERV-Transmissionen festgestellt werden. Auf der anderen Seite ist das Wissen um die PERVs noch zu gering, um eine Übertragung ausschließen zu können. Erschwerend kommt hinzu, dass durch die Entwicklung transgener immunokompatibler Spendertiere die Immunantwort auf die vom Transplantat produzierten viralen Partikel ebenfalls moduliert werden kann und gerade in diesem Zusammenhang kaum verlässliche Daten vorliegen.

Aus diesem Grund befinden sich verschiedene Strategien zur generellen Vermeidung von Xenosen durch PERV in der Erprobung. In der vorliegenden Arbeit werden speziell (i) die RNAi vermittelten PERV-Inhibition, (ii) die Entwicklung antiretroviraler Impfstoffe sowie (iii) Methoden zur Identifizierung von Schweinen mit niedriger PERV-Last mit praktischen Experimenten untersucht und anschließend diskutiert.

1.3.1 Antiretrovirale Chemotherapie

Im Fall einer Virämie ist eine antiretrovirale Chemotherapie eine geeignete erste Maßnahme zur Prophylaxe bzw. Behandlung der Infektion. Es steht eine ganze Reihe von Wirkstoffen zur Verfügung, die bereits zur Behandlung von HIV-1 zugelassen sind und auch auf PERV inhibierend wirken. Am vielversprechendsten sind Nukleosidische-Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI). Sie hemmen als Nucleosid-Analoga kompetitiv die vireneigene Reverse Transkriptase und verhindern somit die Reverse Transkription des Virengenoms in DNA. Die Integration des Virus ins Genom der Zielzelle und die anschließende Replikation sind somit unterbunden. Die meisten NRTIs wirken auf ein breites Spektrum von Retro-Viren. Als potentestes Mittel zur Inhibition von PERV hat sich Ziduidin (AZT) erwiesen (SHI *et al.* 2007; STEPHAN *et al.* 2001).

Der Wirkstoff Nevirapin, ein nicht-nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor (NNRTI), der nicht kompetitiv bindet, führt bei HIV-1 zu einer Verlangsamung der Synthesegeschwindigkeit der Reversen-Transkriptase. Auf PERV hat er keine Wirkung (SHI *et al.* 2007).

Die gegen HIV-1 eingesetzten Protease-Inhibitoren Indinavir, Nelfinavir, Saquinavir, Ritonavir, und Amprenavir haben auf PERV ebenfalls keine Wirkung (QARI *et al.* 2001).

1.3.2 RNAi

Die RNA Interferenz (RNAi) spielt eine bedeutende Rolle bei der posttranskriptionalen Genregulation. Es wird angenommen, dass mindestens 20-30 % aller humanen Gene über RNAi reguliert werden (KREK *et al.* 2005; LEWIS *et al.* 2005; YOON and DE MICHELI 2005).

Als Mediator der RNAi wurden kurze komplementäre RNA Moleküle identifiziert (anti-sense RNA; siRNA), die über homologe Basenpaarung mit der Ziel-RNA hybridisieren und eine enzymatisch gesteuerte Degradation oder translationale Blockade einleiten.

Die regulatorischen Antisense-RNAs werden unter natürlichen Bedingungen von RNA-Polymerase II oder III Promotoren als Vorläufer-RNAs transkribiert und durch die Enzyme Drosha (im Kern) und Dicer (im Zytoplasma) in die aktiven siRNAs prozessiert. Eine *in vitro* Transfektion der siRNAs ist möglich.

Die RNAi stellt eine der Möglichkeiten dar, das Übertragungsrisiko von PERV zu verringern. In ersten Untersuchungen konnten wirksame siRNAs identifiziert werden, deren Transfektion in PERV-produzierende Zellen eine Reduktion der PERV-Expression zur Folge hatten (KARLAS *et al.* 2004). Im weiteren Verlauf wurden lentivirale Transduktionssysteme entwickelt, um die effektivste der gefundenen siRNAs (pol2) als stabil exprimierte shRNA in das Genom PERV-produzierender primärer porziner und anderer Zelllinien einbringen zu können (DIECKHOFF *et al.* 2007a). Der inhibierende Effekt auf die PERV-Expression konnte auch mit diesem System erfolgreich nachgewiesen werden. Letztlich stellte sich die Frage, ob aus den primären Zelllinien durch somatisch nukleare Klonierung überlebensfähige Schweine generiert werden können, die durch eine reduzierte PERV-Expression charakterisiert sind. Im Jahr 2007 wurden erstmals shRNA-transgene Ferkel geboren, die im Vergleich zu nicht-transgenen Tieren eine reduzierte PERV-Expression in verschiedenen Organen aufwiesen (DIECKHOFF *et al.* 2008).

Da für die Probennahme eine Schlachtung der Tiere unumgänglich war, wurden neue shRNA transgene Tiere generiert und im Zuge dieser Arbeit analysiert. Weiterhin wurde nach weiteren effektiven shRNA Sequenzen gesucht.

1.3.3 Impfstoffe

Eine andere vielversprechende Möglichkeit, die Übertragung von PERV auf den Xenotransplantat Empfänger zu verhindern, bietet die Immunisierung des Patienten vor der Transplantation. Im Fall, dass vom Xenotransplantat Virionen freigesetzt werden, sollen diese durch die induzierten Antikörper spezifisch gebunden und neutralisiert werden, bevor eine Transmission stattfinden kann. Für verschiedene Vertreter der Gammaretroviren wurden bereits leistungsstarke Vakzine entwickelt. Leucogen (Virbac) und Nobivac (Intervet) sind Beispiele für Subunit-Vakzine, die auf dem rekombinanten unglykosylierten Oberflächenprotein p45 vom feline Leukämievirus basieren.

Die Induktion PERV-neutralisierender Antikörper durch die Immunisierung von Ziegen mit dem in *E. coli* rekombinant hergestellten transmembranen Hüllprotein p15E ist bereits beschrieben (FIEBIG *et al.* 2003). Die Seren der immunisierten Ziegen erkannten zwei Haupt-Epitope. Eines befand sich in der Fusionsprotein-Proximalen-Region (FPPR) und wurde als E1 bezeichnet. Das zweite befand sich in der Membranproximalen-Externen-Region (MPER) und heißt E2. Da keine adäquaten Tiermodelle für Effizienz-Analysen eines solchen Impfstoffes *in vivo* zur Verfügung

standen, wurden Immunisierungen mit analog hergestellten, rekombinanten Hüllproteinen des nahe verwandten FeLV durchgeführt. In den Versuchen wurden Ratten, Ziegen und Katzen immunisiert und erfolgreich neutralisierende Antikörper induziert. Interessanterweise zeigten die induzierten Antikörper ein zum PERV-Vakzin ähnliches Verteilungsmuster der für die Neutralisation relevanten Epitope (LANGHAMMER *et al.* 2005). Challenge-Versuche mit infektiösem FeLV zeigten, dass die Immunisierung mit p15E in 50 % der Fälle und die Immunisierung mit rekombinantem Oberflächenhüllprotein in allen Fällen vor einer Antigenemie schützten. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass eine Immunisierung mit beiden Proteinen zu einem besonders hohen Titer an neutralisierenden Antikörpern führt.

Neben der Relevanz für die Xenotransplantation könnte die Entwicklung wirksamer PERV-Impfstoffe auch für die Entwicklung eines HIV-Vakzines von Nutzen sein. HIV und Gammaretroviren besitzen strukturelle Ähnlichkeiten der Hüllproteine. Interessant ist zum Beispiel, dass die Epitope neutralisierender Antikörper von FeLV und PERV eine ähnliche Lokalisation in der viralen MPER besitzen, wie auch die HIV-1-neutralisierenden Antikörper 2F5 und 4E10. Ebenfalls scheint trotz der evolutionären Distanz zwischen den Epitopen im gp41 von HIV-1 und p15E von PERV, FeLV und anderen Gamma-Vertretern eine gewisse Sequenzhomologie zu bestehen (FIEBIG *et al.* 2003).

1.3.4 Prävalenzanalysen

Verschiedene wissenschaftliche Arbeiten haben gezeigt, dass PERV ein integraler Bestandteil aller Schweine ist. Die Anzahl, Subtypenzusammensetzung und Expression der Proviren unterliegt jedoch rassenspezifischen Schwankungen (DIECKHOFF *et al.* 2009; TACKE *et al.* 2003). Einige Autoren gehen davon aus, dass besonders die Domestizierung zu einer stetigen Zunahme der Anzahl von PERV-Providern geführt hat (MANG *et al.* 2001).

Für die Virus-Sicherheit bei der Xenotransplantation ist es von besonderem Interesse, Individuen oder ganze Rassen mit niedriger „PERV-Belastung“ zu identifizieren und diese für den Aufbau geeigneter transgener Schweinelinien zu nutzen. Weiterhin soll durch geeignete Zuchtwahl der PERV-Subtyp C aus den Spendertierbeständen eliminiert und somit eine A/C Rekombination effektiv verhindert werden. In den letzten Jahrzehnten wurde eine ganze Reihe sensitiver Assays entwickelt, mit denen diese Ziele erreicht werden können (TACKE *et al.* 2001).

In der vorliegenden Arbeit wird das methodische Spektrum durch verschiedene PCR basierende Techniken erweitert.

1.3.5 Andere Strategien

Neben den in dieser Arbeit praktisch untersuchten Strategien befinden sich weitere Methoden in der Erprobung. Diese sind unter anderem:

1. die Generierung transgener Schweine mit erweitertem Spektrum verschiedener Restriktionsfaktoren (z.B. hAPOBEC3G)
2. die Veränderung des Glykosylierungsmusters porziner Zellen und damit Herabsetzung der Infektiösität von PERV
3. Entwicklung PERV-inhibierender Ribozyme
4. Knockout von PERV unter Anwendung spezifischer Zinkfinger nukleasen
5. die mechanische Verkapselung porziner Zellen und Gewebe durch Polymere

Da keine der bisher untersuchten Möglichkeiten einen hundertprozentigen Transmissionsschutz verspricht, ist es vorstellbar, dass eine Kombination der Verfahren letztendlich zum Erfolg führen könnte. Gerade im Zusammenhang mit der Entwicklung kompletter künstlicher porziner Chromosomen scheint dieser Ansatz realisierbar, erfordert allerdings weitere Grundlagenforschung.

1.4 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit befasst sich als Teilprojekt der DFG-geförderten Transregio-Forschergruppe Xenotransplantation mit verschiedenen Strategien zur Minimierung des Übertragungsrisikos von PERV im Zuge zukünftiger klinischer Xenotransplantationen.

Die folgenden Aspekte sollten untersucht werden:

1. Langzeitcharakterisierung shRNA-(pol2)-transgener Schweine
2. Validierung neuer shRNA-Sequenzen und Entwicklung von Multi-shRNA-Vektoren
3. Erweiterung der Daten zu anti-retroviralen Impfstoffen auf Basis rekombinant hergestellter Hüllproteine von PERV
4. Entwicklung sensitiver diagnostischer Verfahren zur Prävalenzanalyse von PERV in verschiedenen Schweinerassen.

2 Material

2.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von Sigma Aldrich Chemie GmbH (Deutschland) oder Carl Roth GmbH (Deutschland) bezogen.

2.2 Bakterienstämme

Für Klonierungsarbeiten und zur Herstellung von Plasmidpräparation wurden *E. coli* Top10 und DH5 α verwendet und die Proteinexpressionen erfolgten mit den *E. coli* Stämmen BL21-CodonPlusTM(DE3)-RP bzw. BL21 RosettaTM 2(DE3)pLysS (Tabelle 3).

Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp
Top10 F'	<i>E. coli</i> F' { <i>lacIq</i> , <i>Tn10</i> (TetR)} <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara</i> <i>leu</i>) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>
DH5 α	<i>E. coli</i> F- <i>gyrA462</i> <i>endA1</i> Δ (<i>sr1</i> - <i>recA</i>) <i>mcrB</i> <i>mrr</i> <i>hsdS20</i> (rB ⁻ , mB ⁻) <i>supE44</i> <i>ara-14</i> <i>galK2</i> <i>lacY1</i> <i>proA2</i> <i>rpsL20</i> (SmR) <i>xyl-5</i> λ - <i>leu</i> <i>mtl1</i>
BL21-CodonPlus TM (DE3)-RP	<i>E. coli</i> B F- <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (rB ⁻ , mB ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tetr gal λ (DE3) <i>endA</i> Hte [<i>argU</i> <i>proL</i> Cam ^r]
Rosetta TM 2(DE3)pLysS	<i>E. coli</i> B F- <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> (rB ⁻ , mB ⁻) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3) pLysSpRARE23 (Cam ^r)

2.3 Plasmide

Für die Experimente wurden verschiedene kommerzielle Vektoren verwendet. Eine Auflistung aller relevanten Plasmide und deren Derivate ist in folgender Tabelle zu sehen (Tabelle 4).

Tabelle 4: Liste von Plasmiden und deren Derivat

GenBank	Bemerkung	Referenz
<u>pET-22b(+)</u>	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> ; AmpR, N-terminal <i>pelB</i> Signalpeptid, C-terminal His-Tag, T7-Promotor	Novagen
pet-22b(+)_gp70_PERV	PERV SU (EcoRI/SalI) kloniert aus PK15-DNA	C. Wurzbacher
Pet-22b(+)_gp70_KoRV	KoRV SU (EcoRI/SalI) kloniert aus DNA von KoRV infizierten 293-Zellen	C. Wurzbacher
<u>pCAL-n</u>	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> ; AmpR, N-terminal	Stratagene

	CBP-Tag, T7 Promotor	
pCal-n-p15E PERV	PERV-TM kloniert aus PK15-DNA	Dr. U. Fiebig
pCal-n-p15E KoRV	KoRV-TM kloniert aus DNA KoRV infizierter 293-Zellen	C. Wurzbacher
<u>pBluescript II KS</u>	Klonierungsvektor für <i>E. coli</i> , AmpR, LacZ	Stratagene
pBluescript envC1	EnvC Real-time Fragment blunt ends in SmaI	Diese Arbeit
pBluescript hGAPDH	hGAPDH Real-time Fragment EcoRI/BamHI	Diese Arbeit
<u>pSUPER.basic</u>	pSUPER RNAi System TM ; AmpR, H1 Promotor	oligoengine
pSuper pol2	Pol2 shRNA Oligos BglII/HindIII inseriert	Dr. A. Karlas
pSuper Mfe I	Mfe I Schnittstelle durch Mutagenese PCR in MCS H1 downstream eingefügt	Diese Arbeit
pSuper Mfe I shRNA X	shRNA Oligos Bgl2/HindIII inseriert; pol1, pol2, pol3, pol4, gag1, gag2, envA1, envA2, envB1, envB2, Luzi	Diese Arbeit
<u>RNAi-Ready pSIREN-RetroQ</u>	selbstinaktivierender Retroviraler Vektor; AmpR, PuroR, U6 Promotor	Clontech
pSiren ΔU6	Insertion der Oligos pSirU6 del for & rev, anschließende Deletion von U6 durch BglII Verdau und Religation	Diese Arbeit
pSiren shRNA X	shRNA-Kassetten EcoRI als MfeI/EcoRI Fragment aus pSuper MfeI shRNA X inseriert; pol1, pol2, pol3, pol4, gag1, gag2, Luzi, envA1, envA2, envB1, envB2	Diese Arbeit
pSiren shRNAX/pol2;	shRNA-Kassetten EcoRI als MfeI/ExoRI Fragment aus pSuper MfeI shRNA X in pSiren pol2 inseriert	Diese Arbeit
pSiren ΔU6 pol1 G418	G418 aus pCDNA3.1 über PCR amplifiziert (Primer X,Y); EcoRI/BamHI in pSiren U6 Del kloniert; shRNA-Kassette aus pSuper Mfe I pol2 MfeI/EcoRI in MfeI kloniert	Diese Arbeit
<u>pLVTHM</u>	Selbstinaktivierender lentiviraler Vektor; GFP, H1 (in 5' LTR)	addgene
pLVTHM pol2	EcoRI, ClaI Insertion der H1 pol2 Kassette aus pSuper pol2	Dr. A. Karlas
<u>pMAD2.G</u>	VSV-G unter CMV Promotor	addgene
<u>pLXSN</u>	retroviraler Vektor, Genkonstrukt unter Kontrolle der 5' LTR; G418 Resi	Clontech
pLXSN GFP	GFP Fragment aus pLVTHM mit PCR amplifiziert (GFP for und rev) und EcoRI/BamHI kloniert	Diese Arbeit

2.4 Antikörper/Seren

Für die diagnostischen Verfahren Immunfluoreszenzmikroskopie (IMF), Western Blot (WB) und ELISA wurden verschiedene kommerziell erhältliche Antikörper sowie Seren, die bereits im Vorfeld vorhanden waren, verwendet (Tabelle 5).

Tabelle 5: Benutzte Antikörper und Antiseren

Antikörper/Seren	Verd.	Anwendung	Hersteller bzw. Referenz
FITC Kaninchen anti-Ziege IgG	1:160	IMF	Sigma
Rabbit anti-Rat Immunoglobulins-HRP	1:1000	WB/ELISA	Dako
Rabbit anti-Mouse Immunoglobulins-HRP	1:1000	WB/ELISA	Dako
Goat anti-guinea pig IgG-HRP	1:1000	WB/ELISA	Dako
Anti-Rabbit-Immunoglobulins-HRP	/1:2000	WB/ELISA	Dako
Rabbit anti goat-Immunoglobulins-HRP	1:2000/1:3000	WB/ELISA	Dako
Anti-swine-Immunoglobulins-HRP	1:1000	WB	Dako
Ziege 16 anti-p15E (PERV)	1:200	WB/ELISA	AG Denner
Ziege 14 anti-p27 (PERV)	1:200	WB	AG Denner
Ziege 62 anti-gp70 (PERV)	1:200	WB/ELISA	AG Denner
Ziege 46 anti-p15E (KoRV)	1:200	WB	AG Denner
Ziege 61 anti-gp70 (KoRV)	1:200	WB	AG Denner

2.5 Peptide und Pepsotmembranen

Die biotinylierten Peptide für die Biacor-Analysen wurden von Genaxxon BioScience GmbH, (Biberach, Deutschland) bezogen (Tabelle 6). Die Pepsotmembranen (PepSpots™) zur Epitopkartierung wurden bei JPT Peptide Technologies GmbH (Deutschland) gekauft. Die Aminosäuresequenz entspricht den Positionen 2199 bis 2325 der zum Provirus GenBank: AJ133817.1 (PERV-A, Klon 42) gehörenden Aminosäuresequenz (Tabelle 7).

Tabelle 6: Peptide

Peptid	AS-Sequenz	Anwendung	Hersteller
E1(484-505)*	GTAALITGPQQLEKGLSNLHRI	SPR	Genaxxon BioScience GmbH
E2(583-604)*	EREADQGWFEFEGWFNRSPWMTTL		
E1 (randomisiert)	ALRLGQELISGHNAPIKTQTLG		
E2 (randomisiert)	TWPGEFWRSTNMLDWEQARFGE		
E1	AALITGPQQLEKGLSNLHRICKKK	Inhibition der Neutralisation	Jerini AG
E2	KKKCCREREADQGWFEFEGWFNRSPWM		
ISU	VVLQNRRLDLLFLKEGGL		

*AJ133817.1 in Bezug zum Translationsstartpunkt vom Env-Protein (AS-Sequenz beginnt bei: MHPTLS...)

Tabelle 7: Sequenz der PepSpotTM-Membran

Position	Sequenz
AS 2199..2325 in PERV- Polyprotein AJ33817.1	VGTGTAALIT GPQQLEKGLS NLHRIVTEDL QALEKSVSNL EESLTSLSSEV VLQNRRLDLL LFLKEGGLCV ALKEECCFYV DHSGAIRDSM SKLRERLERR RREREADQGW FEGWFNRSPW MTTLLSALTG

2.6 Enzyme

Eine Zusammenstellung der verwendeten Enzyme und deren Bezugsquellen befinden sich in der folgenden Tabelle (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Verwendete Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
AmpliTaq Gold DNA Polymerase	Applied Biosystems
Pfu DNA Polymerase (rekombinant)	Fermentas
KAPA2G DNA-Polymerase	Peqlab
SuperScript TM III Reverse Transkriptase (RT)	Invitrogen
Platinum [®] Taq DNA Polymerase	Invitrogen
T4 DNA Ligase	Roche oder Fermentas
Shrimp Alkaline Phosphatase	Fermentas
Restriktionsenzyme	NEB oder Fermentas
Lysozym	Sigma
Trypsin	Invitrogen
Proteinase K	Qiagen

2.7 Primer und Sonden

Die Synthese aller Oligonukleotide wurde bei Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland) in Auftrag gegeben. Die Sequenzen aller verwendeten Oligonukleotide sind in folgender Tabelle aufgelistet (Tabelle 9). DNA Oligos wurden für Sequenzierungen, Kolonie-PCRs, PCRs zur Prävalenzanalyse von PERV sowie qRT-PCR verwendet. RNA-Oligonukleotide fanden zur Charakterisierung des one step reverse qRT-PCR Assays zum Nachweis der pol1 und der pol2 shRNA Verwendung.

Tabelle 9: Primer und Sonden

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Referenz
<u>Sequenzierung und Kolonie-PCR</u>		
T7-Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	Standard
T7-Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Standard
M13 for	GTAAAACGACGGCCAGT	Standard
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC	Standard
pSiren for	CTCCCTTTATCCAGCCCTCACTCC	Diese Arbeit
pSiren rev	GAAAAGCGCCTCCCCTACC	Diese Arbeit
<u>Nachweis von PERV-A, B mittels PCR</u>		
PERV-A VRBF	CCTACCAGTTATAATCAATTTAATTATGGC	(WOOD <i>et al.</i> 2004)
PERV envA for	TGGAAAGATTGGCAACAGCG	(LE TISSIER <i>et al.</i> 1997)
PERV envA rev	AGTGATGTTAGGCTCAGTGG	(LE TISSIER <i>et al.</i> 1997)
PERV envB for	TTCTCCTTTGTCAATTCCGG	(LE TISSIER <i>et al.</i> 1997)
PERV envB rev	TACTTTATCGGGTCCCCTG	(LE TISSIER <i>et al.</i> 1997)
PERV-A upSD	TGCTGTTTGCATCAAGACCGC	(KARLAS <i>et al.</i> 2010)
PERV-A SA	ATGGAGGCGAAGCTTAAGGGGA	(KARLAS <i>et al.</i> 2010)
PERV-A downSD	ACAGACACTCAGAACAGAGAC	(KARLAS <i>et al.</i> 2010)
<u>Nachweis von PERV-C mittels PCR</u>		
PCR1 for	CTGACCTGGATTAGAACTGG	(TAKEUCHI <i>et al.</i> 1998)
PCR1 for	ATGTTAGAGGATGGTCCTGG	(TAKEUCHI <i>et al.</i> 1998)
PCR1 NV for	CTGACCTGGACTAGAACTGG	Diese Arbeit
PCR1 NV rev	ATGTTAaagaaATGGTCCTGG	Diese Arbeit
PCR2 for	GTGCTCTCCTTCAGACCTAGATTAC	i.Z.m. AG Prof. R. Tönjes

PCR2 rev	CGTCAAGACCGTATTTGGTCC	i.Z.m. AG Prof. R. Tönjes
PCR3 for	CTGACCTGGATTAGAACTGG	Diese Arbeit
PCR3 rev	AAGTTTTGCCCCATTTTAGT	Diese Arbeit
PCR4 for	GATTAGAACTGGAAGCCCCAAGTGCTCT	Dr. B. Dieckhoff
PCR4 rev	TCTGATCCAGAAGTTATGTTAGAGGATGGT	Dr. B. Dieckhoff
PCR5 for	CTATTCGCCTCAAATAAACCAG	Diese Arbeit
PCR5 rev	CATGTGCATTGGTCTCTATG	Diese Arbeit
PCR6 for	CCAGGACCACCAAATAATGG	Diese Arbeit
PERV-C TMR	CTCAAACCACCCTTGAGTAGTTTCC	(WOOD <i>et al.</i> 2004)

Nachweis von pLVTHM

GFP for	GATCACGAGACTAGCCTCGAGGT	(DIECKHOFF <i>et al.</i> 2008)
GFP rev	CCAGGATGTTGCCGTCCTC	(DIECKHOFF <i>et al.</i> 2008)
Pol2 for	AACGCTGACGTCATCAAC	(DIECKHOFF <i>et al.</i> 2008)
Pol2 rev	GGACGCTGACAAATTGAC	(DIECKHOFF <i>et al.</i> 2008)
Pol2 nested for	TCACTCCCAACGAAGACAAGA	Diese Arbeit
Pol2 nested rev	AAGTTATTCCCATGCGACGGTATC	Diese Arbeit

Klonierung

pSiren G418 for	CCTCCCTTTATCCAGCCCTCACTC	Diese Arbeit
pSiren G418 rev	CCTCGAGCCCCTCAGAAGAACTCGTCAAG XhoI	Diese Arbeit
Pol1 for	GATCCCCGAGGAGAGAGGTAACATACTCGAAAGTA TGTTACCTCTCTCCTGCTTTTTTA	Diese Arbeit
Pol1 rev	AGCTTAAAAAGCAGGAGAGAGGTAACATACTTTTCGA GTATGTTACCTCTCTCCTGCGGG	Diese Arbeit
Pol2 for	GATCCCCGAGGAGGAAATAAAGAACAAGCGAACTTT GTCAATTTGTCAGCGTCCTTTTTTGAAA	Diese Arbeit
Pol2 rev	AGCTTTTCCAAAAGGACGCTGACAAATTGACTTCT CTTGAAAGTCAATTTGTCAGCGTCCGGG	Diese Arbeit
Pol3 for	GATCCCCGCAAGGACCTTACAGACATACCGAAGTAT GTCTGTAAGGTCCTTGCTTTTTTA	Diese Arbeit
Pol3 rev	AGCTTAAAAAGCAAGGACCTTACAGACATACTTCGG TATGTCTGTAAGGTCCTTGCGGG	Diese Arbeit
Pol4 for	GATCCCCGAGGGAAATAAAGAACAAGCGAACTTT GTTCTTTATTTCCCTCCTTTTTTA	Diese Arbeit
Pol4 rev	AGCTTAAAAAGGAGGGAAATAAAGAACAAGTTTCGC TTTGTCTTTATTTCCCTCCGGG	Diese Arbeit
Gag1 for	GATCCCCGCCCTCTTAGTTTGACTCTCGACCATCGA AATGGTCGAGAGTCAAATAAGAGGGTTTTTA	i.Z.m. Dr. L. Scobie

Gag1 rev	AGCTTAAAAACCTCTTAGTTTACTCTCGACCATC GAAATGGTCGAGAGTCAAACCTAAGAGGGCGGG	i.Z.m. Dr. L. Scobie
Gag2 for	GATCCCCGCTCATAATTTGTCAGTTCAGGTTACGAA TAACCTGAACTGACAAATTATGAGCTTTTTTA	i.Z.m. Dr. L. Scobie
Gag2 rev	AGCTTAAAAAGCTCATAATTTGTCAGTTCAGGTTAT TCGTAACCTGAACTGACAAATTATGAGCGGG	i.Z.m. Dr. L. Scobie
Luzi for	GATCCCCGTGCGCTGCTGGTGCCAACCCGAAGGGT TGGCACCAGCAGCGCACTTTTTTA	Diese Arbeit
Luzi rev	AGCTTAAAAAGTGCCTGCTGGTGCCAACCTTCGG GGTTGGCACCAGCAGCGCACGGG	Diese Arbeit
EnvA1 for	GATCCCCGCAAGCAATGGAGCTGCATAACGAATTAT GCAGCTCCATTGCTTGCTTTTTTA	i.Z.m. C. Kruse
EnvA1 rev	AGCTTAAAAAGCAAGCAATGGAGCTGCATAATTCGT TATGCAGCTCCATTGCTTGCGGG	i.Z.m. C. Kruse
EnvA2 for	GATCCCCGGGAAATTCAATGTGACAAAGCGAACTTT GTCACATTGAATTTCCCTTTTTTA	i.Z.m. C. Kruse
EnvA2 rev	AGCTTAAAAAGGGAAATTCAATGTGACAAAGTTCGC TTTGTACATTGAATTTCCCGGG	i.Z.m. C. Kruse
EnvB1 for	GATCCCCGCAATAGTACTGTGGTTTATGCGAACATA AACCACAGTACTATTGCTTTTTTA	i.Z.m. C. Kruse
EnvB1 rev	AGCTTAAAAAGCAATAGTACTGTGGTTTATGTTTCGC ATAAACCACAGTACTATTGCGGG	i.Z.m. C. Kruse
EnvB2 for	GATCCCCGGTTTGAAGGATGGTTCAACACGAATGTT GAACCATCCTTCAAACCTTTTTTA	i.Z.m. C. Kruse
EnvB2 rev	AGCTTAAAAAGGTTTGAAGGATGGTTCAACATTCGT GTTGAACCATCCTTCAAACCGGG	i.Z.m. C. Kruse
<u>Real-time PCR</u>		
PERV gag for	TCCAGGGCTCATAATTTGTC	Dr. U. Fiebig
PERV gag rev	TGATGGCCATCCAACATCGA	Dr. U. Fiebig
PERV gag Sonde	FAM-AGAAGGGACCTTGGCAGACTTTCT-BHQ1	Dr. U. Fiebig
PERV pol for	ATGTGGATGAGCGTAAGGGAGTAG	i.Z.m. C. Kruse
PERV pol rev	GTCTGGGGGCTGCCGAACGAT	i.Z.m. C. Kruse
PERV pol Sonde	FAM-TAGGACCATGGAGGAGACCTGTTGCC-BHQ1	i.Z.m. C. Kruse
huGAPDH 41	GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC	(BUSCHER <i>et al.</i> 2005)
huGAPDH 42	TGGTCCACACCCATGACGA	(BUSCHER <i>et al.</i> 2005)
huGAPDH Sonde	HEX-CTTACCACCATGGAGAAGGCTGGG-BHQ1	(BUSCHER <i>et al.</i> 2005)
pCyp real s	Cy5-TGCCAGGGTGGTGACTTCACACGCC-BHQ2	(DUVIGNEAU <i>et al.</i> 2005)
pCyp real as	GACTTGCCACCCAGTGCCATTA	(DUVIGNEAU <i>et al.</i> 2005)
pCyp Sonde	TGCCAGGGTGGTGACTTCACACGCC	(DUVIGNEAU <i>et al.</i> 2005)

EnvC HS for	CCCCAACCCAAGGACCAG	Diese Arbeit
EnvC HS rev	AAGTTTTGCCCCCATTTTAGT	Diese Arbeit
EnvC HS Sonde	FAM-CTCTAACATAACTTCTGGATCAGACCC-BHQ1	Diese Arbeit
EnvC WB for	CCCCAGCCAAGGACCAG	Diese Arbeit
EnvC WB rev	AAGTTTTGtCCCCgTTTTTAGT	Diese Arbeit
EnvC WB Sonde	FAM-CTtTAACATAACTTCTGGATCAGACCC-BHQ1	Diese Arbeit
Pol1 NW for	CGGCGGagtatgttacctctc	Diese Arbeit
Pol1 NW rev	GTGCAGGGTCCGAGGT	Diese Arbeit
Pol1 NW-RT-Loop-Primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTG GATACGACaagca	Diese Arbeit
Pol1 NW Sonde	FAM-TGGATACGACaagcag-BHQ1	Diese Arbeit
Pol2 NW for	CGGCGGAGTCAATTTGTCAGC	Diese Arbeit
Pol2 NW rev	GTGCAGGGTCCGAGGT	Diese Arbeit
Pol2 NW-RT-Loop-Primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTG GATACGACaaggac	Diese Arbeit
Pol2 NW Sonde	FAM-TGGATACGACaaggac-BHQ1	Diese Arbeit

2.8 Software und EDV

Für die Anfertigung dieser Arbeit sowie die Datenanalyse und Datenverarbeitung wurden folgende Software-Programme verwendet (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Verwendete Software

Name	Verwendung	Hersteller
MxPro QPCR Software	Real-time PCR	Stratagene
MS Office 2003	EDV	Microsoft
Magellan™ Data Analysis Software	ELISA	TECAN
Lasergene Software Version 8.0	Sequenzanalysen	DNASTAR
Blast-n und Blast-p	Sequenzanalyse	NCBI
ExpASy	Sequenzanalyse	SIB
TDS Quantity One	Gel Doc 2000	Biorad
BLOCK-iT™ RNAi Designer	Entwicklung neuer shRNAs	Invitrogen

2.9 GenBank Nummern

Für das Design spezifischer Primer und Sonden, die Auswertung von Sequenzierungen und die Entwicklung neuer shRNAs wurden verschiedene bei GenBank hinterlegte Sequenzen genutzt. Die Wichtigsten sind in der folgenden Tabelle gelistet (Tabelle 11).

Tabelle 11: Wichtige „Accession Numbers“

GenBank	Spezies	Bemerkung	Referenz
HQ688786	PERV-A	ORF des rekombinanten p15E	Diese Arbeit;
HQ688785	PERV-A	ORF des rekombinanten gp70	Diese Arbeit;
AM229312*	PERV-C	Klon 1312; HS typisch	(PREUSS <i>et al.</i> 2006)
AJ293656*	PERV-A	Klon 58	(KRACH <i>et al.</i> 2001)
AJ133817*	PERV-A	Klon 42	(KRACH <i>et al.</i> 2001)
AJ293657*	PERV-B	Klon 213	(KRACH <i>et al.</i> 2001)
AY570980*	PERV-A/C	Klon A14/220	(BARTOSCH <i>et al.</i> 2004)
DQ174772	KoRV;	Env-Protein	(FIEBIG <i>et al.</i> 2006)
M77194	RaLV	kann ras-gen transduzieren	(LEE <i>et al.</i> 1998)
AY534305	PERV-A/C	aus <i>Sus barbatus</i>	(NIEBERT and TONJES 2005)

*replikationskompetente Sequenz

2.10 Versuchstiere

Für die durchgeführten Versuche wurden verschiedene Versuchstierspezies verwendet und in den Stallungen des RKI, BfR oder FLI gehalten. Die entsprechenden Spezies sind in der folgenden Tabelle gelistet (Tabelle 12). Ebenfalls Verwendung fand Biopsie bzw. DNA-Material von Hausschweinen aus der Umgebung von Hannover, von transgenen und nicht-transgenen Schweinen der Bestände des FLI sowie von bereits in anderen Studien publizierten Wildschweinen (ADLHOCH *et al.* 2010; ADLHOCH *et al.* 2009; DIECKHOFF *et al.* 2009).

Tabelle 12: Bezugsquelle der Versuchstiere

Spezies	Anzahl	Bezugsquelle	Wo gehalten
Ratte (Wismar)	28	CRLI, Inc*	RKI-Tierstall
Ratte Lois	2	CRLI, Inc*	RKI-Tierstall
Ratte Spraque	2	CRLI, Inc*	RKI-Tierstall
Maus Balb/c	80	CRLI, Inc*	RKI-Tierstall
Meerschweinchen	12	CRLI, Inc*	RKI-Tierstall
Ziegen	2	BfR	BfR-Tierstall
Kaninchen	3	CRLI, Inc*	RKI und Ungarn [#]

*Charles River Laboratories International, Inc; Wilmington USA

[#]Hungarian institute of veterinary vaccines; Gödöllő, Ungarn

2.11 Kulturmedien

2.11.1 Flüssige Nährmedien für *E. coli*

Für Expressionsexperimente wurde LB-Medium und für die Plasmidpräparation das 2YT Medium verwendet (Tabelle 13).

Tabelle 13: Kulturmedien für *E. coli*

	LB-Medium	2YT-Medium
Hefeextrakt	5 g/l	10 g/l
Trypton	10 g/l	16 g/l
NaCl	0,5 g/l	5 g/l
pH	7	7

Um Selektivmedien herzustellen, wurde nach der Sterilisation plasmid- bzw. stammabhängig Ampicillin (EK=50 µg/l) oder Chloramphenicol (EK=34 µg/l) zugegeben.

2.11.2 Feste Nährböden für *E. coli*

Zur Herstellung von Agarplatten wurde LB Medium 14 g/l Agar-Agar (bakteriologisch; Roth) zugegeben und die Suspension vorsichtig in der Mikrowelle aufgekocht. Nachdem das Medium abgekühlt war (ca. 50 °C), wurden entsprechende Antibiotika zugegeben und anschließend die Platten unter der Sterilbank gegossen. Es fanden 8 mm PE Platten Verwendung. Zur Herstellung von X-Gal Medien (blau weiß Selektion; pBluescript KS II Derivate) wurde zusätzlich auf eine EK=0,1 mM IPTG und auf eine EK=20 µg/ml X-Gal (PEQLAB Biotechnologie GmbH; Stammlösung 20 mg/ml in Dimethylformamid) zugegeben.

2.11.3 Kulturmedien für eukaryotische Zellen

Die verwendeten Kulturmedien für eukaryotische Zellen sind in der folgenden Tabelle gelistet (Tabelle 14). PBS wurde zum Trypsinieren sowie für diverse Waschschrte verwendet.

Tabelle 14: Kulturlösungen für eukaryotische Zellen

Medium	Zusammensetzung
Standardmedium	DMEM + 4,5 g/l Glukose 10 % (v/v) FKS (Biochrom) 2 mM Glutamin (Biochrom) 100 U/ml Penicillin (Biochrom) 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom) 15 mM HEPES-Puffer (Biochrom)
Medium für fötale Fibroblasten	+ 0,1 mM β-Mercaptoethanol 1 % (v/v) nicht essentielle AS. (Sigma-Aldrich) 1 % (v/v) Vitaminlösung (Sigma-Aldrich)
PBS „ohne“	140 mM NaCl 6,4 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 10 mM KCl 2 mM KH ₂ PO ₄ pH=7,2

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.1.1 Isolation von Nukleinsäuren

Für die Isolation von RNA und DNA aus Proben verschiedenen Ursprungs wurden kommerziell erhältliche Systeme verwendet und die Protokolle des entsprechenden Herstellers genutzt (siehe Tabelle 15). Für die Transfektionsexperimente wurden ausschließlich die EndoFree Kits (Qiagen) genutzt. Zum Aufschluss von Biopsiematerial wurde der TissueLyser (Qiagen) nach Herstelleranleitung verwendet.

Tabelle 15: Kits zur Isolation von DNA und RNA

Ursprung	Nukl.S.	Produkt	Hersteller
<i>E. coli</i>	DNA	EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
		QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
Euk. Zellkultur/Blut	DNA	QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen
Euk. Zellkultur/Blut	RNA	Rneasy-Mini-Kit	Qiagen
Euk. Zellkultur	RNA	PARIST [™] Kit	Applied Biosystems/Ambion
Gewebeprobe/Blut	DNA/RNA	TRI Reagent [®]	Sigma
Agarose-Gel	DNA	QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen

3.1.2 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA-Proben erfolgte am ND-1000 NanoDrop[®] (peqlab, Erlangen, Deutschland). Es wurde jeweils 1 µl der Probe gegen bidestilliertes Wasser als Referenz vermessen.

3.1.3 Molekulares Klonieren

Für Klonierungsarbeiten wurden die Restriktionsenzyme der Firmen Fermentas oder NEB genutzt. Die Ligation erfolgt mit der T4-Ligase.

3.1.3.1 Gerichtete Klonierung von PCR-Fragmenten

Es wurden Primer generiert, die die Ziel-Sequenz flankieren und an den 5' Enden geeignete Restriktionsschnittstellen besitzen, um eine gerichtete Klonierung zu ermöglichen (bei pLXSN-GFP, pSiren G418, pSuper MfeI). Nach der Amplifikation mit der Pfu-Polymerase (proof reading) wurden die PCR Fragmente mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt und mit den Restriktionsenzymen in entsprechenden Puffern gespalten. Ebenfalls wurden die Zielvektoren mit identischen Enzymen gespalten. Es folgte eine erneute säulenchromatographische Aufreinigung von Vektor und Fragment. Die Ausbeute wurde durch Agarosegelelektrophorese abgeschätzt, Vektor und Fragment im Mengenverhältnis von etwa 1:3 gemischt und über Nacht bei 16 °C im Thermocycler mit Ligase inkubiert. Abschließend erfolgte die Transformation in *E. coli*.

3.1.3.2 Ungerichtete Klonierung von PCR-Fragmenten

Die PCR-Fragmente (z.B. aus Real-time PCR) wurden über das QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Falls Taq-Derivate als Polymerase benutzt wurde, wurden die Adenin 3' Überhänge mit dem Klenow-Enzym (NEB) abgebaut. Die Klonierung erfolgte in den SmaI geschnittenen Vektor pBlueskript KS II. Nach der Ligation wurde SmaI zum Ligationsansatz gegeben und 30 min bei RT inkubiert um den religierten Vektor erneut zu schneiden. Nach der Transformation wurden durch Blau-Weiß-Selektion mögliche positive Klone auf neue Agarmedien überführt und einer Kolonie-PCR mit den Primer T7-Promotor und M13 reverse unterzogen.

3.1.3.3 Klonierung der shRNA-Oligonukleotide in pSuper MfeI

Die den shRNAs entsprechenden Oligonukleotide (siehe Tabelle 9) wurden bei Sigma Aldrich GmbH bestellt und auf eine Konzentration von EK=100 µM verdünnt. Jeweils 4,5 µl von jedem der beiden Primerstocks wurden gemischt und mit 1 µl PCR Puffer versetzt und im Thermocycler folgendem Temperaturgradienten ausgesetzt: 72 °C für 2 min, 37 °C für 2 min, 25 °C für 2 min; 4 °C Ende. Der Ansatz wurde im Anschluss 1:100 mit nuklease-freiem Wasser (Sigma) verdünnt. Von der Verdünnung wurde pro Ligationsansatz (ca. 10 ng BglIII/HindIII geschnittener pSuper MfeI Vektor) 1 µl gegeben und über Nacht bei 16 °C im Thermocycler ligiert.

Mit den Ligationsansätzen wurden *E. coli* Bakterien (Top 10 oder DH5 α) transformiert. Die Selektion positiver Klone erfolgte mittels Kolonie PCR unter Zuhilfenahme der Primer M13 rev und T7 Promotor.

