

**Porcine endogene Retroviren als Risiko bei der
Xenotransplantation?**

**Infektionsstudien *in vitro* und Inokulation von
Kleintieren und nicht-humanen Primaten *in vivo*.**

Diese Arbeit wurde vom 01.05.1999 bis zum 30.04.2002 am Paul-Ehrlich-Institut,
Paul-Ehrlich-Strasse 51-59, 63225 Langen und dem Robert Koch-Institut,
Nordufer 20, 13353 Berlin angefertigt.

**Porcine endogene Retroviren als Risiko bei der
Xenotransplantation?**

**Infektionsstudien *in vitro* und Inokulation von
Kleintieren und nicht-humanen Primaten *in vivo*.**

D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des akademischen Grades

do c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fachbereich Biologie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Volker Specke

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. rer. nat. Michael Linscheid

Gutachter 1:.....

Gutachter 2:.....

Gutachter 3:.....

Tag der mündlichen Prüfung:.....

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Xenotransplantation	1
1.1.1 Mögliche Spendertiere	3
1.1.2 Immunologie der Xenotransplantation	4
1.2 Mikrobiologische Risiken bei der Xenotransplantation	7
1.2.1 Infektionsgefahren	8
1.2.2 Retroviren	9
1.2.2.1 Das pathogene Potential von Retroviren	10
1.2.2.2 Einteilung der Retroviren	11
1.2.2.3 Morphologie der Gammaretroviren	13
1.2.2.4 Replikation der Gammaretroviren	15
1.2.3 Porcine endogene Retroviren (PERVs)	20
1.3 Zielsetzung	24
2. MATERIAL UND METHODEN	27
2.1 Zellbiologische Methoden	27
2.1.1 Verwendete Zellen	27
2.1.2 Isolation primärer Zellen	29
2.1.2.1 Isolation von Blutleukozyten	29
2.1.2.2 Isolation von Milzzellen	29
2.1.2.3 Isolation von Nierenzellen und Embryo-Zellen	29
2.1.2.4 Isolation von Tumorzellen	30
2.1.3 Kultivierung von Zellen	30

2.1.3.1 Suspensionskulturen.....	30
2.1.3.2 Adhärenz Zellen.....	30
2.1.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	31
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	31
2.2.1 Isolation von Nukleinsäuren.....	31
2.2.1.1 Isolation von genomischer DNA aus kultivierten Zellen.....	31
2.2.1.2 Isolation von genomischer DNA aus kultivierten Zellen im 96-well Maßstab.....	31
2.2.1.3 Isolation von genomischer DNA aus Gewebe.....	32
2.2.1.4 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	32
2.2.1.5 Isolation von viraler RNA aus Zellkulturüberstand.....	32
2.2.1.6 Isolation von viraler RNA aus Plasma.....	33
2.2.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	33
2.2.2.1 Nachweis der Sensitivität der PCR.....	34
2.2.2.2 Nested-PCR.....	35
2.2.2.3 Reverse Transkription-PCR (RT-PCR).....	35
2.2.2.4 Lyse-PCR aus kultivierten Zellen im 96-well Maßstab.....	35
2.2.2.5 Kolonie-PCR aus Bakterien.....	35
2.2.3 Klonierung.....	35
2.2.3.1 Restriktion von DNA.....	36
2.2.3.2 Ligation von DNA.....	36
2.2.3.3 Transformation von Bakterien.....	37
2.2.3.4 Sequenzierung.....	37
2.2.4 Expressionsstudien.....	37
2.2.4.1 Transfektion eukaryotischer Zellen.....	38

2.3. Immunologische Methoden.....	38
2.3.1 Enzyme-Linked Immuno Assay (ELISA).....	38
2.3.2 Immunoperoxidase-Assay (IPA).....	39
2.3.3 Western Blot-Assay (WB).....	40
2.3.4 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)-Analyse.....	40
2.3.5 Histochemie (HC).....	41
2.3.6 Immun-Histochemie (IHC).....	41
2.4 Mikroskopie.....	42
2.4.1 Immun-Fluoreszenzmikroskopie (IFM).....	42
2.4.2 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM).....	43
2.4.3 Raster-Elektronenmikroskopie (REM).....	43
2.5 Virologische Methoden.....	43
2.5.1 Isolation von Viren aus Zellkulturüberstand.....	43
2.5.2 Nachweis von Reverser Transkriptase (RT)-Aktivität (RT-Test).....	44
2.5.3 Virustitration.....	44
2.5.4 <i>In vitro</i> Infektion kultivierter Zellen.....	45
2.5.5 <i>In vivo</i> Infektionsversuche.....	45
2.5.5.1 Verwendete Immunsuppressiva.....	46
2.5.5.2 <i>In vivo</i> Infektion von Kleintieren.....	51
2.5.5.3 <i>In vivo</i> Infektion von nicht-humanen Primaten.....	53
 3. ERGEBNISSE	 56
3.1 Das Wirtsspektrum von PERV <i>in vitro</i>.....	56
3.1.1 Die Infektion von Zellen verschiedener Kleintiere.....	56
3.1.1.1 Die Infektion der Nerzzell-Linie Mv1Lu.....	58
3.1.2 Die Infektion von Zellen nicht-humaner Primaten.....	63

3.1.3 Die Infektion von humanen Zellen.....	67
3.1.4 Die Adaptation von PERV an humane Zellen.....	69
3.2 Das Wirtsspektrum von PERV <i>in vivo</i>.....	80
3.2.1 Die Inokulation von Kleintieren.....	80
3.2.2 Die Inokulation von nicht-humanen Primaten.....	85
<u>4. DISKUSSION</u>	<u>95</u>
4.1 Die Infektion von Zellen mit PERV <i>in vitro</i>.....	95
4.1.1 Die Infektion von Zellen verschiedener Kleintiere.....	95
4.1.1.1 Die produktive Infektion der Nerzzell-Linie Mv1Lu.....	96
4.1.2 Die produktive Infektion von Zellen nicht-humaner Primaten.....	97
4.1.3 Die produktive Infektion von humanen Zellen.....	99
4.1.3.1 PERVs adaptieren sich <i>in vitro</i> an humane Zellen.....	100
4.2 Keine Übertragung von PERV <i>in vivo</i>.....	107
4.3 Implikationen für die Xenotransplantation.....	113
<u>5. ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>116</u>
<u>6. LITERATUR</u>	<u>118</u>
<u>7. ANHANG</u>	<u>135</u>
7.1 Abkürzungen.....	135
7.2 Plasmidkarten.....	138
7.3 Danksagung.....	140
7.4 Lebenslauf.....	142
7.5 Publikationen.....	143
7.6 Erklärung.....	147

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Verwendete Zellen

Für die Analyse des Wirtsspektrums der PERVs wurden in den *in vitro* Infektionsversuchen sowie in den *in vivo* Studien verschiedene Subtypen von PERVs verwendet, welche von Mitogen-stimulierten porcinen primären Zellen und porcinen oder humanen Zell-Linien freigesetzt wurden. Diese PERV-produzierenden Zellen sind in [Tabelle 2.1](#) wiedergegeben. In den *in vitro* Versuchen wurden primäre Zellen und Zell-Linien verschiedener Spezies und Gewebe als Zielzellen verwendet. Diese Zellen sind in den [Tabellen 2.2](#) und [2.3](#) aufgelistet und näher charakterisiert.

Tabelle 2.1: PERV-produzierende porcine und humane Zellen

Zell-Linie	Spezies	Gewebe	Wuchsform	Medium	Herkunft
porcine PBMC	Schwein	PBMC	Suspension	RPMI	primär isoliert
PK-15	Schwein	Nierenepithel	adhärent	DME	ATCC, CCL-33
293-PERV	Human	Nierenepithel	adhärent	DME	Patience et al., 1997
293-PERV/I	Human	Nierenepithel	adhärent	DME	diese Arbeit
293-PERV/II	Human	Nierenepithel	adhärent	DME	diese Arbeit
293-PERV-A	Human	Nierenepithel	adhärent	DME	Weiss et al., unveröffentlicht
293-PERV-A/I	Human	Nierenepithel	adhärent	DME	diese Arbeit
293-PERV-A/II	Human	Nierenepithel	adhärent	DME	diese Arbeit
293-PERV-B	Human	Nierenepithel	adhärent	DME	Onions et al., unveröffentlicht
293-PERV-B/I	Human	Nierenepithel	adhärent	DME	diese Arbeit
293-PERV-B/II	Human	Nierenepithel	adhärent	DME	diese Arbeit
293-NIH/3°	Human	Nierenepithel	adhärent	DME	Wilson et al., 2000
293/4°	Human	Nierenepithel	adhärent	DME	diese Arbeit
293/5°	Human	Nierenepithel	adhärent	DME	diese Arbeit
293/6°	Human	Nierenepithel	adhärent	DME	diese Arbeit
293/7°	Human	Nierenepithel	adhärent	DME	diese Arbeit
C8166-PERV	Human	T-Zellen	Suspension	RPMI	diese Arbeit
C8166-PERV/I	Human	T-Zellen	Suspension	RPMI	diese Arbeit
Mv1Lu-PERV	Nerz	Lungenepithel	adhärent	DME	diese Arbeit
Mv1Lu-PERV/I	Nerz	Lungenepithel	adhärent	DME	diese Arbeit
293-Mv1Lu-PERV	Human	Nierenepithel	adhärent	DME	diese Arbeit

Tabelle 2.2: Uninfizierte Zell-Linien

Zell-Linie	Spezies	Gewebe	Wuchsform	Medium	Herkunft
CTL-6	Maus	Fibroblasten	adhärent	DME	Denner et al., 1994
3T3	Maus	Fibroblasten	adhärent	DME	ATCC CRL-1658
RAT-2	Ratte	Fibroblasten	adhärent	DME	ATCC CRL-1764
Mv1Lu	Nerz	Lungenepithel	adhärent	DME	ATCC, CCL-64
CRFK	Katze	Nierenepithel	adhärent	DME	ATCC, CCL-94
PG-4	Katze	Astrozyten	adhärent	DME	ECACC, 94102703
293	Human	Nierenepithel	adhärent	DME	Wilson et al., 1998
C8166	Human	T-Zellen	Suspension	RPMI	ECACC 88051601
THP-1	Human	Monozyten	Suspension	RPMI	ATCC, TIB-202
WIL2.NS.6TG	Human	Milz	Suspension	RPMI	ECACC, 93031001

Tabelle 2.3: Uninfizierte primäre Zellen

Spezies	Gewebe	Wuchsform	Medium	Herkunft
Ratte	PBMC	Suspension	RPMI	primär isoliert
	Milz	adhärent	DME	
	Niere	adhärent	DME	
	Embryo	adhärent	DME	
Baumwollratte	PBMC	Suspension	RPMI	primär isoliert
	Milz	adhärent	DME	
	Niere	adhärent	DME	
Cynomolgus-Affe	PBMC	Suspension	RPMI	primär isoliert
Afrikanische grüne Meerkatze	PBMC	Suspension	RPMI	primär isoliert
Schweins-Affe	PBMC	Suspension	RPMI	primär isoliert
	Milz	adhärent	DME	
	Fibroblasten	adhärent	DME	
Rhesus-Affe	PBMC	Suspension	RPMI	primär isoliert
Mantelpavian	PBMC	Suspension	RPMI	primär isoliert
	Milz	adhärent	DME	
	Niere	adhärent	DME	
Human	PBMC	Suspension	RPMI	primär isoliert
	Glatte Muskelzellen der Koronararterie	adhärent	231	Cascade Biologics Inc.
	Endothelzellen der Aorta	adhärent	200	Cascade Biologics Inc
	Endothelzellen der Pulmonararterie	adhärent	200	Cascade Biologics Inc
	Endothelzellen der Nabelschnur	adhärent	Endomed	Biochrom
	Fibroblasten des Bindegewebe	adhärent	Fibromed	Biochrom

2.1.2 Isolation primärer Zellen

2.1.2.1 Isolation von Blutleukozyten (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs)

Nach steriler Abnahme von 10-100 ml Heparin-Blut von einem gesunden Spender, wurde das Blut 1:2 mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) verdünnt und auf ein 25 ml Ficoll-Kissen (Histopaque-1077; Sigma) geschichtet. Mittels Dichtezentrifugation bei $800 \times g$ für 30 Minuten bei Raumtemperatur (*RT*) wurden die PBMCs bandiert, vorsichtig aus dem umgebenden Plasma entnommen und zweimal „gewaschen“, d.h. in PBS resuspendiert und bei $500 \times g$ pelletiert. Die Zellen wurden dann in NH_4Cl -Lösung (0,86 g/100 ml Aqua dest.) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, um eine Lyse der ebenfalls isolierten Erythrozyten zu erreichen. Nach der Inkubation wurden die Zellen nochmals durch Zentrifugation bei $500 \times g$ für 10 Minuten gewaschen, in RPMI-1640 Medium mit 10% fötalem Kälberserum (FKS; Biochrom), 2 mM Glutamin, 10 mM HEPES, 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin, resuspendiert und nach der Bestimmung der Zellzahl mittels eines Neubauer-Cytometer in einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro ml Medium (RPMI-1640) kultiviert.

2.1.2.2 Isolation von Milzzellen

Nach der sterilen Entnahme der Milz, wurde diese von umgebendem Fettgewebe befreit und mehrfach mit PBS gewaschen. Zur Vereinzlung der Zellen wurde die Milz mit Hilfe eines kleinen Löffels vorsichtig durch ein feines Metallsieb gepreßt. Die Milzzellen wurden anschließend in RPMI-1640 Medium mit 10% FKS (Biochrom), 2 mM Glutamin, 10 mM HEPES, 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin aufgenommen und durch Auf- und Abpipettieren zusätzlich resuspendiert. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugieren bei $500 \times g$ und anschließendem Resuspendieren in Serum-haltigem Medium dreimal gewaschen. Nach der Bestimmung der Zellzahl mittels eines Neubauer-Cytometer wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro ml Medium (RPMI-1640) kultiviert. Durch Zugabe von 72 $\mu\text{g}/\text{ml}$ des Mitogens Phytohämagglutinin (PHA, Abbott Murex) wurden die Zellen für drei Tage initial zur Proliferation angeregt. Im Verlauf der weiteren Kultivierung erfolgte die Stimulation durch Zugabe von 100U/ml Interleukin-2 (IL-2).

2.1.2.3 Isolation von Nierenzellen und Embryo-Zellen

Nach der sterilen Entnahme der Nieren wurden diese von umgebendem Fettgewebe befreit und mehrfach mit PBS gewaschen. Die Nieren wurden dann mit einem Skalpell in etwa 3 mm^2 große Stücke zerteilt. Ähnlich wurde bei der Isolation von Embryo-Zellen verfahren.

Rattenembryonen aus trächtigen Wistar/Wu-Ratten wurde nach dem Öffnen des Uterus des Muttertiers und der Durchtrennung der Nabelschnüre entnommen und mehrfach in

PBS gespült. Die toten Embryonen wurden dann mit einem Skalpell in etwa 3 mm² große Stücke geschnitten. Die jeweiligen Gewebestücke der Nieren oder Rattenembryonen wurden in eine 0,25%ige Trypsinlösung überführt und bei 37°C für 20-30 Minuten unter Rühren inkubiert. Die entstandene Zellsuspension wurde in mehreren Zyklen immer wieder abgenommen und durch neue Trypsinlösung ersetzt, bis die Gewebeteile vollständig gelöst waren. Die einzelnen Fraktionen wurden vereinigt und die Zellen durch Zentrifugation bei 500 x g für 10 Minuten pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in DME-Medium mit 10% FKS (Biochrom), 2 mM Glutamin, 10 mM HEPES, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin aufgenommen und durch dreimaliges Zentrifugieren bei 500 x g gewaschen. Nach der Bestimmung der Zellzahl mittels eines Neubauer-Cytometer wurden die Zellen in einer Dichte von 1 x 10⁶ Zellen pro ml DME-Medium kultiviert.

2.1.2.4 Isolation von Tumorzellen

Nach der sterilen Entnahme der Tumore wurden diese von umgebendem Fettgewebe befreit und mehrfach mit PBS gewaschen. Die Tumore wurden dann mit einem Skalpell in etwa 3 mm² große Stücke zerteilt und nach der unter **2.1.2.3** beschriebenen Methode durch Trypsinierung in eine Einzelzell-Suspension gebracht. Alternativ dazu wurden etwa 10 mm² große Gewebestücke auf Poly-D-Lysin beschichtete Kulturschalen (Greiner) gebracht. In DME-Medium mit 10% FKS (Biochrom), 2 mM Glutamin, 10 mM HEPES, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin wuchsen aus den Tumoren in 3-5 Tagen Zellen aus, welche nach der Entfernung des initialen Gewebestücks weiter kultiviert werden konnten.

2.1.3 Kultivierung von Zellen

2.1.3.1 Suspensionskulturen

Wenn nicht anders beschrieben, wurden Suspensionskulturen mit einer Zelldichte von 1 x 10⁶ Zellen pro ml Medium in einem Kulturvolumen von 50 ml Medium gehalten. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, einer CO₂-Konzentration von 5% und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 98%. Die Passagierung der Zellen erfolgte alle 3-4 Tage indem die Zellen bei 500 x g zentrifugiert, in neuem Medium resuspendiert und gegebenenfalls nach den Angaben der jeweiligen Zellbank passagiert wurden. Das Medium primärer PBMCs und Milzzellen wurde nach der Isolation der Zellen für drei Tage mit 72µg/ml PHA und im Verlauf der weiteren Kultivierung mit 100U/ml IL-2 versetzt.

2.1.3.2 Adhärenente Zellen

Adhärenente Zellen wurden in einem Volumen von 20 ml Medium kultiviert. Für die Passagierung der Zellen wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 10 ml PBS gespült und

nach Entfernen des PBS mit 5 ml 0,25% Trypsinlösung inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in neuem Medium resuspendiert und gegebenenfalls nach den Angaben der jeweiligen Zellbank passagiert.

2.1.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden adhärente Zellen mit Trypsin in Suspension gebracht. Die Zellen der Suspension wurde bei 500 x g pelletiert, in frischem Medium resuspendiert und die Zellzahl mittels eines Neubauer-Cytometers bestimmt. Dann wurden jeweils 1×10^7 Zellen nochmals bei 500 x g pelletiert, das Zellpellet in 1 ml FKS mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma) resuspendiert, in Schraubampullen aliquotiert und nach ca. 18 Stunden Lagerung bei -80°C final in flüssigen Stickstoff eingelagert.

Zum Auftauen wurden die gefrorenen Ampullen kurz in ein 37°C warmes Wasserbad getaucht und die aufgetauten Zellen sofort in 10 ml vorgewärmtes Medium gegeben und bei 500 x g pelletiert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und entsprechend des Zelltyps kultiviert.

2.2 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wurden nach Sambrook (Sambrook et al., 1989) durchgeführt. Bei der Verwendung von kommerziellen Methoden („Kits“) wird auf den Hersteller und die entsprechende Anleitung verwiesen. Spezielle Puffer und Lösungen werden bei der jeweiligen Methode beschrieben.

2.2.1 Isolation von Nukleinsäuren

2.2.1.1 Isolation genomischer DNA aus kultivierten Zellen

Für die DNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen in Kultur wurde eine kommerzielle Methode mittels DNA-Bindung an Silika-Säulen verwendet (QIAamp DNA Isolation Kit oder DNA Blood and Tissue Isolation Kit, Qiagen). Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren in Lösung wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

2.2.1.2 Isolation genomischer DNA aus kultivierten Zellen im 96-well Maßstab

Adhärenz Zellen wurden je nach Fragestellung mit einer Zellzahl von $1 \times 10^3 - 1 \times 10^6$ Zellen pro well in Medium auf eine Poly-D-Lysin beschichtete 96-well Kulturplatte (Greiner) gebracht und durch 3 Stunden Inkubation im Brutschrank auf der Platte fixiert. Nach Entfernung des Mediums wurde die 96-well Platte mehrfach bei -80°C eingefroren und wieder aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen pro well mit 100 μl Lysepuffer (50 mM KCL, 1,5 mM MgCl_2 , 10 mM Tris-HCl, pH 8,4, 200 $\mu\text{g/ml}$ Protei-

nase K) überschichtet und die Platte für 3 Stunden bei 56°C inkubiert, gefolgt von einer Inkubation bei 95°C für 10 Minuten zur Inaktivierung des Enzyms.

2.2.1.3 Isolation genomischer DNA aus Gewebe

Die Isolation von DNA aus Geweben und Organen erfolgte entweder unter Verwendung des kommerziellen Guanidin-enthaltenden Isolationsreagenz DNAzol nach den Angaben des Herstellers (GibcoBRL) oder nach einer klassischen Methode unter Verwendung von Phenol und Chloroform. Dazu wurden 50 mg Gewebe in einem sterilen Mörser unter flüssigem Stickstoff zerrieben, in einem Glas-Homogenisator mit 10 ml TES-Puffer (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 7,4; und 0,5% SDS, 3 mg Proteinase K) homogenisiert und das Homogenisat für drei Stunden bei 55°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Lysat mit ½ Volumen TE-gesättigtem Phenol (Roth) versetzt, invertiert und bei 20 x g für 15 Minuten und sofort im Anschluß bei 3200 x g für weitere 10 Minuten zur Trennung der organischen Phase von der wäßrigen Phase zentrifugiert. Die DNA-haltige wäßrige obere Phase wurde abgezogen, erneut mit ½ Volumen TE-gesättigtem Phenol (Roth) versetzt, invertiert und nochmals die Phasentrennung durch Zentrifugation erreicht. Die wäßrige obere Phase wurde abgenommen und mit 1 Volumen Phenol/Chloroform (1:1, v/v; Roth) vermischt. Erneut wurden die Phasen durch Zentrifugation bei 3200 x g für 10 Minuten getrennt, und die Extraktion nach dem Abziehen der wäßrigen Phase und nochmaligem Versetzen mit 1 Volumen Phenol/Chloroform (1:1, v/v; Roth) wiederholt. Die DNA-haltige wäßrige Phase wurde vorsichtig abgezogen und erst mit 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat (NaAc, pH 6,5), dann mit 2,5 Volumen kaltem absolutem Ethanol vermischt, so daß bei -20°C über Nacht die DNA präzipitiert. Die ausgefallene DNA wurde durch Zentrifugation bei 3200 x g und 4°C pelletiert und das Pellet mit 75%igem Ethanol zweimal unter gleichen Zentrifugationsbedingungen gewaschen. Die pelletierte DNA wurde dann unter Vakuum getrocknet und in Nuklease-freiem Wasser gelöst.

2.2.1.4 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolation von Plasmid DNA erfolgte unter Verwendung von kommerziellen Methoden wie dem QIAprep Spin Miniprep oder dem Maxi-Kit nach den Angaben der Firma Qiagen.

2.2.1.5 Isolation von viraler RNA aus Zellkulturüberstand

Aus dem Überstand kultivierter Virus-produzierender Zellen wurde durch 10 Minuten Zentrifugation bei 500 x g erst freie Zellen, und im Anschluß durch 15 Minuten Zentrifugation bei 10000 x g weitere Zellreste entfernt. Aus dem klaren Überstand wurden die Viruspartikel durch Ultrazentrifugation bei 54000 x g über 3 Stunden pelletiert. Das entstandene Pellet wurde in 200-1000 µl PBS aufgenommen und die virale RNA mittels

einer kommerziellen Methode durch Bindung der RNA an Silika Säulen (Viral RNA Isolation Kit, Qiagen) isoliert und in einer RT-PCR analysiert (siehe 2.2.2.3).

2.2.1.6 Isolation von viraler RNA aus Plasma

Für die Isolation viraler RNA aus dem Plasma immunsupprimierter Affen wurde eine kommerzielle Methode mit Guanidin-haltigem Puffer und Bindung an Silika-Säulchen (High Pure Viral RNA Isolation Kit, Roche) verwendet. Die Isolation wurde streng nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und die RNA in einer RT-PCR analysiert (siehe 2.2.2.3).

2.2.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Alle PCR-Reaktionen wurden in Biozym MJ Research PTC-200 Thermocyclern durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben enthielt ein 50 µl Reaktionsansatz entsprechend der verwendeten DNA-Polymerase die in Tabelle 2.4 angegebenen Endkonzentrationen von Reaktionskomponenten. Tabelle 2.5 gibt eine Übersicht der verwendeten Standard-PCR Programme, wobei abweichende Annealing-Temperaturen der Tabelle 2.6 zu entnehmen sind, die eine Übersicht der verwendeten Primer darstellt.

Tabelle 2.4: Übersicht der Reaktionskomponenten eines 50 µl PCR-Ansatzes

Komponente	Stammkonzentration	AmpliTaQ Gold (Applied Biosystems)	Cloned Pfu (Stratagene)	Pfx (GibcoBRL)
genomische DNA		ca. 100-300 ng	ca. 100-300 ng	ca. 100-300 ng
Primer 1	10 pmol/µl	5 µM	2 µM	1,5 µM
Primer 2	10 pmol/µl	5 µM	2 µM	1,5 µM
dNTP-Mix	10 mM	1 mM	0,5 mM	0,3 mM
10x PCR-Puffer		10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂ 0,001% (w/v) Gelatine	20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO ₄ , 10 mM KCl, 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,1% Triton-X 100, 0,1mg/ml BSA	5 mM Tris-HCl, 5 mM KCl, 0,1 mM DTT, 0,01 mM EDTA, 5% (v/v) Glycerol
MgSO ₄	50 mM	-	-	1 mM
Aqua dest.		ad 50 µl	ad 50 µl	ad 50 µl

Tabelle 2.5: Übersicht der Standard-PCR Programme

Polymerase	Initiale Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklen	Finale Elongation
AmpliTaQ Gold	10 Minuten 95°C	1 Minute 95°C	1 Minute 55°C	1 Minute 72°C	35-40	7 Minuten 72°C
Cloned Pfu	2 Minuten 95°C	1 Minute 95°C	1 Minute 55°C	1 Minute 72°C	35-40	7 Minuten 72°C
Pfx	2 Minuten 95°C	1 Minute 95°C	1 Minute 55°C	1 Minute 68°C	35-40	7 Minuten 68°C

Tabelle 2.6: Übersicht der verwendete Primer

Spezies	Primer	Sequenz (5' - 3')	Tm	Referenz
Human	β-Aktin (for)	CTACAATGAGCTGCGTGTGG	58°C	Clontech
	β-Aktin (rev)	AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC		
	GAPDH (for)	TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT	58°C	
	GAPDH (rev)	CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC		
Schwein	CO II (for)	TCACCCATCATAGAAGAACTCCTACA	55°C	Switzer et al., 1999
	CO II (rev)	TTTTACGGTTAAGGCTGGGTTATTAAT		
	centrom (for)	TAGCCATGCTGCATGTAATGC	55°C	Paradis et al., 1999
	centrom (rev)	GGAGCGTGGCCCAAT		
Ratte	β-Aktin (for)	TTGTAACCAACTGGGACGATATGG	58°C	Clontech
	β-Aktin (rev)	GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG		
PERV	LTR (for)	AAAGGATGAAAATGCAACCTAACC	55°C	Czuderna et al., 2000
	LTR (rev)	ACGCACAAGACAAAGACACACGAA		
	Gag 1 (for)	GCGACCCACGCAGTTGCATA	55°C	Q-one
	Gag 2 (rev)	CAGTTCCTTGCCCAGTGCCTT		
	Gag 3 (for)	TGATCTAGTGAGAGAGGCAGAG	55°C	Q-one
	Gag 4 (rev)	CGCACAATGGTCCTTGTCG		
	Pol 1 (for)	TTGACTTGGGAGTGGGACGGGTAAC	55°C	Czuderna et al., 2000
	Pol 2 (rev)	GAGGGTCACCTGAGGGTGTTGGAT		
	Pol 3 (for)	GGTAACCCACTCGTTTTCTGGTCAT	55°C	Czuderna et al., 2000
	Pol 4 (rev)	CTGTGTAGGGCTTCGTCAAAGATG		
	Env 1 (for)	AGGGAAAGAGAGGCTGAC	55°C	Mang et al., 2001
	Env 2 (rev)	AGTTTCTCCTTGGCTCAG		
	Env 3 (for)	AGGTCTCCTTGGATGACC	55°C	Mang et al., 2001
	Env 4 (rev)	GATCTGGACTGCACTCAC		
	Env-A (for)	TGGAAAGATTGGCAACAGCG	55°C	LeTissier et al., 1997
	Env-A (rev)	AGTGATGTTAGGCTCAGTGG		
Env-B (for)	TTCTCCTTTGTCAATTCCGG	55°C	LeTissier et al., 1997	
Env-B (rev)	TACTTTATCGGGTCCCCTG			
Env-C (for)	CTGACCTGGATTAGAACTGG	55°C	Takeuchi et al., 1998	
Env-C (rev)	ATGTTAGAGGATGGTCCTGG			
BaEV	Pol (for)	TGGACTCGACTTCCCCAGGG	55°C	v. d. Kuyl et al., 1995
	Pol (rev)	CAGTTCCCAGGAATTCACGC		
Ad 5	E1a (for)	TGGGCAGTGGGTGATAGAGTGGTGGGTTTG	55°C	Louis et al., 1997
	E1a (rev)	ATCACACTTCCGCCACACTACTACGTCACC		

2.2.2.1 Nachweis der Sensitivität der PCR

Für die Überprüfung einer PERV-Infektion *in vitro* und *in vivo* wurde die Sensitivität der verwendeten Primer für PERV-*gag*, *-pol* und *-env* bestimmt. Dazu wurden chronisch PERV-produzierende 293 Zellen in jeweils 8 Replikaten von einer Zellzahl von 1×10^5 bis 0 Zellen seriell ausverdünnt und mit einer konstanten Anzahl von 1×10^6 uninfizierten 293 Zellen vermischt. Die DNA Isolation erfolgte nach den Protokollen der Isolation genomischer DNA aus kultivierten Zellen (siehe 2.2.1.2) mit anschließender Lyse-PCR im 96-well Maßstab (siehe 2.2.2.4). Die Sensitivität der jeweiligen PCR wurde mit der Anzahl der noch detektierbaren PERV-produzierender 293 Zellen vor dem Hintergrund der 1×10^6 uninfizierten 293 Zellen angegeben.

2.2.2.2 Nested-PCR

Nach der potentiellen Amplifikation einer zwischen zwei Primersequenzen befindlichen Zielsequenz wurden jeweils 5 µl dieses PCR Ansatzes als Template für eine sich anschließende nested-PCR mit zwei weiteren internen Primern auf dieser ersten Zielsequenz eingesetzt. Je nach Fragestellung richteten sich die dabei Bedingungen der PCR nach der verwendeten Polymerase und nach den verwendeten Primern (Tabelle 2.6).

2.2.2.3 Reverse Transkription-PCR (RT-PCR)

Die Umschreibung von RNA in ihre komplementäre DNA (complementary DNA, cDNA) erfolgte mittels einer kommerziellen Methode (one-step-RT-PCR System, GibcoBRL) nach Anleitung des Herstellers. Da sich bei diesem System an die Reverse Transkription direkt die Amplifikation der Zielsequenz anschließt, wurden die entsprechenden Primer und deren Annealing-Temperaturen der jeweiligen Fragestellung angepaßt und können der Tabelle 2.6 entnommen werden.

2.2.2.4 Lyse-PCR aus kultivierten Zellen im 96-well Maßstab

Nach der Isolation genomischer DNA aus kultivierten Zellen im 96-well Maßstab (siehe 2.2.1.2) wurden 5 µl des DNA-haltigen Lysats auf eine 96-well PCR-Platte (Applied Biosystems) transferiert und mit den in Tabelle 2.4 angegebenen Reaktionskomponenten versetzt. Die Auswahl der Primer und der zugehörigen Annealing-Temperatur richtete sich dabei nach der jeweiligen Fragestellung und ist der Tabelle 2.6 zu entnehmen.

2.2.2.5 Kolonie-PCR aus Bakterien

Für eine schnelle Überprüfung der Transformation einzelner Bakterienklone nach der Klonierung definierter Sequenzbereiche in ein Plasmid wurde mit einer Pipettenspitze ein kleines Stück des Bakterienklons von der Agarplatte entnommen und direkt als Template in eine PCR eingesetzt. Die Wahl der Primer und der Reaktionsbedingungen richteten sich dabei jeweils nach der zu untersuchenden Fragestellung. Die Kolonie-PCR wurde im Anschluß durch einen spezifischen Restriktionsverdau bestätigt (siehe 2.2.3.1).

2.2.3 Klonierung

Für die Klonierung der LTR- und Env-Regionen verschiedener Passagen von PERV wurden die jeweiligen Sequenzbereiche mittels PCR unter Verwendung der in Tabelle 2.6 angegebenen Primer amplifiziert, die Ansätze über eine kommerzielle Methode aufgereinigt (PCR Purification Kit, Qiagen) und in verschiedene Vektorsysteme eingebracht (Tabelle 2.7). Bei der Durchführung wurde nach den Angaben des jeweiligen Herstellers gearbeitet. Die zugehörigen Plasmidkarten sind am Ende dieser Arbeit im Anhang unter 7.2 zu finden.

Die Klonierungen für die Untersuchungen der Expressionsregulation der PERV-LTR in einem Dualen Luziferase-System sind unter **2.2.4** genauer dargestellt.

Tabelle 2.7: Verwendete Vektorsysteme und Bakterien

System	Vektor	Resistenz	Größe	Bakterien	Hersteller
Perfectly Blunt™ Cloning Kit	pT7Blue-3	Amp. Kan.	5050 bp	<i>Escherischia coli</i> NovaBlue	Novagen
TOPO TA Cloning Kit	pCR2.1-TOPO	Amp. Kan.	3908 bp	<i>Escherischia coli</i> TOP10	Invitrogen
Duales Luziferase Reporter Assay System	pGL3-basic (<i>firefly</i>)	Amp.	4818 bp	<i>Escherischia coli</i> BL-21	Promega
	pGL3-control (<i>renilla</i>)	Amp.	5256 bp	<i>Escherischia coli</i> BL-21	Promega
	pRL-TK (<i>renilla</i>)	Amp.	4045 bp	<i>Escherischia coli</i> BL-21	Promega

2.2.3.1 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgte unter Standardbedingungen in einem Volumen von 20 µl. In die Restriktion wurden 0,2-1 µg DNA und pro µg DNA eine Einheit (1 U) Restriktionsenzym (New England Biolabs, [Tabelle 2.8](#)) eingesetzt. Die Zugabe des jeweiligen Restriktionspuffers, sowie optional die Zugabe von 0,1 µg/µl Rinderserumalbumin (BSA), wurde nach Angaben des Enzym-Herstellers durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Restriktionsansätze für 90 Minuten bei 37°C inkubiert und im Anschluß mittels einer kommerziellen Methode von Salzen und Enzym befreit (PCR Purification Kit, Qiagen). Bei der Restriktion von Vektor-DNA wurde die DNA nach der Aufreinigung mit 0,1 bis 0,5 Einheiten Shrimp alkaline Phosphatase (SAP, USB) für 1 Stunde bei 37°C dephosphoryliert. Das Enzym wurde dann bei 65°C für 20 Minuten inaktiviert. Die entstandenen einzelnen Fragmente der verdauten DNA wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, über eine kommerzielle Methode (Qiaquick Gel Extraction Kit, Qiagen) aus dem Gel eluiert und für die weitere Verwendung in Wasser aufgenommen.

Tabelle 2.8: Verwendete Restriktionsenzyme

Enzym	Konzentration	Temperatur	BSA	Hersteller
<i>Xho</i> I	3000 U	37°C	ja	New England Biolabs
<i>Kpn</i> I	3000 U	37°C	ja	New England Biolabs
<i>Hind</i> III	10000 U	37°C	ja	Boeringer Mannheim
<i>Eco</i> RI	10000 U	37°C	ja	Boeringer Mannheim

2.2.3.2 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA erfolgte in einem Volumen von 20 µl und unter Verwendung von 100-200 ng Vektor bei 16°C über Nacht. Die Menge an DNA-Fragment (Insert) wurde in dreifachem molarem Überschuß zugegeben (1:3). Dabei errechnete sich die Masse an Insert-DNA wie folgt:

$$\text{Masse}_{\text{Fragment}} [\text{ng}] \frac{\text{Masse}_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Fragment}}}{\text{Länge}_{\text{Vektor}}} \times \text{molares Verhältnis} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}}$$

2.2.3.3 Transformation von Bakterien

Sämtliche Transformationen von Bakterien wurden unter Verwendung von 2 µl (ca. 80 ng DNA) des jeweiligen Ligationsansatzes mittels Hitzeschock nach den Angaben der Hersteller durchgeführt. Die Inkubation der Bakterien erfolgte auf LB-Platten mit Selektions-Antibiotikum bei 37°C über Nacht. Der Erfolg der Transformation wurde mittels Kolonie-PCR (siehe 2.2.2.5) oder Restriktionsverdau (siehe 2.2.3.1) überprüft.

2.2.3.4 Sequenzierung

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen wurden von der Firma TopLab angefertigt. Die Vorbereitungen der Proben erfolgte dabei nach den Angaben der Firma.

2.2.4 Expressionsstudien

Nach serieller Passagierung von PERV auf humanen 293 Zellen kam es zu genetischen Veränderungen in der LTR-Regionen der Viren, welche mit ansteigender Passagenzahl gleichzeitig mit einem Titeranstieg assoziiert waren (siehe 3.1.4). Die Klonierung von LTRs verschiedener Passagen in den Vektor pCR2.1-TOPO (Tabelle 2.7) und deren anschließende Sequenzierung zeigte eine Multimerisierung von repetitiven Sequenzen („Repeats“). Für die Untersuchung des Einflusses dieser repetitiven Bereiche in der viralen LTR auf die Expression von PERV in humanen 293 Zellen wurden LTR Regionen mit unterschiedlicher Anzahl von Repeats über Restriktion mit den Enzymen *KpnI* und *XhoI* (Tabelle 2.8) aus dem Vektor pCR2.1-TOPO ausgeschnitten, und in die Vektoren pGL-basic und pRL-TK eines dualen Luziferase Systems (Promega) über Ligation eingebracht. Die weitere Vorgehensweise erfolgte streng nach den Angaben des Herstellers und soll hier nur kurz Erwähnung finden: Die eigentliche Untersuchung der Regulationsfunktion der PERV-LTRs erfolgte über luminometrische Messung der Expression einer Firefly (*Photinus pyralis*) Luziferase auf dem Vektor pGL3-basic in humanen 293 Zellen an einem WinGlow 1.24 Luminometer (Berthold). Um eine unterschiedliche Transfektion der Zellen (siehe 2.2.4.1) auszuschließen, wurden diese mit dem Vektor pRL-TK kotransformiert. Dieser Vektor trägt die Sequenz der Renilla (*Renilla reniformis*) Luziferase, welche sich durch den Umsatz von Coelenteracin statt Luziferin als Substrat von der Firefly-Luziferase unterscheidet. Dies ermöglichte eine Messung der Firefly-Luziferase-Aktivität in Abhängigkeit von der Transformationsrate und somit eine Aussage über die Regulationsintensität der PERV-LTRs.

2.2.4.1 Transfektion eukaryotischer Zellen

Für die Transfektion eukaryotischer Zellen wurde das auf kationischen Liposomen basierende Transfektions-Reagenz TransFast (Promega) verwendet. Dazu wurde 1 µg Plasmid-DNA in 20 µl Serum-freiem Medium 1:1 mit dem Reagenz gemischt und auf 3×10^4 293 Zellen/well einer lichtundurchlässigen 96-well Platte gegeben. Die Platte wurde 1 Stunde bei 37°C und nach Zugabe weiterer 200 µl/well Serum-haltigen Mediums für 24-72 Stunden Inkubiert.

2.3 Immunologische Methoden

Für den immunologischen Nachweis von PERV wurden verschiedene PERV-spezifische Antiseren verwendet (Tabelle 2.9). Sämtliche Seren wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für einige Anwendungen mußten die Seren zur Verminderung unspezifischer Bindungen mit Zellen der jeweiligen Spezies adsorbiert werden. Dies wurde durch Inkubation des Serums mit mindestens 1×10^7 Zellen für 3 Stunden in einem „Über-Kopf-Schüttler“ bei RT erreicht. Nach der Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 500 x g für 10 Minuten pelletiert und aus dem Serum entfernt.

Tabelle 2.9: Primäre Antikörper

WB: Western Blot; **ELISA:** Enzyme-linked Immuno Assay; **IPA:** Immuno Peroxidase Assay; **IFM:** Immun-Fluoreszenz Mikroskopie; **IHC:** Immun-Histochemie

Antikörper	Epitop	Verdünnung					Referenz
		WB	ELISA	IPA	IFM	IHC	
Seren der <i>in vivo</i> Studien	Gesamt PERV	1:100	1:100	1:100	1:100	1:10-1:320	diese Arbeit
Ziege 20	PERV rp15E	1:500	1:500	1:500	1:100	1:100	Denner et al., unveröffentl.
Ziege 18	PERV p15E	1:100	1:100	1:100	1:100	-	Stephan et al., 2001
Ziege 10	PERV gp70	1:20	1:20	-	-	-	Tacke et al., 2001
Kaninchen 6	PERV Gag	1:100	1:100	1:100	1:100	-	Tacke et al., 2001
Anti-Gag	FLV Gag	1:500	1:500	-	-	-	Tacke et al., 2001

2.3.1 Enzyme-Linked Immuno Assay (ELISA)

Rekombinante Proteine der Regionen von Gag und Env von PERV wurden in 0,05 M Natriumcarbonat-Puffer (0,05 M Na₂CO₃, 0,05 M NaHCO₃, 0,06 g NaCl, pH 9,6) gelöst und mit 1 µg Protein pro well durch Inkubation bei 4°C über Nacht auf flexible 96-well Platten (BD) gebracht. Nach Waschen der Platten mit PBS und 0,05% Tween 20 wurden die Platten mit einer Blockierungslösung (PBS mit 3% bovinem Serum Albumin (Serva) und 10% fötalem Kälberserum (Biochrom) inkubiert, um unspezifische Bindungen der primären Antikörper zu verhindern. Nach erneutem Waschen mit PBS

und 0,05% Tween 20 wurden die primären Antikörper in Blockierungslösung mit 0,05% Tween 20 verdünnt (Tabelle 2.9), mit 100 µl pro well auf die Platten gegeben und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Platten erneut 5 mal mit PBS mit 0,05% Tween 20 gewaschen, mit 100 µl pro well Peroxidase-konjugiertem sekundärem Antikörper versehen und erneut bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Die sekundären Antikörper wurden dabei entsprechend den Angaben des Herstellers in Blockierungslösung mit 0,05% Tween 20 verdünnt (Tabelle 2.10). Nach der Inkubation wurden die Platten erneut 5 mal mit PBS mit 0,05% Tween 20 gewaschen. Durch Zugabe von Wasserstoff-Peroxid (H₂O₂) als Substrat und von 100 µg pro well o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid (OPD, Sigma) als Chromogen wurde ein Farbumsatz erreicht, welcher in einem ELISA-Reader (Tecan) bei einer Wellenlänge von 492 nm gegen 620 nm gemessen werden konnte.

Tabelle 2.10: Sekundäre Antikörper

MS: Meerschweinchen; **HRP:** Meerrettich-Peroxidase; **FITC:** Fluoresceinisocyanat; **WB:** Western Blot; **ELISA:** Enzyme-linked Immuno Assay; **IPA:** Immuno Peroxidase Assay; **IFM:** Immun-Fluoreszenz Mikroskopie; **IHC:** Immun-Histochemie

Spezies	Anti-körper	Epitop	Konjugation	Verdünnung in					Hersteller
				WB	ELISA	IPA	IFM	IHC	
Ratte	αIgG	gesamt	HRP	1:1000	1:1000	-	-	-	Sigma
MS	αIgG	gesamt	HRP	1:200	-	-	-	-	Sigma
Nerz	αIgG	gesamt	HRP	1:200	-	-	-	-	Sigma
Ziege	αIgG	gesamt	HRP	1:1000	1:1000	1:1000	-	1:300	Sigma
	αIgG	gesamt	FITC	-	-	-	1:500	-	Sigma
Kaninchen	αIgG	gesamt	HRP	1:1000	1:1000	1:1000	-	-	Sigma
	αIgG	gesamt	FITC	-	-	-	1:200	-	Sigma
Human	αIgG	gesamt	HRP	1:1000	-	-	-	-	Sigma
	αIgM	µ-Kette	HRP	1:1000	-	-	-	-	Sigma
	αIgA	α-Kette	HRP	1:1000	-	-	-	-	Sigma
	αIgE	ε-Kette	HRP	1:1000	-	-	-	-	Sigma
	αIgG	Vimentin	HRP	-	-	-	-	1:500	Dako
	αIgG	Zytokeratin	HRP	-	-	-	-	1:500	Roche
Versch.	αIgG	Prot. G	HRP	1:5000	1:5000	1:5000	-	-	Sigma

2.3.2 Immuno Peroxidase-Assay (IPA)

Für den immunologischen Nachweis der Expression viraler Proteine in kultivierten Zellen wurden in 100 µl 3 x 10⁴ Zellen pro well auf eine Poly-D-Lysin beschichtete 96-well Platte (Greiner) gebracht und durch 3 Stunden Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit zum Anwachsen gebracht. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen mit 100 µl pro well eiskaltem Methanol bei -20°C über Nacht fixiert und damit gleichzeitig die Membran für die intrazelluläre Färbung permeabilisiert. Nach der Fixierung wurde das Methanol durch Waschen mit PBS entfernt, die Zellen mit 100 µl pro well Blockierungslösung (PBS mit 2% fettarmen Milchpulver) überschichtet und bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurden die primären Antikörper in Blockierungslösung verdünnt (Tabelle 2.9), mit 100 µl

pro well auf die Platten gegeben und bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit für eine Stunde inkubiert. Die Platten wurden erneut 3 mal mit PBS gewaschen, mit 100 µl pro well Peroxidase-konjugiertem sekundärem Antikörper versehen und erneut bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit für eine Stunde inkubiert. Die sekundären Antikörper wurden dabei entsprechend den Angaben des Herstellers in Blockierungslösung verdünnt (Tabelle 2.10). Nach der Inkubation wurden die Platten 3-5 mal mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von 1 Teil des Chromogens 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC (Sigma), gelöst in 4 mg/ml Dimethylformamid (DMF, Roth)) und 19 Teilen 20 mM Natrium-Acetat Puffer (pH 5) wurden bei weiterer Zugabe von H₂O₂ als Substrat die viralen Proteinkomplexe durch eine intensive Färbung sichtbar. Für längere Lagerung wurden die Platten nach Entfernung der Substratlösung mit 20% Glycerol in Aqua dest. überschichtet. Zur Dokumentation wurden Bilder der IPAs an einem Zeiss Axiovert inversen Lichtmikroskop angefertigt.