3.1.4 Kolonie PCR

Die Kolonie PCR ist eine Methode, mit der nach der Transformation eines Ligationsansatzes positive Klone schnell identifiziert werden können. Es wird ein Primerpaar benötigt, das die Insertionsstelle flankiert. Bei Klonierungsvektoren sind das zumeist die Primer, die ebenfalls bei der Sequenzierung genutzt werden können (Tabelle 9). Es wurde AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Roch) mit folgendem Mastermix verwendet: 2.5 μ l 10 x PCR Puffer, 3 μ l MgCl₂ (25 mM), 0.5 μ l dNTP (20 mM each), 0.5 μ l (10 μ M) von jedem Primer, 0.3 μ l AmpliTaq Gold® Polymerase (Roche, Mannheim, Germany) (5 U/ μ L) und Nuklease-freies Wasser (add. 25 μ l). Als Template wurden Transformandenkolonien verwendet. Mit einer 200 μ l Pipettenspitze wurde eine isolierte Kolonie berührt und anschließend mit der Spitze ein Replika auf einer neuen Agarplatte erzeugt. Die Spitze wurde daraufhin in ein mit Mastermix gefülltes PCR-Tube gestellt. So wurde mit etwa 20 Klonen pro Transformationsansatz verfahren. Abschließend wurden die Spitzen entfernt und folgendes PCR-Programm durchgeführt:

Denaturierung		Annealing	Elongation	Ende
95 °C/15 min	95 °C/15 s	55 °C/30 s	72 °C/1 min pro kb	72 °C/10 min 4 °C ∞
← 32 Zyklen →				

Die Auswertung erfolgte nach Agarosegelelektrophorese über Vergleich der Fragmentgröße in Bezug zum Kontrollansatz (Plasmidpräparation vom Leervektor).

3.1.5 PCR-Diagnostik

Einfache PCRs kamen zum Einsatz, um die Prävalenz der PERV-Subtypen A, B, C und A/C zu untersuchen (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: PCRs zur Prävalenzanalyse

Nachweis von	Templ.	Primer	Referenz
PERV-A	DNA/cDNA	PERV envA for & rev	(LE TISSIER <i>et al.</i> 1997)
PERV-B	DNA/cDNA	PERV envB for & rev	(LE TISSIER <i>et al.</i> 1997)
PERV-C	DNA/cDNA	PCR1 for & rev	(TAKEUCHI <i>et al.</i> 1998)
PERV-A/C	DNA	PERV-A VRBF & PERV-C TMR	(WOOD <i>et al.</i> 2004)
PERV-A gespleißt	cDNA	PERV-A upSD & PERV-A SA	(KARLAS <i>et al.</i> 2004)
PERV-A ungespleißt	cDNA	PERV-A downSD & PERV-A SA	(KARLAS <i>et al.</i> 2004)
PERV-C HS	DNA	PCR2 for & rev, PCR3 for & rev; PCR4 for & rev; PCR5 for & rev	Diese Arbeit
PERV-C WS	DNA	PCR1 NV for & rev; PCR6 for & EnvC WB rev	Diese Arbeit

Als Template wurde DNA oder cDNA (SuperScript® III; Invitrogen) verwendet. Einige PCRs sind bereits beschrieben, andere wurden neu etabliert.

Für die neuen Reaktionen wurde AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Roche) mit folgendem Mastermix verwendet: 2.5 µl 10 x PCR Puffer, 3 µl MgCl₂ (25 mM), 0.5 µl dNTP (20 mM each), 0.5 µl (10 µM) von jedem Primer, 0.3 µl AmpliTaq Gold® Polymerase (Roche, Mannheim, Germany) (5 U/µL) und nuklease-freies Wasser (add. 25 µl). Folgendes PCR-Programm fand Anwendung:

Denaturierung		Annealing	Elongation	Ende
95 °C/15 min	95 °C/15 s	55 °C/30 s	72 °C/1 min pro kb	72 °C/10 min 4 °C ∞
← 32 Zyklen →				

3.1.6 Real-time PCR

Die Methode der Real-time PCR wurde im Neutralisationsassay sowie bei den Prävalenzanalysen von PERV-C auf DNA- sowie bei den Messungen der PERV-Expression und shRNA-Expression auf RNA-Ebene genutzt. Die cDNA Synthese erfolgte bei den Expressionsanalysen direkt vor der qRT-PCR im selben Reaktionsansatz. Entsprechend handelt es sich in diesen Fällen im Speziellen um „one step reverse quantitative real-time PCRs“ (One-Step qRT-PCR). Für die Quantifizierung wurden TaqMan-Sonden verwendet. Die TaqMan-Sonden tragen am 5'-Ende einen Reporter-

Fluoreszenzfarbstoff (Cy5, Fam oder HEX) und am 3'-Ende einen kompatiblen Quencher (BHQ1 bzw. BHQ2). Die Sequenzen wurden so gewählt, dass interne Sekundärstrukturen minimiert waren und die Schmelz- oder Hybridisierungstemperatur (T_m) oberhalb der des verwendeten Primerpaares lag.

3.1.6.1 Messung der PERV-Expression

Als Template für die Analyse diente RNA aus Gewebeproben oder pelletierten Zellen aus *in vitro* Versuchen. Standardmäßig wurden 50 ng RNA / Ansatz verwendet. Es handelte sich um Duplex-PCRs bei der das porcine Cyclophilin als Referenz zur späteren Normalisierung coamplifiziert wurde. Für die Detektion von PERV standen zwei Primer/Sondenpaare zur Verfügung. Paar eins bindet im gag Bereich (PERV gag real for & rev) und Paar zwei bindet im pol Bereich (PERV pol for & rev). Die Analyse der PERV-Expression in porcinen Fibroblasten zeigte geringfügig Unterschiede bei den gemessenen RNAi induzierten Effekten (KRUSE 2009). Für die Mastermixe wurde das SuperScript® III One-Step RT-PCR System mit Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) verwendet (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Master-Mix und Programm der PERV-Expression qRT-PCR

2X Reaction Mix	12,5 µl	Reverse- Transkription	15 min 50 °C
MgSO4 (50 mM)	1,0 µl		
PERV pol for & rev (jeweils 10 µM)	2 x 0,5 µl	Denaturierung	2 min 95 °C
PERV pol Sonde (10 µM)	0,5 µl		15 sec 95 °C
pCyp for & rev (jeweils 10 µM)	2 x 0,5 µl	Annealing u. Elongation	30 sec 58 °C
pCyp Sonde (10 µM)	0,5 µl		
SuperScript. III RT/ Platinum Taq Mix	1,0 µl		
Template RNA	50 ng/Rkt.		
H2O, nukleasefrei	Add. 25 µl		

50x

3.1.6.2 Nachweis von envC

Die Quantifizierung von *envC* in genomischer porciner DNA erfolgte als Duplex Real-time PCR, bei der ein 92 bp langer Teil von *envC* und ein Fragment vom porcinen Cyclophilin coamplifiziert wurden.

Tabelle 18: Master-Mix und Programm der PERV-C Real-time PCR

PCR-Puffer	2,5 µl	Denaturierung	7 min 95 °C	45x
MgCl ₂	3,0 µl		20 sec 95 °C	
dNTP	0,5 µl	Annealing u. Elongation	30 sec 58 °C	
ROX	0,1 µl			
EnvC for & rev (jeweils 10 µM)	2 x 0,5 µl			
Sonde EnvC (10 µM)	0,5 µl			
pCyp for & rev (jeweils 10 µM)	2 x 0,5 µl			
pCyp Sonde (10 µM)	0,5 µl			
AmpliTaq Gold	0,3 µl			
Template DNA	1 – 100 ng /Rkt.			
H ₂ O, nukleasefrei	Add. 25 µl			

Für den Nachweis der hausschweintypischen Sequenz wurden das Primer/Sondenpaar EnvC HS for, EnvC HS rev und EnvC Sonde verwendet. Der Nachweis der wildschweintypischen Sequenz erfolgte mit dem Primer/Sondenpaar EnvC NV for, EnvC NV rev und EnvC NV Sonde. Für die Amplifikation wurde die AmpliTaq Gold[®] Polymerase (Roche, Mannheim, Germany) mit den zugehörigen Puffern verwendet (siehe Tabelle 18)

3.1.6.3 shRNA Expression

Für die Messung der shRNA Expression von pol1 und pol2 wurde das Superscript[®] III RT Kit (Invitrogen) mit folgendem Mastermix und Temperaturprogramm verwendet (Tabelle 19).

Tabelle 19: Master-Mix und Programm der shRNA Expressions qRT-PCR;

2X Reaction Mix	12,5 µl	Reverse- Transkription	5 min 25 °C	50x
Pol2 NW for & rev (jeweils 10 µM)	0,5 µl		5 min 35 °C	
Pol2 NW-RT Loop-Primer (0,05 µM)	1,0 µl		5 min 55 °C	
Pol2 NW Sonde	0,5 µl	Denaturierung	5 min 95 °C	
SuperScript. III RT/ Platinum Taq Mix	1,0 µl	20 sec 95 °C		
Template RNA	20 ng /Rkt.	Annealing u. Elongation	30 sec 58 °C	
H ₂ O, nukleasefrei	Add. 25 µl			

3.1.6.4 Kopienzahlbestimmung

Für die absolute Quantifizierung wurde der Ct-Wert der Probe mit einem Plasmidstandard abgeglichen. Zu diesem Zweck musste die Zielsequenz subkloniert werden, bzw. lag bereits kloniert vor. Aus der Größe des Plasmids und seiner Konzentration in der Präparation wurde die Kopienzahl der Präparation pro μl nach:

$$\frac{\text{Kopien}}{1\mu\text{l}} = \frac{C_P \cdot NA}{M_{bp} \cdot G_P \cdot 10^9}$$

berechnet.

Bei C_P handelt es sich um die DNA-Konzentration in $\text{ng}/\mu\text{l}$. NA ist die Avogadro-Konstante mit $NA=6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$. M_{bp} ist die durchschnittliche molare Masse eines Basenpaares mit 660 g/mol und G_P die Größe des gesamten Plasmids in bp . Die DNA-Konzentration der Proben wurde mit der Nanodrop vermessen. Anschließend wurde eine geeignete Plasmidverdünnung (z.B. 1:10; 10^9 bis 10^{-2} Kopien pro μl) hergestellt und die Ct-Werte mittels Real-time PCR bestimmt. Die Korrelation zwischen Ct-Wert und Kopienzahl konnte somit als Funktion der Trendlinie dargestellt und die Kopienzahl bestimmt werden. Zur Abschätzung der Kopienzahl relativ zur Genomgröße wurde die durchschnittliche Genomgröße entsprechend der Literatur zu $3,2 \text{ Gbp}$ für den Menschen und zu $2,7 \text{ Gbp}$ für das Schwein veranschlagt (HUMPHRAY *et al.* 2007; MAKALOWSKI 2001). Die Kopienzahl pro Genom ergab sich aus dem Quotienten der absoluten Anzahl des Zielgens und der absoluten Anzahl der Genome in der jeweiligen Probe.

3.1.6.5 Relative Quantifizierung

Die relative Quantifizierung erfolgt nach der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode (LIVAK and SCHMITTGEN 2001). Zur Normalisierung fanden die konstitutiv exprimierten Haushaltsgene Cyclophilin und hGAPDH Verwendung.

3.1.6.6 Effizienzbestimmung

Die Effizienz einer Real-time PCR Reaktion kann bei Vermessung einer Standardverdünnung aus dem Anstieg m der Trendlinie bei Auftragung der Ct-Werte über dem Logarithmus der Kopienzahl definiert werden. Bei einer Effizienz von 100 % findet pro Zyklus genau eine Verdopplung der Amplifikatmenge statt. Der Abstand zwischen den Messwerten einer 1:10 Verdünnung beträgt dann jeweils 3,3 Ct. Der Anstieg m der Trendlinie ist dann ebenfalls 3,3.

$$f(x) = mx + n; E_r = \text{Effizienz}[\%]; E_r = (-1 + 10^{1/m}) \cdot 100$$

3.1.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip der Didesoxymethode nach Sanger unter Verwendung des ABI-BigDye Mix 3.1 (Applied Biosystems). Die zu analysierende DNA und der entsprechende Primer wurden einer Sequenzierungs-PCR unterzogen (siehe Tabelle 20) und die Reaktionsansätze im Anschluss im institutseigenen Service-Labor mit einem 370A DNA-Sequencing System von Applied Biosystems vermessen. Die Datenauswertung erfolgte mit der Software Lasergene 8 (DNASTAR) oder anderen Programmen (Tabelle 10).

Tabelle 20: Master-Mix und Programm für Sequenzierung

DNA	2 μ l (bei 150 ng/ μ l)	Denaturierung	2 min 96 °C	↕
BigDye-Mix 3.1	2 μ l		10 sec 96° C	
Primer 10 mM	0,5	Annealing	5 sec 55°C 25 x	
5 x ABI-Puffer	1 μ l	Elongation	4 min 60°C	
H ₂ O, nukleasefrei	Add. 10 μ l	Ende	∞ min 4°C	

3.1.8 Agarosegelelektrophorese

Für die elektrophoretische Trennung und die Visualisierung von DNA-Fragmenten in Abhängigkeit ihrer Länge wurden 1 %ige Agarosegele verwendet. Zur Auftrennung von Fragmenten kleiner als 500 bp kamen ebenfalls 3 %ige Gele zum Einsatz. Die Gele wurden mit Ethidiumbromid (Endkonzentration=0,5 μ g/ml) versetzt. Die Auftrennung erfolgte horizontal bei einer konstanten Spannung von 75 V. Als Elektrolyt und zum Kochen der Gele wurde 1 x TAE-Puffer (50 x: 50 mM EDTA, 1 M Eisessig, pH 8,0) verwendet. Die Auswertung erfolgte im Gel Doc 2000 (BioRad). Als Größenmarker wurde der O'GeneRuler™ (Fermentas) genutzt.

3.2 Arbeiten mit Proteinen und Peptiden

3.2.1 Darstellung der Antigene

Für die PERV-Immunisierungen wurden zwei Antigene verwendet. Zum einen die Ectodomäne des transmembranen Hüllproteins (TM; p15E) von PERV-A sowie ein zweites rekombinantes Protein, das dem Oberflächenhüllprotein (SU; gp70) von PERV-A entspricht. Parallel wurden Antigene, die dem TM und dem SU Protein des KoRV entsprechen, verwendet. Für die Expression wurden die *E. coli* Stämme BL21-CodonPlusTM(DE3)-RP und BL21 Rosetta2TM(DE3)pLysS verwendet. Die Kultivierung und Aufreinigung der rekombinanten p15E-Proteine erfolgten wie bereits für PERV-p15E beschrieben (FIEBIG *et al.* 2003; WURZBACHER 2007). Für die Aufreinigung der rekombinanten gp70 Proteine wurden Übernachtskulturen pet-22b(+) gp70 PERV bzw. pet-22b(+) gp70 KoRV transformierter Bakterien unter Ampicillin- (EK=100 µg/ml) sowie Chloramphenicol-Selektion (34 µg/ml) hergestellt. Mit diesen wurde am folgenden Tag 4 Liter vorgewärmtes (Raumtemperatur) LB-Medium inokuliert (ca. OD₆₀₀=0,100). Die Kultivierung erfolgte in 3 Liter Schikanekolben mit jeweils 1,3 Liter Füllung im Schüttelinkubator Innova 4330 (New Brunswick Scientific) bei 200 rpm und 37 °C. Der Verlauf der OD₆₀₀ wurde verfolgt und die Expression der Proteine bei OD₆₀₀=0,7 durch Zugabe von IPTG (EK=0,1 µg/ml) induziert. Nach 3 h wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 8000 x g in einer Avanti Centrifuge J-25 (Beckmann) pelletiert und nach Waschen mit PBS (8000 x g 5403 Kühlzentrifuge; Eppendorf) auf zwei 50 ml Falcons vereint und bei – 20 °C verwahrt. Der Zellaufschluß erfolgte in PBS durch Zugabe von Lysozym (Sigma) EK=1 mg/ml und durch Ultraschallbehandlung mit einem Sonifier II 250 (Branson). Die unlösliche Proteinfraction wurde durch Zentrifugation bei 26 000 x g für 30 min abgetrennt und in 6 M GuHCL-Puffer gelöst. Zur Unterstützung des Lösungsvorganges wurde das Pellet mit Hilfe einer Impföse zerkleinert. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C auf einem Plattformschüttler Duomax 1030 (Heidolph). Am nächsten Tag wurde erneut bei 26 000 x g für 30 min zentrifugiert und der klare Überstand für die affinitätschromatographische Aufreinigung verwendet. Für die Aufreinigung wurde Ni-NTA (Qiagen) als Matrix und die in der folgenden Tabelle (Tabelle 21) aufgelisteten Puffer nach den Vorgaben des Herstellerprotokolls (QIAexpressionistTM 2003) verwendet.

Die Elutionsfraktionen wurden in 2 ml Aliquots in Eppendorfgefäßen gesammelt und proteinhaltigen Fraktionen photometrisch am BioPhotometer (Eppendorf) bestimmt und vereint.

Es erfolgte eine Dialyse in PBS mittels Dialyseschlauch (Roth) mit einem MWCO von 12 kDa - 14 kDa bei 4 °C. Die Reinheit der rekombinanten Proteine wurde durch SDS-Page überprüft.

Tabelle 21: Puffer zur Aufreinigung von rekombinatem gp70

Puffer	Zusammensetzung
Lysepuffer	100 mM NaH ₂ PO ₄ ; 10 mM Tris; 6 M GuHCl; pH=8,0 (NaOH)
Äquilibrierungs- und Waschpuffer	100 mM NaH ₂ PO ₄ ; 10 mM Tris·Cl, 8 M CH ₄ N ₂ O; pH=6,3 (HCl)
Elutionspuffer	100 mM NaH ₂ PO ₄ ; 10 mM Tris·Cl; 8 M CH ₄ N ₂ O; pH=4,5 (HCl)
Dialysepuffer	PBS; (137 mM NaCl; 2,7 mM KCL; 12 mM Phosphat; pH=7,4)

3.2.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurden verschiedene Methoden verwendet. Die Menge an aufgereinigtem rekombinatem Protein wurde je nach Löslichkeit der Probe entweder mittels BCA, Bradford-Test oder optisch im gefärbten SDS-Gel bestimmt. Im BCA und Bradford-Test lässt sich die Konzentration unlöslicher Proteine nicht bestimmen. Sowohl Bradford-Test als auch BCA-Bestimmung wurden in 96 well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Absorption wurde bei Bradford bei 595 nm und bei BCA bei 570 nm zu 492 nm im ELISA-Reader (Tecan) gemessen. Die Proteinkonzentration ergibt sich aus der Funktion der Standardreihe nach Import und Auswertung der Daten in Excel (Microsoft). Bei der optischen Auswertung im SDS-Gel wurde die Konzentration im Vergleich zu einer 1:2 Verdünnungsreihe von BSA oder Lysozym mit bekannter Konzentration abgeschätzt.

3.2.3 SDS-Page

Für die SDS-Page wurde die Elektrophorese-Einheit Hoefer-SE 250 (Hoefer) benutzt. Die Gelgröße entsprach 8 mm x 7 mm x 1,5 mm (Höhe, Breite, Dicke). Als Anodenpuffer wurde 200 mM Tris bei pH=8,9 und als Kathodenpuffer 100 mM Tris, 100 mM Tricin, 0,1 % (w/v) SDS bei pH=8,25 genutzt. Die Auftrennung erfolgte vertikal bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel mit dem Gerät Power Pac 200 (BioRad) als Spannungsquelle. Es wurden 10 %ige Trenngele und 4 %ige Sammelgele verwendet (siehe Tabelle 22).

Tabelle 22: Zusammensetzung der SDS-Gele

Lösung	Trenngel	Sammelgel
Gelpuffer (0,1 M Tris-HCL; 0,3 % (w/v) SDS; pH=8,0)	5,0 ml	2,0 ml
Rotiphorese Gel ^R 30 (Roth)	5,0 ml	0,8 ml
Deionisiertes Wasser	5,0 ml	3,2 ml
TEMED (USB)	10 µl	10 µl
APS 10 %ig	100 µl	100 µl

Geladen wurden maximal 20 µl Probe + 20 µl Probenpuffer in 10er Kamm Gelen und bei analytischen Gelen ein Volumen von 200 µl Probe + 200 µl Probenpuffer. Nach der PAGE erfolgte entweder eine Färbung mit Coomassie Blue oder eine Western Blot Analyse.

Zum Färben mit Coomassie Blue wurde eine wässrige Lösung aus 3 mM Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Eisessig verwendet. Die Entfärbung der Gele erfolgte in 10 % (v/v) Eisessig und 25 % (v/v) Methanol in deionisiertem Wasser.

3.3 Immunologische Techniken

3.3.1 Western Blot

Der Blot wurde mit dem Gerät „Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell“ (BioRad) bei einer konstanten Spannung von 25 V für 30 min durchgeführt. Als Transferpuffer wurde 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,038 (w/v) SDS mit pH 8,9 verwendet. Das Blot-Sandwich bestand aus einer Lage Whatman-Papier (3 mm), dem zu blottenden Gel, der PVDF Membran (0,2 µm; Millipore) und einer abschließenden Lage Whatman-Papier (3 mm). Als Blockierungspuffer wurde PBS mit 5 % Magermilchpulver (TSI GmbH & Co. Kg) und 0,05 % Tween-20 (Roche) benutzt.

Für die Analyse der Seren wurden analytische Gele geblottet, mit je einer Referenztasche (für den Marker). Es wurde 1 µg Viruspräparation pro Gel bzw. 8 µg p15E + 30 µg gp70 pro Gel in 2 x Probenpuffer geladen. Nach dem Blockieren wurden die Gele in einen „Mini-PROTEAN II Multiscreen Apparatus“ eingespannt und mit den Seren (1:100 bis 1:250 mit Blockierungspuffer) 2 h inkubiert. Die Zellen des Multiscreen Apparatus wurden anschließend separat mit PBS + 0,05 % Tween-20 Puffer gespült. Die Membran wurde entfernt und dreimal für 10 min gewaschen. Die Detektion erfolgte nach der Inkubation mit den entsprechenden HPRT-gekoppelten Sekundärantikörpern (siehe Tabelle 5) mit DAB (Fluka) oder ECL-Färbung (GE Healthcare).

3.3.2 ELISA

Der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurde zur Titerbestimmung antigenspezifischer Antikörper in den Seren genutzt. Die rekombinanten Antigene wurden in einer Konzentration von p15E (0,625 µg/well) und gp70 (1 µg/well) in H₂O auf Nunclon™ Delta 96-Well MicroWell® Plates (Thermo Scientific) durch Eintrocknen über Nacht bei 37 °C im Inkubator (Binder) immobilisiert. Waschschritte erfolgten im 96 Plate Washer™ (TECAN).

Folgende Wasch- und Inkubationssequenz wurde benutzt: 1,5 h Blockierung mit Blockierungspuffer 1 bei 37 °C, 1 x Waschen mit 300 µl Waschpuffer je well bei einer Einwirkzeit von 10 s, 2 h Inkubation mit in Blockierungspuffer 2 verdünnten Seren (1:20 bis 1:630) bei 37 °C, 3 x Waschen mit 250 µl Waschpuffer und 10s Einwirkzeit pro Zyklus, 1 h Inkubation mit HPRT konjugierten Sekundärantikörpern in Blockierungspuffer 2, 7 x Waschen mit 300 µl Waschpuffer und 30 s Einwirkzeit pro Zyklus, Ausschlagen anhaftender Tropfen auf saugfähigem Papier und abschließende Entwicklung.

Die Detektion erfolgte in einem Volumen von 80 µl Substratlösung / well. Die Reaktionen wurden nach 20 min durch Zugabe von 80 µl 5 normaler H₂SO₄ gestoppt, die Farbreaktion bei 490/620 nm im ELISA Reader (TECAN) gemessen und mit den Computerprogrammen Magelan™ (TECAN) sowie Excel (Microsoft) ausgewertet.

Tabelle 23: Lösungen für ELISA

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Waschpuffer	PBS mit 0,05 % (v/v) Tween-20
Blockierungspuffer 1	PBS mit 5 % (w/v) BSA und 0,05 % (v/v) Tween-20
Blockierungspuffer 2	PBS mit 2,5 % (w/v) BSA und 0,05 % (v/v) Tween-20
Substratlösung	PBS 30 ml mit o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid (1 mg/ml) und 200 µl H ₂ O ₂ 30 %ig

3.3.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

PERV/5°-infizierte und native 293-Zellen wurden in spezielle Petrischalen (Petriperm, Heraeus) ausgesät und bis zum Erreichen einer Konfluenz von nahe 100 % kultiviert. Die Zellen wurden vorsichtig mit PBS gewaschen und zum Fixieren mit einer 2 %igen Paraformaldehydlösung für 2 h inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Bodenmembranen der Petrischalen in Rechtecke mit ca. 1 cm Kantenlänge zerschnitten. Zum Blockieren wurde PBS mit 0,1 %

Gelatine und 1 % Kaninchenserum verwendet. Das Immunsereum von Ziege 355, immunisiert mit PERV-p15E, wurde in einer Verdünnung von 1:500 auf die blockierten Membranen gegeben. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einem FITC Kaninchen anti-Ziege IgG in einer Verdünnung von 1:160 inkubiert.

Für die Fluoreszenzanalyse wurden die Zellen in Moviol 4-88 (Roth) and 0.1 µg/ml Bisbenzimid H 33258 (Sigma) Lösung eingebettet. Für die mikroskopischen Aufnahmen wurde ein Axioskop2 (Axiovision Rel. LE 4.5) und CLSM Mikroskop 510 META (Carl Zeiss AG) verwendet.

3.3.4 Neutralisationsassay

Der Neutralisationsassay wurde mit virushaltigen Überständen PERV/5°-infizierter HEK 293-Zellen durchgeführt. 100 µl uninfizierte Zellen wurden in einer 96 Well Mikrotiterplatte eingesät und für 4 Stunden im CO₂-Inkubator MCO-20AIC (Sanyo) bebrütet. 20 µl der dekomplementierten Seren wurden mit 80 µl verdünntem PERV/5° für 30 min bei 37 °C inkubiert und zu den 293-Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend für 72 h bei 37 °C inkubiert, die Vitalität wurde lichtmikroskopisch am Inversmikroskop (Carl Zeiss AG) überprüft und das Medium wurde anschließend entfernt. Die Zellen wurden bei 95 °C für 30 min inaktiviert (Inkubator Heraeus instruments) und anschließend bei -20 °C gelagert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 100 µl Lysepuffer (nukleasefreies Wasser mit 0.2 mg/ml Proteinase K und 10 % (v/v) 10 × PCR-Puffer) bei 60 °C für mindestens 3 Stunden. Die Proteinase K wurde bei 95 °C für 30 min hitzeinaktiviert. Jeweils 3 µl des Lysates wurden in der PERV-Duplex Real-time PCR pro Reaktionsansatz eingesetzt Für die Quantifizierung wurden die Primer/Sonden Kombinationen gag-for/gag-rev/gag-Sonde und huGAPDH-for/huGAPDH-re/huGAPDH-Sonde verwendet (siehe Tabelle 9). Die optimale Virusverdünnung wurde durch Titration des virushaltigen Überstandes auf 293-Zellen ermittelt. Verdünnungen, die in der Real-time PCR zu stabilen Ct-Werten zwischen 25 und 27 führen, sind geeignet.

Die Neutralisation wurde als eine serumvermittelte Reduktion der Provirusintegration von mehr als 75 % (2 Ct) im Vergleich zu den Kontrollseren (Präimmunsereum oder Serum von Kontrolltier) definiert. Die Unterschiede im Provirusgehalt wurden relativ nach der $\Delta\Delta C_t$ Methode bestimmt (LIVAK and SCHMITTGEN 2001; SCHMITTGEN and LIVAK 2008).

3.3.5 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (engl. surface plasmon resonance spectroscopy, SPR-Spektroskopie) wurde genutzt, um die Affinität der Seren immunisierter Tiere spektroskopisch auf Qualität der bindenden Eigenschaften zu untersuchen. Die Messungen wurden von Frau Dr. M. Eschricht an einem BIAcore X100 (GE Healthcare, Waukesha, Wisconsin, USA) durchgeführt.

Es wurden zwei Streptavidin-Chips (GE Healthcare) generiert. Der erste Chip wurde in Flußzelle 2 mit 1200 Resonanzeinheiten des biotynilierten E1 Peptides (AS: 484-505), und in Flußzelle 1 mit 1200 RU biotyniliertem randomisierten E1 Peptid beschichtet. Die Flußzelle 2 des zweiten Chips wurde entsprechend mit E2(AS: 583-604) und die Flußzelle 1 mit randomisierten E2 Peptid beschichtet. Für die Messungen wurden die Seren der Tiere unverdünnt verwendet. Als Laufpuffer wurde 1 x HBS-EP Puffer (10 mM HEPES; 150 mM NaCl; 3 mM EDTA; 0,05 % Surfactant P20; pH=7,4; GE Healthcare) mit 1 M Harnstoff verwendet. Die Assoziationszeit betrug 60 s und die Dissoziationszeit 180 s oder 240 s. Zur Regenerierung der Chips wurde 50 mM Glycine/HCl, pH 1,5 (bei Meerschweinchen pH=2.0) benutzt. Alle Analysen wurden bei 25 °C mit einer Flußrate von 10 µl/min durchgeführt.

3.3.6 Epitopkartierungen

Die Epitopkartierungen wurden mit PepSpot™-Membranen (JPT-Berlin) durchgeführt. Das gesamte p15E von PERV wurde in Form von 15-AS-Peptiden mit einer Überlappung von jeweils 12 Aminosäuren auf Zellulosemembranen gespottet. Das Entwicklungsverfahren ist analog zum Western Blot und erfolgte nach Herstellerprotokoll. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Die Detektion erfolgte mittels HPRT-konjugierten Sekundärantikörpern (siehe Tabelle 5) durch ECL (Amersham Pharmacia Biotech).

3.4 Mikrobiologische Methoden

3.4.1 Stammhaltung von Bakterien

Von allen transformierten Bakterien wurden Glycerinkulturen zur Kryokonservierung angelegt. Zu diesem Zweck wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur des jeweiligen Stammes mit ca. 200 µl Glycerin 100 % versetzt und eingefroren. Die Kulturen sind bei einer Lagerung bei mindestens -80 °C über mehrere Jahre reaktivierbar.

3.4.2 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien erfolgte auf LB-Agarplatten bzw. in LB - oder 2YT - Medium. Die Inkubationstemperatur betrug 37 °C. Bei Flüssigkulturen kam ein Schüttler der Sorte Innova 4330 (New Brunswick Scientific) bei 220 rpm zum Einsatz.

3.4.3 Bestimmung der Zelldichte

Als Maß für die Zelldichte wurde die OD_{600nm} herangezogen. Mindestens 800 µl der zu messenden Suspension wurden in eine Küvette gefüllt und im BioPhotometer (Eppendorf) gegen steriles Medium als Referenz vermessen.

3.4.4 Transformation

Nach der Hitzeschockmethode wurden Ligationsansätze bzw. Plasmide in chemokompetente *E. coli* Bakterien transformiert. Zu diesem Zweck wurden 50 µl der kompetenten Zellen mit dem Ligierungsansatz vermischt und anschließend 10 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei einer Temperatur von 42 °C für 30 sec in einem ThermoStat plus (Eppendorf). Im Anschluss wurden die Zellen für 2 min auf Eis gekühlt und mit 500 µl LB-Flüssigmedium (Raumtemperatur) versetzt.

Die Ansätze wurden für 45 min bei 37 °C inkubiert und anschließend auf Selektivnährböden ausplattiert. Die Herstellung chemokompetenter *E. coli* erfolgte nach dem Protokoll im QIAexpressionist (Qiagen).

3.5 Zellbiologische Methoden

3.5.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Für die Experimente fanden verschiedene Zelllinien Verwendung (siehe Tabelle 24)

Die Kultivierung eukaryotischer Zelllinien erfolgte in einem BBD 6220 (Heraeus) oder CO₂-Inkubator MCO-20AIC (Sanyo) Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 91 % relativer Luftfeuchtigkeit. Als Kulturgefäße wurden Zellkulturflaschen oder Zellkulturtestplatten von TPP (Techno Plastic Products AG) verwendet. Für die Zellkulturarbeiten wurden Sterilbänke der Firma Thermo Scientific genutzt.

Um Kontaktinhibition zu vermeiden, wurden alle Zelllinien ab einer Konfluenz von 80 % im Verhältnis 1:3 bis 1:10 geteilt. Bei stark adhärenenten Zellen (PK15 und Fibroblasten) wurden die Zellen zuvor 5 min mit Trypsin/EDTA (Invitrogen) behandelt und vorsichtig mit einem Zellschaber (TPP) von den Kulturgefäßen gelöst.

Tabelle 24: Verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Spezies	Zelltyp	Herkunft	Medium
HEK 293	Mensch	Embryonale Nierenzelllinie	ATCC CRL-1573	DMEM
HEK 293-PERV 5°	Mensch	Embryonale Nierenzelllinie	Infiziert mit PERV-A/C 5° Passage	DMEM
293GP	Mensch	Embryonale Nierenzelllinie mit Expression von MuLV gag und pol	Clonotech	DMEM
PK15	Schwein	Nierenzelllinie	ATCC CCL-33	DMEM
PFF F10 pLVTHM pol2	Schwein	Fibroblasten	(DIECKHOFF <i>et al.</i> 2007a; DIECKHOFF <i>et al.</i> 2008)	Fibroblasten-Medium
Primäre porzine Fibroblasten	Schwein	Fibroblasten	FLI	Fibroblasten-Medium

3.5.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Zur Langzeit-Verwahrung wurden die Zellen bei - 196 °C im flüssigen Stickstoff gelagert. Vor dem Einfrieren wurden die Zellen mit PBS gewaschen und wenn nötig trypsiniert. Anschließend wurde die Zellsuspension (ca.10⁵-10⁷ Zellen) in 15 ml Falcons überführt und bei 800 x g für 10

min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einem Gemisch aus 90 % (v/v) FKS und 10 % (v/v) DMSO aufgenommen, in 1 ml Aliquots auf Kryoröhrchen verteilt und auf Eis gelagert. Das Einfrieren erfolgte im Tiefkühlschrank, in einem speziellen mit Isopropylalkohol gefüllten Einfriercontainer, "Mr. Frosty", bei - 80 °C. Nach 24 h wurden die Kryoröhrchen in die Stickstofftonne überführt. Zum Reaktivieren wurden die Kryoröhrchen in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt. Nach dem Auftauen wurde der Inhalt in 10 ml vorgewärmtes DMEM-Medium aufgenommen. Um das DMSO zu entfernen, erfolgte eine Zentrifugation bei 800 x g für 10 min. Das DMSO-haltige Medium wurde entfernt und ersetzt. Die Zellen wurden abschließend in den gewünschten Kulturgefäßen ausgesät.

3.5.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit der Neubauer Zählkammer (improved; Brand). 10 µl der zu analysierenden Zellsuspension wurden mit dem gleichen Volumen einer 0,4 % Trypanblau-Lösung (Sigma-Aldrich) vermischt und in die Zählkammer eingebracht. Für die Bestimmung wurden 4 Großquadrate ausgezählt, dabei kann zwischen vitalen und toten Zellen unterschieden werden. Der Farbstoff Trypanblau dringt in tote Zellen ein und färbt diese blau-violett an. Die Zellzahl pro Milliliter ergibt sich aus der durchschnittlichen Zellzahl in den Großquadraten multipliziert mit 2×10^4 . Zuvor angefertigte Verdünnungen sind zu berücksichtigen.

3.5.4 Anlegen von Kulturen primärer porciner Fibroblasten

Die primären Zelllinien aus Ohrbiopsien der pLVTHM bzw pLVTHM pol2 transgenen Schweinen wurden am FLI von Dr. B. Petersen angelegt.

3.5.5 Isolation von PBMCs

Die Isolierung von PBMCs erfolgte aus Heparinblut mit dem Lymphocytenseparationsmedium Ficoll (Biochrom AG). In einem 50 ml Falcon wurden 10 ml Ficoll vorgelegt und mit dem gleichen Volumen Blut überschichtet. Danach folgte eine Zentrifugation für 20 min, 800 x g bei Raumtemperatur. Um eine distinkte Phasengrenze zwischen Ficoll und Serum zu gewährleisten, wurde die die Zentrifuge (MEGAFUGE 1.0 R, Heraeus) ohne Bremse auslaufen gelassen.

Durch die Zentrifugation entstand eine distinkte Schichtung. Am Boden befanden sich die Erythrozyten. Danach folgte eine Schicht Ficoll. Die oberste Phase entsprach dem Blut-Plasma. Zwischen Ficoll und Blut-Plasma setzten sich die PBMCs ab. Der „Ring“ wurde vorsichtig

abpipettiert und die PBMCs wurden in ein neues Falcon überführt. Die PBMCs wurden mit warmem PBS auf ein Volumen von 50 ml eingestellt und erneut bei 340 x g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Danach wurden die PBMCs in RPMI Medium aufgenommen, ausgezählt und in gewünschter Anzahl in die Kulturgefäße eingesät oder anderweitig, z.B. zur DNA- oder RNA-Isolation verwendet.

3.5.6 Durchflusszytometrie

Für den Nachweis der GFP Expression in porzinen Fibroblasten wurde eine FACS Analyse durchgeführt. Die Fibroblastenkulturen wurden trypsiniert, mit PBS gewaschen und anschließend mit *CellFIX*TM (BD Biosciences) nach dem Herstellerprotokoll fixiert. Die Zellsuspensionen wurden in dem Gerät FACScalibur (BD Biosciences) mit jeweils 1000 counts im FITCs-Kanal vermessen.

3.5.7 Transfektion

Zum Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen wurde die Methode der Transfektion angewandt. Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamine 2000 (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Um den Erfolg der Transfektion zu prüfen, wurde in Kontrollansätzen ein GFP-Expressionsvektor (pLXSN-GFP) transfiziert und die Zellen nach 2 Tagen unter einem UV-Mikroskop begutachtet. Nach erfolgreicher Transfektion wurden durch Zugabe von Geneticin oder Puromycin resistente Zellen selektiert und somit transgene Zelllinien generiert. Der Selektionsdruck wurde so lange aufrecht erhalten, bis untransfizierte Kontrollzelllinien keine Vitalität mehr zeigten.

3.5.8 Transduktion von PK15-Zellen

Die Transduktion wurde genutzt, um die shRNA Kassetten über retrovirale Partikel stabil in PK15-Zellen einzuschleusen. Bei dieser Methode wurden die Genkonstrukte in Form einer replikationsinkompetenten retroviralen mRNA in die Zelle eingebracht und vermittelt durch die retroviralen Enzyme Reverse Transkriptase und Integrase stabil in das PK15-Genom als DNA integriert. Im ersten Schritt wurden stabile 293GP-Zelllinien, die den entsprechenden retroviralen Vektor tragen, hergestellt. Zu diesem Zweck wurden 293GP-Zellen entsprechend einer Konfluenz von 80 % in 25 cm² Zellkulturflaschen ausgesät, mit den retroviralen Vektoren (pSiren Derivate; siehe Tabelle 4) transfiziert und anschließend stabile Zelllinien selektiert.

Die stabilen Zelllinien wurden mit dem Vektor pMAD2.G, der für das VSV-G Env kodiert, transfiziert. Nach 12 h wurde das Medium abgenommen und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und mit neuem Medium überschichtet. Nach drei Tagen wurde das Medium abgenommen und bei 800 x g für 10 min zentrifugiert. Der partikelhaltige Überstand wurde abgenommen, steril filtriert (Porengröße 45µm) und in Kryoröhrchen à 1,5 ml gefüllt.

In einer 96 well Platte (TPP) wurden PK15-Zellen in einer Dichte von 10^4 Zellen ausgesät und nach 24 h mit den retroviralen Überständen versetzt. Die verbleibende Virensuspension wurde bei - 80 °C verwahrt. Das Medium wurde abgenommen und durch 100 µl Virensuspension (jeweils Verdünnungsreihe 1:10) ersetzt. Um doppeltransgene Zelllinien (pSiren ΔU6 pol2 & pSiren ΔU6 pol1 G418) zu erhalten, wurde über sechs Reihen das pol2 Konstrukt vertikal und das pol1 Konstrukt horizontal 1:10 titriert. Jedem Well wurde Polybren in einer Endkonzentration von 6 µg/ml zugegeben. Nach einem Tag Inkubation wurden die Zellen einem Selektionsdruck durch entsprechende Antibiotika ausgesetzt und die Zellen kultiviert, bis untransduzierte Kontrollzellen kein Wachstum mehr zeigten. Wells mit vitalen Zellen wurden entsprechend gesplittet. Von jedem Konstrukt wurden jeweils zwei besiedelte Wells der Platte auf 25 cm² Kulturflaschen umgesetzt, weiter kultiviert und zur Messung der PERV und shRNA Expression herangezogen. Die Wells wurden so gewählt, dass mit ca. 10^3 transduzierten Einzelzellen zu rechnen war. Die Integration der Transgene wurde mit PCR (pSiren for & pSiren rev) nachgewiesen.

3.5.9 Herstellung transgener Schweine

Die pLVTHM bzw. pLVTHM pol2 transgenen Schweine wurden mit der Methode des somatischen Nukleus Transfers von Dr. Björn Petersen (Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Institut für Tierzucht Mariensee) aus der weiblichen Fibroblastenzelllinie PFF F10 pLVTHM pol2 und PFF F10 pLVTHM generiert. Die Tiere wurden am FLI gehalten.

3.6 Immunisierungsstudien

3.6.1 Applikation der Antigene

Zur Evaluierung des immunogenen Potentials der rekombinanten Hüllproteine von PERV und KoRV wurden verschiedene Spezies immunisiert. Alle Antigene befanden sich in PBS-gepufferter Lösung und wurden vor den Immunisierungen 1:1 mit Complete Freund's Adjuvanz (Pierce) gemischt und unter Verwendung einer 15 ml Spritze mit Kanüle GR 12 zu einer

Emulsion von sahnartiger Konsistenz verarbeitet. Drei Wochen nach der ersten Immunisierung erfolgten die Boosts unter Verwendung von Incomplete Freund's Adjuvanz (Pierce). Die Applikationsmenge und die Applikationsart sind in der folgenden Tabelle gelistet (siehe Tabelle 25). Die Immunisierung der Ratten, Meerschweinchen, Mäuse und einem der drei Kaninchen wurden vom Tierpflegepersonal des RKIs durchgeführt. Die Ziegen wurden am BfR immunisiert. Die Immunisierungen der beiden verbleibenden Kaninchen erfolgte in Ungarn im Institut der Kooperationspartner (Hungarian institute of veterinary vaccines; Gödöllő).

Tabelle 25: Applikationsart und -ort der Antigene

Spezies	Menge Antigen	Volumen	Injektion
Wistar Ratte	150 µg, 175 µg, 200 µg	1 ml	intramuskulär
Balb/c Mäuse	150 µg, 50 µg, 25 µg, 15 µg	200 µl	subkutan
Ziege	500 µg	2 ml	intramuskulär
Meerschweinchen	200 µg	1,5 ml	subkutan
Kaninchen	250 µg, 340 µg, 170 µg	2 ml	subkutan + intramuskulär

3.6.2 Gewinnung der Seren

Den Tieren wurde vor den Immunisierungen (Präimmunblut) und nach den Immunisierungen (Immunblut) Blut vom zuständigen Tierpflegepersonal abgenommen. Das Blut wurde 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und mit einem Glasstab gerührt um die Koagulation zu unterstützen. Das Blut wurde über Nacht bei 4 °C gelagert und anschließend bei 4 °C und 3000 rpm für 10 min in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und erneut bei 4 °C und 10 000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das partikelfreie Serum wurde im Wasserbad bei 56 °C für 30 min dekomplementiert und anschließend aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei – 20 °C. Immunglobuline wurden durch Fällung mit 2 M Ammoniumsulfat und IgGs mit dem SpinTrap™ kit (GE Healthcare) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt.

4 Ergebnisse

4.1 Ein Impfstoff gegen eine mögliche PERV-Übertragung

Die Übertragung von PERV bei der Xenotransplantation könnte im Vorfeld des Eingriffes durch die Induktion PERV-neutralisierender Antikörper im Zuge einer Impfung verhindert werden. Für den Fall, dass das Transplantat bzw. verbliebene porcine Lymphozyten PERV-Partikel freisetzen, würden diese durch die Antikörper neutralisiert werden, bevor eine Infektion von Zellen des Transplantatrezipienten stattgefunden hat. Für die verwandten Retroviren FeLV und MuLV erwiesen sich die rekombinanten viralen Hüllproteine als effektive Vakzine (LANGHAMMER *et al.* 2005; LANGHAMMER *et al.* 2006). Die Effektivität von rekombinantem PERV-p15E zur Induktion neutralisierender Antikörper konnte bereits in Ziegen demonstriert werden (FIEBIG *et al.* 2003).

Um die Eignung des rekombinanten gp70 zu testen und die des rekombinanten p15E weiter zu validieren, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene Spezies mit p15E, gp70 oder einem Gemisch von beiden immunisiert und die Seren der Tiere anschließend charakterisiert.

Des Weiteren wurden die beiden viralen Hüllproteine (SU und TM) des eng verwandten Koala Retrovirus (KoRV) analog zu denen des PERV rekombinant hergestellt und als Antigen für die Immunisierung von Ratten und Mäusen verwendet. PERV und KoRV sind phylogenetisch eng verwandt und es war anzunehmen, dass die Hüllproteine ähnliche immunologische Eigenschaften besitzen.

4.1.1 Charakterisierung der Expressionsvektoren

Für die Immunisierungen wurden die TM und SU Proteinuntereinheiten beider Viren als rekombinante Proteine in *E. coli* exprimiert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Für die Expression der gp70 Proteine fand der Vektor pet22b(+) (Novagen) und für die p15E Proteine der Vektor pCal-n (Stratagen) Verwendung. Die Vektoren standen zur Verfügung (FIEBIG *et al.* 2003; WURZBACHER 2007) und wurden zunächst sequenziert und die Leserahmen wurden charakterisiert.

PERV-p15E: Der Leserahmen des rekombinanten TMs von PERV (PERV-p15E) codiert 142 Aminosäuren. Die theoretische molekulare Masse beträgt 16,3 kDa. Für die

affinitätschromatographische Aufreinigung ist N-terminal das 31 Aminosäuren lange Calcium-bindende Peptid fusioniert (CBP). Zwischen CBP und TM befinden sich 2 Aminosäuren. Zusammen mit CBP haben diese einen Anteil am gesamten Molekulargewicht von 3,7 kDa. Die Sequenz ist identisch zu AJ133817 (AS 2206..2328; Abbildung 8). Die Nukleotidsequenz des ORFs wurde im Zuge der Publikation bei GenBank: HQ688786 hinterlegt (KAULITZ *et al.* 2011a).

PERV-gp70: Die Sequenz für das rekombinante gp70 wurde aus PK15-cDNA amplifiziert und über die Sall und EcoRI Schnittstellen in den Vektor pet-22b(+) kloniert (WURZBACHER 2007). Der Leserahmen des Proteins stimmt mit dem rekombinanten Oberflächenhüllprotein von FeLV überein, das in dem kommerziellen Impfstoff Leucogen verwendet wird und Katzen effektiv vor einer FeLV-Infektion schützt (HOFMANN-LEHMANN *et al.* 1995). Im Vergleich zum nativen Env beginnt die Aminosäuresequenz des rekombinanten Env-Proteins an Position 49 statt an Position 44 (AY288779; Abbildung 8). Der ORF reicht über die Furinprotease Schnittstelle (AS-Position 463) hinaus bis AS-Position 487 und beinhaltet die ersten 25 Aminosäuren des TMs. Am N-Terminus ist die 22 Aminosäuren lange pelB-Leader-Sequenz fusioniert, die das rekombinante Protein in den periplasmatischen Raum von *E. coli* dirigieren soll. Das Protein hat eine theoretische molekulare Masse von 54 kDa. Die Sequenz für den gp70 Leserahmen wurde in der GenBank als HQ688785 hinterlegt (KAULITZ *et al.* 2011a).



Abbildung 8: Schematische Darstellung der rekombinanten PERV-Antigene

- A: Virales EnvA-Polyprotein mit Signalpeptid (SP) den drei Proteinase-Schnittstellen (PCS) und dem R-Peptid (R), B: rekombinantes gp70 mit N-terminaler Leadersequenz (PelB) und C-terminalem His-Tag, C: rekombinantes p15E mit N-terminalem Calmodulin-bindenden Peptid (CBP)

KoRV-p15E: Die Strukturierung des Leserahmens für das rekombinante TM von KoRV ist analog zu PERV-p15E. Das Protein hat eine theoretische molekulare Masse von 16,2 kDa und der

TM Anteil umfasst ebenfalls 109 Aminosäuren. Die Sequenz entspricht der unter DQ174772 hinterlegten Sequenz (AS 489..597). Wie bei dem rekombinanten TM von PERV ist am N-Terminus das Calmodulin-bindende Peptid fusioniert.

KoRV-gp70: Die Sequenz für das rekombinante gp70 von KoRV wurde aus der DNA von KoRV-infizierten 293-Zellen mittels PCR amplifiziert und analog zu PERV-gp70 über die Sall und EcoRI Schnittstellen in den pet-22b(+) Vektor kloniert (WURZBACHER 2007). Die Sequenzierung zeigte Übereinstimmung zu der unter DQ174772 hinterlegten Sequenz. Am N-Terminus befindet sich ebenfalls die PelB Leadersequenz und am C-Terminus ein His-Tag (FIEBIG *et al.* 2006).

4.1.2 Aufreinigung der Antigene

Die Expression der rekombinanten Proteine erfolgte im heterologen Wirt *E. coli*. Es wurden die Stämme BL21-CodonPlusTM(DE3)-RP und BL21 RosettaTM 2(DE3)pLysS verwendet. Die optimalen Expressionsbedingungen für die KoRV- und PERV-TM Konstrukte waren bei einer Temperatur von 37 °C und einer IPTG-Endkonzentration von 1 mM zu finden. Die SU Konstrukte zeigten bei einer Temperatur von 37 °C und einer IPTG Konzentration von 0,1 mM die beste Expression. Im Gegensatz zu den TM-Konstrukten war bei den SU-Konstrukten keine Überexpression festzustellen. Die Endausbeute lag durchschnittlich bei 1 mg Protein pro Liter eingesetztem LB-Medium. Entsprechend wurde mit großen Mengen Kulturlösung (4 Liter/Ansatz) gearbeitet. Die rekombinanten SU-Proteine lagen nach Zellaufschluss unlöslich vor, aus diesem Grund wurde ein Protokoll zur Aufreinigung von Inclusion Bodies adaptiert, mit dem die Reinheit und Ausbeute verbessert werden konnten. Alle rekombinant hergestellten Proteine waren in physiologischen Puffern schwer löslich.

Die rekombinanten SU-Proteine (gp70) von PERV und KoRV liefen in SDS-Gelen auf gleicher Höhe bei 54 kDa. Die rekombinanten TM-Proteine von PERV und KoRV waren bei 12 kDa im SDS-Gel zu finden (Abbildung 9).

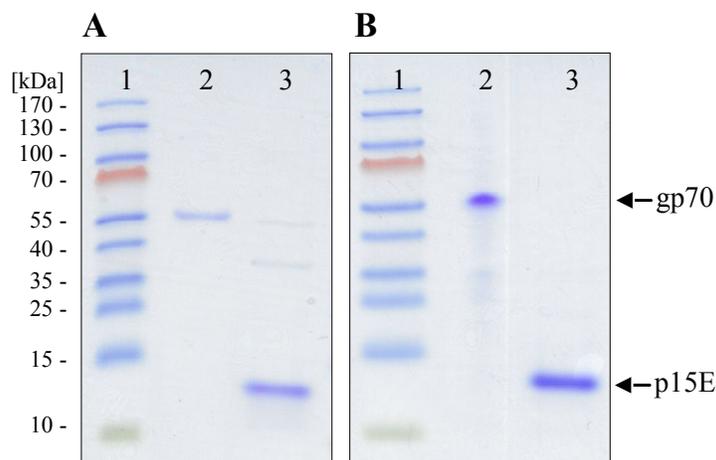


Abbildung 9: SDS-Page der aufgereinigten rekombinanten Proteine

Die rekombinanten Proteine p15E und gp70 von PERV (Bild A) und KoRV (Bild B) laufen im SDS-Gel auf gleicher Höhe (54 kDa und 12 kDa). Spur 1 = PageRuler™; Spur 2 = gp70, Spur 3 = p15E.

4.1.3 Immunisierung

Die Immunisierungen erfolgten bei Ratten und Ziegen intramuskulär sowie bei Mäusen, Meerschweinchen und Kaninchen subkutan. Für die Erstimmunisierungen wurde komplettes Freundsches Adjuvans und für die nach 2-3 Wochen folgenden Boosts inkomplettes Freundsches Adjuvans verwendet.

Da für die verwandten Retroviren FeLV und MuLV gezeigt wurde, dass eine Doppelimmunisierung mit p15E und gp70 zu erhöhten Titern an bindenden und neutralisierenden Antikörpern führt (LANGHAMMER *et al.* 2011a), wurden einige Spezies (Ratte, Maus, Meerschweinchen) sowohl mit gp70 als auch mit p15E immunisiert.

PERV: 10 Mäuse, 4 Ratten und 2 Meerschweinchen wurden mit dem rekombinanten gp70 (SU) immunisiert. 2 Ziegen (#346, #355), 10 Mäuse, 4 Ratten, 3 Kaninchen und 2 Meerschweinchen wurden mit rekombinantem p15E (TM) immunisiert. 10 Mäuse, 4 Ratten und 2 Meerschweinchen wurden mit einem homogenen Gemisch aus p15E und gp70 immunisiert. Darüber hinaus wurden 10 Mäuse, 4 Ratten und 2 Meerschweinchen als Kontrolltiere mit PBS und Adjuvans immunisiert. Die Immunisierung der Ziegen 16 und 20 (mit p15E) erfolgte ebenso wie die der Ziege 62 (mit gp70) im Vorfeld dieser Arbeit (FIEBIG 2007; WURZBACHER 2007). Die Seren dieser Tiere dienten als Positivkontrolle.

KoRV: Mit KoRV-p15E wurden 10 Mäuse und 4 Ratten immunisiert. 10 Mäuse und 4 Ratten wurden mit gp70 immunisiert. 10 Mäuse und 8 Ratten wurden mit einem Gemisch aus gp70 und p15E immunisiert. Die Immunisierung der Ziegen 46 (KoRV-p15E) und 61 (KoRV-gp70) erfolgte im Vorfeld der vorliegenden Arbeit im Zuge einer Diplomarbeit (WURZBACHER 2007).

4.1.4 Charakterisierung bindender Antikörper

In allen Spezies konnten antigenspezifische Antikörper induziert werden. Die Antikörper detektierten sowohl die Viren-Präparationen im Western Blot (Abbildung 10) als auch die rekombinanten Antigene in Western Blot (Abbildung 11) und ELISA (Abbildung 12).

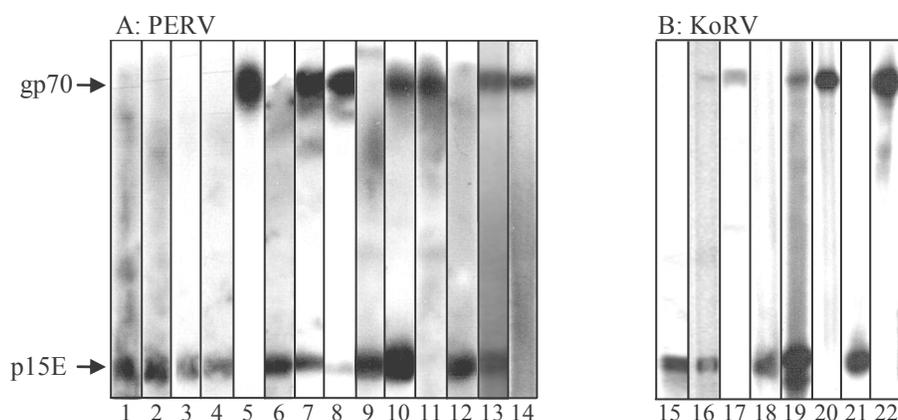


Abbildung 10: Western Blot Analyse der Immunsereen verschiedener Spezies

A: Zusammenstellung verschiedener Western Blots von Spezies die mit PERV-Antigenen immunisiert wurden. Tiere 1-5 Ziege, Tiere 6-8 Ratte, Tiere 8-11 Meerschweinchen, Tiere 12-14 Maus. 1-4, 6, 9, 12 wurden nur mit p15E, 5, 8, 11, 14 mit gp70 und 7, 10, 13 mit einem Gemisch aus p15E und gp70 immunisiert. B: Western Blots von Tieren die mit KoRV-Antigenen immunisiert wurden. Tiere 15-17 Ratte, 18-20 Maus, 21-22 Ziege. 15, 18, 21 wurden nur mit p15E, 17, 20, 22 nur mit gp70 und 16, 19 mit einem Gemisch von gp70 und p15E immunisiert. In den Blots wurden PERV- bzw. KoRV-Virenlysate verwendet.

Um zu zeigen, dass die Antikörper eine spezifische Folge der Immunisierungen waren, wurde ebenfalls Präimmunblut in Western Blot und ELISA untersucht. In den Spezies Maus, Meerschweinchen, Hase und Ziege konnten in keiner Präimmunprobe spezifische Antikörper gegen p15E nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden bei Ratten spezifische anti-p15E Antikörper im Präimmunblut und im Blut der Kontrolltiere gefunden (Abbildung 11).

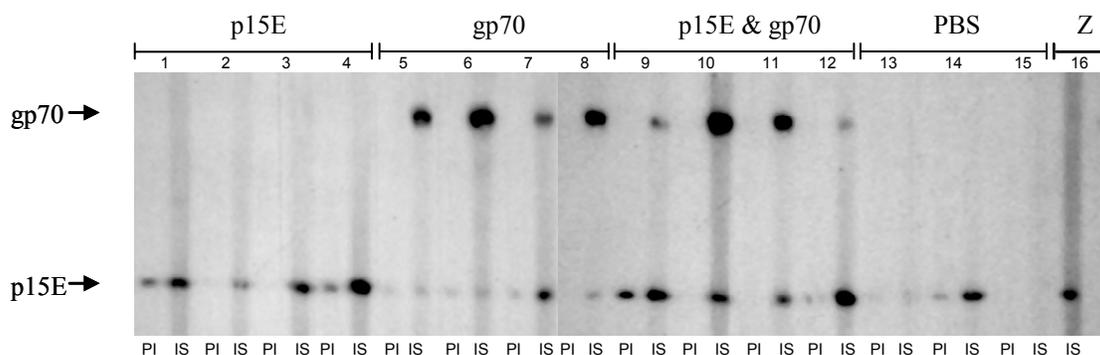
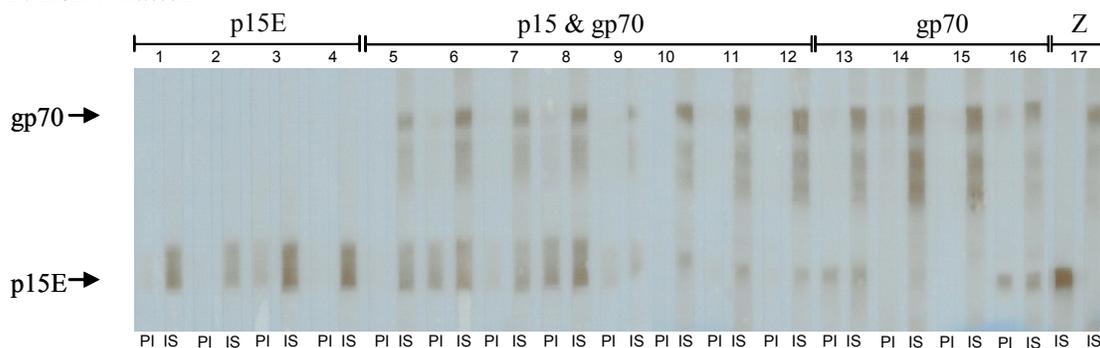
A: PERV Ratten**B: KoRV Ratten**

Abbildung 11: Analyse der Rattenserum im Western Blot

Der größte Teil der Präimmun-Seren von Ratten zeigte eine spezifische Reaktion gegen p15E von PERV und KoRV. Bild A zeigt die Immunsere (IS) und Präimmun-Seren (PI) der mit PERV-p15E und -gp70 immunisierten Rattengruppen. Als Antigen für den Western Blot wurde PERV-Virenlysate verwendet. Bild B zeigt die Reaktion der Rattenserum der KoRV-Gruppen auf ein Gemisch der rekombinanten Antigene p15E und gp70. In beiden Fällen konnte eine spezifische Immunantwort gegen gp70 erzielt werden. „Präformierte“ anti-p15E Antikörper traten jedoch in beiden Gruppen auf. Bei (Z) handelt es sich um die Kontrollziegenseren.

Um die Titer der bindenden Antikörper zu bestimmen, wurden ELISAs durchgeführt. Als Antigen dienten die rekombinanten Proteine. Die Titer der mit PERV-Antigenen immunisierten Spezies lagen im Bereich von 10^4 bis 10^6 (Abbildung 12). Die Analyse der Seren der KoRV-Immunisierung erfolgte als Bestandteil einer Diplomarbeit (MAHDI 2009). Auch hier zeigten die Seren der Spezies Maus, Ratte und Ziege vergleichbare Reaktivitäten in den ELISAs.

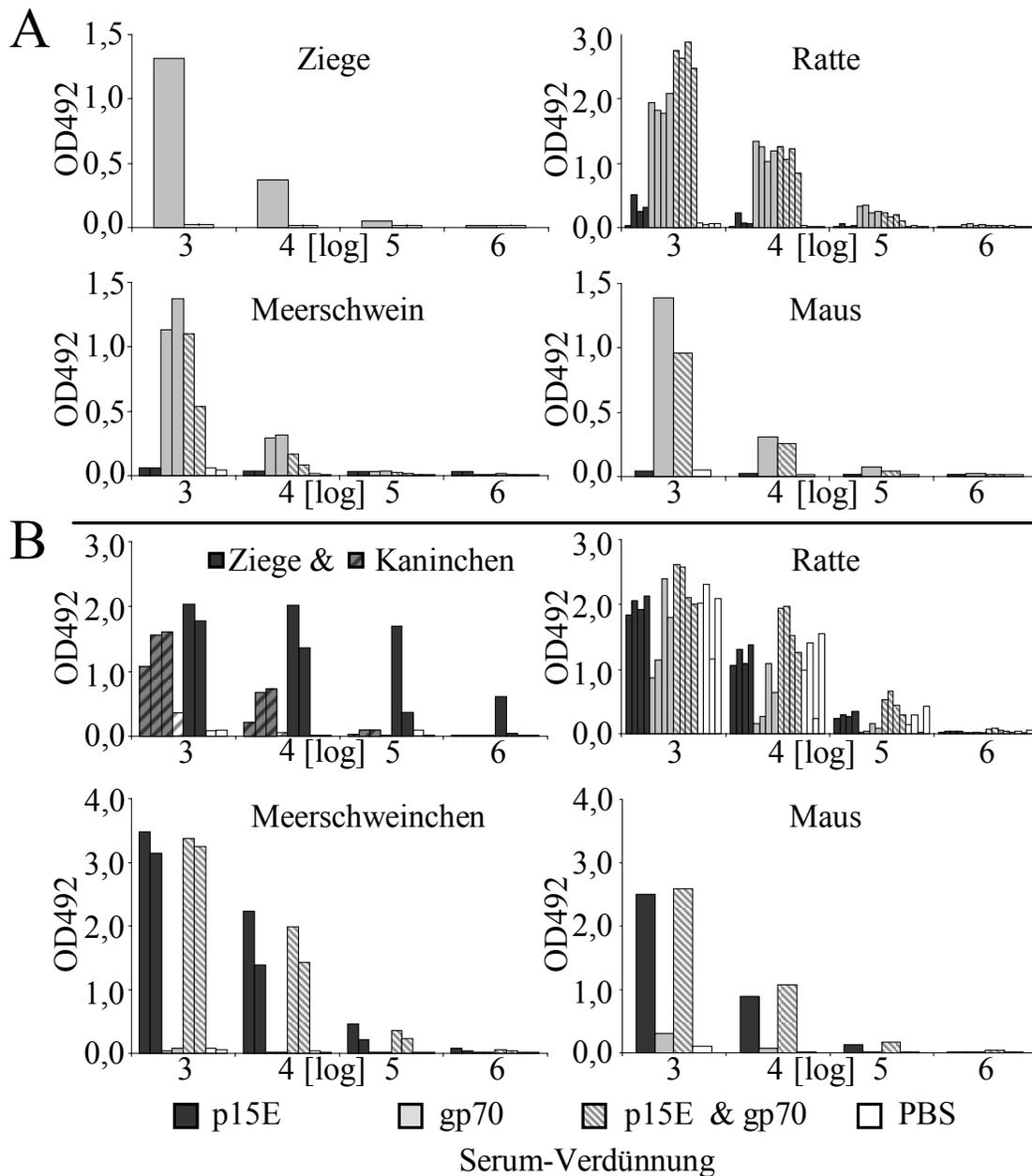


Abbildung 12: ELISA-Daten der Immunisierungen mit gp70 und p15E von PERV

A: Titer gp70 spezifischer Antikörper von Ziege (62), von 16 Ratten, von 8 Meerschweinchen und von 40 Mäusen (gepoolt) bestimmt mit rekombinantem gp70. B: Titer p15E spezifischer Antikörper von 2 Ziegen (346, 355), 3 Kaninchen, 16 Ratten, 8 Meerschweinchen und 40 Mäusen (gepoolt) bei der Verwendung von p15E als Antigen. Schwarze Säulen indizieren die mit p15E, graue die mit gp70, schraffierte die mit gp70 und p15E sowie weiße Säulen die mit PBS (Kontrolltiere) immunisierten Gruppen.

4.1.5 Infektionsversuch von Ratten mit KoRV

Um herauszufinden, ob ungeachtet der in Wistar-Ratten gefundenen präformierten p15E Antikörper die Tiere mit KoRV infiziert werden können, wurden jeweils 2 Tiere der Rassen Lewis und Sprague-Darley (von Charles River Inc.) auf Infizierbarkeit mit KoRV untersucht (Abbildung 13).

Zu diesem Zweck wurde ihnen 5 ml eines KoRV-haltigen Überstandes aus der Zellkultur (10^5 IFU/ml) intraperitoneal appliziert (Abbildung 13 A; P0). 11 Tage vor der Belastung (Abbildung 13 A; P-1) sowie 11 (A; P1) und 48 Tage (A; P2) nach der Belastung wurde den Tieren Blut zur Isolierung von PBMCs, Serum und DNA entnommen. Die PBMCs von Tag 11 wurden mit KoRV-infizierbaren 293-Zellen co-kultiviert und nach 12 Tagen (A; P3) und 22 Tagen (A; P4) wurde DNA aus den 293-Zellen isoliert um KoRV-Provirus mittels PCR nachzuweisen. Weder in der PBMC-DNA (A; P1) noch in den Proben der Co-Kultivierung (A; P3,P4) konnte KoRV-Povirus nachgewiesen werden.

Die Analyse der Seren im Western Blot mit rekombinantem KoRV-gp70 und p15E als Antigen zeigte die Anwesenheit von p15E spezifischen Antikörpern in allen Ratten schon vor und ebenfalls nach der Belastung (Abbildung 13 C; P-1, P1, P2). Gp70 Antikörper konnten zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Eine Infektion mit KoRV wurde somit nicht detektiert.

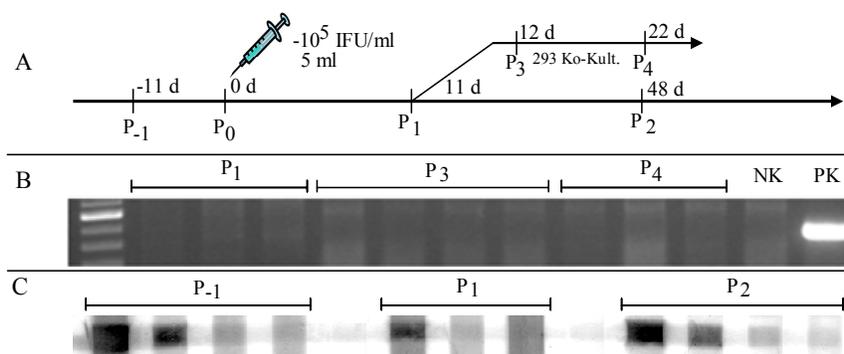


Abbildung 13: Infektionsversuch von Ratten mit KoRV

A: Zeitlicher Verlauf des Versuches. In verschiedenen Intervallen wurde den Tieren Blut abgenommen (P-1, P1, P2). Mit den PBMCs aus P1 erfolgte eine Co-Kultivierung mit HEK 293T-Zellen und nach 12 und 22 Tagen eine Isolation von DNA. B: PCR-Analyse der PBMCs sowie der beiden Proben der Co-Kultivierung. Es konnte kein KoRV-Provirus nachgewiesen werden. C: Western Blot der Seren der 4 Ratten vor und nach der Inokulation mit Virus. P15E spezifische Antikörper waren bereits vor der Belastung vorhanden.

4.1.6 Neutralisationsassay

Für die Messung der neutralisierenden Aktivität der Seren wurde ein Neutralisationsassay angewandt. Der Test basiert auf der relativen Messung der PERV-Provirusintegration in 293-Zellen mittels Real-time PCR.

Ein definierter Viren-Stock wurde verdünnt, mit dem zu analysierenden Serum inkubiert und anschließend mit den Zielzellen in Kontakt gebracht. War das Serum neutralisierend, so sank die Anzahl der integrierten Proviren im Vergleich zum unbehandelten Virenstock bzw. zu Serumproben ohne neutralisierende Wirkung. Beim Auftreten einer Neutralisation wurden die PERV-spezifischen Ct-Werte größer.

Bei der verwendeten Real-time PCR handelte es sich um eine Duplex Konfiguration. Parallel zu der PERV-spezifischen Sequenz (gag) wurde eine für das Housekeeping Gen hGAPDH charakteristische Sequenz co-amplifiziert. Auf diese Weise wurde eine probeninterne Normalisierung ermöglicht. Ebenfalls konnten cytotoxische Effekte auf Grund schwankender Ct-Werte für das hGAPDH-Gen identifiziert werden.

Eine Erhöhung der Ct-Werte des Referenzgens im Vergleich zu den Kontrollen würde in diesem Assay auf Apoptose bzw. eine Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit hinweisen. Da die PERV-spezifische Real-time PCR in einem hoch konservierten Bereich von gag lokalisiert ist, können mit diesem System die PERV-Subtypen A, B und C sowie A/C nachgewiesen werden.

Als Testvirus wurde PERV/5° genutzt, eine hochtitrige an humane Zellen adaptierte A/C Rekombinante.

Die Messung der Effizienz der Duplex Real-time PCR durch Standardverdünnungen zeigte eine sehr gute Korrelation und Linearität beider PCRs über einen großen Messbereich. Es konnte keine signifikante Interferenz bis zum Detektionslimit von 10 Kopien des Provirus pro 25 µl Reaktionsansatz festgestellt werden (Abbildung 14).

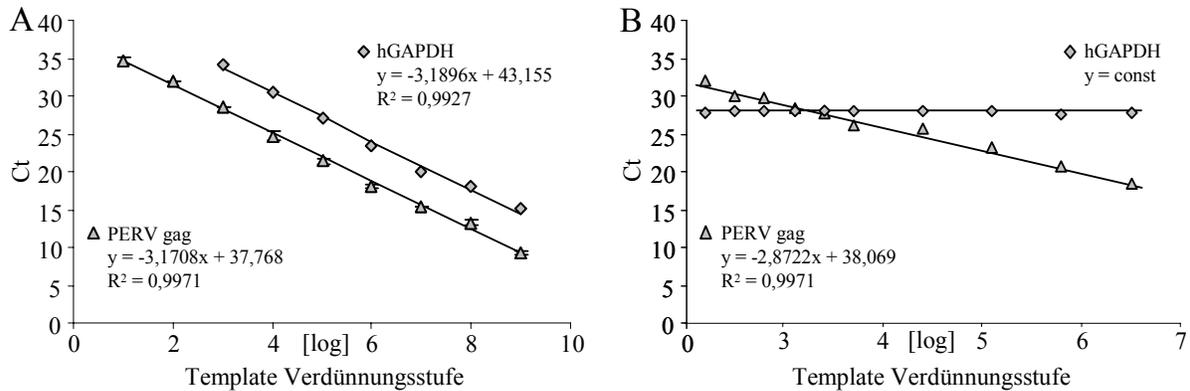


Abbildung 14: Effizienzbestimmung NT-Assay

A: Äquimolare Ausverdünnung des PERV-A/C 220/14 Moleklarklons und des klonierten hGAPDH Amplikons. Die Effizienz beider PCRs ist nahe 100 % und über den gemessenen Bereich linear. B: Ausverdünnung des Moleklarklons PERV-A/C 220/14 in jeweils 100 ng humaner DNA. Die Menge an hGAPDH ist durch die Anwesenheit der genomischen DNA konstant und spiegelt sich in den identischen Ct-Werten von 28 wieder. Die Messwerte für PERV verhalten sich über den gemessenen Bereich bis 10^6 -PERV-Kopien ebenfalls linear. Es wurde keine Interferenz beider PCRs festgestellt.

Die Seren der mit p15E immunisierten Ziegen sowie das Serum der mit gp70 immunisierten Ziege zeigten eine PERV-spezifische, konzentrationsabhängige PERV-Neutralisation. Die Präimmun-Seren der Ziegen zeigten hingegen keine Neutralisation (siehe Abbildung 15). Der Effekt basiert auf den Immunglobulinen, da er auch nach Aufreinigung der Immunglobuline aus dem Serum (Ziege 355) erhalten blieb.

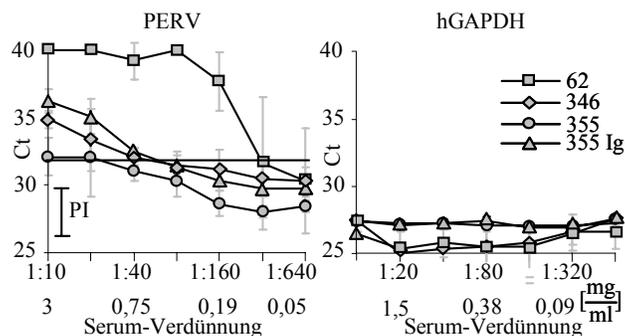


Abbildung 15: Test der Neutralisation bei Ziegen

Gezeigt wird die neutralisierende Aktivität des Ziegensersums 62 immunisiert mit gp70 und der Ziegenserum 346 und 355 immunisiert mit p15E. Zusätzlich wurde die neutralisierende Aktivität aufgereinigter Immunglobuline von Ziege 355 gemessen. Alle Seren zeigten eine Neutralisation.

Der Neutralisationstiter wurde als diejenige Verdünnung definiert, bei der der PERV-spezifische Ct-Werte mindestens 2 Cts über dem des Präimmun-Serums lag. Der Titer der Ziege 355 betrug 1:20, der der Ziege 346 1:40, der des Serums 62 spezifisch für gp70 1:320 und der der isolierten Immunglobuline von Ziege 355 1:40 bei einer Konzentration von 0,75 mg/ml.

Die Titer der Seren der anderen Spezies konnten nicht bestimmt werden. Die Ratten zeigten präformierte p15E Antikörper und wahrscheinlich damit verbundene neutralisierende Effekte in den Präimmun-Seren sowie den Seren der Kontrollgruppen (Daten nicht gezeigt). Auch die Präimmun-Seren von Mäusen und Meerschweinchen führten zu einer Reduktion der Provirusintegration im Assay, obwohl keine präformierten Antikörper nachweisbar waren. Der Effekt konnte durch eine Aufreinigung der IgGs nicht behoben werden (Daten nicht gezeigt).

4.1.7 Hemmung mit Peptiden

Um die Spezifität der neutralisierenden Aktivität zu zeigen, wurden Inhibitionsexperimente mit dem rekombinanten gp70 und den synthetischen Peptiden, die mit den p15E Epitopen korrespondieren, durchgeführt. Die Inkubation des Ziegenserums 62 (spezifisch für gp70) mit rekombinatem gp70 zeigte im Neutralisationsassay eine dosisabhängige Inhibition der Neutralisation (Abbildung 16). Um herauszufinden, ob Antikörper gegen das E1 und das E2 Epitop an der neutralisierenden Aktivität des Ziegenserums 16 (spezifisch für p15E) ursächlich sind, wurde das Serum von Ziege 16 mit E1 -, E2 - und dem Gemisch von E1- und E2-Peptid sowie dem ISU-Peptid als Kontrolle im NT-Assay analysiert. Nur das E2 Peptid konnte die Neutralisation signifikant inhibieren, was zeigt, dass die neutralisierenden Antikörper hauptsächlich gegen die MPER von p15E gerichtet sind. Im Fall von HIV-1-neutralisierenden Antikörpern wie z.B. 2F5 and 4E10 ist dies ebenfalls der Fall (ZWICK *et al.* 2001).

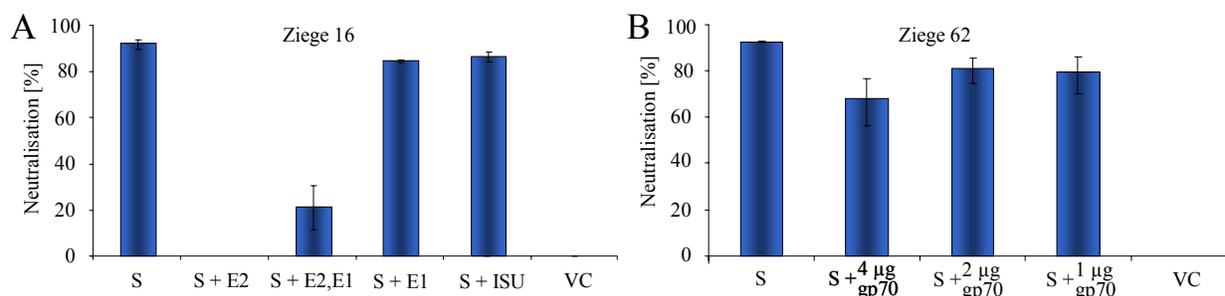


Abbildung 16: Inhibitionsversuch mit Peptiden und rekombinanten Proteinen

A: Neutralisierende Aktivität des Serums von Ziege 16 (p15E) in Anwesenheit MPER (E2)-, FPPR (E1)- und ISU-Domain (ISU)-spezifischer Peptide (Tabelle 6). Eine Zugabe von E2 reduzierte die Neutralisation spezifisch. B: neutralisierenden Eigenschaften des Serums von Ziege 62 (gp70) in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen von rekombinatem gp70. VC = Virus-Kontrolle ohne Serum.

4.1.8 Epitopkartierung

Um die Bindungsstellen der PERV-spezifischen p15E Antikörper zu charakterisieren, wurden Epitopmappings der Immunsereen von Meerschweinchen, Ziegen und Mäusen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden spezifische PepSpotsTM-Membranen verwendet, auf denen die gesamte Sequenz des TMs von PERV in Form überlappender Peptide von jeweils 15 Aminosäuren Länge kovalent gebunden vorlag.

Der Vergleich (Abbildung 17) mit Mappings aus vorangehenden Untersuchungen (Ziege 16, 20 und Ratten (FIEBIG 2007)) zeigte, dass zwei Haupt-Epitope detektiert wurden. Ein Epitop (E1) ist in der FPPR lokalisiert und ein anderes (E2) in der MPER. Alle Ziegenserum banden an die AS-Sequenz GPQQQL innerhalb der E1 Region. Das Serum von Ziege 346 zeigte ebenfalls eine Bindung in der Immunsuppressiven Domäne (TACKE *et al.* 2000). Bei zwei Seren (Ziege 346 and 355) erwies sich ebenfalls der argininreiche Bereich „ERLERRR“ innerhalb der MPER als immunogen. Die Seren der Ziegen 16 und 20 detektierten nur ein Epitop in jeder der beiden Domänen, wohingegen die Seren der Ziegen 346, 355 sowie 4 von 9 Ratten mit zwei Epitopen innerhalb der MPER interagierten. Diese Bereiche wurden als E2a und E2b deklariert. Die meisten der E2b Epitope enthielten die Sequenz FEGWFN. Alle Seren der Spezies Ratte, Maus und Meerschweinchen reagierten spezifisch mit Epitopen innerhalb der MPER aber nur 5 von ihnen mit Epitopen in der FPPR.

Die Lokalisation der Epitope ist denen, die in Immunisierungsversuchen mit rekombinantem FeLV-p15E in den Spezies Ratte und Ziege identifiziert wurden, sehr ähnlich (LANGHAMMER *et al.* 2005; LANGHAMMER *et al.* 2006). Das E2b Epitop FEGWFN ist bei beiden Viren identisch und befindet sich in einem Bereich, der über drei Aminosäuren (WFN) ebenfalls zum gp41 von HIV-1 (NWFNIT) Homologie zeigt. NWFNIT ist das Epitop des breit HIV-1-neutralisierenden human monoklonalen Antikörpers 4E10.

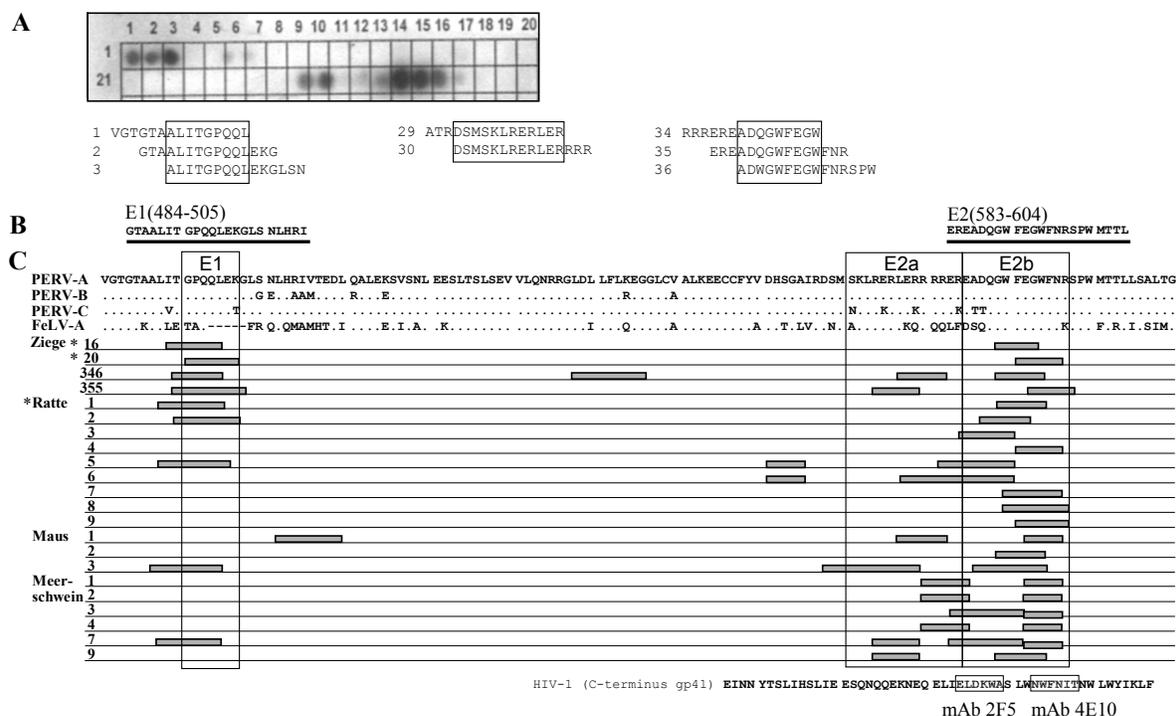


Abbildung 17: Epitopkartierung verschiedener mit p15E immunisierter Spezies

A: PepSpotsTM-Membran von Maus Nr. 3. Auf der Membran sind 15-mer Peptide, die mit je 12 Aminosäure-Resten überlappen und in ihrer Gesamtheit die TM Sequenz repräsentieren, immobilisiert. Nach Inkubation mit dem Serum wurden mit einem anti-Mause-HPRT-Konjugat diejenigen Spots detektiert, an die p15E spezifische Immunglobuline des Mausserums gebunden haben. B: Sequenz und Lokalisation der Peptide E1 und E2 wie sie für die Biacore-Analyse verwendet wurden. C: schematische Zusammenfassung aller Epitopmappings. Seren, die im Rahmen anderer Arbeiten gemapped wurden, sind mit * markiert. Alle Tiere waren mit rekombinantem p15E immunisiert worden. Die Sequenzen des p15E von PERV-A, PERV-B, PERV-C and FeLV werden ebenfalls gezeigt. E1 ist nach der Reaktivität des Serums von Ziege 20 definiert (FIEBIG *et al.* 2003), sowie E2a und E2b in Anlehnung an die Epitopen die für FeLV beschrieben wurden (LANGHAMMER *et al.* 2006). Zum Vergleich der gefundenen Epitope mit den Epitopen der monoklonalen Antikörper 2F5 und 4E10 ist ebenfalls ein Teil des gp41 von HIV-1 dargestellt (ZWICK *et al.* 2001).