2.3.3 Western Blot (WB)

Je nach Fragestellung wurde entweder ein elektrophoretisch aufgetrenntes Lysat kultivierter Zellen oder ein Lysat aus pelletiertem Virus für die Western Blot-Analysen verwendet. Die Lyse kultivierter Zellen wurde dabei durch Inkubation von 1×10^7 Zellen in 10 ml Lysepuffer (1% Triton-x 100, 0,32 M Sucrose, 5 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 8,0), 2 mM DTT und 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail (Roche)) erreicht.

Für ein Virus-Lysat wurde Gradient-gereinigtes Virus verwendet (siehe 2.5.1), welches durch Aufnahme in Probenpuffer (BioRad) und Aufkochen lysiert wurde.

Die Proteinkonzentrationen der jeweiligen Lysate wurden in einem kommerziellen ELISA-System nach Bradford (BioRad) bestimmt, mit 10 µg pro Spur in einer 10% Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in Tricin-Puffer aufgetrennt und mittels einer Semi-Dry-Blot-Apparatur (BioRad) 45 Minuten lang bei 15 Volt auf eine Polyvenyliden Fluorid (PVDF)-Membran transferiert. Die Membranen wurden anschließend in einer Blockierungslösung (PBS, 0,5% Tween 20, 2% BSA) inkubiert und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Primäre Antikörper wurden in Blockierungslösung verdünnt (Tabelle 2.9) und bei 4°C über Nacht auf der Membran inkubiert. Nach dem Waschen der Membran in Waschpuffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5% Tween 20, 0,2% BSA, pH 7,3) erfolgte eine Inkubation für 90 Minuten bei RT mit dem entsprechenden Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper, welcher nach Herstellerangaben in Blockierungslösung verdünnt wurde (Tabelle 2.10). Nach erneutem Waschen wurde die Antikörperbindung durch Zugabe eines kommerziellen Chromogens (metal-enhanced Diaminobenzidine, DAB (Pierce)) und H₂O₂ visualisiert.

2.3.4 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)-Analyse

PBMCs von Rhesus-Affen und Pavianen wurden über Ficoll-Histopaque Dichtezentrifu-

gation unter Verwendung von Citrat-gepufferten Vacutainer CPT Röhrchen (BD) frisch isoliert, 2 mal mit PBS gewaschen und maschinell gezählt (Coulter Counter T890). Die Lymphozyten wurden nach Standardprotokoll mit humanen kreuzreagierenden Antikörpern gegen CD3, CD4 und CD8 Oberflächenproteine gefärbt (Tabelle 2.10) und der prozentuale Anteil der jeweiligen positiven Zellen in der gesamt Population unter Benutzung einer CellQuest Software an einem FACS Calibur (BD) bestimmt.

2.3.5 Histochemie (HC)

Die Histochemie wurde in Kooperation mit Dr. R. Plesker am Paul-Ehrlich-Institut durchgeführt. Gewebeproben aus den *in vivo*-Versuchen wurden in 10% Formalin für 24 Stunden fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Anfertigung der 3 µm dicken Dünnschnitte erfolgte an einem HM 400 Schnittmikrotom (Microm). Anschließend wurde das Paraffin von den Dünnschnitten mittels serieller Dehydrierung (3 mal 1 Minute Xylol, 2 mal 1 Minute Propanol, 1 Minute 96% Ethanol, 1 Minute 70% Ethanol, 2 mal 1 Minute Aqua dest.) entfernt. Die Färbung mit Hämatoxylinlösung (Papanicolaou 1b; Merck) erfolgte durch zweimalige Inkubation für je eine Minute. Nach zweimal Waschen für je 1 Minute mit Aqua dest., wurde die Reaktion durch Zugabe von HCL-Ethanol-Lösung (576 ml EtOH (100%), 524 ml Aqua dest., 2,8 ml HCL (37%)) gestoppt. Nach dem Waschen mit Aqua dest. für eine Minute und der Inkubation mit 70% Ethanol für eine Minute, wurden die Schnitte für eine Minute mit Eosinlösung (Merck; 20g ad 1 L Aqua dest. und 1 L EtOH (96%)) gegengefärbt. Nach abschließender Inkubation für 1 Minute in 70% Ethanol, 2 x 1 Minute in 96% Ethanol, 2 x 1 Minute in Propanol und 3 x 1 Minute in Xylol, wurden die Schnitte mit Entellan (Sigma) eingedeckt. Die Auswertung der Histochemie erfolgte an einem ST 4040 Lichtmikroskop (Leica).

2.3.6 Immun-Histochemie (IHC)

Die Immun-Histochemie wurde in Kooperation mit Dr. R. Plesker am Paul-Ehrlich-Institut, und Herrn Prof. Dr. Reinacher am Institut für Veterinärpathologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen durchgeführt. Gewebeproben aus den *in vivo*-Versuchen wurden in konzentriertem Methanol (70%, v/w) für 24 Stunden fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Anfertigung der 4 µm dicken Dünnschnitte erfolgte nach Standard-Protokollen an einem HM 400 Schnittmikrotom (Microm). Von den eingebetteten Dünnschnitten wurde nach einer Stunde Inkubation bei 58°C auf Objektträgern das Paraffins bei *RT* mittels serieller Dehydrierung (4 x 1 Minute Xylol, 2 x 1 Minute Propanol, 1 Minute 100% Ethanol, 1 Minute 70% Ethanol, 1 x 5 Minuten Aqua dest.) entfernt. Die Inaktivierung endogener Peroxidasen erfolgte durch Inkubation mit 3% H₂O₂ für 10 Minuten. Nach dem Waschen der Dünnschnitte unter fließendem Wasser für 20 Minuten und 2 mal Waschen mit TBS für 5 Minuten, wurden die Schnitte getrocknet und durch Inkubation in PBS mit 1% BSA für 20 Minuten bei *RT* blockiert. Im

Anschluß wurde der primäre Antikörper von 1:10 bis 1:320 in TBS verdünnt und auf den Dünnschnitten für 60 Minuten bei RT inkubiert. Nach 3 mal 5 Minuten waschen mit TBS wurde der sekundäre Antikörper nach den Angaben des Herstellers in TBS verdünnt (Tabelle 2.10) und ebenfalls für 60 Minuten bei RT auf die Dünnschnitte gegeben. Nach 3 mal 5 Minuten Waschen mit TBS wurde die Antikörperbindung durch Zugabe eines kommerziellen Chromogens (Diaminobenzidine, DAB (Sigma)) und H₂O₂ sichtbar. Die Schnitte wurden abschließend 5 Minuten in 70% Ethanol, 5 Minuten in 80% Ethanol, 2 mal 5 Minuten in 96% Ethanol und 2 mal 5 Minuten in Xylol inkubiert und dann mit Entellan (Sigma) abgedeckt. Die photographische Dokumentation der Immun-Histochemie erfolgte an einem Zeiss Axiophot Fluoreszenzmikroskop.

2.4 Mikroskopie

Alle Zellen wurden standardmäßig lichtmikroskopisch (Zeiss ID 03 oder Nikon Eclipse TS100) auf ihre Morphologie und Vitalität (Trypanblau-Färbung) untersucht. Immunologische Nachweise viraler Infektionen (z. B. IPA, siehe 2.3.2) wurden ebenfalls mittels Lichtmikroskopie oder mittels Immun-Fluoreszenzmikroskopie (siehe 2.4.1) durchgeführt. Spezielle Mikroskopie-Techniken wie Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM, siehe 2.4.2) oder Raster-Elektronenmikroskopie, (REM, siehe 2.4.3) wurden in Kooperation mit den elektronenmikroskopischen Abteilungen des Paul-Ehrlich-Institutes und des Robert Koch-Institutes durchgeführt und werden im Folgenden nur für Standard-Untersuchungen beschrieben.

2.4.1 Immun-Fluoreszenzmikroskopie (IFM)

Für die eine bessere Haftung der Zellen wurden Objektträger mit einer 0,005% Poly-L-Lysin Lösung beschichtet oder kommerzielle Adhäsions-Objektträger (Roth) verwendet. Nach dem Festwachsen der Zellen wurden diese mit 2% Paraformaldehyd (Merck) für 2 Stunden bei RT fixiert. Bei einer optionalen intrazellulärer Färbung wurden die Zellen nach zweimal waschen in PBS im Anschluß an die Fixierung durch 15 Minuten Inkubation in PBS mit 0,5% Triton-X 100 (Sigma) bei RT permeabilisiert. Nach dreimal waschen in PBS und 30 Minuten Inkubation der Zellen bei RT in Blockierungslösung (PBS, 1% Trockenmilch) wurden die Zellen mit dem entsprechenden primären Antikörper (Tabelle 2.9) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen mit einem FITC-markiertem sekundären Antikörper (Tabelle 2.10) für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach finalem zweimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen mit Moviol (Calbiochem) überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Dokumentation erfolgte an einem Zeiss Axiophot oder einem Nikon Eclipse E 600 Fluoreszenzmikroskop mit DXM 1200 Digitalkamera.

2.4.2 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Die Transmissions-Elektronenmikroskopie wurde in Kooperation mit Dr. K. Boller am Paul-Ehrlich-Institut durchgeführt. Dazu wurden kultivierte Zellen für 45 Minuten bei *RT* mit einer frisch in Medium angesetzten 2,5% Glutaraldehydlösung fixiert, aus der Kulturflasche gekratzt und in flüssiger Agarose resuspendiert, welche dann sofort auf Eis zum Abkühlen gebracht wurde. Nach dem Schneiden der Agarose in kleine Blöcke, wurden diese nochmals in 1% Osmium-Tetraoxyd-Lösung (OsO_4 in PBS) fixiert und seriell in Ethanol dehydriert. Nach Einbettung in Epon 812 wurden die Eponblöcke an einem Ultracut 4 Mikrotom (Leica) in 80 nm dicke Dünnschnitte geschnitten. Diese wurden dann bei *RT* 10 Minuten mit 2% Uranyl-Acetat und 2 Minuten mit Blei-Citrat kontrastiert. Zur Dokumentation wurden Mikrographien an einem Zeiss CEM 902 Elektronenmikroskop im ESI Modus aufgenommen.

2.4.3 Raster-Elektronenmikroskopie (REM)

Alle Raster-elektronenoptischen Aufnahmen wurden in Kooperation mit Dr. M. Özel am Robert Koch-Institut durchgeführt. Dazu wurden PERV/5°-produzierende 293 Zellen auf ein mit Alzian-Blau beschichtetes Deckglas gebracht und mit 2,5% Glutaraldehyd (in PBS) für 30 Minuten sowie weiterhin mit 1% Osmium Tetraoxyd für 1 Stunde bei *RT* fixiert. Die Proben wurden dann seriell in Ethanol dehydriert und in Carbon-Dioxid nach der Kritisch-Punkt-Methode getrocknet. Nach dem Aufbringen einer 8 nm Goldschicht wurden die Proben in einem LEO 1530 Raster-Elektronenmikroskop bei 5 kV untersucht und dokumentiert.

2.5 Virologische Methoden

Für die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* und *in vivo* Infektionsversuche wurden verschiedene porcine endogene Retroviren verwendet, welche sich in ihrem Subtyp oder ihrer produzierenden Zell-Linie unterscheiden. [Tabelle 2.11](#) gibt eine Übersicht der verwendeten Viren und zeigt deren weitere Charakteristika.

2.5.1 Isolation von Viren aus Zellkulturüberstand

PERV wurde aus dem Überstand kultivierter Zellen isoliert, indem ein 3 Tage alter Überstand von 1×10^7 PERV-produzierenden Zellen durch Zentrifugation bei $500 \times g$ erst von freien Zellen, und dann durch Zentrifugation bei $10000 \times g$ für 15 Minuten von Zelltrümmern befreit wurde. Aus dem klaren Überstand wurden die Viruspartikel durch Ultrazentrifugation bei $54000 \times g$ über 3 Stunden pelletiert, in TE-Puffer aufgenommen und bei -80°C gelagert. Für eine weitere Reinigung des Virus erfolgte im Anschluß eine weitere Zentrifugation bei $140000 \times g$ für 2 Stunden durch ein 22% Succrose-Kissen.

Tabelle 2.11: Verwendete Viren

Für einen vergleichbaren Einsatz der verschiedenen Virustypen wurde deren jeweiliger Titer bestimmt (siehe 2.5.3). Da nicht für alle verwendeten Viren eine Titerbestimmung erfolgte, sind für diese Virustypen alternativ RT-Aktivitäten angegeben, welche nach 3 Tagen Kultivierung von 1×10^7 Zellen in dem jeweiligen Überstand gemessen wurden. Bei den mit * gekennzeichneten porcinen PBMCs erfolgte die RT-Bestimmung erst 5 Tage nach Kultivierungsbeginn, da hier für die optimale Virusfreisetzung eine Stimulation mit 72 µg/ml PHA erfolgen mußte. NG: Nicht getestet.

Virus	Subtyp	Titer	RT [mU/ml]	Zell-Linie
PERV/MP	A, B, C	NG	5 ± 2	porcine PBMC*
PERV/PK-15	A, B	$1 \times 10^{1,3}$	80 ± 10	PK-15
PERV/293	A, B	$1 \times 10^{2,2}$	280 ± 6	293-PERV
PERV/293/I	A, B	$1 \times 10^{2,5}$	300 ± 4	293-PERV/I
PERV/293/II	A, B	$1 \times 10^{2,7}$	335 ± 9	293-PERV/II
PERV-A	A	$1 \times 10^{1,5}$	180 ± 5	293-PERV-A
PERV-A/I	A	$1 \times 10^{2,6}$	130 ± 7	293-PERV-A/I
PERV-A/II	A	1×10^3	110 ± 11	293-PERV-A/II
PERV-B	B	$1 \times 10^{1,7}$	200 ± 3	293-PERV-B
PERV-B/I	B	$1 \times 10^{2,6}$	125 ± 7	293-PERV-B/I
PERV-B/II	B	1×10^3	120 ± 9	293-PERV-B/II
PERV/NIH/3°	A/C	$1 \times 10^{2,5}$	350 ± 10	293-NIH-3°
PERV/4°	A/C	1×10^3	385 ± 8	293/4°
PERV/5°	A/C	1×10^5	530 ± 12	293/5°
PERV/6°	A/C	NG	340 ± 10	293/6°
PERV/C8166	A, B	NG	27 ± 2	C8166-PERV
PERV/C8166/I	A, B	NG	26 ± 1	C8166-PERV/I
PERV/Mv1Lu	A, B	1×10^2	$39 \pm 1,8$	Mv1Lu-PERV
PERV/Mv1Lu/I	A, B	NG	$13 \pm 0,3$	Mv1Lu-PERV/I
PERV/293(Mv1Lu)	A, B	NG	$37 \pm 2,1$	293-Mv1Lu-PERV

2.5.2 Nachweis von Reverser Transkriptase (RT)-Aktivität (RT-Test)

Der Nachweis von RT-Aktivität in Überständen kultivierter Zellen oder in Plasma der nicht-humanen Primaten erfolgte unter Verwendung eines kommerziellen Systems mit Präferenz für die Mangan-abhängige Reverse Transkriptase der Gammaretroviren (C-Type RT-Activity Assay, Caviditech). Die Durchführung erfolgte strikt nach den Angaben des Herstellers.

2.5.3 Virustitration

Auf einer Poly-D-Lysin beschichteten 96-well Platte (Greiner) wurden 3×10^4 uninfizierte PERV-suszeptible Zellen pro well gegeben und für 3 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit zum Anwachsen gebracht. Parallel dazu wurden Überstände von kultivierten PERV-produzierenden Zellen durch Zentrifugation bei 500 x g für 10 Minuten und Filtration durch einen 0,45 µm Sterilfilter von Zellen befreit und je nach Virustyp 1:2 bis 1:10 in Kulturmedium 12 mal seriell verdünnt. Die einzelnen Verdünnungsstufen wurden dann mit 100 µl pro well in je 8 Replikaten auf die Platte mit den Zellen transferiert, und über Nacht unter den üblichen Zellkulturbedingungen inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Virus-haltige Überstand entfernt und nach Waschen mit

PBS durch frisches Medium ersetzt. Die Zellen wurden 4 bis 6 Wochen lang kultiviert, wobei die Zelldichte pro well alle 3 bis 4 Tage durch Passagierung von 1:3 reguliert wurde. Nach spätestens 6 Wochen wurde das Medium entfernt und die Infektion der Zellen mittels PCR nach dem Protokoll der DNA-Isolation aus kultivierten Zellen im 96-well Maßstab (siehe 2.2.1.2) und anschließender Lyse-PCR im 96-well Maßstab (siehe 2.2.2.4) überprüft. Alternativ wurden die Zellen nach Entfernung des Mediums über Nacht mit 100 µl pro well eiskaltem Methanol bei -20°C fixiert. Die Detektion PERV-infizierter Zellen erfolgte dann mittels IPA (siehe 2.3.2) unter Verwendung eines Antiserums (Ziege 20; Tabelle 2.9), welches durch Immunisierung mit dem rekombinanten transmembranen Hüllprotein p15E von PERV erhalten wurde (Denner et al., unveröffentlicht). Die Auswertung erfolgte in beiden Fällen mit einer Software des National Institute of Cell Biology (NCBI) zur Bestimmung des jeweiligen Virustiters (Tissue culture infectious dose, TCID₅₀).

2.5.4 *In vitro* Infektion kultivierter Zellen

Für die meisten *in vitro* Infektion kultivierter Zellen wurden zellfreie Überstände von kultivierten PERV-produzierenden Zellen verwendet, welche durch Zentrifugation bei 500 x g für 10 Minuten und Filtration durch einen 0,45 µm Sterilfilter von Zellen befreit wurden. Standardmäßig wurden 1 x 10⁷ Zielzellen in 10 ml Medium zusätzlich mit 10 ml frischem Virus-haltigem Überstand versetzt und für 12 bis 24 Stunden bei 37°, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Virus-haltigen Überstände enthielten dabei den in Tabelle 2.11 angegebenen Virustiter, welcher nach 3 Tagen Kultivierung von 1 x 10⁷ PERV-produzierenden Zellen in den Überstand sezerniert wurde. Für einige der Infektionsversuche wurden zusätzlich 6-10 µg Polybren (Sigma) pro ml Medium als kationischer Infektionsverstärker verwendet (Xu et al., 2000; Themis et al., 1998). Neben zellfreier Infektion wurden auch Infektionsversuche mit Zell-Zell-Kontakt durchgeführt. Dazu wurden porcine PERV-produzierende PK-15 Zellen radioaktiv bestrahlt, um sie in ihrer weiteren Proliferation zu hemmen und nach dem nächsten Zellteilungszyklus zum Absterben zu bringen. Die so behandelten Zellen wurden mit uninfizierten Zielzellen im Verhältnis 1:1 kultiviert, bis über PCR mit Schweine-spezifischen Primern (Tabelle 2.6) keine porcinen Zellen mehr nachweisbar waren. Die verbliebenen Zellen wurden dann mit PERV-spezifischen Primern (Tabelle 2.6) auf Infektion getestet.

2.5.5 *In vivo* Infektionsversuche

Alle im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten *in vivo* Infektionsversuche wurden am Paul-Ehrlich-Institut in Kooperation mit Dr. R. Plesker und Dr. C. Coulibaly, und unter strenger Berücksichtigung der Auflagen des Regierungspräsidiums Darmstadt und dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Einigen Kleintieren, sowie allen Affen wur-

den Immunsuppressiva appliziert, um die Bedingungen einer klinischen Xenotransplantation zu simulieren. Applikationsart und Dosis sind unter den jeweiligen Versuchbeschreibungen zu finden. Im Vorfeld soll jedoch kurz auf den Wirkmechanismus der applizierten Medikamente eingegangen werden.

2.5.5.1 Verwendete Immunsuppressiva

- Cyclosporin-A (Cs-A)

Cyclosporin ist ein aus 11 Aminosäuren bestehendes lipophiles cyclisches Peptid aus dem Bodenpilz *Tolypocladium inflatum Gams* und wirkt am stärksten im Zytosol der CD4-positiven (CD4+) T-Helfer-Lymphozyten. Es sind antigenspezifische Zellen, die sich üblicherweise im ruhenden Zustand, der G0-Phase des Zellzyklus, befinden. Erst wenn es zu einer Stimulation des Antigenrezeptors der T-Lymphozyten kommt, beginnen die Synthese von Interleukinen und die Proliferation der Zellen. Im Rahmen der hiermit eingeleiteten klonalen Expansion entstehen T-Helferzellen (CD4+) und zytotoxische T-Lymphozyten (CD8+). Hierbei handelt es sich um die Anfangsphase der zellulären Immunreaktion, welche schließlich unter anderem zur Transplantatabstoßung führen kann.

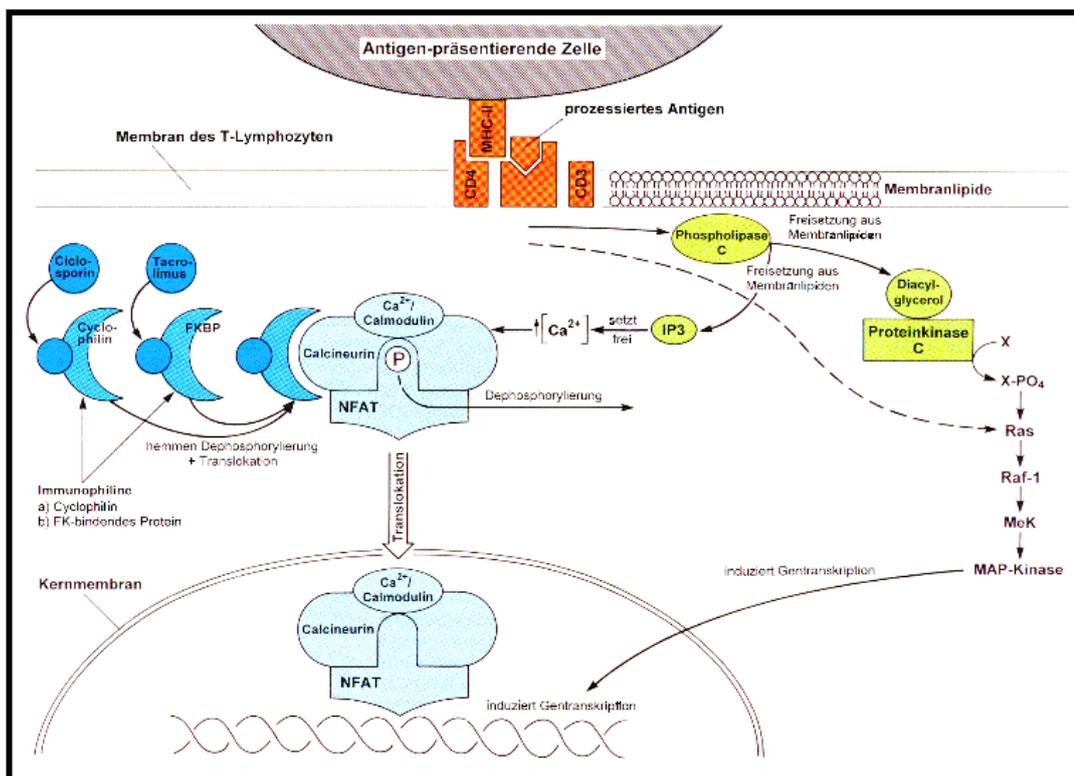


Abbildung 2.1: Schematische Wiedergabe des Wirkmechanismus von Cyclosporin. Erklärungen siehe Text. (Text und Abbildung verändert nach: Schröder und Herzig (1998))

Zur initialen T-Zell-Aktivierung bedarf es Antigen-aufbereitender Zellen (z. B. Makrophagen), die nach vorheriger Proteolyse Antigenfragmente gemeinsam mit dem Histokompatibilitätskomplex (MHC)-II-Molekül präsentieren. Diese interagieren mit dem antigenspezifischen Rezeptor des T-Lymphozyten, der auf der Zelloberfläche gemeinsam mit einem CD4- und einem CD3-Glykoprotein kolokalisiert ist. Die beiden letztgenannten Glykoproteine unterstützen die Antigenerkennung und

die intrazelluläre Signaltransduktion. Intrazellulär wird nach T-Zell-Rezeptorstimulation eine Phospholipase C aktiviert, welche daraufhin aus membranären Phospholipiden Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) freisetzt. Diese beiden intrazellulären Botenstoffe sorgen auf eine unterschiedliche Weise für eine Aktivierung der Gen-Transkription.

IP₃ setzt aus zytosolischen Speichern Calcium-Ionen (Ca²⁺) frei. Ca²⁺ und Calmodulin aktivieren Calcineurin, ein Enzym mit Phosphataseaktivität. Das aktivierte Calcineurin bindet sich im Zytosol an das Protein NFAT ("nuclear factor of activated thymocytes") und sorgt für dessen Dephosphorylierung. Nur im dephosphorylierten Zustand gelangt NFAT gemeinsam mit Calcineurin als Komplex in den Zellkern. Sie lagern sich an die DNA und induzieren die Transkription der mRNA für Interleukin 2 (IL2) und anderer Genprodukte. Im Zellkern antagonisiert Calcineurin die erneute Phosphorylierung des NFAT durch Kinasen. Vermutlich wandert der Calcineurin/NFAT-Komplex wieder aus dem Zellkern in das Zytoplasma zurück, wenn durch gegenregulatorische Vorgänge der intrazelluläre Ca²⁺-Spiegel gesunken ist.

Der zweite intrazelluläre Signaltransduktionsweg besteht zunächst in der oben genannten Produktion von Diacylglycerol durch Phospholipase C und der Aktivierung der Proteinkinase C. Dies führt zu einer Aktivierung von Ras, einem Protein mit GTPase-Aktivität. Daneben ist zusätzlich eine Proteinkinase-C-unabhängige Ras-Aktivierung möglich. Ras interagiert mit Raf-1 (= Serin/ Threoninkinase), wodurch eine Kinasen-Kaskade reguliert wird. Auch dieser Weg führt schließlich zu einer Induktion der IL2-Transkription und anderer Genprodukte.

Der erstgenannte intrazelluläre Aktivierungsweg wird durch Cyclosporin gehemmt ([Abbildung 2.1](#)), indem es sich intrazellulär an ein Immunophilin namens Cyclophilin bindet und der Cyclosporin/Cyclophilin-Komplex bindet sich dann wiederum an Calcineurin, blockieren dessen Enzymaktivität und hemmen somit die Dephosphorylierung des NFAT, die Translokation des Calcineurin/NFAT-Komplexes in den Zellkern und die Produktion der mRNA für IL2 und anderer Genprodukte.

- **Methylprednisolon**

Das von Hydrocortison (Cortisol) abgeleitete synthetische Glucocorticoid Prednisolon bindet nach passiver Diffusion durch die Zellmembran an einen zytosolischen Glucocorticoid-Rezeptor ([Abbildung 2.2](#)). Eine dadurch ausgelöste Konformationsänderung des Rezeptors hat die Loslösung eines rezeptorassoziierten Hitzeschockproteins (HSP 90) zur Folge. Der auf diese Weise aktivierte Steroid-Rezeptor-Komplex transloziert in den Zellkern und bindet dort an spezifische DNA-Strukturen („glucocorticoid responsive elements“; GRE's) in der Promotor-Region Steroid-sensitiver Gene. Die infolge einer hormonspezifischen Induktion der Genexpression entstehenden mRNA-Moleküle werden in die entsprechenden Glucocorticoid-induzierbaren Proteine translatiert.

Auf der anderen Seite wird bei Bindung des Glucocorticoid-Rezeptor-Komplexes an sogenannte „negative GRE's“ die Expression bestimmter Gene supprimiert. Als Ursache dieses Effektes wird eine sterische Behinderung der Bindung positiv wirkender Transkriptionsfaktoren diskutiert.

Vielen antiphlogistischen und immunsuppressiven Glucocorticoid-Effekten liegt eine Hemmung der Zytokin-aktivierbaren Transkriptionsfaktoren Activator Protein 1 (AP-1) und Nuclear Factor kappa-B (NF-kappa-B) zugrunde, die mit Glucocorticoid-Rezeptor-Komplexen eine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung im Nukleus eingehen können. Eine Aktivierung von AP-1 hat die Transkription proinflammatorischer Metalloproteasen (Kollagenase, Stromelysin) zur Folge. Bindungsstellen für NF-kappa-B sind unter anderem in der Promotorregion von Interleukin (IL)-Genen (IL-2, IL-6, IL-8) nachgewiesen worden. NF-kappa-B ist im Zytosol an ein Repressorprotein der I-kappa-B-Familie gebunden, das bei Stimulation der Zelle durch Zytokine phosphoryliert und proteolytisch

abgebaut wird. Das freie NF-kappa-B-Molekül transloziert in den Zellkern und aktiviert dort die Transkription proinflammatorischer Gene. Neben der bereits erwähnten direkten Inaktivierung von NF-kappa-B induzieren Glucocorticoid-Rezeptor-Komplexe die Transkription des I-kappa-B-alpha-Gens und hemmen somit über die erhöhte Synthese dieses Inhibitorproteins die NF-kappa-B-Translokation. Immunsuppressive und antiphlogistische Effekte sind im besonderen Maße auf die Hemmung der Zytokin-Synthese (zum Beispiel Interferon gamma, Granulozyten/Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor [GM-CSF], IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, Tumor-Nekrose-Faktor alpha [TNFalpha]) und konsekutiv auf die Beeinflussung der Funktionen in das Entzündungsgeschehen involvierter Zellen (zum Beispiel Hemmung der T-Lymphozyten-Aktivierung infolge Suppression der IL-2- und IL-2-Rezeptor-Synthese) zurückzuführen. Ein weiterer Effekt von Glucocorticoiden ist deren Wirkung auf der Ebene des zellulären Energiestoffwechsels (Hemmung der RNA/DNA-Synthese in aktivierten Lymphozyten).

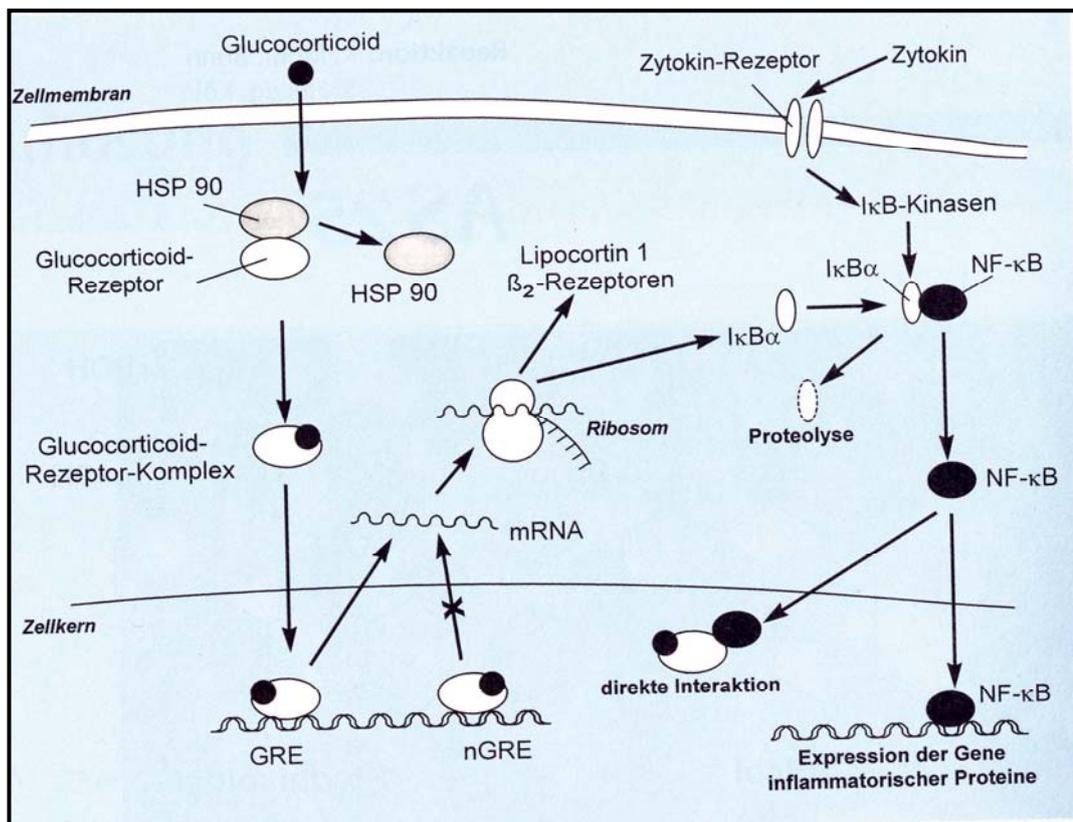


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von Prednisolon. (Text und Abbildung aus: Hinz und Schröder (1998)).

- Das Rapamycin-Derivat RAD

Bei dem in der Primaten-Studie verwendeten RAD handelt es sich um ein neues Rapamycin-Derivat, welches freundlicherweise von der Firma NOVARTIS zur Verfügung gestellt wurde. Da sich das Präparat noch in der Test-Phase befindet und genaue Daten des Wirkmechanismus zur Zeit noch nicht bekannt sind, wird im Folgenden nur kurz auf den grundsätzlichen Wirkmechanismus von Rapamycin eingegangen.

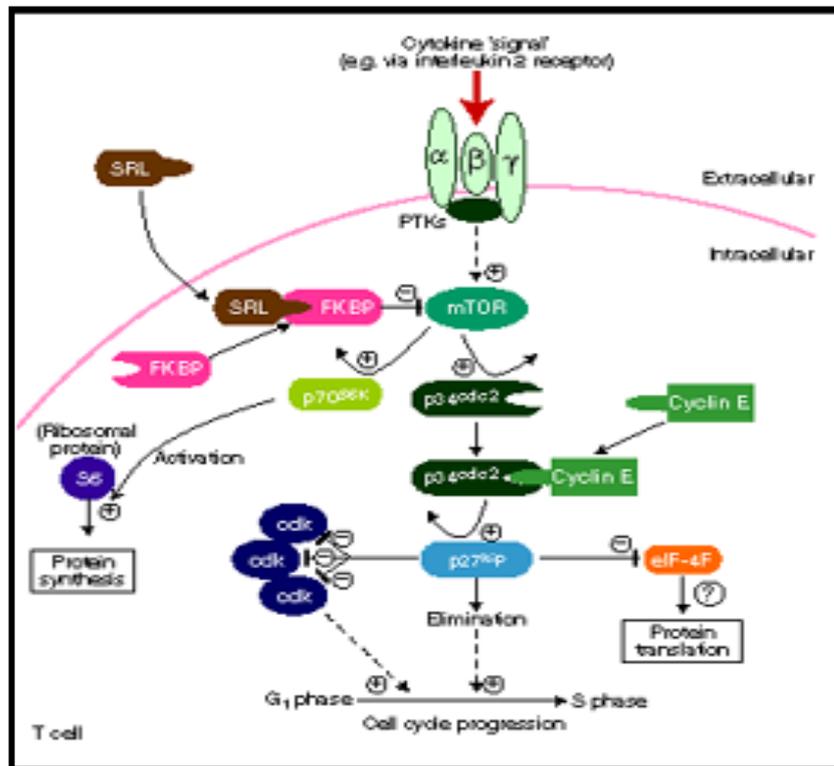


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von Rapamycin. Erläuterungen siehe Text.

Rapamycin inhibiert die Interleukin-2 (IL-2)-abhängige Proliferation von T- und B-Zellen und damit die T-Zell-vermittelte Immunantwort. Nach der Diffusion durch die Zellmembran bindet Rapamycin den intrazellulären zytosolischen Rezeptor FKBP12. Der entstehende Komplex (Rapamycin-FKBP12) bindet wiederum an mTOR (auch RAFT1) und blockiert dieses in seiner Funktion im Ras/MAP-Kinase Signalweg. Daraus resultiert ein Arrest der T-Zellen in der späten G1/S-Phase des Zell-Zyklus. Weiterhin kommt es durch die Blockade von mTOR zu einer Inhibition der 70 kD S6 Protein Kinase und damit zum Stop der zellulären Protein Synthese.

- C1-Komplement-Inhibitor und der Komplement-Depletor Cobra Venom Factor (CVF)

An dieser Stelle kann und soll nicht detailliert auf die einzelnen Aktivierungsschritte der verschiedenen Komplementwege eingegangen werden. Eine kurze Übersicht gibt [Abbildung 2.4](#). Darüber hinausgehende Informationen sind weiterführender Literatur zu entnehmen (z.B.: Walport, 2001a,b; Thomas, 1992).

C1-Inhibitor ist ein natürlicher plasmatischer Faktor und der einzige Inhibitor für die aktivierten Komplementkomponenten C1r und C1s, welche am Beginn des Antikörper-vermittelten klassischen Weges der Komplementaktivierung stehen. C1-Inhibitor verhindert damit regulatorisch eine über-

schießende Aktivierung des Komplementsystems. Darüber hinaus zeigten jüngste Untersuchungen eine Wirkung von C1-Inhibitor als Regulator des alternativen Weges der Komplementaktivierung (Jiang et al., 2001). Dabei interagiert C1-Inhibitor mit C3b und verhindert dadurch die Bindung des Faktor B an C3b. Damit kommt es zu einer Verminderten Bildung der C3 Konvertase und letztlich zu einer Inhibierung des alternativen Weges der Komplementaktivierung. Die Applikation von C1-Inhibitor in den Primaten-Versuchen dieser Arbeit diente damit der Inhibierung des klassischen wie des alternativen Weges der Komplementaktivierung.

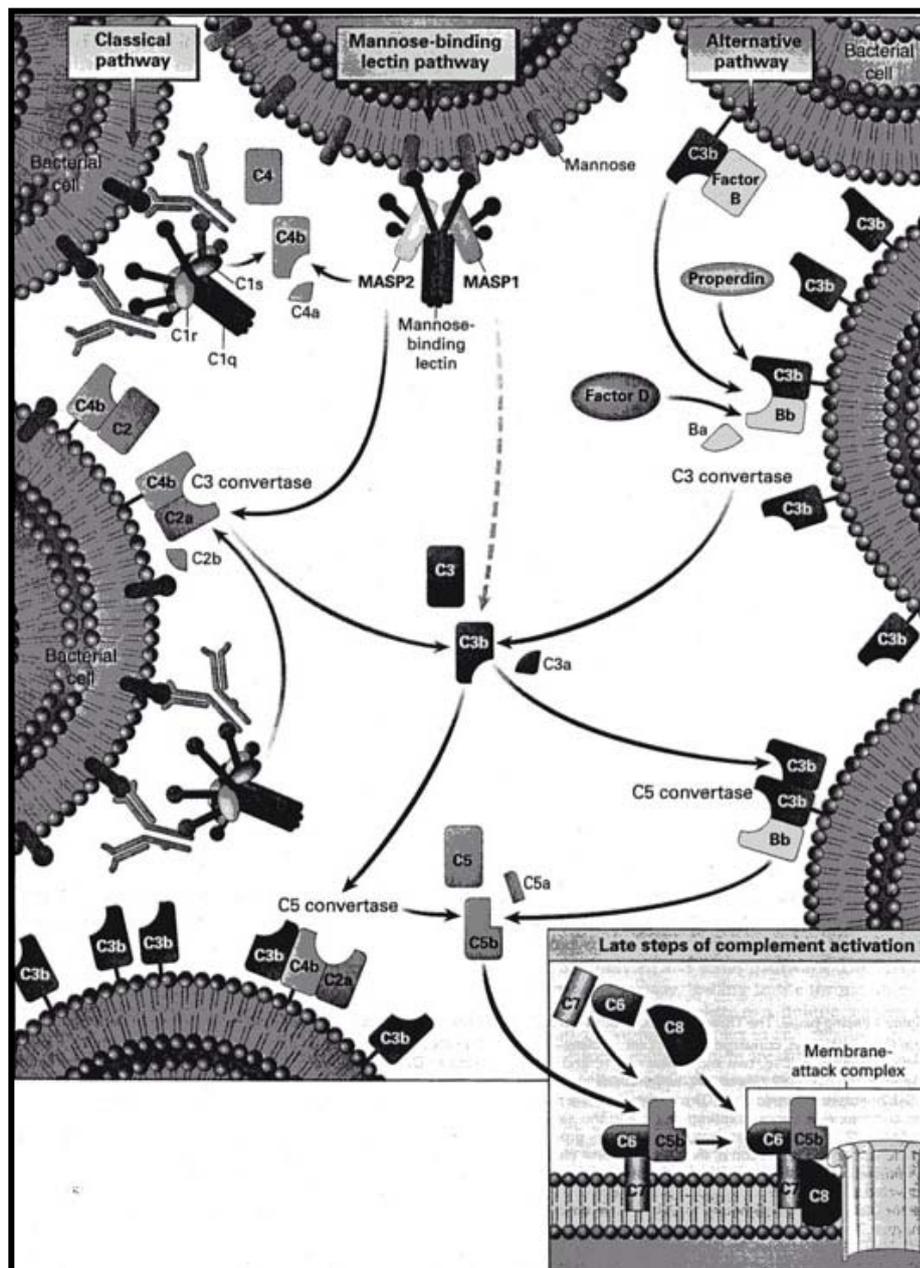


Abbildung 2.4: Schematische Wiedergabe der verschiedenen Komplementaktivierungs-Wege. (Abbildung aus Walport, 2001a).

Das aus dem Gift der Kobra (*Naja naja kaouthia*) gewonnene Anti-Komplement Protein (Cobra Venom Factor, CVF) ist ein C3b Analog. Eine bestehende Menge an Konvertase C3 des klassischen Weges zerfällt normalerweise ständig in ihre Bestandteile C3a und C3b. C3b bindet dann auf der Membran des Pathogens und bildet mit dem humanen Faktor B die Konvertase C3, welche den Fak-

tor D in Ba und Bb spaltet. Der resultierende C3b,Bb-Komplex ist die C3 Konvertase des alternativen Wegs und spaltet hoch effizient C3 in C3a und C3b zur Deponierung vieler C3b-Moleküle auf der Oberfläche des Pathogens. Die Applikation des C3b Analogs CVF induziert demzufolge eine Aktivierung des alternativen Wegs durch gesteigerte Spaltung von C3. In hohen Dosen von CVF erfolgt die Spaltung so schnell, daß es zu einem vollständigen Verbrauch von C3 und damit zu einer Inhibierung von klassischem und alternativem Weg der Komplementaktivierung kommt.

2.5.5.2 *In vivo* Infektion von Kleintieren

A) Inokulation von Ratten

Für die *in vivo* Studie mit Ratten wurden weibliche Wistar/WU Ratten (Charles River) verwendet, die in 13 verschiedenen Versuchsansätzen (Tabelle 2.12) mit drei Tiere pro Gruppe gehalten wurden. Neben Gruppen mit naiven Tieren (Gruppen 1-3, 7-9, 13) wurden auch Gruppen eingesetzt, deren Tiere jeden zweiten Tag mit 10 mg/kg Cyclosporin-A (Cs-A, Sandimmun, Novartis Pharma) i.m. immunsupprimiert wurden (Gruppen 4-6). Tiere weiterer Gruppen erhielten zusätzlich 5 Tage vor der Virus-Applikation und am Tag der Applikation je 500µg/kg Cobra Venom Faktor (CVF, Sigma) i.p. (Gruppen 10-12). Zwei weitere Gruppen (Gruppen 8 und 9) enthielten Jungtiere, welche am Tag ihrer Geburt mit 1 ml zellfreiem Überstand von PERV-produzierenden PK-15 Zellen oder von 293/PERV-Zellen i.p. inokuliert wurden. Für die Inokulation der adulten Ratten der Gruppen 1, 2, 4, 5, 8-11 wurden 2 ml zellfreier Kulturüberstand von PERV-produzierenden PK-15 oder 293 Zellen verwendet. Den Tieren wurde ein Virus-Titer von 1×10^5 TCID₅₀ pro Tier intraperitoneal (i.p.) und/oder intramuskulär (i.m.) und/oder intravenös (i.v.) appliziert (Tabelle 2.12), wobei der Virus-Titer einiger Überstände durch Ultrazentrifugation angereichert wurde (siehe 2.5.1). Den Tieren der Gruppen 1, 2, 4 und 5 wurden 8 Wochen nach der zellfreien Virusgabe zusätzlich 5×10^7 PERV-produzierenden PK-15 Zellen (80 mU RT/ml) oder 293 Zellen (350 mU RT/ml) i.p. appliziert.

Die Tiere wurden alle 4 Wochen zur Entnahme von Blut mit 5 mg/kg Ketamin (WDT) narkotisiert und das Blut mit einer Pasteurpipette aus dem Augenwinkel entnommen und sofort mit 0,5 mg/ml Heparin (Sigma) versetzt. Ein Teil des Blutes wurde zur Bestimmung des Cs-A Blutspiegels verwendet. Die Analyse wurde von Frau Dr. I. Hauser mittels eines Cyclosporin-spezifischen Testverfahrens (Emit 2000, Syva/Dade Behring) am Universitätsklinikum Frankfurt/Main durchgeführt. Aus dem anderen Teil des Blutes wurde durch Zentrifugation bei 3200 x g für 10 Minuten Serum gewonnen, welches bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert wurde.