4.1.9 Biacore-Analyse

Um die in den Mappings gefundenen Epitope mit einer zweiten Methode zu bestätigen und um das Bindungsverhalten zu charakterisieren, wurde eine SPR Analyse mit einem BIAcore X100 Gerät durchgeführt. Zwei Peptide E1(484–505) (GTAALITGPQQLEKGLSNLHRI) und E2(583–604) (EREADQGWFEFEGWFNRSPWMTTL), die mit Hilfe des Ziegenserums 20 definiert wurden (FIEBIG *et al.* 2003), sowie randomisierte Kontrollpeptide wurden verwendet. Die SPR Analyse der Seren zeigte ein für affine Antikörper typisches Bindungsverhalten (Abbildung 18, A), das in ähnlicher Weise auch für den breit HIV-1-neutralisierenden Antikörper 2F5 zu seinem Epitop beschrieben ist (FIEBIG *et al.* 2009). Während Ziegen-Serum 355 fast gleich stark an die E1 und E2 Peptide band, zeigten die Seren von Ziege 16 (4,1 fach), Ziege 20 (3,6 fach) und Ziege 346 (1,7 fach) eine stärkere Affinität zum MPER abgeleiteten E2 Peptid (Abbildung 18, B).

Neben den Seren von Ziegen wurden ebenfalls Seren von Meerschweinchen und Ratten analysiert (Abbildung 18, C, D). Die Seren von 4 Meerschweinchen, die mit p15E allein immunisiert wurden (Säulen 1,2) oder in Kombination mit gp70 (Säulen 3,4), zeigten ebenfalls eine Bindung zum MPER abgeleiteten E2 Peptid in der Biacore Analyse. Die Seren der mit gp70 allein immunisierten Meerschweinchen (Säulen 7,8) zeigten hingegen keine Reaktivität, weder gegen E1 noch gegen E2 (Abbildung 18, C). Die Seren von 3 der 4 Ratten immunisiert mit p15E und 2 der 4 Ratten der Mischgruppe (gp70 + p15E) zeigten eine Bindung zum E2 abgeleiteten Peptid.

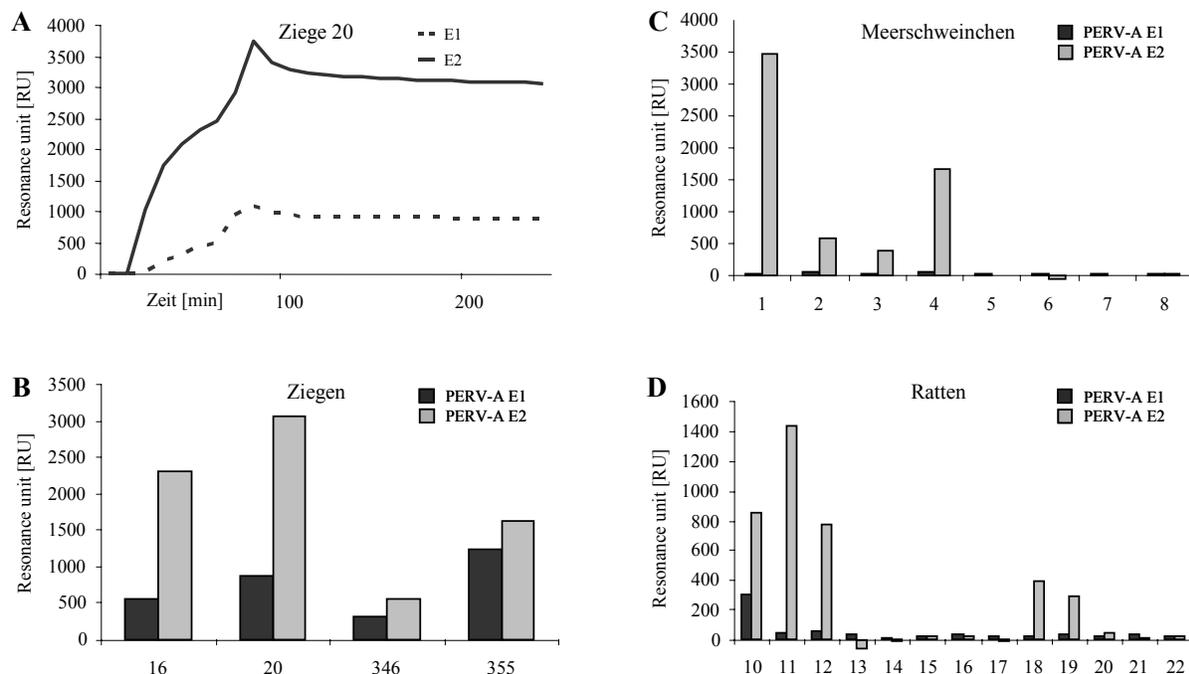


Abbildung 18: Biacore-Analyse ausgewählter Seren

A: für affine Antikörper typische Bindungskurve des Ziegenserums 20 hinsichtlich der E1 und E2 Peptide. B: Bindungsstärke der Seren von 4 Ziegen zu E1 und E2. C: Bindungsstärke der Seren von 8 Meerschweinchen. Bei 4 Seren ist eine Bindung zu E2 und bei keinem der Seren eine Bindung zu E1 vorhanden. D: Analyse der Seren von 13 Ratten.

Einige der Seren reagierten mit dem von der FPPR abgeleiteten Peptid E1 (grau) und dem von der MPER abgeleiteten Peptid E2 (schwarz). Die Ziegen wurden nur mit p15E, die Meerschweinchen mit p15E (Tiere 1,2), p15E und gp70 (Tiere 3,4), gp70 (Tiere 5,6) und PBS+Adjuvans (Tiere 7,8) sowie die Ratten mit p15E (Tiere 10-13), gp70 (Tiere 14-17), p15E und gp70 (Tiere 18-21) und PBS + Adjuvans (Tier 22) immunisiert.

4.1.10 Immunserum reagiert mit PERV auf der Zelloberfläche

Um den Mechanismus der Neutralisation näher zu untersuchen, wurde getestet, ob das Serum der Ziege 355 natives Virus erkennt. Zu diesem Zweck wurden nicht-permeabilisierte 293-Zellen die mit PERV/5^o infiziert oder nicht infiziert waren mit Serum inkubiert und unter einem Axioskop sowie einem konfokalen Lasermikroskop untersucht. Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC markierter anti-Ziege Antikörper verwendet.

Uninfizierte Zellen wurden weder vom Präimmun-Serum noch vom Immunserum der Ziege 355 gebunden (Abbildung 19, A und B). Im Gegensatz dazu reagierte das Ziegenserum 355 mit Viren-Akkumulationen auf der Oberfläche der PERV-infizierten 293-Zellen (Abbildung 19, C und D).

Viren-Akkumulationen auf der Zelloberfläche PERV/5°-infizierter 293-Zellen sind typisch und sind bereits durch „Scanning Electron Mikroskopie“ (SEM) identifiziert worden (KARLAS *et al.* 2010). Die Aufnahmen zeigen, dass die vom Immuns Serum der Ziege 355 erkannten p15E spezifischen Epitope auf der Oberfläche PERV-produzierender Zellen präsentiert werden und für eine spezifische Interaktion zugänglich sind.

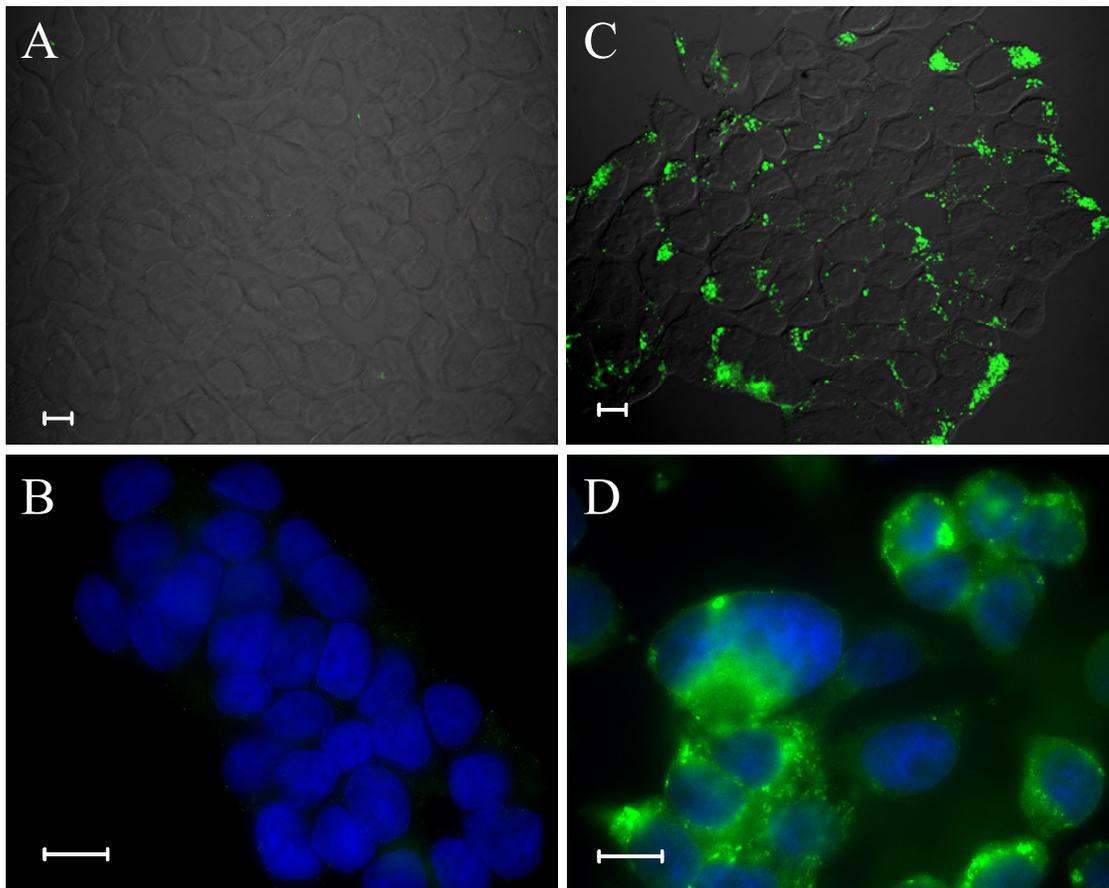


Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von PERV-A/C 5° infizierten 293-Zellen unter Verwendung eines Ziegenserums gegen p15E von PERV

A: Bindung des Präimmun-Serums von Ziege 355 an PERV-A/C 5° infizierte 293-Zellen. B: Bindung des Immuns erums von Ziege 355 an uninfizierte 293-Zellen. C: und D: Reaktion des Immuns erums von Ziege 355 mit PERV-infizierten 293-Zellen. Als sekundärer Antikörper wurde ein anti-Ziege FITC markierter Antikörper verwendet. Die PERV-Partikel wurden spezifisch vom Immuns erum der Ziege 355 erkannt. Die entsprechenden Epitope sind für die Antikörperreaktion zugänglich. Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop (A, C) sowie einem Axioskop (B, D) gemacht.

4.2 Hemmung von PERV mittels RNAi

In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass sich die PERV-Expression durch den Einsatz geeigneter siRNAs reduzieren lässt. In den ersten *in vitro* Versuchen konnte eine effiziente siRNA-Sequenz (pol2) identifiziert werden, die die PERV-Expression in PERV-infizierten humanen Zelllinien und porcinen Zelllinien um durchschnittlich 80 % vermindern konnte (DIECKHOFF *et al.* 2007a; KARLAS *et al.* 2004). Um die pol2-siRNA auch konstitutiv exprimieren zu können, wurde in Folge-Experimenten der lentivirale Vektor pLVTHM verwendet. Mit ihm wurde es möglich, die pol2-siRNA als shRNA unter der Kontrolle eines Polymerase III abhängigen Promotors (H1) in verschiedenen Zelllinien stabil zu exprimieren. Durch Transduktion und anschließende Selektion konnten shRNA exprimierende porcine primäre Zelllinien hergestellt werden, die eine reduzierte PERV-Expression aufwiesen (DIECKHOFF *et al.* 2007a). Diese Zelllinien dienten als Kerndonoren für die Generierung shRNA transgener Schweine mittels somatischen nuklearen Kerntransfers. In der ersten Studie von 2008 wurden insgesamt sechs lebende pol2 positive transgene Ferkel geboren, von denen vier kurz nach der Geburt durch Agalaktie der Muttersau verstarben. Die beiden überlebenden Tiere wurden am dritten Tag eingeschläfert, um Proben für die Analyse der PERV-Expression zu gewinnen. Es war festzustellen, dass die pol2-positiven Tiere gegenüber den pol2 negativen Tieren eine um bis zu 94 % verminderte PERV-Expression in den untersuchten Organen (Herz, Lunge, Leber, Milz und Niere) aufwiesen (DIECKHOFF *et al.* 2008).

4.2.1 Generierung und Charakterisierung shRNA transgener Schweine

Um herauszufinden, ob der hemmende Effekt auch in adulten Tieren zu sehen ist, wurden neue transgene Tiere generiert. Die Klonierung erfolgte wie im ersten Experiment mittels somatischen Kerntransfers. Als Kerndonoren wurden die beschriebenen Zelllinien pFF F10 pLVTHM und pFF F10 pLVTHM pol2 verwendet (DIECKHOFF *et al.* 2007a). Es handelt sich hierbei um primäre porcine Fibroblasten, die mit den lentiviralen Vektoren pLVTHM (Kontrolle) beziehungsweise pLVTHM pol2 transduziert waren.

pLVTHM ist ein lentiviraler Vektor, der als Selektionsmarker GFP trägt. Die shRNA Kasette befindet sich in der 3' LTR. Durch den Integrationsprozess wird die shRNA Kasette verdoppelt und befindet sich nach Integration sowohl in der 5' als auch in der 3' LTR. Von beiden Zelllinien wurden am Friedrich-Loeffler-Institut Mariensee transgene Embryonen hergestellt und in porcine

Leihmütter (vier Tiere) verpflanzt. Der Kerntransfer erfolgte am 14.11.2007. Nach 119 Tagen kamen am 10.03.2008 sechs pol2 transgene Schweine zur Welt, von denen drei durch das Muttertier erdrückt wurden. Die überlebenden Tiere wiesen keine anatomischen Auffälligkeiten auf und entwickelten sich normal. Eines der pol2-positiven Tiere wurde am 20.11.2008 erneut durch Kerntransfer geklont. Ausgangsmaterial war eine Fibroblastenkultur, die aus einer Ohrbiopsie gewonnen wurde. Es wurden insgesamt 181 Embryonen in zwei Säue verpflanzt. Am 15.03.09 wurden zehn Ferkel geboren, von denen nur ein Tier überlebte.

4.2.2 Probenahme bei den transgenen Tieren

Im Gegensatz zu den 2008 veröffentlichten Versuchen stand bei den aktuellen Experimenten die Wirkung und Expression der shRNA im adulten Tier im Fokus. Aus diesem Grund war es notwendig, die Art der Proben so zu wählen, dass die Gesundheit der Tiere nicht gefährdet war. Die Probennahme beschränkte sich aus diesem Grund auf Ohrbiopsien und Vollblut.

Aus den Ohrbiopsien wurden Fibroblastenkulturen hergestellt (von Dr. Björn Petersen; FLI), die für weitere Analysen zur Verfügung standen. Die transgenen Tiere wurden insgesamt über einen Zeitraum von zwei Jahren untersucht (Abbildung 20).

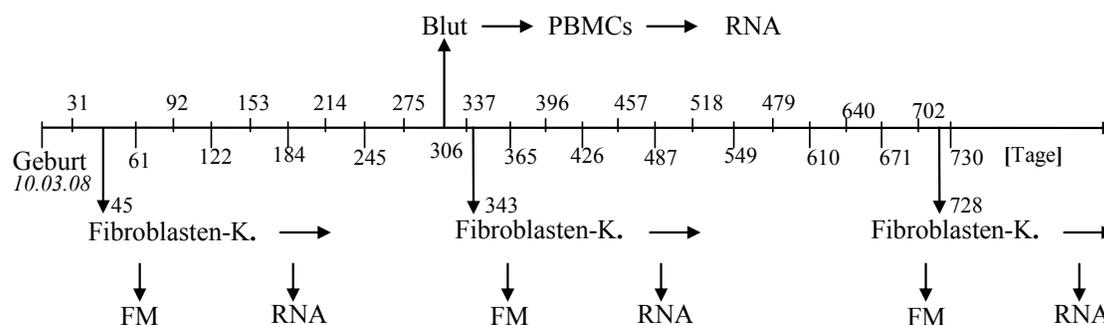


Abbildung 20: Zeitstrahl der Probenahme bei pol2-transgenen Schweinen

45, 343 und 728 Tagen nach der Geburt wurde den Tieren Ohrgewebe entnommen. Aus diesem wurden Fibroblastenkulturen angelegt. Die Fibroblasten wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop auf Anwesenheit des Reportergens GFP untersucht und dienten als Quelle für RNA zur Messung der PERV-Expression. Ebenfalls wurde Blut zur Isolation von PBMCs mit anschließender RNA-Gewinnung zu einem Zeitpunkt abgenommen. FM = Fluoreszenzmikroskopie

4.2.3 Nachweis der Transgenintegration

Die Integration des Transgens wurde mittels PCR nachgewiesen. Als Template für den Nachweis diente aus Ohrbiopsien oder PBMCs isolierte DNA. Es kamen drei verschiedene Primer Sets zum Einsatz. Das erste Primerpaar amplifizierte ein 502 bp langes Fragment aus dem GFP-Gen. Das GFP-Gen war in allen transgenen, sowohl in den Kontrolltieren als auch in den pol2-positiven Tieren, enthalten. Das zweite Primerpaar wurde so gewählt, dass einer der Primer sequenzspezifisch die zur shRNA komplementäre Sequenz bindet. Eine Amplifikation des 283 bp langen Fragmentes fand wie erwartet bei den pol2-positiven Tieren statt. Das dritte Primerpaar flankierte die shRNA-Kassette. Die PCR lieferte für die Tiere mit dem leeren pLVTHM Kontroll-Vektor ein Fragment mit einer Länge von 621 bp und für die Tiere mit dem Vektor pLVTHM pol2 ein 677 bp langes Fragment (Abbildung 21).

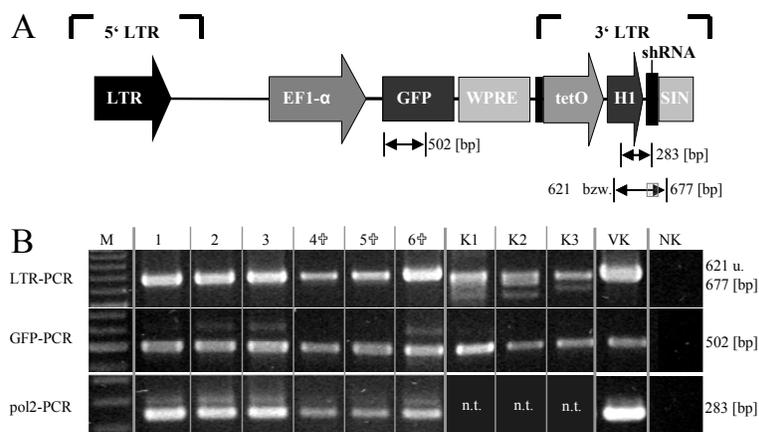


Abbildung 21: Nachweis der Integration von pLVTHM mittels PCR

A: Schematische Organisation des lentiviralen Teils des Vektors pLVTHM pol2. Die Positionen der verwendeten Primerpaare sind mit Doppelpfeilen markiert. B: Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse. Mittels der LTR-PCR konnte zwischen pol2-positiven und pol2-negativen Tieren aufgrund der geringfügig unterschiedlichen Größe der Amplifikate (621 bp zu 677 bp) unterschieden werden. Die GFP-PCR war bei allen Proben positiv, da auch die Kontrolltiere den pLVTHM (ohne pol2) trugen. Die pol2-PCR war spezifisch für pol2-positive Tiere, da der reverse Primer innerhalb der shRNA-Sequenz lokalisiert ist. Untersucht wurden Ohrbiopsien von drei lebenden pol2+(1-3), von drei durch das Muttertier erdrückten (4†-6†) sowie von drei Kontroll-Tieren (K1-K3). Als Vektorkontrolle (VK) diente eine Plasmidpräparation des Vektors pLVTHM pol2. (NK = Wasserkontrolle).

Die Expression von GFP konnte durch UV-Mikroskopie bestätigt werden (Abbildung 22, A,B,C oben). Alle der gewonnenen Fibroblastenkulturen aus Ohrbiopsien zeigten eine deutliche GFP Expression. Es war zu erkennen, dass die Stärke der Expression bei den pol2-positiven Kulturen niedriger war als bei den pol2-negativen Kulturen. Um diesen Effekt quantifizieren zu können, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt (Abbildung 22, A,B,C unten). Auch hier war festzustellen, dass die pol2-positiven Tiere eine schwächere Fluoreszenz als die Kontrolltiere aufwiesen. Während das Intensitätsmaximum der Fluoreszenz bei den drei getesteten pol2-positiven Zelllinien denselben Wert hatte, zeigte die GFP-Expression der beiden Kontrollzelllinien unterschiedliche Intensitätsmaxima. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Kontrolltiere im Gegensatz zu den pol2-positiven Tieren eine unterschiedliche Anzahl von Vektorintegraten tragen und die pol2-positiven Tiere diesbezüglich identische Klone repräsentieren oder, dass die Stärke der Expression unterschiedlich reguliert ist.

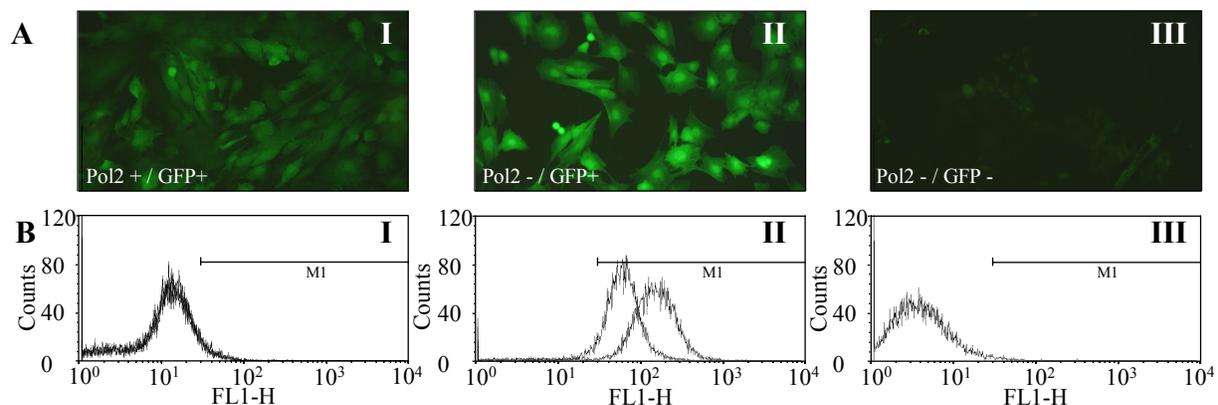


Abbildung 22: FM Aufnahmen und FACS Daten der Fibroblastenkulturen

A: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der pol2-positiven Fibroblasten vom Schwein 147 (I), der pol2-negativen Fibroblasten vom Schwein 140 (II), sowie nicht-transgenen Fibroblasten (III). B: FACS-Analyse von 3 pol2-positiven Fibroblastenkulturen (147, 148, 286; I), 2 pol2-negativen Fibroblasten (140, 142; II), sowie nicht-transgenen Fibroblasten (III). Die pol2-positiven Zellen haben identische Fluoreszenzmaxima und sind in ihrer Intensität schwächer als die pol2-negativen Zellen.

Die Expression von GFP war auch in den Tieren bei Bestrahlung mit UV-Licht erkennbar. Für die Aufnahmen wurden die Tiere mit einem leichten Anästhetikum ruhig gestellt. Die transgenen Schweine zeigten eine grüne Fluoreszenz, vor allem in den Klauen, der Rüsselscheibe und der Haut. Die Borsten zeigten eine weniger starke GFP Expression.

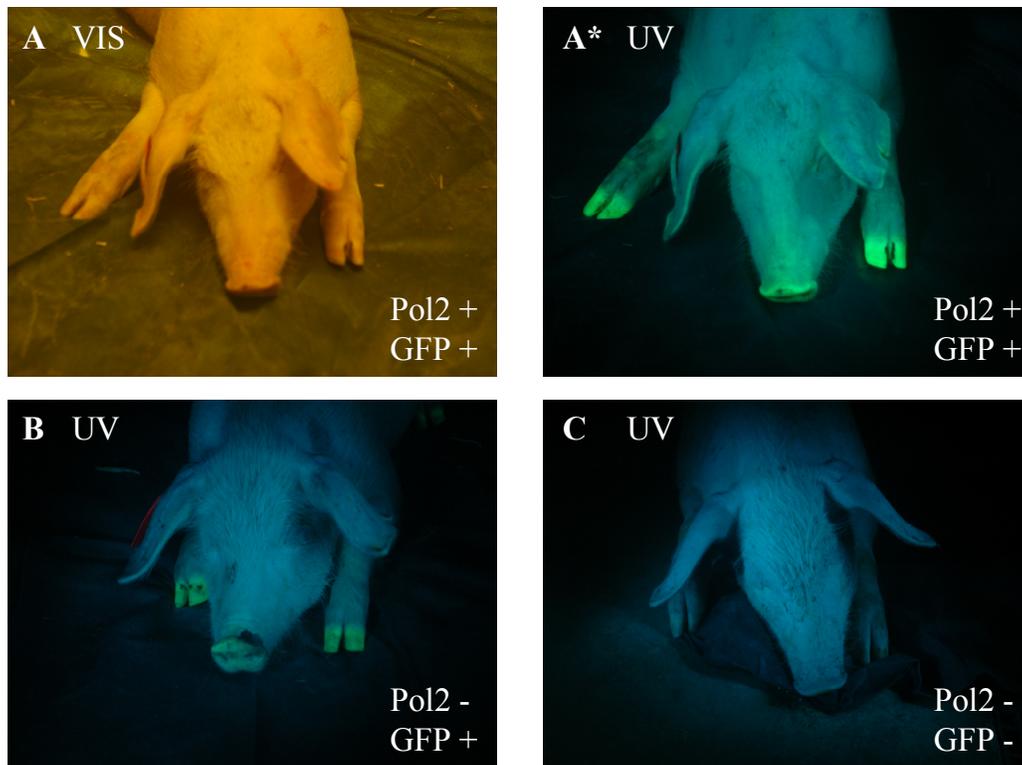


Abbildung 23: Bilder zur GFP-Expression in transgenen Schweinen

A, A*: pol2-positives Tier im visuellen Bereich sowie in Dunkelheit bei Bestrahlung mit UV-Licht. B: pol2-negatives Schwein, das den lentiviralen Vektor pLVTHM trägt. C: nicht-transgenes Schwein unter UV-Licht. Die Expression von GFP ist bei den pLVTHM bzw. pLVTHM pol2-positiven Tieren deutlich erkennbar. (Dr. B. Petersen, FLI)

4.2.4 PERV-Prävalenz in den transgenen Tieren

Die transgenen Schweine wurden auf die Anwesenheit der Proviren der PERV-Subtypen A, B und C und deren Expression untersucht. Bei allen Tieren wurde auf DNA-Ebene PERV-A, -B und -C nachgewiesen. Die Analyse der RNA mittels RT-PCR zeigte, dass die Proviren der Subtypen A und B transkribiert werden. Es konnte sowohl gespleißte als auch Vollängen-mRNA nachgewiesen werden (Abbildung 24).

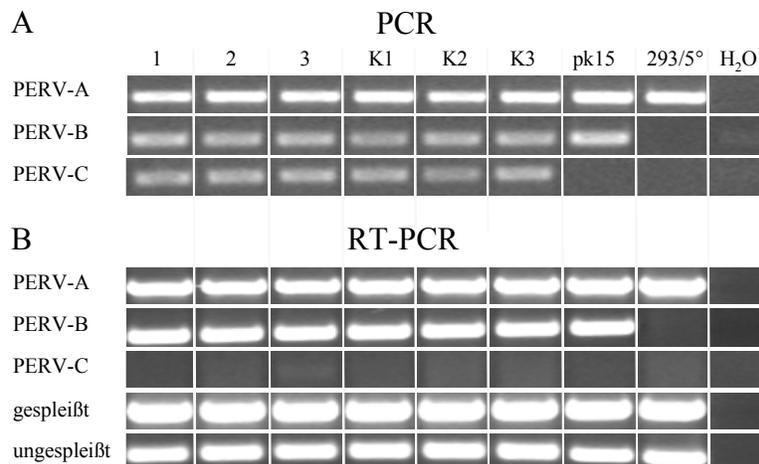


Abbildung 24: Nachweis der PERV-Subtypen in den transgenen Tieren

A: PERV-Prävalenzanalyse von pol2-positiven Tieren (1-3), Kontrolltieren mit dem pLVTHM Vektor (K1-K3), PK15-Zellen sowie PERV-A/C 5° infizierten 293-Zellen. Die transgenen Tiere besaßen ausnahmslos die Proviren aller Subtypen. B: Analyse der Expression der Proviren. Sowohl PERV-A als auch PERV-B wurden exprimiert. Es konnte gespleißte und ungespleißte RNA nachgewiesen werden.

4.2.5 Expression der shRNA

Für den Nachweis der Expression der shRNA in den transgenen Tieren wurde ein neuer Real-time PCR basierter Assay entwickelt. Die aus der pol2-shRNA prozessierte pol2-siRNA ist aufgrund ihrer Länge von 19 bp für eine einfache qRT-PCR ungeeignet. Um sie dennoch mittels Real-time PCR nachweisen zu können, wurde ein spezieller Primer für den Schritt der Reversen-Transkription entwickelt. Der Primer hatte eine Länge von 50 bp und bildete zwischen seinem 3' und 5' Ende eine Haarnadelstruktur mit einem 6 bp langen Überhang am 3' Ende. Der 3' Überhang war komplementär zur pol2-siRNA und bestimmte die Spezifität der Reverse Transkription. In diesem ersten Schritt wurde der Loop-Primer komplementär zur pol2-Sequenz durch die Reverse Transkriptase verlängert. Der verlängerte Loop-Primer hatte nun eine Länge von 63 Basen. Im zweiten Schritt wurde der verlängerte Loop-Primer mit einer Real-time PCR nachgewiesen. Für die Detektion wurde ein TaqMan System verwendet. Der Forward-Primer ist spezifisch für das 5' Ende des Loop-Primers und der Revers-Primer für das 3' Ende des um die pol2 verlängerten Loop-Primers. Zwischen beiden Primern befindet sich die TaqMan Sonde. Ihre Sequenz ist ebenfalls über 6 Basen homolog zur pol2-siRNA (Abbildung 25).

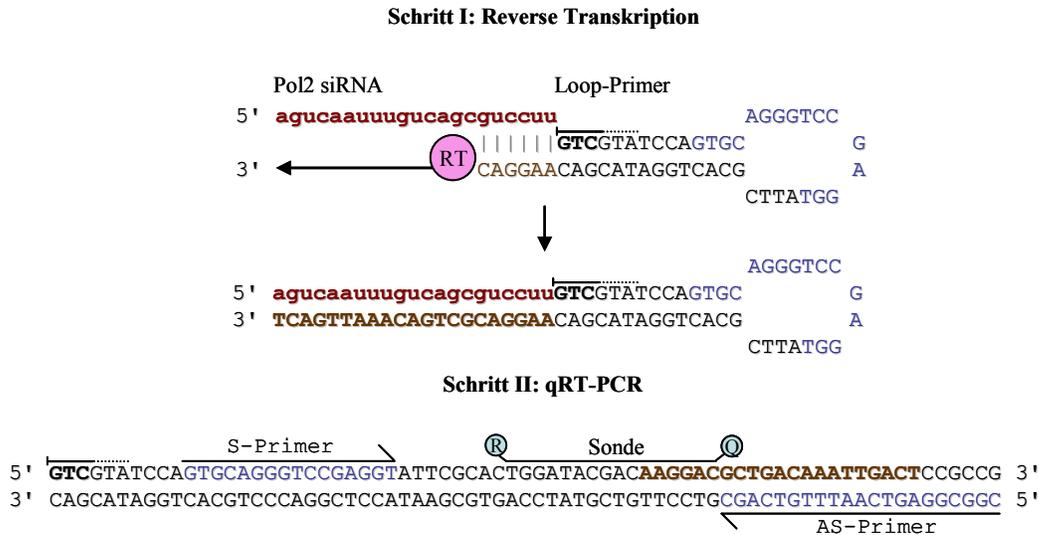


Abbildung 25: Schematische Darstellung der One Step qRT-PCR zum Nachweis der pol2-siRNA

Der Nachweis der siRNA geschah in zwei Schritten. Im ersten Schritt, wurde durch die Reverse Transkriptase ein siRNA-spezifischer Primer mit interner Haarnadelstruktur (Loop-Primer) um die komplementäre Sequenz der siRNA verlängert. Im zweiten Schritt wurde dieser verlängerte Loop-Primer mit einem spezifischen qRT-PCR Setup quantifiziert.

Um die Effizienz der Real-time PCR zu bestimmen und um eine absolute Quantifizierung vornehmen zu können, wurde eine synthetische RNA, die homolog zur prozessierten pol2-siRNA ist, verwendet. Es wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe hergestellt und in der pol2-spezifischen One Step qRT-PCR vermessen (Abbildung 26).

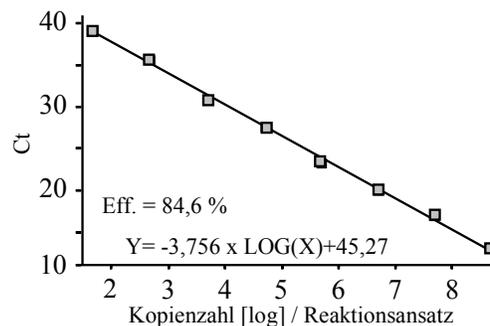


Abbildung 26: Effizienzbestimmung der pol2 One Step qRT-PCR

Durch 1:10 Verdünnung einer synthetischen (pol2) siRNA wurde die Effizienz der Reaktion als 84,6 % bestimmt. Die Nachweisgrenze lag unter 100 Kopien. Die Messwertverteilung ist über den gesamten Messbereich bis 10^9 Kopien linear.

Zur Standardisierung wurde RNA aus pol2-positiven PK15 in diesem Lauf mitgeführt und anschließend als Referenz-RNA (100 ng) in den folgenden Experimenten zur Quantifizierung der pol2-Expression verwendet.

4.2.6 PERV-Hemmung und shRNA-Expression in den Fibroblasten

Die Analyse der PERV-Expression in den transgenen Schweinen wurde in Fibroblastenzelllinien von drei Abnahmen (vergleiche Seite 76; Punkt 4.2.2) durchgeführt. Die Fibroblasten des ersten Messpunktes zeigten eine deutliche und reproduzierbare Reduktion der PERV-Expression (KRUSE 2009). Die Zellen wurden über flüssigen Stickstoff bis zum Erhalt der Zellkulturen des zweiten und dritten Messpunktes eingefroren und anschließend in Kultur genommen. Aus allen Zelllinien wurde Gesamt-RNA isoliert und die PERV-Expression sowie die shRNA-Expression wurden gemessen. Im Vergleich zu den Zelllinien der Kontrolltiere zeigte die Kultur 286-1 des Messpunkts I und die Kultur 148 des Messpunkts II eine signifikant ($> 50\%$) reduzierte PERV-Expression. Die absolute Expression lag in der Größenordnung von 10^3 Kopien pro ng eingesetzter Gesamt-RNA. Die Expression der shRNA pol2 konnte in allen pLVTHM pol2 transgenen Fibroblastenkulturen nachgewiesen werden und lag zwischen 5×10^3 und $2,5 \times 10^4$ Kopien pro ng RNA. Eine Korrelation zwischen der signifikant verminderten PERV-Expression und der shRNA Expression wurde für die Fibroblastenkultur 148 vom Messpunkt II festgestellt (Abbildung 27).

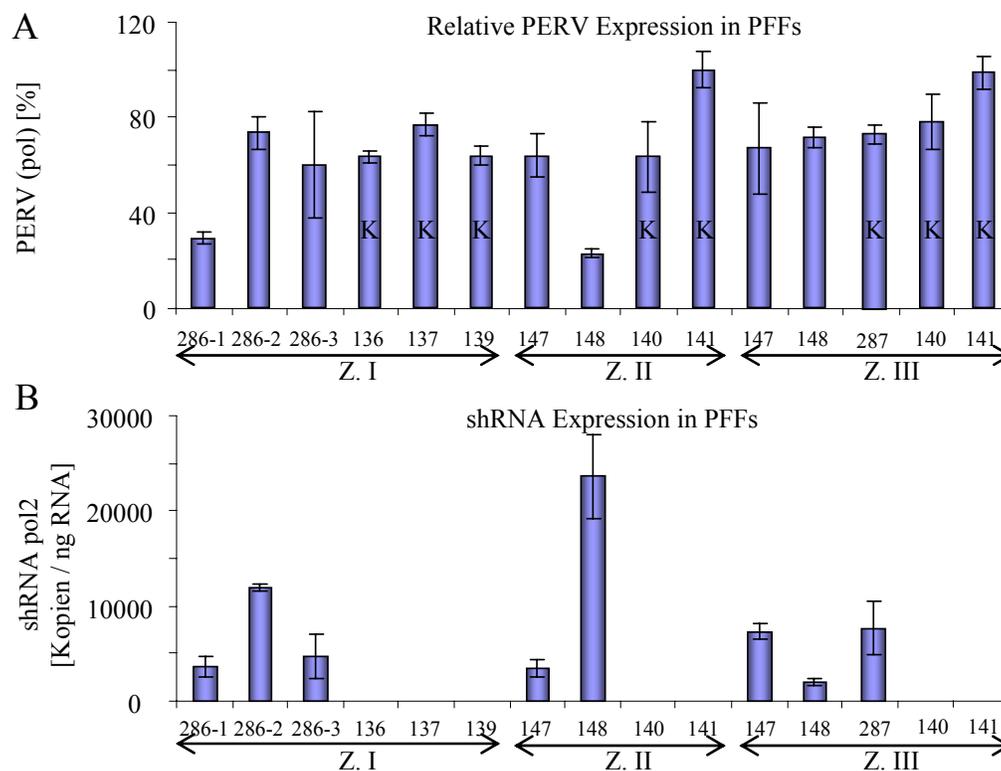


Abbildung 27: Expression von PERV und der pol2-shRNA in den Fibroblasten der transgenen Tiere

A: relative PERV-Expression aller Fibroblastenkulturen. Die Kulturen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten angelegt. Messpunkt Z. I 45 Tage nach Geburt, Z. II 343 Tage nach Geburt und Z. III 728 Tage nach Geburt. (K) markiert die pol2-negativen Kontrolltiere. Eine signifikante Hemmung ist bei den Kulturen 286-1 Z.I und 148 Z. II zu sehen. B: Expression der shRNA pol2. Ihre Expression konnte in allen pol2-positiven Kulturen nachgewiesen werden.

4.2.7 PERV-Hemmung und shRNA-Expression in PBMCs

Neben den Fibroblastenkulturen wurden ebenfalls PBMCs der transgenen Tiere untersucht. Den transgenen Tieren wurde am FLI Blut (Heparin) abgenommen und am Robert Koch-Institut untersucht. Die Isolation der PBMCs erfolgte mittels Dichtezentrifugation (Ficoll). Anschließend wurde die Gesamt-RNA extrahiert.

Die Messung der absoluten PERV-Expression ergab Werte von 7.5×10^3 bis $2,3 \times 10^4$ Kopien pro ng Gesamt-RNA und entspricht dem Größenbereich, der auch in anderen Arbeiten gefunden wurde (RAMSOONDAR *et al.* 2009). Die PERV-Expression in PBMCs war um den Faktor 10 höher als die in den Fibroblasten gemessenen. Die Schwankung innerhalb der Proben betrug maximal Faktor 3 (Tier 140 und Tier 137). Dies entspricht einem ΔCt -Wert von gerundet 1,5 in

der qRT-PCR. Es handelt sich folglich um sehr kleine Unterschiede ($< 75\%$). Die PERV-Expression in den PBMCs aller transgenen Tiere kann somit als ähnlich betrachtet werden. Signifikante Unterschiede zwischen pol2-positiven und pol2-negativen Tieren konnten nicht gefunden werden (Abbildung 28, A).

Die Expression der shRNA konnte mit der neuen pol2-spezifischen One Step qRT-PCR in den pol2-positiven Tieren nachgewiesen werden (Abbildung 28, B). Der Effekt der pol2-siRNA war nicht eindeutig. Eine ähnliche Sachlage wird auch von RAMMONDAR et al., 2009 beschrieben.

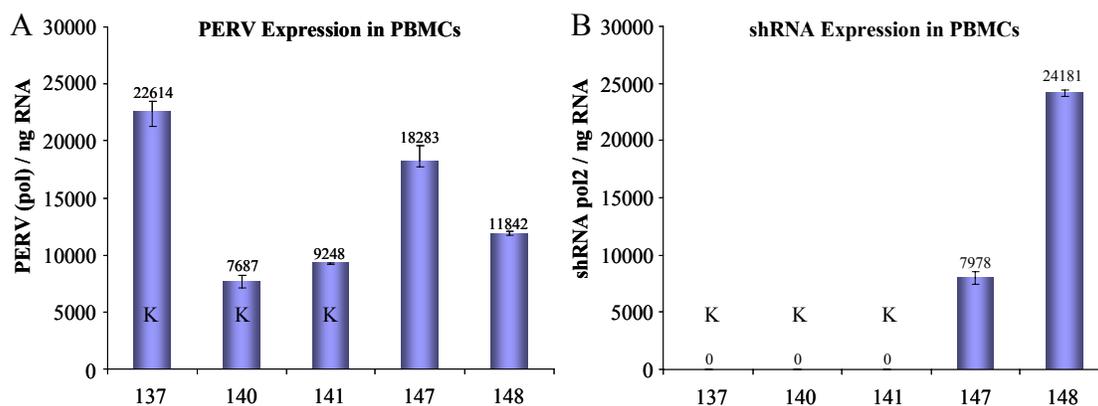


Abbildung 28: Expression der PERV-mRNA und der pol2-shRNA in den PBMCs der transgenen Tiere

A: Anzahl der PERV-mRNA-Kopien in den PBMCs der transgenen Schweine pro ng GesamtrNA. B: Kopien der shRNA pol2 pro ng GesamtrNA in den identischen Proben. (K) markiert die pol2-negativen Kontrolltiere

4.2.8 Entwicklung neuer shRNAs

In den ersten Arbeiten der Arbeitsgruppe zur Effizienz der siRNAs wurden neben der pol2 bereits andere siRNAs beschrieben, deren Effekt allerdings weniger stark ausgeprägt war (KARLAS *et al.* 2004). Seit dieser Zeit wurden neue rechnergestützte Algorithmen entwickelt, die das Auffinden effektiver siRNAs und shRNAs erleichtern. Aus diesem Grund wurde die PERV-A Sequenz mit einem Onlinetool der Firma Invitrogen erneut nach möglichen shRNA-Targets abgesucht. Es wurden 3 potentielle Zielsequenzen im gag/pol-Bereich, zwei im envA-Bereich und zwei im envB-Bereich ausgewählt (Abbildung 29). Neben den neuen shRNA-Sequenzen wurde zusätzlich eine Luziferase-shRNA als Kontrolle verwendet. Ebenfalls wurden 2 shRNAs deren

Zielsequenz im gag-Bereich liegt getestet. Die Sequenzen der gag-shRNAs wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. L. Scobie (Kaledonische Universität Glasgow) festgelegt (Abbildung 29).

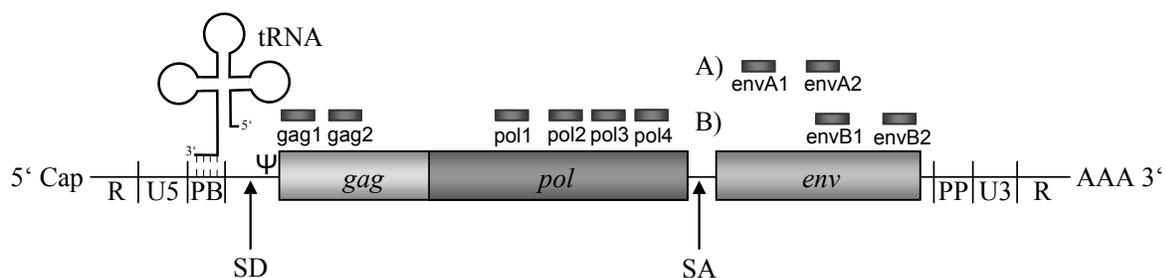


Abbildung 29: Lokalisation der Targets neuer anti-PERV-shRNAs

Schematische Lage der zehn untersuchten shRNA-Zielsequenzen in der PERV-mRNA. Es kamen zwei gag, vier pol sowie zwei envA und zwei envB shRNAs zum Einsatz. Als negative Kontrolle diente in den Experimenten der Basisvektor pSiren Δ U6 sowie eines seiner Derivate das eine Anti-Luziferase shRNA kodiert.

Um zu verifizieren, ob die Möglichkeit besteht, die Hemmung der PERV-Expression durch multiple shRNAs zu verstärken, wurde ein System zur erleichterten Klonierung von shRNA-Kassetten entwickelt. Zu diesem Zweck wurde der Vektor pSuper mutiert und downstream vom H1 Promotor eine MfeI Schnittstelle generiert. Upstream befindet sich eine EcoRI Schnittstelle. EcoRI und MfeI geschnittene DNA-Fragmente haben identische 5' Überhänge. Somit wurde es möglich, ein solches Restriktionsfragment in jede beliebige EcoRI Schnittstelle zu klonieren, wobei die Kombination der EcoRI und MfeI Enden zum Verlust der palindromischen Zielsequenz beider Enzyme führte und die Kombination EcoRI und EcoRI eine intakte Erkennungssequenz für EcoRI lieferte, in die erneut ein solches Fragment kloniert werden konnte. Auf diese Weise ist es möglich, beliebig viele shRNA Expressionseinheiten in Reihe zu klonieren ohne Limitation durch die vorhandenen Restriktionsschnittstellen.

Für die Klonierung der getesteten Vektoren wurden im ersten Schritt alle neuen shRNA-Sequenzen sowie die pol2-shRNA-Sequenz in den modifizierten pSuper MfeI Vektor kloniert. Die shRNA-Kassetten wurden anschließend mittels MfeI/EcoRI aus den entstanden Vektoren ausgeschnitten und in den retroviralen Vektor pSiren Δ U6 umkloniert. Neben den Vektoren mit einfacher shRNA wurden nach dem beschriebenen System (Abbildung 30) ebenfalls fünf Vektoren mit Doppelkassetten generiert.

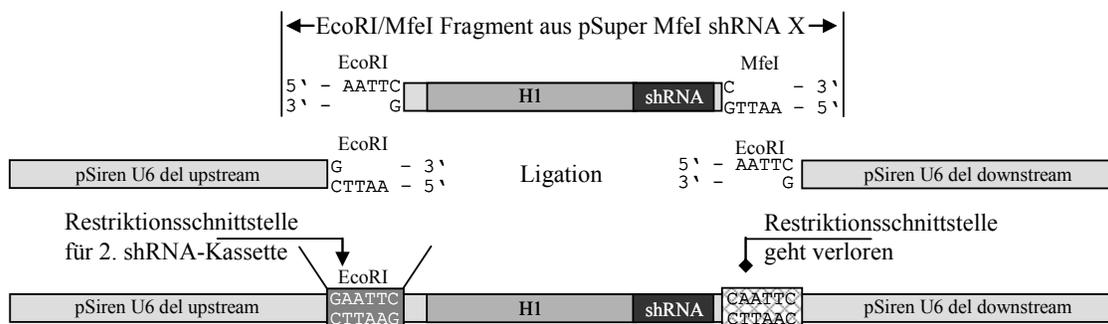


Abbildung 30: Klonierungsstrategie für multiple shRNA-Vektoren

Mit EcoRI und MfeI geschnittene Fragmente besaßen identische 5' Überhänge und ließen sich ligieren. Nur die Kombinationen Mfe/Mfe bzw. EcoRI/EcoRI liefern intakte Erkennungssequenzen für die entsprechenden Restriktionsenzyme. Bei der Klonierung eines EcoRI/MfeI Fragments in eine EcoRI Schnittstelle blieb somit nur die EcoRI Schnittstelle erhalten und konnte für die Klonierung einer neuen shRNA-Kassette verwendet werden. Um diese Prinzip nutzen zu können, wurde in den Vektor pSuper downstream vom H1 eine MfeI Schnittstelle generiert.

Ingesamt wurden 17 Vektoren kloniert und *in vitro* getestet (Tabelle 26). Bei den Doppelkassetten wurde dabei stets die pol2 verwendet, da ihre Effizienz bereits belegt war. Eine pol2/pol2 Doppelkassette wurde nicht getestet.

Tabelle 26: Auflistung der hergestellten pSiren Derivate

Name	Bemerkung	Name	Bemerkung
1. pSiren ΔU6	Basisvektor	10. envA2	GenBank:7214..7234*
2. Luzi	Anti-Luziferase	11. envB1	GenBank:7262..7282 [#]
3. gag1	GenBank:1173..1197*	12. envB2	GenBank:7871..7891 [#]
4. gag2	GenBank:1219..1243*	13. pol1/pol2	Vektor mit 2 shRNAs
5. pol1	GenBank:3866..3886*	14. pol3/pol2	Vektor mit 2 shRNAs
6. pol2	GenBank:4344..4362*	15. pol4/pol2	Vektor mit 2 shRNAs
7. pol3	GenBank:4598..4617*	16. gag1/pol2	Vektor mit 2 shRNAs
8. pol4	GenBank:4904..4923*	17. gag2/pol2	Vektor mit 2 shRNAs
9. envA1	GenBank:6585..6605*		

(*) Position der shRNA-Zielsequenz in AJ293656 (PERV-A) oder ([#]) in AJ293657 (PERV-B)

Um eine Aussage über die Wirksamkeit der Vektoren bzw. der jeweiligen shRNAs treffen zu können, wurden PK15-Zellen mit den Vektoren transfiziert und stabile multiklonale Zelllinien durch Antibiotika-Selektion (Puromycin) generiert. Nach der RNA-Isolation wurde die PERV-Expression mit einer pol spezifischen One Step qRT-PCR gemessen (Abbildung 31).

In diesem Experiment konnte durch die pol2-shRNA die PERV-Expression auf 38 % des PK15-Niveaus gesenkt werden. Die pol1 Sequenz zeigte mit einer Reduktion der PERV-Expression auf 10 % den größten Effekt. Ebenfalls wirksam waren die gag2 (23 %) sowie die Doppelkassetten pol1/pol2 (20 %) und pol3/pol2 (20 %). Alle anderen Proben zeigten keine signifikante (< 50 %) Reduktion der PERV-Expression. Die pol1/pol2 Doppelkassette sowie die pol4/pol2 Doppelkassette zeigen keine signifikante Reduktion der PERV-Expression.

Additive Effekte durch multiple shRNAs waren nicht nachweisbar. Die env Konstrukte zeigten ebenfalls keine signifikante Reduktion der PERV-Expression.

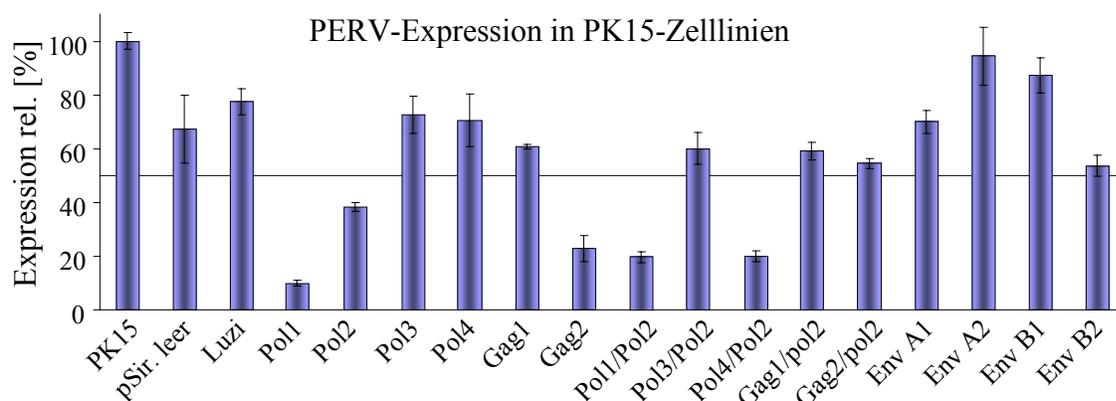


Abbildung 31: Wirkung der shRNAs in stabil transfizierten PK15-Zellen

PERV-Expression in verschiedenen PK15-Zelllinien relativ zum Expressionsniveau nativer PK15-Zellen (100 %). Als signifikant kann eine Reduktion auf unter 50 % des Basisniveaus angesehen werden. Signifikante PERV Inhibition zeigten die mit pol1, pol2, gag2, pol1/pol2 sowie die mit pol4/pol2 transfizierten Zelllinien.

4.2.9 Transduktion ausgewählter shRNAs in PK15-Zellen

Um die Wirksamkeit der neuen pol1 zu verifizieren und um zu testen, ob die fehlenden additiven Effekte bei den Doppelkassetten ein Problem des Kassettendesigns (Abstand der Expressionseinheiten 9 bp; evtl. Promotorinterferenz) waren, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Im Gegensatz zum vorhergehenden Versuch wurden die shRNA-Konstrukte durch Transduktion in die Zielzellen (PK15) eingebracht. Zu diesem Zweck wurden zunächst mit allen verwendeten Vektoren stabile 293GP-Verpackungszelllinien (Puromycin bzw. Geneticin Selektion) generiert und anschließend nach VSV-env Transfektion (pMAD2.0) retrovirale Virenstocks (10^4 IFU PK15) hergestellt. Um Zelllinien herstellen zu können, die sowohl die pol1 als auch die pol2 exprimieren, wurde bei dem pol1-Vektor die Puromycin-Resistenz durch eine

Geneticin-Resistenz über eine Klonierung ausgetauscht, um später eine Doppelselektion sowohl mit Geneticin als auch mit Puromycin durchzuführen.

Die Virenstocks wurden auf PK15-Zellen titriert und stabile polyklonale (aus ca. 100 Kolonien bestehend, MOI=1) Zelllinien generiert (Tabelle 27).

Tabelle 27: Retroviral transduzierte PK15-Zelllinien

Anzahl	Zelllinie	Eigenschaften
1 x	PK15	Untransduziert (Kontrolle)
2 x	pSiren Δ U6	Leervektor mit Puromycin-Resistenz (Kontrolle)
2 x	Luzi	Puromycin-Resistenz (Kontrolle)
2 x	pol1	G418-Resistenz
2 x	pol2	Puromycin-Resistenz
3 x	pol1/pol2	G418-Resistenz und Puromycin-Resistenz

Aus allen Zelllinien wurde Gesamt-RNA isoliert und anschließend wurde die PERV-Expression sowie die shRNA Expressionen mittels spezifischer One Step qRT-PCR gemessen. Um die shRNA Expression der pol1-Zellen ermitteln zu können, wurde auch hier eine entsprechend spezifische One Step qRT-PCR etabliert.

Alle shRNA Konstrukte zeigten im Vergleich zu den Kontrollen (pSiren Δ U6 und Luzi) eine signifikante Reduktion der PERV-Expression (Abbildung 32, A). Den größten Effekt zeigte eine der pol1/pol2 Zelllinien (Nr. 6). In dieser Zelllinie war ebenfalls die Expression der beiden shRNAs am höchsten (Abbildung 32, A). Eine andere der pol1/pol2 Zelllinien zeigte die geringste Reduktion der PERV-Expression. Das Niveau der pol2 Expression war hier insgesamt am niedrigsten und die Expression der pol1 konnte überhaupt nicht (no Ct) nachgewiesen werden. Die dritte der pol1/pol2 Zelllinien (Nr. 5) zeigte wie Nr. 6 eine Expression sowohl der pol1 als auch der pol2-shRNA. Die PERV-Expression lag leicht über dem Niveau der singulären pol1 bzw. pol2-shRNA PK15-Zelllinien (Nr. 1,2,3,4). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass alle der mit einer PERV-spezifischen shRNA ausgestatteten PK15-Zelllinien eine signifikante Reduktion der PERV-Expression zeigten. Signifikante Steigerungen durch die Expression beider shRNAs konnten jedoch nicht beobachtet werden. Das Niveau der Reduktion der PERV-Expression war beim Vergleich der pol1-Zellen, der pol2-Zellen und der pol1/pol2-PK15-Zellen nahezu identisch.

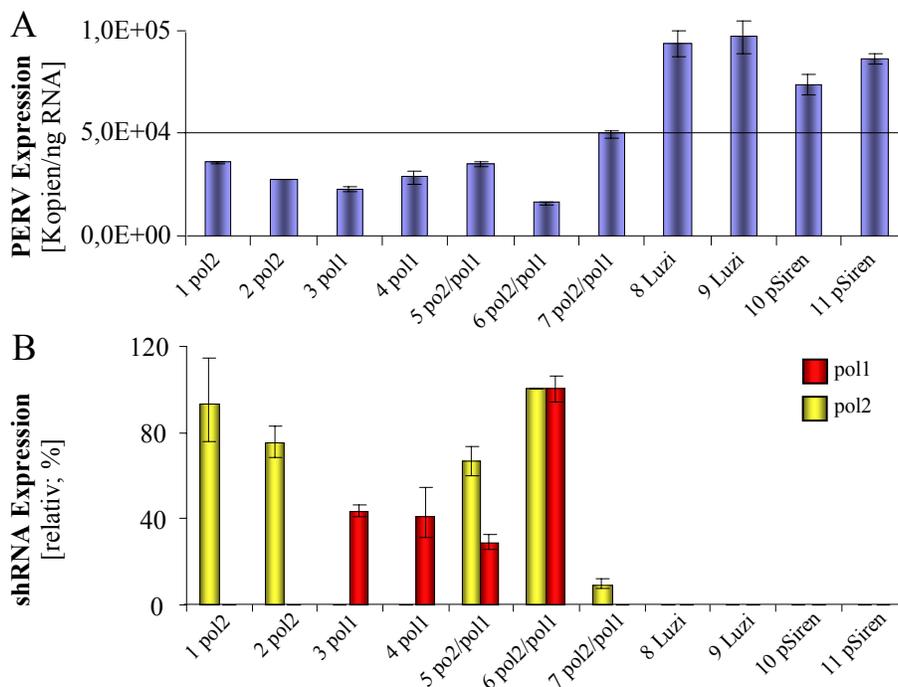


Abbildung 32: PERV und shRNA Expression in transduzierten PK15-Zellen

A: PERV-Expression verschiedener retroviral transduzierter Zelllinien. B: Relative Expression der pol1 und der pol2-shRNAs. Die Normalisierung erfolgte mittels Zelllinie Nr. 6, die in hohem Maße sowohl die pol1 als auch die pol2-shRNA exprimiert und zudem die niedrigste PERV-Expression zeigte.

Die Degradation der PERV-mRNAs durch die RNAi findet nach bisherigen Erkenntnissen im Zytoplasma statt. Bei der Messung der PERV-Expression bei Verwendung der Gesamt-RNA mittels One Step qRT-PCR kann allerdings nicht zwischen ehemals kernlokalisierter und im Zytoplasma lokalisierter PERV-RNA unterschieden werden. Hieraus ergibt sich ein Dilemma. Geht man davon aus, dass sämtliche PERV-RNA augenblicklich nach Verlassen des Zellkerns RNAi vermittelt degradiert wird (PERV-Knockdown entspräche 100 %), wird im Assay System immer noch die intakte Kern-RNA gemessen, die den Zellkern noch nicht verlassen hat. Übersteigt nun die Menge Kern-RNA signifikant die Menge an zytoplasmatischer RNA, so kann der RNAi vermittelte Effekt über qRT-PCR nicht mehr gemessen werden, da das Kern-RNA Signal gegenüber dem Zytoplasma-RNA Signal dominiert.

Um einen Eindruck von dem Verhältnis von Kern- zu zytoplasmatischer PERV-RNA zu erhalten, wurde von sechs der PK15-Zelllinien (Nr.1 pol2, Nr. 3 pol1, Nr. 5 pol2/pol1, Nr. 8 Luzi, Nr. 10 pSiren U6 del und PK15) zytoplasmatische und Kern-RNA aufgereinigt und getrennt in der PERV-spezifischen qRT-PCR vermessen. Es wurden jeweils 100 ng RNA pro Reaktion

eingesetzt. Es war festzustellen, dass sich die Ct-Werte für das Referenzgen (Cyclophilin) nicht signifikant (weniger als $\frac{1}{2}$ Ct) unterschieden (Daten nicht gezeigt). Jedoch wurde in der Kern-RNA Fraktion die höchste Konzentration der PERV-mRNA im Vergleich zur zytoplasmatischen und zur Gesamt-RNA-Fraktion gefunden (Tabelle 28). Es war weiterhin festzustellen, dass sich die Verhältnisse zwischen PERV-mRNA Menge in der Gesamt-RNA, der Kern-RNA und der zytoplasmatischen RNA in Anwesenheit einer PERV-spezifischen shRNA verschoben.

Tabelle 28: Nachweis von PERV-mRNA in verschiedenen RNA-Fraktionen

Zelllinie	PERV-Kopien / pg RNA			Verhältnis Gesamt : Kern : Zytoplasma
	Gesamt-RNA	Kern-RNA	Zytoplasma-RNA	
1. pol2	36	107	10	4:10:1
3. pol1	23	122	8	3:15:1
5. pol2/pol1	35	140	9	4:14:1
8. Luzi	95	237	50	2:5:1
10. pSiren	74	203	42	2:5:1
PK15	207	463	78	3:6:1

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass sich in der Kern-RNA Fraktion eine signifikante Menge PERV-RNA befindet. Relativ gesehen ist die gemessene PERV-RNA-Konzentration im Kern bei den Kontrollzellen (PK15, Luzi, pSiren) zwischen 5 bis 6-mal höher als die im Zytoplasma. Bei den shRNA transgenen Zelllinien (pol1, pol2 und pol2/pol1) liegt dieser Wert zwischen 11 und 16. Anteilig wurde in der zytoplasmatischen Fraktion jeweils die geringste Konzentration an PERV-RNA gemessen.

Die absoluten Mengen an PERV-RNA im Kern und im Zytoplasma blieben in diesem Experiment unbekannt, da das Verhältnis von RNA im Kern zu RNA im Zytoplasma für PK15 ebenfalls nicht bekannt ist. Es ist allerdings erkennbar, dass die Kern-RNA gegenüber der zytoplasmatischen RNA (in Bezug auf PERV) den kleineren Anteil an der Gesamt-RNA Menge ausmachen muss, da ansonsten die gemessene Menge an PERV-RNA in der Gesamt-Fraktion höher gewesen sein müsste.

In den verschiedenen Fraktionen wurden ebenfalls die Mengen der pol1 und pol2-shRNAs gemessen. Die shRNAs konnten in allen untersuchten Fraktionen nachgewiesen werden. Ihr Anteil wurde relativ zur Gesamt-RNA der Zelllinie Nr. 6. (pol1/pol2) bestimmt (Abbildung 32).

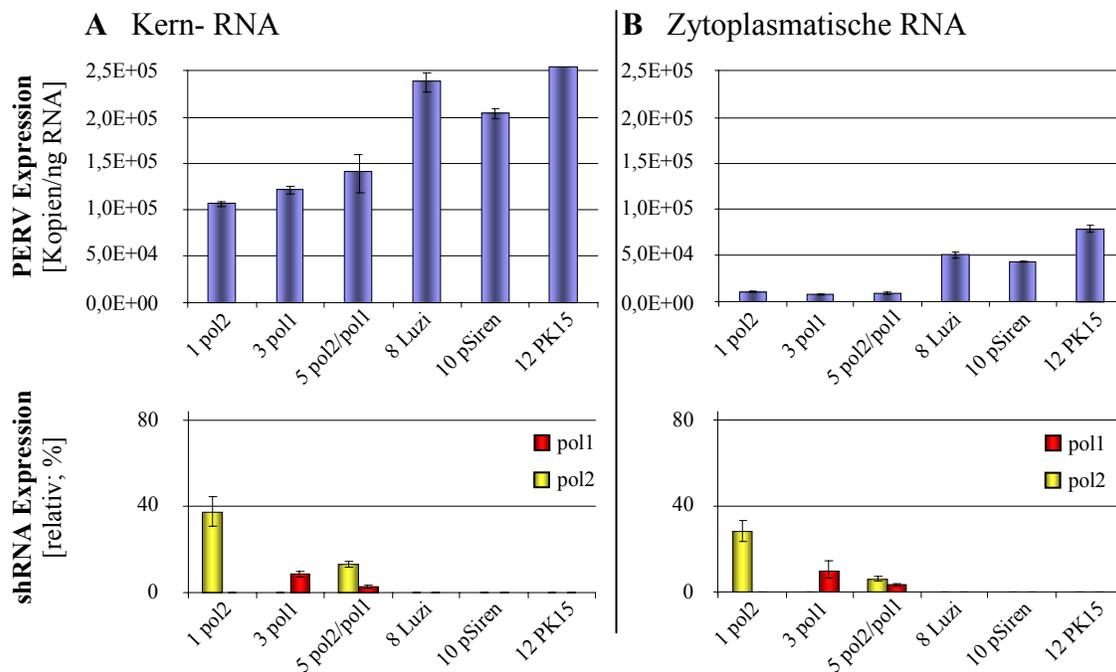


Abbildung 33: Expression von PERV in Kern und Zytoplasma von PK15-Zellen

A: Menge an PERV-Kopien pro ng aufgereinigter Kern-RNA sowie relativer Anteil der pol1 bzw. pol2 shRNAs in Bezug zur Gesamt-RNA von Kultur Nr. 6 (Abbildung 32). B: Äquivalente Werte für die zytoplasmatische Fraktion. Die Konzentration an PERV-RNA im Kern war deutlich höher als die im Zytoplasma. In der zytoplasmatischen Fraktion war die RNAi vermittelte Hemmung der PERV-Expression sichtbar. Bei der Kern-Fraktion lag die Reduktion oberhalb des als 50 % Reduktion definierten Thresholds.

Das verwendete RNA-Aufreinigungsprotokoll beinhaltet verschiedene Fällungs- bzw. affinitätschromatografische Aufreinigungsschritte, bei denen die Aufreinigungseffizienz kleiner RNA Fragmente gegenüber größeren Fragmenten wahrscheinlich vermindert ist. Konstitutiv exprimierte zelluläre miRNAs bzw. shRNAs zur Normalisierung stehen für porcine Zellsysteme noch nicht zur Verfügung. Aus diesem Grund war eine Normalisierung nur auf die eingesetzte Gesamt-RNA-Menge möglich. Es ist anzunehmen, dass die shRNA Expression real wesentlich höher als angegeben war.

4.3 Prävalenzanalyse von PERV-C

Eine besondere Gefahr bei der Xenotransplantation stellen rekombinante Virenstämme der Subtypen PERV-A und PERV-C dar (DENNER 2008). Aus der Konsensus Erklärung der IXA aus dem Jahr 2009 geht die Empfehlung hervor, dass die Herden zukünftiger Spenderschweine aus PERV-C freien Tieren bestehen sollten, um Rekombinationsereignisse im Voraus ausschließen zu können (DENNER *et al.* 2009; HERING *et al.* 2009).

Um dieses Ziel durchsetzen zu können, ist es notwendig zuverlässige Assays für die Analyse der PERV-Prävalenz zu entwickeln bzw. bestehende Assays weiter zu validieren. In den folgenden Versuchen wurde die PERV-C Prävalenz mittels PCR basierender Tests untersucht und es wurden neue Nachweismethoden entwickelt.

In der 2009 im Rahmen der DFG-Transregio Research Group Xenotransplantation veröffentlichten Studie zur Prävalenz von PERV in den speziell für die Xenotransplantation gezüchteten Schweinherden wurde gezeigt, dass von 181 Tieren 176 (97,2 %) PERV-C positiv waren (DIECKHOFF *et al.* 2009). Nach dieser Veröffentlichung wurden weitere Tiere auf die Anwesenheit von PERV-C-Proviren untersucht.

4.3.1 Nachweis von PERV-C mit PCR und nested PCR

Die DNA-Sequenzen der Proviren der Subtypen PERV-A, -B und -C sind über weite Teile homolog. Die Leserahmen gag und pol sind nahezu identisch. Sequenzunterschiede findet man vorrangig in den LTRs und dem ORF des env-Gens. Die größte Häufung sequenzieller Unterschiede ist in dem für die Oberflächenhüllproteine kodierenden Bereich, speziell innerhalb der Rezeptorbindedomäne, zu finden (Abbildung 38). Diese Bereiche sind für die Subtypenbestimmung von großem Interesse und bilden die Grundlage fast aller PCR-basierenden Assays.

Insgesamt wurden 38 DNA-Proben von transgenen und nicht transgenen Hausschweinen untersucht. Um falsch negative Ergebnisse ausschließen zu können, wurden verschiedene PCRs angewendet bzw. neu etabliert. Als erstes wurden die Proben mit einer bereits publizierten PERV-C Standard-PCR (PCR1) untersucht. Ihre Nachweisgrenze wurde am Paul-Ehrlich-Institut durch Standardverdünnung (AG Prof. Dr. R. Tönjes) bis zu 1×10^3 Kopien des replikationskompetenten molekularen PERV-C Klons 1312 (PREUSS *et al.* 2006) bestimmt. In der

PCR wurden zwischen 100 ng und 50 ng DNA eingesetzt. Die Sensitivität der PCR1 ist in diesem Mengenbereich ausreichend, um endogene Proviren nachzuweisen, da das porcine Genom ähnlich wie das menschliche Genom eine Größe von ca. 3 Gbp besitzt und demzufolge rechnerisch in 100 ng genomischer DNA etwa 3×10^4 Kopien enthalten sind.

Um die Sensitivität zu steigern, wurde innerhalb des Amplikons von PCR1 eine zweite PCR (PCR2) integriert. Die Analyse erfolgte als nested PCR. Zuerst wurde PCR1 durchgeführt und anschließend wurde deren Amplifikat als Template für PCR2 verwendet. Die Nachweisgrenze wurde am Paul-Ehrlich-Institut als eine Kopie pro PCR-Ansatz bestimmt. Neben der Standard und der nested PCR wurden drei weitere PERV-C spezifische PCRs (PCR2, PCR3 und PCR5) angewandt. PCR2 entspricht der inneren PCR der nested PCR ohne vorhergehende Amplifikation durch PCR1. Eine vierte PCR (PCR 4) wurde bereits beschrieben und zeigte zur PCR1 identische Ergebnisse (DIECKHOFF *et al.* 2009). Sie wurde aus diesem Grund nicht durchgeführt.

Von den 38 untersuchten transgenen und nicht transgenen Schweinen wurden 35 sowohl mit PCR 1, PCR2 als auch mit PCR3 positiv getestet, was zeigte, dass die PCRs dieselben Ergebnisse liefern und die Mehrzahl der Tiere (92 %) eindeutig PERV-C-positiv waren (Tabelle 29).

Tabelle 29: Häufigkeit von PERV-C in transgenen und nicht-transgenen Schweinen

Anzahl	Rasse	Ursprung	Transgene bzw. KO	PCR 1	PCR 2	PCR 3	PERV-C Prävalenz
16	DL	Farm Frankfurt	-	14/16	14/16	14/16	87,5 %
15	DL	FLI Mariensee	HO-1, A20, CD59, DAF	14/15	14/15	14/15	93,3 %
7	DL x DU x MP	FLI Mariensee	GalKO	7/7	7/7	7/7	100 %

Acht der Tiere wurden zusätzlich mit der PCR5 untersucht und die Amplifikate wurden im Anschluss sequenziert, um vorhandene Polymorphismen identifizieren zu können. Die PCR5 umfasst den Amplifikationsbereich aller verwendeten PCRs und lieferte identische Ergebnisse zu den anderen PCRs. Bei der Sequenzierung der Amplifikate konnten bei keinem der Tiere Polymorphismen innerhalb der Primer-Regionen der verwendeten PCRs gefunden werden. Bei der Untersuchung negativ getesteter Tiere in der nested PCR erwiesen sich diese bei Verwendung von DNA aus PBMCs ebenfalls als negativ. Unterschiede in den Ergebnissen der nested PCRs ergaben sich bei DNA aus Ohrbiopsien. Im Gegensatz zu DNA aus PBMCs, zeigte diese in vielen Fällen fälschlicherweise positive Ergebnisse. Ursache könnte eine Kontamination der

Biopsieproben, z.B. durch das Biopsie-Instrument oder die Verschleppung von Hautpartikel durch den Kontakt der Schweine untereinander, gewesen sein. Diese Kontamination lag in den meisten Fällen unter dem Detektionslimit der einfachen PCRs, konnte jedoch mit der nested PCR leicht nachgewiesen werden.

4.3.2 Etablierung einer Real-time PCR

Um die Anzahl der integrierten PERV-C-Proviren quantifizieren zu können, wurde eine PERV-C-spezifische Real-time PCR etabliert. Die Primer und die Sonde wurden in einen Bereich hoher Divergenz zwischen den Proviren der Subtypen A, B und C gelegt (Abbildung 38). Das Amplikon wurde so klein wie möglich gehalten (92 bp), um eine optimale Amplifikationsrate zu gewährleisten. Zur Normalisierung der eingesetzten DNA-Mengen und zur Qualitätskontrolle der eingesetzten DNA wurde ein Fragment des Haushaltsgens Cyclophilin co-amplifiziert und mit einer spezifischen Sonde quantifiziert.

Die Effizienzen beider Reaktionen wurden durch Standardverdünnung einer envC positiven DNA-Probe (Pankreas 374) bestimmt. Der lineare Messbereich beider Reaktionen war sehr groß und erstreckte sich von 10^{-3} ng bis 10^2 ng genomischer DNA pro PCR-Reaktion. Die Effizienzen lagen nahe 100 %, und es konnte im Messbereich keine Interferenz beider Reaktionen festgestellt werden (Abbildung 34, A). Das Amplikon der PERV-C-Real-time wurde in den Vektor pBluescript KS II kloniert und anschließend wurde durch Standardverdünnung das Ende des linearen Bereiches zu 100 PERV-C-Kopien bestimmt. Durch die Standardverdünnung konnte die Anzahl der in den PERV-C-positiven Proben enthaltenen Proviren zwischen 1 und 7 Kopien eingegrenzt werden. Einige der in den PCRs negativ und in der nested-PCR positiv getesteten Proben zeigten in der Real-time PCR ebenfalls positive Signale. In diesen Fällen lag die Kopienzahl stets unter 1 Kopie pro 300 Genome und war klar von endogenen Kopien abgrenzbar. Die neue envC spezifische Real-time PCR hat sich als eine gute Methode zur Unterscheidung von exogen Kontaminationen und endogen vorhandenen Proviren in kritischen Proben bewährt (Abbildung 34; B und C).

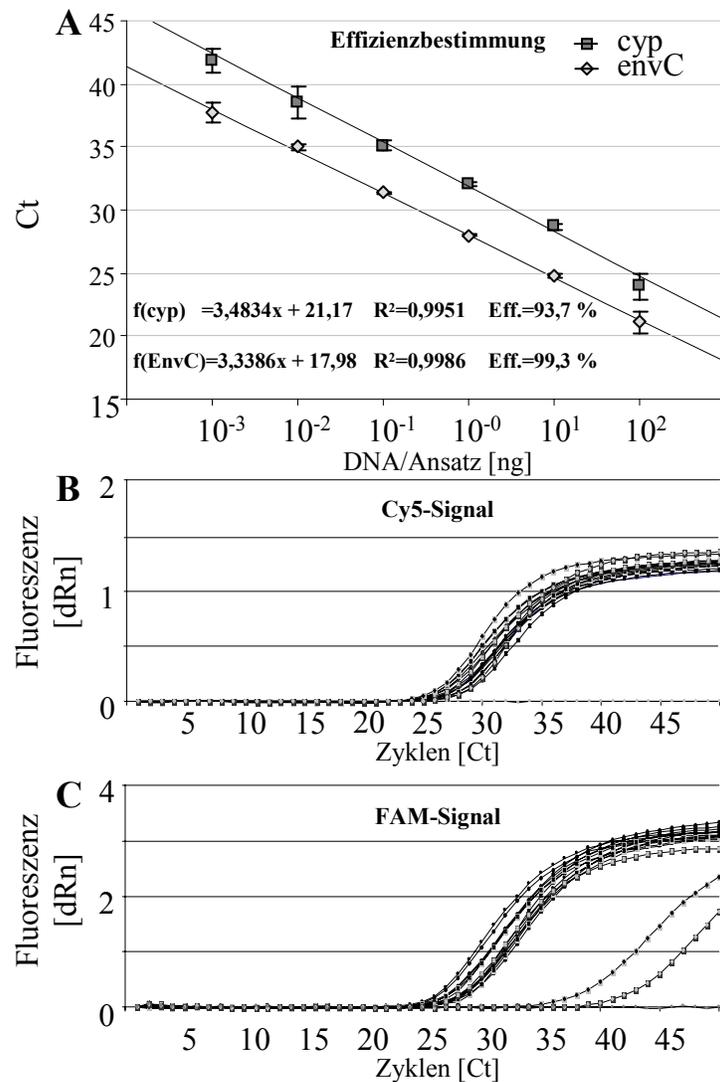


Abbildung 34: Charakterisierung der envC Real-time PCR

A: Effizienzbestimmung der Duplex Real-time PCR am Beispiel einer 1:10 Verdünnung genomischer envC positiver DNA. Über einen Bereich von 0,001 bis 100 ng verlaufen die Graphen linear. Beide Reaktionen hatten eine sehr hohe Effizienz von 93,7 % und 99,3 %. B: und C: Real-time PCR Rohdaten von 15 Tieren (Ohrbiopsie) und der Negativkontrolle. 13 Proben waren positiv für endogenes envC. Sowohl die Cy5- als auch die Fam-Werte lagen bei diesen Proben im selben Größenbereich. Zwei Proben zeigten eine exogene Kontamination mit envC, erkennbar an den hohen Fam-Werten bei gleichzeitig dem Gesamt-Durchschnitt entsprechenden Cy5 (cyp) Werten. Die gezeigten Werte sind charakteristisch für 100 ng genomischer DNA pro Reaktionsansatz.

4.3.3 Infektionsversuch PERV-C-negativer Tiere mit PERV-A/C

Rekombinante porzine endogene Retroviren der Subtypen A und C (PERV-A/C) stellen ein besonderes Risiko bei der Xenotransplantation dar. In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sie als *de novo* Integrate vorrangig in lymphatischen Zellen des Schweins vorkommen können (WOOD *et al.* 2004). Sie wurden ebenfalls in Milzen von Schweinen mit Melanomen nachgewiesen (DIECKHOFF *et al.* 2007b). Endogenisiert wurden sie bisher noch nicht gefunden.

Kennzeichnend für diese rekombinanten Viren sind die intakten Leserahmen und die vergleichsweise hohen Transkriptionsraten. Die beschriebenen Vertreter besitzen den Tropismus von PERV-A und sind in der Lage, humane Zellen produktiv zu infizieren. Ob eine Replikation im natürlichen Wirt mit Virämie und Pathogenese stattfinden kann, ist derzeit unklar. Aus diesem Grund wurde ein Infektionsversuch durchgeführt

Da in PERV-C-freien Schweinen Rekombinationsereignisse zwischen PERV-A und PERV-C ausgeschlossen sind, wurden diese Tiere verwendet. Es wurden drei envC negativ getestete Hausschweine von Bauernhöfen aus der Umgebung von Frankfurt an das Paul-Ehrlich-Institut überführt. Dort wurden die Tiere mit einem PERV/5°-haltigen Zellkulturüberstand intraperitoneal inokuliert. Der Überstand beinhaltete kultivierungsbedingt eine gemischte PERV-A/C-Population. Sie bestand hauptsächlich aus PERV/5° und PERV/LT. PERV/5° besitzt 5 NFY-Bindestellen und PERV/LT ist ein Virus, das sich bei längerer Kultivierung ohne Selektionsdruck durch Passagierung gegenüber PERV/5° durchsetzt. Das ursprüngliche Virus PERV/5° resultierte aus einer mehrfachen Passagierung viraler Überstände auf humanen 293-Zellen, in deren Verlauf eine Adaption stattfand, die sich auf der Ebene der Proviren in einer Multimerisierung der NFY Transkriptionsfaktorbindestellen manifestierte und mit einem erhöhten Titer verbunden war (DENNER *et al.* 2003).

Um den Anteil an PERV/5° im Überstand zu erhöhen, wurde eine erneute Passagierung auf uninfizierte 293-Zellen durchgeführt. Das Virus wurde nach 4 Wochen geerntet und die DNA der Wirtszellen mittels PCR analysiert (PERV-LTR). Es konnte nur ein Gemisch aus PERV/5° und PERV/LT nachgewiesen werden (Abbildung 35).

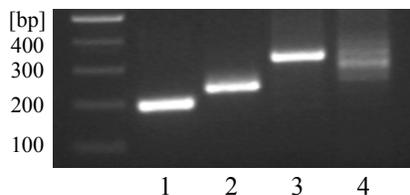


Abbildung 35: PCR-Analyse der mit PERV/5° infizierten Zellen

Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate der LTR-spezifischen PCR. 1: PERV/3°, 2: PERV/4°, 3: PERV/5° und 4: DNA der infizierten Zellen. In den PERV/5° produzierenden 293T-Zellen wurde ein Gemisch aus PERV/5° und PERV/LT gefunden. PERV/LT setzt sich bei Langzeitkultivierung gegenüber PERV/5° durch (KARLAS *et al.* 2010).

Mit jeweils 500 ml des Überstandes wurden zwei der drei C-freien Schweine (Nr. 5 and Nr. 17) i.p. inokuliert. Die absolute Menge an infektiösen Partikeln in diesem Volumen wurde durch Titration auf 293-Zellen mit anschließender Real-time PCR auf $6,4 \times 10^6$ berechnet. Ein Tier (Nr. 6) blieb unbelastet.

In Intervallen von einem Monat wurde den Tieren Blut abgenommen. Die aus diesem Blut isolierte DNA wurde auf die Anwesenheit von PERV-A und PERV-A/C analysiert. Nach 4 Monaten wurden die Tiere eingeschläfert. Für die DNA-Isolation wurden verschiedene Organproben entnommen. Die Analyse auf PERV-A/C Proviren erfolgte mit den Primern VRBF und TMR. In keiner der Proben konnte PERV-A/C nachgewiesen werden (Abbildung 36).

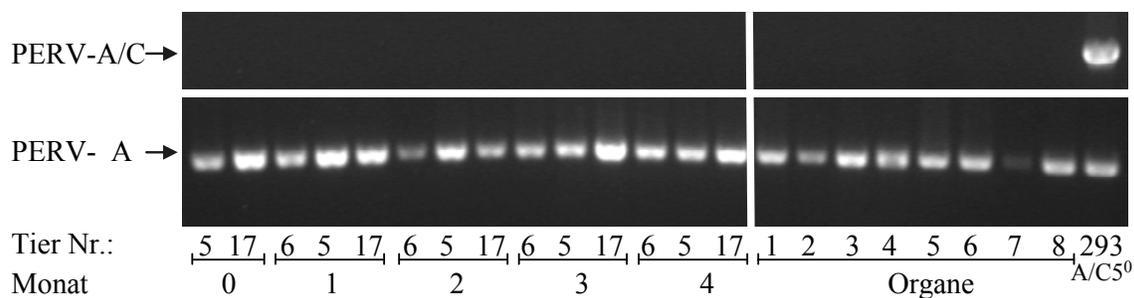


Abbildung 36: PCR-Analyse der mit PERV/5° inokulierten PERV-C-freien Schweine

PCR-Analyse der Schweine vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Belastung. Die Tiere Nr. 5 und 17 wurden mit PERV-A/C inokuliert. Bei Tier Nr. 6 handelte es sich um das Kontrolltier. Über einen Zeitraum von 4 Monaten wurden Blutproben sowie im Anschluss verschiedene Organe (1=Herz, 2=Muskel, 3=Leber, 4=Niere, 5=Milz, 6=Lymphknoten, 7=Lunge und 8=Haut) von Tier Nr. 17 untersucht. Zur Kontrolle der Qualität der DNA wurde parallel PERV-A amplifiziert. In keiner Probe konnte PERV-A/C nachgewiesen werden. Modifiziert nach (KAULITZ *et al.* 2011b).

Um herauszufinden, ob die Tiere in Folge der Inokulation PERV-spezifische Antikörper produziert haben, wurden Seren der Tiere im Western Blot analysiert. Als Antigen wurde ein Lysat von PERV-A/C-Partikeln verwendet. Im Gegensatz zu den Kontroll-Ziegenseren konnten in den Seren der drei Schweine keine PERV-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 37).

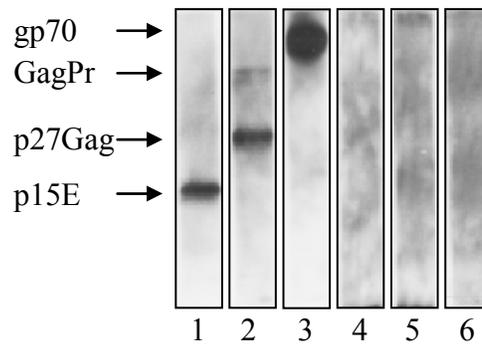


Abbildung 37: Keine PERV-Antikörper im Serum der mit PERV-A/C inokulierten Schweine

Western Blot Analyse der Seren zweier mit PERV-A/C belasteter Schweine (4: Tier Nr. 5 und 5: Tier Nr. 17) und des Kontrolltieres (6: Tier Nr. 6). Als Antigen wurde pelletiertes PERV-A/C-Virus verwendet. Die Seren der Schweine zeigten keine Reaktion mit dem Antigen, wohingegen die Seren verschiedener mit rekombinanten PERV-Proteinen immunisierter Ziegen (1: p15E, 2: p27 gag, 3: gp70) mit dem Antigen reagierten.