Nach 4, 8 und 12 Wochen wurde jeweils eines der 3 Tiere jeder Gruppe euthanasiert und Milz, Nieren und Lymphknoten entnommen. Aus den Organen wurde DNA isoliert (siehe 2.2.1.3) und mittels nested-PCR auf Integration von proviraler DNA untersucht.

B) Inokulation von Meerschweinchen

Für die Versuche wurden 3 Gruppen mit je 2 adulten, naiven, weiblichen Meerschweinchen (Dunkin Hartley, Charles River) verwendet (siehe [Tabelle 2.12](#)). Die Tiere der Gruppen 1 und 2 wurden mit 2 ml zellfreiem Kulturüberstand von PERV-produzierenden PK-15 Zellen oder von 293/PERV-Zellen mit einem Virus-Titer von 1×10^5 TCID₅₀ pro Tier intramuskulär (i.m.) inokuliert. Einige der Überstände mußten dafür durch Ultrazentrifugation in ihrem Virus-Titer angereichert werden (siehe [2.5.1](#)). Nach 4, 8 und 12 Wochen wurde den Tieren Blut durch Herzpunktion entnommen, welches wie unter [A](#)) beschrieben weiter behandelt wurde. Nach 8 Wochen wurde jeweils 1 Tier pro Gruppe euthanasiert und Milz, Nieren und Lymphknoten entnommen. Die weitere Analyse erfolgte wie unter [A](#)) beschrieben. Die verbliebenen Tiere wurden in Woche 8 zusätzlich mit 5×10^7 PERV-produzierenden PK-15 Zellen (80 mU RT/ml) oder 293-NIH/3°-Zellen (350 mU RT/ml) i.p. inokuliert. In Woche 12 wurde diese Tiere ebenfalls euthanasiert, Blut zur Serum-Gewinnung abgenommen und die oben genannten Organe entnommen. Die weitere Verarbeitung erfolgte wie bereits beschrieben.

Tabelle 2.12: *In vivo* Inokulation von Ratten, Meerschweinchen und Nerzen

Die mit \$ gekennzeichneten Gruppen sind Jungtiere, die am Tag ihrer Geburt inokuliert wurden. IS: Immunsuppression; Cs-A: Cyclosporin-A; CVF: Cobra Venom Faktor; i.m.: intramuskulär; i.p.: intraperitoneal; i.v.: intravenös

Spezies	Gruppe	IS		Virus	Applikation	Zellen	Applikation
		Cs-A	CVF				
Ratte	1	-	-	PERV/PK-15	i.m., i.p.	PK-15	i.p.
	2	-	-	PERV/293	i.m., i.p.	293-PERV	i.p.
	3	-	-	-	-	-	-
	4	+	-	PERV/PK-15	i.v., i.m.	PK-15	i.p.
	5	+	-	PERV/293	i.v., i.m.	293-PERV	i.p.
	6	+	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-
	8\$	-	-	PERV/PK-15	i.p.	-	-
	9\$	-	-	PERV-NIH/3°	i.p.	-	-
	10	+	+	PERV/PK-15	i.v.	-	-
	11	+	+	PERV-NIH/3°	i.v.	-	-
	12	+	+	-	-	-	-
	13	-	-	-	-	-	-
Meerschweinchen	1	-	-	PERV/PK-15	i.m., i.p.	PK-15	i.p.
	2	-	-	PERV/293	i.m., i.p.	PERV/3°	i.p.
	3	-	-	-	-	-	-
Nerz	1	-	-	PERV/Mv1Lu	i.p.	-	-
	2	-	-	PERV/Mv1Lu	i.p.	-	-
	3	-	-	PERV/Mv1Lu	i.p.	-	-
	4	-	-	PERV/Mv1Lu	-	-	-
	5	-	-	PERV/Mv1Lu	-	-	-
	6*	-	-	PERV/Mv1Lu	i.p.	-	-
	7*	-	-	PERV/Mv1Lu	i.p.	-	-

C) Inokulation von Nerzen

Für die Versuche wurden 5 Gruppen mit jeweils einem adulten, naiven, weiblichen Amerikanischen Nerz (*Mustella vison*, Artemis) verwendet (Tabelle 2.12), wobei die Tiere der Gruppen 4 und 5 trächtige Weibchen waren. Die beiden Muttertiere verblieben als Kontrolltiere und erhielten keine Virus-Applikation. Am Tag der Geburt der Jungtiere wurden diese sowie die Tiere der Gruppen 1-3 mit 1 ml pelletiertem Virus aus zellfreiem Überstand der PERV-produzierenden Zell-Linie Mv1Lu-PERV mit einem Titer von 1×10^2 TCID₅₀/ml i.p. inokuliert. PERV-Mv1Lu wurde verwendet, da durch die Replikation in der Nerzzell-Linie Mv1Lu das Virus bei seiner Knospung (budding) von der Zellmembran Nerz-eigene Membranproteine in die Virushülle inkorporiert und damit bereits bedingt an die Spezies Nerz adaptiert ist. Nach 4, 8 und 12 Wochen wurde den Tieren Blut durch Herzpunktion entnommen, welches wie unter A) beschrieben weiter behandelt wurde. Nach 12 Wochen wurden alle Tiere euthanasiert und Blut, Milz, Nieren, Lymphknoten, Herz, Lunge, Leber, Hirn, Ovarien und der Pankreas entnommen. Die weitere Analyse erfolgte wie unter A) beschrieben.

2.5.5.3 In vivo Infektion von nicht-humanen Primaten

Für die Inokulation nicht-humaner Primaten wurden zwei Paviane (*Papio hamadryas*; **6614**: weiblich, 8 Jahre alt; 11,8 kg schwer; **7341**: weiblich; 7 Jahre alt; 11,6 kg schwer) drei Rhesus-Affen (*Macaca mulatta*; **178**: männlich; 10 Jahre alt; 10,4 kg schwer; **179**: männlich; 11 Jahre alt; 9,5 kg schwer; **180**: männlich; 11 Jahre alt; 11 kg schwer) und zwei Schweins-Affen (*Macaca nemestrina*; **6501**: männlich; 9 Jahre alt; 11 kg schwer; **6506**: männlich; Alter unbekannt; 13,7 kg schwer) verwendet. Für die Simulation einer klinischen Xenotransplantation wurden alle Tiere täglich mit einer Dreifach-Kombination aus Cyclosporin-A (Cs-A), Prednisolon und dem Rapamycin-Derivat RAD immunsupprimiert. Die Konzentrationen der Immunsuppressiva richteten sich dabei nach Erfahrungswerten aus der Literatur (Schuurman et al., 1997; 2000; Minanov et al., 1998), sowie nach den Angaben der Hersteller über Verträglichkeit und Pharmakokinetik in experimentellen Transplantationen. In jedem der Tiere wurde der Plasmaspiegel der einzelnen Immunsuppressiva über die gesamte Dauer des Experiments bestimmt. Die Bestimmung des Cs-A wurde von Frau Dr. I. Hauser mittels eines Cyclosporin-spezifischen Testverfahrens (EMIT 2000[®], Syva/Dade Behring) in der Nephrologischen Abteilung des Universitätsklinikums Frankfurt/Main durchgeführt. Die Nachweisgrenze für Cs-A betrug dabei 20 ng/ml. Die Bestimmung des Methylprednisolons wurde von Herrn Prof. Dr. F. Pragst mittels HPLC in der Abteilung für Toxikologische Chemie am Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Charité der Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt. Die Nachweisgrenze von Methylprednisolon betrug dabei 10 ng/ml. Die Bestimmung des Rapamycin-Derivats RAD wurde mittels LC/MS am Institut für Pharmakologie und Pharmakokinetik der Novartis Phar-

ma AG in Basel, Schweiz, durchgeführt. Die Nachweisgrenze für RAD betrug dabei 2,143 ng/ml. Das Versuchsdesign erstreckte sich über einen Zeitraum von fast einem Jahr (336 Tage) und unterteilte sich in zwei Phasen, in deren Verlauf die Tiere 1-3 Virusapplikationen mit PERV/5° erhielten ([Abbildung 2.5](#)). In Phase 1 (Tag 1-200) wurden den Rhesus-Affen 178 und 179, sowie beiden Pavianen und beiden Schweins-Affen täglich jeweils 10 mg/kg Cyclosporin-A (Cs-A; Sandimmune, Novartis Pharma AG, Basel, CH) i.m., 0,8 mg/kg Methylprednisolon-Acetat (Depot-Medrol, Upjohn, Kalamazoo, USA) i.m. und 0,075 mg/kg des Rapamycin-Derivats RAD (Novartis Pharma AG, Basel, CH) s.c. appliziert. Die Applikation von Cs-A wurde 5 Tage vor der Virusgabe begonnen. Am Tag der 1. Inokulation wurden zusätzlich 15 mg/kg Methylprednisolon Natrium-Succinat (Solu-Medrol, Upjohn, Kalamazoo, USA) einmalig i.v. appliziert. Für die Virus-Inokulation wurde zellfreier Kulturüberstand von 293/5° Zellen mit einem Titer von 1×10^7 TCID₅₀/ml verwendet. Die Gesamtdosis von 1×10^9 TCID₅₀/100 ml wurde mit jeweils 50 ml einmal i.p. injiziert, und einmal i.v. infundiert. Über den gesamten Zeitraum der Phase 1 wurde allen Tieren regelmäßig Blut entnommen, welches für immunologische Untersuchungen und DNA Isolationen verwendet wurde. Die applizierten Immunsuppressiva verursachten bei einigen Tieren Komplikationen, so daß 14 Tage nach Inokulation der Rhesus-Affe 179 aufgrund einer bakteriellen Infektion euthanasiert werden mußte. Aus ähnlichen Gründen wurde ab Tag 21 bzw. ab Tag 50 nach Inokulation die Immunsuppression für den Rhesus-Affen 178 und den Pavian 7341 bis zum Beginn der Phase 2 ausgesetzt. 200 Tage nach Inokulation wurde die Immunsuppression für den Pavian 6614 bis zu Beginn der Phase 2 gestoppt und die beiden Schweins-Affen 6501 und 6506 euthanasiert. Den euthanasierten Tieren wurden bei der Sektion Milz, Nieren, Herz, Lunge, Leber Hirn und Lymphknoten entnommen. Aus den Organen wurde DNA isoliert (siehe **2.2.1.3**), welche anschließend mittels nested-PCR auf eine Integration von PERV-Proviren untersucht wurde (siehe **2.2.2**).

260 Tage nach der ersten PERV-Inokulation begann Phase 2 der *in vivo*-Studie (Tag 200-336), in der die Rhesus-Affen 178 und 180, sowie die Paviane 6614 und 7341 wie in Phase 1 mit der täglichen Applikation von Cs-A, Prednisolon und RAD immunsupprimiert wurden (siehe oben). Die Applikation von Cs-A begann 10 Tage vor der 2. Virus-Inokulation. 3 Tage vor der 2. Inokulation wurden den Tieren 500 Einheiten des C1-Esterase Inhibitors Berinert[®] HS (Aventis Behring) i.v. appliziert, um das Komplementsystem der Tiere zu inhibieren. Am Tag der 2. Inokulation wurden den Tieren weitere 500 Einheiten Berinert[®] HS, 10 mg/kg Cs-A und 15 mg/kg Methylprednisolon Natrium-Succinat i.v. appliziert. Dem Rhesus-Affen 178 und dem Pavian 6614 wurden 312 ml zellfreier Überstand von 293/5° Zellen an verschiedenen Applikationsstellen inokuliert: 250 ml i.v., 50 ml i.p., 2 x 5 ml s.c. und 2 x 1 ml i.m.. Dem Rhesus-Affen 180 und dem Pavian 7341 wurden an den gleichen Applikationsstellen im gleichen Volumen Virus-haltigen Überstands zusätzlich 1×10^9 293/5° Zellen injiziert.

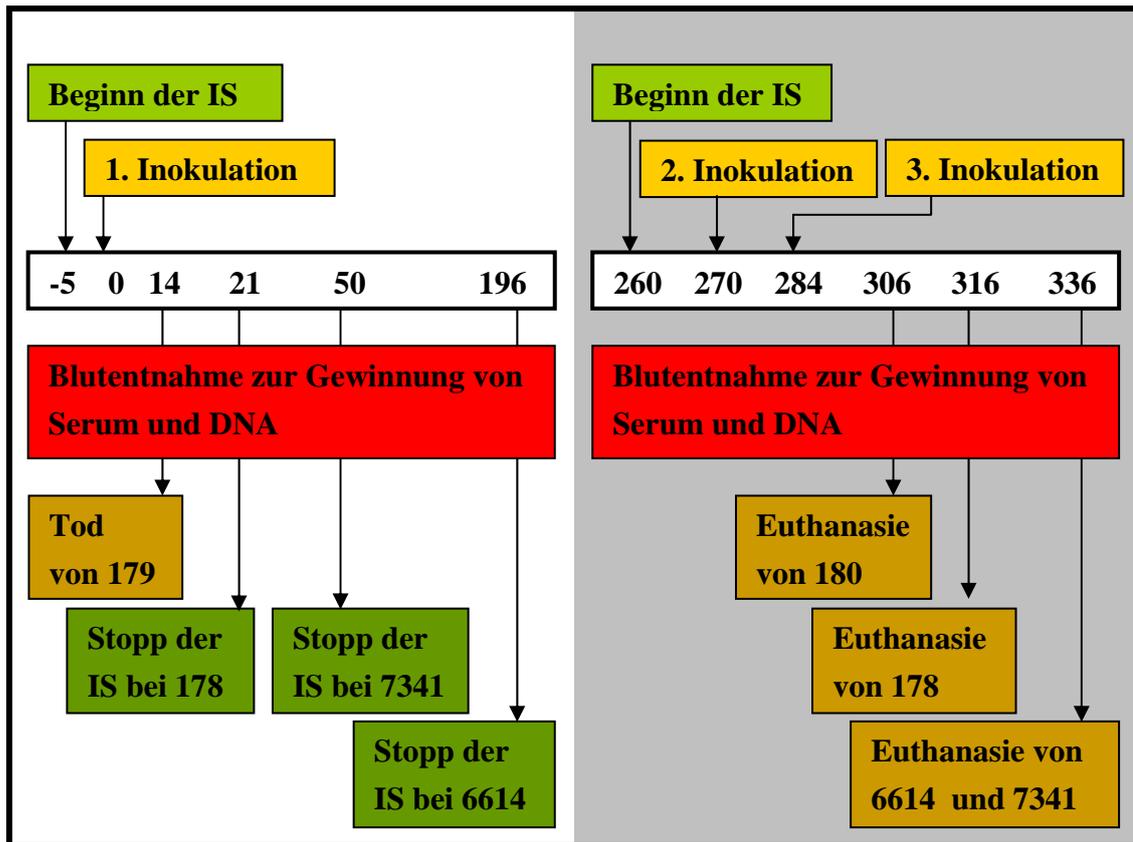


Abbildung 2.5: Schematische Übersicht der *in vivo*-Studie mit nicht-humanen Primaten. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Am Tag 284 erfolgte eine dritte Inokulation von PERV/5°, die in der Art der Virusapplikation der 2. Inokulation vollständig entsprach. Allerdings wurde hier kein C1-Esterase Inhibitor appliziert.

Über den gesamten Zeitraum der Phase 2 wurde den Tieren alle 7 Tage Blut entnommen, welches für die Gewinnung von Serum, die Isolation von DNA und die Bestimmung der Immunsuppressiva-Konzentration im Plasma verwendet wurde. Weiterhin wurde den Tieren alle 4 Wochen Blut entnommen, welches nach Isolation von PBMCs für die Bestimmung der Verteilung von CD4⁺/CD8⁺ Zellen mittels FACS-Analyse verwendet wurde.

Die Euthanasierung der Tiere erfolgte 306 (Rhesus 180), 313 (Rhesus 178) und 336 (Paviane 6614 und 7341) Tage nach Beginn der Studie. Allen Tieren wurde bei der Sektion Milz, Nieren, Herz, Lunge, Leber, Hirn und Lymphknoten entnommen, aus welchen im Anschluß DNA isoliert wurde.

1. EINLEITUNG

Die Behandlung und die Heilung Kranker begleitet die Menschheit seit jeher und ist integraler Teil jeder Kulturgeschichte. Insbesondere die letzten Jahrzehnte des 20. Jahrhunderts zeichneten sich aufgrund intensiver Forschung durch neue Heilverfahren und innovative Behandlungsmethoden aus. Die Transplantationsmedizin nahm dabei eine bedeutende Schlüsselposition ein, da hier gleichermaßen anatomische, immunologische, physiologische, ethische und rechtliche Hürden genommen werden mußten. Doch die stete Zunahme an erfolgreichen Transplantationen führt heute zu einem Mangel an verfügbaren Spenderorganen, so daß zur Zeit fast ein Viertel der Patienten im Verlauf ihrer Wartezeit auf ein passendes Transplantat versterben. Die moderne Medizin sieht sich daher gezwungen, Alternativen zu den bisher verfügbaren Allotransplantaten (gr. *allos*: anders) zu finden. Neben der Entwicklung künstlicher Organe (z. B. des künstlichen Herzens, Anderson et al., 2000; SoRelle, 2000) und der Herstellung von Geweben aus körpereigenen Zellen mittels „Tissue-Engineering“ (z.B. Hautgewebe, Tanczos et al., 1999), könnte die Transplantation von tierischen Zellen, Geweben und Organen, die sogenannte Xenotransplantation (gr. *xenos*: fremd), eine Möglichkeit bieten, einen akuten Organmangel zumindest zeitweise zu überbrücken.

1.1 Xenotransplantation

Da es sich bei den mit der Xenotransplantation assoziierten Forschungsbereichen um ein Feld schneller experimenteller und klinischer Entwicklung handelt, werden im Folgenden einige Daten der beteiligten Wissenschaften dargestellt, welche zu Beginn dieser Arbeit bekannt waren, und teilweise die Grundlage der durchgeführten Experimente boten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden dann unter 4. anderen aktuellen Daten gegenübergestellt und eingehend diskutiert.

Bereits bei den Hochkulturen der Antike, sowie in der Welt der Fabeln und Märchen werden Mischwesen aus verschiedenen Tierarten oder aus Mensch und Tier beschrieben. Doch werden nicht nur diese Kreaturen die Inspiration für die ersten experimentellen Xenotransplantationen geliefert haben. Auch das Streben nach neuem Wissen wird die damaligen Mediziner dazu veranlaßt haben, auf diesem Weg sonst unheilbar Kranke zu behandeln. Bereits seit dem 17. Jahrhundert gibt es Aufzeichnungen von ersten Xenotransplantationen, wobei diese initialen Experimente direkt am Menschen durchgeführt wurden.

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts ermöglichte die Entwicklung der Gefäßnaht (Carrel, 1902 (2001)) die Transplantation solider Organe in allogenen, wie auch in xenogenen Systemen. Jedoch verurteilte das mangelnde immunologische Wissen die ersten Transplantationen zu einem kläglichen Scheitern. Insbesondere die hyperakute Abstoßung von artfremdem Gewebe ließ die Xenotransplantation von Teilen einer Kaninchenniere in die Niere eines Kindes durch Prineteau 1905 (Young, 2002) zu einem Mißerfolg werden. Die Gefäßanastomose von Schweine- und Ziegenmieren an die Blutgefäße an Unterarm bzw. Unterschenkel von Patienten durch Jaboulay 1906 (Jaboulay, 1906), sowie die Transplantation einer Rhesusaffen-Niere auf eine Frau durch Unger 1909 (Unger, 1910) scheiterten ebenfalls aufgrund der Abstoßungsreaktionen der Rezipienten. 1960 führte die Entwicklung von Thiopurinen wie Azathioprin zu ersten experimentellen Erfolgen in der pharmakologischen Hemmung der Transplantatabstoßung und 1962 wurde Azathioprin als erstes Immunsuppressivum in der Therapie eingesetzt. Als ein weiterer Durchbruch in der Geschichte der Xenotransplantation kann das neunmonatige Überleben eines Patienten nach der Transplantation von Schimpansen-Nieren in dessen Oberschenkelbeuge angesehen werden (Reemtsma et al., 1964). Im Verlauf der folgenden 20 Jahre kam es zu zahlreichen weiteren Xenotransplantationen, wobei neben der Niere auch Herzen (Hardy et al., 1964; Cooley et al., 1968; Barnard et al., 1977) und Lebern (Starzel et al., 1964, 1993) transplantiert wurden. Im gleichen Zeitraum kam es zur Entdeckung der Cyclosporine in dem Bodenpilz *Tolypocladium inflatum Gams* (1970), von denen Cyclosporin A nach pharmakologischen Studien 1982 als das bis dahin potenteste Immunsuppressivum Sandimmun auf den Markt kam. Mit dem wachsenden Wissen um Bedeutung und Funktion des Immunsystems, sowie dessen Inhibierung mittels immer besserer Immunsuppressiva, kam es zu einem sprunghaften Anstieg erfolgreicher Transplantationen. Trotz dieser Entwicklungen, und der Erkenntnis, daß neonatale Spender, sowie neonatale Empfänger, die günstigsten Voraussetzungen für eine Xenotransplantation bieten, scheiterte die Transplantation eines 7 Monate alte juvenilen Pavian-Herzens auf das neugeborene Baby Fae (Baily et al., 1985). 21 Tage nach dem Eingriff verstarb das Kind an Multiorganversagen, aber bei schlagendem Herzen, und ließen diese Xenotransplantation traurige Berühmtheit erlangen. Die letzten Xenotransplantationen solider Organe auf Menschen fanden 1992 mit der Transplantation eines Schweineherzens und 1994 mit der Verpflanzung einer Schweineleber (Makowka et al., 1994) statt. Beide Rezipienten verstarben innerhalb von 24 Stunden an den Folgen einer hyperakuten Abstoßungsreaktion.

In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß im Gegensatz zu der Xenotransplantation von soliden Organen die klinische Anwendung der zellulären Xenotransplantation beim Menschen bereits wesentlich weiter fortgeschritten ist. Insbesondere bei der Therapie von Erkrankungen bzw. Schädigungen des zentralen Nerven-

systems, bei der Therapie von Diabetis oder bei akutem Leberversagen findet die xenogene zelluläre Transplantation bereits häufigen Einsatz. Bei der Behandlung der neurodegenerativen Krankheiten des Morbus Parkinson und der Huntington'schen Krankheit mit fötalen porcinen Zellen des ventralen Mesencephalon, zeigten die Patienten über 12 Monate eine deutliche Verbesserung der klinischen Symptome (Fink et al., 2000; Schumacher et al., 2000). Im Fall von Patienten mit Typ I Diabetis konnte durch Implantierung verkapselter, fötaler porciner Inselzellen eine Substitution der eigenen verminderten Insulinproduktion über den Zeitraum von 2 Jahren erreicht werden (Elliott et al., 2000).

Ebenfalls unter den Begriff der Xenotransplantation fallen extrakorporale Nieren- und Leberperfusionen mit nicht-humanen Organen, sowie bioartifizielle Leberunterstützungssysteme, welche mit nicht-humanen Hepatocyten funktionieren. Bei letzteren kommt es durch ein maschinelles Pumpsystem zum Durchfluß des Rezipienten-Blutes durch einen Bioreaktor mit z.B. porcinen Hepatocyten. Das Blut wird dann nach seiner Entgiftung wieder in den Körper des Patienten zurück gepumpt. Die genannten Systeme konnten so bereits lebensbedrohende Situationen von Patienten mit akutem Nieren- oder Leberversagen über Stunden erfolgreich überbrücken (Patience et al., 1998; Pitkin und Mullon 1999; Levy et al., 2000).

Gegenüber den immunologischen Hürden bei der Xenotransplantation solider Organe ergibt sich der Erfolg der zellulären Xenotransplantation insbesondere aus der Möglichkeit, einzelne Zellen oder Zellverbände durch Verkapselung vor dem Zugriff des Immunsystems zu schützen. Diese Tatsache hat nicht nur aus immunologischer Sicht Relevanz, sondern trägt auch zu der Frage der mikrobiologischen Sicherheit des jeweiligen Xenotransplantates bei. Bei der Diskussion um einen eventuellen dauerhaften klinischen Einsatz der Xenotransplantation muß daher zwischen dem Einsatz von xenogenen Zellen und Geweben und der Xenotransplantation solider Organe grundlegend unterschieden werden.

1.1.1 Mögliche Spendertiere

Als potentielle Spendertiere für Xenotransplantate sind vorwiegend aus phylogenetischen Gründen die nicht-humanen Primaten der Altwelt in Betracht gezogen worden (Goodman et al., 1994). Untersuchungen zeigten eine relative Kompatibilität von Primaten-Organen in der Anatomie und Physiologie, sowie eine Kompatibilität der Blutgruppen (O'h Uigin et al., 1997), was im Vergleich zu Transplantaten anderer Donor-Spezies zu einer verhältnismäßigen Akzeptanz der Primaten-Organe im humanen Rezipienten führt (Bontrop et al., 1993). Doch Probleme bei der Züchtung und Haltung der Tiere, ihre geringe Nachkommenzahl und die langen Gestationszeiten (Harcourt et al., 1980), sowie der strenge Artenschutz der Menschenaffen (Ezzell, 1988) führte dazu,

daß diese Spezies zur Zeit nicht mehr als potentielle Spender favorisiert werden (Allan, 1998). Darüber hinaus deutet sich an, daß die mikrobiologische Sicherheit der Transplantate nicht gewährleistet werden kann, da bereits Übertragungen von Mikroorganismen wie dem simianen Foamy Virus (SFV), dem endogenen Retrovirus der Paviane (BaEV) und dem Cytomegalievirus der Paviane (BCMV) bei ersten klinischen Xenotransplantationen von Pavian-Lebern auf Menschen beobachtet werden konnten (Allan et al., 1998; Michaelis et al., 2001).

Als eine mögliche Alternative werden daher zur Zeit Schweine als potentielle Spender von Xenotransplantaten favorisiert. Zwar sind diese als Paarhufer phylogenetisch von den Menschen wesentlich weiter entfernt als die nicht-humanen Primaten, doch gibt es trotzdem eine Vielzahl anatomischer und physiologischer Übereinstimmungen (Hannon et al., 1990). Allerdings gibt es auch einige insbesondere physiologische Differenzen, welche für die Xenotransplantation gravierende Probleme mit sich bringen könnten. Die Verlagerung der im Spenderorganismus horizontal angeordneten Organe in eine vertikale Orientierung im humanen Rezipienten hat nachweislichen Einfluß auf die Funktion der Organe (West, 1984). Als ein weiteres Problem wird die Bildung und Erkennung von Hormonen angesehen, welche meist sehr komplexen Regulationsmechanismen unterliegen. Das humane Parathormon ist z.B. mit der porcinen Niere inkompartibel, so daß es zu einer vermehrten Ausscheidung von Phosphor kommt. Dies resultiert in einer Hypophosphatämie im Serum, welches für den Menschen lebensgefährliche Folgen haben könnte (Zaidi et al., 1998). Auch bleibt fraglich, ob alle der etwa 2500 von der porcinen Leber produzierten Enzyme und Hormone in dem fremden Milieu des humanen Rezipienten mit gleicher Effizienz produziert werden und ihre zum Teil lebenswichtigen Funktionen ausüben können (Schön et al., 1999).

In diesem Zusammenhang wird zur Zeit die Frage nach der hormonellen Regulation des Wachstums und des Alterns als fundamentale Hürde angesehen. Für das humane Wachstumshormon konnten Kreuzreaktionen in Tierexperimenten gezeigt werden. Da allerdings der antagonistische Inhibitor fehlte, kam es zu einem unbegrenzten Wachstum von Organen mit letalen Folgen. Ob sich ein porcines Xenotransplantat der Regulation des humanen Wachstums unterordnen würde, bleibt daher bislang fraglich. Auch bleibt unklar, ob sich die Alterung der porcinen Organe dem um ein Vielfaches langsameren humanen Alterungsprozess anpassen wird. Der physiologische Aspekt bleibt daher bis zur klinischen Realisierung von Xenotransplantationen solider Organe Gegenstand intensiver Forschung.

1.1.2 Immunologie der Xenotransplantation

Das Immunsystem der Wirbeltiere dient als lebensnotwendige Schutzbarriere gegen fremdwirkende Strukturen. Dabei erfüllt es vorwiegend die Aufgabe der effektiven Ab-

wehr von Mikroorganismen. Im Fall des Einbringens von körperfremder Substanz in den Organismus im Rahmen einer (Xeno)Transplantation, kommt es ebenfalls zu einer Aktivierung des Immunsystems, aufgrund seiner Fähigkeit, körperfremde Substanz von körpereigener zu unterscheiden.

Das Immunsystems induziert daher bei einer allogenen wie auch bei einer xenogenen Transplantation aufgrund einer Gewebsunverträglichkeit (Histoinkompatibilität) eine immunologische Abstoßungsreaktion gegen das Transplantat. Im Gegensatz dazu bleibt eine solche Reaktion bei einer autologen Transplantation (innerhalb der selben Person) oder einer syngenen Transplantation (zwischen genetisch identischen Individuen) aus. Bei der xenogenen Transplantation ist bemerkenswert, daß die Histoinkompatibilität bei einer konkordanten Xenotransplantation (zwischen phylogenetisch weit entfernten Spezies, z.B. Schwein/Mensch) wesentlich stärker ist als bei einer diskordanten Xenotransplantation (zwischen phylogenetisch näher verwandten Spezies, z. B. Maus/Ratte). Die dabei auftretenden immunologischen Reaktionen lassen sich prinzipiell in 4 zeitliche Phasen gliedern:

1. Die hyperakute vaskuläre Abstoßung (HAR)

Die hyperakute Abstoßung von Transplantaten tritt nach einigen Minuten bis Stunden auf. Es kommt durch präformierte Antikörper gegen Epitope von Gal- α -1,3-gal-Resten, die auf den Zellen aller Säugetiere, ausgenommen des Menschen und der Altwelt-Affen, vorkommen (Lin *et al.*, 1998; Sandrin *et al.*, 1993), und dem Komplementsystem zu Schädigungen des endothelialen Gewebes der Blutgefäße. Als Folge treten Zellen und Flüssigkeit aus, es bilden sich Thromben, die dann durch Blockierung der Feindurchblutung das Transplantat von der Blutversorgung abschneiden und schließlich zu Nekrosen und zum Organversagen führen. Von allen bei der Xenotransplantation auftretenden Abstoßungsreaktionen ist die hyperakute vaskuläre Abstoßung die bereits am besten regulierbare bzw. inhibierbare Reaktion.

Zur Vermeidung der HAR wurden mehrere Strategien entwickelt. Zum einen wurden neutrale, aus Schweinemagen-Mucin isolierte Oligosaccharide getestet, die Anti-Gal- α -1,3-gal-Immunglobuline *in vitro* binden und die Zytotoxizität von humanen Seren auf Schweinezellen reduzierten (Li *et al.*, 1996). Zum anderen konnte die HAR auch durch Plasmapherese, bei der Antikörper gegen Gal- α -1,3-gal aus dem Serum entfernt wurden, unterdrückt werden. Ein weiterer Ansatz war die genetische Modifikation von Schweinen, die Entwicklung transgener Schweine. Dabei wurden die Schweine z.B. mit Genen ausgestattet, die Enzyme kodieren, die zur Verringerung der Expression von Gal- α -1,3-gal Zuckerresten an der Zelloberfläche beitragen (Artrip *et al.*, 1997; Osman *et al.*, 1997). Der Versuch, die Gene der α -1,3-Galactosyltransferase durch knock-out Verfahren aus dem Genom der Schweine zu entfernen, konnte anfänglich nicht realisiert werden (Vanhove *et al.*, 1998). Es war allerdings möglich, Gene, die humane Komplementsystem-Regulatorproteine kodieren, z.B. hDAF (decay-accelerating factor, CD55) (Schmoekel *et al.*, 1997), MCP (Membran-Cofaktor-Protein, CD46) oder Protectin (CD59) (Byrne *et al.*, 1997), in das porcine Genom einzufügen, so daß durch deren Expression die Zerstörung des fremden Gewebes durch die HAR nicht mehr möglich ist. Heute sind auf dem Gebiet der Regulation der HAR viele weitere Fortschritte erzielt worden. So ist es bereits gelungen, zumindest eines der vermutlich zwei kodierenden Gene der α -1,3-Galactosyltransferase aus dem Genom der Schweine zu entfernen (Dai *et al.*, 2002; Lai *et al.*, 2002).

2. Die akut vaskuläre Abstoßung

Die auch als verzögerte Xenotransplantat-Reaktion bezeichnete akute vaskuläre Abstoßung gilt zur Zeit als die schwierigste immunologische Hürde der xenogenen Organtransplantation (Platt et al., 1998) und ist bislang am wenigsten verstanden. Neben den Gal-Epitopen wurden auf porcinen Gefäßendothelzellen weitere Kohlenhydrat-Antigene gefunden, gegen die im menschlichen Blut natürliche Antikörper vorkommen (Cooper, 1998). Durch diese natürlich vorkommende Antikörper erfolgt eine Endothelzellaktivierung des Typs II, was zu einer Abstoßung des Transplantats innerhalb weniger Tage führt. Durch Expression von Adhäsionsmolekülen kommt es zur Anlagerung und Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Monozyten (Sandrin und McKenzie, 1999). Weiterhin kommt es zur Ausschüttung von Entzündungs-fördernden Zytokinen (z.B. IL-2; IL-8) und zur Expression des „Tissue Factor“. Letzterer induziert ein lokales gerinnungsförderndes Milieu, welches schließlich zur Fibrinablagerung und zur intravaskulären Thrombose führt.

3. Die akute T-Zell-vermittelte Abstoßung

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen humoralen Immunreaktionen spielen bei den T-Zell-vermittelten Abstoßungsreaktionen Antikörper keine Rolle. Hier erfolgt vielmehr die Erkennung des Fremdgewebes über die Präsentation von Antigenen durch dendritische Zellen oder über das Histokompatibilitätskomplex (MHC)-II-Molekül auf der Oberfläche der Zellen des Transplantats. Es kommt somit zu einer Aktivierung von T-Lymphozyten und gleichzeitig zur Induktion der klonalen Expansion von CD4-positiven T-Helferzellen und CD8-positiven zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) (Satake et al., 1996, Yamada et al., 1995). Weiterhin werden massiv Entzündungs-fördernde Zytokine ausgeschüttet. Untersuchungen zeigten, daß die Endothelzellen vieler porciner Gewebsabschnitte für die humanen T-Lymphozyten als besonders immunogen gelten (Dorling und Lechler, 1998). Dies erklärt sich daraus, daß mit zunehmender phylogenetischer Distanz von Donor und Rezipient, die Fähigkeit zur Induktion der spezifischen immunologischen Reaktionen zunimmt, wogegen deren Inhibierung mittels Immunsuppressiva rapide abnimmt (Auchincloss und Sachs, 1998). Die Aktivierung von T-Zellen ist damit der Beginn einer binnen Tagen und Wochen ablaufenden Reaktionskette von entzündlichen und gewebsdestruktiven Folgereaktionen, die letztlich zur Transplantatzerstörung führen.

Für die Sicherung des Erfolgs einer Transplantation werden herkömmlicherweise immunsuppressive Medikamente, wie z.B. Cyclosporin A, Cyclophosphamid, FK 506, Rapamycin und Desoxyspergualin und deren Kombination, appliziert, um die Immunreaktionen des Rezipienten zu unterdrücken (Meriggi *et al.*, 1994). Ungeklärt ist, wie weit die im Vergleich zur Allotransplantation höher anzusetzende Medikation mit Immunsuppressiva die Entstehung von Tumoren fördert, da eine lebenslange Einnahme von immunsuppressiven Medikamenten nötig wäre. So könnte es bei Xenotransplantatempfängern, ähnlich wie bei Allotransplantatempfängern, zur Entwicklung von Non-Hodgkin-Lymphomen oder anderen Krebsarten und zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen kommen. Daher ist es womöglich erforderlich, neuartige, auf die Xenotransplantation zugeschnittene, Immunsuppressiva zu entwickeln, um die obengenannten Risiken (Entstehung von Tumoren usw.) zu vermindern. In diesem Zusammenhang muß weiterhin bedacht werden, daß die Applikation von Immunsuppressiva die natürliche Schutzfunktion des Immunsystems zumindest partiell aufheben wird, und somit die potentielle Übertragung von Mikroorganismen erleichtern könnte (siehe 1.2).

4. Die chronische Transplantat-Abstoßung

Bei dieser späten Form der Abstoßung kommt es binnen Monaten bis Jahren aufgrund von Gewebeproliferation zur Verengung und letztlich zu dem Verschluß von Gefäßen (Transplantat-Vaskulopathie) und zu interstitiellen Gewebsfibrose. Die initialen Prozesse der chronischen Abstoßung bestehen aus einem komplexen Netzwerk immunologischer und nicht-immunologischer Auslöser, welche bislang weitgehendst unbekannt sind. Allerdings gibt es ähnliche Abläufe bei der Allotransplantation, so daß aus diesen klinischen Erfahrungen Rückschlüsse auf die Prozesse bei der Xenotransplantation gezogen werden können. Vermutlich erfolgt die Abstoßung in zwei Phasen, wobei die erste Phase aus reversiblen Entzündungsprozessen durch die antigene Transplantatwirkung besteht. In einer zweiten Phase kommt es dann durch Antigen-unabhängige Abläufe zu einer irreversiblen Proliferationsförderung des Gewebes durch Wachstumsfaktoren (Shen *et al.*, 1998). Der damit immer weiter zunehmende Verschluß der Gefäße resultiert letztlich in Nekrosen und dem Versagen des transplantierten Organs. Erfahrungen aus der Allotransplantation zeigten, daß die Prozesse bei der chronischen Abstoßung besonders problematisch sind, da sie gegenüber den bei der akuten Abstoßung hochwirksamen Immunsuppressiva resistent sind.

1.2 Mikrobiologische Risiken bei der Xenotransplantation

Die Xenotransplantation birgt neben den immunologischen und physiologischen Problemen, das Risiko der Übertragung von Mikroorganismen. Allerdings ist bis heute auch die Allotransplantation mit dem Risiko einer Übertragung bekannter wie unbekannter Erreger behaftet (Beckmann *et al.*, 2000). Dies resultiert meist aus der Kürze von wenigen Stunden innerhalb welcher Organe von z.B. Unfallopfern auf den wartenden Emp-

fänger transplantiert werden müssen. Auch kommt es in einigen seltenen Fällen zu der Situation, daß das Risiko einer Infektion mit Pathogenen durch die Transplantation kontaminierter Organe bewußt einkalkuliert wird, um das Leben des Patienten zumindest zeitweise zu retten. Weiterhin ist der notwendige Einsatz von Immunsuppressiva oft der Auslöser von latent vorhandenen Infektionen. Demgegenüber könnte die Verwendung von Xenotransplantaten die Verfügbarkeit von standardisierten und untersuchten Organen ermöglichen. Dabei gilt es aber zunächst, die bekannten potentiell übertragbaren Erreger aus den Spendern zu eliminieren, da sich sonst das Problem einer Xenozoonosis einstellen könnte. Dieses könnte zusätzlich zu dem Rezipienten selbst auch das soziale Umfeld des Patienten gefährden.

1.2.1 Infektionsgefahren

Mit Hinblick auf eine potentielle Verwendung von Schweinen als Spender für Xenotransplantate, muß die Kontamination der Tiere mit Mikroorganismen besondere Beachtung finden. Trotz Jahrhunderte langer Nutzung und Züchtung von Schweinen sind bis heute viele der Tiere mit unzähligen pathogenen wie nicht-pathogenen Keimen durchseucht. Als nicht-virale Schweinepathogene seien hier nur *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Trichinella spiralis*, *Streptococcus suis*, *Campylobacter coli*, *Mycobacterium avium*, *Leptospira interrogans*, *Brucella suis*, *Listeria* und *Erysipelothrix rhusiopathiae* genannt, da sie nachweislich auf den Menschen übertragbar sind (Beckmann et al., 2000). Jedoch lassen sich diese bekannten Erreger durch Zucht und Haltung unter SPF (Specified Pathogen Free)-Bedingungen eliminieren (Swindle, 1998). Mit Hinblick auf eine Risikobewertung der Xenotransplantation sind Viren von besonderer Bedeutung und werden daher im weiteren Gegenstand der Betrachtung sein. Die heute existierenden Schweinestämme enthalten nach wie vor humanpathogene Viren, welche zum Teil fatale Infektionen auslösen können. Die Übertragung des Schweineinfluenzavirus auf den Menschen führte z.B. zu einem Epidemie-artigen Sterben von über 20 Millionen Menschen zwischen 1918 und 1919 (Taubenberger et al., 1997). Auch heute gibt es noch aktuelle Berichte von letal verlaufenden Infektionen mit diesem Virus (Rota et al., 1989). Das zu den Orthomyxoviren gehörende Virus zeichnet sich dabei durch eine hohe Variabilität aus, da verschiedene Virusstämme ihre Hüllproteine untereinander austauschen können („Pseudotyping“). Außerdem ermöglicht sein segmentiertes Genom ein hohes Maß an Rekombination, wodurch immer neue pathogene Eigenschaften entstehen können.

Als ein weiteres zoonotisches Virus wurde kürzlich das Schweineparamyxovirus Nipah beschrieben (Paton et al., 1999), welches bei Arbeitern auf asiatischen Schweinefarmen viele Todesfälle auslöste. Das zu den Flaviviren gehörende Japanische Enzephalitis Virus (JEV) wird nach Replikation im Schwein durch Stechmücken auf den Menschen

übertragen und führt dort zu schweren Krankheiten und letztlich zum Tod. Weitere in Schweinen vorkommende Viren wie das Vesicular Stomatitis Virus (VSV), das Maul- und Klauenseuchevirus, das Swine Vesicular Disease Virus (SVDV), das Tollwutvirus, das Vacciniavirus, das Schweinepapovirus (PPV), das Schweinepockenvirus, das porcine Enzephalomyocarditisvirus (EMCV), die Schweinecircoviren PCV 1 und 2, sowie das kürzlich entdeckte Schweinehepatitisvirus können den Menschen infizieren (Meng et al., 1997), haben jedoch für diesen bei normaler Immunkompetenz meist nur geringe Folgen (Beckmann et al., 2000). Auch bedeuten diese Pathogene für die Xenotransplantation ein nur sehr geringes Risiko, da sie ebenfalls durch Zucht und SPF-Haltung aus den entsprechenden Herden entfernt werden können.

Als verbleibende Risikofaktoren sind daher einerseits die bislang unbekannt Erreger anzusehen. Diese existieren symbiotisch in ihrem natürlichen Wirt, und können aufgrund des Fehlens von pathogenen Merkmalen nicht erkannt werden. Doch zeigen die Infektionen mit Ebola, Marburg (Smith et al., 1967) oder SIV/HIV (Gao et al., 1994; 1999) die fatalen Folgen einer Übertragung von unbekannt Viren.

Das vermutlich größte mikrobiologische Risiko wird bei der Verwendung porciner Xenotransplantate von den endogenen Retroviren des Schweins (porcine endogene Retroviren, PERVs) ausgehen (Denner, 1998). Diese endogenen Retroviren liegen als ein integraler Teil des porcinen Genoms in jeder Zelle der Spendertiere vor, und werden daher allein durch Züchtung nicht zu eliminieren sein.

1.2.2 Retroviren

Bis in das späte 17. Jahrhundert wurde für alle übertragbaren Krankheiten der Begriff „Virus“ (lat. Gift, Schleim) verwendet, da die damaligen Methoden den Nachweis von krankheitserregenden Mikroorganismen nicht ermöglichten. Doch gelang es bereits in dieser Zeit, erste Impfstoffe gegen Epidemie-artige Krankheiten wie Pocken oder Tollwut zu entwickeln (Jenner, 1796; Pasteur, 1885; (Cook, 1996)). Erst die Erfindung von entsprechenden Filtersystemen ermöglichte die Entdeckung von Viren: Walter Reed wies so 1900 das Gelbfiebervirus als erstes humanpathogenes Virus nach. Die ersten Retroviren wurden 1908 mit der Entdeckung der aviären Leukose-Viren (ALV) als Ursache der Leukose bei Hühnern beschrieben (Ellermann und Bang; 1908). Der Beweis für eine Übertragbarkeit von Viren wurde 1911 erbracht, in dem es gelang, das Rous Sarkom Virus (RSV) mittels filtrierter Extrakte aus Geflügelsarkomen auf gesunde Hühner zu übertragen, welche dann ebenfalls Sarkome entwickelten (Rous, 1911). Nach diesen initialen Untersuchungen mit den C-Typ Retroviren der Vögel (Aviäre Sarkom/Leukose Viren (ASLV)) weiteten sich die Untersuchungen der Virus-induzierten Tumorerkrankungen schnell auch auf die Säuger aus. Die Entdeckung, daß der Erreger der malignen Milchdrüsenerkrankung bei Mäusen (Maus-Mamma-Tumor-Virus

(MMTV)) nicht nur horizontal auf andere Mäuse, sondern auch vertikal auf die Folgegeneration übertragen werden kann (Bittner, 1936), zeigte eine bislang unbekannte Übertragungsart von Viren. Doch erst die Fortschritte in der Molekularbiologie ermöglichten mit der Entdeckung des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) eine Erklärung dieser Beobachtungen (Baltimore, 1970). Das für die Retroviren charakteristische Enzym bietet diesen Viren eine einzigartige Umkehrung des sonst üblichen Informationsflusses von DNA über RNA zum Protein. In der Umkehrung wird das einzelsträngige RNA-Genom der Retroviren in ein Zwischenprodukt aus doppelsträngiger DNA umgeschrieben, das sogenannte Provirus.