Die Ergebnisse der PCR-Analyse und des Western Blots zeigten, dass keine produktive Infektion mit PERV-A/C stattgefunden hatte.

4.3.4 PERV-C bei Wildschweinen

Im Rahmen der 2009 durchgeführten Studie zur Prävalenz der PERV-Subtypen A, B und C in verschiedenen transgenen und nicht-transgenen Schweinebeständen wurden neben Hausschweinen auch 18 Wildschweine aus der Umgebung von Berlin untersucht (DIECKHOFF *et al.* 2009). Es hatte sich gezeigt, dass alle Wildschweine in der PCR1 positiv reagierten. Im Gegensatz zu diesem Ergebnis zeigte Mang *et al.* 2001, dass im Wildschwein auch mit einer nested PCR kein PERV-C nachzuweisen ist. Allerdings wurde in dieser Studie nur ein Tier untersucht (MANG *et al.* 2001). Um die Ergebnisse der vorangehenden Studie zu bestätigen und neue Daten zu erheben, wurden diese 18 Tiere erneut analysiert und die Probenzahl dabei um 107 Tiere (zur Verfügung gestellt von C. Adlhoch) erweitert.

Im ersten Schritt wurden alle der insgesamt 125 zur Verfügung stehenden Proben mit der neu entwickelten envC spezifischen Real-time PCR analysiert. Es war festzustellen, dass keines der Tiere das Kriterium eines endogen vorhandenen PERV-C-Virus erfüllte. Bei allen Tieren lagen die PERV-spezifischen FAM Ct-Werte deutlich unter denen der Cyclophilin spezifischen Cy5 Ct-Werte. Da jedoch 10 von 10 mit der PCR1 getesteten Proben positiv reagierten, erschien es unwahrscheinlich, dass die Tiere kein endogenes PERV-C besitzen. Als mögliche Ursache für die Diskrepanz schienen Polymorphismen im Bereich von Sonde und Primern der Real-time PCR am wahrscheinlichsten. Aus diesem Grund wurden zwei neue Primer entwickelt und mit der PCR3 und PCR5 die betreffenden Bereiche des envC amplifiziert und sequenziert. Tatsächlich wurden in den für die Real-time PCR relevanten Bereichen Polymorphismen entdeckt (Abbildung 38). Nachdem Primer und Sonde angepasst wurden, konnte in allen Wildschweinen PERV-C als eindeutig endogen identifiziert werden. Somit waren im Einklang mit der vorangehenden Studie 100 % der getesteten Tiere PERV-C positiv.

Um Polymorphismen in einem erweiterten Bereich aufdecken zu können, wurde ein dritter Primer entwickelt. Der Primer liegt im VRA-Bereich von envC und ist somit envC spezifisch. Zusammen mit dem angepassten reversen Primer der Real-time PCR stellt er die PCR6 dar. Mit den Primer-Kombinationen PCR6 und PCR7 wurden weitere Sequenzierungen durchgeführt (Abbildung 38).

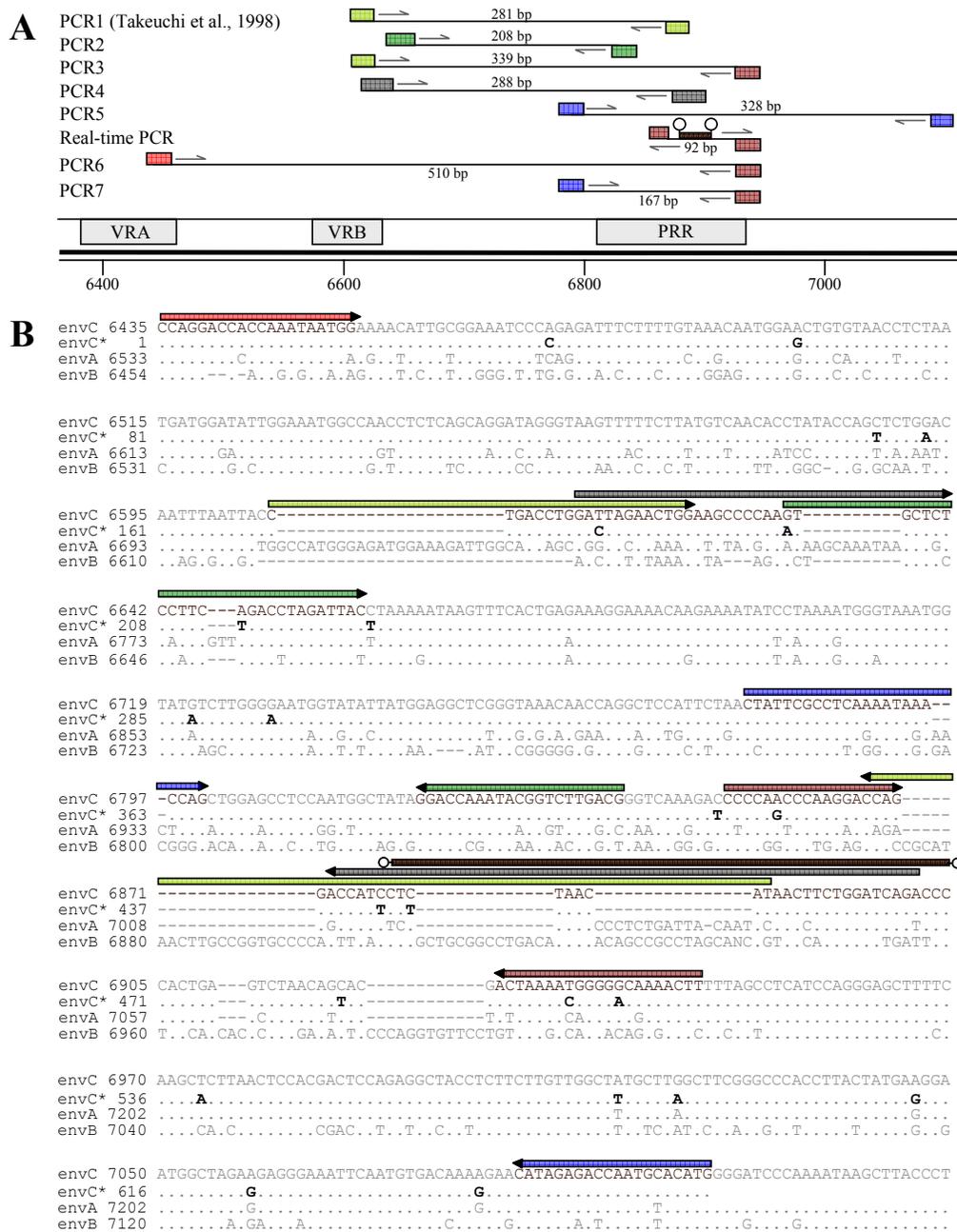


Abbildung 38: Primerlokalisierung und Sequenzspezifität der envC-PCRs

A: Primerpaare der verschiedenen PCRs und deren Positionierung innerhalb der Rezeptorbindedomäne von envC. B: Multialignment von envC (AM229312), der neuen Wildschweinsequenz envC* sowie PERV-A (AJ293656) und PERV-B (AJ293657). EnvC* entspricht ab Nukleotid-Position 504 der PERV-A Sequenz. Der Unterschied an Nukleotid-Position 666 ist irrelevant, da der PCR5 rev-Primer für die Amplifikation genutzt wurde und die gefundene Sequenz der Primer-Sequenz aus technischen Gründen entsprechen musste. EnvC identische Nukleotide sind durch „.“ markiert, Lücken mit „-“ sowie die gefundenen SNPs durch Fettschrift. Ebenfalls zeigt wird die Lage und die Orientierung von Primern und Sonden.

Insgesamt wurde ein Bereich von 671 bp Länge sequenziert. Für das Erstellen der Konsensussequenz dienten die Sequenzen von acht individuellen Wildschweinproben. Alle Sequenzen waren homolog und zeigten keine individuellen SNPs. Im Vergleich zur hausschweintypischen envC Sequenz (AM229312) wurden 23 SNPs gefunden. Keiner der SNPs erzeugt im ORF des envC-Gens ein Stopcodon. Es wurden im betreffenden Bereich jedoch 11 Aminosäuresubstitutionen identifiziert (Abbildung 39).

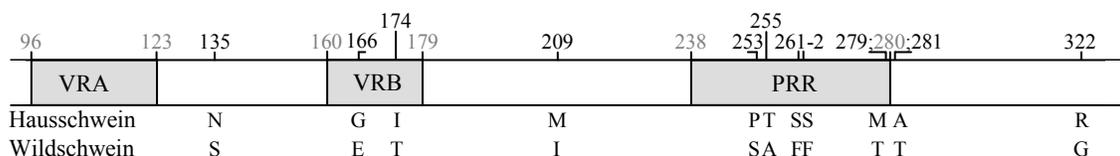


Abbildung 39: Lokalisation der gefundenen AS-Substitutionen

Vergleich der Aminosäuresequenz des hausschweintypischen envC Bereichs (AM229312) mit der des wildschweintypischen envC. Es wurden 11 Substitutionen gefunden.

Es erfolgte ein phylogenetischer Vergleich mit den bei GenBank gelisteten Sequenzen (Abbildung 40). Gleichgroße Verwandtschaft wurde zur Sequenz AY534305 und anderen PERVs gefunden.

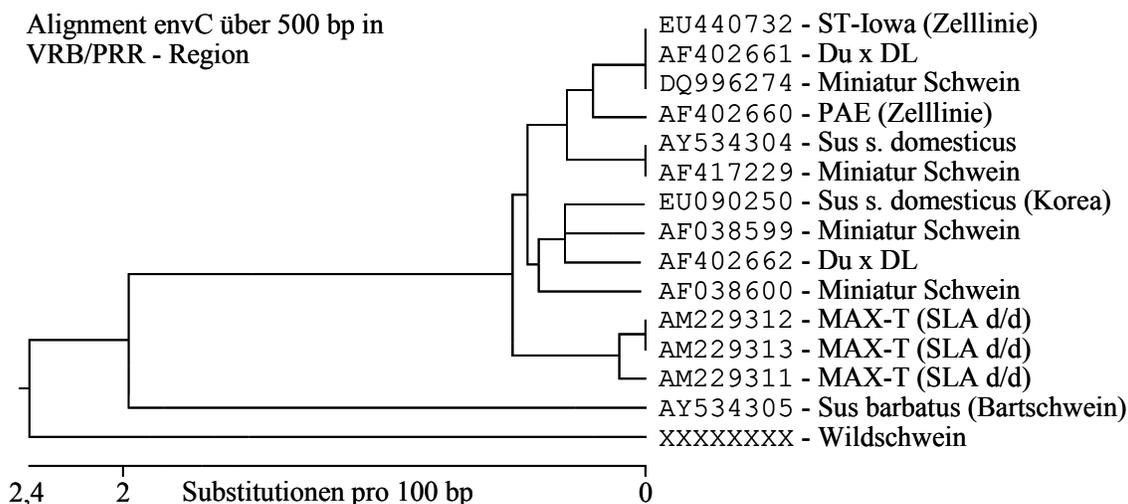


Abbildung 40: Phylogenetischer Baum der neuen envC-Sequenz

Im Vergleich zu anderen PERV-C-Sequenzen zeigt die neue Sequenz gleichgroße Verwandtschaft zu einem im Bartschwein gefundenen A/C-Provirus und den anderen PERVs. Der untersuchte Bereich umfasste den Bereich PCR1 for bis PCR5 rev (Abbildung 38).

Bei AY534305 handelt es sich um ein PERV-A/C-verwandtes Virus, das im Bartschwein gefunden wurde. Beim Vergleich der gefundenen SNPs mit der Nukleotidsequenz von PERV-A fiel auf, dass die letzten vier gefundenen SNPs mit der envA Sequenz identisch sind. Ab Nukleotid Position 504 bp in der wildschweintypischen Sequenz lässt sich diese, im Gegensatz zur gewöhnlichen envC Sequenz, nicht mehr von PERV-A unterscheiden (Abbildung 38). Entsprechend handelt es sich bei der Aminosäuresubstitution an Position 322 ebenfalls um einen envA spezifischen Austausch (Abbildung 39). Möglicherweise handelt es sich bei dem neu gefundenen Virus um die Erstbeschreibung eines endogenen PERV-A/C-rekombinanten Virus im Genom des Schweins. Interessanterweise ist die neu gefundene Sequenz bei Wildschweinen dominierend. Das hausschweintypische envC konnte mit der spezifischen Real-time PCR in keiner der Wildschweinproben nachgewiesen werden.

5 Diskussion

Die Xenotransplantation, im speziellen die Übertragung lebender Organe, Gewebe oder Zellen vom Schwein auf den Menschen, hat sich in den letzten Jahren von einem rein theoretischen Ansatz zu einer Technologie entwickelt, die bereits in der klinische Praxis angewendet wird (GARKAVENKO *et al.* 2004).

Bemerkenswerte Fortschritte wurden ebenfalls bei der Transplantation porziner Herzen in nicht-humane Primaten erzielt (EKSER and COOPER 2008). Durch die Zucht gentechnisch angepasster Schweine und die Fortschritte im Bereich der Immunsuppression konnte die wesentlichste Hürde der Xenotransplantation, die immunologische Abstoßungsreaktion, zumindest im Tiermodell weitgehend überwunden werden (HARA and COOPER 2010; LE BAS-BERNARDET *et al.* 2008). Während die Überlebenszeit der Tiere in den ersten Versuchen auf Grund der teils heftigen hyperakuten Abstoßungsreaktionen nur wenige Minuten oder Stunden betrug, überlebten die Tiere nun mehrere Monate und starben nicht mehr an den unmittelbaren Folgen der Immunantwort (BAUER *et al.* 2010). Da die anatomischen Gegebenheiten bei Xenotransplantation porziner Herzen in humane Empfänger günstiger sind, könnte beim Menschen eine bessere Prognose erwartet werden. Ein weiteres Beispiel ist die Implantation verkapselter porziner Inselzellen zur Therapie von Diabetes Typ II Patienten. Die neuseeländische Firma LCT (Living Cell Technologies) schloss kürzlich eine klinische Phase IIa erfolgreich ab und testet ihr Produkt DIABECCELL[®] in einer weiterführenden Phase IIb Studie (HEALTH 2011).

Durch diese Entwicklungen rücken weiterführende Fragestellungen immer mehr in den Fokus. So auch die Frage nach den biologischen Risiken eines solchen Eingriffes. Zwar ist es möglich, die meisten humanpathogenen Erreger des Schweins durch DPF-Haltung zu eliminieren, doch ist bis heute noch nicht zufriedenstellend geklärt, ob von den porzinen endogenen Retroviren eine signifikante Gefahr für die Patienten ausgeht (DENNER 2011a; GARKAVENKO *et al.* 2008). Das porzine endogene Retrovirus ist nächster Verwandter verschiedener endogener und exogener Immunschwäche- und Tumor-induzierender Gammaretroviren wie z.B. GaLV, FeLV, KoRV und MLV. Deshalb müssen alle nötigen Vorkehrungen unternommen werden, um eine Transmission effektiv verhindern bzw. ausschließen zu können (DENNER 2008; DENNER *et al.* 2009).

5.1 Vakzine auf Basis viraler Hüllproteine

Für verschiedene Vertreter der Gammaretroviren sind antiretrovirale Impfstoffe beschrieben. Bekannte kommerzielle Beispiele sind Leukocell[®] und Leucogen[®], die in Katzen einen Impfschutz gegen das Katzenleukämievirus (FeLV) aufbauen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Eignung der rekombinant hergestellten Hüllproteine (p15E und gp70) von PERV und KoRV zur Induktion neutralisierender Antikörper betrachtet.

Für den Fall, dass bei der Xenotransplantation eine Transmission und *in vivo* Infektion stattfindet, könnte ein solches PERV-Vakzin für die prophylaktische Anwendung von Nutzen sein. Weiterhin könnte die Funktionsanalyse von PERV- und KoRV-neutralisierenden Antikörpern wichtige Einsichten zu generellen Eigenschaften neutralisierender Antikörper liefern. Bis heute existieren keine Impfstoffe gegen die AIDS induzierenden humanpathogenen Retroviren HIV-1 und HIV-2. Ebenfalls ist ein Impfstoff gegen das humane T-lymphotrope Virus (HTLV-1 und HTLV-2) von großem Interesse.

Kürzlich wurde bei amerikanischen Patienten mit Prostatakarzinom bzw. mit einem chronischem Erschöpfungssyndrom ein neues Gammaretrovirus (XMRV), das mit PERV und KoRV eng verwandt ist, beschrieben (URISMAN *et al.* 2006). Inzwischen ist gesichert, dass es sich dabei um ein Artefakt handelt (COHEN 2011; KENYON and LEVER 2011). In europäischen Vergleichsproben konnte kein Zusammenhang zwischen der Inzidenz von Prostatakarzinomen und XMRV bestätigt werden (HOHN *et al.* 2009) und ursprüngliche Überlegungen einen Impfstoff zu entwickeln, sind derzeit obsolet.

5.1.1 Expression der rekombinanten Proteine in *E. coli*

Eine wichtige Eigenschaft, die die Eignung eines rekombinanten Proteins als Vakzine mitbestimmt, ist neben seiner Fähigkeit eine spezifische Immunantwort zu induzieren, auch die Möglichkeit es in ausreichenden Mengen im heterologen Wirt (hier *E. coli*) zu exprimieren und anschließend aufzureinigen zu können. Bei den Oberflächenhüllproteinen von Retroviren, die als potentielle Vakzine gut geeignet sind, handelt es sich um Membranproteine bzw. um Proteine die mit Zellmembranen funktional stark interagieren können. Die Expression solcher Proteine stellt in vielen Fällen eine besondere Herausforderung dar.

Für die Immunisierungsversuche wurden die Oberflächenhüllproteine gp70 (SU) und p15E (TM) im heterologen Wirt *E. coli* exprimiert und anschließend affinitätschromatografisch aufgereinigt. Im Gegensatz zu den p15E Proteinen ließen sich die gp70 Proteine nicht gut exprimieren. Die ORFs beider Proteine (gp70 KoRV und gp70 PERV) enthalten für *E. coli* seltene Codons. Zum Beispiel beinhaltet der 439 Aminosäuren umfassende Leserahmen des PERV-gp70 13 seltene Arginin-, 11 seltene Prolin-, 7 seltene Isoleuzin-, sowie 2 seltene Leuzin-Codons (MURA 2003). Aus diesem Grund wurden die *E. coli* Stämme BL21-CodonPlusTM(DE3)-RP und BL21 RosettaTM 2(DE3)pLysS verwendet. BL21-CodonPlusTM(DE3)-RP trägt plasmidkodiert die Gene der tRNA-argU (erkennt AGA und AGG) sowie der tRNA-proL (erkennt CCC). Die entsprechenden Codons sind typisch für GC reiche Genome von Säugetieren und sind die dominierenden seltenen Codons in den gp70 Sequenzen. Um die verbleibenden Codons auszugleichen, wurde während der Experimente auf den Stamm BL21 RosettaTM 2(DE3)pLysS gewechselt. Dieser kann 7 der in *E. coli* seltenen tRNAs plasmidkodiert ausgleichen. Eine Überexpression war dennoch nicht möglich, und zwischen beiden Stämmen konnte kein Unterschied in der Expressionsrate festgestellt werden. Es hat sich jedoch gezeigt, dass mit den pet22b (+) gp70 Vektoren transformierte Bakterienkulturen nach Induktion der Expression mit einem Wachstumsstopp reagierten ($OD_{600nm} = konst$). Da dieser nicht mit der Produktion signifikanter Mengen an rekombinanten Protein korrelierte, ist davon auszugehen, dass beide rekombinanten Proteine (PERV-gp70 und KoRV-gp70) für die verwendeten Stämme toxisch waren. Es wurden kürzlich neue *E. coli* BL21 Stämme identifiziert (BL21 C41(DE3), BL21 C43(DE3) oder Lemo21(DE3)), die sich besonders für die Expression toxischer Proteine eignen und möglicherweise eine Überexpression der Proteine erlauben (DUMON-SEIGNOVERT *et al.* 2004; WAGNER *et al.* 2008). Um für alle Immunisierungen ausreichende Mengen der rekombinanten gp70 Proteine zur Verfügung zu haben, wurden mehrerer Expressionen mit durchschnittlich 4 Liter Kulturmedium durchgeführt. Die Ausbeute und Reinheit wurde, im Gegensatz zur ursprünglich von C. Wurzbacher etablierten Methode, nicht durch eine Verringerung der Expressionstemperatur auf 4 °C und einer entsprechenden Verlängerung der Expressionszeit, sondern durch ein modifiziertes Aufreinigungsprotokoll erhöht (WURZBACHER 2007). Die rekombinanten gp70 Proteine lagen im Zytosol unlöslich vor (MAHDI 2009), aus diesem Grund konnte durch die Abtrennung löslicher zytosolischer Proteine der Aufreinigungsfaktor verbessert werden.

Die Sequenzierung der Expressionsplasmide zeigte für das gp70 Konstrukt von PERV eine Modifikation an Aminosäureposition 161. Es handelt sich um eine Aminosäuresubstitution, die in keiner bei NCBI hinterlegten PERV-A-Sequenzen zu finden war. Da mit dem Konstrukt neutralisierende Antikörper (Ziege 62) induziert werden konnten, scheint diese Substitution für die Wirkung des Vakzins irrelevant zu sein.

5.1.2 Rekombinantes p15E induziert Antikörper mit ähnlichen Epitopen bei verschiedenen Spezies

Mit den rekombinanten Antigenen wurden verschiedene Spezies (Ziege, Ratte, Maus, Kaninchen, Meerschweinchen) immunisiert. Alle Spezies zeigten hohe Titer spezifisch bindender Antikörper. Interessanterweise ließ sich mit den Seren der meisten mit PERV-p15E immunisierten Tiere im Bereich der MPER das Epitop (FEGWFNM; E2) detektieren. Ein ähnliches Epitop wird auch von dem monoklonalen HIV-1-Antikörper 4E10 erkannt (ZWICK *et al.* 2001). Dieser humane Antikörper bindet spezifisch das Epitop NWFNIT innerhalb der MPER des gp41 von HIV-1. 4E10 kann ein breites Spektrum an HIV-1-Stämmen neutralisieren und ist aus diesem Grund von großem Interesse für die Entwicklung eines HIV-1-Impfstoffes (MCGAUGHEY *et al.* 2004).

Die bei den PERV-Immunsierungen gefundenen MPER Epitope und das 4E10 Epitop enthalten beide das Aminosäure-Triplet WFN. Trotz der verschiedenen Genera der Viren HIV-1 und PERV zeigt dieser Bereich der MPER einen gewissen Verwandtschaftsgrad. 4E10 ähnliche neutralisierende Antikörper konnten im Menschen noch nicht gezielt induziert werden. Bei Gammaretroviren scheint dieser Bereich jedoch besonders immunogen zu sein. Unter anderem aus diesem Grund wurde in einer anderen Arbeit die Eignung von rekombinanten HIV/PERV-TM Hybriden als Basis für ein HIV-1-Vakzine untersucht (BEHRENDT 2009).

Die Seren der mit PERV-p15E immunisierten Tiere zeigten nicht nur eine Reaktion mit den Pepspot-Peptiden der MPER, sondern auch mit denen der FPPR. Die Epitope liegen in einem Bereich, der auch bei anderen Immunisierungsversuchen mit anderen Modellen gefunden wurde (Abbildung 41). Sowohl die Seren mit p15E von FeLV immunisierter Ziegen, Ratten und Katzen (LANGHAMMER *et al.* 2005; LANGHAMMER *et al.* 2011a; LANGHAMMER *et al.* 2011b; LANGHAMMER *et al.* 2006) sowie KoRV-p15E immunisierter Mäuse (MAHDI 2009) zeigten Epitope sowohl in der FPPR als auch im MPER-Bereich.

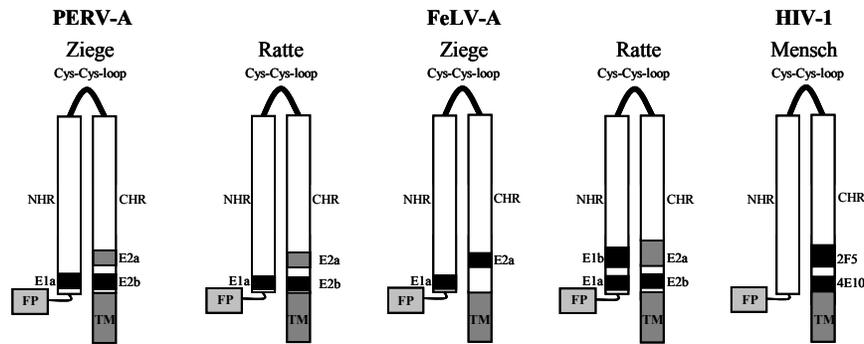


Abbildung 41: Lokalisation relevanter TM-Epitope bei PERV, FeLV und HIV-1

Das Bild zeigt schematisch die Epitope neutralisierenden Antikörper bei verschiedenen Retroviren. Die neutralisierenden Antikörper bei PERV und FeLV wurden durch Immunisierung mit rekombinantem p15E induziert (LANGHAMMER *et al.* 2005). Bei 2F5 und 4E10 handelt es sich um monoklonale HIV-1-Antikörper, die ein breites Spektrum an HIV-1-Stämmen neutralisieren können (ZWICK *et al.* 2001). FP = Fusions-Peptid, NHR = N-terminale helikale Region, CHR = C-terminale helikale Region.

5.1.3 PERV-Neutralisation durch Seren verschiedener Spezies

Mit einem Neutralisationsassay, der in ähnlicher Form auch für HIV-2 beschrieben wurde (BEHRENDT *et al.* 2009), konnte eine dosisabhängige neutralisierende Wirkung der Seren, der mit PERV-gp70 und KoRV-gp70 (MAHDI 2009) sowie der mit PERV-p15E immunisierten Ziegen nachgewiesen werden. Durch Immunfluoreszenz konnte zudem gezeigt werden, dass das Serum der mit PERV-p15E immunisierten Ziegen spezifisch PERV-produzierende Zellen bindet und die Epitope auf den Viren frei zugänglich sind.

In den Seren der immunisierten Ratten ließ sich keine antigenspezifische Neutralisation nachweisen, da auch Präimmun- und Kontrollseren eine neutralisierende Aktivität zeigten. Ähnliche interferierende neutralisierende Effekte wurden ebenfalls bei Immunisierungsversuchen von Ratten mit rekombinanten KoRV-Hüllproteinen beobachtet (MAHDI 2009; MÖLLER 2007). In den ersten Versuchen zur Evaluierung des rekombinanten PERV-p15E zur Induktion einer antigenspezifischen Neutralisation in Ratten wurde diese Interferenz nicht festgestellt. Zu diesem Zeitpunkt konnte mit einem zu dem hier verwendeten Neutralisationstest ähnlichem System eine spezifische Neutralisation in den Immunsereen, jedoch nicht in den Präimmunsereen nachgewiesen werden (FIEBIG 2007). Zu diesem Zeitpunkt wurde in den Kontrollseren keine präformierten Antikörper beobachtet (FIEBIG 2007). Es scheint naheliegend, dass die in dieser und in den

anderen Arbeiten beobachteten präformierten Antikörper ursächlich für die generelle Neutralisation der Rattenserum waren.

Der Neutralisationstest wurde ursprünglich für die Spezies Ziege etabliert, und ließ sich auf die Seren von Mäusen und Meerschweinchen nicht anwenden. In den betreffenden Seren konnten zwar keine präformierten Antikörper nachgewiesen werden, doch zeigten auch diese eine unspezifische Neutralisation. Falsch positive Ergebnisse bei *in vitro* Neutralisationstests sind ein generelles Problem bei der Impfstoffforschung (DENNER 2011b; MAHDI 2009; MÖLLER 2007; POLONIS *et al.* 2008)

Möglicherweise beruhte der bei Mäusen und Meerschweinchen beobachtete neutralisierende Effekt auf Antikörpern gegen spezifische Epitope des humanen Glykosylierungsmusters, das auf der viralen Membran des Testvirus präsentiert wurde. Die Produktion der Virenstocklösungen für die NT-Assays erfolgte ausschließlich auf humanen 293-Zellen, da PERV in Nagerzelllinien nicht oder nur sehr schlecht repliziert und die Herstellung speziesspezifischer Virenstocks somit nicht möglich war (IRGANG *et al.* 2005; WILSON *et al.* 2000).

Eine Glykosylierung kann sowohl bei Proteinen als auch bei Lipiden stattfinden (BERG *et al.* 2010). So liegen beispielsweise die meisten der für die hyperakute Abstoßung verantwortlichen Kohlenhydrat-Epitope (z.B. α -1,3-Gal) an Lipide gebunden vor (DISWALL *et al.* 2010). Das solche Glykolipide Target neutralisierender Antikörper sein können bzw. die Immunantwort beeinflussen können, wurde zum Beispiel für PERV (MCKANE *et al.* 2004; MCKANE *et al.* 2003), HIV (ABDEL-MOTAL *et al.* 2006) und PrV (HAYASHI *et al.* 2004) am Beispiel des α -1,3-Gal Epitopes gezeigt. Im Allgemeinen stellt die Glykosylierung eine der größten immunologischen Barrieren bei viralen Zoonosen dar (KIM *et al.* 2007). Diese Hypothese könnte zum einen erklären, warum die Aufreinigung der IgGs nicht zur Eliminierung des neutralisierenden Effekts bei den Kontrollseren geführt hat und zum zweiten die Kontrollseren im Western Blot mit Viren-Präparationen nicht reagierten. Im Western Blot sind nur proteingebundene Epitope detektierbar. Unter Zuhilfenahme eines molekularen Klons von PERV könnte diese Interferenz möglicherweise durch die Herstellung speziesspezifischer Virenstocks umgangen werden.

Da die Lokalisation der Epitope zwischen den einzelnen Spezies große Übereinstimmung zeigte, ist es wahrscheinlich, dass auch die Seren der immunisierten Mäuse, Ratten und Meerschweinchen neutralisierende Eigenschaften besitzen. In einer thematisch verwandten Arbeit

Von einem der positiven Ratten-Präimmun-Seren wurde ein Epitop-Mapping durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Das Serum interagiert mit denjenigen Peptiden der PepSpots™ Membran die die ISU-Domäne von PERV-p15E repräsentierten. Die ISU-Domäne ist bei allen drei Viren hoch konserviert. In noch unveröffentlichten Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von RaLV durch verschiedene Stimuli (z.B. Pasteurella Toxin) möglich ist (Fiebig unveröffentlicht). Aus diesem Grund wurden die Ratten prophylaktisch mit dem Breitbandantibiotikum Baytril® behandelt, um eine Infektion mit Pasteurellen und anderen Erregern zu vermeiden. Auf die anti-p15E-Reaktivität der Prä- und Kontrollseren hatte dies jedoch keine Auswirkung.

Die präformierten Antikörper interferierten ebenfalls im Infektionsversuch Ratte/KoRV. Alle inokulierten Tiere der Rassen Lewis und Sprague-Darley zeigten wie auch die meisten der in den Immunisierungsversuche verwendeten Ratten der Rasse Wistar präformierte TM-Antikörper. Vermutlich sind diese Antikörper ursächlich für die Immunität der Tiere. In einer Arbeit, in der unter anderem der Tropismus von KoRV charakterisiert wurde, konnten bei 11 von 12 Tieren neutralisierende anti-P15E Antikörper detektiert und bei 4 von 12 Tieren Provirus in PBMCs am Tag 21 nach Belastung gefunden werden (FIEBIG *et al.* 2006).

Zu diesem Zeitpunkt war die produktive Infektion von Ratten mit KoRV ebenfalls möglich (FIEBIG *et al.* 2003). In einer weiterführenden Arbeit zur Etablierung des Modells KoRV-Ratte zur Evaluierung rekombinanter KoRV-Impfstoffe konnte in PBMCs infizierter Ratten jedoch kein KoRV-Provirus nachgewiesen werden und als Koinzidenz traten auch in dieser Arbeit präformierte Antikörper auf (MÖLLER 2007). Bis zur Aufklärung des Ursprungs der präformierten TM-Antikörper ist das Modell KoRV-Ratte zur *in vivo* Validierung rekombinanter KoRV- bzw. PERV-Impfstoffe und neutralisierender Antikörper als ungeeignet anzusehen.

In den Spezies Maus, Meerschweinchen und Kaninchen waren keine präformierten Antikörper nachweisbar.

5.2 Hemmung der PERV-Expression durch RNA-Interferenz

Im Genom vom Schwein befinden sich je nach Rasse zwischen 50 und 100 PERV-Kopien (ERICSSON *et al.* 2001; LE TISSIER *et al.* 1997; PATIENCE *et al.* 2001). Klassische Knockoutstrategien durch Insertionsmutagenese sind aus diesem Grund kaum anwendbar. Es besteht jedoch die Möglichkeit, die PERV-mRNA durch den gezielten Einsatz von RNAi zu

degradieren. Durch die Homologie des gag/pol-Gens innerhalb der PERV-gamma1 Familie ist es möglich siRNAs zu entwickeln, die auf alle Subtypen und ebenfalls auf rekombinante PERVs inhibierend wirken. Ein solche siRNA wurde in der pol2 gefunden und deren Wirkung in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Experimenten belegt (DIECKHOFF *et al.* 2007a; DIECKHOFF *et al.* 2008; KARLAS *et al.* 2004).

In dieser Arbeit wurde die Wirksamkeit der pol2 erneut in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Experimenten gezeigt. Des Weiteren wurde eine neue effektive shRNA identifiziert.

5.2.1 Hemmung der PERV-Expression *in vitro*

Die RNAi hat sich seit ihrer Entdeckung (FIRE *et al.* 1998) zu einem beliebten Instrument der molekularen Genetik entwickelt. Während die ersten Anti-PERV-siRNAs noch nach relativ einfachen Kriterien, allerdings sehr zeit- und arbeitsintensiv identifiziert wurden, stehen heute eine ganze Reihe von EDV-Anwendungsprogrammen zur Verfügung.

Die PERV gag/pol Konsensussequenz und die envA und envB Sequenz wurden mit dem BLOCK-iT™ RNAi Designer der Firma Invitrogen erneut auf günstige shRNA Target-Sequenzen untersucht. Drei konservierte Sequenzen im gag/pol-Bereich und jeweils zwei konservierte Bereiche in den env Genen wurden ausgewählt und die entsprechenden siRNAs in Form von shRNAs kloniert. Zusätzlich kamen eine anti-Luziferase-shRNAs und zwei anti-gag-shRNAs der Arbeitsgruppe um Dr. L. Scobie (Kaledonische Universität Glasgow) zum Einsatz. Nach der Transfektion und Transduktion PERV-produzierender PK15-Zellen mit den entsprechenden retroviralen Vektoren konnte mit qRT-PCR eine signifikante Reduktion der Menge an PERV-mRNA im Vergleich zu untransfizierten PK15-Zellen gemessen werden. Die Wirksamkeit der pol2 wurde bestätigt und eine weitere effektive shRNA Sequenz (pol1) identifiziert. Andere getestete shRNAs z.B. im gag-Bereich zeigten ebenfalls eine Wirkung.

Keine signifikante Wirkung zeigten shRNAs, die gegen die env-Sequenzen von Subtyp A und B gerichtet waren. Möglicherweise ist dies darin begründet, dass PK15-Zellen sowohl PERV-A als auch PERV-B exprimieren (KRACH *et al.* 2001) und mit dem etablierten qRT-PCR Assay zwischen den Subtypen nicht unterschieden werden kann. Bei einer angenommenen gleichstarken Expression beider Subtypen (Verhältnis mRNA Subtyp A zu Subtyp B = 1:1) und bei einer angenommenen Effizienz der shRNA von 100 % gegen jeweils einen der beiden Subtypen kann der

maximal gemessene Knockdown maximal 50 % betragen und liegt somit nicht innerhalb des Wertebereichs, in dem eine Hemmung als signifikant anzusehen ist.

Ebenfalls wurden Strategien untersucht, um die Effizienz des RNAi vermittelten Knockdowns durch multiple shRNAs zu erhöhen. Zu diesem Zweck wurde ein Klonierungs-System etabliert, mit dem verschiedene Kombination der pol2 und der neuen shRNAs als Tandem in den retroviralen Vektor pSiren kloniert werden konnten. Zur Evaluierung der Konstrukte wurden diese nachfolgend in PK15-Zellen transfiziert. In diesem Experiment zeigte die pol1 solo shRNA mit einer Hemmung von 90 % die stärkste Reduktion der PERV-Expression und wurde von keinem der Tandem-shRNA Konstrukte übertroffen. Die Ursache hierfür war zu diesem Zeitpunkt unklar. Es wurde vermutet, dass es sich um ein Problem der zu engen Nachbarschaft (9 bp) der einzelnen shRNA-Kassetten handelte und eine Promotor-Interferenz aufgetreten ist, die zur Reduktion der shRNA-Expression führte. Um dies ausschließen zu können, wurde ein zweites *in vitro* Experiment durchgeführt. In diesem Fall wurden die einzelnen shRNA Kassetten durch Doppeltransfektion und Doppelsektion in PK15-Zellen eingebracht. Parallel wurde ein neues Nachweissystem zur Quantifizierung der shRNA Expression für die pol1-shRNA und die pol2-shRNA entwickelt. Die Expression beider shRNAs konnte nachgewiesen werden und eine der doppeltransgenen Zelllinien, in der auch beide shRNAs am stärksten exprimiert wurden, zeigte die höchste Reduktion der PERV-Expression im Versuch. Eine Co-Abhängigkeit zwischen Expression der anti-PERV-shRNA und der Reduktion der PERV-RNA wurde auch in anderen Arbeiten nachgewiesen (RAMSOONDAR *et al.* 2009).

5.2.2 Grenzwert der maximal erreichbaren Hemmung

Vergleicht man aktuelle *in vitro* Studien zum Thema RNAi induzierte PERV-Inhibition (Tabelle 30) so ist erkennbar, dass die höchste bisher gemessene siRNA vermittelte Reduktion der PERV-Expression sowohl bei PK15-Zellen (RAMSOONDAR *et al.* 2009) als auch bei fötalen primären Fibroblasten bei 95 % liegt (DIECKHOFF *et al.* 2007a). Es stellte sich die Frage, ob es sich bei den Werten möglicherweise um den Grenzwert des maximal erreichbaren Knockdowns in PK15-Zelllinien handelte.

Tabelle 30: PERV-Hemmung in verschiedenen Zelllinien

RNAi System	RNA-Probe aus	Hemmung	Referenz
Synthetische pol2	PERV-B-infizierte 293	82 %	(KARLAS <i>et al.</i> 2004)
pSuper pol2	Klon A5; PERV-B-infizierte 293	90 %	(KARLAS <i>et al.</i> 2004)
RRLPGK-GFP-pol2	SE101	82,5 %	(DIECKHOFF <i>et al.</i> 2007a)
RRLPGK-GFP-pol2	SE105	78 %	(DIECKHOFF <i>et al.</i> 2007a)
pLVTHM-pol2	P1 F10 transduziert	81.8%	(DIECKHOFF <i>et al.</i> 2007a)
pLVTHM-pol2	P1 F10 transduziert u. gesortet	94.8 %	(DIECKHOFF <i>et al.</i> 2007a)
RRLPGK-GFP-pol2	PK15	65,8 %	(DIECKHOFF <i>et al.</i> 2007a)
pLVTHM-pol2	PK15	73,5 %	(DIECKHOFF <i>et al.</i> 2007a)
pSiren pol1	PK15 transfiziert	90 %	Diese Arbeit
pSiren pol2	PK15 transfiziert	62 %	Diese Arbeit
pSiren pol1	PK15 transduziert	83 %*	Diese Arbeit
pSiren pol2	PK15 transduziert	77 %*	Diese Arbeit
pSiren pol1/pol2	PK15 transduziert	80 %*	Diese Arbeit
pREV801 (gag u. pol shRNA)	PK15 stabile Zellklone	63 – 95 %	(RAMSOONDAR <i>et al.</i> 2009)

* gemessen in zytoplasmatischer Fraktion

Die maximal mit einer qRT-PCR messbare Hemmung der PERV-Expression einer shRNA transgenen Zelllinie im Vergleich zu ihrer Ausgangszelllinie ist von verschiedenen Faktoren abhängig. So setzt sich zum Beispiel die Gesamtmenge der PERV-RNA einer Zelle aus deren Anteilen in Zytoplasma und im Kern zusammen. Zwischen Kern und zytoplasmatischer RNA herrscht ein dynamisches Gleichgewicht. Während die RNA im Zytoplasma RNAi vermittelt (und auch durch andere Prozesse) degradiert wird, wird im Kern stetig neue RNA transkribiert und in das Zytoplasma exportiert. Da die RNA im Kern bei der Vermessung von Gesamt-RNA also stets anwesend ist, definiert sie die Grenze des maximal messbaren Knockdowns mittels qRT-PCR. Stark vereinfacht lässt sich das mit dieser Formel veranschaulichen:

$$RNA_{\text{gesamt; Ref.}} = RNA_{\text{geschnitten; Zyto}} + RNA_{\text{ungeschnitten; Zyto}} + RNA_{\text{Kern}}$$

Geht man von einem idealisierten und statischen Modell aus, bei dem die Transkriptionsstärken von PERV bei der Referenz-Zelllinie und der zu analysierenden Zelllinie absolut identisch sind, so entspricht die PERV-Kopienzahl in der Gesamt-RNA der Referenz-Zelllinie ($RNA_{\text{gesamt; Ref.}}$), der Summe aus den degradierten ($RNA_{\text{geschnitten; Zyto}}$) und nichtdegradierten ($RNA_{\text{ungeschnitten; Zyto}}$)

PERV-Kopien im Zytoplasma und des Kerns (RNA_{Kern}) der zu analysierenden Zelllinie, bezogen auf identische Zellzahl. Um diesen Sachverhalt näher zu betrachten, wurde von ausgewählten shRNA transgenen PK15-Zelllinien neben Gesamt-RNA auch Zytoplasma- und Kern-RNA isoliert und mit der PERV-qRT-PCR analysiert. Es hatte sich herausgestellt, dass sich in der Fraktion der Kern-RNA die höchste Konzentration an PERV-Kopien befand. In der zytoplasmatischen Fraktion konnten geringfügig weniger PERV-Kopien als in der Gesamt-RNA nachgewiesen werden. Es wurde somit gezeigt, dass sich in der Gesamt-RNA für die Messung mit qRT-PCR signifikante Mengen an Kern-RNA befinden, die die maximal messbare RNAi Hemmung limitieren.