1.2.2.1 Das pathogene Potential von Retroviren

Viele Retroviren wurden erst durch ihre Assoziation mit bestimmten Krankheiten identifiziert, und letztlich konnte das entsprechende Virus als Ursache für die jeweils beobachteten Krankheitsbilder manifestiert werden. Der genetische Weg zur Auslösung dieser Krankheiten kann allerdings vielseitig sein. Eine der am häufigsten vorkommenden Ursachen ist die Insertionsmutagenese. Hierbei kommt es zur Integration des Provirus in Bereiche des zellulären Genoms, wodurch es zur Inaktivierung oder Schädigung essentieller Gene des Wirtsorganismus kommt. Eine weitere Form der Insertionsmutagenese beinhaltet die genetische Regulation von zellulären Genen, durch die regulativen LTR-Elemente des Provirus. Dabei kann es zur Aktivierung von Protoonkogenen kommen (Kung et al., 1991; Tschlis und Lazo, 1991), oder auch zur Repression von normalerweise inhibierend wirkenden Genprodukten (Ben-David et al., 1990). Die daraus entstehende Fehlregulation der zellulären Gene resultiert dann meist in der Entstehung von Tumoren. Eine weitere Form der Tumorentstehung wird durch Viren verursacht, welche zusätzlich oder statt ihrer Strukturgene sogenannte Onkogene tragen. Diese werden bei der Replikation der proviralen DNA mit transkribiert und translatiert. Die entstehenden Genprodukte greifen dann in den Regulationsmechanismus der infizierten Zelle ein, und führen letztlich zur Tumorbildung.

Die Infektion mit Retroviren ist oftmals mit der Ausprägung einer Immunsuppression des Wirts verbunden (Peterson et al., 1963). Der Mechanismus, mit dem die Retroviren eine derartige Immundefizienz hervorrufen ist bislang unklar. Allerdings haben Befunde von HIV-infizierten Patienten gezeigt, daß die Progression der Virus-induzierten Immunschwächekrankheit AIDS von der Virusbelastung des Patienten abhängt (Pantaleo et al., 1993). Dies läßt vermuten, daß virale Proteine eine Schlüsselrolle in der Immunpathogenese spielen könnten. Diese Vermutung wird weiterhin von der Tatsache gestützt, daß inaktivierte Retroviren die Proliferation von Lymphozyten hemmen können. Dies konnte sowohl für Lentiviren wie HIV (Pahwa et al., 1985; Amadori et al., 1988), sowie für verschiedene Retroviren des Typ-C (Denner et al., 1980) und des Typ-D

(Denner et al., 1985a,b) gezeigt werden. Dabei scheint der immunsuppressive Effekt auf das transmembrane Hüllprotein der Retroviren zurückzuführen sein (Cianciolo et al., 1985; Ruegg et al., 1989; Denner et al., 1994, 1996). Neben der Hemmung der Lymphozytenproliferation kommt es zu einer Modulation der Zytokinproduktion. So wird die Produktion von Interleukin 2 (IL-2) gehemmt, und die von IL-10, sowie der Interferone alpha ($IFN\alpha$) und gamma ($IFN\gamma$) erhöht (Denner, 1998; Haraguchi et al., 1995). Zwar konnten auf der Oberfläche von immunkompetenten Zellen Bindungsproteine für von dem transmembranen Hüllprotein abgeleitete Peptide nachgewiesen werden (Chen et al., 1992; Henderson und Qureshi, 1993; Denner et al., 1993, 1995), jedoch bleibt weiterhin unklar, wie die immunsuppressiven Effekte der Retroviren induziert und vermittelt werden.

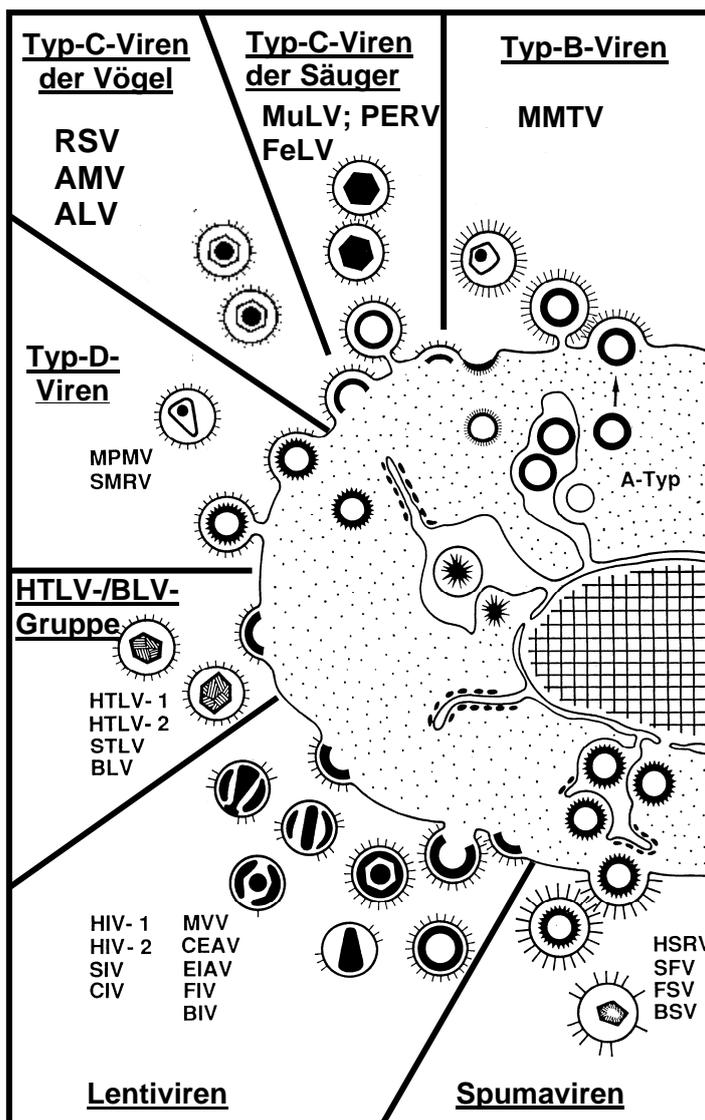
1.2.2.2 Einteilung der Retroviren

Aufgrund einer kürzlichen Neueinteilung der Retroviren soll an dieser Stelle die neue Nomenklatur (Van Regenmortel et al., 2000) den alten Bezeichnungen (Murphy et al., 1995) kurz gegenüber gestellt werden (Tabelle 1.1). Die Familie der *Retroviridae* (lat., *retro*: rückwärts) untergliedert sich demnach heute in sieben Genera, nämlich die Retroviren Alpha bis Epsilon (ehemals als Onkoviren bezeichnet), die Lentiviren (lat., *lentus*: langsam) und die Spumaviren (lat., *spuma*: Schaum) welche anhand von morphologischen und genetischen Unterschieden unterteilt werden (Van Regenmortel et al., 2000). Die Alpharetroviren entsprechen dabei dem vormals als Typ-C-Viren der Vögel bezeichneten Genus der *Retroviridae*, wofür das aviäre Leukosevirus (ALV) als typischer Vertreter genannt werden kann. Die ehemals als Typ-B-Viren und Typ-D-Viren bezeichneten Genera sind heute unter den Betaretroviren zusammengefaßt. Als klassische Vertreter sind das Maus-Mammatumovirus (MMTV) und das Mason-Pfizer-Affen-Virus (MPMV) zu nennen. Die Gammaretroviren umfassen heute die Gruppe von Retroviren, welche früher in dem Genus der Typ-C-Viren der Säugetiere zusammengefaßt waren. Hier kann als typisches Retrovirus das Maus-Leukämievirus (MLV) genannt werden. In die Gruppe der Deltaretroviren fallen heute die Retroviren, welche früher in der Gruppe der HTLV/BLV-Viren zusammengefaßt wurden. Für diesen Genus bleiben das humane T-Zell-Leukämievirus (HTLV) und das bovine Leukämievirus (BLV) die typischen Vertreter. In dem neuen Genus der Epsilonretroviren findet man die kürzlich entdeckten Retroviren der Fische eingegliedert. Als repräsentatives Retrovirus ist hierfür das Walley Dermal Sarkomvirus (WDSV) zu nennen (Holzschu et al., 1995). Als typische Vertreter der Lentiviren ist das humane Immundefizienzvirus 1 (HIV-1), und für die Spumaviren das Foamy Virus der Schimpansen (CFV) zu nennen (Tabelle 1.1). Zusätzlich dazu wird zukünftig ein weiterer Genus für die Typisierung der Retroviren der Fliegen (Kim et al., 1994) notwendig werden.

Tabelle 1.1: Übersicht der Familie der *Retroviridae* und ihrer Genera.

Genus	Alte Nomenklatur	Typischer Vertreter
Alpharetroviren	Typ-C-Retroviren der Vögel	ALV
Betaretroviren	Typ-B-Retroviren; Typ-D-Retroviren	MMTV; MPMV
Gammaretroviren	Typ-C-Retroviren der Säuger	MLV
Deltaretroviren	Retroviren der HTLV/BLV-Gruppe	HTLV, BLV
Epsilonretroviren	---	WDSV
Lentiviren	Lentiviren	HIV-1
Spumaviren	Spumaviren	CFV

Da sich im Folgenden eine Vielzahl der Beschreibungen auf die alte Nomenklatur der Familie der *Retroviridae* bezieht (Murphy et al., 1995), ist diese nochmals schematisch in [Abbildung 1.1](#) wiedergegeben. Diese alte Nomenklatur wird für ein besseres Verständnis der zum Teil historischen Daten in den folgenden Kapiteln stellenweise beibehalten, und ist daher als synonym mit der aktuellen Taxonomie anzusehen.

**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung der Familie der *Retroviridae*.

Die Familie der *Retroviridae* untergliedern sich nach Murphy (Murphy et al., 1995) in drei Unterfamilien: Die Onkoviren mit den fünf Genera der Typ-B-Viren, der Typ-C-Viren der Vögel, der Typ-C-Viren der Säuger, der Typ-D-Viren und der Viren der HTLV-/BLV-Gruppe, sowie die beiden Unterfamilien der Lenti- und Spumaviren. Die Unterteilung erfolgt aufgrund morphologischer und genetischer Charakteristika. Dargestellt ist der Weg der Partikelbildung, und Freisetzung und Reifung von Virionen der einzelnen Genera. Für jede Gruppe von Viren sind einige ihrer Vertreter exemplarische genannt. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. H. Gelderblom; Denner und Kurth, 2001)

Retroviren lassen sich weiterhin in exogene und endogene Viren unterteilen. Beide Typen besitzen in der Regel in ihrem Genom alle Informationen, die für den Ablauf eines Infektionszyklus mit Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln benötigt werden. Allerdings sind einige der exogenen Retroviren defekt, so daß sie für ihre Verbreitung auf die Hilfe anderer Retroviren (Helferviren) angewiesen sind. Exogene Retroviren können sich horizontal von Organismus zu Organismus verbreiten. Im Unterschied dazu sind endogene Retroviren in allen Zellen eines Organismus in das Genom integriert und werden vertikal über die Keimbahnzellen übertragen. Endogene Retroviren konnten in allen Genomen von Säugern und Vögeln nachgewiesen werden (Löwer *et al.*, 1996). Allerdings sind viele dieser endogenen Retroviren defekt. Intakte endogene Proviren können jedoch unter bestimmten Umständen zur Produktion von infektiösen Partikeln angeregt werden.

1.2.2.3 Morphologie der Gammaretroviren

Da die endogenen Retroviren des Schweins dem Genus der Gammaretroviren (Typ-C-Viren der Säuger) entsprechen, soll im Folgenden nur auf diese Gruppe der Retroviren eingegangen werden.

Die infektiösen Partikel der verschiedenen Retroviren haben prinzipiell einen ähnlichen morphologischen Aufbau und einen Durchmesser von 80-120 nm. Das zentrale Kapsid ist von einer Hüllmembran umgeben, die von der Zytoplasmamembran der Wirtszelle abgeleitet ist. Mit ihr sind die viralen Glykoproteine assoziiert, von denen eines als transmembranes Hüllprotein (TM) über eine Region von ca. 20 hydrophoben Aminosäuren verankert ist. Das andere, das sogenannte Oberflächenhüllprotein (SU), ist dagegen durch Disulfidbrücken mit dem außerhalb der Membran gelegenen Teil des transmembranen Proteins verbunden. Beide Env-Proteine werden als gemeinsames Vorläuferprotein von einer einfach gespleißten mRNA translatiert und während der Virusmorphogenese durch eine zelluläre Protease gespalten (Coffin *et al.*, 1997). Die Matrixproteine (MA) sind über aminoterminal angefügte Myristinsäurereste mit der Innenseite der Hüllmembran verbunden (Henderson *et al.*, 1983).

Im Partikelinneren findet man das Viruskapsid. Es besteht aus Kapsidproteinen (CA) (Stromberg *et al.*, 1974; Durbin und Manning, 1982), die wie die Matrixproteine Komponenten der gruppenspezifischen Antigene (Gag-Proteine) sind. Die Kapside enthalten zwei identische Moleküle einzelsträngiger RNA als Virusgenom. Das RNA-Genom weist mit einer 5'-Cap-Struktur und einer 3'-Polyadenylierung alle Charakteristika einer eukaryotischen mRNA auf (Wang *et al.*, 1975; Coffin und Billeter, 1976). An einer als Primer Bindungsstelle (PB) bezeichneten Sequenzfolge aus 18 Nukleotiden im 5'-Bereich des Genoms ist ein Molekül zellulärer tRNA hybridisiert. Die RNA ist mit dem

Nukleokapsidprotein (NC) komplexiert (Davis und Rueckert, 1972; Fleissner und Tress, 1973), das ebenfalls aus dem Gag-Protein hervorgeht. Alle Gag-Proteine (MA, CA, NC) werden als ein gemeinsames Vorläuferprodukt synthetisiert und im Verlauf der Virusmorphogenese durch die virale Protease (PR) in die einzelnen, im Virion vorkommenden Komponenten gespalten (Wills und Craven, 1991). Die virale Protease liegt dabei in ihrem aktiven Zustand als ein Dimer aus zwei identischen Proteineinheiten vor. Die kodierende Sequenz der viralen Protease (PR) befindet sich im 5'-Bereich des *pol*-Gens, welches weiterhin auch für die Reverse Transkriptase (RT) und die Integrase (IN) kodiert (Katz und Skalka, 1994).

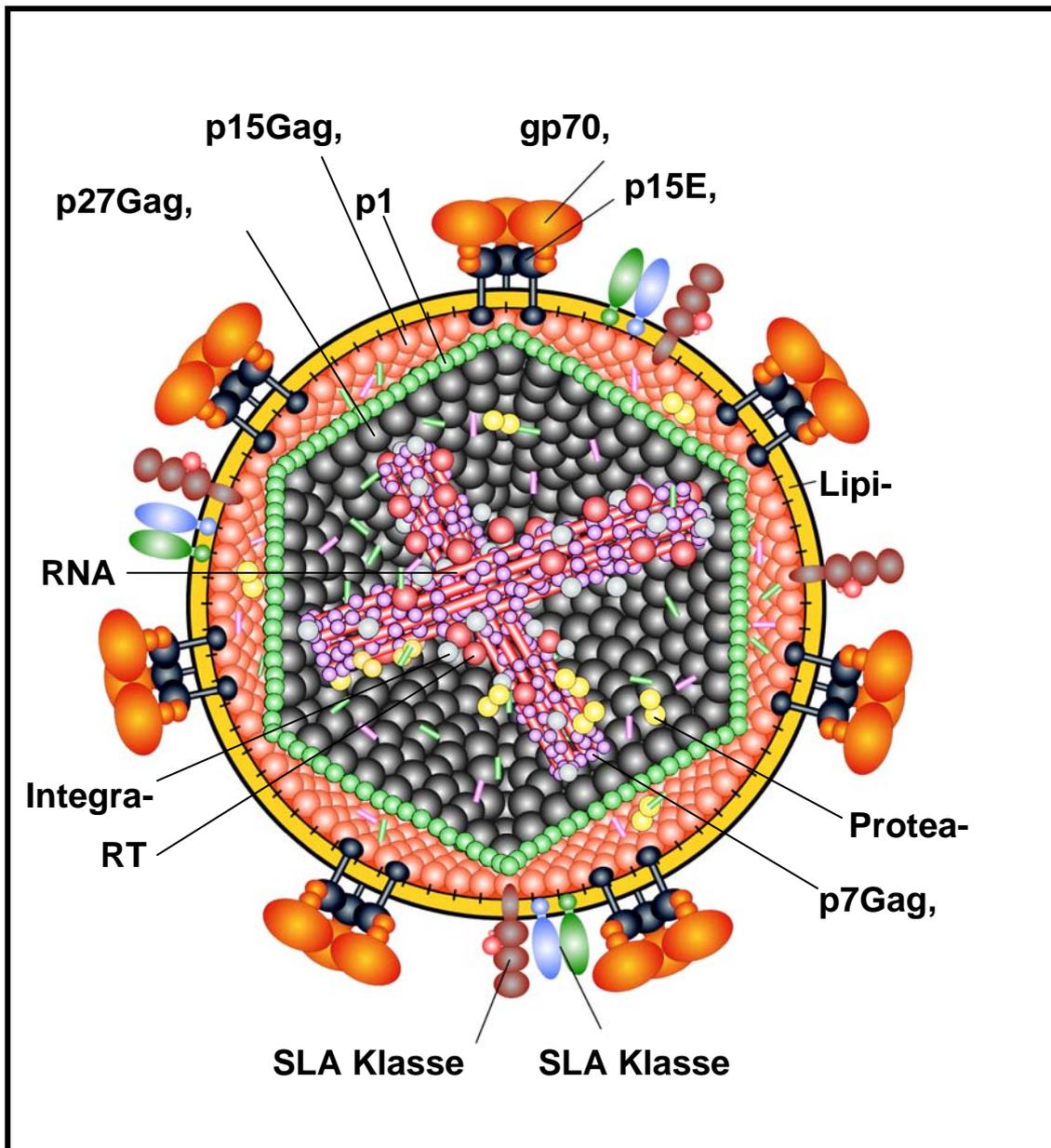


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Morphologie eines **Gamma-retrovirus**. Die Größenangaben der Proteine wurden durch SDS-Gelelektrophorese für die porcinen endogenen Retroviren ermittelt (Tacke et al., 2000). Weitere Angaben, siehe Text. (Abbildung verändert mit freundlicher Genehmigung von Dr. S. Norley, RKI; Berlin).

Alle drei Enzyme werden aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein synthetisiert. Die Reverse Transkriptase enthält mehrere funktionelle Aktivitäten. Sie kann sowohl als RNA- als auch als DNA-abhängige DNA-Polymerase wirken. Zusätzlich besitzt sie die Aktivität einer RNase-H, die den RNA-Anteil von DNA/RNA-Hybridsträngen abbauen kann (Moelling et al., 1971). Die RT besitzt keine Mechanismen zur Kontrolle der Lesegenauigkeit, wodurch mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-3} bis 10^{-4} falsche Basen in die neusynthetisierten Stränge eingebaut werden (Modrow und Falke, 1998). Im 3'-Bereich des *pol*-Leserahmens befindet sich der Sequenzbereich, der für die Integrase (IN) kodiert. Dieses Enzym erkennt und schneidet doppelsträngige DNA an bestimmten Sequenzmotiven und fungiert daher als Endonuklease (Grandgenett et al., 1978). Darüber hinaus arbeitet die Integrase auch als Ligase. Sie bindet sich an die Enden des linearen, in doppelsträngige DNA umgeschriebenen Virusgenoms und ist für dessen Integration in das Wirtsgenom verantwortlich (Craigie et al., 1990).

1.2.2.4 Replikation der Gammaretroviren

Die Interaktion der Retroviren mit ihrem/ihren zellulären Rezeptor(en) erfolgt spezifisch in Abhängigkeit von dem jeweiligen Virustyp. Für die Gammaretroviren fungieren meist Aminosäuretransporter als zelluläre Rezeptoren (Sommerfelt, 1999). Nach der Interaktion der äußeren viralen Glykoproteine (SU) mit dem zellulären Rezeptor erfolgt die Aufnahme des Virus-Kapsids in das Zytoplasma der Wirtszelle mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose (Andersen und Nexø, 1983; Bolander, 1996) (**Abbildung 1.3**).

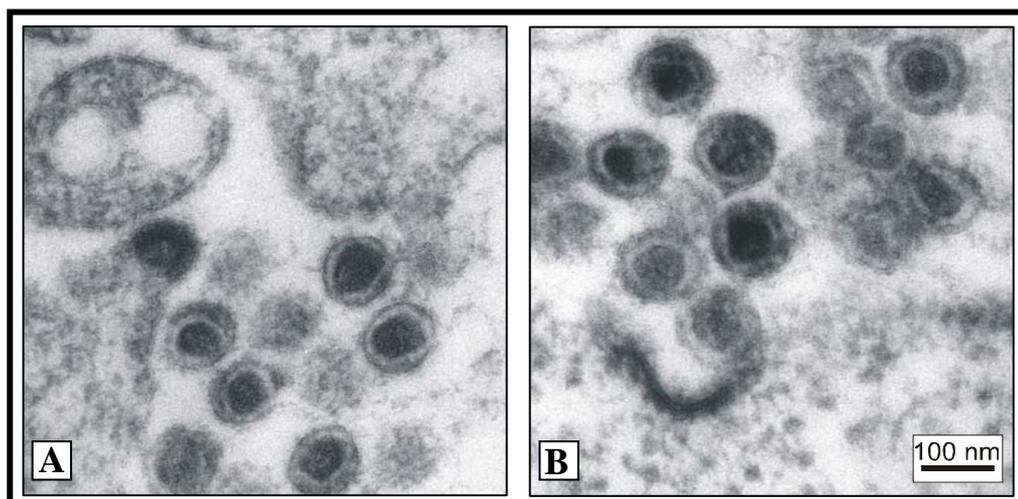


Abbildung 1.3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Replikation von Gam-maretroviren am Beispiel der PERVs. Die Viren werden durch Knospung („budding“) von der Membran der Wirtszelle freigesetzt (A). Die freien Viren interagieren im Verlauf des Infektionsprozesses mit dem zellulären Rezeptor und werden dann endozytotisch aufgenommen (B). Bar: 100 nm. (Mikrographien mit freundlicher Genehmigung von Dr. M. Özel, RKI, Berlin).

Im Zytoplasma kommt es durch das virale Enzym Reverse Transkriptase (RT) zur reversen Transkription des viralen RNA-Genoms und zur Bildung des doppelsträngigen DNA-Provirus ([Abbildung 1.4](#)). Dieser Vorgang beginnt am 3'-OH-Ende des tRNA-Moleküls, welches mit der PB-Region im 5'-Bereich des Virus-Genoms assoziiert ist. Ausgehend von dieser tRNA synthetisiert die RT in 5'-3'-Richtung einen zu den U5 und R-Sequenzen der LTR komplementären DNA-Strang. Die RNase-H-Funktion der RT baut nun den RNA-Anteil des kurzen Hybridstranges ab, so daß nur ein einzelsträngiger DNA-Strang mit kovalent verknüpfter tRNA verbleibt. Dieses Molekül wird im Folgenden an das 3'-Ende des viralen RNA-Genoms transferiert, und hybridisiert mit den dort vorliegenden komplementären R-Sequenzen. Dieses Hybrid dient nun als Primer für die Synthese eines zum gesamten viralen Genom komplementären DNA-Stranges. Der RNA-Anteil des entstandenen RNA/DNA-Hybrids wird wiederum über die RNase-H bis auf eine kurze Sequenz im Bereich des Polypurintraktes abgebaut.

Das 3'-OH-Ende dieses RNA-Abschnitts dient nun als Primer für die Synthese des ersten doppelsträngigen DNA-Abschnittes, der sich in 5'-3'-Richtung bis zu an der PB-Region noch immer gebundenen tRNA erstreckt. Diese wird nun abgebaut, so daß an dieser Stelle ein 3'-Überhang entsteht, welcher zu der PB-Region am 3'-Ende des durchgehenden DNA-Erststranges komplementär ist. Die Hybridisierung dieser beiden Sequenzbereiche bildet die Primerstruktur für die nachfolgende Synthese des proviralen DNA-Doppelstranges (Coffin et al., 1997; Modrow und Falke, 1998).

Das weiterhin mit den Kapsidkomponenten komplexierte Provirus gelangt nun in den Zellkern, wo es mittels der Integrase zur Integration in das zelluläre Genom kommt. Dafür entfernt die Integrase zwei Nukleotide von den 3'-Enden des viralen DNA-Doppelstrangs, so daß 5'-überhängende, einzelsträngige Dinukleotide entstehen (Brown et al., 1987). Durch die Endonuklease-Aktivität der Integrase wird die zelluläre DNA an einer willkürlichen Stelle geschnitten (Withers-Ward et al., 1994), so daß hier ebenfalls 5'-überhängende, einzelsträngige Sequenzen von 4-6 Nukleotiden entstehen. Die 5'-Enden der zellulären DNA werden nun mit den 3'-Enden der viralen DNA verbunden, wobei es zum Verlust der 5'-überhängenden Dinukleotide des Virusgenoms kommt (Bushman und Craigie, 1991). Die verbleibenden einzelsträngigen Lücken werden durch zelluläre Reparaturmechanismen gefüllt und durch Ligasen zu Doppelsträngen geschlossen (Daniel et al., 1999). Im Verlauf dieses Prozesses werden 4-6 Basen der flankierenden zellulären DNA dubliziert, wogegen das Virusgenom seine endständigen zwei Nukleotide verliert.

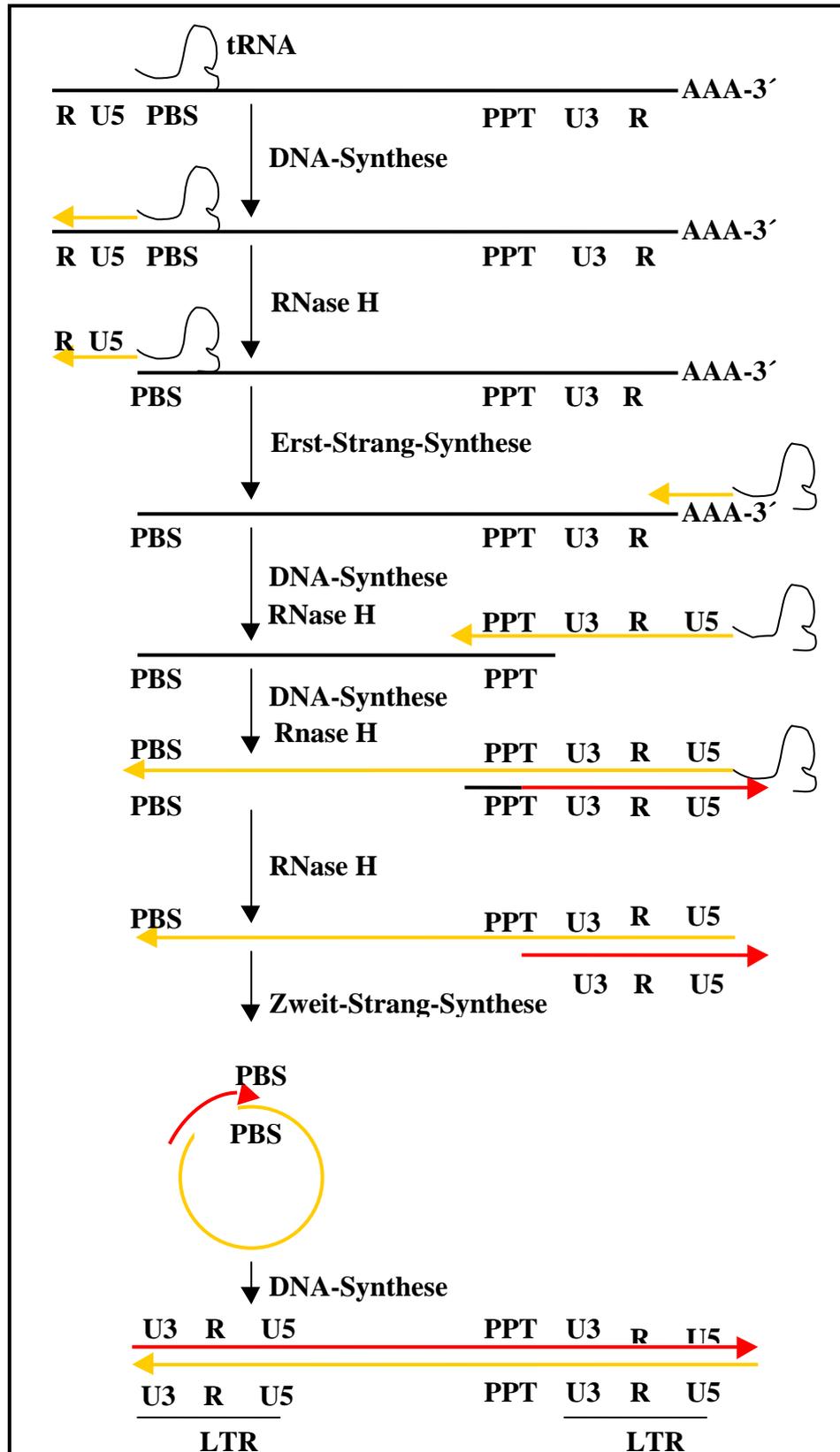


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der reversen Transkription des viralen RNA Genoms. Erläuterungen siehe Text. (Abbildung verändert nach Coffin et al., 1997).

Nach der Integration liegt das retrovirale RNA-Genom in Form eines doppelsträngigen DNA-Provirus in dem Genom des Wirtes vor ([Abbildung 1.5](#)). Die viralen Gene werden dann von identischen Sequenzabschnitten flankiert, welche als „long terminal repeats“ (LTR) bezeichnet werden. Die LTR-Region untergliedert sich in drei Abschnitte. Die U3-Region (U = unique), welche ihren Namen von ihrer Lokalisation am 3'-Ende des viralen RNA-Genoms erhält. Nach der Integration des Provirus in die zelluläre DNA befindet sich diese Region allerdings am 5'-Ende des Provirus (siehe oben). In der U3-Region befinden sich die meisten *cis*-aktiven Elemente der viralen Transkriptionsregulation, sowie wichtige Sequenzen für die Provirus-Integration. Der Bereich der U3-Region ist bei vielen Retroviren variabel und kann von 200 bis über 1000 Basen lang sein. Das Mittelstück der LTR bildet die R-Region (R = redundant) mit 15-230 Basen Länge, an welche sich die U5-Region anschließt. Diese 75-200 Basen lange Region ist analog zur U3-Region nach ihrer Lokalisation am 5'-Ende des viralen RNA-Genoms benannt und befindet sich nach der Integration des Provirus am 3'-Ende der LTR. Auch sie trägt für die Integration notwendige Sequenzen. In dem zwischen LTR und dem *gag*-Gen liegenden Bereich befindet sich die PB-Region. Hier befindet sich die Spleiß-donorstelle, die für die Produktion aller gespleißter mRNA-Moleküle verwendet wird. Benachbart findet man die als ψ -Stelle bezeichnete Sequenzfolge, mittels derer sich die RNA-Genome bei der Morphogenese an die Nukleokapsidproteinabschnitte der sich bildenden Viruspartikel anlagern. In den Genomen aller Retroviren findet man die gleiche Abfolge der offenen Leserahmen *gag*, *pro/pol* und *env*. Das *gag*-Gen kodiert dabei für die als gruppenspezifische Antigene bezeichneten Proteine MA, CA und NC; das *pol*-Gen für die Enzyme PR, RT und IN, und das *env*-Gen für die Hüllproteine TM und SU (siehe oben). Bei komplexeren Retroviren werden diese drei Gene durch weitere akzessorische Gene ergänzt. An diese schließt sich der Polypurintrakt (PP) an, der aus einer Folge von mindestens 9 Adenosin- und Guanosinresten besteht. Diese Sequenz ist für die Initiation der Synthese des DNA-Doppelstranges bei der reversen Transkription wichtig (siehe oben).

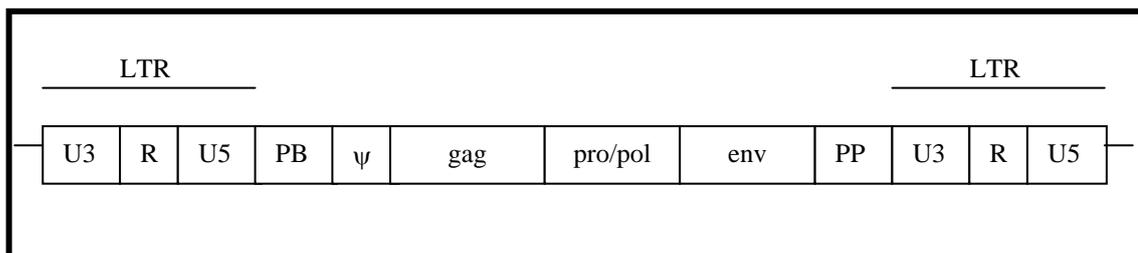


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der genetischen Organisation eines Gammaretrovirus nach der Integration als Provirus in die zelluläre DNA. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Über den zellulären Transkriptionsapparat kommt es zum Ablesen der viralen Gene. Im Folgenden wird einerseits eine ungespleißte mRNA an zytoplasmatischen Ribosomen translatiert, und es entsteht das Gag-Pro/Pol-Fusionsprotein, welches die Sequenzen von MA, CA, NC, PR, RT und IN enthält. Andererseits wird nach dem Spleißen der mRNA das Env-Protein mit den Sequenzen für SU und TM synthetisiert. Das zu diesem Zeitpunkt noch unreife Env-Polyprotein gelangt mittels einer Signalsequenz an die Membran des rauen Endoplasmatischen Retikulums (rER) und durch weitere Translationschritte der Membran-gebundenen Ribosomen des rER in dessen Lumen hinein. In Golgi-Vesikeln wird das Env-Protein an die Plasmamembran der Zelle transportiert. Im Verlauf des Transportes kommt es dabei zur Glykolisierung des Proteins.

Der Transport des Gag-Pro/Pol-Fusionsproteins zur Zellmembran ist dagegen noch weitgehendst unklar. Als die wahrscheinlichste Theorie wird zur Zeit die Interaktion des Gag-Proteins mit Proteinen des Zytoskeletts, wie z.B. Aktin, angesehen (Edbauer und Naso, 1984). Dabei würde das Gag-Protein in Assoziation mit den zytoskelettalen Strukturen des Zellkortex bis an die Plasmamembran gelangen (Ott et al., 1996). Allerdings gibt es auch die Theorie, daß die Gag-Proteine über Chaperone stabilisiert und an ihren Zielort transportiert werden könnten (Becker und Craig, 1994).

Der Zusammenbau der Viruspartikel („Assembly“) untergliedert sich allerdings bei den verschiedenen Gruppen der Retroviren in zwei Arten (Gelderblom, 1990): Bei den Retroviren des Typs B und D kommt es bereits innerhalb des Zytoplasmas zu einer Zusammenlagerung der Gag-Proteine. Diese als A-Partikel bezeichneten Virus-Vorläufer sind unumhüllte Viruspartikel, welche als Ganzes an die Plasmamembran transportiert werden, und erst dort mit den Env-Proteinen im Verlauf der Knospung („budding“) von der Zellmembran umhüllt werden.

Die als Typ-A-Partikel bezeichneten Viren wurden ursprünglich als unumhüllte zytoplasmatische Vorläuferpartikel der Typ-B-Viren charakterisiert. Allerdings wurden sie auch als intrazysternale Typ-A-Partikel (IAPs) beschrieben, welche in das endoplasmatische Retikulum (ER) von Nagerzellen budden und dort akkumuliert werden. Diese IAPs sind dann umhüllte Partikel, deren Hüllmembran sich von der Membran des ER ableitet. Im Gegensatz zu allen anderen Retroviren, welche im reifen Zustand ein zentrales, kondensiertes Kapsid enthalten (Bernhard, 1958), besitzen die Typ-A-Partikel ein Genom aus ein bis zwei konzentrischen Ringen. Damit ähnelt das Kapsid der Typ-A-Partikel den unreifen Virionen der anderen Retroviren (DeHarven, 1974).

Im Gegensatz dazu kommt es bei den Typ-C-Viren, den Lenti- und den Spumaviren zu einem Transport von nur einzelnen Gag-Proteinen an die Plasmamembran. Dort werden

alle viralen Proteine akkumuliert und letztlich im Verlauf der Knospung zu vollständigen Partikeln zusammengelagert ([Abbildung 1.1](#)). In beiden Fällen spielt das Gag-Protein die zentrale Rolle im Prozeß des Assembly (Kräuslich und Welker, 1996). Über die Interaktions(I)-Domäne in der NC-Region des Gag-Proteins kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen verschiedenen Gag-Proteinen (Craven et al., 1993), welche in Anwesenheit von RNA deutlich gesteigert wird (Campbell und Vogt, 1995). An die initiale Zusammenlagerung der Gag-Proteine schließt sich übergangslos der Budding-Prozeß der Viruspartikel von der Zellmembran an. Bei den direkt an der Plasmamembran entstehenden Partikeln, wie auch bei den zytoplasmatisch gebildeten Typ-A-Partikeln kommt es zur Assoziation mit den viralen Glykoproteinen und einer exozytischen Abschnürung der Partikel von der Plasmamembran. Im Verlauf des Wachstums der immer größer werdenden Knospe werden neben den viralen Hüllproteinen auch zelluläre Membranproteine mit in die Hülle der Viren inkorporiert. Die Größe der entstehenden Partikel wird vermutlich durch Interaktionen zwischen den CA-Sequenzen der Gag-Proteine determiniert (Wills et al., 1994). Die Ablösung der neuen Viruspartikel wird vermutlich von viralen (z.B.: L-Domäne der Gag-Proteine), wie auch von zellulären Komponenten reguliert (Bork und Sudol, 1994). Im Verlauf dieser Ablösung, oder kurz danach, werden die bis dahin als Polyproteine vorliegenden viralen Proteine durch die PR in ihre einzelnen Komponenten prozessiert, und es kommt zur Kondensation des Kapsids (Sommerfelt et al., 1992). Die Partikel besitzen nun die Morphologie reifer Viren und können über die Interaktion ihrer Glykoproteine mit den entsprechenden zellulären Rezeptoren erneut als infektiöse Viren aufgenommen werden.

1.2.3 Porcine endogene Retroviren (PERVs)

Porcine endogene Retroviren (PERVs) wurden erstmals in der porcinen Nieren-Zell-Linie PK-15 beobachtet (Breese, 1970). Elektronenoptische Untersuchungen zeigten umhüllte, Virus-ähnliche Partikel mit einem Durchmesser von 90-100 nm, in deren Kernbereich sich das RNA-enthaltende sogenannte „Virus-core“ mit einer Größe von etwa 60 nm befand. Auch in anderen porcinen Zell-Linien wie 38A-1, IB-RS-2, SK-6, MPK, ST-Mo, PORC oder PFT konnte nach Langzeit-Passagierung der Zellen eine spontane Freisetzung von PERVs beobachtet werden (Armstrong et al., 1971; Woods et al., 1973; Todaro et al., 1974, Lieber et al., 1973; 1975; Bouillant et al., 1975). DNA/DNA-Nukleinsäure-Hybridisierungen mit DNA aus normalem porcinen Gewebe bewiesen, daß es sich bei den PERVs um endogene, vertikal vererbte Retroviren handelte (Todaro und Hübner, 1972). Dabei wiesen die Viruspartikel aus den porcinen Zellkulturen die morphologischen Charakteristika von Typ-C Retroviren (heute Gammaretroviren) auf (Breese et al., 1970; siehe [Abbildung 1.4](#)). Weiterhin zeigten biochemische Untersuchungen, daß PERVs hohe Ähnlichkeiten zu anderen Gammaretroviren

wie z.B. dem Maus-Leukämievirus (MuLV), dem Katzen-Leukämievirus (FeLV) oder dem endogenen Retrovirus der Paviane (BaEV) besitzen. Wie diese, bandieren PERV-Partikel in einem Saccharose-Gradienten bei der für Retroviren typischen Dichte von $1,16 \text{ g/cm}^3$ (Todaro et al., 1974; Tacke et al., 2000). Die Partikel besaßen eine RNA-abhängige DNA-Polymerase von 70 kDa, welche als reverse Transkriptase (RT) das typische Schlüsselenzym der Retroviren darstellt. Auch konnten gruppenspezifischen Antigene (Gag-Proteine) nachgewiesen werden (Lieber et al., 1973, Woods et al., 1973). Allerdings zeigten DNA/RNA-Nukleinsäure-Hybridisierungen, daß sich die PERVs von den endogenen Viren anderer Säuger auf der Nukleinsäure-Ebene deutlich unterscheiden und daher eine eigene Gruppe von Typ-C Retroviren bilden (Todaro et al., 1974; Benevise et al., 1974).

Im Gegensatz zu der Expression von PERV in porcinen Zell-Linien konnte die Freisetzung von Viruspartikeln in Kulturen von primären und sekundären porcinen Nierenzellen nicht beobachtet werden (Armstrong et al., 1971). Spätere Untersuchungen zeigten dagegen, daß PERV von porcinen Tumorzellen (Fraizer et al., 1985), von primären Endothelzellen der porcinen Aorta (Martin et al., 1998a) und von Mitogen-stimulierten porcinen PBMCs (Wilson et al., 1998; Tacke et al., 2000) *in vitro* freigesetzt wird. Darüber hinaus konnte in verschiedenen Geweben des Schweins mRNA Expression von PERV nachgewiesen werden (Akiyoshi et al., 1998; Langford et al., 2001).

Auch zeichnete sich ab, daß es sich bei PERV um eine Gruppe von verschiedenen Typen von Proviren handelt, welche mit über 50 Kopien (Patience et al., 2001; Ericsson et al., 2001) an verschiedenen Loci im Genom der Schweine verankert sind (Akiyoshi et al., 1998; LeTissier et al., 1997). Viele dieser Proviren sind vermutlich defekt, und führen nicht zur Bildung intakter Viruspartikel. Daher konnte den porcinen endogenen Retroviren anfangs kein infektiöses Potential zugeordnet werden. Zwar gelang es, Zellen der eigenen Spezies, wie z.B. die porcine Zell-Linie ST-IOWA mit PERV zu infizieren (Strandström et al., 1974, Lieber et al., 1975), doch schlugen alle Versuche fehl, PERV auf Zellen anderer Spezies zu übertragen (Bouillant et al., 1975; Todaro et al., 1974; Lieber et al., 1975).

Jedoch wurden später intakte Proviren von PERV isoliert, welche sich in die drei verschiedene Subtypen PERV-A, PERV-B und PERV-C unterteilen lassen. PERV-A und PERV-B wurden aus der humanen Zell-Linie 293 isoliert, welche zuvor mit PERV aus der porcinen Nierenzell-Linie PK-15 infiziert worden war (LeTissier et al., 1997). Die ersten Isolate von PERV-C stammten dagegen aus den Lymphozyten eines Miniatur-Schweins (PERV-MSL; Akiyoshi et al., 1998) und aus einem porcinen Lymphom (PERV-Tsukuba-1; Suzuka et al., 1986).

Die Unterteilung der Subtypen basiert auf einer abweichenden Sequenz im Bereich des für das Hüllprotein kodierenden *env*-Gens (Akiyoshi et al., 1998; LeTissier et al., 1997; Suzuka et al., 1986). Ähnliche Unterschiede in Bereichen des Oberflächen-

Glykoproteins von MuLV sind limitierend für ein spezifisches Wirtsspektrum der jeweiligen Subtypen (Battini et al., 1992; 1995). Der/die zelluläre(n) Rezeptor(en) der PERVs ist/sind bislang unbekannt, doch scheinen die einzelnen Subtypen unterschiedliche Rezeptoren für die Infektion der jeweiligen Zellen zu nutzen (Takeuchi et al., 1998). Analog dazu weisen die verschiedenen Subtypen von PERV auch ein unterschiedliches Wirtsspektrum auf: PERV-A und PERV-B sind polytrope Viren, da sie im Gegensatz zu früheren Beobachtungen (siehe oben) auch Zellen anderer Spezies *in vitro* infizieren können (Patience et al., 1997; LeTissier et al., 1997; Takeuchi et al., 1998; Wilson et al., 1998). Von besonderer Bedeutung für die Xenotransplantation war dabei die Infektion von humanen Zellen *in vitro* (Abbildung 1.6).

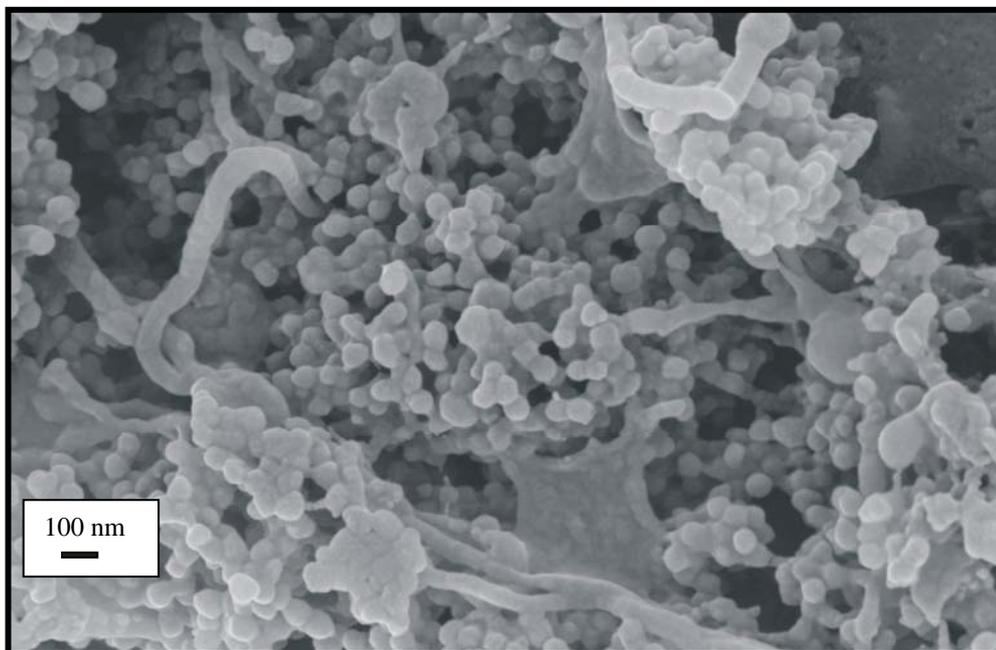


Abbildung 1.6: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von PERV. PERV-A/C Virionen nach der Freisetzung von der humanen Zell-Linie 293. Bar: 100 nm. (Mikrographie mit freundlicher Genehmigung von Dr. M. Özel, RKI, Berlin)

Bei PERV-C handelt es sich dagegen vermutlich um ein ecotropes Virus, welches nur Zellen der eigenen Spezies infizieren kann. Dies würde damit die früher beobachtete Infektion der porcinen Zell-Linien erklären (Strandström et al., 1974, Lieber et al., 1975; siehe oben). Allerdings konnte PERV-C in einigen Fällen auf humane Zell-Linien übertragen werden, wobei davon ausgegangen werden muß, daß es dabei zu einer Kreuzverpackung des PERV-C Genoms mit PERV-A oder PERV-B gekommen sein könnte (Takeuchi et al., 1998).

Weitere Sequenzanalysen zeigten, daß PERV-A, PERV-B und PERV-C in den Bereichen der *gag*- und *pol*-Gene hohe Homologien zueinander aufweisen, wobei sich die einzelnen Subtypen höchstens um 5% in der Aminosäuresequenz der entsprechenden

Bereiche unterscheiden (Akyoshi et al., 1998; LeTissier et al., 1997; Patience et al., 1997). Darüber hinaus weisen die PERVs auch mit 60-70% hohe Homologie zu den Gammaretroviren des Gibbonaffen (GaLV), der Katze (FeLV) und der Maus (MLV) auf (LeTissier et al., 1997; Takeuchi et al., 1998). Für diese und viele weitere Gamma-retroviren konnte schon früh gezeigt werden, daß es neben den Virus-assoziierten Krankheitsbildern zu einer Virus-induzierten Immunsuppression kommt (Dent, 1972). Dies konnte nicht nur *in vitro* (Denner et al., 1980; Haraguchi et al., 1995), sondern auch *in vivo* gezeigt werden (Bendinelli et al., 1985; Good et al., 1991; Mangeney und Heidmann, 1998). Die Gammaretrovirus-vermittelte Immunsuppression zeichnete sich *in vivo* durch eine gesteigerte Mortalität wie auch durch eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber sekundären viralen und bakteriellen Krankheiten aus (Anderson et al., 1971; Essex und Snyder, 1973; Hoover et al., 1973; Cotter et al., 1975). Weiterführende *in vitro*-Versuche zeigten, daß es im Verlauf der retroviralen Immunsuppression zu einer Inhibierung der Lymphozyten-Proliferation, sowie zu einer Modulation des Zytokinmusters kommt (Wainberg et al., 1987; Denner et al., 1980, 1985a,b, 1986, Denner, 1987; Orosz et al., 1985a,b; Yasuda et al., 1987; Haraguchi et al., 1995). Die Inhibierung der Produktion von Interleukin-2 (IL-2), IL-12, sowie der Tumor-Nekrose-Faktoren α und γ , und die gesteigerte Produktion von IL-10 scheinen initiale Schritte in die Richtung einer Fehlfunktion des Immunsystems zu sein. Ähnliche immunsuppressive Effekte konnten auch für die porcinen endogenen Retroviren *in vitro* gezeigt werden (Denner, 1998; Tacke et al., 2000). Demgegenüber konnte den PERVs bislang weder *in vitro* noch *in vivo* ein tumorigenes Potential zugeordnet werden. Allerdings lassen diese Befunde nur sehr limitierte Rückschlüsse auf das Risiko zu, welches mit einer potentiellen Expression und Freisetzung von PERV von einem porcinen Xenotransplantat in dem humanen Rezipienten und den damit assoziierten pathogenen Folgen verbunden sein könnte (Denner, 1998).

Zur Zeit existiert kein Tiermodell für die Untersuchung einer Infektion mit PERVs, doch zeigten erste Untersuchungen mit experimentellen Xenotransplantationen in nicht-humanen Primaten (Martin et al., 1998b; Winkler et al., 1999), sowie erste klinische Xenotransplantationen (Paradis et al., 1999; Pitkin und Mullon, 1999; Tacke et al., 2001) keine Übertragung von PERVs *in vivo*.

In diesem Zusammenhang muß allerdings erwähnt werden, daß bei der Verwendung porciner Xenotransplantate von transgenen Schweinen, das Risiko einer Übertragung von PERV rapide zunehmen könnte (Weiss, 1998).

Die gentechnische Manipulation von Schweinen wurde zur Verminderung der immunologischen Abstoßungsreaktionen der Xenotransplantate initiiert. Als das wichtigste Antigen der natürlichen xenoreaktiven Antikörper gilt das Gal-Epitop, welches auf den Zellen aller Säuger, außer auf denen des Menschen und der Altwelt-Affen vorkommt (siehe 1.1.2). Im Verlauf des „budding“ von einer porcinen Zelle (siehe 1.2.2.4) werden

diese Epitope mit in die Hüllmembran der PERVs inkorporiert und dienen dem humanen Immunsystem als schnelle Hilfe bei der Erkennung der Körper-fremden Partikel. Im Umkehrschluß würde die Entfernung dieses Epitops die PERVs vor einer vorzeitigen Eliminierung durch das humane Immunsystem schützen. Allerdings war die Entfernung des Gens für das α -Gal-synthetisierende Enzym α 1,3- Galaktosyl-Transferase aus dem porcinen Genom anfangs nicht gelungen. Jedoch existierten vielversprechende Ansätze bei α -Gal-knock-out-Mäusen, welche dann wie Mensch und Altwelt-Affen anti-Gal-Antikörper bilden (Thall et al., 1996). Diese ersten Erfolge führten zwischenzeitlich auch zu der Eliminierung von einem der vermutlich zwei Gene der α 1,3- Galaktosyl-Transferase aus dem porcinen Genom (Lai et al., 2002; Dai et al., 2002).

Ein anderer Ansatz basiert auf der durch gentechnische Veränderung induzierten Expression von humanen Komplement-regulierenden Proteinen auf der porcinen Zelloberfläche. Die Expression von z.B. CD46, CD59 oder CD55 (hDAF) auf porcinen Gefäßendothelzellen zeigte dabei bereits eine deutliche Verminderung der Aktivierung des humanen Komplementsystems (Cozzi et al., 1996; Platt und Logan, 1996; Byrne et al., 1997; Cowen et al., 1998). Das humane Komplementsystem fungiert allerdings als ein effektives Schutzsystem gegen Mikroorganismen. Auch für PERVs konnte eine effektive Inaktivierung durch das humane Komplement gezeigt werden (Rother et al., 1995; Takeuchi et al., 1996). Eine derartige gentechnische Veränderung der Schweine würde daher mit einer Inkorporation der humanen Komplementregulator-Proteine in die Hüllmembran der PERVs einhergehen und den PERVs einen entsprechenden Schutz vor der Eliminierung durch das Komplement bieten.

Da bislang allerdings kein Tiermodell für die Untersuchung einer Infektion mit PERVs existiert, kann über die möglichen Folgen des Einsatzes von gentechnisch veränderten porcinen Xenotransplantaten und das Ausmaß einer potentiellen Infektion mit PERVs nur spekuliert werden.

1.3 Zielsetzung

Mit zunehmender Überwindung der immunologischen Hürden bei der Transplantation xenogenen Transplantate in humane Rezipienten wird ein möglicher klinischer Einsatz der Xenotransplantation immer wahrscheinlicher. Als eine der Grundvoraussetzungen dafür gilt allerdings weiterhin die mikrobiologische Sicherheit der Xenotransplantate. Zur Zeit scheint dabei das größte Risiko von den endogenen Retroviren der Spender-tiere auszugehen. Im Gegensatz zu allen anderen Mikroorganismen lassen sich die endogenen Viren nicht ohne weiteres aus dem Genom der Tiere entfernen. Bei der Verwendung von Schweinen als mögliche Spender der Xenotransplantate ist diese Tatsache besonders problematisch, da die porcinen endogenen Retroviren (PERVs) mit weit mehr als 50 Kopien an verschiedenen Loci des porcinen Genoms integriert sind. Die Elim-

nierung der einzelnen Proviren über „knock-out“ Verfahren wird daher zur Zeit als äußerst schwierig angesehen. Es konnte bereits gezeigt werden, daß PERVs humane Zellen *in vitro* infizieren, doch bleibt die Frage eines möglichen Infektionspotentials von PERVs *in vivo* offen. In diesem Zusammenhang ist zu bedenken, daß die gemachten Fortschritte in der Behebung der immunologischen Transplantatabstoßung, wie eine verbesserte Immunsuppression oder die gentechnische Veränderung der Spendertiere, das Risiko einer Übertragung von Mikroorganismen wie den endogenen Viren auf den humanen Rezipienten deutlich erhöhen könnten.

Vor diesem Hintergrund sollte die vorliegende Arbeit einen Beitrag zu der Evaluierung der Virussicherheit bei der Xenotransplantation leisten, und eine Analyse des potentiellen Risikos einer Übertragung von PERVs *in vivo* bieten.

Da bis heute die zellulären Rezeptoren der PERVs unbekannt sind, wurde in dieser Arbeit eine Analyse des Wirtsspektrums der PERVs durchgeführt, um detailliertere Angaben über susceptible Spezies und Gewebe zu erhalten. Dabei sollte mit replikationskompetenten Viren, sowie vorwiegend mit primären Zellen gearbeitet werden, um die Situation einer möglichen Infektion des Xenotransplantat-Rezipienten mit PERVs *in vitro* zu simulieren. Die Analyse des Wirtsspektrums wurde dabei mit zwei Zielsetzungen durchgeführt:

1. Es sollten humane Zellen verschiedener Gewebe auf ihre Suszeptibilität gegenüber einer Infektion mit PERVs untersucht werden, da die Identifizierung susceptibler Zelltypen die spätere Untersuchung von Empfängern porciner Xenotransplantate deutlich erleichtern würde. Darüber hinaus könnte dies möglicherweise Ansätze bieten, eine Infektion mit z.B. kompetitiv wirkenden Antikörpern gegen die zellulären Bindungsstellen des Virus zu blockieren.
2. Die Analyse des Wirtsspektrums von PERVs mit Zellen verschiedener Spezies sollte die Identifikation einer oder mehrerer Spezies ermöglichen, welche für die Etablierung eines Tiermodells in Frage kommen würde(n).

Als ein weiterer Aspekt der *in vitro* Versuche sollte die mögliche Adaptation von PERVs an Zellen der jeweiligen Spezies untersucht werden. Diese Fragestellung beruht auf der Tatsache, daß für viele Retroviren bekannt ist, daß sie sich im Verlauf ihrer Replikation in den Zellen ihres Wirtes an diesen anpassen, was zum Teil in pathogenen Folgen für den Wirt resultiert. Dabei sollte mit Hinblick auf die Xenotransplantation der Schwerpunkt der Analyse auf humanen Zellen liegen.

Da das potentiell pathogene Potential von PERVs *in vivo* für die Xenotransplantation von besonderer Bedeutung ist, sollte nach der Identifikation einer susceptiblen Spezies *in*

vitro ein Tiermodell etabliert werden, in welchem diese Frage detaillierter *in vivo* analysiert werden könnte. Dabei sollte aus ethischen und praktischen Gründen vorrangig ein Kleintiermodell aufgebaut werden, welches trotz der phylogenetischen Distanz zum Menschen die grundsätzlichen Folgen einer Infektion mit PERV *in vivo* demonstrieren könnte. Darüber hinaus wurde ein Tiermodell mit nicht-humanen Primaten angestrebt, da sich die Ergebnisse einer derartigen Studie auf die Situation des humanen Xenotransplantat-Rezipienten wesentlich besser übertragen ließen, als die Daten einer Studie mit Kleintieren.

Zusammenfassend sollte so das Wirtsspektrum, sowie das infektiöse und potentiell pathogene Potential der porcinen endogenen Retroviren *in vitro* und *in vivo* detailliert charakterisiert werden.

3. ERGEBNISSE

3.1 Das Wirtsspektrum von PERV *in vitro*

Nach der Entdeckung und den ersten elektronenoptischen und biochemischen Untersuchungen der porcinen endogenen Retroviren (PERVs) Anfang 1970 (Breese, 1970), schenkte man diesen Viren lange Zeit wenig Beachtung. Erst die Überlegung, Schweine als Quelle für Xenotransplantate zu verwenden, warf die Frage nach der mikrobiologischen Sicherheit dieser porcinen Xenotransplantate auf. Diese Problematik erhielt besondere Bedeutung, da in ersten Infektionsversuchen gezeigt werden konnte, daß PERVs humane Zellen *in vitro* infizieren können (Patience et al., 1997), und somit das Risiko einer potentiellen Übertragung von PERVs auf den humanen Rezipienten *in vivo* besteht. Für die spätere Etablierung eines Tiermodells wurden daher Zellen verschiedener Kleintiere auf ihre Suszeptibilität für eine Infektion mit PERV *in vitro* untersucht.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde mit den beiden bislang einzigen xenotropen Subtypen PERV-A und PERV-B, sowie dem ecotropen Subtyp PERV-C gearbeitet. Später wurde zusätzlich mit einem rekombinierten Subtyp PERV-A/C gearbeitet. Dieser war nach der Infektion von humanen 293 Zellen mit PERVs aus Mitogen-stimulierten porcinen PBMCs durch Rekombination von *env*-Sequenzen von PERV-A und PERV-C während der Passagierung auf humanen 293 Zellen entstanden (Abbildung 4.4; Wilson et al., 1998).

3.1.1 Die Infektion von Zellen verschiedener Kleintiere

Für diese Infektionsversuche wurden vorwiegend primäre Zellen verwendet, da sie im Gegensatz zu immortalisierten und transformierten Zell-Linien aufgrund ihres „naiven“ Status am besten die natürliche Kompetenz der Zellen *in vivo* widerspiegeln. Diese Zellen wurden mit PERVs infiziert, welche von der porcinen Zell-Linie PK15 (PERV/PK) oder der humanen Zell-Linie 293 (PERV/293) produziert wurden (Tabelle 2.11). In den verwendeten primären Zellen von Ratten und Baumwollratten ließ sich 4 Wochen nach der Inokulation keine Infektion mit PERV nachweisen. Zwar zeigten einige Kulturen positive RT-Werte in ihren Überständen (Tabelle 3.1), doch ließen sich in einer PCR mit spezifischen Primern keine proviralen Sequenzen von PERV amplifizieren. Die detektierten RT-Aktivitäten wurden daher vermutlich durch aktivierte endogene Retroviren der Ratten freigesetzt.

Tabelle 3.1: Infektion von Zellen verschiedener Kleintiere mit PERV *in vitro*.

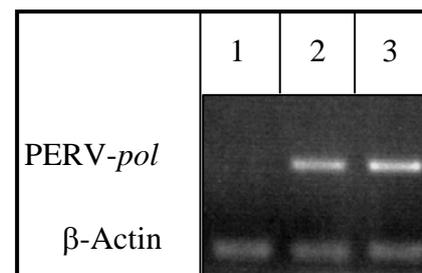
Spezies	Zellursprung	Virus	Titer/10 ml	Detektion	
				RT[mU/ml]	PCR
Ratte	Niere	PERV/PK	1 x 10 ^{2,3}	-	NG
		PERV/293	1 x 10 ^{3,2}	-	-
	Milz	PERV/PK	1 x 10 ^{2,3}	-	NG
		PERV/293	1 x 10 ^{3,2}	+*	-
	PBMCs	PERV/PK	1 x 10 ^{2,3}	-	NG
		PERV/293	1 x 10 ^{3,2}	+*	-
	Embryo	PERV/PK	1 x 10 ^{2,3}	-	NG
		PERV/293	1 x 10 ^{3,2}	+*	-
Baumwollratte	Niere	PERV/PK	1 x 10 ^{2,3}	-	NG
		PERV/293	1 x 10 ^{3,2}	-	-
	Milz	PERV/PK	1 x 10 ^{2,3}	-	NG
		PERV/293	1 x 10 ^{3,2}	+*	-
	PBMC	PERV/PK	1 x 10 ^{2,3}	-	NG
		PERV/293	1 x 10 ^{3,2}	+*	-
Nerz	Mv1Lu	PERV/PK	1 x 10 ^{2,3}	-	-
		PERV/293	1 x 10 ^{3,2}	39 ± 1,8	+
Katze	CRFK	PERV/PK	1 x 10 ^{2,3}	-	-
		PERV/293	1 x 10 ^{3,2}	+*	-
	PG-4	PERV/PK	1 x 10 ^{2,3}	-	-
		PERV/293	1 x 10 ^{3,2}	16 ± 2	+

NG: nicht getestet; * : Überstände dieser kultivierten Zellen zeigten eine positive RT-Aktivität, doch ließen sich über eine PCR mit PERV-spezifischen Primern in der DNA der Zellen keine proviralen Sequenzen amplifizieren. Die detektierte RT-Aktivität wurde vermutlich durch aktivierte endogene Retroviren der Ratte oder der Katze freigesetzt. Die Standardabweichung ergibt sich aus Messungen von Triplikaten.

Dagegen ließ sich in der DNA der Zell-Linien Mv1Lu und PG-4 provirale DNA mit PERV-spezifischen Primern nachweisen (Abbildungen 3.1 und 3.2). Weiterhin zeigten diese Kulturen Mangan(Mn²⁺)-abhängige RT-Aktivität in ihren Überständen, was auf eine produktive Infektion dieser Zelltypen mit Gammaretroviren wie PERV hindeutete (Tabelle 3.1). Da jedoch die feline Zell-Linie PG-4 für den Aufbau eines entsprechenden Kleintier-Modells nicht geeignet erschien, wurde aufgrund der produktiven Infektion der Nerzzell-Linie Mv1Lu der Nerz als ein in Frage kommendes Modell-System in Betracht gezogen (siehe 3.2.1). Im Vorfeld sollte allerdings durch nähere Charakterisierung der Zell-Linie Mv1Lu das Infektions- und Replikations-Potential von PERV auf Zellen dieser Spezies analysiert werden.

Abbildung 3.1: Nachweis proviraler DNA mittels PCR und PERV-pol spezifischen Primern in DNA von PERV/293-Infizierten PG-4 Zellen.

DNA von uninfizierten PG-4 Zellen (1) und PERV/293-infizierten PG-4 Zellen (2). Zur Kontrolle der PCR wurde DNA aus 293/PERV-Zellen (3) verwendet. Zur Kontrolle der DNA-Qualität wurden in einer Multiplex-PCR gleichzeitig Sequenzen des β-Actin-Gens amplifiziert.



3.1.1.1 Die Infektion der Nerzzell-Linie Mv1Lu

Für eine Überprüfung, ob die detektierte RT-Aktivität in den Überständen der PERV-infizierten Zell-Linie Mv1Lu mit infektiösen Virus-Partikeln assoziiert ist, wurde das Virus pelletiert, auf uninfizierten 293 Zellen titriert und mittels PCR ein infektiöser Titer von 1×10^2 TCID₅₀/ml ermittelt. Analyse mit Subtyp-spezifischen Primern ergab, daß beide von PERV/293 produzierten polytrophen Subtypen, PERV-A und PERV-B, auf die Nerz-Zellen übertragen wurden ([Abbildung 3.2](#)). Daraus ließ sich schließen, daß Mv1Lu Zellen die entsprechenden Rezeptoren beider Subtypen von PERV exprimieren. PERV/Mv1Lu konnte weiterhin auf uninfizierte Mv1Lu Zellen, sowie auf uninfizierte 293 Zellen passagiert werden. Wiederum wurden dabei beide Subtypen von PERV übertragen ([Abbildung 3.2](#)).

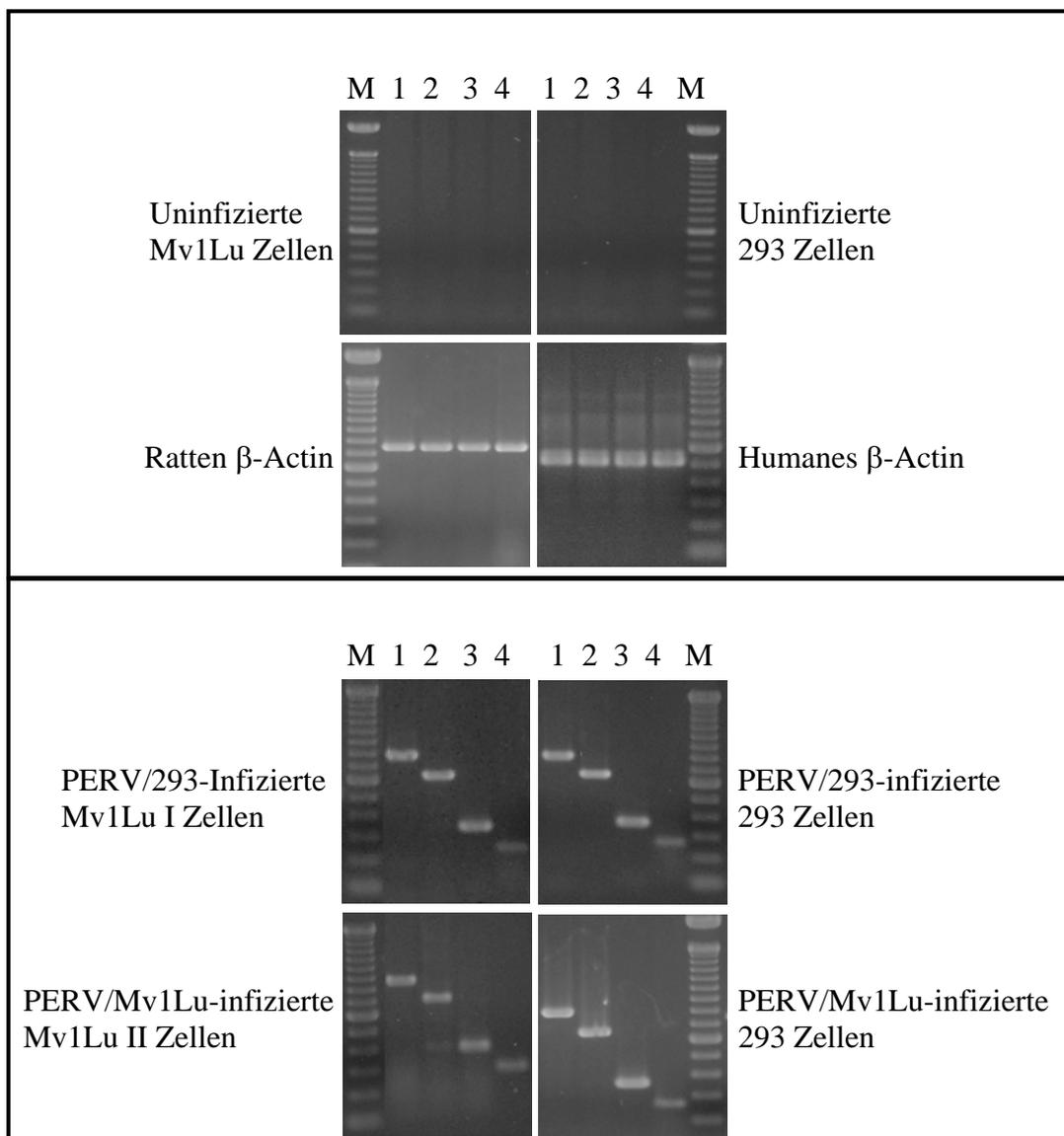


Abbildung 3.2: PCR mit DNA von uninfizierten und infizierten Mv1Lu-Zellen und 293 Zellen. Die PCR erfolgte mit spezifischen Primern für PERV-*gag* (1); PERV-*pol* (2); PERV-*env-A* (3) und PERV-*env-B* (4); Die Qualität der DNA wurde durch Amplifikation von β -Actin Sequenzen überprüft. M: 100 bp-Leiter. (Specke et al., 2001c)

Neben dem Nachweis der Integration proviraler DNA wurde die Replikationsfähigkeit von PERV/293 mittels RT-Assay und der Expression des transmembranen Hüllproteins p15E von PERV in einem Immunperoxidase-Assay (IPA) in PERV/293-infizierten Mv1Lu-Zellen und humanen 293 Zellen untersucht. Die Expressionsdaten zeigten dabei deutlich, daß die Replikation von PERV/293 in der humanen Zell-Linie wesentlich stärker erfolgte, als in den Mv1Lu-Zellen. In den Überständen von PERV/293-infizierten 293 Zellen wurden RT-Aktivitäten von 280 ± 6 mU/ml nachgewiesen, wogegen in den Überständen der Nerz-Zellen nur Werte von $39 \pm 1,8$ mU/ml RT-Aktivität gemessen werden konnten. Auch im IPA wurde durch die signifikant stärkere Färbung der Kultur die größere Anzahl der p15E exprimierender Zellen visualisiert ([Abbildung 3.3](#)).

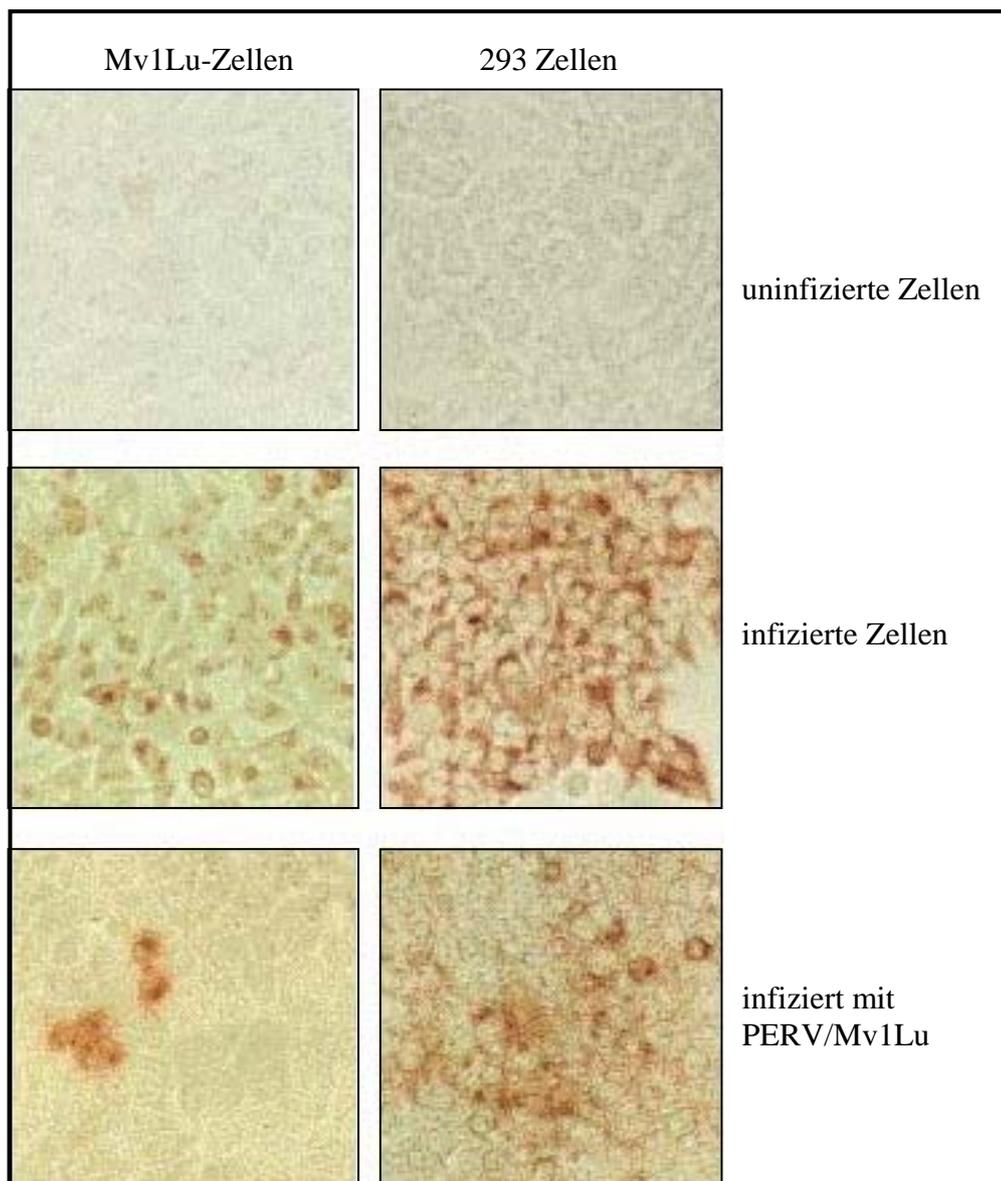


Abbildung 3.3: Immunoperoxidase Assay mit uninfizierten und infizierten Nerz Mv1Lu (links) und humanen 293 Zellen (rechts). Die Infektion wurde über die Expression des viralen p15E von PERV detektiert und mittels Rotfärbung der infizierten Zellen visualisiert. Die Mikrographien wurden an einem Zeiss Axiovert Lichtmikroskop bei einer 100-fachen Vergrößerung aufgenommen. (Specke et al., 2001c).

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß PERV die Fähigkeit der höheren Replikation auf humanen Zellen auch nach einer Passage in der Nerzzell-Linie Mv1Lu nicht verliert: In parallel mit PERV/Mv1Lu-transfizierten Mv1Lu und 293 Zellen erfolgte die Expression von p15E nach gleicher Replikationszeit in der humanen Zell-Linie 293 wesentlich stärker, als in den Mv1Lu Zellen ([Abbildung 3.3](#)). Dieses Ergebnis deutete auf eine bessere Replikationsfähigkeit von PERV auf humanen Zellen im Allgemeinen hin. Dieser Frage wird unter **3.1.4** detaillierter nachgegangen.

In diesem Zusammenhang wurden die Virus-Partikel von PERV/Mv1Lu mittels Elektronenmikroskopie auf eventuell morphologische Veränderungen untersucht. Jedoch zeigten die Viren die typische Morphologie von Gammaretroviren mit einem elektronenoptisch dichteren Membran-umhüllten Kernbereich und einem Durchmesser von etwa 100 nm. Im Vergleich zu PERV/293 wiesen sie weder bei der Knospung ([Abbildung 3.4 a, c](#)) noch als freie Partikel ([Abbildung 3.4 b, d, e, f](#)) sichtbare Unterschiede auf. Jedoch zeigte auch die elektronenmikroskopische Untersuchung einer Anzahl statistisch relevanter Schnitte von PERV/293-infizierten Nerz-, sowie humanen Zellen, daß in den infizierten humanen Zellen eine relativ höhere Anzahl von Viruspartikeln vorkam.

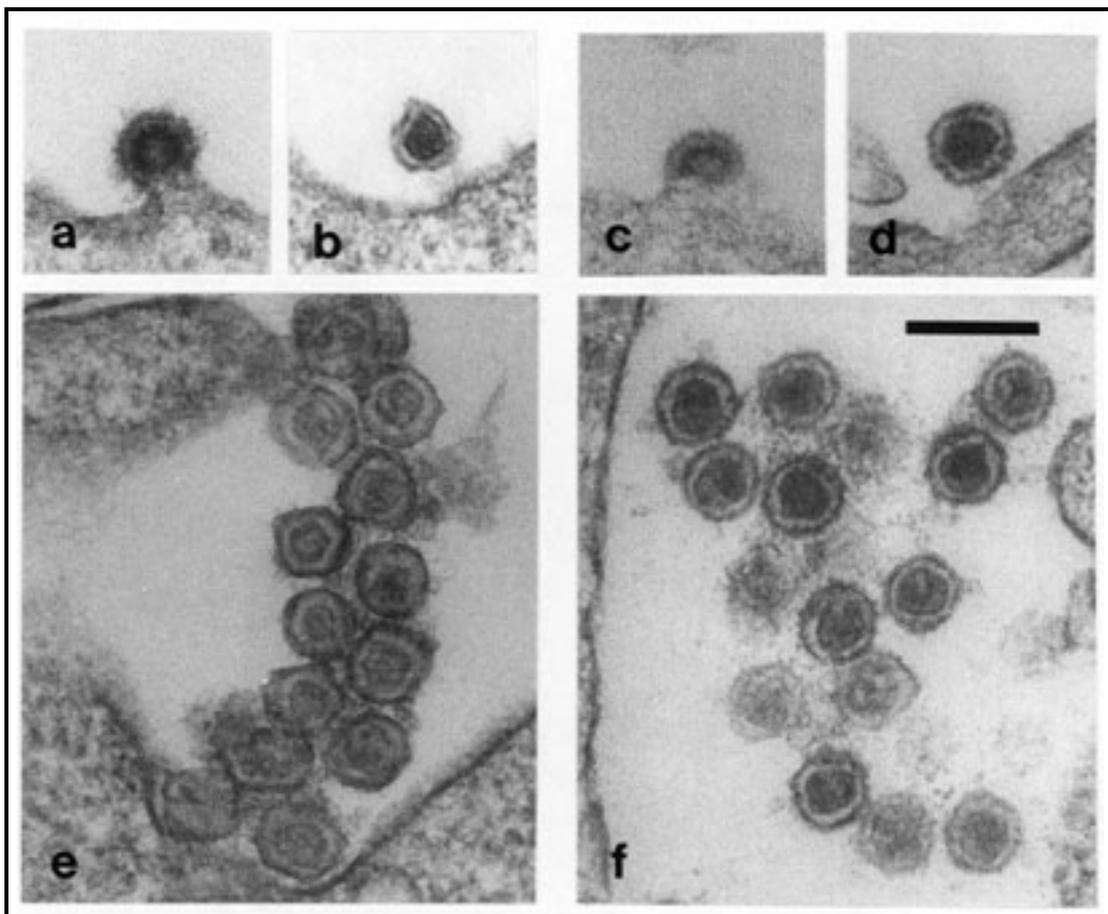


Abbildung 3.4: Elektronenoptische Aufnahmen von PERV/293 und PERV/Mv1Lu-Partikeln. Knospende und freie Viruspartikel, die von humanen 293 Zellen (a, b, e) und von der Nerzzell-Linie Mv1Lu (c, d, f) produziert wurden. Bar: 200 nm. (Specke et al.,

2001c)
Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der PERV/293-infizierten Mv1Lu Zellen fiel das Vorkommen von multivesikulär („multivesicular body“, MVB)-ähnlichen Strukturen auf. Während in uninfizierten Mv1Lu Zellen derartige Strukturen gänzlich fehlten, lagen die MVBs in den infizierten Mv1Lu Zellen als Zisternen-artig angeordnete Komplexe im gesamten Zytoplasma vor ([Abbildung 3.5](#)).

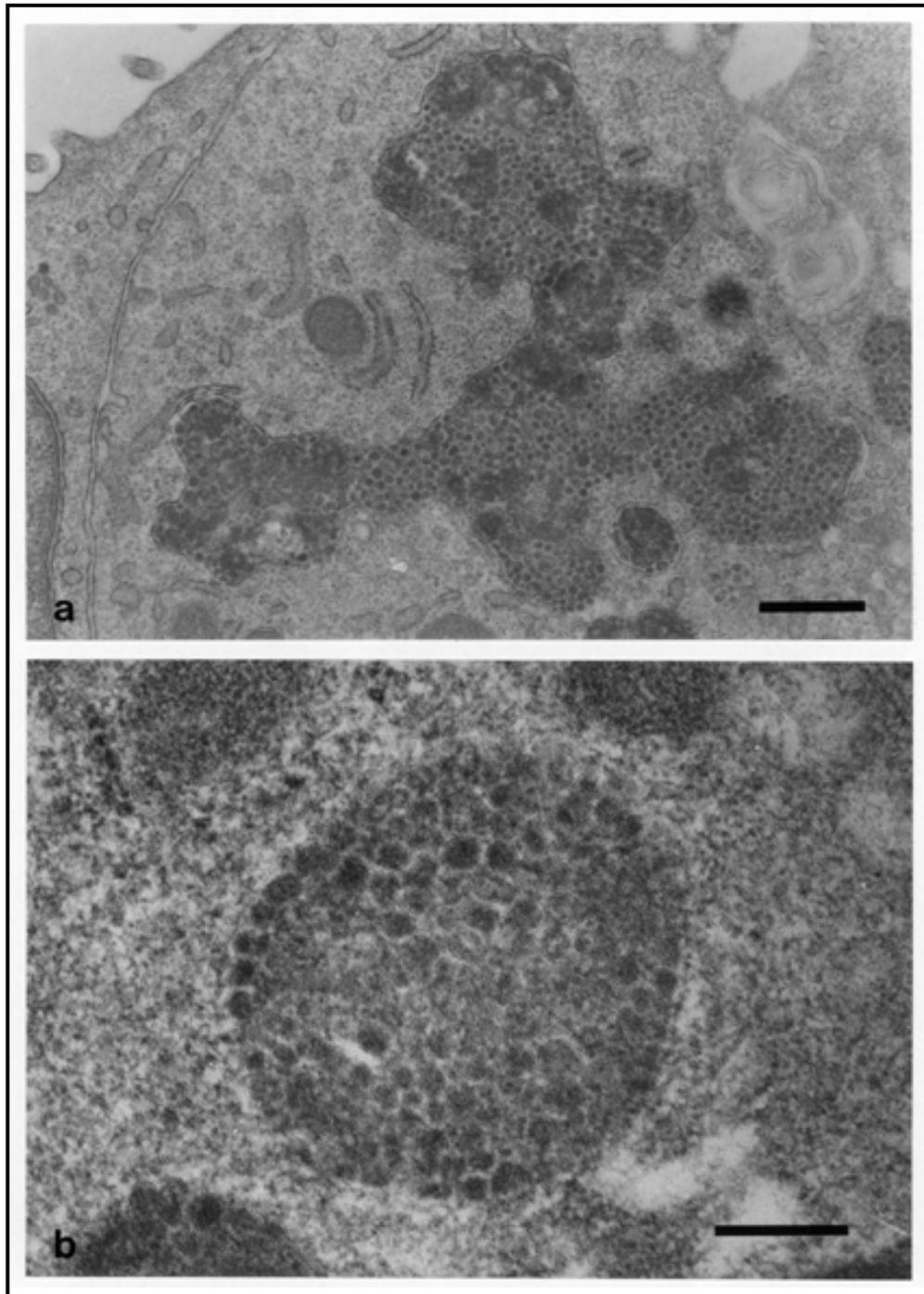


Abbildung 3.5: Elektronenoptische Aufnahmen von MVBs in PERV-infizierten Mv1Lu-Zellen. In infizierten Mv1Lu-Zellen findet man im gesamten Zytoplasma MVB-ähnlichen Strukturen, welche meist Zisternen-artig vorkommen (a). Die MVBs, enthalten wiederum große Mengen an virus like particles (VLPs), welche einen Durchmesser von 60 nm aufweisen (b). Bar: 200 nm. (Specke et al., 2001c).

Die MVBs wiederum enthielten eine Vielzahl von Partikeln Virus-ähnlicher Morphologie („virus-like particles“, VLPs), welche allerdings im Gegensatz zu normalen Gammaretroviren nur einen Durchmesser von 60 nm aufwiesen. Die Größe und Morphologie der VLPs deutete damit auf das Vorliegen unreifer Viruspartikel hin. Der Nachweis der viralen Proteine p15E und Gag von PERV in den MVBs mittels ImmunFluoreszenzmikroskopie stützte weiterhin die Vermutung, daß es sich bei den VLPs um eine Ansammlung unreifer PERV-Partikel handelte, welche in den MVBs gelagert werden. In der Immun-Fluoreszenzmikroskopie sind diese Ansammlungen deutlich als kugelige Komplexe im Zytoplasma der Zellen erkennbar ([Abbildung 3.6](#)).

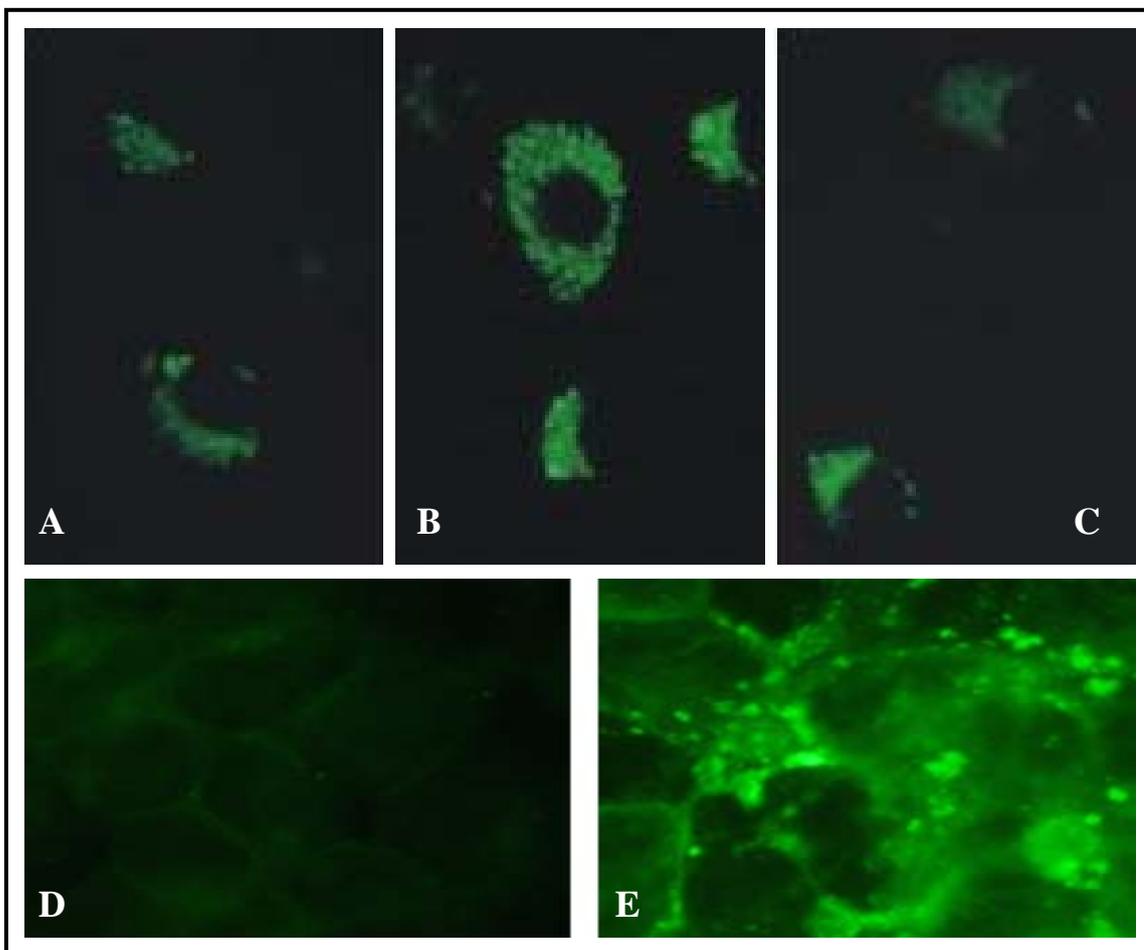


Abbildung 3.6: Immun-Fluoreszenzmikroskopie mit PERV/293-infizierten Mv1Lu Zellen. Die Detektion von PERV-Proteinen erfolgte über die Verwendung eines p15E-erkennenden Antiserums und einen FITC-markierten Zweitantikörper. Die Färbung zeigt deutlich die kugeligen Strukturen der MVBs im Zytoplasma der infizierten Zellen (A, B, C). Die Verwendung von Prä-Immunsereum oder nur des Zweitantikörpers führte zu keiner Färbung. Uninfizierte Mv1Lu Zellen zeigten in jeder Kontrolle ebenfalls keine Färbung viraler Proteine. Zum Vergleich wurden uninfizierte und PERV/293-infizierte 293 Zellen mit den selben Seren inkubiert. Während die uninfizierten 293 Zellen keinerlei spezifische Färbung zeigten (D), erfolgte in den infizierten 293 Zellen, abgesehen von einigen Ansammlungen, die Anfärbung der viralen Proteine diffus über die ganze Zelle (E).

3.1.2 Die Infektion von Zellen nicht-humaner Primaten

Die Etablierung eines Kleintiermodells im Zusammenhang mit der Untersuchung viraler Infektionsvorgänge beim Menschen, hat neben einer Vielzahl von praktischen und wirtschaftlichen Gründen den entscheidenden Nachteil, ein vom Menschen phylogenetisch weit entferntes Modell zu liefern. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit parallel zu den Kleintierexperimenten ein aussagekräftigeres Tiermodell in nicht-humanen Primaten angestrebt. Um auch hier eine ausreichende Suszeptibilität der jeweiligen Spezies zu gewährleisten, wurden Zellen verschiedener Affen-Arten auf ihre Suszeptibilität für eine Infektion mit PERV *in vitro* getestet (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Infektion von primären Zellen nicht-humaner Primaten *in vitro*.