Nach diesen Versuchen wurde klar, dass bei der Verwendung mehrerer effektiver shRNAs zwischen den Beiträgen einzelner shRNAs mit der PERV-spezifischen qRT-PCR nicht mehr unterschieden werden kann, da sich die Auflösungskraft der Methode durch den asymptotischen Verlauf der Messkurve bei Doppelkassetten einengt und dem Grenzwert (Kern-RNA) nähert (Abbildung 43). Der Anteil der einzelnen shRNAs an der Hemmung ist nicht zugänglich. So kann nur eine Aussage getroffen werden, ob generell eine effektive Degradation der Ziel-RNA stattgefunden hat oder nicht. Erschwerend kommt hinzu, dass durch die Betrachtung von Einzellzellklonen im Zuge anderer Studien entdeckt wurde, dass ein und dasselbe Konstrukt unterschiedlich stark exprimiert und damit verbunden unterschiedliche Knock-down-Effizienzen in einer identischen Ausgangs-Zelllinie zeigen kann (RAMSOONDAR *et al.* 2009). Um diesen Effekt zu mitteln, wurde in den hier gezeigten Experimenten mit multiklonale Zelllinien gearbeitet. Der maximal messbare Knockdown wurde demzufolge zugunsten der Stabilität des Messwertes geringer.

Die größten Knockdown Effekte wurden erzielt, wenn Zytoplasma-RNA analysiert wurde. Im Vergleich zu den gemittelten Werten der Kontrollvektorproben (pSiren, pSiren Luzi) ergab sich bei den shRNA transgenen PK15-Zelllinien eine signifikante Verminderung der messbaren PERV-Expression (Gesamt-RNA: pol1 27 %, pol2 43 %, pol1/pol2 42 %; Zytoplasma-RNA: pol1 17 %, pol2 23 %, pol1/pol2 20 %).

Durch die Experimente wurden die *in vitro* Daten von Karlas *et al.* und Dieckhoff *et al.* zur Wirksamkeit der pol2 bestätigt und durch weitere wirkungsvolle shRNA-Sequenzen sowie eine neue qRT-PCR basierte Methode zum Nachweis der Expression der shRNAs ergänzt.

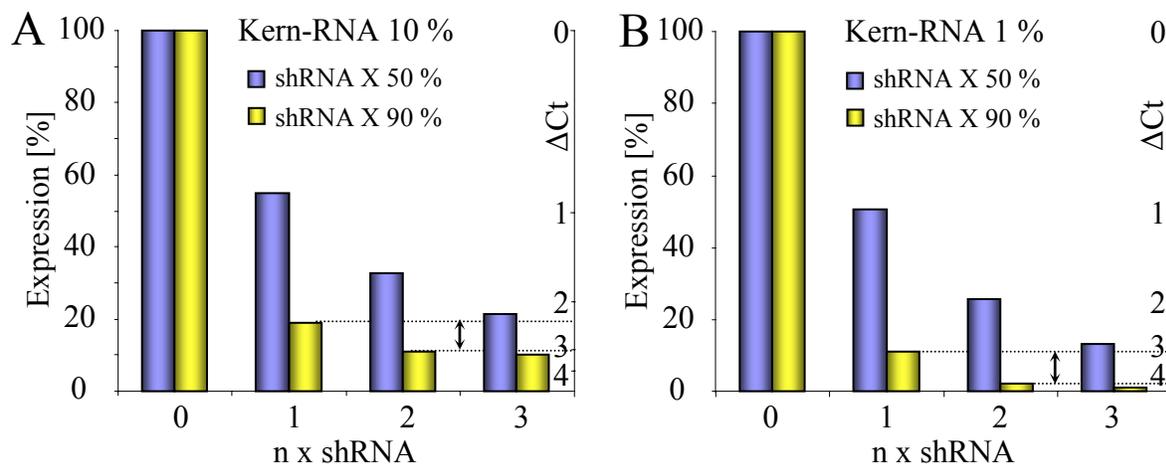


Abbildung 43: Model der qRT-PCR Messung bei Multi-shRNAs

Gezeigt wird die theoretische, additive Reduktion der PERV-Expression in Anwesenheit multipler shRNAs (0-3) mit definierten Effizienzen (50 % bzw. 90 % Degradation der PERV-RNA im Zytoplasma) und einem angenommenen Anteil von 10 % (Bild A) bzw. 1 % (Bild B) der Gesamt-PERV-RNA im Kern unter Idealbedingungen. Betrachtet wird Gesamt-RNA. Der Grenzwert der maximal messbaren Hemmung nähert sich mit steigender Anzahl an shRNAs asymptotisch dem Anteil der Kern RNA. Je effektiver die shRNA und umso höher der Anteil der PERV-RNA im Kern ist, umso schneller erfolgt die Annäherung.

5.2.3 Hemmung der PERV-Expression *in vivo*

Im Verlauf dieser Arbeiten wurden neue pol2-transgene Tiere durch somatischen Kerntransfer geklont. Als Donor-Zelllinie wurden kryokonservierte Zellen des ersten Versuchs verwendet. Die Schwangerschaft der Tiere verlief ohne Komplikationen und es wurden sechs Ferkel mit der pol2-shRNA geboren. Drei der Tiere wurden kurz nach der Geburt durch das Muttertier getötet, vermutlich auf Grund einer Puerperalpsychose, die bei Jungsauen gehäuft auftreten kann (PLONAIT and BICKHARDT 1997). Die drei überlebenden Tiere sowie die elf Kontrolltiere mit dem leeren pLVTHM Vektor entwickelten sich normal. Eines der drei transgenen Tiere wurde erneut geklont. Aus diesem Versuch resultierte ein neues transgenes Tier.

Die Anwesenheit des Transgens konnte durch Fluoreszenzmikroskopie, PCR und FACS in allen Tieren nachgewiesen werden, die GFP-Expressionen in den Tieren wurde mittels UV-Bestrahlung sichtbar. Ein neu entwickeltes qRT-PCR basiertes Nachweissystem zeigte die Expression der shRNA pol2 in Fibroblasten und PBMCs der transgenen Schweine.

Im Gegensatz zur Studie von Dieckhoff et al. von 2008 konnte in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede der PERV-Expression zwischen den pol2-positiven und den pol2-negativen Tieren nachgewiesen werden. Die pol2-transgenen Tiere von Dieckhoff et al. zeigten eine Hemmung der PERV-Expression um bis zu 94 % (Milz) beim Vergleich mit entsprechenden Organproben der Kontrolltieren (DIECKHOFF *et al.* 2008). Ein wesentlicher Unterschied zwischen dieser Studie und den neu gewonnenen Daten ist die Art der Probenwahl. Während 2008 verschiedene Organe untersucht wurden, wurden aktuell ausschließlich Zellkulturen aus Ohrbiopsien und PBMCs betrachtet. Die in den Fibroblasten und den PBMCs gemessene absolute PERV-Expression ist um durchschnittlich eine 10er Potenz höher als die in den Organproben von 2008 gemessene (DIECKHOFF *et al.* 2008). Die Expression von PERV und der pol2-shRNA in den einzelnen Organen der aktuellen Tiere sind Forschungsgegenstand der Promotionsarbeit des Dipl. Biologen M. Semaan (AG Denner; RKI).

Im Verlauf der gezeigten Versuche wurde 2009 ein Fachartikel publiziert, der sich ebenfalls mit der Wirkung von Anti-PERV-siRNAs *in vitro* und *vivo* auseinandersetzt (RAMSOONDAR *et al.* 2009). Es werden verschiedene siRNAs beschrieben, die als shRNAs unter der Kontrolle von RNA Polymerase II und III Promotoren exprimiert und *in vitro* getestet wurden. Ebenfalls wurden transgene Tiere mittels somatischen Kerntransfers generiert. Diese Tiere enthielten als Transgene sowohl eine anti-pol als auch eine anti-gag siRNA, die als miRNA ausgehend von einem pol II Promotor exprimiert und prozessiert wurden. Die Effizienz der Konstrukte konnte auch hier *in vitro* in PK15-Zellen gezeigt werden. Ebenfalls konnte eine Korrelation zwischen PERV-Knockdown und siRNA-Expressionslevel bestätigt werden, allerdings wie auch in der vorliegenden Arbeit nur *in vitro*. *In vivo*, also in den transgenen Tieren, konnten hingegen sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene (Expression unter Nachweisgrenze) und Partikelebene (Reverse Transkriptase) keine Effekte gefunden werden. Die Wirksamkeit der siRNAs wurde indirekt durch das Anlegen von Fibroblastenkulturen, deren Transfektion mit GFP-Reportergenkonstrukten und anschließender Messung der Verschiebung des Fluoreszenzmaximums im FACs nachgewiesen. Die Autoren dieser Studie vergleichen das PERV-mRNA-Expressionslevel ihrer transgenen Schweine mit dem von hochexprimierenden PK15-Zellen und schlussfolgern, dass die Expression von PERV in ihren transgenen Herden als „virtually undetectable“ anzusehen sei (RAMSOONDAR *et al.* 2009).

Die absolute PERV-Expression in PBMCs wurde im Rahmen der Studie von Ramsoondar et. mittels qRT-PCR im Größenbereich von 1×10^6 Kopien pro μg Gesamt-RNA ermittelt. Die in der vorliegenden Arbeit gemessene PERV-Expression in PBMCs beträgt im Durchschnitt $1,3 \times 10^7$ Kopien/ μg Gesamt-RNA und hat somit eine ähnliche Dimension, zumal Ramsoondar et al. eine Fluktuation der Werte um Faktor 20 (entspricht 4,3 Ct bei 100 % Effizienz) einräumen (RAMSOONDAR *et al.* 2009).

Die Schwankungen in der PERV-Expression zwischen den Individuen ist für die Bestimmung der *in vivo* Effizienz von siRNAs eines der größten Probleme. Um aussagekräftige und statistisch signifikante Daten erhalten zu können, müsste mit einer sehr großen Anzahl von transgenen Tieren gearbeitet werden. Dieckhoff et al. konnten zum Beispiel zeigen, dass die PERV-Expression selbst innerhalb eines Wurfes erheblichen Schwankungen unterliegen kann. Bei der Betrachtung der Rassen bzw. Kreuzungen Duroc/Deutsche Landrasse Schweinen, Deutsche Landrasse Schweinen und Schwäbisch-Hällischen Landschweinen ergaben sich maximale Abweichungen der PERV-Expression in PBMCS von Faktor 3,9 (74,4 %), 7,1 (85,9 %) und 13,0 (92,3 %) (DIECKHOFF *et al.* 2009). Diese Abweichungen haben dieselbe Dimension, in der auch der Effekt des RNAi vermittelten Knockdowns zu erwarten ist. Weiterhin verdeutlichen die vorliegende Arbeit und die Arbeit von Ramsoondar et al., dass selbst bei geklonten Tieren die individuellen Unterschiede zu schwerwiegend sind, um den RNAi Effekt auf Basis der Real-time PCR messen zu können (RAMSOONDAR *et al.* 2009).

Für die Schwankungen der PERV-Expression sind verschiedene Ursachen denkbar. Untersucht wurde bereits die mögliche Einwirkung von Hormonen und epigenetischen Faktoren. Innerhalb der PERV-LTRs befindet sich ein Hormon-Responsiv-Element das mit Estrogenrezeptoren interagieren kann (QUINN and LANGFORD 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die PERV-LTR sowohl methylierungssensitiv als auch sensitiv für Histonacetylierung ist (PARK *et al.* 2010).

Während die RNAi vermittelte Reduktion der PERV-Expression *in vitro* nachweisbar war, kann über die Wirkung *in vivo* anhand der gewonnenen Daten keine Aussage getroffen werden. Die pol2 ist, wie es in dieser und auch in anderen *in vitro* Studien gezeigt wurde, eine effiziente siRNA und mit der Entwicklung neuer Nachweismethoden könnte ihr Effektivität auch *in vivo* bestätigt werden.

Das wichtigste Kriterium, nämlich die Expression der shRNA, war in allen untersuchten Proben zu allen Zeitpunkten erfüllt.

5.3 Prävalenz von PERV-C in verschiedenen Rassen

5.3.1 Transgene und nicht-transgene Hausschweine

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Methoden untersucht, um das Genom transgener und nicht-transgener Schweine auf die Anwesenheit des PERV-Provirus vom Subtyp C zu untersuchen. Das methodische Spektrum umfasste verschiedene PCRs, sowie eine Real-time PCR. Mit den Methoden wurde gezeigt, dass 35 von 38 nicht-transgenen und transgenen Tieren PERV-C in ihrer Keimbahn tragen. Somit wurde eine vorangehende Studie mit 181 Tieren, von denen 92 % C-positiv waren, bestätigt (DIECKHOFF *et al.* 2009).

In einem Konsensus Artikel der International Xenotransplantation Association (IXA) von 2009 wird empfohlen, für künftige Xenotransplantationen Tiere zu verwenden, die keinen PERV-C-Provirus tragen (DENNER *et al.* 2009). Für PERV sind drei intakte, replikationskompetente Subtypen bekannt. Die PERVs vom Subtyp A und B sind polytrop und können produktiv verschiedene humane Zelllinien infizieren (LE TISSIER *et al.* 1997). Der Subtyp C ist als ecotrop beschrieben und nicht in der Lage, humane Zelllinien zu (AKIYOSHI *et al.* 1998; WILSON *et al.* 1998). Es wurde allerdings gezeigt, dass die Substitution einiger weniger Aminosäuren am C-terminalen Teil des SU Proteins zum Tropismuswechsel und zur Infizierbarkeit humaner Zellen führen kann (ARGAW *et al.* 2008). Weiterhin besteht die Möglichkeit von Rekombination mit dem Subtyp A, die zur Bildung chimärer polytroper PERV-A/C-Stämme führen kann, von denen ein besonderes Gefahrenpotential angenommen wird (DENNER 2008).

Die durchgeführten Methoden sind geeignet, zwischen PERV-C-positiven und negativen Tieren zu unterscheiden. Sie sind sensitiv, und es kann schon bei der einfachen PCR ab dem Grenzwert von $1,0 \times 10^3$ pro Reaktionsansatz (entspricht ca. 3 ng intakter genomischer DNA) PERV-C nachgewiesen werden. Eine Sensitivitätssteigerung ist durch die Anwendung der nested PCR möglich. Auf diese Weise kann eine Kopie pro Reaktionsansatz nachgewiesen werden. Mit der Real-time PCR ist ein sicherer Nachweis von PERV-C ab einem Schwellwert von 100 Kopien möglich. Besonders die Real-time PCR zeichnet sich durch einen breiten Messbereich aus. Noch

bei einer Konzentration von 0,001 ng genomischer DNA pro Reaktionsansatz kann nachgewiesen werden, ob PERV-C endogen vorliegt.

Hohe Sensitivität birgt stets das Risiko von falsch positiven Ergebnissen durch Kontamination. Ein besonders hohes Kontaminationsrisiko wurde bei der Untersuchung von Ohrbiopsien festgestellt. Eine Verschleppung von Fremd-DNA ist z.B. durch Hautkontakt zwischen den Individuen oder durch Verunreinigung der Biopsiezange möglich. Dieses Problem kann umgangen werden, indem Blut statt Ohrgewebe als DNA Quelle genutzt wird. Die Entnahme von Blut ist allerdings nicht trivial, da die dafür notwendige Ruhigstellung der Tiere mit Stress verbunden ist und die Gesundheit der Tiere gefährdet. Eine zuverlässige Methode zur Identifizierung von Kontaminationen bietet die Real-time PCR. Die Real-time PCR hat gegenüber der Standard-PCR verschiedene Vorteile. Durch das Setup als Duplex PCR mit paralleler Messung des Referenzgens Cyclophilin ist eine Aussage über die Qualität der verwendeten DNA möglich. Im Fall der einfachen PCR muss bei PERV-C-negativen Tieren stets eine zweite PCR z.B. PERV-A oder die eines anderen endogenen Ziel-Amplikons durchgeführt werden, um ein falsch negatives Ergebnis auf Grund degradierter DNA ausschließen zu können. Bei der Real-time PCR ist unter Verwendung von 100 ng genomischer DNA mit einem Cyclophilin Ct-Wert, je nach Lage des gewählten Threshold-Cycles, zwischen 22 und 24 Ct zu rechnen. Sind die Cyclophilin Ct-Wert bei einer Ausgangsmenge von 100 ng gemessener DNA (photometrisch) deutlich höher, kann von stark degradierter DNA ausgegangen werden. Die PERV-C-spezifischen Ct-Werte und die Cyclophilin spezifischen Ct-Werte befinden sich bei PERV-C-positiven Proben stets im ähnlichen Größenbereich (± 2 Ct; Abbildung 34). Auf diese Weise ist es leicht möglich, schon bei der Betrachtung der Rohdaten PERV-C-positive von PERV-C-negativen bzw. von kontaminierten Proben zu unterscheiden. Mit der Real-time PCR sind ebenfalls Messungen im Spurenbereich möglich.

Die PCR-1 ist eine geeignete Methode zur Identifizierung von PERV-C-positiven Tieren, insofern ausreichend intakte DNA von einer kontaminationssicheren Quelle zur Verfügung steht. Die Real-time PCR ist die Methode der Wahl bei kontaminationsverdächtigen Proben bzw. bei der Messung im Spurenbereich oder bei Vermessung stark degradierter DNA.

Sowohl eine hohe Sensitivität als auch eine hohe Spezifität sind wichtige Kriterien zur Detektion retroviraler Infektionen. Neuere Berichte über Kontaminationen im Rahmen des Nachweises eines neuen Gammaretrovirus (XMRV) bei Patienten mit Prostata-Karzinomen oder chronischem Erschöpfungssyndrom in einigen Labors der USA (URISMAN *et al.* 2006) sind ein Beispiel dafür und unterstreichen die Wichtigkeit eines kontaminationsfreien Labormanagements. Es ist inzwischen anerkannt, dass es sich bei XMRV um ein kontaminationsbedingtes Artefakt handelt (DENNER 2010; SILVERMAN *et al.* 2010a; YANG *et al.* 2011).

5.3.2 Keine Infektion mit PERV-A/C beim Schwein

In einem Infektionsversuch wurden zwei PERV-C-freie Schweine mit PERV-A/C belastet. Ein drittes Tier blieb als Kontrolle ohne Belastung, wurde jedoch mit den anderen beiden Tieren in einem Stall gehalten, da es von Interesse war, ob im Falle einer Infektion eine Transmission zwischen den Individuen möglich gewesen wäre. Es konnte jedoch in keinem der Tiere, auch nicht nach mehrmonatiger Beobachtung, in Blutproben sowie verschiedenen Organen Provirus nachgewiesen werden. Die Seren lieferten ebenfalls keine Indikation, da keine humorale Immunantwort auf das eingesetzte Virus im Western Blot feststellbar war.

Diese Studie ergänzt somit eine Reihe anderer Studien, in denen der *in vivo* Tropismus von PERV untersucht wurde. Zwar kann PERV *in vitro* Zelllinien verschiedener Spezies infizieren (SPECKE *et al.* 2002a; SPECKE *et al.* 2001a; SPECKE *et al.* 2001b; TAKEUCHI *et al.* 1998) doch alle *in vivo* Versuche mit immunsupprimierten Pavianen, Makaken und Rhesusaffen (SPECKE *et al.* 2009) sowie mit Nerzen (SPECKE *et al.* 2002a), Mäusen (IRGANG *et al.* 2005), Ratten (DENNER *et al.* 2008) und den hier untersuchten Schweinen zeigten keine Anzeichen einer produktiven Infektion. In Meerschweinchen konnte nach *in vivo* Belastung PERV-Provirus in geringen Mengen nachgewiesen werden, jedoch erhöhte sich die Provirusmenge nicht im Verlauf des Experiments, so dass von keiner produktiven Infektion auszugehen ist (ARGAW *et al.* 2004). Einzig in einer transgenen Mauslinie mit exprimiertem PERV-A-Rezeptor (HuPAR-2) wurde einmalig eine produktive PERV-Infektion beschrieben (MARTINA *et al.* 2006).

Bei einer Infektion mit PERV sind generell drei mögliche Szenarien denkbar, die einen Einfluss auf die diagnostische Nachweisbarkeit haben (HERRING *et al.* 2001):

1. Virämie: Das Virus repliziert aktiv und ist im Blut nachweisbar. Es besteht die Möglichkeit einer Übertragung auch auf andere Personen. RNA, DNA, RT, virale Proteine und spezifische Antikörper wären nachweisbar.
2. Latente Infektion: Die provirale DNA ist integriert, aber die Transkription ist schwach oder findet gar nicht statt. Das Potential der Virämie bleibt bestehen. Eine Reaktivierung durch Immunsuppression oder andere Stimuli ist denkbar.
3. Cleared Infection: Eine Infektion hat stattgefunden. Alle infizierten Zellen und Virionen wurden vom Immunsystem neutralisiert. Der Nachweis der Infektion könnte im Nachhinein durch spezifisch induzierte Antikörper möglich sein.

Die hier gezeigten Daten schließen eine Virämie und eine Cleared Infection aus, da weder Provirus noch Antikörper im Serum nachweisbar gewesen waren.

Das Fehlen einer produktiven Infektion kann folgendermaßen erklärt werden. Alle getesteten Tiere waren PERV-A-positiv, und es ist denkbar, dass auf Grund der Expression von PERV-A eine Rezeptorinterferenz auftrat, die eine Infektion verhinderte. Außerdem könnte PERV durch verschiedene Mechanismen der angeborenen Immunität eliminiert worden sein. Das Komplementsystem sowie verschiedene präformierte Antikörper kommen in diesem Prozess als Ursache in Frage (LACHMANN and DAVIES 1997; OCHSENBEIN and ZINKERNAGEL 2000). Zusätzlich könnten intrazelluläre Restriktionsfaktoren eine Virus-Replikation ebenfalls verhindert haben. Es ist bekannt, dass verschiedene Mitglieder der humanen und porzinen APOBEC Familie (DORRSCHUCK *et al.* 2008; JONSSON *et al.* 2007; LEE *et al.* 2011) sowie Tetherin (MATTIUZZO *et al.* 2010) die PERV-Replikation inhibieren. TRIM5 α wurde ebenfalls untersucht - und obwohl es eine anti-virale Wirkung bei einer ganzen Reihe von Viren zeigt, wirkt es nicht auf PERV (WOOD *et al.* 2009). Es ist derzeit unbekannt, ob andere Restriktionsfaktoren, z.B. TRIM28 (Transkriptionsblocker), ZAP (Zink-Finger anti-virales Protein; RNA-Degradation) oder anti-virale miRNAs, auf die PERV-Replikation einen Effekt haben (UMBACH and CULLEN 2009; WOLF and GOFF 2008).

Es ist unwahrscheinlich, dass die eingesetzte Virusdosis zu gering angesetzt war. Eine Menge von $6,4 \times 10^6$ infektiösen Partikeln pro Tier sollte für eine Infektion ausreichend sein. So ließen sich

in anderen Studien mit 2×10^4 FFU (intraperitoneal) (EVANS *et al.* 2006) Mäuse mit MuLV und mit $200 \mu\text{l}$; 5×10^4 TCID₅₀/mL (ebenfalls intraperitoneal) (TORRES *et al.* 2010) sowie 1×10^4 FFU (oronasal) (MAJOR *et al.* 2010) Katzen mit FeLV infizieren.

Die Abwesenheit von PERV-Antikörpern in den Seren kann durch die fehlende Virus-Replikation sowie durch immunologische Toleranz auf das speziesspezifische endogene Retrovirus erklärt werden.

5.3.3 Neues PERV-C in Wildschweinen

Neben 38 Hausschweinen wurden ebenfalls Proben von 125 Wildschweinen aus verschiedenen Regionen Deutschlands auf die Anwesenheit von PERV-C untersucht. Alle Tiere wurden in der PERV-C-spezifischen Real-time PCR getestet und zeigten interessanterweise das für Kontaminationen typische Muster. Dieser Befund stand im Widerspruch zu einer Studie, die zu einem früheren Zeitpunkt durchgeführt wurde, bei der 8 von 8 Wildschweinen als PERV-C-positiv beschrieben wurden. Aus diesem Grund wurde mit ausgewählten Proben die PCR1 durchgeführt, in der die Tiere ebenfalls PERV-C-positiv reagierten. Um die Diskrepanz zwischen einfacher PCR und Real-time PCR aufzuklären, wurden neue Primer entwickelt, die es erlaubten, einen Bereich von 700 bp innerhalb des relevanten env-Bereiches (im SU) zu sequenzieren. Es wurden dabei insgesamt 23 SNPs entdeckt, die wiederum 8 AS-Substitutionen repräsentieren. Einige der SNPs befinden sich in primerrelevanten Sequenzbereichen. Die Primer und Sonden der Real-time PCR wurden aus diesem Grund an die neu gefundene Sequenz angepasst und die Proben erneut vermessen. Mit dem adaptierten Oligonukleotiden konnte das neue Provirus in allen untersuchten Proben eindeutig als endogen nachgewiesen werden.

Mit der neuen Real-time PCR wurden Stichproben der PERV-C-negativ getesteten Hausschweine analysiert und es war festzustellen, dass einige der Hausschweine ebenfalls die wildschweintypische Sequenz endogen enthielten. Durch Sequenzierung konnte dieses Ergebnis bestätigt werden.

Es wurde eine neue provirale PERV-C-Sequenz gefunden, die bisher noch nicht beschrieben wurde. Über ihre Prävalenz kann zu diesem Zeitpunkt keine Aussage getroffen werden, da festgestellt wurde, dass die wildschweinspezifische Real-time PCR ebenfalls das hausschweintypische PERV-C amplifiziert. Eine selektive Messung ist somit nicht möglich. In weiterführenden Versuchen muss geklärt werden, ob es sich bei dem neuen PERV-C-Typ um ein

replikationskompetentes Provirus handelt. Im analysierten Bereich wurden keine Frameshift-Mutationen oder Stop-Codons gefunden, jedoch AS-Substitutionen mit unbekanntem Folgen für den Tropismus. Aus *in vitro* Versuchen ist bekannt, dass bereits geringe Veränderungen im C-terminalen Bereich des Env-C-SU-Proteins zu einem Tropismuswechsel führen können (ARGAW *et al.* 2008). Interessanterweise müssen sich diese Veränderungen nicht zwangsläufig in der Rezeptorbindedomäne befinden. Einen ersten Hinweis auf Replikationsfähigkeit könnte der Nachweis der Wildschweinsequenz auf RNA-Ebene liefern.

Einen weiteren interessanten Aspekt stellt die Tatsache dar, dass in keinem der 125 untersuchten Wildschweine die hausschweintypische envC Sequenz nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise beruht diese Tatsache auf der phylogenetischen Verwandtschaft zwischen Hausschweinen und Wildschweinen. Die Domestizierung des Hausschweins begann in Europa im Zuge der Neolithischen-Revolution vor ca. 11.000 Jahren (Jungsteinzeit). Die Analyse mitochondrialer DNA aus zooarchäologischen Proben zeigte, dass ursprünglich Tiere, die aus dem nahen Osten stammten, gehalten wurden und diese später vollständig durch domestizierte europäischen Wildschweinen ersetzt wurden (LARSON *et al.* 2007; LARSON *et al.* 2005). Möglicherweise fand eine Kreuzung beider Populationen statt, in deren Verlauf das hausschweintypische PERV-C akquiriert und durch Inzucht überproportional verbreitet wurde.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen der DFG geförderten Transregio-Forschergruppe Xenotransplantation (DE729) in der Projektgruppe P13 „Retrovirus induzierte Immunsuppression“ unter Leitung von Dr. Joachim Denner am Robert Koch-Institut Berlin und als externe Promotion der Freien Universität Berlin. Während meiner Promotion haben mich viele Menschen begleitet und unterstützt und ich möchte diese Zeilen nutzen, um mich bei ihnen zu bedanken.

Bei Prof. Dr. Reinhard Kurth bedanke ich mich für die Betreuung meiner Dissertation am Robert Koch-Institut.

Für die externe Betreuung der Arbeit danke ich Prof. Dr. Rupert Mutzel von der Freien Universität Berlin.

Mein besonderer Dank gilt dem PERV-Team. Das Arbeitsklima war immer sehr harmonisch und hat mich begeistert.

Herrn Dr. Denner danke ich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des interessanten Themas, den regen fachlichen Austausch, sein Vertrauen in meine Ideen, seine Unterstützung bei der Publikation der Ergebnisse sowie für die Förderung der Netzwerkbildung durch interne und externe Kongresse und Seminare.

Bei Debora Mihica bedanke ich mich für die kompetente und zuverlässige technische Unterstützung sowie für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ebenfalls danke ich meinen tapferen Diplomanden Christoph Kruse und Yassin Mahdi für ihren engagierten Einsatz.

Bei Uwe Fiebig, Kerstin Petsch, Martina Lau, Christa-Maria Schmidt, Magdalena Eschricht, Sven Stengel, Michael Mühle, Nicola Strasz und allen anderen aus Haus 3 bedanke ich mich für die Hilfsbereitschaft und die freundliche Unterstützung sowie für die zahlreichen Anregungen und die gute Arbeitsatmosphäre. Außerdem bedanke ich mich bei den Kooperationspartnern und den Mitarbeitern des RKI-Tierstalls für die erfolgreiche Zusammenarbeit.

Vielen Dank den fleißigen Korrekturlesern Debora Mihica und Eva Jobst.

Großer Dank gilt ebenfalls meinen Verwandten und den vielen Freunden, die mir die Anfertigung der Arbeit erleichtert haben. Im Besonderen danke ich Christian Hirschmann und Uschi Kaulitz für die vielseitige Unterstützung meiner jungen Familie.

Bei meiner lieben Frau Dana bedanke ich mich für unseren steten Zusammenhalt, ihre Geduld und unsere schöne gemeinsame Zeit. Danke, dass Du da bist!

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Vor- und Zuname: Herr Danny Kaulitz (geb. Jobst)

Wohnort: Berlin

Geburtsdatum und -ort: 27.05.1981, Erlabrunn

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: verheiratet, zwei Kinder (Charlotta Marie und Frieda Marie)

Schulbildung:

09/1987 - 07/1992 Polytechnische Oberschule Hans Beimler in Schwarzenberg

09/1992 - 06/1999 Gymnasium Bertolt Brecht in Schwarzenberg

Abschluss: Abitur

Wehrdienst:

11/1999 – 08/2000 Bundeswehr (Wehrpflicht)

Studium:

10/2000 – 03/2007 Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald - Studium mit den
Schwerpunktbereichen Biochemie, Genetik und Umweltanalytik

Titel der Diplomarbeit: „Analyse zur Funktion des *phlSTUVW*
Operons von *Pseudomonas Putida*“

Abschluss: Diplom-Biochemiker

Promotion:

06/2007 – 06/2010 Robert Koch-Institut - Arbeitsgruppe „Retrovirus induzierte
Immunsuppression“ als Teilprojekt der DFG geförderten
Transregio-Forschergruppe Xenotransplantation

Eidesstattliche Erklärung

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

Berlin, den 15. November 2011

Eigene Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in den nachfolgend genannten Fachartikeln publiziert:

D. Kaulitz, U. Fiebig, M. Eschricht, C. Wurzbacher, R. Kurth, J. Denner, Generation of neutralising antibodies against porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Virology* 411 (2011) 78-86.

D. Kaulitz, D. Mihica, J. Dorna, M.R. Costa, B. Petersen, H. Niemann, R.R. Tonjes, J. Denner, Development of sensitive methods for detection of porcine endogenous retrovirus-C (PERV-C) in the genome of pigs. *Journal of Virological Methods* (2011).

D. Kaulitz, D. Mihica, R. Plesker, A. Geissler, R.R. Tonjes, J. Denner, Absence of infection in pigs inoculated with high-titre recombinant PERV-A/C. *Archives of Virology* 156 (2011) 707-710.

B. Dieckhoff, B. Kessler, D. Jobst, W. Kues, B. Petersen, A. Pfeifer, R. Kurth, H. Niemann, E. Wolf, J. Denner, Distribution and expression of porcine endogenous retroviruses in multi-transgenic pigs generated for xenotransplantation. *Xenotransplantation* 16 (2009) 64-73.

Literaturverzeichnis

- ABDEL-MOTAL, U., S. WANG, S. LU, K. WIGGLESWORTH and U. GALILI, 2006 Increased immunogenicity of human immunodeficiency virus gp120 engineered to express Galalpha1-3Galbeta1-4GlcNAc-R epitopes. *Journal of virology* **80**: 6943-6951.
- ADLHOCH, C., M. KAISER, H. ELLERBROK and G. PAULI, 2010 High prevalence of porcine Hokovirus in German wild boar populations. *Virol J* **7**: 171.
- ADLHOCH, C., A. WOLF, H. MEISEL, M. KAISER, H. ELLERBROK *et al.*, 2009 High HEV presence in four different wild boar populations in East and West Germany. *Vet Microbiol* **139**: 270-278.
- AKIYOSHI, D. E., M. DENARO, H. ZHU, J. L. GREENSTEIN, P. BANERJEE *et al.*, 1998 Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine. *J Virol* **72**: 4503-4507.
- ANDRIAMAMPANDRY, C., O. TALEB, V. KEMMEL, J. P. HUMBERT, D. AUNIS *et al.*, 2007 Cloning and functional characterization of a gamma-hydroxybutyrate receptor identified in the human brain. *FASEB J* **21**: 885-895.
- ARGAW, T., W. COLON-MORAN and C. A. WILSON, 2004 Limited infection without evidence of replication by porcine endogenous retrovirus in guinea pigs. *The Journal of general virology* **85**: 15-19.
- ARGAW, T., M. FIGUEROA, D. R. SALOMON and C. A. WILSON, 2008 Identification of residues outside of the receptor binding domain that influence the infectivity and tropism of porcine endogenous retrovirus. *J Virol* **82**: 7483-7491.
- ARMSTRONG, J. A., J. S. PORTERFIELD and A. T. DE MADRID, 1971 C-type virus particles in pig kidney cell lines. *J Gen Virol* **10**: 195-198.
- ARNAUD, F., M. VARELA, T. E. SPENCER and M. PALMARINI, 2008 Coevolution of endogenous betaretroviruses of sheep and their host. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **65**: 3422-3432.
- ASANO, M., S. R. GUNDRY, H. IZUTANI, S. N. CANNARELLA, O. FAGOAGA *et al.*, 2003 Baboons undergoing orthotopic concordant cardiac xenotransplantation surviving more than 300 days: effect of immunosuppressive regimen. *J Thorac Cardiovasc Surg* **125**: 60-69; discussion 69-70.
- BALDAN, N., P. RIGOTTI, F. CALABRESE, R. CADROBBI, A. DEDJA *et al.*, 2004 Ureteral stenosis in HDAF pig-to-primate renal xenotransplantation: a phenomenon related to immunological events? *Am J Transplant* **4**: 475-481.
- BARTOSCH, B., D. STEFANIDIS, R. MYERS, R. WEISS, C. PATIENCE *et al.*, 2004 Evidence and consequence of porcine endogenous retrovirus recombination. *J Virol* **78**: 13880-13890.
- BARTOSCH, B., R. A. WEISS and Y. TAKEUCHI, 2002 PCR-based cloning and immunocytological titration of infectious porcine endogenous retrovirus subgroup A and B. *J Gen Virol* **83**: 2231-2240.
- BAUER, A., J. POSTRACH, M. THORMANN, S. BLANCK, C. FABER *et al.*, 2010 First experience with heterotopic thoracic pig-to-baboon cardiac xenotransplantation. *Xenotransplantation* **17**: 243-249.
- BAUERNVERBAND, D., 2010 Situationsbericht 2010 Trends und Fakten zur Landwirtschaft.

-
- BEHRENDT, R., 2009 Immunogene und immunsuppressive Eigenschaften des transmembranen Hüllproteins gp41 von HIV. Dissertation (Robert Koch-Institut), Humboldt-Universität, Berlin.
- BEHRENDT, R., U. FIEBIG, S. NORLEY, L. GURTLER, R. KURTH *et al.*, 2009 A neutralization assay for HIV-2 based on measurement of provirus integration by duplex real-time PCR. *J Virol Methods* **159**: 40-46.
- BENIT, L., J. B. LALLEMAND, J. F. CASELLA, H. PHILIPPE and T. HEIDMANN, 1999 ERV-L elements: a family of endogenous retrovirus-like elements active throughout the evolution of mammals. *J Virol* **73**: 3301-3308.
- BERG, J. M., J. L. TYMOCZKO and L. STRYER, 2010 *Biochemie*. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg.
- BHATTI, F. N., M. SCHMOECKEL, A. ZAIDI, E. COZZI, G. CHAVEZ *et al.*, 1999 Three-month survival of HDAAFF transgenic pig hearts transplanted into primates. *Transplant Proc* **31**: 958.
- BIRKS, E. J., M. H. YACCOUB, N. R. BANNER and A. KHAGHANI, 2004 The role of bridge to transplantation: should LVAD patients be transplanted? *Curr Opin Cardiol* **19**: 148-153.
- BÖCKER, W., P. U. HEITZ, A. AGUZZI and M. BÖCKER DENK HEITZ, 2008 *Pathologie : mit über 200 Tabellen*. Elsevier, Urban & Fischer, München [u.a.].
- BOILSON, B. A., E. RAICHLIN, S. J. PARK and S. S. KUSHWAHA, 2010 Device therapy and cardiac transplantation for end-stage heart failure. *Curr Probl Cardiol* **35**: 8-64.
- BREESE, S. S., JR., 1970 Virus-like particles occurring in cultures of stable pig kidney cell lines. Brief report. *Arch Gesamte Virusforsch* **30**: 401-404.
- BREM, G., B. BRENIG, H. M. GOODMAN, R. C. SELDEN, F. GRAF *et al.*, 1985 Production of Transgenic Mice, Rabbits and Pigs by Microinjection into Pronuclei. *Zuchthygiene-Reproduction in Domestic Animals* **20**: 251-252.
- BRIGNIER, A. C., and A. M. GEWIRTZ, 2010 Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol* **125**: S336-344.
- BUSCHER, K., U. TREFZER, M. HOFMANN, W. STERRY, R. KURTH *et al.*, 2005 Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. *Cancer Res* **65**: 4172-4180.
- CALNE, R. Y., 1970 Organ transplantation between widely disparate species. *Transplant Proc* **2**: 550-556.
- CANDINAS, D., S. BELLIVEAU, N. KOYAMADA, T. MIYATAKE, P. HECHENLEITNER *et al.*, 1996 T cell independence of macrophage and natural killer cell infiltration, cytokine production, and endothelial activation during delayed xenograft rejection. *Transplantation* **62**: 1920-1927.
- CAVALIERE, F. M., G. L. SCOARUGHI and C. CIMMINO, 2009 Interspecific transfer of mammalian artificial chromosomes between farm animals. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* **17**: 507-517.
- CHEN, G., H. QIAN, T. STARZL, H. SUN, B. GARCIA *et al.*, 2005 Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys. *Nat Med* **11**: 1295-1298.
-

-
- CHEN, G., H. SUN, H. YANG, D. KUBELIK, B. GARCIA *et al.*, 2006 The role of anti-non-Gal antibodies in the development of acute humoral xenograft rejection of hDAF transgenic porcine kidneys in baboons receiving anti-Gal antibody neutralization therapy. *Transplantation* **81**: 273-283.
- CHIANG, C. Y., Y. R. PAN, L. F. CHOU, C. Y. FANG, S. R. WANG *et al.*, 2007 Functional epitopes on porcine endogenous retrovirus envelope protein interacting with neutralizing antibody combining sites. *Virology* **361**: 364-371.
- COHEN, J., 2011 *Virology*. The waning conflict over XMRV and chronic fatigue syndrome. *Science* **333**: 1810.
- COOPER, D. K., 1998 Xenoantigens and xenoantibodies. *Xenotransplantation* **5**: 6-17.
- COOPER, D. K., A. M. KEOGH, J. BRINK, P. A. CORRIS, W. KLEPETKO *et al.*, 2000 Report of the Xenotransplantation Advisory Committee of the International Society for Heart and Lung Transplantation: the present status of xenotransplantation and its potential role in the treatment of end-stage cardiac and pulmonary diseases. *J Heart Lung Transplant* **19**: 1125-1165.
- COSTA, C., L. ZHAO, W. V. BURTON, K. R. BONDIOLI, B. L. WILLIAMS *et al.*, 1999 Expression of the human alpha 1,2-fucosyltransferase in transgenic pigs modifies the cell surface carbohydrate phenotype and confers resistance to human serum-mediated cytolysis. *Faseb Journal* **13**: 1762-1773.
- COZZI, E., and E. ANCONA, 2003 Xenotransplantation, where do we stand? *J Nephrol* **16 Suppl 7**: S16-21.
- D'APICE, A. J., and P. J. COWAN, 2009 Xenotransplantation: the next generation of engineered animals. *Transpl Immunol* **21**: 111-115.
- DDS, 2008 Deutsche Diabetes-Stiftung Jahresbericht 2008
- DELGADO, R. M., 3RD, M. NAWAR, C. LOGHIN, T. J. MYERS, I. D. GREGORIC *et al.*, 2006 Catheterization of the AbioCor implantable replacement heart: evaluation of the unique physiology created by the device. *Tex Heart Inst J* **33**: 359-360.
- DELL-OLIO, D., and D. A. KELLY, 2010 Immunosuppressants: what's new? Current opinion in organ transplantation **15**: 594-600.
- DENNER, J., 1998 Immunosuppression by retroviruses: implications for xenotransplantation. *Ann N Y Acad Sci* **862**: 75-86.
- DENNER, J., 2007 Transspecies transmissions of retroviruses: new cases. *Virology* **369**: 229-233.
- DENNER, J., 2008 Recombinant porcine endogenous retroviruses (PERV-A/C): a new risk for xenotransplantation? *Arch Virol* **153**: 1421-1426.
- DENNER, J., 2010 Detection of a gammaretrovirus, XMRV, in the human population: open questions and implications for xenotransplantation. *Retrovirology* **7**: 16.
- DENNER, J., 2011a Infectious risk in xenotransplantation - what post-transplant screening for the human recipient? *Xenotransplantation* **18**: 151-157.
- DENNER, J., 2011b Towards an AIDS vaccine: the transmembrane envelope protein as target for broadly neutralizing antibodies. *Human vaccines* **7 Suppl**: 4-9.
- DENNER, J., S. NORLEY and R. KURTH, 1994 The immunosuppressive peptide of HIV-1: functional domains and immune response in AIDS patients. *AIDS* **8**: 1063-1072.
-