Die Zellen wurden mit verschiedenen Subtypen von PERV inokuliert und mittels PCR mit PERV-spezifischen Primern eine Woche nach Infektion auf eine Integration proviraler DNA in das Wirtsgenom getestet. Weiterhin wurden zum selben Zeitpunkt die Überstände der Zellkulturen auf das Vorhandensein von Gammaretroviren-spezifischer RT-Aktivität untersucht. Die mit * gekennzeichneten Kulturen zeigten allerdings erst 14 Tage nach Inokulation eine signifikante RT-Aktivität in ihren Überständen. Für weitere Erklärungen, siehe Text.

Spezies	Tier	Gewebe	Virus	Inokulierter Titer/10 ml	Pro-virus	Sezernierte RT-Aktivität [mU/ml]	
Rhesus- Affe	178	PBMCs	PERV/5°	1 x 10 ⁶	+	12 ± 2,0	
			PERV-B	1 x 10 ^{2,7}	+	0 ± 0,08	
	179	PBMCs	PERV/5°	1 x 10 ⁶	+	11 ± 1,5	
			PERV-B	1 x 10 ^{2,7}	+	0 ± 0,2	
	180	PBMCs	PERV/5°	1 x 10 ⁶	+	13 ± 0,7	
			PERV-B	1 x 10 ^{2,7}	+	0 ± 0,1	
Pavian	6614	PBMCs	PERV/5°	1 x 10 ⁶	+	14 ± 3,0	
			PERV-B	1 x 10 ^{2,7}	+	0 ± 0,17	
			PERV/293	1 x 10 ^{3,2}	+	0 ± 0,3 (11 ± 0,5)*	
	7341	PBMCs	PERV/PK	1 x 10 ^{2,3}	-	0 ± 0,1	
			PERV/5°	1 x 10 ⁶	+	12 ± 1,7	
			PERV-B	1 x 10 ^{2,7}	+	0 ± 0,02	
	1301	Milz	PERV/293	1 x 10 ^{3,2}	+	0 ± 0,15 (9 ± 2,3)*	
			PERV/PK	1 x 10 ^{2,3}	-	0 ± 0,2	
			PERV/293	1 x 10 ^{3,2}	+	0 ± 0,09 (7 ± 0,7)*	
			PERV/PK	1 x 10 ^{2,3}	-	0 ± 0,2	
Schweins- Affe	6501	PBMCs			-	0 ± 0,03	
		Milz	PERV/5°	1 x 10 ⁶	+	0 ± 0,08	
	6506	Niere				+	0 ± 0,11
		PBMCs				-	0 ± 0,06
		Milz	PERV/5°	1 x 10 ⁶	+	0 ± 0,13	
		Niere				+	0 ± 0,09

Dazu wurden primäre Zellen von Rhesus-Affen, Pavianen und Schweins-Affen mit verschiedenen Subtypen von PERV inokuliert und mittels PCR auf die Integration proviraler DNA in das zelluläre Genom getestet. Alle drei Spezies der nicht-humanen Primaten zeigten sich dabei als suszeptibel, da bereits eine Woche nach Inokulation mit PERV/5° in allen Proben eine Infektion nachweisbar war (Tabelle 3.2 und Abbildung 3.7). Da PERV/5° eine PERV-A/C Rekombinante mit reinem PERV-A Tropismus ist, zeigte die

Infektion dieser Zellen und die Amplifikation von Subtyp-spezifischer proviraler DNA das Vorhandensein des putativen Rezeptors für PERV-A.

Zellen von Rhesus-Affen und Pavianen ließen sich weiterhin mit PERV-B infizieren (Tabelle 3.2 und Abbildung 3.7), so daß auf den getesteten Zellen die Rezeptoren beider polytropen Subtypen von PERV vorkommen müssen. Eine Woche nach der Inokulation mit PERV-B ($1 \times 10^{2,7}$ TCID₅₀) waren PERV-B Proviren detektierbar, jedoch resultierte diese Infektion innerhalb der verbleibenden Lebensdauer der primären Zellen von 14 Tagen nicht in einer produktiven Infektion.

Spezies	Pavian				Rhesus				Schweinsaffe			
Gewebe	PBMC		PBMC		PBMC		PBMC		Milz		Niere	
Tier	6614	7341	6614	7341	178	179	178	179	6501	6506	6501	6506
PERV	M - +	- +	M - +	- +	M + -	+ -	M - +	- +	M - +	- +	M - +	- +
PERV Primer												
Kontroll- Primer	BaEV		BaEV		β-actin		β-actin		β-actin		β-actin	

Abbildung 3.7: Nachweis proviraler PERV-DNA mittels PCR in primären Zellen nicht-humaner Primaten. Primäre PBMCs von Pavianen und Rhesus-Affen wurden parallel mit PERV/5° und PERV-B inokuliert. Bereits eine Woche nach Inokulation konnte provirale DNA mittels PCR und PERV-spezifischen Primern detektiert werden. Dabei konnte in dem jeweiligen Ansatz der entsprechend inokulierte Subtyp nachgewiesen werden, was auf eine Suszeptibilität der Zellen für beide Subtypen von PERV hindeutete. PBMCs der Schweins-Affen ließen sich nicht mit PERV/5° infizieren. Dagegen konnten primäre Milz- und Nierenzellen der Schweins-Affen mit PERV/5° infiziert werden. Zur Kontrolle der Pavian-DNA wurden Sequenzen von BaEV, zur Kontrolle der Rhesus und Schweins-Affen-DNA β-Actin-Sequenzen amplifiziert. + infizierte Zellen; - uninfizierte Kontroll-Zellen. (Specke et al., 2002b).

Diese Vermutung wurde weiterhin durch die Infektion von Pavian-Zellen mit PERV/293 gestützt, welches ein Gemisch aus PERV-A und PERV-B repräsentiert. Allerdings schien die Infektion der Zellen mit der Dosis an inokuliertem Virus zu korrelieren, da die Inokulation der gleichen Pavian-Zellen mit PERV-PK, welches ebenfalls ein Gemisch aus PERV-A und PERV-B enthält, zu keiner detektierbaren Infektion führte. Die Etablierung einer produktiven Infektion schien daher in Abhängigkeit der inokulier-

ten Virusmenge zu erfolgen (Tabelle 3.2). Für den Nachweis einer Virusreplikation wurde die Menge von Gammaretroviren-spezifischer RT-Aktivität in den jeweiligen Kulturüberständen herangezogen. Dabei zeigte sich, daß bei der Inokulation mit PERV/5° (1×10^6 TCID₅₀) bereits nach einer Woche neben dem Nachweis proviraler DNA auch signifikante RT-Aktivitäten detektierbar waren. Bei Inokulation mit PERV/293 ($1 \times 10^{3,2}$ TCID₅₀) erfolgte bereits nach einer Woche der Provirus-Nachweis, signifikante RT-Aktivitäten waren dagegen erst zwei Wochen nach der Infektion nachweisbar (Tabelle 3.2). Wie bereits erwähnt, führte die Inokulation der Pavian-Zellen mit PERV/PK ($1 \times 10^{2,3}$ TCID₅₀) bei keiner der getesteten Ansätze zu einer Integration proviraler DNA und damit auch zu keiner produktiven Infektion. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß es bei einer Inokulation mit höheren Titern von PERV/PK ebenfalls zu einer Infektion der Pavian-Zellen und einer Replikation von PERV auf diesen infizierten Zellen gekommen wäre. Gleiches gilt für die mit PERV-B infizierten Zellen von den Pavianen und den Rhesus-Affen. Da bislang keine Versuche unternommen wurden, Zellen von Schweins-Affen mit PERV-B zu infizieren, kann zur Zeit bezüglich der Suszeptibilität dieser Spezies für diesen Subtyp keine Aussage getroffen werden. Dagegen bleibt anzumerken, daß die Zellen der Schweins-Affen trotz der relativ hohen inokulierten Titer von PERV/5° (1×10^6 TCID₅₀) keine produktiven Infektionen der primären Milz- und Nierenzellen aufwiesen, und die PBMCs der Tiere nicht infizierbar waren.

Für den Nachweis einer sich tatsächlich in der Kultur verbreitenden Infektion, wurden die mit PERV/293 inokulierten primären Pavian-Zellen über einen Zeitraum von 15 Tagen detailliert analysiert. Als Maß der Infektion wurde das Auftreten der proviralen DNA im Wirtsgenom, sowie von RT-Aktivität und viraler RNA im Kulturüberstand detektiert (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Verbreitung einer Infektion von PERV/293 in primären Pavian-Zellen. Die Infektion wurde durch das Auftreten von proviraler DNA im Wirtsgenom, sowie durch Detektion von Gammaretroviren-spezifischer RT-Aktivität und viraler RNA im Kulturüberstand über einen Zeitraum von 15 Tagen nach Inokulation mit PERV/293 bestimmt.

Tier	Gewebe	RT-Aktivität [mU/ml]					
6614	PBMCs	280 ± 6	32 ± 2,5	0 ± 0,3	0 ± 0,3	9 ± 0,3	11 ± 0,5
7341	PBMCs	280 ± 6	17 ± 1	0 ± 0,15	0 ± 0,2	6,5 ± 0,6	9 ± 2,3
1301	Niere	280 ± 6	22 ± 0,9	0 ± 0,7	0 ± 0,8	6 ± 0,4	7 ± 0,7
Provirus [#]		-	-	+	+	+	+
virale RNA [§]		+	NG	-	-	-	+
Zeit-Skala		Tag 0 [*]	Tag 3	Tag 6	Tag 9	Tag 12	Tag 15

Provirale DNA wurde mittels nested-PCR und spezifisch Primern für PERV *pol* detektiert.

§ Viruspartikel aus Überständen der infizierten Kulturen wurden mittels Ultrazentrifugation pelletiert und in den pelletierten Partikeln virale RNA mittels RT-PCR detektiert.

* Tag der Inokulation. 5×10^6 Zielzellen in 10 ml Medium wurden durch Zugabe von weiteren 10 ml PERV/293-enthaltendem Überstand ($1 \times 10^{2,2}$ TCID₅₀/ml) inokuliert. Das Virus wurde von 1×10^7 293/PERV Zellen innerhalb von 3 Tagen produziert. Die Standardabweichung ergibt sich aus Messungen von Triplikaten. NG: Nicht getestet

Sechs Tage nach der Infektion konnte in allen Zellen PERV-provirale DNA nachgewiesen werden. Nach sechs weiteren Tagen waren in den Kulturüberständen signifikante RT-Aktivitäten meßbar, welche im Verlauf der folgenden 3 Tage noch weiter anstiegen. Daß die gemessene RT-Aktivität mit einer Neubildung viraler Partikel assoziiert war, konnte an Tag 15 der Infektion durch Ultrazentrifugation der Überstände und anschließender RT-PCR mit RNA aus den pelletierten Viren gezeigt werden. Diese Daten zeigten deutlich, daß es sich bei der beobachteten Infektion der Pavian-Zellen um eine echte Neuinfektion handelte, welche sich in der Kultur durch Replikation auf den Pavian-Zellen ausbreitete.

3.1.3 Die Infektion von humanen Zellen

Für die Evaluierung der Virussicherheit bei der Xenotransplantation ist die Suszeptibilität humaner Zellen für eine Infektion mit PERV von grundlegender Bedeutung. Daher wurden intensive Infektionsstudien mit humanem Zellmaterial durchgeführt, wobei ein Schwerpunkt auf die Verwendung primärer humaner Zellen gelegt wurde (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Infektion von primären humanen Zellen und Zell-Linien *in vitro*. Alle Zellen wurden mit PERV/5° mit einem Titer von 1×10^6 TCID₅₀ zellfrei inokuliert. Die Detektion der Infektion erfolgte 1 Woche nach Inokulation mittels PCR. Die RT-PCR erfolgte nach Isolation von viraler RNA aus pelletierten Viruspartikeln des Überstands der infizierten Kulturen. RT-Aktivität wurde mittels eines Gammaretroviren-spezifischem RT-Assay in den Überständen der Kulturen detektiert. Die Standardabweichung ergibt sich aus Messungen von Triplikaten. NG: Nicht getestet.

Name	Zell-Typ	Detektion		
		PCR	RT-PCR	RT
293	Endothelzellen der Niere	+	+	530 ± 12
C8166	T-Zellen	+	+	27 ± 2
THP-1	Monozyten	+	+	19 ± 2
WIL2.NS.6TG	Milzzellen	+	+	37 ± 5
PBMC	PBMC	+	+	12 ± 3
HCASMC	Glatte Muskelzellen der Koronararterie	+	NG	0 ± 0,2
HAEC	Endothelzellen der Aorta	+	+	17 ± 3
HPAEC	Endothelzellen der Pulmonararterie	+	+	15 ± 1
HUVEC	Endothelzellen der Nabelschnur	+	+	18 ± 2
HCTFC	Fibroblasten des Bindegewebe	+	+	22 ± 1

Alle Zelltypen wurden dazu mit einem Titer von 1×10^6 TCID₅₀ der PERV-A/C Rekombinanten PERV/5° zellfrei inokuliert. Bei allen verwendeten humanen Zellen konnte eine Woche nach der Inokulation eine Integration von PERV mittels PCR und PERV-spezifischen Primern detektiert werden (Abbildung 3.8). Für den Nachweis einer produktiven Infektion erfolgte die Messung von Gammaretroviren-spezifischer RT-Aktivität im Überstand der jeweiligen Kulturen. Außer in den Überständen der kultivierten glatten Muskelzellen der humanen Koronararterie, konnten in allen Proben signifikante Mengen an RT-Aktivität detektiert werden (Tabelle 3.4), was auf eine Replikation von PERV in den infizierten Zellen hinwies. Dabei ist erwähnenswert, daß der Überstand der Nierenzell-Linie 293 mit Abstand die höchste RT-Aktivität aufwies.

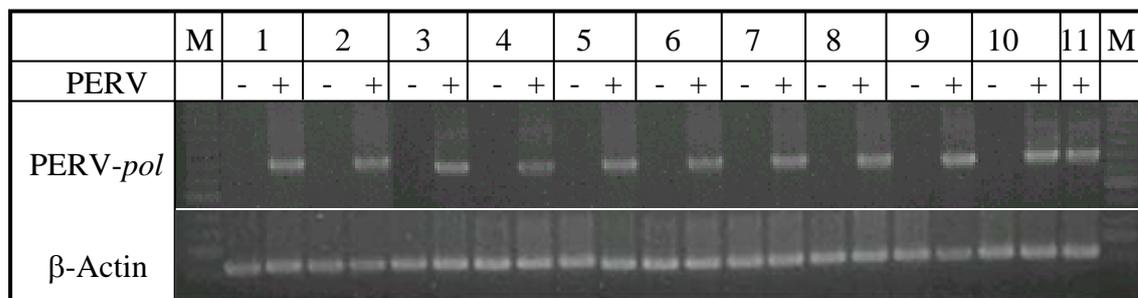
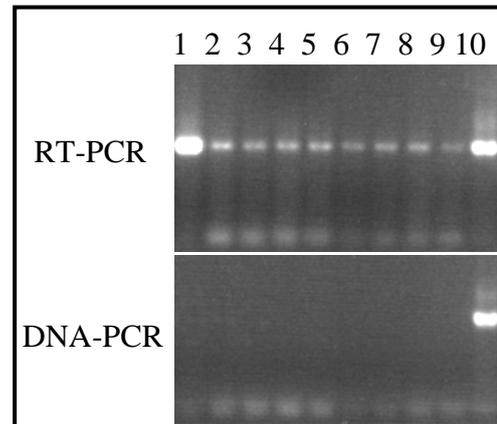


Abbildung 3.8: PCR mit DNA humaner Zellen zum Nachweis proviraler DNA der *pol*-Region von PERV. 1) 293-DNA; 2) C8166-DNA; 3) THP-1-DNA; 4) WIL2.NS.6TG-DNA; 5) PBMC-DNA; 6) HAEC-DNA; 7) HPAEC-DNA; 8) HUVEC-DNA; 9) HCTFC-DNA; 10) 293/PERV-DNA; M: 100 bp-Leiter

Für den Nachweis, daß die RT-Aktivität in den Überständen der infizierten Zellen auch mit intakten Viruspartikeln assoziiert ist, wurden diese aus den Überständen einiger Zellkulturen durch Ultrazentrifugation pelletiert und aus den Viruspartikeln virale RNA isoliert. Mittels RT-PCR konnte in allen getesteten Proben Bereiche des viralen PERV-Genoms amplifiziert werden ([Abbildung 3.9](#)).

Abbildung 3.9: RT-PCR mit RNA von pelletiertem Virus aus dem Überstand kultivierter humaner Zellen. RT-PCR mit RNA aus Überständen von : PERV/5° (1); C8166 (2); THP-1 (3); WIL2.NS.6TG (4); PBMC (5); HAEC (6); HPAEC (7); HUVEC (8); HCTFC (9). Zur Kontrolle der DNA-abhängigen Polymerase wurde sowohl in die RT-PCR als auch in DNA-PCR DNA von 293/PERV-Zellen (10) verwendet.



Zur Klärung der Frage, ob diese sezernierten Partikel auch Infektiösität besitzen, sollten die freigesetzten Viren erneut auf uninfizierten Zellen gleichen Typs passagiert werden. Da primäre Zellen aufgrund ihrer limitierten Lebensdauer für diese Experimente nicht geeignet waren, wurde dabei ausschließlich auf die verwendeten Zell-Linien zurückgegriffen. Überstände der PERV-infizierten lymphoiden Zell-Linien C8166 und WIL2.NS.6TG mit RT-Aktivitäten von 10 bzw. 37 mU/ml ([Tabelle 3.4](#)) wurden dazu auf uninfizierten Zellen des jeweils gleichen Zell-Typs zellfrei pasagiert.

Die Detektion proviraler DNA erfolgte in beiden Fällen 14 Tage nach der Inokulation mittels PCR ([Abbildungen 3.10](#) und [3.11](#)). Für beide Ansätze konnten weiterhin produktive Infektionen ermittelt werden, da in den Überständen der neu infizierten C8166/II-Kulturen eine RT-Aktivität von 26 ± 1 mU/ml, in den Überständen von WIL2.NS.6TG/II-Kulturen sogar von $30 \pm 1,8$ mU/ml detektiert wurden. Dies zeigte neben der Suszeptibilität der humaner Immunzellen für eine Infektionen auch deren Fähigkeit, die Replikation von PERV zu unterstützen.

Abbildung 3.10: Passagierung von PERV/C8166. Der Nachweis der Infektion erfolgte mittels PCR über Amplifikation von Sequenzen aus PERV-*gag* (1); PERV-*pol* (2); und PERV-*env-A* (3). Eine Amplifikation von PERV-*env-B* Sequenzen erfolgte nicht (4), da die Infektion mit einem PERV-A/C Subtyp durchgeführt wurde. Zur Kontrolle der DNA-Qualität diente die Amplifikation von β -Actin-Sequenzen (5). M: 100 bp-Leiter.

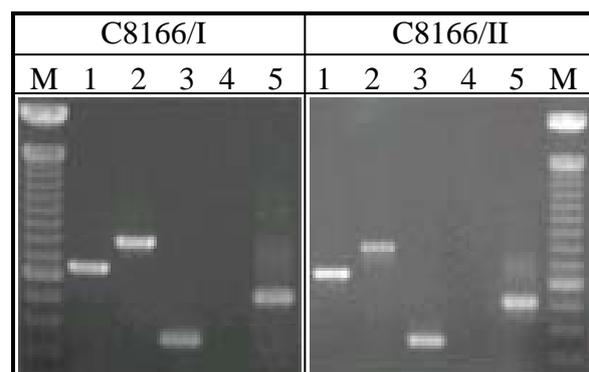


Abbildung 3.11: Passagierung von PERV/ WIL2.NS.6TG. Der Nachweis proviraler DNA erfolgte mittels PCR und Primern spezifisch für PERV-*pol*. Zur Kontrolle der DNA-Qualität diente die Amplifikation von β -Actin-Sequenzen. -: uninfizierte Zellen; +: infizierte Zellen; M: 100 bp-Leiter.

	WIL2.NS.6TG/I			WIL2.NS.6TG/II		
PERV	M	-	+	M	-	+
PERV- <i>pol</i>						
β -Actin						

Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, daß parallel zu den oben beschriebenen Versuchen auch uninfizierte 293 Zellen jeweils mit PERV/C8166 und PERV/WIL2.NS.6TG transfiziert wurden. Bei diesen 293 Zellen konnte unter Verwendung der selben Nachweissysteme eine Infektion mit PERV bereits nach 1 Woche nachgewiesen werden. Auch waren die gemessenen RT-Aktivitäten mit 380 mU/ml wesentlich höher als in den infizierten Immunzellen.

3.1.4 Adaptation von PERV an humane Zellen

Da sich die humane Nierenzell-Linie 293 im Verlauf der *in vitro* Experimente mit humanen Zellen als eine besonders suszeptible Zell-Linie für Infektionen mit PERV herausgestellt hatte, sollte das Replikationspotential von PERVs auf dieser humanen Zell-Linie detaillierter untersucht werden. In einen Immunoperoxidase-Assay wurde in PERV/5°-infizierten 293 Zellen die Expression von PERV-Proteinen analysiert und mittels eines spezifischen Serums gegen das Hüllprotein p15E von PERV visualisiert ([Abbildung 3.12 B](#)). Deutlich sieht man, daß fast alle Zellen der gesamten Kultur das virale Protein exprimierten, wogegen uninfizierte Kontrollzellen negativ blieben ([Abbildung 3.12 A](#)). Diese Daten konnte auch mit einem Serum verifiziert werden, welches gegen das gesamte PERV-Virion generiert wurde (Kaninchen 6; [Tabelle 2.9](#))

Auch in elektronenmikroskopischen Immuno-Gold-Färbungen ließ sich die Proteinexpression von PERV in humanen 293 Zellen zeigen. Auch hier wurde fast jede Zelle von dem Serum gegen das Hüllprotein p15E von PERV erkannt. Die Spezifität des Serums gegen p15E konnte dabei deutlich durch die Lokalisation der Goldpartikel im Bereich der Hüllmembran der PERV-Virionen gezeigt werden ([Abbildung 3.12 C](#)).

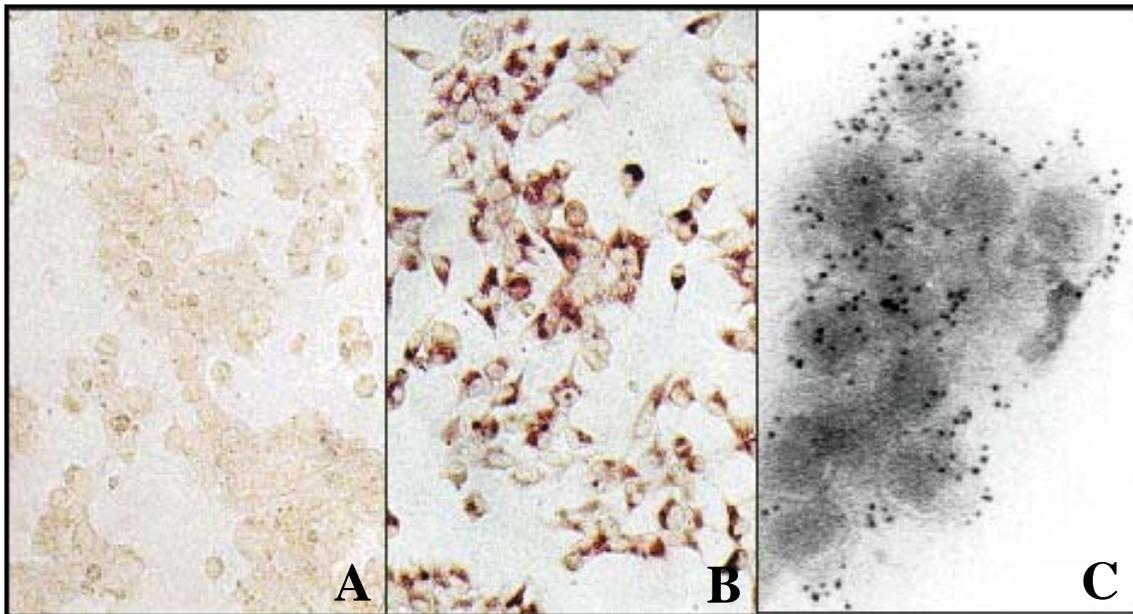


Abbildung 3.12: Immunologischer Nachweis der Expression von p15E in PERV/5°-infizierten humanen 293 Zellen. IPA mit uninfizierten (A) und PERV/5°-infizierten (B) 293 Zellen. Immuno-Gold-Färbung der PERV/5°-infizierten 293 Zellen (C). (Stephan et al., 2001).

Für die Untersuchung, ob die gebildeten PERV-Proteine mit der Freisetzung von infektiösen Virionen assoziiert sind, wurde, ähnlich den oben beschriebenen Passagierungen von PERV auf humanen lymphoiden Zellen, das Virus auf den humanen Epithelzellen der Nierenzell-Linie 293 passagiert. Dazu wurde PERV-NIH/3°, ein rekombiniertes PERV-A/C mit PERV-A Tropismus ([Abbildung 4.2](#)), seriell auf uninfizierte 293 Zellen übertragen ([Abbildung 3.13A](#)).

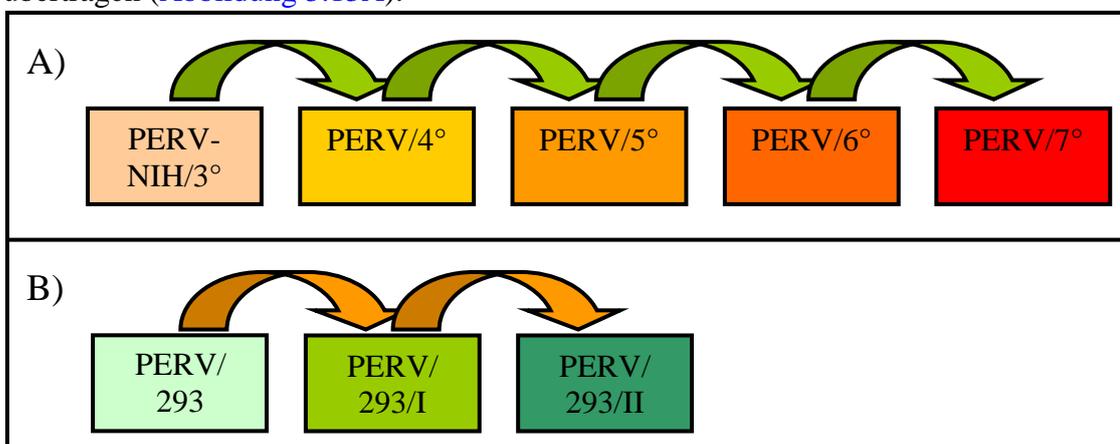
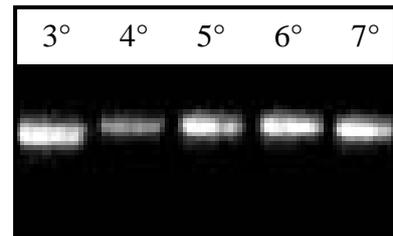


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung der seriellen Passagierung von PERV auf humanen 293 Zellen. Das aus infizierten 293 Zellen freigesetzte PERV-A/C (PERV-NIH/3°-PERV/6°) (A), bzw. PERV-A/PERV-B-Gemisch (PERV/293) (B) wurde im Verlauf der Passagierung jeweils auf uninfizierte 293 Zellen transfiziert.

Nach der Isolation von genomischer DNA aus den Zellen der jeweiligen Passagen wurden die einzelnen Genombereiche der integrierten Proviren mittels PCR amplifiziert. Bei der Auftrennung der PCR-Amplifikate in der Agarose-Gelelektrophorese fiel auf, daß sich die Amplifikate der LTR-Regionen der einzelnen Passagen in ihrer Laufgeschwindigkeit, und damit in ihrer Länge voneinander unterschieden ([Abbildung 3.14](#)).

Abbildung 3.14: PCR-Amplifikation von LTR-Regionen aus Proviren verschiedener Passagen von PERV-A/C auf humanen 293 Zellen.

Die unterschiedliche Laufgeschwindigkeit der Amplifikate deutete auf eine Veränderung der LTR-Länge im Verlauf der Passagierung hin. Die Bande im Agarosegel repräsentierte nur die Hauptfraktion der in der zellulären DNA vorkommenden LTRs. Nach Klonierung und Sequenzierung aus genomischer DNA amplifizierter Proviren fanden sich ebenfalls längere und kürzere LTR-Amplifikate, welche sich im Gel oberhalb, bzw. unterhalb der Hauptbande verteilten. Diese wurden allerdings wegen der limitierten Anzahl und der begrenzten Visualisierung durch EtBr kaum bis gar nicht sichtbar.



Die Klonierung und Sequenzierung der LTR-Amplifikate der einzelnen Passagen zeigte, daß in der Nukleotidabfolge der jeweiligen LTRs Blöcke direkter repetitiver Sequenz („Repeats“) von je 37 Basenpaaren (bp) vorkamen, welche sich mit zunehmender Passagierung multimerisierten (Abbildung 3.15). Datenbankanalysen zeigten, daß die Nukleotidabfolge dieser Repeats auch in der LTR-Sequenz von PERV-Providiren aus porcinen Lymphozyten (z.B. PERV-MSL; MSL = „Mini-Swine Lymphocytes“) vorkommt. Allerdings weisen alle bisher bekannten Sequenzen von PERV-LTRs aus Schweine-lymphozyten das hier beschriebenen Repeat nur einmal auf (Abbildung 3.15).

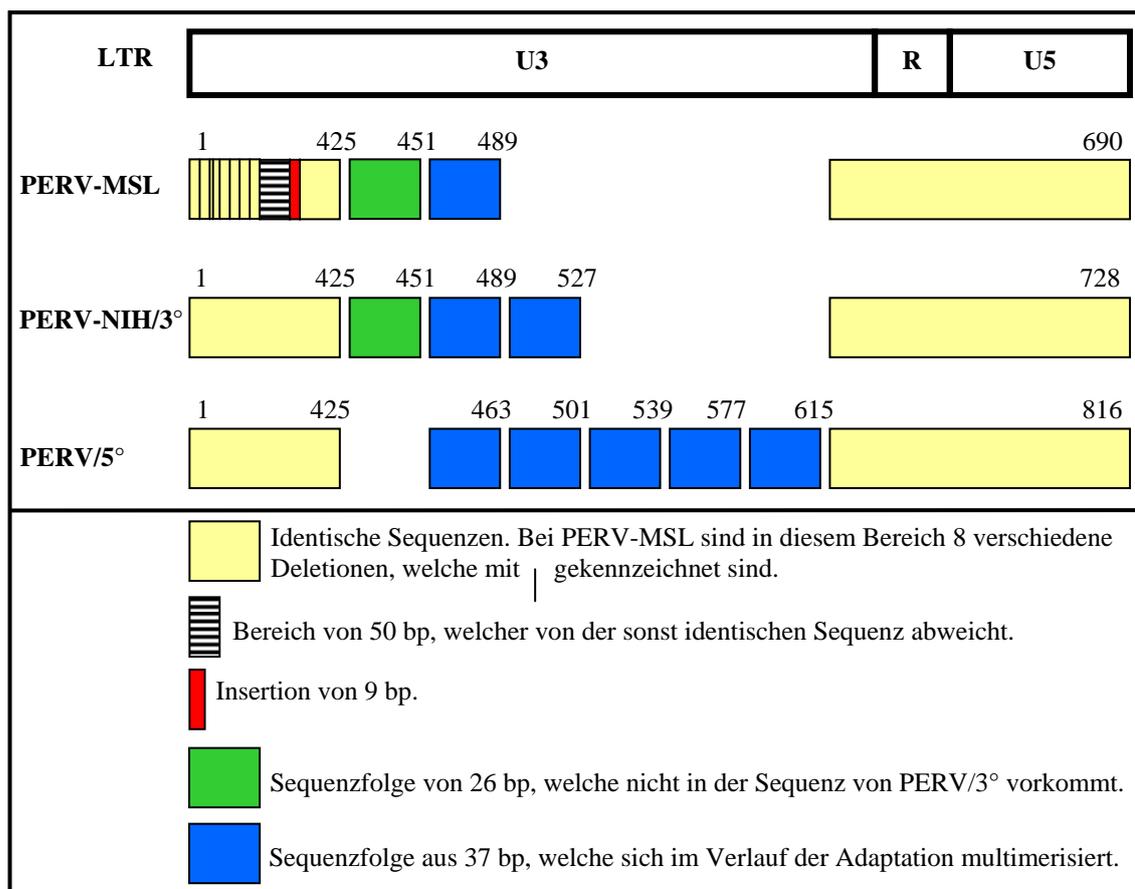


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung der LTR-Region von PERV-MSL und verschiedener Passagen von PERV auf humanen 293 Zellen. Eine gleiche Farbcodierung entspricht einer identischen Sequenz. Die Schematische Darstellung beruht auf Homologievergleichen von PERV/3° und PERV/5° zu PERV-MSL (AF 038600-EMBL). Vergleiche dazu [Abbildung 3.17](#).

Auffallend war weiterhin, daß es im Verlauf der Passagierung von PERV-A/C auf humanen Zellen in höheren Passagen zu einer Deletion eines Sequenzblocks von 26 bp kam ([Abbildung 3.15](#)).

Neben der Verlängerung der LTR-Regionen, zeigten die einzelnen Passagen von PERV-A/C mit zunehmender Passagenzahl auch einen starken Anstieg in ihrem Virustiter ([Abbildung 3.16 A](#)). Diese Daten sprachen damit für eine Korrelation der genetischen LTR-Veränderung und der Replikationsfähigkeit von PERV auf humanen 293 Zellen. Ähnliche Daten konnten auch nach der Passagierung von PERV/293 ([Abbildung 3.13 B](#)), einem Gemisch aus PERV-A und PERV-B, auf 293 Zellen gezeigt werden. Auch hier kam es im Verlauf der Passagierung mit ansteigender Passagenzahl zu einem Anstieg des Virustiters ([Abbildung 3.16 B](#)).

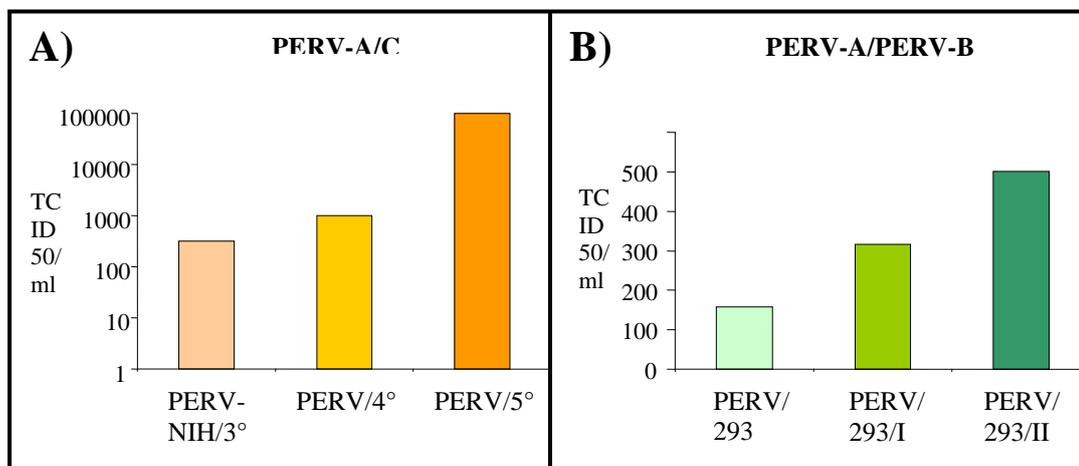


Abbildung 3.16: Schematische Darstellung der Virustiter verschiedener Passagen von PERV-A/C (A) und eines PERV-A/PERV-B Gemisches (B) auf humanen 293 Zelle. Die jeweiligen Titer wurden mittels IPA erstellt und mit der TCID₅₀-Software des NCBI ermittelt. Die unter (A) dargestellte TCID₅₀/ml ist logarithmisch aufgetragen.

Desweiteren konnten bei der seriellen Passagierung von PERV/293 ebenfalls eine Verlängerungen der LTRs beobachtet werden. Durch die Klonierung und Sequenzierung dieser LTRs konnten repetitive Elemente von 18 bp und 21 bp identifiziert werden, welche sich im Verlauf der Passagierung verfielfältigt hatten. Faßt man jeweils ein 18 bp und ein 21 bp Repeat zu einer Sequenzfolge von 39 bp zusammen, so weist diese Sequenz hohe Homologie zu dem 37 bp Repeat aus PERV-A/C auf ([Abbildung 3.17](#) und [4.2](#)). Allerdings kommt das 39 bp Repeat jeweils anderdhalb-fach vor, d.h. auf jedes 39 bp Repeat (18 bp + 21 bp) folgt immer ein weiteres 18 bp Repeat.

		60
PERV-A	TGAAAGGATGAAAATGCAACCTAACCCCTCCAGAACCCAGGAAGTTAATAAAAAAGCTCTA	
PERV-B	TGAAAGGATGAAAATGCAACCTAACCCCTCCAGAACCCAGGAAGTTAATAAAAAAGCTCTA	
PERV/3°	TGAA-GGATGAAAATGCAACCTAACCCCTCCAGAACCCAGGAAGTTAATAAGAAGCTCTA	
PERV/5°	TGAAAGGATGAAAATGCAACCTAACCCCTCCAGAACCCAGGAAGTTAATAAGAAGCTCTA	
PERV-MSL	TGAAAGGATGAAAATACAACCT-----AAGCTAATGAGAAGCTTAA	
		120
PERV-A	AATGCCCCCGAATTCCAGACCCCTGCTGGCTGCCAGTAAATAGGTAGAAGGTCACTTTCC	
PERV-B	AATGCCCCCGAATTCCAGACCCCTGCTGGCTGCCAGTAAATAGGTAGAAGGTCACTTTCC	
PERV/3°	AATGCCCCCGAATTCCAGACCCCTGTTCCCT-----ATAGGTAAAAGATCATACTTTT	
PERV/5°	AATGCCCCCGAATTCCAGACCCCTGTTCCCT-----ATAGGTAAAAGATCATACTTTT	
PERV-MSL	AATTGTTCTGAATTCCAGAGTTTGTTCCT-----ATAGGTAAAAGATTAGGTTTTT	
		180
PERV-A	TATTGTTCCA-----GGG	
PERV-B	TATTGTTCCA-----GGG	
PERV/3°	TGCTGTTTTAGGGCTTGCTTTCTGCTCTGTACAAAACCTTTGTGGAAGGGGAAAAACAGGC	
PERV/5°	TGCTGTTTTAGGGCTTGCTTTCTGCTCTGTACAAAACCTTTGTGGAAGGGGAAAAACAGGC	
PERV-MSL	TGCTGTTTTA-----AAA--TATGCGGAAGT---AAAATAGGC	
		240
PERV-A	CC-TGC-TATCCTGGCCTAAGTAAG-----	
PERV-B	CC-TGC-TATCCTGGCCTAAGTAAG-----	
PERV/3°	CCCTGAGTATGTGCCTCTATGCTTGAAACTTCTTGAAACTGCTCCTAACCTGCTTTGG	
PERV/5°	CCCTGAGTATGTGCCTCTATGCTTGAAACTTCTTGAAACTGCTCCTAACCTGCTTTGG	
PERV-MSL	CC-TGAGTACATGTCTCTAGGCATGAAACTTCTTGAAACTA-----TTTGA	
		300
PERV-A	-----ATAACAGGAAATG---AGTTGACTAATCGCTTATCTGGATT	
PERV-B	-----ATAACAGGAAATG---AGTTGACTAATCGCTTATCTGGATT	
PERV/3°	CTTCTGTAAACCTGCTTGCATAAGATAAAAAGAGGAGGAG-TCAATTGCCTAACGGACCC	
PERV/5°	CTTCTGTAAACCTGCTTGCATAAGATAAAAAGAGGAGAAG-TCAATTGCCTAACGGACCC	
PERV-MSL	G-----ATAACAAGAAAAG-GGAGTTT-CTAACTGCTTGTTTAGCTT	
		360
PERV-A	CTGTAAAACCTGACTGGCACCATAGAAGAATTGATTACACATTGACAGCCCTAGTGACCTA	
PERV-B	CTGTAAAACCTGACTGGCACCATAGAAGAATTGATTACACATTGACAGCCCTAGTGACCTA	
PERV/3°	CAGTAAGATCGGGTG-TACCACAAA-----ATGTTGAAA---C-----ACATA	
PERV/5°	CAGTAAGATCGGGTG-TACCACAAA-----ATGTTGAAA---C-----ACATA	
PERV-MSL	CTGTAAAACCTGGTTG-CGCCATAAAGATGTTG---AAATGTTGATA---C-----ACATA	
		420
PERV-A	TCTCAACTGCAATCTGTCACTCT-GCCAGGAGCCACGCTAGATCGGACCTCCGGAGC	
PERV-B	TCTCAACTGCAATCTGTCACTCT-GCCAGGAGCCACGCTAGATCGGACCTCCGGAGC	
PERV/3°	TCTTGGTGACAACATGTCTCCCCACCCCGAAAACATGCGC-AAATGTGTAACCTAAAAC	
PERV/5°	TCTTGGTGACAACATGTCTCCCCACCCCGAAAACATGCGC-AAATGTGTAACCTAAAAC	
PERV-MSL	TCTTGGTGACAACATGTCTCCCCACCCCGAAAACATGCGC-AAATGTGTAACCTAAAAC	
		480
PERV-A	TATTTTAAAATGATTGGTCCACGGAGCGCGGGCTCTCGA-----	
PERV-B	TATTTTAAAATGATTGGTCCACGGAGCGCGGG-CTCTCGA-----	
PERV/3°	AATTT-AAATTAATTGGTCCACGAAGCGCGGG-CTCTCGAAGTTTTAAATTGACTGGTTT	
PERV/5°	AATTT-AAATTAATTGGTCCACGAAGCGCGGG-CTTTG-----	
PERV-MSL	AATTT-AAATTAATTGGTCCACGAAGCGCGGG-CTCTCGAAGTTTTAAATTGACTGGTTT	
		540
PERV-A	----TATTTTAAAATGATTGGTCCACGGAGCGCGGGCTCTCGATATTTTAAAATGATTG	
PERV-B	----TATTTTAAAATGATTGGTCCACGGAGCGCGGG-CTCTCGATATTTTAAAATGATTG	
PERV/3°	GTAAATATTTTAAAATGATTGGTTGTAAAGCGCGGGCTTTG-----	
PERV/5°	----TATTTTAAAATGATTGGTTGTAAAGCGCGGGCTTTG-----TATTTTAAAATGATTG	
PERV-MSL	GTAAATATTTTAAAATGATTGGTTGTAAAGCGCGGGCTTTG-----	

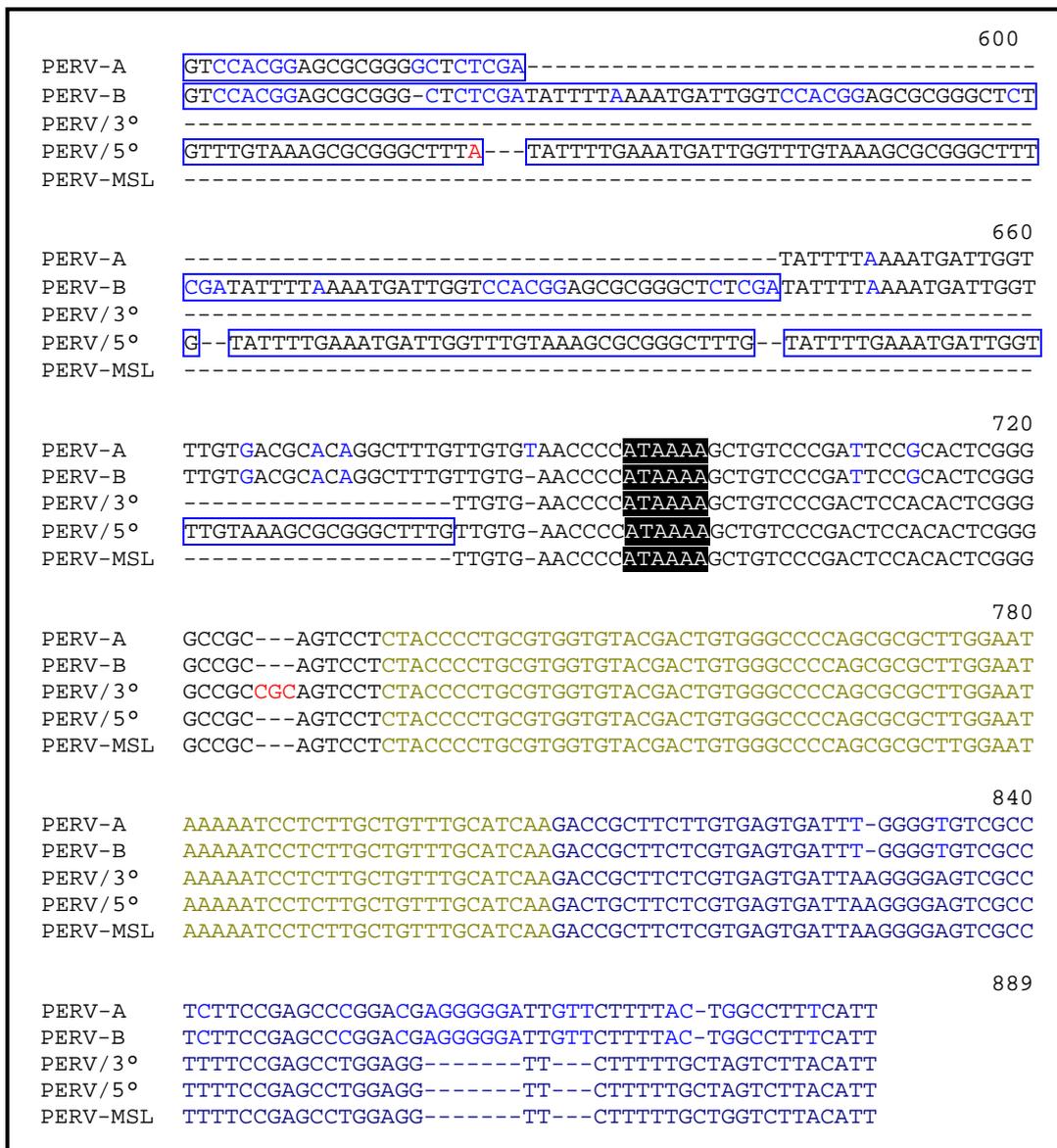


Abbildung 3.17: Sequenzvergleich der LTR-Regionen von PERV-A, PERV-B, PERV/3°, PERV/5° und PERV-MSL (PERV-C). Die LTR-Bereiche sind unterteilt in die U3-Region (schwarze Schrift), die R-Region (grüne Schrift) und die U5-Region (blaue Schrift). Repetitive Sequenzen sind entsprechend der Farben in [Abbildung 3.15](#) umrahmt. Die vermutete TATA-Box ist **schwarz** unterlegt. Deletionen sind durch – gekennzeichnet. Die Sequenzvergleiche wurden gegenüber der Sequenz von PERV-MSL (AF038600-EMBL) mit der Software DNAsar MegAlign durchgeführt. Nukleotide, welche sich gegenüber dieser Sequenz unterscheiden sind **rot** gekennzeichnet. Nukleotide, welche nur in den Sequenzen von PERV-A und PERV-B vorkommen sind hinzukommend **blau** gekennzeichnet.

Diese Homologievergleiche zeigten weiter, daß die Passagen PERV/3° und PERV/5°, abgesehen von der Anzahl der vorkommenden Repeats, untereinander eine fast identische Nukleotidsequenz in dem untersuchten LTR-Bereich aufwiesen. Selbst unter Einbeziehung der repetitiven Sequenzen zeigten beide Proviren noch eine Homologie von 88,3% ([Abbildung 3.18 A](#)). Weiterhin wurde deutlich, daß diese beiden PERV-A/C Rekombinanten in ihren LTRs eine wesentlich höhere Homologie zu der LTR-Sequenz von PERV-MSL (84,8% bzw. 73,8%) als zu den LTRs von PERV-A (63,5% bzw.

60,8%) oder PERV-B (56,0% bzw. 66,1%) aufwiesen (Abbildung 3.18 A). Diese Daten ließen sich weiterhin durch die Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums stützen, welcher deutlich zeigte, daß PERV/3° und PERV/5° im Bereich der LTR-Region eine höhere Verwandtschaft mit PERV-MSL, und damit zu PERV-C besitzen. Dagegen bilden PERV-A und PERV-B einen eigenen Ast des Stammbaums, und sind demzufolge gegenüber PERV-C wesentlich divergenter als PERV-A/C (Abbildung 3.18 B).

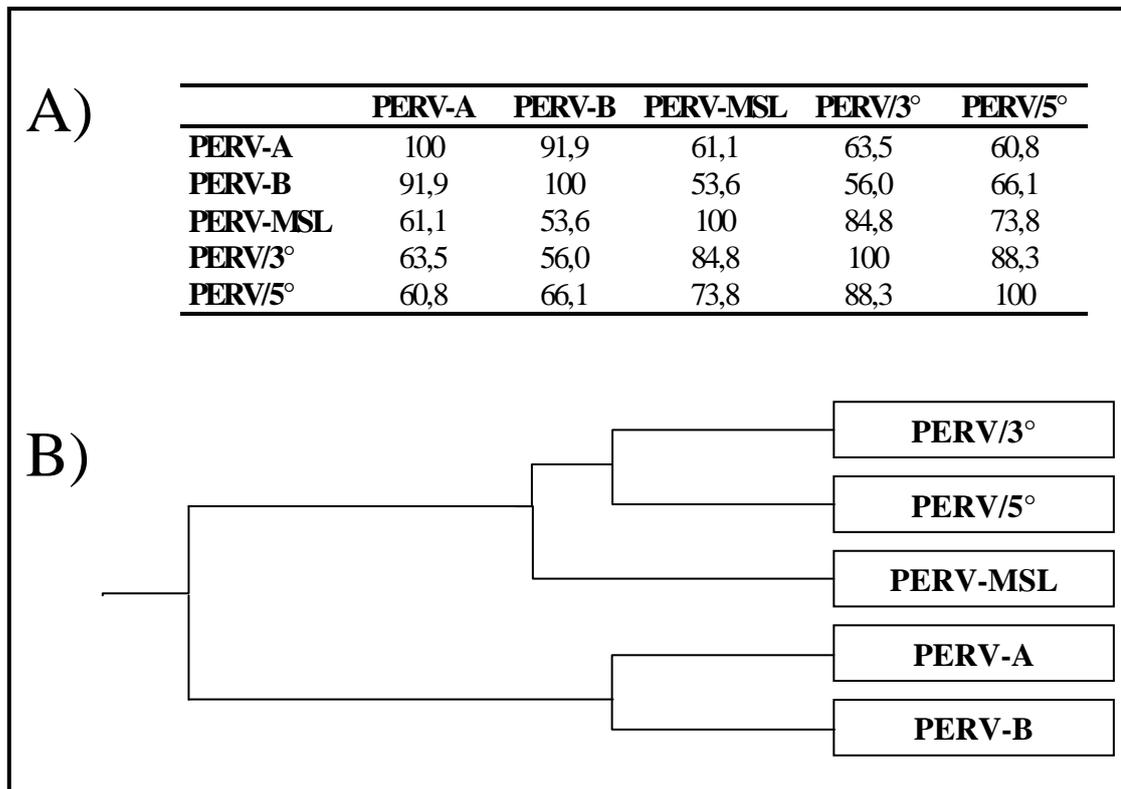


Abbildung 3.18: Phylogenetische Analyse von PERV-A, PERV-B, PERV-C und PERV-A/C. Prozentuale Identität der Nukleotid-Sequenz in der LTR-Region von PERV-A, PERV-B, PERV-MSL (PERV-C), PERV/3° und PERV/5° (A). Die zum Teil große Divergenz der Sequenzen untereinander, beruht unter anderem auf dem Vorkommen verschieden vieler repetitiver Sequenzblöcke in den jeweiligen LTRs. Trotzdem bleibt klar erkenntlich, daß PERV/3° und PERV/5° phylogenetisch näher mit PERV-MSL verwandt sind, als mit PERV-A oder PERV-B (B).

Da die beobachteten Titeranstiege im Verlauf der Passagierung von PERV-A/C auf humanen Zellen auch durch eventuelle Veränderungen im Bereich der Oberflächen-Proteine des Virus bedingt sein konnten, wurde der provirale Sequenzbereich des gp70 (SU) von PERV/5° und PERV/3° mittels PCR amplifiziert und kloniert. Ein Homologievergleich der Aminosäuresequenzen zeigte, daß beide Passagen untereinander eine fast identische Sequenz aufwiesen (Abbildung 3.19). Die Passagierung auf humanen Zellen hatte also keine genetische Modifikation im Bereich von SU zur Folge, so daß die gesteigerte Replikation von PERV-A/C auf die Veränderungen in der LTR zurückgeführt werden konnten. Weiterhin wurde nochmals deutlich, daß PERV-A/C in der SU Region eine 100%ige Homologie mit der Aminosäuresequenz von PERV-A aufwies,

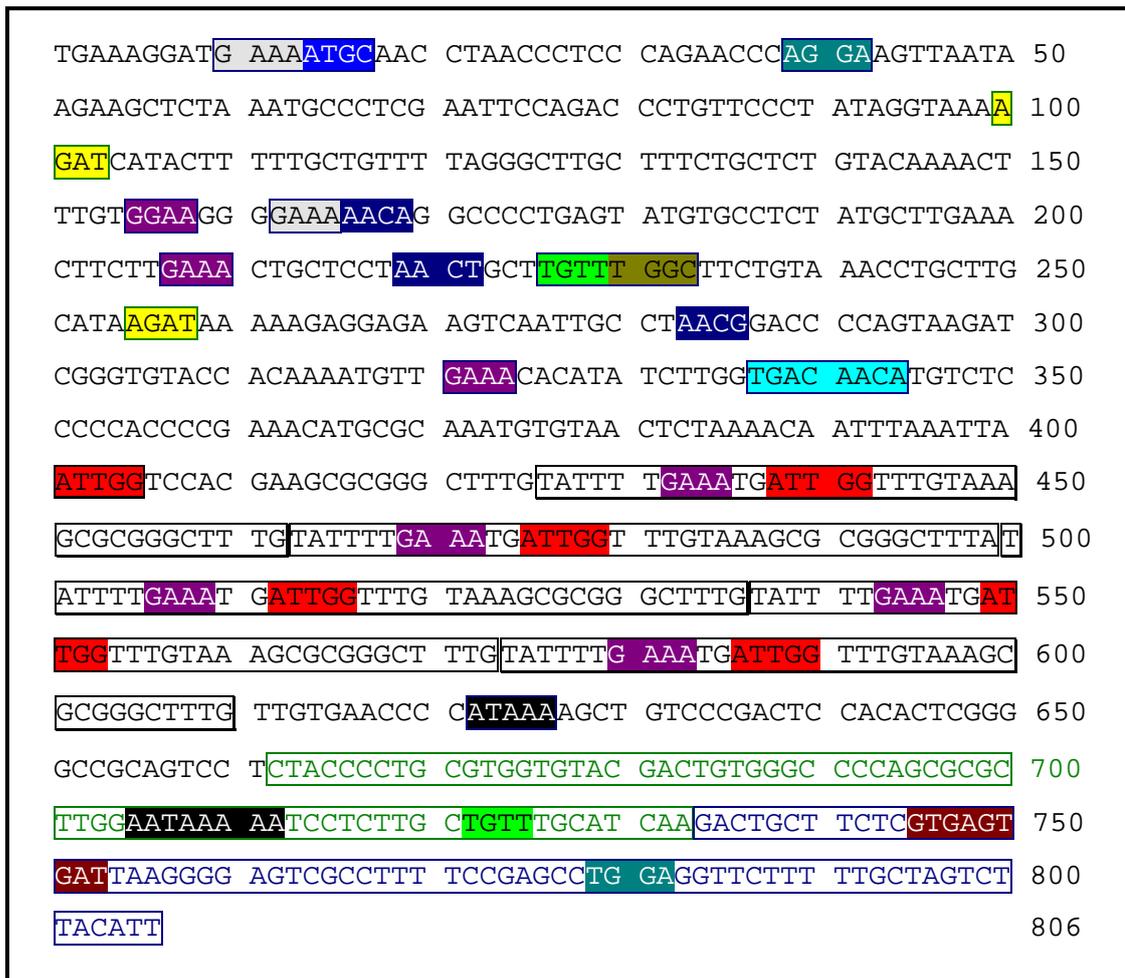
und demzufolge der beobachtete identische Wirtstropismus auch auf molekularer Ebene bestätigt werden konnte (Abbildung 3.19). Dagegen unterschied sich die SU Region von PERV-C deutlich in ihrer Sequenz von den SU-Regionen von PERV-/3°, PERV/5° und PERV-A.

	60
PERV/5°	MHPTLSRRHLP I RGGKPKRLKIPLSFASIAWFLTLSITPQVNGKRLVDS P NSHKPLSLTW
PERV/3°	MHPTLSRRHLP I RGGKPKRLKIPLSFASIAWFLTLSITPQVNGKRLVDS P NSHKPLSLTW
PERV-A	MHPTLSRRHLP I RGGKPKRLKIPLSFASIAWFLTLSITPQVNGKRLVDS P NSHKPLSLTW
PERV-C	MHPTLNRRLHLP I RGGKPKRLKIPLSFASIAWFLTLSITPQVNGKRLVDS P NSHKPLSLTW
	120
PERV/5°	LLTDSGTGININSTQGEAPLGTWWPELYVCLRSVIPGLNDQATPPDVL RAYGFYVCPGPP
PERV/3°	LLTDSGTGININSTQGEAPLGTWWPELYVCLRSVIPGLNDQATPPDVL RAYGFYVCPGPP
PERV-A	LLTDSGTGININSTQGEAPLGTWWPELYVCLRSVIPGLNDQATPPDVL RAYGFYVCPGPP
PERV-C	LITDSGTGININNTQGEAPLGTWWPELYVCLRSVIPGLNDQATPPDVL RAYGFYVCPGPP
	180
PERV/5°	NNEEYCGNPQDFFCQWSCVTSNDGNWKWPVSQQDRVSYSFVNNPTS YNQFN YGHGRWKD
PERV/3°	NNEEYCGNPQDFFCQWSCVTSNDGNWKWPVSQQDRVSYSFVNNPTS YNQFN YGHGRWKD
PERV-A	NNEEYCGNPQDFFCQWSCVTSNDGNWKWPVSQQDRVSYSFVNNPTS YNQFN YGHGRWKD
PERV-C	NNGKHCGNPRDFFCQWNCVTSNDGYWKWPTSQQDRVSFSYVNTYTSSGQFN Y-----
	240
PERV/5°	WQQRVQKDVRNKQISCHSLDLDY LKISFTEKGKQENIQKWVNGMSWGI VYYGGSGRKKGS
PERV/3°	WQQRVQKDVRNKQISCHSLDLDY LKISFTEKGKQENIQKWVNGMSWGI VYYRGGSGRKKGS
PERV-A	WQQRVQKDVRNKQISCHSLDLDY LKISFTEKGKQENIQKWVNGISWGI VYYGGSGRKKGS
PERV-C	-----LTWIRTGSPKCSPSDL DYLKISFTEKGKQENILKWVNGMSWGMVYYGGSGKQPGS
	300
PERV/5°	VLTI RLRIETQMEPPVAIGPNKGLAEQGPPIQEQRSPNPSDYNTTSGSVPT EPNITIKT
PERV/3°	VLTI RLRIETQMEPPVAIGPNKGLAEQGPPIQEQRSPNPSDYNTTSGSVPT EPNITIKT
PERV-A	VLTI RLRIETQMEPPVAIGPNKGLAEQGPPIQEQRSPNPSDYNTTSGSVPT EPNITIKT
PERV-C	ILTI RLKIN-QLEPPMAIGPNTVLTGQRPTQ----GPGPS-SNITSGSDPTESSSTTKM
	360
PERV/5°	GAKLFNLIQGA FQALNSTTPEATSSCW LCLASGPPYYEGMARGGKFNVTKEHRDQCTWGS
PERV/3°	GAKLFNLIQGA FQALNSTTPEATSSCW LCLASGPPYYEGMARGGKFNVTKEHRDQCTWGS
PERV-A	GAKLFSLIQGA FQALNSTTPEATSSCW LCLASGPPYYEGMARGGKFNVTKEHRDQCTWGS
PERV-C	GAKLFSLIQGA FQALNSTTPEATSSCW LCLASGPPYYEGMARGGKFNVTKEHRDQCTWGS
	420
PERV/5°	QNKLTLEVSGKGT CIGMVPPSHQHL CNHTEAFNRTSESQYLVPGYDRWWACNTELT PCV
PERV/3°	QNKLTLEVSGKGT CIGMVPPSHQHL CNHTEAFNRTSESQYLVPGYDRWWACNTELT PCV
PERV-A	QNKLTLEVSGKGT CIGMVPPSHQHL CNHTEAFNRTSESQYLVPGYDRWWACNTELT PCV
PERV-C	QNKLTLEVSGKGT CIGKVPVPSHQHL CNHTEAFNQTS ESQYLVPGYDRWWACNTELT PCV
	462
PERV/5°	STLVFNQTKDFCVMVQIVPRVYYYPEKAVLDEYDYRYNRPKR
PERV/3°	STLVFNQTKDFCVMVQIVPRVYYYPEKAVLDEYDYRYNRPKR
PERV-A	STLVFNQTKDFCVMVQIVPRVYYYPEKAVLDEYDYRYNRPKR
PERV-C	STLVFNQTKDFCIMVQIVPRVYYYPEKAILDEYDYRNHRPKR

Abbildung 3.19: Vergleich der Aminosäuresequenz von PERV/5° und PERV/3° in der SU-Region (AA 1-462) von Env. Zum Vergleich wurden Sequenzen der gleichen Region von PERV-A und PERV-C herangezogen. Die Sequenzanalyse zeigte deutlich, daß, PERV/3° und PERV/5° über den gesamten SU-Bereich eine fast identische Aminosäuresequenz zu PERV-A aufwiesen. Weiterhin wurde deutlich, daß außer einem R-G Austausch (Position 232), im Verlauf der Passagierung von PERV/3° bis zu PERV/5° keine weiteren Veränderungen im Bereich der SU-Region aufgetreten waren.

Da die Regulation der Replikation von PERV auf die Struktur der LTR-Region zurückzuführen war, wurde dieser Sequenzbereich intensiv auf potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen (TFB) untersucht. Mittels der Analyse-Software MatInspector (Genomatix, München) konnten über den gesamten Sequenzbereich eine Vielzahl von TFBs identifiziert werden ([Abbildung 3.20](#)), wobei im Folgenden nur kurz auf diese eingegangen werden soll: Im Bereich der U3-Region konnten zwei Bindungsstellen für den nuklearen Faktor AT (**NF-AT**) identifiziert werden, welcher als Transkriptionsfaktor (TF) für die Regulation der Zytokinexpression in aktivierten T-Zellen fungiert (Masuda et al., 1995). Des Weiteren wurde eine Bindungsstelle für den ubiquitär vorkommenden TF **Oct-1** (auch NF-III, OTF-1 oder OBP-100) gefunden, welcher besonders stark in embryonalen Zellen gebildet wird (In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, daß es sich bei 293 Zellen um eine embryonale Nierenzell-Linie handelt). Dieser zelluläre TF dient als eine Art essentieller „Ko-Faktor“ bei der Transkription vieler Viren und komplexiert dabei mit den jeweiligen viralen Transaktivatoren (z. B. mit VP16 beim humanen Herpes-Simplex Virus (HSV, Spector et al., 1991), mit Tax-1 beim humanen T-Zell-Leukemie-Virus (HTLV, Shibuya und Taniguchi, 1989), mit HNF-1 beim Hepatitis-B Virus (HBV, Zhou und Yen, 1991)). Für den TF **Ets-1** wurde jeweils eine Bindungsstelle in der U3- und der U5-Region der LTR identifiziert. Ets-1 ist ein zellulärer TF, welcher meist in Kombination mit AP-1 (siehe unten) fungiert und essentiell für die Replikation der aviären Erythroblastose Viren (AEV) und der Adenoviren ist (Knippers, 1995). Außerdem induziert Ets-1 eine intensive Steigerung der Replikation des Molony Murinen Sarkom Virus (MSV) durch Bindung an dessen LTR-Region (Gunther et al., 1990). Weiterhin befinden sich zwei Bindungsstellen für den Erythrozyten-spezifischen TF **GATA-1** und drei Bindungsstellen für den viralen TF **v-Myb** in der U3-Region. Letztere kann aber auch von dem humanen TF c-Myb gebunden werden, welcher z. B. durch Interaktion mit VP16 eine starke Erhöhung der Transkription von HSV-Genen induziert (Ibanez und Lipsick, 1990). Weiterhin bindet Myb als Transaktivator in der LTR des Humanen Immundefizienz Virus (HIV). Für den TF **HNF-3** (auch HNF-3 = Hepatocyte Nuclear Factor-3) konnte eine Bindungsstelle in der U3-Region und eine in der R-Region gefunden werden. Dieser TF wird besonders in embryonalen, aber auch in adulten Nierenzellen expremiert und dient als Aktivator für die Transkription weiterer Transkriptionsfaktoren (Overdier et al., 1997). Weiterhin wurde eine Bindungsstelle für den nuklearen Faktor 1 (**NF-1**, auch CTF = CCAAT-Box-bindender TF) identifiziert, für welchen ebenfalls die Bindung in der LTR-Region von Adenoviren (Gronostajski et al., 1984), des humanen Polyomavirus JC (JCV, Amemiya et al., 1989), von HCV (Ghazal et al., 1987) und HBV (Ben-Levy et al., 1989) gezeigt werden konnte. Offensichtlich führt die Bindung von NF-1 dabei zu einer Stabilisierung des Transkriptionskomplexes und verhindert damit den Abbruch der mRNA-Synthese. In der U3-, sowie der U5-Region wurden je eine Bindungsstelle für das Aktivator Protein

1 (**AP-1**, auch PEA-1) identifiziert, welches in großen Mengen in embryonalen Zellen vorkommt und insbesondere für die Induktion der zellulären Proliferation eine große Rolle spielt.



U3-Region 1-661 (schwarz); R-Region 662-733 (grün); U5-Region 734-806 (blau)

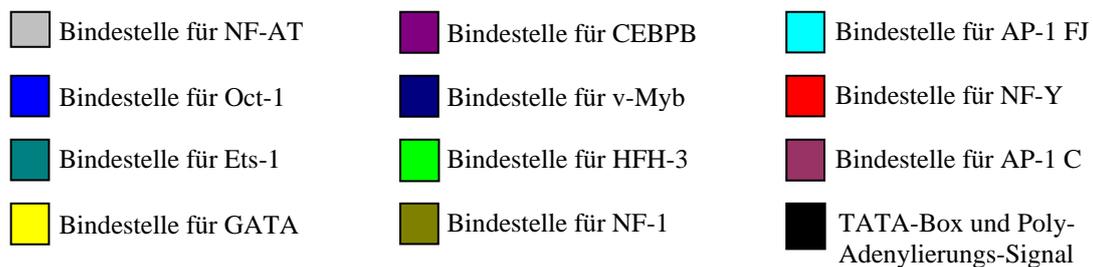


Abbildung 3.20: Analyse der LTR von PERV/5° auf potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen. Die jeweiligen *cis*-Elemente wurden mittels der TRANSFAC-Datenbank ermittelt. Erläuterungen siehe Text.

Darüber hinaus wurden Bindungsstellen für AP-1 in den regulativen Sequenzen des Polyomavirus Py (Kryszke et al., 1987) und des simianen Virus 40 (SV 40, Piette und Yaniv, 1987) gefunden. Neben den bisher genannten TFBs waren die potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren innerhalb der repetitiven Sequenzbereiche von

besonderem Interesse, da diese sich ebenfalls im Verlauf der Passagierung multimerisierten. Die möglicherweise daraus resultierte vermehrte Bindung von Transkriptionsfaktoren in dieser Region könnte damit für die gesteigerte PERV-Replikation verantwortlich gewesen sein.

Für den TF **CEBPB** (auch NFIL-6) wurden im Bereich der U3-Region 3 TFBs, sowie innerhalb jeden Repeats je eine TFB identifiziert. Damit existieren 8 TFBs für den TF CEBPB in der gesamten LTR von PERV/5°. CEBPB ist ein ubiquitär vorkommender Transaktivator vieler Interleukin-Gene, dessen Bildung im Rahmen der inflammatorischen Antwort oder bei viralen Infektionen stark erhöht wird. Dabei bindet CEBPB vorwiegend an die Promotoren der Gene, welche für die Interleukine (IL) IL-6 und IL-8 kodieren (Matsusaka et al., 1993). Das von T-Helferzellen gebildete IL-6 dient unter anderem der Stimulation von B-Zellen zur Proliferation und regt diese zur Differenzierung zu Antikörper-bildenden Plasmazellen an. Das Chemokin IL-8 wird von Monozyten und Makrophagen, aber auch von Fibroblasten und Keratinozyten sezerniert, und dient zur Aktivierung naiver T-Zellen und Neutrophilen. Weiterhin leitet es die Leukozyten über einen Konzentrationsgradienten zum Ort der Infektion (Janeway und Travers, 1997).

Des Weiteren ließ sich in der U3-Region unmittelbar vor Beginn der Repeats, sowie in jedem der vorkommenden repetitiven Sequenzmotive je eine Bindungsstelle für den ubiquitär vorkommenden nuklearen Faktor Y (**NF-Y**, auch CBF) identifizieren. Insgesamt kam damit diese Bindungsstelle sechs mal in dem LTR-Bereich des untersuchten PERV/5° vor. Die wichtigste Rolle spielt NF-Y bei der Aktivierung von Genen der Haupthistokompatibilitätskomplexe II (MHC II; Mach et al., 1996), deren Transkription er in Kooperation mit anderen TF reguliert. Weiterhin wird NF-Y auch bei zellulärem Streß, wie z. B. bei einer viralen Infektion, vermehrt von der Zelle gebildet, und dient der Aktivierung von CHOP (= CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP)-homologes Protein), welches durch seine Bindung an die CCAAT-Boxen verschiedener Gene vermutlich für einen Arrest des Zell-Zyklus und eventuell für die Induktion der Apoptose sorgt (Ubeda und Habener, 2000). Neben der Aktivierung der Gene für IL-6, IL-8 und des Chemokin-Rezeptors CCR5 binden CHOP und C/EBP an die *cis*-ständigen C/EBP-Bindungsstellen im Promotor-Bereich vieler weiterer Gene. Bemerkenswert ist, daß die gleiche Bindungsstelle ebenfalls von dem Transaktivator CEBPB (siehe oben) erkannt und gebunden wird. Die Bindung dieser TFs an die entsprechenden C/EBP-Bindungsstellen in viralen LTRs ist essentiell für die Replikation vieler Retroviren, wie z. B. HIV (Henderson et al., 1995; 1996), dem feline Immundefizienz-Virus (FIV, Kawaguchi et al., 1995), dem Rous Sarkom Virus (Sears und Sealy, 1994) oder dem murinen Leukemie Virus (MuLV, Hummell et al., 1993). Ein solches Motiv konnte allerdings in der LTR von PERV/5° nicht identifiziert werden.

3.2 Das Wirtsspektrum von PERV *in vivo*

In der Literatur veröffentlichte Daten, sowie die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, daß die Zellen einer Vielzahl von Spezies mit PERV *in vitro* infizierbar sind. Allerdings blieb bislang ungeklärt, ob die Suszeptibilität von Zellen *in vitro* auch mit einer Suszeptibilität der jeweiligen Spezies *in vivo* korrelieren würde. Für die Evaluierung der Virussicherheit bei der Xenotransplantation standen zur Zeit dieser Arbeit wenige Daten aus humanen Xenotransplantationen zur Verfügung, so daß es daher unerläßlich war, eine potentielle Transmission von PERV in Tiermodellen zu untersuchen. Auch wenn die Übertragung von Ergebnissen aus Tiermodellen in ihrer Aussagekraft auf ein humanes System limitiert ist, stellt diese Art der Untersuchung die einzige Möglichkeit dar, alle nur *in vivo* auftretenden Faktoren mit in die Evaluierung einzubeziehen.

3.2.1 Inokulation von Kleintieren

Der Aufbau von Kleintiermodellen ist aus Tier-ethischen und –rechtlichen, sowie auch aus praktischen Gründen der beste Weg, entsprechend aussagekräftige *in vivo*-Daten zu erhalten. Da *in vitro*-Studien dieser und anderer Arbeitsgruppen zeigten, daß Zellen von Ratten (Takeuchi et al., 1997; Denner et al., 2002a), von Meerschweinchen (Onions et al., persönliche Mitteilung) und von Nerzen (diese Arbeit; Specke et al., 2001c) suszeptibel für Infektionen mit PERVs sind, wurden diese Ergebnisse als Grundlage für den Aufbau verschiedener Kleintiermodelle genutzt.

Da allerdings bis zu diesem Zeitpunkt noch keinerlei Daten über die Inokulation von Tieren mit PERVs existierten, wurde insbesondere bei dem Aufbau der Kleintiermodelle verschiedene Ansätze im Hinblick auf den applizierten Virustyp (PERV-A, PERV-B, PERV-A/C, PERV/Mv1Lu), die Applikationsform der Viren (zellfrei, zellassoziiert), die Applikationsart der Viren (i.p., i.m., i.v.), sowie die Spezies (Ratte, Meerschweinchen, Nerz) und den Immunzustand der Tiere (naiv oder immunsupprimiert) unternommen (Tabellen 3.5 und 3.6). Für die Inokulation der Ratten und Meerschweinchen wurden PERVs verwendet, welche einerseits von der porcinen Zell-Linie PK-15, andererseits von der humanen Zell-Linie 293 produziert wurden. Zur Simulation der Situation einer klinischen Xenotransplantation wurden neben naiven adulten Ratten und Meerschweinchen auch Ratten inokuliert, welche durch Applikation von Cs-A oder/und CVF immunsupprimiert waren. Auch wurden neugeborene Ratten, die durch ein noch nicht vollständig ausgebildeten Immunsystem charakterisiert sind, inokuliert. Vier Wochen nach Inokulation und alle weiteren 4 Wochen, wurden die Tiere mittels Western Blot-Analyse auf Bildung von Antikörpern gegen PERV, sowie mittels PCR auf Integration proviraler DNA in das Genom von Blutzellen untersucht. Zusätzlich wurde an diesen Zeitpunkten je ein Tier jeder Gruppe euthanasiert und diesem Tier durch Sektion Milz,

Nieren und Lymphknoten entnommen. Die DNA dieser Organe wurde ebenfalls mittels PCR auf provirale DNA von PERV untersucht. Zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung zeigten die Tiere Hinweise auf eine Infektion mit PERV.

Tabelle 3.5: Übersicht der Infektionsversuche mit Ratten und Meerschweinchen:

Den Tieren wurden drei Monate lang alle 4 Wochen nach der Inokulation des Virus Blut entnommen, welches mittels PCR (Blut) auf Infektion mit PERV untersucht wurde. Gleichzeitig wurde das Serum der Tiere mittels WB-Analyse auf Bildung von Antikörpern gegen PERV untersucht. Nach Euthanasie der Tiere wurden Milz, Nieren und Lymphknoten, mittels PCR (Organe) auf PERV-provirale DNA untersucht.

Spezies	Gruppe	IS		Appliziertes Virus	PERV-Detektion		
		Cs-A	CVF		WB	PCR (Blut)	PCR (Organe)
Ratte	1	-	-	PERV/PK-15 §*	-	-	-
	2	-	-	PERV/293 §*	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	+	-	PERV/PK-15 #*	-	-	-
	5	+	-	PERV/293 #*	-	-	-
	6	+	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-
	8§	-	-	PERV/PK-15 †	-	-	-
	9§	-	-	PERV-NIH/3° †	-	-	-
	10	+	+	PERV/PK-15 ‡	-	-	-
	11	+	+	PERV-NIH/3° ‡	-	-	-
	12	+	+	-	-	-	-
	13	-	-	-	-	-	-
Meerschweinchen	1	-	-	PERV/PK-15 §*	-	-	-
	2	-	-	PERV/293 §*	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-

§ Die Applikation des zellfreien Virus erfolgte i.m. und i.p.; # Die Applikation des zellfreien Virus erfolgte i.v. und i.m.; † Die Applikation des zellfreien Virus erfolgte nur i.p.; ‡ Die Applikation des zellfreien Virus erfolgte nur i.v.; Die mit * gekennzeichneten Gruppen erhielten 4 Wochen nach der zellfreien Inokulation eine weitere i.p. Applikation von 5×10^7 PERV-produzierende PK-15 oder 293 Zellen. Die mit § gekennzeichneten Gruppen waren Jungtiere, welche am Tag ihrer Geburt mit PERV inokuliert wurden. IS: Immunsuppression; Cs-A: Cyclosporin-A; CVF: Cobra Venom Factor; WB: Western Blot-Analyse

Allerdings würde es sich bei einer klinischen Xenotransplantation um die Transplantation porciner Zellen, Gewebe oder Organe handeln, wobei in erster Linie Viren zellassoziiert übertragen würden. Um auch eine potentielle Transmission von PERVs via Zell-Zell-Kontakt zu simulieren, wurden Ratten der Gruppen 1, 2, 4 und 5, sowie Meerschweinchen der Gruppen 1 und 2 zusätzlich mit PERV-produzierenden PK-15 bzw. 293 Zellen inokuliert. Keines der inokulierten Tiere zeigte in regelmäßigen Analysen während eines Zeitraums von 12 Wochen eine Antikörperreaktion gegen PERV oder eine Integration proviraler DNA in Blutzellen oder in Zellen verschiedener Organe (Tabelle 3.5 und Abbildung 3.21).

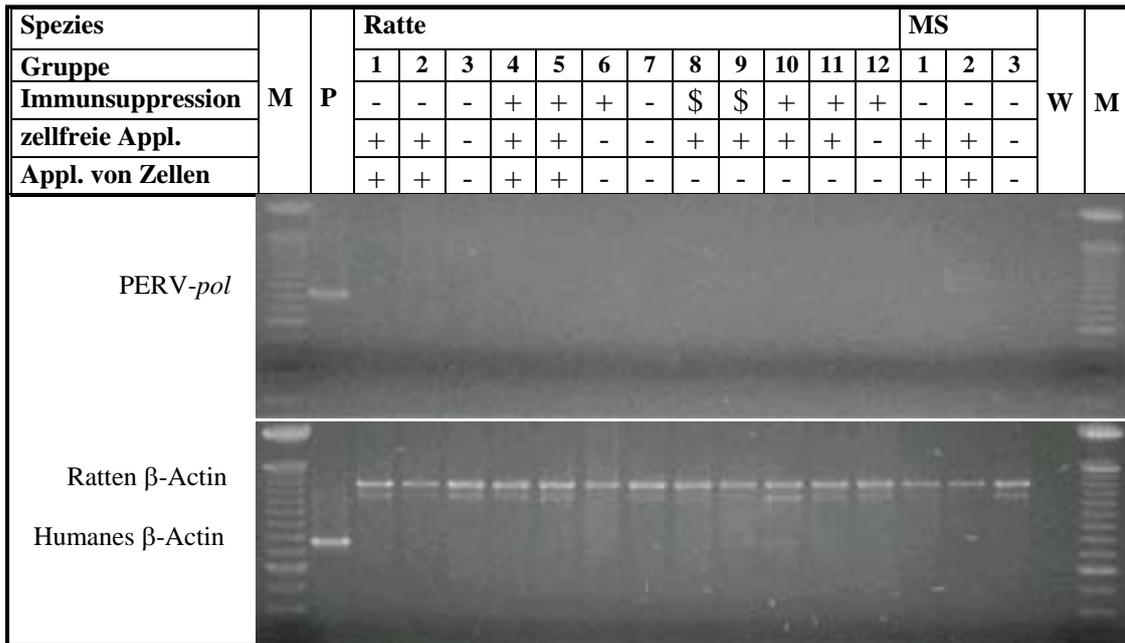


Abbildung 3.21: Nested-PCR mit DNA aus Blut von PERV-inokulierten Ratten und Meerschweinchen. Die Gruppennummern entsprechen den Angaben in [Tabelle 3.5](#), aus welcher weitere Informationen zu den jeweiligen Gruppen zu entnehmen sind. Die Isolation der DNA erfolgte 12 Wochen nach der ersten zellfreien Inokulation mit PERV, bzw. bei einigen Tieren 4 Wochen nach der zusätzlichen Inokulation mit PERV-produzierenden Zellen. Die mit \$ gekennzeichneten Gruppen enthielten Jungtiere, welche am Tag ihrer Geburt inokuliert wurden. Für weitere Informationen siehe Text. MS: Meerschweinchen; M: 100 bp Marker; P: 293/5° DNA als positiv Kontrolle der PCR; W: Wasserkontrolle der PCR;

Für die Inokulation der Nerze wurde PERV/Mv1Lu verwendet, welches von der produktiv infizierten Nerzzell-Linie Mv1Lu produziert wurde (siehe [3.1.1.1](#)). Da Retroviren bei ihrer Knospung Membranproteine der Wirtszelle in ihre Hüllmembran inkorporieren, bestand die Vermutung, daß die von der persistent mit PERV/293 infizierten Nerzzell-Linie Mv1Lu produzierten PERV/Mv1Lu-Partikel an die Spezies Nerz adaptiert seien. Unter diesen Voraussetzungen würde PERV/Mv1Lu vom Immunsystem der Nerz wesentlich weniger als „fremd“ erkannt werden als PERV-Partikel aus porcinen oder humanen Zellen.

Sequenzanalysen klonierter LTR-Regionen von PERV/Mv1Lu konnten zeigen, daß es im Verlauf der seriellen Passagierung des Virus (siehe [3.1.1.1](#)) zu einer Duplizierung von repetitiven Sequenzmotiven kam ([Abbildung 3.22](#)). Ähnliches konnte bei der Adaptation von PERV an humane Zellen beobachtet werden (siehe [3.1.4](#)), und stützte daher die Vermutung der Adaptation von PERV/Mv1Lu an Zellen der Spezies Nerz *in vitro*.

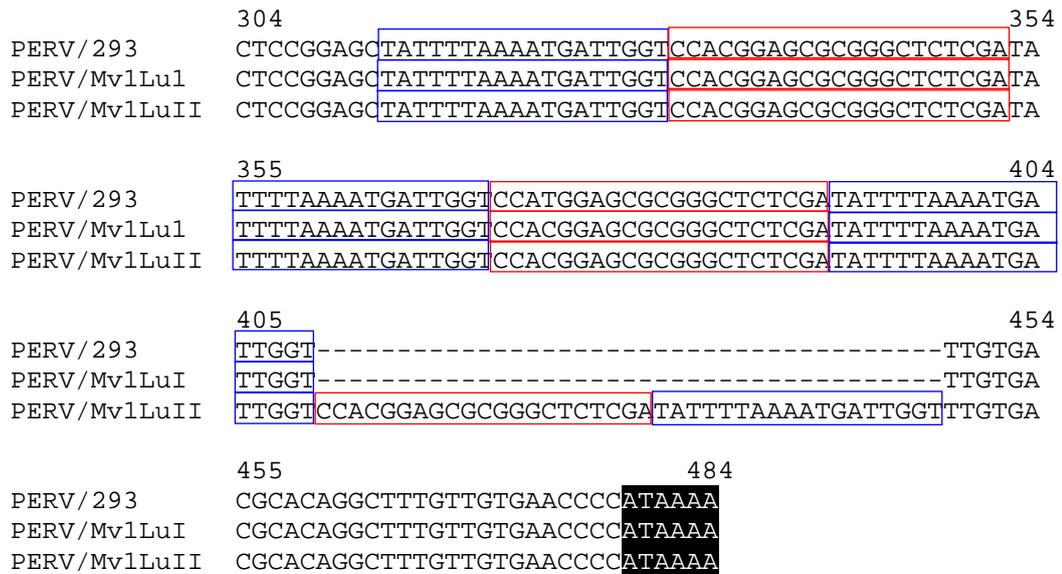


Abbildung 3.22: Sequenzvergleich der LTR-Regionen von PERV/293, PERV/Mv1Lu I und PERV/MvLu II. Der dargestellte Sequenzausschnitt umfaßt die Nucleotide 304 bis 484 der U3 Region der LTRs der angegebenen PERV-Klone. Die repetitiven Sequenzen in der LTR-Sequenz von PERV/293 (ein Gemische aus PERV-A und PERV-B) sind ein 18 bp langes (blau umrahmt) und ein 21 bp langes (rot umrahmt) Repeat. Die vermutete TATA-Box ist schwarz unterlegt. Der Sequenzvergleich wurde mit der Software DNASTar MegAlign durchgeführt.

Daher wurden naive adulte und neugeborene Nerze mit PERV/Mv1Lu *in vivo* inokuliert (Tabelle 3.6). Vier Wochen nach der Inokulation, und alle weiteren 4 Wochen, wurde den Tieren mittels Herzpunktion Blut entnommen, welches zur Gewinnung von Serum und DNA diente.

Tabelle 3.6: Übersicht der Infektionsversuche mit Nerzen: Den Tiere wurden drei Monate lang alle 4 Wochen nach der zellfreien i.p. Inokulation von PERV/Mv1Lu Blut entnommen, welches mittels nested-PCR (Blut) auf Infektion mit PERV untersucht wurde. Gleichzeitig wurde das Serum der Tiere mittels WB-Analyse auf Bildung von Antikörpern gegen PERV untersucht. Nach Euthanasie der Tiere wurden Milz, Nieren, Lymphknoten, Herz, Lunge, Leber, Hirn, Ovarien, und Pankreas mittels nested-PCR (Organe) auf PERV-provirale DNA untersucht. Bei den Organen der Nerze wurde hinzukommend eine Analyse mittels Immun-Histochemie durchgeführt. Bei keinem der Tiere konnten Hinweise einer Infektion festgestellt werden. Die mit \$ gekennzeichneten Gruppen waren Jungtiere, welche am Tag ihrer Geburt mit PERV inokuliert wurden. IS: Immunsuppression; Cs-A: Cyclosporin-A; CVF: Cobra Venom Factor; WB: Western Blot-Analyse; IHC: Immun-Histochemie; NG: Nicht getestet

Gruppe	Appliziertes Virus	PERV-Detektion			
		WB	PCR (Blut)	PCR (Organe)	IHC
1	PERV/Mv1Lu	-	-	-	-
2	PERV/Mv1Lu	-	-	-	-
3	PERV/Mv1Lu	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	NG
6\$	PERV/Mv1Lu	-	-	-	-
7\$	PERV/Mv1Lu	-	-	-	-

In Western Blot-Analysen zeigten die Tiere zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung eine Bildung von Antikörpern gegen das inokulierte Virus (Tabelle 3.6, Abbildung 3.23 A). Auch eine Integration von PERV-Proviren in das Genom der Blutzellen konnte zu den entsprechenden Zeiten mittels nested-PCR nicht nachgewiesen werden (Tabelle 3.6, Abbildung 3.23 B). 12 Wochen nach Inokulation wurden alle Tiere euthanasiert, und Milz, Niere, Lymphknoten, Herz, Lunge, Leber, Hirn, Ovarien, und Pankreas entnommen. In der DNA dieser Organe konnte ebenfalls keine provirale DNA von PERV mittels nested-PCR detektiert werden (Tabelle 3.6, Abbildung 3.23 C). Auch immunhistochemische Untersuchungen von Gewebeschnitten dieser Organe gaben keinen Hinweis auf eine Infektion der Tiere mit PERV (Tabelle 3.6).

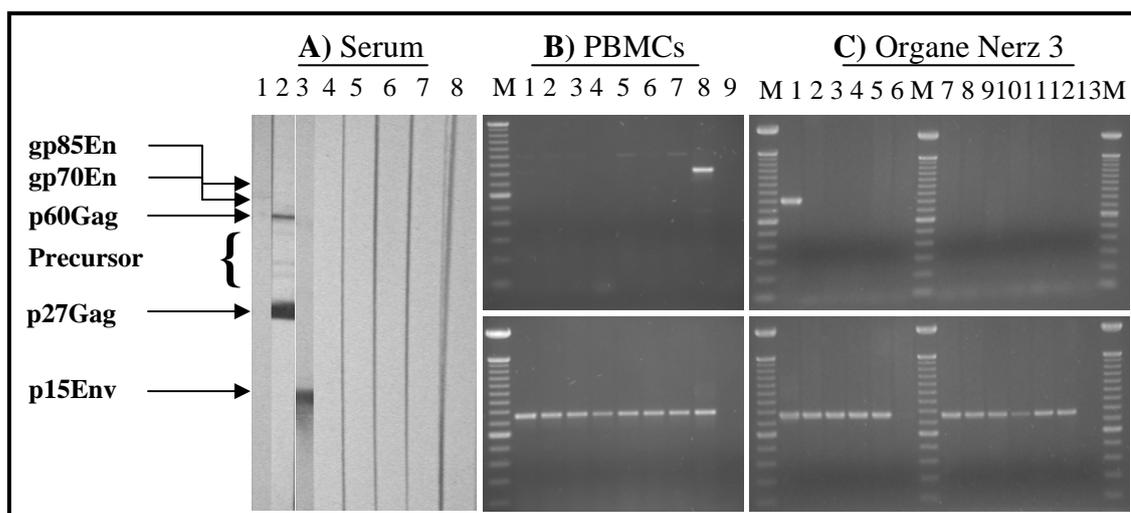


Abbildung 3.23: A) Western Blot mit Seren von 3 PERV/Mv1Lu-infizierten Nerzen(4-6) und 2 Kontrolltieren (7, 8). Die Seren wurden 12 Wochen nach der Inokulation mit PERV/Mv1Lu entnommen. Für die Kontrolle der Blot-Qualität wurden mehrere Kontrollseren verwendet: Anti-gp70 Env (1), kreuzreagierendes Anti-p30 Gag Serum von FeLV (2), Anti-p15Env (3).

B) Nested-PCR mit DNA aus PBMC von Nerzen: inokulierte adulte Nerze (1-3); inokulierte Jungtiere (4-6), naiver adulter Nerz (7). Zur Kontrolle der PCR wurde DNA aus 293/PERV Zellen (8) und Wasser (9) verwendet. M: 100 bp-Leiter.

C) Nested-PCR mit DNA aus verschiedenen Organen des Nerz Nr. 3: Ovar (2); Pankreas (3); Milz (4); Niere (5); Herz (7); Lunge (8); Leber (9); Hirn (10); Lymph-knoten (11); PBMCs (12). Zur Kontrolle der PCR wurde DNA aus 293/PERV Zellen (1) und Wasser (6, 13) verwendet. Die nested-PCR wurde mit spezifischen Primern für die *pol*-Region von PERV durchgeführt. Um die Qualität der DNA zu gewährleisten, wurde jeweils eine PCR mit β -Actin Primern durchgeführt. M: 100 bp-Leiter

Unter den gewählten Bedingungen führte die Inokulation von naiven und immun-supprimierten Kleintieren wie Ratten, Meerschweinchen und Nerze *in vivo* nicht zu einer Infektion der Tiere mit PERV. Keines der Tiere zeigte die Integration von PERV proviraler DNA. Auch konnte keine Antikörperbildung gegen das inokulierte Virus detektiert werden, was darauf hindeutet, daß die applizierte Virusdosis nicht ausreichte, um eine adäquate Immunreaktion in den Versuchstieren zu induzieren. Ob bei einer erhöhten Gabe von PERV eine Replikation des Virus und eine nachfolgende Immunreaktion auftreten würde, bleibt zu diskutieren.