-
- DENNER, J., C. PERSIN, T. VOGEL, D. HAUSTEIN, S. NORLEY *et al.*, 1996 The immunosuppressive peptide of HIV-1 inhibits T and B lymphocyte stimulation. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **12**: 442-450.
- DENNER, J., H. J. SCHUURMAN and C. PATIENCE, 2009 The International Xenotransplantation Association consensus statement on conditions for undertaking clinical trials of porcine islet products in type 1 diabetes--chapter 5: Strategies to prevent transmission of porcine endogenous retroviruses. *Xenotransplantation* **16**: 239-248.
- DENNER, J., V. SPECKE, A. KARLAS, I. CHODNEVSKAJA, T. MEYER *et al.*, 2008 No transmission of porcine endogenous retroviruses (PERVs) in a long-term pig to rat xenotransplantation model and no infection of immunosuppressed rats. *Annals of transplantation : quarterly of the Polish Transplantation Society* **13**: 20-31.
- DENNER, J., V. SPECKE, J. SCHWENDEMANN and S. J. TACKE, 2001 Porcine endogenous retroviruses (PERVs): adaptation to human cells and attempts to infect small animals and non-human primates. *Ann Transplant* **6**: 25-33.
- DENNER, J., V. SPECKE, U. THIESEN, A. KARLAS and R. KURTH, 2003 Genetic alterations of the long terminal repeat of an ecotropic porcine endogenous retrovirus during passage in human cells. *Virology* **314**: 125-133.
- DIECKHOFF, B., 2007 Xenotransplantation und porcine endogene Retroviren (PERV): Evaluierung des Risikos und Prävention der Virusübertragung. Dissertation (Robert Koch-Institut), Freie Universität Berlin, Berlin.
- DIECKHOFF, B., A. KARLAS, A. HOFMANN, W. A. KUES, B. PETERSEN *et al.*, 2007a Inhibition of porcine endogenous retroviruses (PERVs) in primary porcine cells by RNA interference using lentiviral vectors. *Arch Virol* **152**: 629-634.
- DIECKHOFF, B., B. KESSLER, D. JOBST, W. KUES, B. PETERSEN *et al.*, 2009 Distribution and expression of porcine endogenous retroviruses in multi-transgenic pigs generated for xenotransplantation. *Xenotransplantation* **16**: 64-73.
- DIECKHOFF, B., B. PETERSEN, W. A. KUES, R. KURTH, H. NIEMANN *et al.*, 2008 Knockdown of porcine endogenous retrovirus (PERV) expression by PERV-specific shRNA in transgenic pigs. *Xenotransplantation* **15**: 36-45.
- DIECKHOFF, B., J. PUHLMANN, K. BUSCHER, A. HAFNER-MARX, N. HERBACH *et al.*, 2007b Expression of porcine endogenous retroviruses (PERVs) in melanomas of Munich miniature swine (MMS) *Troll. Vet Microbiol* **123**: 53-68.
- DISWALL, M., J. ANGSTROM, H. KARLSSON, C. J. PHELPS, D. AYARES *et al.*, 2010 Structural characterization of alpha1,3-galactosyltransferase knockout pig heart and kidney glycolipids and their reactivity with human and baboon antibodies. *Xenotransplantation* **17**: 48-60.
- DORRSCHUCK, E., C. MUNK and R. R. TONJES, 2008 APOBEC3 proteins and porcine endogenous retroviruses. *Transplant Proc* **40**: 959-961.
- DOWLING, R. D., L. A. GRAY, JR., S. W. ETOCH, H. LAKS, D. MARELLI *et al.*, 2004 Initial experience with the AbioCor implantable replacement heart system. *J Thorac Cardiovasc Surg* **127**: 131-141.
- DSO, 2010 Deutsche Stiftung Organtransplantation.
-

-
- DUMON-SEIGNOVERT, L., G. CARIOT and L. VUILLARD, 2004 The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein expression and purification* **37**: 203-206.
- DUVIGNEAU, J. C., R. T. HARTL, S. GROISS and M. GEMEINER, 2005 Quantitative simultaneous multiplex real-time PCR for the detection of porcine cytokines. *J Immunol Methods* **306**: 16-27.
- DWYER, K. M., T. B. MYSORE, S. CRISIS, S. C. ROBSON, H. NANDURKAR *et al.*, 2006 The transgenic expression of human CD39 on murine islets inhibits clotting of human blood. *Transplantation* **82**: 428-432.
- EKSER, B., and D. K. COOPER, 2008 Update: cardiac xenotransplantation. *Current opinion in organ transplantation* **13**: 531-535.
- ELLIOTT, R. B., L. ESCOBAR, O. GARKAVENKO, M. C. CROXSON, B. A. SCHROEDER *et al.*, 2000 No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of encapsulated porcine islet xenografts. *Cell Transplant* **9**: 895-901.
- ENDRES, M., K. NEUMANN, S. E. SCHRODER, S. VETTERLEIN, L. MORAWIETZ *et al.*, 2007 Human polymer-based cartilage grafts for the regeneration of articular cartilage defects. *Tissue Cell* **39**: 293-301.
- ERICSSON, T., B. OLDMIXON, J. BLOMBERG, M. ROSA, C. PATIENCE *et al.*, 2001 Identification of novel porcine endogenous betaretrovirus sequences in miniature swine. *J Virol* **75**: 2765-2770.
- ERICSSON, T. A., Y. TAKEUCHI, C. TEMPLIN, G. QUINN, S. F. FARHADIAN *et al.*, 2003 Identification of receptors for pig endogenous retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 6759-6764.
- EUROTRANSPLANT, Annual Report 2008, edited by A. R. ARIE OOSTERLEE.
- EVANS, L. H., M. LAVIGNON, K. PETERSON, K. HASENKRUG, S. ROBERTSON *et al.*, 2006 In vivo interactions of ecotropic and polytropic murine leukemia viruses in mixed retrovirus infections. *J Virol* **80**: 4748-4757.
- FIEBIG, U., 2007 Induktion neutralisierender Antikörper gegen transmembrane Hüllproteine von Retroviren. Dissertation (Robert Koch-Institut), Humboldt-Universität Berlin.
- FIEBIG, U., M. G. HARTMANN, N. BANNERT, R. KURTH and J. DENNER, 2006 Transspecies transmission of the endogenous koala retrovirus. *J Virol* **80**: 5651-5654.
- FIEBIG, U., M. SCHMOLKE, M. ESCHRICHT, R. KURTH and J. DENNER, 2009 Mode of interaction between the HIV-1-neutralizing monoclonal antibody 2F5 and its epitope. *AIDS* **23**: 887-895.
- FIEBIG, U., O. STEPHAN, R. KURTH and J. DENNER, 2003 Neutralizing antibodies against conserved domains of p15E of porcine endogenous retroviruses: basis for a vaccine for xenotransplantation? *Virology* **307**: 406-413.
- FINK, J. S., J. M. SCHUMACHER, S. L. ELLIAS, E. P. PALMER, M. SAINT-HILAIRE *et al.*, 2000 Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell Transplant* **9**: 273-278.
- FIRE, A., S. XU, M. K. MONTGOMERY, S. A. KOSTAS, S. E. DRIVER *et al.*, 1998 Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.
-

-
- FISCHEL, R. J., J. L. PLATT, A. J. MATAS, E. PERRY, A. P. DALMASSO *et al.*, 1991 Prolonged survival of a discordant cardiac xenograft in a rhesus monkey. *Transplant Proc* **23**: 589-590.
- FISHMAN, J. A., and C. PATIENCE, 2004 Xenotransplantation: infectious risk revisited. *Am J Transplant* **4**: 1383-1390.
- GALILI, U., R. E. MANDRELL, R. M. HAMADEH, S. B. SHOHET and J. M. GRIFFISS, 1988 Interaction between human natural anti-alpha-galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora. *Infect Immun* **56**: 1730-1737.
- GALILI, U., E. A. RACHMILEWITZ, A. PELEG and I. FLECHNER, 1984 A unique natural human IgG antibody with anti-alpha-galactosyl specificity. *J Exp Med* **160**: 1519-1531.
- GALILI, U., and K. SWANSON, 1991 Gene sequences suggest inactivation of alpha-1,3-galactosyltransferase in catarrhines after the divergence of apes from monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7401-7404.
- GARKAVENKO, O., M. C. CROSSON, M. IRGANG, A. KARLAS, J. DENNER *et al.*, 2004 Monitoring for presence of potentially xenotic viruses in recipients of pig islet xenotransplantation. *J Clin Microbiol* **42**: 5353-5356.
- GARKAVENKO, O., S. WYNYARD, D. NATHU, D. SIMOND, M. MUZINA *et al.*, 2008 Porcine endogenous retrovirus (PERV) and its transmission characteristics: a study of the New Zealand designated pathogen-free herd. *Cell Transplant* **17**: 1381-1388.
- HAMMER, R. E., V. G. PURSEL, C. E. REXROAD, JR., R. J. WALL, D. J. BOLT *et al.*, 1985 Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* **315**: 680-683.
- HANNON, J. P., C. A. BOSSONE and C. E. WADE, 1990 Normal physiological values for conscious pigs used in biomedical research. *Laboratory animal science* **40**: 293-298.
- HARA, H., and D. K. COOPER, 2010 The immunology of corneal xenotransplantation: a review of the literature. *Xenotransplantation* **17**: 338-349.
- HAYASHI, S., S. OGAWA, Y. TAKASHIMA and H. OTSUKA, 2004 The neutralization of pseudorabies virus by anti-alpha-galactosyl natural antibody in normal serum. *Virus research* **99**: 1-7.
- HEALTH, U. S. N. I. O., 2011 Open-label Investigation of the Safety and Effectiveness of DIABECCELL(R) in Patients With Type I Diabetes Mellitus.
- HERING, B. J., D. K. COOPER, E. COZZI, H. J. SCHURMAN, G. S. KORBUTT *et al.*, 2009 The International Xenotransplantation Association consensus statement on conditions for undertaking clinical trials of porcine islet products in type 1 diabetes-- executive summary. *Xenotransplantation* **16**: 196-202.
- HERRING, C., D. A. CUNNINGHAM, A. J. WHITTAM, X. M. FERNANDEZ-SUAREZ and G. A. LANGFORD, 2001 Monitoring xenotransplant recipients for infection by PERV. *Clin Biochem* **34**: 23-27.
- HOFMANN-LEHMANN, R., E. HOLZNAGEL, A. AUBERT, P. OSSENT, M. REINACHER *et al.*, 1995 Recombinant FeLV vaccine: long-term protection and effect on course and outcome of FIV infection. *Vet Immunol Immunopathol* **46**: 127-137.
- HOHN, O., H. KRAUSE, P. BARBAROTTO, L. NIEDERSTADT, N. BEIMFORDE *et al.*, 2009 Lack of evidence for xenotropic murine leukemia virus-related virus(XMRV) in German prostate cancer patients. *Retrovirology* **6**: 92.
-

-
- HUANG, S. H., C. H. CHU, J. C. YU, W. C. CHUANG, G. J. LIN *et al.*, 2010 Transgenic expression of haem oxygenase-1 in pancreatic beta cells protects non-obese mice used as a model of diabetes from autoimmune destruction and prolongs graft survival following islet transplantation. *Diabetologia* **53**: 2389-2400.
- HUMPHRAY, S. J., C. E. SCOTT, R. CLARK, B. MARRON, C. BENDER *et al.*, 2007 A high utility integrated map of the pig genome. *Genome Biol* **8**: R139.
- IRGANG, M., A. KARLAS, C. LAUE, V. SPECKE, S. J. TACKE *et al.*, 2005 Porcine endogenous retroviruses PERV-A and PERV-B infect neither mouse cells in vitro nor SCID mice in vivo. *Intervirology* **48**: 167-173.
- IRGANG, M., I. M. SAUER, A. KARLAS, K. ZEILINGER, J. C. GERLACH *et al.*, 2003 Porcine endogenous retroviruses: no infection in patients treated with a bioreactor based on porcine liver cells. *J Clin Virol* **28**: 141-154.
- JONSSON, S. R., R. S. LARUE, M. D. STENGLEIN, S. C. FAHRENKRUG, V. ANDRESDOTTIR *et al.*, 2007 The restriction of zoonotic PERV transmission by human APOBEC3G. *PLoS ONE* **2**: e893.
- KARLAS, A., M. IRGANG, J. VOTTELER, V. SPECKE, M. OZEL *et al.*, 2010 Characterisation of a human cell-adapted porcine endogenous retrovirus PERV-A/C. *Ann Transplant* **15**: 45-54.
- KARLAS, A., R. KURTH and J. DENNER, 2004 Inhibition of porcine endogenous retroviruses by RNA interference: increasing the safety of xenotransplantation. *Virology* **325**: 18-23.
- KATZOURAKIS, A., A. RAMBAUT and O. G. PYBUS, 2005 The evolutionary dynamics of endogenous retroviruses. *Trends in microbiology* **13**: 463-468.
- KAULITZ, D., U. FIEBIG, M. ESCHRIGHT, C. WURZBACHER, R. KURTH *et al.*, 2011a Generation of neutralising antibodies against porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Virology* **411**: 78-86.
- KAULITZ, D., D. MIHICA, R. PLESKER, A. GEISLER, R. R. TONJES *et al.*, 2011b Absence of infection in pigs inoculated with high-titre recombinant PERV-A/C. *Archives of virology* **156**: 707-710.
- KENYON, J. C., and A. M. LEVER, 2011 XMRV, prostate cancer and chronic fatigue syndrome. *British medical bulletin* **98**: 61-74.
- KIM, N. Y., W. W. JUNG, Y. K. OH, T. CHUN, H. Y. PARK *et al.*, 2007 Natural protection from zoonosis by alpha-gal epitopes on virus particles in xenotransmission. *Xenotransplantation* **14**: 104-111.
- KLOSE, R., E. KEMTER, T. BEDKE, I. BITTMANN, B. KELSSER *et al.*, 2005 Expression of biologically active human TRAIL in transgenic pigs. *Transplantation* **80**: 222-230.
- KLYMIUK, N., B. AIGNER, G. BREM and E. WOLF, 2010 Genetic modification of pigs as organ donors for xenotransplantation. *Mol Reprod Dev* **77**: 209-221.
- KLYMIUK, N., M. MULLER, G. BREM and B. AIGNER, 2002 Characterization of porcine endogenous retrovirus gamma pro-pol nucleotide sequences. *J Virol* **76**: 11738-11743.
- KLYMIUK, N., E. WOLF and B. AIGNER, 2008 Concise classification of the genomic porcine endogenous retroviral gamma1 load to defined lineages. *Virology* **371**: 175-184.
- KRACH, U., N. FISCHER, F. CZAUDERNA and R. R. TONJES, 2001 Comparison of replication-competent molecular clones of porcine endogenous retrovirus class A and class B derived from pig and human cells. *J Virol* **75**: 5465-5472.
-

-
- KREK, A., D. GRUN, M. N. POY, R. WOLF, L. ROSENBERG *et al.*, 2005 Combinatorial microRNA target predictions. *Nature genetics* **37**: 495-500.
- KROSHUS, T. J., S. A. ROLLINS, A. P. DALMASSO, E. A. ELLIOTT, L. A. MATIS *et al.*, 1995 Complement inhibition with an anti-C5 monoclonal antibody prevents acute cardiac tissue injury in an ex vivo model of pig-to-human xenotransplantation. *Transplantation* **60**: 1194-1202.
- KRUSE, C., 2009 Hemmung der Expression von porcinen endogenen Retroviren (PERVs) mittels RNA-Interferenz. Diplomarbeit (Robert Koch-Institut), Universität Potsdam.
- KUROYANAGI, Y., M. KENMOCHI, S. ISHIHARA, A. TAKEDA, A. SHIRAISHI *et al.*, 1993 A cultured skin substitute composed of fibroblasts and keratinocytes with a collagen matrix: preliminary results of clinical trials. *Ann Plast Surg* **31**: 340-349; discussion 349-351.
- KUWAKI, K., C. KNOSALLA, F. J. DOR, B. GOLLACKNER, Y. L. TSENG *et al.*, 2004 Suppression of natural and elicited antibodies in pig-to-baboon heart transplantation using a human anti-human CD154 mAb-based regimen. *Am J Transplant* **4**: 363-372.
- KUWAKI, K., Y. L. TSENG, F. J. DOR, A. SHIMIZU, S. L. HOUSER *et al.*, 2005 Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat Med* **11**: 29-31.
- LACHMANN, P. J., and A. DAVIES, 1997 Complement and immunity to viruses. *Immunological reviews* **159**: 69-77.
- LAM, T. T., B. HAUSEN, L. HOOK, M. LAU, J. HIGGINS *et al.*, 2005 The effect of soluble complement receptor type 1 on acute humoral xenograft rejection in hDAF-transgenic pig-to-primate life-supporting kidney xenografts. *Xenotransplantation* **12**: 20-29.
- LANGHAMMER, S., U. FIEBIG, R. KURTH and J. DENNER, 2005 Neutralising antibodies against the transmembrane protein of feline leukaemia virus (FeLV). *Vaccine* **23**: 3341-3348.
- LANGHAMMER, S., U. FIEBIG, R. KURTH and J. DENNER, 2011a Increased neutralizing antibody response after simultaneous immunization with leucogen and the feline leukemia virus transmembrane protein. *Intervirology* **54**: 78-86.
- LANGHAMMER, S., J. HUBNER, O. JARRETT, R. KURTH and J. DENNER, 2011b Immunization with the transmembrane protein of a retrovirus, feline leukemia virus: absence of antigenemia following challenge. *Antiviral research* **89**: 119-123.
- LANGHAMMER, S., J. HUBNER, R. KURTH and J. DENNER, 2006 Antibodies neutralizing feline leukaemia virus (FeLV) in cats immunized with the transmembrane envelope protein p15E. *Immunology* **117**: 229-237.
- LARSON, G., U. ALBARELLA, K. DOBNEY, P. ROWLEY-CONWY, J. SCHIBLER *et al.*, 2007 Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 15276-15281.
- LARSON, G., K. DOBNEY, U. ALBARELLA, M. FANG, E. MATISOO-SMITH *et al.*, 2005 Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science* **307**: 1618-1621.
- LAVILLETTE, D., and D. KABAT, 2004 Porcine endogenous retroviruses infect cells lacking cognate receptors by an alternative pathway: implications for retrovirus evolution and xenotransplantation. *J Virol* **78**: 8868-8877.
- LE BAS-BERNADET, S., I. ANEGON and G. BLANCHO, 2008 Progress and prospects: genetic engineering in xenotransplantation. *Gene therapy* **15**: 1247-1256.
-

-
- LE TISSIER, P., J. P. STOYE, Y. TAKEUCHI, C. PATIENCE and R. A. WEISS, 1997 Two sets of human-tropic pig retrovirus. *Nature* **389**: 681-682.
- LEE, J., J. Y. CHOI, H. J. LEE, K. C. KIM, B. S. CHOI *et al.*, 2011 Repression of porcine endogenous retrovirus infection by human APOBEC3 proteins. *Biochemical and biophysical research communications* **407**: 266-270.
- LEE, S. Y., T. M. HOWARD and S. RASHEED, 1998 Genetic analysis of the rat leukemia virus: influence of viral sequences in transduction of the c-ras proto-oncogene and expression of its transforming activity. *Journal of virology* **72**: 9906-9917.
- LEVY, M. F., J. CRIPPIN, S. SUTTON, G. NETTO, J. MCCORMACK *et al.*, 2000 Liver allotransplantation after extracorporeal hepatic support with transgenic (hCD55/hCD59) porcine livers: clinical results and lack of pig-to-human transmission of the porcine endogenous retrovirus. *Transplantation* **69**: 272-280.
- LEWIS, B. P., C. B. BURGE and D. P. BARTEL, 2005 Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**: 15-20.
- LIVAK, K. J., and T. D. SCHMITTGEN, 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.
- LOVELAND, B. E., J. MILLAND, P. KYRIAKOU, B. R. THORLEY, D. CHRISTIANSEN *et al.*, 2004 Characterization of a CD46 transgenic pig and protection of transgenic kidneys against hyperacute rejection in non-immunosuppressed baboons. *Xenotransplantation* **11**: 171-183.
- LUKES, D. J., A. LUNDGREN, U. SKOGSBERG, A. KARLSSON-PARRA, B. SOUSSI *et al.*, 2005 Ischemic preconditioning can overcome the effect of moderate to severe cold ischemia on concordant mouse xeno-heart transplants. *Transplant Proc* **37**: 3332-3334.
- MAHDI, Y., 2009 Antiretrovirale Impfstoffe: Immunisierung mittels Hüllproteinen von γ -Retroviren. Diplomarbeit (Robert Koch-Institut), Freie Universität Berlin.
- MAJOR, A., V. CATTORI, E. BOENZLI, B. RIOND, P. OSSENT *et al.*, 2010 Exposure of cats to low doses of FeLV: seroconversion as the sole parameter of infection. *Veterinary research* **41**: 17.
- MAKALOWSKI, W., 2001 The human genome structure and organization. *Acta Biochim Pol* **48**: 587-598.
- MAKOWKA, L., G. D. WU, A. HOFFMAN, L. PODESTA, L. SHER *et al.*, 1994 Immunohistopathologic lesions associated with the rejection of a pig-to-human liver xenograft. *Transplant Proc* **26**: 1074-1075.
- MANG, R., J. MAAS, X. CHEN, J. GOUDSMIT and A. C. VAN DER KUYL, 2001 Identification of a novel type C porcine endogenous retrovirus: evidence that copy number of endogenous retroviruses increases during host inbreeding. *J Gen Virol* **82**: 1829-1834.
- MARCUCCI, K. T., T. ARGAW, C. A. WILSON and D. R. SALOMON, 2009 Identification of two distinct structural regions in a human porcine endogenous retrovirus receptor, HuPAR2, contributing to function for viral entry. *Retrovirology* **6**: 3.
- MARTIN, C., M. PLAT, V. NERRIERE-DAGUIN, F. COULON, S. UZBEKOVA *et al.*, 2005 Transgenic expression of CTLA4-Ig by fetal pig neurons for xenotransplantation. *Transgenic Res* **14**: 373-384.
-

-
- MARTIN, U., S. J. TACKE, A. R. SIMON, C. SCHRODER, K. WIEBE *et al.*, 2002 Absence of PERV specific humoral immune response in baboons after transplantation of porcine cells or organs. *Transpl Int* **15**: 361-368.
- MARTINA, Y., K. T. MARCUCCI, S. CHERQUI, A. SZABO, T. DRYSDALE *et al.*, 2006 Mice transgenic for a human porcine endogenous retrovirus receptor are susceptible to productive viral infection. *Journal of virology* **80**: 3135-3146.
- MATTIUZZO, G., S. IVOL and Y. TAKEUCHI, 2010 Regulation of porcine endogenous retrovirus release by porcine and human tetherins. *J Virol* **84**: 2618-2622.
- MCCURRY, K. R., D. L. KOOYMAN, C. G. ALVARADO, A. H. COTTERELL, M. J. MARTIN *et al.*, 1995 Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury. *Nat Med* **1**: 423-427.
- MCGAUGHEY, G. B., G. BARBATO, E. BIANCHI, R. M. FREIDINGER, V. M. GARSKY *et al.*, 2004 Progress towards the development of a HIV-1 gp41-directed vaccine. *Current HIV research* **2**: 193-204.
- MCGREGOR, C. G., S. S. TEOTIA, G. W. BYRNE, M. G. MICHAELS, J. M. RISDAHL *et al.*, 2004 Cardiac xenotransplantation: progress toward the clinic. *Transplantation* **78**: 1569-1575.
- MCKANE, B. W., S. RAMACHANDRAN, X. C. XU, B. J. OLACK, W. C. CHAPMAN *et al.*, 2004 Natural antibodies prevent in vivo transmission of porcine islet-derived endogenous retrovirus to human cells. *Cell transplantation* **13**: 137-143.
- MCKANE, B. W., S. RAMACHANDRAN, J. YANG, X. C. XU and T. MOHANAKUMAR, 2003 Xenoreactive anti-Gal α (1,3)Gal antibodies prevent porcine endogenous retrovirus infection of human in vivo. *Human immunology* **64**: 708-717.
- MILLARD, A. L., and N. J. MUELLER, 2010 Can human viruses infect porcine xenografts? *Xenotransplantation* **17**: 6-10.
- MIN, J. Y., M. F. SULLIVAN, Y. YANG, J. P. ZHANG, K. L. CONVERSO *et al.*, 2002 Significant improvement of heart function by cotransplantation of human mesenchymal stem cells and fetal cardiomyocytes in postinfarcted pigs. *Ann Thorac Surg* **74**: 1568-1575.
- MIYAGAWA, S., H. MURAKAMI, Y. TAKAHAGI, R. NAKAI, M. YAMADA *et al.*, 2001 Remodeling of the major pig xenoantigen by N-acetylglucosaminyltransferase III in transgenic pig. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 39310-39319.
- MIYAGAWA, S., A. YAMAMOTO, K. MATSUNAMI, D. WANG, Y. TAKAMA *et al.*, 2010 Complement regulation in the GalT KO era. *Xenotransplantation* **17**: 11-25.
- MOALIC, Y., H. FELIX, Y. TAKEUCHI, A. JESTIN and Y. BLANCHARD, 2009 Genome areas with high gene density and CpG island neighborhood strongly attract porcine endogenous retrovirus for integration and favor the formation of hot spots. *J Virol* **83**: 1920-1929.
- MODROW, S., D. FALKE, U. TRUYEN and H. SCHÄTZL, 2010 *Molekulare Virologie*, S. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- MÖLLER, A., 2007 Entwicklung eines Kleintiermodells zur Evaluierung von Impfstoffen gegen Retroviren. Diplomarbeit (Robert Koch-Institut), Humboldt-Universität, Berlin.
- MUELLER, N. J., and J. A. FISHMAN, 2004 Herpesvirus infections in xenotransplantation: pathogenesis and approaches. *Xenotransplantation* **11**: 486-490.
- MURA, C., 2003 Rare Codon Calculator (RaCC).
-

-
- MURAKAMI, H., H. NAGASHIMA, Y. TAKAHAGI, S. MIYAGAWA, T. FUJIMURA *et al.*, 2002 Transgenic pigs expressing human decay-accelerating factor regulated by porcine MCP gene promoter. *Molecular Reproduction and Development* **61**: 302-311.
- MURRAY, J. E., J. P. MERRILL and J. H. HARRISON, 2001 Renal homotransplantation in identical twins. 1955. *J Am Soc Nephrol* **12**: 201-204.
- NARUSE, K., H. ISHIKAWA, H. O. KAWANO, H. UEDA, M. KUROME *et al.*, 2005 Production of a transgenic pig expressing human albumin and enhanced green fluorescent protein. *J Reprod Dev* **51**: 539-546.
- NIEBERT, M., and R. R. TONJES, 2005 Evolutionary spread and recombination of porcine endogenous retroviruses in the suiformes. *J Virol* **79**: 649-654.
- NIEMANN, H., E. VERHOEYEN, K. WONIGEIT, R. LORENZ, J. HECKER *et al.*, 2001 Cytomegalovirus early promoter induced expression of hCD59 in porcine organs provides protection against hyperacute rejection. *Transplantation* **72**: 1898-1906.
- OCHSENBEIN, A. F., and R. M. ZINKERNAGEL, 2000 Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunology today* **21**: 624-630.
- ORLIC, D., J. KAJSTURA, S. CHIMENTI, I. JAKONIUK, S. M. ANDERSON *et al.*, 2001 Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410**: 701-705.
- PARK, S. J., J. W. HUH, D. S. KIM, H. S. HA, Y. D. JUNG *et al.*, 2010 Analysis of the molecular and regulatory properties of active porcine endogenous retrovirus gamma-1 long terminal repeats in kidney tissues of the NIH-Miniature pig. *Mol Cells* **30**: 319-325.
- PARKER, W., D. BRUNO, Z. E. HOLZKNECHT and J. L. PLATT, 1994 Characterization and affinity isolation of xenoreactive human natural antibodies. *J Immunol* **153**: 3791-3803.
- PATEL, R., and C. V. PAYA, 1997 Infections in solid-organ transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* **10**: 86-124.
- PATIENCE, C., W. M. SWITZER, Y. TAKEUCHI, D. J. GRIFFITHS, M. E. GOWARD *et al.*, 2001 Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species. *J Virol* **75**: 2771-2775.
- PETERSEN, B., W. RAMACKERS, A. TIEDE, A. LUCAS-HAHN, D. HERRMANN *et al.*, 2009 Pigs transgenic for human thrombomodulin have elevated production of activated protein C. *Xenotransplantation* **16**: 486-495.
- PLATT, J. L., and F. H. BACH, 1991 The barrier to xenotransplantation. *Transplantation* **52**: 937-947.
- PLONAIT, H., and K. BICKHARDT, 1997 *Lehrbuch der Schweinekrankheiten*: 63 Tabellen. Parey, Berlin.
- POGGIALI, P., G. L. SCOARUGHI, M. LAVITRANO, P. DONINI and C. CIMMINO, 2002 Construction of a swine artificial chromosome: a novel vector for transgenesis in the pig. *Biochimie* **84**: 1143-1150.
- POLEJAeva, I. A., S. H. CHEN, T. D. VAUGHT, R. L. PAGE, J. MULLINS *et al.*, 2000 Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* **407**: 86-90.
- POLONIS, V. R., B. K. BROWN, A. ROSA BORGES, S. ZOLLA-PAZNER, D. S. DIMITROV *et al.*, 2008 Recent advances in the characterization of HIV-1 neutralization assays for standardized evaluation of the antibody response to infection and vaccination. *Virology* **375**: 315-320.
-

- PREUSS, T., N. FISCHER, K. BOLLER and R. R. TONJES, 2006 Isolation and characterization of an infectious replication-competent molecular clone of ecotropic porcine endogenous retrovirus class C. *J Virol* **80**: 10258-10261.
- PRUITT, S. K., R. R. BOLLINGER, B. H. COLLINS, H. C. MARSH, JR., J. L. LEVIN *et al.*, 1997 Effect of continuous complement inhibition using soluble complement receptor type 1 on survival of pig-to-primate cardiac xenografts. *Transplantation* **63**: 900-902.
- QARI, S. H., S. MAGRE, J. G. GARCIA-LERMA, A. I. HUSSAIN, Y. TAKEUCHI *et al.*, 2001 Susceptibility of the porcine endogenous retrovirus to reverse transcriptase and protease inhibitors. *J Virol* **75**: 1048-1053.
- QUINN, G., and G. LANGFORD, 2001 The porcine endogenous retrovirus long terminal repeat contains a single nucleotide polymorphism that confers distinct differences in estrogen receptor binding affinity between PERV A and PERV B/C subtypes. *Virology* **286**: 83-90.
- RAMSOONDAR, J., T. VAUGHT, S. BALL, M. MENDICINO, J. MONAHAN *et al.*, 2009 Production of transgenic pigs that express porcine endogenous retrovirus small interfering RNAs. *Xenotransplantation* **16**: 164-180.
- RASHEED, S., J. BRUSZEWSKI, R. RONGEY, P. ROY-BURMAN, H. P. CHARMAN *et al.*, 1976 Spontaneous release of endogenous ecotropic type C virus from rat embryo cultures. *Journal of virology* **18**: 799-803.
- REEMTSMA, K., B. H. MCCracken, J. U. SCHLEGEL and M. PEARL, 1964 Heterotransplantation of the Kidney: Two Clinical Experiences. *Science* **143**: 700-702.
- ROSE, E. A., A. C. GELIJS, A. J. MOSKOWITZ, D. F. HEITJAN, L. W. STEVENSON *et al.*, 2001 Long-term mechanical left ventricular assistance for end-stage heart failure. *N Engl J Med* **345**: 1435-1443.
- SACHS, D. H., 1994 The pig as a potential xenograft donor. *Veterinary immunology and immunopathology* **43**: 185-191.
- SAMUELS, L., J. ENTWISTLE, E. HOLMES, J. FITZPATRICK and A. WECHSLER, 2004 Use of the AbioCor replacement heart as destination therapy for end-stage heart failure with irreversible pulmonary hypertension. *J Thorac Cardiovasc Surg* **128**: 643-645.
- SAUER, I. M., D. KARDASSIS, K. ZEILLINGER, A. PASCHER, A. GRUENWALD *et al.*, 2003 Clinical extracorporeal hybrid liver support--phase I study with primary porcine liver cells. *Xenotransplantation* **10**: 460-469.
- SCHMITTGEN, T. D., and K. J. LIVAK, 2008 Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* **3**: 1101-1108.
- SCHUMACHER, J. M., S. A. ELLIAS, E. P. PALMER, H. S. KOTT, J. DINSMORE *et al.*, 2000 Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD. *Neurology* **54**: 1042-1050.
- SHI, M., X. WANG, E. DE CLERCQ, S. TAKAO and M. BABA, 2007 Selective inhibition of porcine endogenous retrovirus replication in human cells by acyclic nucleoside phosphonates. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 2600-2604.
- SILVERMAN, R. H., C. NGUYEN, C. J. WEIGHT and E. A. KLEIN, 2010a The human retrovirus XMRV in prostate cancer and chronic fatigue syndrome. *Nat Rev Urol* **7**: 392-402.
- SILVERMAN, R. H., C. NGUYEN, C. J. WEIGHT and E. A. KLEIN, 2010b The human retrovirus XMRV in prostate cancer and chronic fatigue syndrome. *Nature reviews. Urology* **7**: 392-402.

-
- SOIN, B., C. M. VIAL and P. J. FRIEND, 2000 Xenotransplantation. *Br J Surg* **87**: 138-148.
- SPECKE, V., R. PLESKER, C. COULIBALY, K. BOLLER and J. DENNER, 2002a Productive infection of a mink cell line with porcine endogenous retroviruses (PERVs) but lack of transmission to minks in vivo. *Arch Virol* **147**: 305-319.
- SPECKE, V., R. PLESKER, J. WOOD, C. COULIBALY, K. SULING *et al.*, 2009 No in vivo infection of triple immunosuppressed non-human primates after inoculation with high titers of porcine endogenous retroviruses. *Xenotransplantation* **16**: 34-44.
- SPECKE, V., S. RUBANT and J. DENNER, 2001a Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses. *Virology* **285**: 177-180.
- SPECKE, V., H. J. SCHURMAN, R. PLESKER, C. COULIBALY, M. OZEL *et al.*, 2002b Virus safety in xenotransplantation: first exploratory in vivo studies in small laboratory animals and non-human primates. *Transpl Immunol* **9**: 281-288.
- SPECKE, V., S. J. TACKE, K. BOLLER, J. SCHWENDEMANN and J. DENNER, 2001b Porcine endogenous retroviruses: in vitro host range and attempts to establish small animal models. *J Gen Virol* **82**: 837-844.
- STARZL, T. E., T. L. MARCHIORO, G. N. PETERS, C. H. KIRKPATRICK, W. E. WILSON *et al.*, 1964 Renal Heterotransplantation from Baboon to Man: Experience with 6 Cases. *Transplantation* **2**: 752-776.
- STEPHAN, O., J. SCHWENDEMANN, V. SPECKE, S. J. TACKE, K. BOLLER *et al.*, 2001 Porcine endogenous retroviruses (PERVs): generation of specific antibodies, development of an immunoperoxidase assay (IPA) and inhibition by AZT. *Xenotransplantation* **8**: 310-316.
- TACKE, S. J., K. BODUSCH, A. BERG and J. DENNER, 2001 Sensitive and specific immunological detection methods for porcine endogenous retroviruses applicable to experimental and clinical xenotransplantation. *Xenotransplantation* **8**: 125-135.
- TACKE, S. J., R. KURTH and J. DENNER, 2000 Porcine endogenous retroviruses inhibit human immune cell function: risk for xenotransplantation? *Virology* **268**: 87-93.
- TACKE, S. J., V. SPECKE and J. DENNER, 2003 Differences in release and determination of subtype of porcine endogenous retroviruses produced by stimulated normal pig blood cells. *Intervirology* **46**: 17-24.
- TAKEUCHI, Y., C. PATIENCE, S. MAGRE, R. A. WEISS, P. T. BANERJEE *et al.*, 1998 Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus. *J Virol* **72**: 9986-9991.
- TALLACCHINI, M., 2008 Defining an appropriate ethical, social and regulatory framework for clinical xenotransplantation. *Curr Opin Organ Transplant* **13**: 159-164.
- THIVOLET, C., 1998 Strategies for inducing immunological tolerance of xenogeneic islet transplants in type I diabetes. *Diabetes & metabolism* **24**: 225-228.
- TONJES, R. R., and M. NIEBERT, 2003 Relative age of proviral porcine endogenous retrovirus sequences in *Sus scrofa* based on the molecular clock hypothesis. *J Virol* **77**: 12363-12368.
- TORRES, A. N., K. P. O'HALLORAN, L. J. LARSON, R. D. SCHULTZ and E. A. HOOVER, 2010 Feline leukemia virus immunity induced by whole inactivated virus vaccination. *Veterinary immunology and immunopathology* **134**: 122-131.
- TUCKER, A., C. BELCHER, B. MOLOO, J. BELL, T. MAZZULLI *et al.*, 2002 The production of transgenic pigs for potential use in clinical xenotransplantation: microbiological evaluation. *Xenotransplantation* **9**: 191-202.
-

-
- TURNER, G., M. BARBULESCU, M. SU, M. I. JENSEN-SEAMAN, K. K. KIDD *et al.*, 2001 Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. *Curr Biol* **11**: 1531-1535.
- UMBACH, J. L., and B. R. CULLEN, 2009 The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity. *Genes & development* **23**: 1151-1164.
- URISMAN, A., R. J. MOLINARO, N. FISCHER, S. J. PLUMMER, G. CASEY *et al.*, 2006 Identification of a novel Gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant. *PLoS pathogens* **2**: e25.
- VALDES-GONZALEZ, R. A., L. M. DORANTES, G. N. GARIBAY, E. BRACHO-BLANCHET, A. J. MENDEZ *et al.*, 2005 Xenotransplantation of porcine neonatal islets of Langerhans and Sertoli cells: a 4-year study. *Eur J Endocrinol* **153**: 419-427.
- VIAL, C. M., D. J. OSTLIE, F. N. BHATTI, E. COZZI, M. GODDARD *et al.*, 2000 Life supporting function for over one month of a transgenic porcine heart in a baboon. *J Heart Lung Transplant* **19**: 224-229.
- WAGNER, S., M. M. KLEPSCH, S. SCHLEGEL, A. APPEL, R. DRAHEIM *et al.*, 2008 Tuning Escherichia coli for membrane protein overexpression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 14371-14376.
- WANG, B., L. YI, H. LI and C. E. PAN, 2005 A new cardiac concordant xenotransplantation model. *Transplant Proc* **37**: 4620-4622.
- WANG, S. R., J. T. CHANG, M. S. LIN, C. Y. CHIANG and H. Y. CHANG, 2004 Establishing the reactivity of monoclonal antibodies against porcine endogenous retrovirus envelope protein. *Intervirology* **47**: 93-101.
- WATT, S. R., J. M. BETTHAUSER, M. L. AUGENSTEIN, L. A. CHILDS, G. D. MELL *et al.*, 2006 Direct and rapid modification of a porcine xenoantigen gene (GGTA1). *Transplantation* **82**: 975-978.
- WEISS, E. H., B. G. LILIENFELD, S. MULLER, E. MULLER, N. HERBACH *et al.*, 2009 HLA-E/human beta2-microglobulin transgenic pigs: protection against xenogeneic human anti-pig natural killer cell cytotoxicity. *Transplantation* **87**: 35-43.
- WEISS, R. A., 2006 The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology* **3**: 67.
- WILSON, C. A., S. WONG, J. MULLER, C. E. DAVIDSON, T. M. ROSE *et al.*, 1998 Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *J Virol* **72**: 3082-3087.
- WILSON, C. A., S. WONG, M. VANBROCKLIN and M. J. FEDERSPIEL, 2000 Extended analysis of the in vitro tropism of porcine endogenous retrovirus. *J Virol* **74**: 49-56.
- WOLF, D., and S. P. GOFF, 2008 Host restriction factors blocking retroviral replication. *Annual review of genetics* **42**: 143-163.
- WOLF, E., W. SCHERNTHANER, V. ZAKHARTCHENKO, K. PRELLE, M. STOJKOVIC *et al.*, 2000 Transgenic technology in farm animals - progress and perspectives. *Experimental Physiology* **85**: 615-625.
- WOOD, A., B. L. WEBB, B. BARTOSCH, T. SCHALLER, Y. TAKEUCHI *et al.*, 2009 Porcine endogenous retroviruses PERV A and A/C recombinant are insensitive to a range of divergent mammalian TRIM5alpha proteins including human TRIM5alpha. *J Gen Virol* **90**: 702-709.
-

-
- WOOD, J. C., G. QUINN, K. M. SULING, B. A. OLDMIXON, B. A. VAN TINE *et al.*, 2004 Identification of exogenous forms of human-tropic porcine endogenous retrovirus in miniature Swine. *J Virol* **78**: 2494-2501.
- WOODS, W. A., T. S. PAPAS, H. HIRUMI and M. A. CHIRIGOS, 1973 Antigenic and biochemical characterization of the C-type particle of the stable porcine kidney cell line PK-15. *J Virol* **12**: 1184-1186.
- WURZBACHER, C., 2007 Entwicklung von DNA- und Proteinimpfstoffen sowie Diagnostika gegen zwei Retroviren (PERV & KoRV). Diplomarbeit (Robert Koch-Institut), Universität Kassel.
- YAMADA, K., K. YAZAWA, A. SHIMIZU, T. IWANAGA, Y. HISASHI *et al.*, 2005 Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue. *Nat Med* **11**: 32-34.
- YAMAMOTO, S., J. M. LAVELLE, P. A. VAGEFI, H. ARAKAWA, E. SAMELSON-JONES *et al.*, 2005 Vascularized thymic lobe transplantation in a pig-to-baboon model: a novel strategy for xenogeneic tolerance induction and T-cell reconstitution. *Transplantation* **80**: 1783-1790.
- YANG, J., P. BATTACHARYA, R. SINGHAL and E. S. KANDEL, 2011 Xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV) in prostate cancer cells likely represents a laboratory artifact. *Oncotarget* **2**: 358-362.
- YI, J. M., H. M. KIM and H. S. KIM, 2006 Human endogenous retrovirus HERV-H family in human tissues and cancer cells: expression, identification, and phylogeny. *Cancer letters* **231**: 228-239.
- YOON, S., and G. DE MICHELI, 2005 Prediction of regulatory modules comprising microRNAs and target genes. *Bioinformatics* **21 Suppl 2**: ii93-100.
- ZWICK, M. B., A. F. LABRIJN, M. WANG, C. SPENLEHAUER, E. O. SAPHIRE *et al.*, 2001 Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J Virol* **75**: 10892-10905.