3.2.2 Inokulation von nicht-humanen Primaten

Wie eingangs erwähnt, ermöglichen Tiermodelle nur eine limitierte Aussage über die Geschehnisse im humanen Organismus. Insbesondere das Kleintiermodell mangelt trotz seiner vielen praktischen Vorteile durch seine phylogenetische Ferne zum Menschen an Aussagekraft. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Tiermodell angestrebt, welches die Situation im humanen Xenotransplantat-Rezipienten besser widerspiegeln könnte. In vorausgehenden *in vitro* Studien konnte bereits gezeigt werden, daß Zellen nicht-humaner Primaten für eine Infektion mit PERV permissiv sind (siehe 3.1.2). Da Zellen von Pavianen, Rhesus-Affen und Schweins-Affen mit PERV infizierbar waren, wurden Tiere dieser drei Spezies *in vivo* mit PERV inokuliert. Im Vorfeld wurden nochmals PBMCs von jedem der im Experiment befindlichen Tiere auf deren Suszeptibilität gegenüber PERV getestet (siehe 3.1.2). Obwohl PBMCs der Schweins-Affen in diesem Versuch nicht für eine Infektion mit PERV suszeptibel waren, wurde diese Spezies aufgrund der Infizierbarkeit von primären Milz- und Nierenzellen (siehe 3.1.2) in die *in vivo* Studie aufgenommen. Das Experiment wurde als eine Langzeitstudie angelegt, in deren Verlauf die Tiere 1-3 mal mit hohen Dosen von PERV/5° inokuliert wurden. Alle Tiere erhielten über diesen gesamten Zeitraum eine tägliche Applikation von Cs-A, Prednisolon und RAD, um die Bedingungen einer klinischen Xenotransplantation zu simulieren. Für detaillierte Angaben zur Immunsuppression siehe 2.5.5.1 und 2.5.5.3. Die Applikation der Immunsuppressiva führte bei einigen Tieren zu Komplikationen, was für diese Tiere eine individuelle vorzeitige Beendigung der Immunsuppression (IS) bedingte. Für die Angleichung der Versuchsbedingungen mußte daher die Studie nachträglich in zwei Phasen unterteilt werden, welche durch einen Zeitraum von 60 Tagen unterbrochen wurden, in der keines der Tiere eine IS erhielt (siehe 2.5.5.3). Zu Beginn der Phase 1 wurde allen Tieren eine zellfreie Virusdosis von PERV/5° mit einem Titer von 1×10^9 TCID₅₀ i.p. und i.v. appliziert (1. Inokulation). Im Verlauf der Phase 1 wurde den Tieren regelmäßig nach der 1. Inokulation Blut für die Gewinnung von Serum und DNA entnommen. Der Rhesus-Affe 179 verstarb 14 Tage nach der 1. Inokulation aufgrund einer bakteriellen Infektion. Erwartungsgemäß zeigte das Tier innerhalb dieses kurzen Zeitraums keine Bildung von Antikörpern gegen das inokulierte Virus. In der DNA der Blutzellen, sowie in der DNA von den durch Sektion entnommenen Organen konnte keine provirale DNA von PERV mittels nested-PCR detektiert werden (Abbildung 3.28). Im weiteren Verlauf der Phase 1 zeigten die verbleibenden Tiere in wiederholten Western Blot-Analysen ebenfalls keine Antikörperproduktion gegen PERV/5°, sowie in PERV-spezifischen PCR-Analysen keine Integration proviraler DNA in das Genom ihrer Blutzellen (Abbildung 3.24). Am Ende der Phase 1 lag demzufolge bei keinem der inokulierten Tiere ein Hinweis auf eine Infektion mit PERV/5° vor.

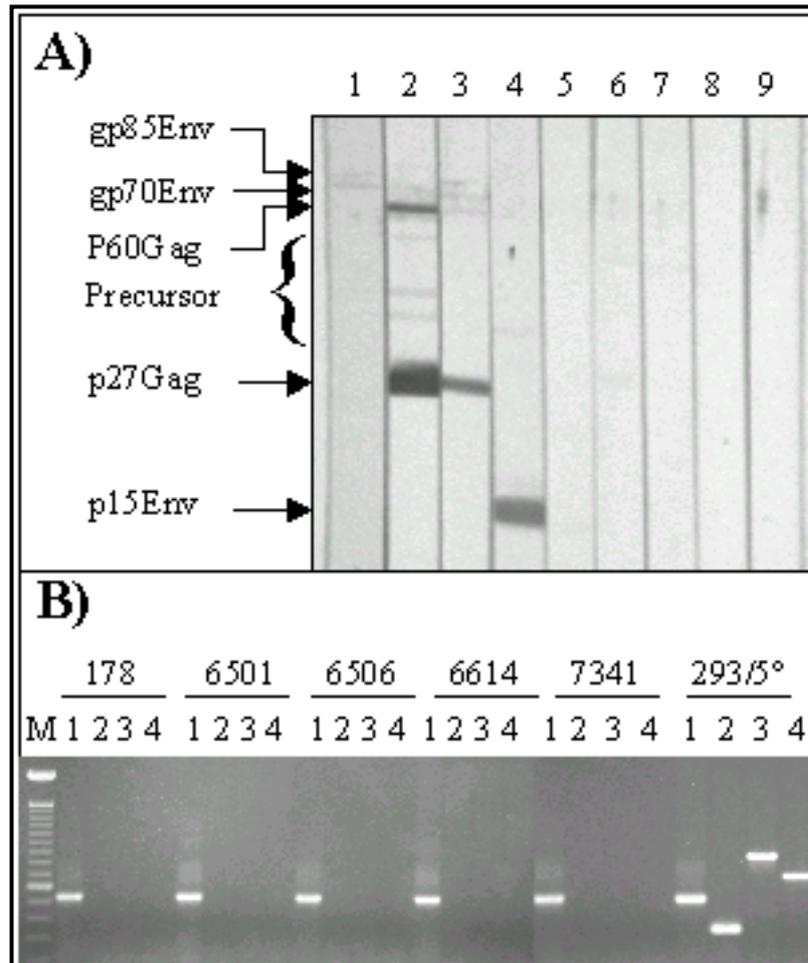


Abbildung 3.24: Western Blot-Analyse (A) und nested-PCR (B) zur Überprüfung der Infektion von nicht-humanen Primaten mit PERV/5°. Die in Phase 1 der *in vivo*-Studie mit PERV/5° inokulierten Tiere wurden über den gesamten Zeitraum regelmäßig mittels Western Blot-Analyse auf die Bildung von Antikörpern getestet. Nach bis zu 200 Tagen war in keinem der Tiere (5-9) eine Antikörperproduktion gegen das inokulierte Virus nachweisbar, wogegen entsprechende Kontrollseren (1-4) im selben Assay positiv reagierten (A). Anti-gp70Env (1); Anti-p27Gag (2); Anti-PERV gesamt (3); Anti-p15Env (4); Rhesus 178 (5); Schweins-Affen 6501 und 6506 (6, 7); Paviane 6614 und 7341 (8, 9).

Parallel zu den Western Blot-Analysen erfolgte zu den gleichen Zeitpunkten die Analyse auf eine Integration von PERV-Proviren in das Genom von Blutzellen mittels nested-PCR (B). Für die Detektion wurden PERV-spezifische Primer für die viralen Sequenzbereiche *env-A* (1), *gag* (2) und *pol* (3) verwendet. Zur Kontrolle der DNA-Qualität wurden Sequenzen des β -Aktin-Gens amplifiziert (4). M: 100 bp-Leiter

Die Schweins-Affen 6501 und 6506 wurden 200 Tage nach der 1. Inokulation mit PERV/5° euthanasiert. Da sich *in vitro* gezeigt hatte, daß PBMCs dieser Spezies nicht infizierbar waren (siehe 3.1.2), wurden beiden Tieren zusätzlich Lymphknoten, Leber, Lunge, Nieren, Milz und Herz entnommen und auf die Integration von proviraler DNA in das jeweilige zelluläre Genom untersucht. Allerdings waren in keinem der genannten Organe provirale Sequenzen der Region von PERV-*pol* mittels einer nested-PCR detektiert (Abbildung 3.25).

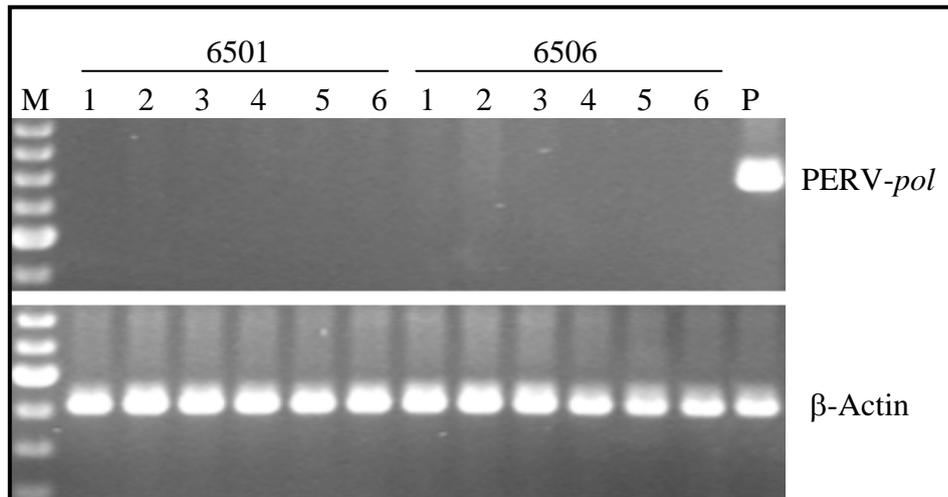


Abbildung 3.25: Nested-PCR mit DNA aus Organen von Schweins-Affen. Die immunsupprimierten Affen 6501 und 6506 wurden 200 Tagen vor der Analyse mit 1×10^9 TCID₅₀ von PERV/5° inokuliert. Nach der Euthanasie der Tiere wurde DNA aus Lymphknoten (1), Leber (2), Lunge (3), Niere (4), Milz (5), und Herz (6) isoliert und mittels nested-PCR mit spezifischen Primern für PERV-*pol* auf eine Integration von proviraler DNA untersucht. Für die Kontrolle der DNA wurden Sequenzen des β-Actin-Gens amplifiziert. Für die Kontrolle der PCR wurde DNA von 293/5° Zellen verwendet (P). M: 100 bp-Leiter

Da die verbliebenen Tiere am Ende der Phase 1 der *in vivo*-Studie (200 Tage nach der 1. Inokulation) keine Infektion mit PERV/5° aufwiesen, wurden die selben Tiere nach einer Unterbrechung der Immunsuppression zu Beginn der Phase 2 erneut mit dem selben Virus inokuliert. An Stelle des euthanasierten Rhesus-Affen 178 wurde der Rhesus-Affe 180 in die Studie aufgenommen. Für genaue Angaben der Virus-Inokulation und Immunsuppression siehe **2.5.5.3**.

Bei der 2. Inokulation (Tag 270) wurde neben der Applikation eines C1-Esterase Inhibitors die totale Virusdosis gegenüber der 1. Inokulation verdreifacht (siehe **2.5.5.3**). Weiterhin wurde das Virus zusätzlich zu der bisherigen i.p.- und i.v.-Applikation i.m. und s.c. inokuliert. Als eine weitere Abwandlung, wurde zwei Tieren (Rhesus 180 und Pavian 7341) 1×10^9 PERV/5°-produzierende 293 Zellen inokuliert, wogegen dem Rhesus-Affen 178 und dem Pavian 6614 PERV/5° zellfrei inokuliert wurde (siehe **2.5.5.3**). Im Abstand von 14 Tagen erfolgte bei den Tieren eine 3. Inokulation (Tag 284), welche den Bedingungen der 2. Inokulation entsprach. Allerdings wurde bei der 3. Inokulation kein Komplement-Inhibitor appliziert. Über den Zeitraum der Phase 2 wurde allen Tieren zur Gewinnung von Serum wöchentlich Blut entnommen und mittels Western Blot-Analyse auf Hinweise einer Infektion getestet. Bis zum Ende der *in vivo*-Studie am Tag 336 zeigte keines der Tiere in wiederholten Western Blot-Untersuchungen eine signifikante Antikörper-Reaktion gegen PERV, bei der Verwendung von kreuzreagierenden humanen IgG- und IgM Sekundärantikörpern. Auffallend war, daß der mit humanen 293/5°-Zellen inokulierte Rhesus-Affe 180 und der Pavian 7341 in Western Blot-

Analysen mit humanen uninfizierten 293 Zellen als Antigen keine Immunreaktion zeigten. Das Ausbleiben einer Antikörperproduktion gegen die inokulierten humanen Zellen konnte allerdings auf die Wirkung der applizierten Immunsuppressiva zurückzuführen sein. Diese Vermutung wurde durch eine Immunreaktion gegen das im zellfreien Kulturüberstand enthaltene fötale Kälberserum in einer entsprechenden Western Blot-Analyse mit Seren des Rhesus-Affen 180 widerlegt, und bewies eine verbliebene Immunkompetenz des Tieres (**Abbildung 3.26 A**). Im Fall des Pavian 7341 war in diesem Zusammenhang bemerkenswert, daß ab dem Tag 305, und damit etwa 21 Tage nach der 2. Inokulation, Antikörpern gegen das Gag-Protein von PERV auftraten (**Abbildung 3.26 B**). Im Prä-Immuns Serum des Tieres, sowie in allen vorherigen Western Blot-Analysen der Studie, war eine solche Reaktion nicht detektierbar. Allerdings war diese Beobachtung kein Indiz für eine Infektion des Tieres, da es sich um eine Reaktion gegen nur eines der viralen Proteine von PERV handelte. Um von einer Infektion mit PERV sprechen zu können, hätten mindestens gegen ein weiteres virales Struktur-Protein (Env oder Pol) von PERV Immunreaktionen auftreten müssen. Die eigentliche Ursache dieser Gag-Antikörper ließ sich nicht klar definieren, doch könnte es sich dabei möglicherweise um eine Kreuzreaktion von Antikörpern gehandelt haben, welches das Tier gegen Immunsuppressions-induzierte eigene Retroviren (z.B. BaEV) gebildet hatte. Diese Daten waren allerdings ein Hinweis, daß das Tier trotz der applizierten Immunsuppression eine Immunkompetenz besaßen.

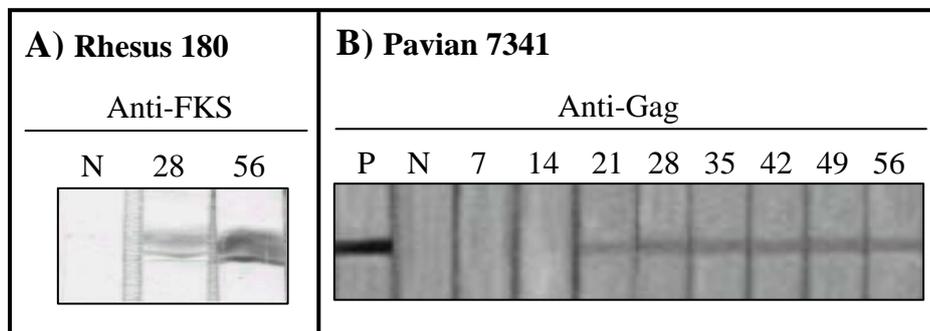


Abbildung 3.26: Nachweis der Immunkompetenz des Rhesus-Affen 180 und des Pavian 7341. Zur Überprüfung der Immunkompetenz des Rhesus-Affen 180 wurden Seren verschiedener Zeitpunkte in einer Western Blot-Analyse auf Reaktion gegen fötales Kälberserum (FKS) getestet (**A**). FKS war als Serum Bestandteil des Kulturmediums der PERV/5^o-produzierenden Zellen, und wurde daher dem Tier bei der Inokulation des Virus-haltigen Überstandes appliziert. Erwartungsgemäß zeigte das Tier nach ca. 28 Tagen eine Immunreaktion, welche sich im Verlauf der anschließenden 4 Wochen noch deutlich verstärkte.

In den Seren des Pavians 7341 traten ca. 21 Tage nach der 2. Inokulation Antikörper gegen PERV-Gag auf, welche bis zum Rest der Studie weiterhin nachweisbar waren (**B**). Vermutlich handelt es sich dabei um kreuzreagierende Antikörper des Affen gegen ein anderes Retrovirus, da keine weiteren Antikörper gegen andere Strukturproteine von PERV gebildet wurden. Die Ziffern über den Blots geben die Tage nach der 2. Inokulation an. **P**: Kreuzreagierendes Antiserum gegen p30Gag von FeLV als Positivkontrolle. **N**: Prä-Immuns Serum als Negativ-Kontrolle

Als eine weitere immunologische Untersuchung zum Nachweis der Bildung von Antikörpern im Blut der inokulierten Affen, wurden Seren der Tiere in spezifischen ELISAs getestet, welche im Gegensatz zu der Western Blot-Analyse die Erkennung von kryptischen Epitopen erlaubte. Als Antigen wurden die rekombinanten Proteine rp15Env bzw. rp27Gag von PERV verwendet. In keinem der beiden ELISAs kam es bei Verwendung von Protein G bzw. von kreuzreagierenden humanen IgG-Sekundärantikörpern zu dem Nachweis einer Antikörperproduktion gegen PERV in den Seren der mit PERV/5° inokulierten nicht-humanen Primaten.

Parallel zu den immunologischen Untersuchungen wurde aus den entnommenen Blutproben der Tiere wöchentlich DNA isoliert und mittels nested-PCR auf provirale DNA von PERV getestet. In keiner dieser Proben ließen sich bis zum Ende der *in vivo*-Studie provirale Sequenzen der *gag*-, *pol*- oder *env*-Region von PERV amplifizieren ([Abbildung 3.27](#)). Diese Daten wiesen darauf hin, daß trotz der Infizierbarkeit der PBMCs dieser Tiere *in vitro*, keine Infektion der Zellen *in vivo* stattgefunden hatte.

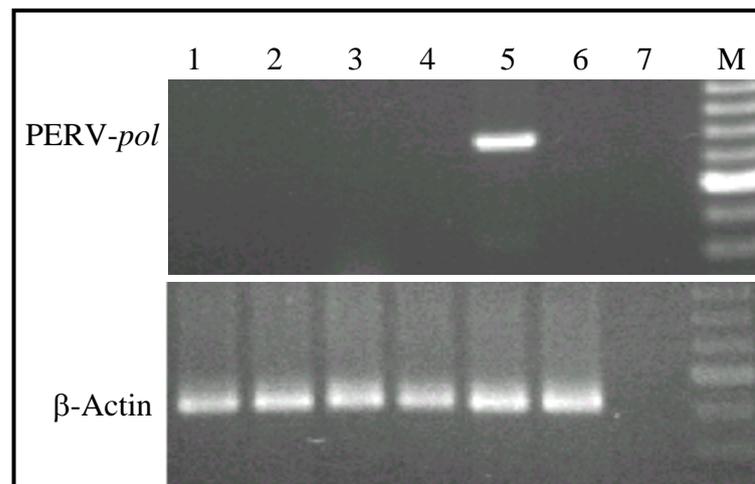


Abbildung 3.27: Nested-PCR mit DNA aus Blut von nicht-humanen Primaten. Die Isolation der DNA erfolgte bei dem Rhesus-Affen 178 (1) am Tag 313, bei dem Rhesus-Affen 180 (2) am Tag 306 und bei den Pavianen 6614 (3) und 7341 (4) am Tag 336 nach der 1. Virusinokulation. Bei Keinem der Tiere konnte eine Integration von proviraler DNA in das Genom der entsprechenden Blutzellen mittels nested-PCR und spezifischen Primern für die *pol*-Region von PERV gezeigt werden. Zur Kontrolle der PCR wurde DNA von 293/5° Zellen (5) und uninfizierten 293 Zellen (6), sowie Wasser (7) verwendet. Für die Kontrolle der DNA-Qualität wurden Sequenzen des β -Actin-Gens amplifiziert. M: 100 bp-Leiter

Für die Untersuchung der Viruslast im Blut der Tiere wurden die Seren in einen Gammaretroviren-spezifischen RT-Assay eingesetzt. In keiner der im Verlauf der Phase 2 entnommenen Serum-Proben war eine Aktivität des viralen Enzyms Reverse Transkriptase nachweisbar. Dies zeigte, daß das inokulierte Virus trotz der applizierten Immunsuppression innerhalb kürzester Zeit von dem unspezifischen Immunsystem der Tiere eliminiert wurde. Dieser Tatbestand wurde weiterhin dadurch gestützt, daß nach Isolati-

on von RNA aus diesen Seren keine Amplifikation von PERV cDNA mittels RT-PCR und PERV-spezifischen Primern möglich war.

Da eine Integration von PERV ebenso in anderen Geweben möglich war, wurde nach der Euthanasie der Tiere DNA aus den Lymphknoten, der Leber, der Lunge, der Milz, den Nieren und dem Herz isoliert, und mittels nested-PCR auf provirale DNA von PERV untersucht. In den Organen des Rhesus-Affen 178 und der beiden Paviane konnten keine Sequenzen der *gag*-, *pol* und *env*-Region von PERV amplifiziert werden ([Abbildung 3.28](#)).

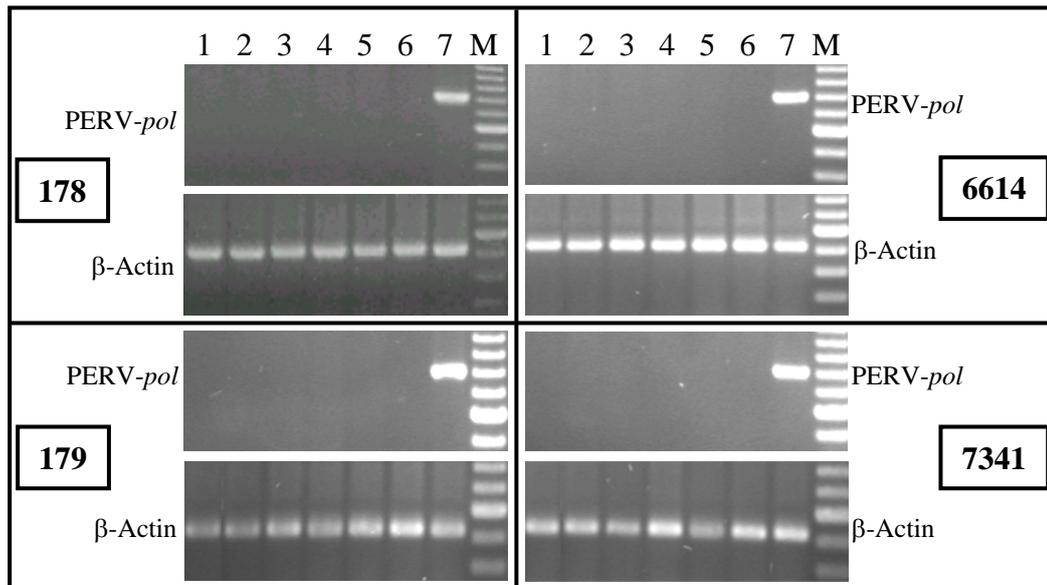
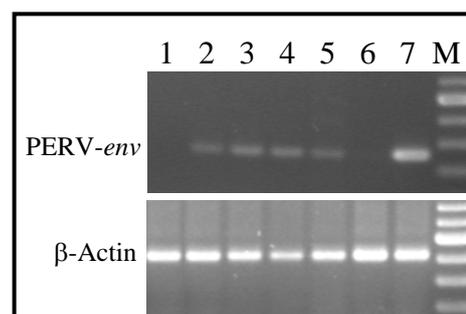


Abbildung 3.28: Nested-PCR mit DNA aus Organen von nicht-humanen Primaten.

Die Inokulation der Tiere mit PERV/5° erfolgte bei den Rhesus-Affen 178 und 179, sowie bei dem Pavian 6614 zellfrei. Bei dem Pavian 7341 erfolgte zusätzlich eine Inokulation mit PERV/5°-produzierenden Zellen. Die PCR-Analyse erfolgte in DNA aus Lymphknoten (1), Leber (2), Lunge (3), Milz (4), Niere (5) und Herz (6). Als Detektionsmethode wurde eine nested-PCR für die proviralen Genomabschnitte *gag*, *pol* und *env* von PERV verwendet, wobei in dieser Abbildung nur exemplarische Gele mit PERV-*pol* Amplifikationen gezeigt werden konnten. In den Organen der Tiere 178, 179, 6614 und 7341 war keine PERV-provirale DNA detektierbar. Für die Kontrolle der PCR wurde DNA von PERV/5° verwendet (7). Die Qualität der DNA wurde durch Amplifikation von Sequenzen des β -Actin-Gens garantiert. M: 100 bp-Leiter

Abbildung 3.29: Nested-PCR mit DNA aus Organen des Rhesus-Affen 180.

Die Inokulation mit PERV/5° erfolgte zellfrei und zusätzlich mit PERV/5°-produzierenden 293 Zellen. Die PCR-Analyse erfolgte in DNA aus Lymphknoten (1), Leber (2), Lunge (3), Milz (4), Niere (5) und Herz (6). In der DNA von Leber, Lunge, Milz und Niere war PERV provirale DNA nachweisbar. Für die Kontrolle der PCR wurde DNA von PERV/5° verwendet (7). Die Qualität der DNA wurde durch Amplifikation von Sequenzen des β -Actin-Gens garantiert. M: 100 bp-Leiter



In der DNA der Leber, Lunge, Milz und Niere des Rhesus-Affen 180 waren allerdings Sequenzen der genannten Provirus-Bereiche detektierbar (Abbildung 3.29). Da dieses Tier zusätzlich zu der zellfreien Virusinokulation eine Applikation von PERV/5°-produzierenden 293 Zellen erhalten hatte, erfolgte hier vermutlich die Amplifikation von Sequenzbereichen aus zellulärer PERV/5°-Provirus-enthaltender 293 DNA zirkulierender humaner Zellen.

Als eine weitere Besonderheit kam es bei dem Rhesus-Affen 180 an den subkutanen und intramuskulären Injektionsstellen der Virus-Inokulation innerhalb der Brust- und Bein-Muskulatur zur Ausprägung massiver Tumorbildung (Abbildung 3.30). Auch die intraperitoneale Injektion verursachte im gesamten Bereich des Peritoneums die Ausbildung zahlreicher Tumore (Abbildung 3.30). Die Lokalisation und Morphologie dieser Tumore sprach allerdings nicht für eine Virus-Transformation von Wirtszellen, sondern für eine Immunsuppressions-bedingte Proliferation der inokulierten humanen 293 Zellen.

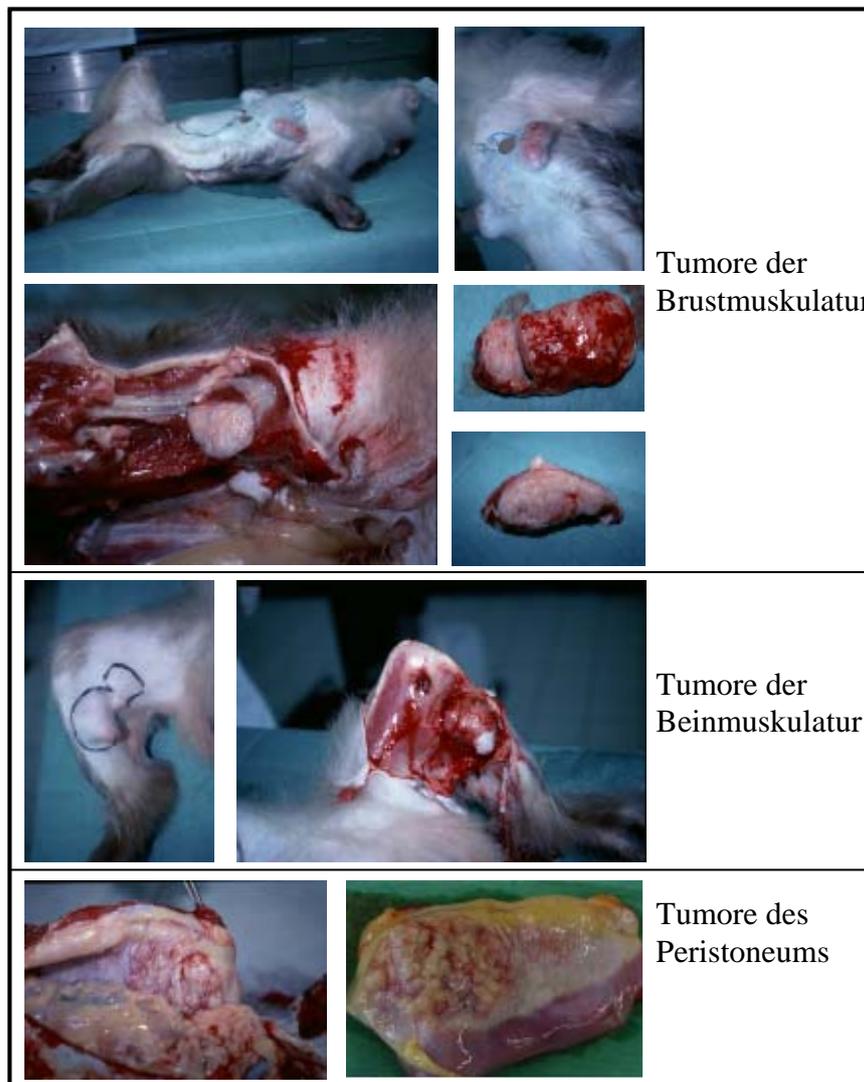


Abbildung 3.30:
Tumore des Rhesus-Affen 180.

Nach der s.c. und i.m. Inokulation von PERV/5°-produzierenden Zellen kam es bei dem Tier zu einer deutlichen Tumorbildung im Bereich der Injektionsstellen. Bei der Sektion des Tieres wurden weiterhin Tumore in der Wand der Bauchhöhle gefunden. Die Ausbildung dieser Tumore resultierte vermutlich aus der i.p. Applikation der PERV/5°-produzierenden Zellen. Die Lokalisation und die Morphologie der Tumore deutete weniger auf ein tumorigenes Potential des inokulierten Virus, als auf eine Auswucherung der inokulierten Zellen hin.

Darüber hinaus deutete die immunhistochemische Identifizierung von Gewebespezifischen Filamentpolypeptiden wie Zytokeratin ebenfalls auf den epithelialen Ursprung der Tumore hin. Dagegen ließen sich die Dünnschnitte mit Antikörpern gegen das Filamentpolypeptid Vimentin, welches ausschließlich in mesenchymalen Geweben vorkommt, nicht anfärben.

Für eine weitere Charakterisierung wurden die Tumore histopathologisch untersucht (**Abbildung 3.31**). In einer Anzahl repräsentativer Schnitte zeigte sich, daß es im Bereich des Peritoneums zur Infiltration von Tumorzellen in das Gewebe der Bauchhöhle gekommen war (**Abbildung 3.31 A, B**). Die Tumore im Bereich der Brust- und Beinmuskulatur waren dagegen von dem umgebenden Muskelgewebe getrennt (**Abbildung 3.31 C**). Zum Teil war dabei deutlich eine Membran zu erkennen, welche den Tumor von dem umgebenden Gewebe abkapselte. Bei allen Tumoren konnte eine deutliche Vaskularisierung mit zum Teil großen Gefäßen beobachtet werden (**Abbildung 3.31 D**).

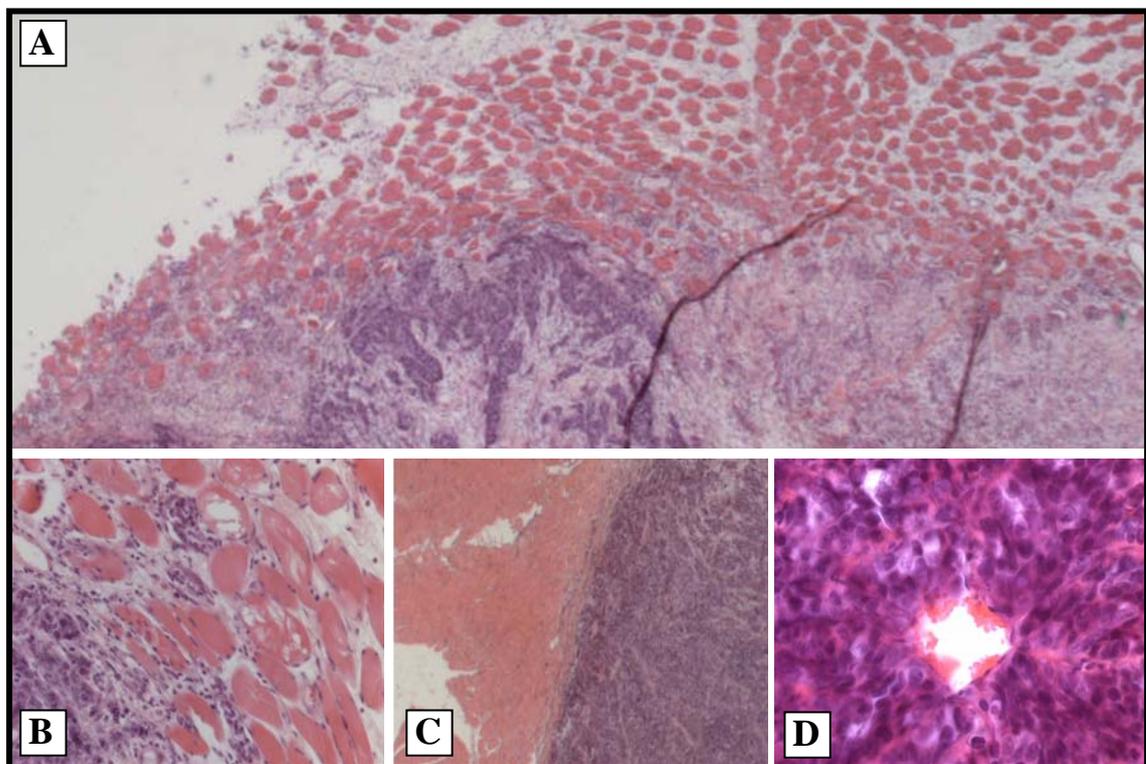


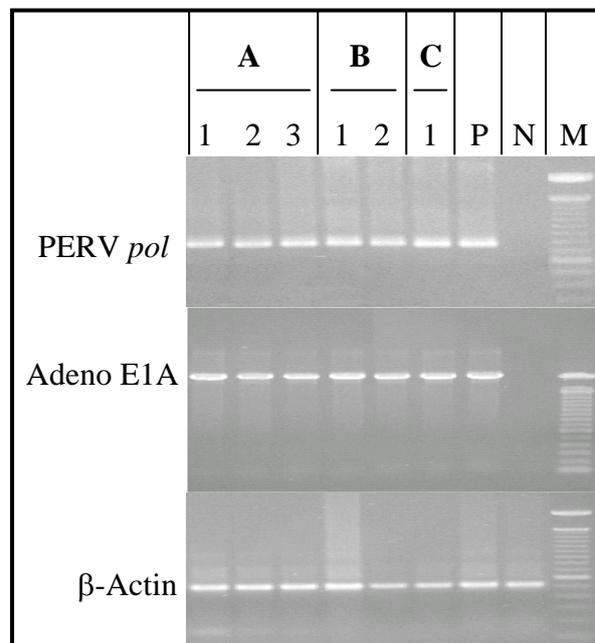
Abbildung 3.31: Histopathologische Untersuchung der Tumore des Rhesus 180. In histologischen Dünnschnitten der Tumore aus dem Bereich des Peritoneums konnte mittels einer HE (Hämatoxylin-Eosin)-Färbung eine Infiltration von Tumorzellen (violett) in das umgebende Gewebe (rot) beobachtet werden (**A, B**). Die Tumore im Bereich der Brust- und Beinmuskulatur waren dagegen deutlich von dem umgebenden Muskelgewebe abgekapselt (**C**). In allen untersuchten Tumoren konnte eine starke Vaskularisierung beobachtet werden (**D**). Die Endothelzellen der Gefäßwände (rot) hoben sich dabei deutlich von dem Tumorgewebe (violett) ab. Auch war in allen Tumoren ein Stützgewebe aus Fibroblasten nachweisbar.

Für eine molekularbiologische Analyse des Ursprungs der Tumore, wurde aus einem Teil der Brust- und Bein-Tumore, sowie aus einigen Tumoren der Bauchhöhle DNA isoliert. Parallel dazu wurden Zellen der entsprechenden Tumore sofort nach der Sektion kultiviert (siehe 2.1.2.4), und auch aus diesen kultivierten Tumorzellen DNA isoliert. Da es sich bei den 293 Zellen um eine mit der E1-Region des Adenovirus 5 (Ad 5) transformierte Zell-Linie handelt, konnte die PCR-Amplifikation von Sequenzbereichen des E1A-Gens von Ad 5 als ein Zelltyp-spezifischer Marker genutzt werden. Bei der Verwendung von Rhesus-Affen DNA führten die verwendeten E1A-Primer erwartungsgemäß zu keiner Amplifikation (Abbildung 3.32). Dagegen war in jedem der untersuchten Tumore die E1A-Sequenz des Adenovirus, und somit DNA aus den inokulierten humanen 293 Zellen detektierbar (Abbildung 3.32).

Abbildung 3.32: PCR mit DNA aus Tumoren des Rhesus-Affen 180.

Aus dem Peritoneum (A) wurden 3 Tumore, aus der Muskulatur der Brust (B) 2 Tumore und aus der Beinmuskulatur (C) 1 Tumor analysiert. Für den Nachweis von proviraler PERV DNA wurden spezifische Primer für die *pol*-Region verwendet. Für den Nachweis von 293 DNA wurden spezifische Primer für das E1A-Gen des Adenovirus 5 verwendet, mit welchem die humanen 293 Zellen transformiert sind.

Als Positiv-Kontrolle der PCR wurde DNA von 293/5° Zellen verwendet (P). Für die Kontrolle der Spezifität der Primer wurde DNA aus PBMCs von uninfizierten Rhesus-Affen als Negativ-Kontrolle verwendet (N). Die Qualität der jeweiligen DNA wurde mittels Amplifikation von β -Actin Sequenzen überprüft. M: 100 bp-Leiter



Die Verwendung von Virus-produzierenden Zellen als Inokulat sollte die erfahrungsgemäß bessere Transmission des Virus via Zell-Zell Kontakt von den inokulierten Zellen zu den Zellen des umgebenden Gewebes ermöglichen. Weiterhin wurde so die Situation eines transplantierten Xenotransplantates simuliert. Bei der Verwendung porciner Xenotransplantate, könnte das knospende Virus direkt von der Membran der porcinen Zelle auf die Zellen des umliegenden Gewebes übertragen werden. Auch bestünde die Möglichkeit einer Verteilung porciner Zellen über den Blutkreislauf im ganzen Körper des Rezipienten. Ähnliches konnte bei den mit PERV/5°-produzierenden Zellen inokulierten Affen dieser Studie beobachtet werden. DNA dieser PERV/5°-produzierenden Zellen war insbesondere in den stark durchbluteten Organen wie Lunge, Leber, Nieren

und Milz detektierbar ([Abbildung 3.29](#)). Eine Differenzierung zwischen den chronisch PERV-infizierten Zellen und potentiell neu infizierten Wirts-Zellen ist allerdings zur Zeit kaum möglich. Das Auftreten sogenannter Mikrochimerismen ist in diesem Zusammenhang ein prinzipielles Problem, und bedarf mit Hinblick auf zukünftige klinische Xenotransplantationen entsprechend sensitiver und selektiver Detektionsmethoden. Da jedoch bei dem Rhesus-Affen 180 keine Virämie detektiert werden konnte, und weiterhin die Entstehung der Tumore dem tumorigenen Potential der inokulierten 293 Zellen zugeordnet werden konnte, mußte davon ausgegangen werden, daß es nicht zu einer produktiven Infektion des Affen *in vivo* gekommen war.

4. Diskussion

Die Xenotransplantation porciner Zellen, Gewebe oder Organe birgt das Risiko der Transmission von Mikroorganismen auf den humanen Rezipienten (Denner, 1998; Onions und Witt, 2000; Stoye et al., 1998; Weiss, 1999). Dabei kommt den porcinen endogenen Retroviren eine besondere Bedeutung zu, da sie nicht wie die meisten anderen Pathogene durch einfache Züchtung oder Impfung aus den Schweinen eliminiert werden können. Für eine aussagekräftige Evaluierung des Übertragungsrisikos der PERVs ist das Wirtsspektrum dieser Viren von fundamentaler Bedeutung. Insbesondere nachdem gezeigt werden konnte, daß PERVs in der Lage sind, humane Zellen *in vitro* zu infizieren (Patience et al., 1997).

4.1 Die Infektion von Zellen mit PERV *in vitro*

Bislang ist/sind der/die zelluläre(n) Rezeptor(en) der PERVs unbekannt, so daß auf diesem Wege PERV-suszeptible Spezies und Zelltypen nicht im vollen Umfang identifiziert werden konnten. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit eine detaillierte Analyse des Wirtsspektrums von PERV *in vitro* durchgeführt. Dabei wurden zwei Ziele verfolgt:

1. Es sollten suszeptible Zellen nicht-humaner Säuger identifiziert werden, um darauf aufbauend eventuell ein Tiermodell für PERV zu etablieren.
2. Es sollten weiterhin potentiell suszeptible humane Zellen verschiedener Gewebe identifiziert werden, und die Replikation von PERV in diesen Zellen näher charakterisiert werden.

4.1.1 Die Infektion von Zellen verschiedener Kleintiere mit PERV

Im Gegensatz zu den ersten Versuchen, PERV auf Zellen anderer Spezies zu übertragen (Bouillant et al., 1975; Todaro et al., 1974; Lieber et al., 1975), gelang es mit zunehmender Intensivierung der Forschung, eine Transspezies-Transmission von PERV *in vitro* zu zeigen (Patience et al., 1997; LeTissier et al., 1997; Takeuchi et al. 1998; Wilson et al., 1998).

Dabei wurde vorwiegend das aus der porcinen Zell-Linie PK-15 stammende Inokulat PERV/PK verwendet, welches auch genutzt wurde, um die humane Zell-Linie 293 produktiv zu infizieren (PERV/293) (Patience et al., 1997). Beide Zell-Linien produzieren ein Gemisch aus PERV-A und PERV-B (LeTissier et al., 1997). Die in [Tabelle 3.1](#) dar-

gestellte Übersicht von PERV-inokulierten Zellen verschiedener Kleintiere zeigt, daß die primären Zellen von Ratten und Baumwollratten nicht suszeptibel gegenüber einer Infektion mit PERV/PK bzw. PERV/293 waren. Demgegenüber stehen allerdings Untersuchungen mit PERV-Pseudotypen, welche die Präsenz des zellulären Rezeptors von mindestens PERV-B auf Rattenzellen beweist (Takeuchi et al., 1998). Neuere Untersuchungen zeigten allerdings, daß die Anzahl von PERV-B Proviren im porcinen Genom gegenüber denen von PERV-A verhältnismäßig gering ist (Stoye et al., 1998; Patience, persönliche Mitteilung). Diese Tatsache könnte die nicht erfolgte Transmission von PERV/PK bzw. von PERV/293 auf die primären Ratten- und Baumwollratten-Zellen erklären, da diese Inokulate vorwiegend PERV-A enthielten. Als eine weitere Bestätigung dieser Vermutung kann die Beobachtung angesehen werden, daß auch ein rekombiniertes PERV-A/C, mit reinem PERV-A Tropismus, Zell-Linien von Ratten nicht infizieren konnte (Wilson et al., 2000). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß bei der Verwendung von Viren mit höherem Titer, oder durch Zell-Zell-Kontakt eine Infektion der Rattenzellen erfolgen könnten. Dazu existieren erste Hinweise einer möglichen Übertragung von PERV-A/C in Kokultivierungs-Experimenten mit Rattenzellen, wobei bisher jedoch keine produktive Infektion beobachtet werden konnte (Denner et al., 2002a).

Bei der Nerzzell-Linie Mv1Lu konnte dagegen die Präsenz der zellulären Rezeptoren für PERV-A und PERV-B mittels Infektionsstudien mit Pseudotypen gezeigt werden (Takeuchi et al., 1998). Dies ließ sich auch durch die Infektion dieser Zellen mit replikationskompetenten PERV/293 (siehe **3.1.1.1** und [Tabelle 3.1](#); Specke et al., 2001a,c), sowie bei Verwendung des rekombinierten PERV-A/C (Wilson et al., 2000) verifizieren. Auch für weitere Säugerzellen wie z.B. bei der Infektion der Katzen-Zell-Linie PG-4 konnte neben der Übertragung von PERV-A auch die produktive Infektion mit PERV-B gezeigt werden ([Abbildung 3.1](#); [Tabelle 3.1](#); Wilson et al., 2000; Specke et al., 2001a).

4.1.1.1 Die produktive Infektion der Nerzzell-Linie Mv1Lu

Da gezeigt werden konnte, daß die Zell-Linie Mv1Lu suszeptibel für eine Infektion mit PERV ist, wurden diese Zellen mit Hinblick auf die Etablierung eines Tiermodells näher charakterisiert (siehe **3.1.1.1**; Specke et al., 2001c). Wie bereits erwähnt, konnte mittels PERV-Pseudotypen (Takeuchi et al., 1998) und bei Verwendung von replikationskompetenten PERVs (Specke et al., 2001c) gezeigt werden, daß die Zellen beide Rezeptoren für PERV-A und PERV-B exprimieren ([Abbildung 3.2](#)). Auch bewies die letztgenannte Studie, daß diese Zellen eine Replikation von PERV unterstützen, da die Expression von PERV-Proteinen gezeigt werden konnte ([Abbildung 3.3](#)). In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, daß PERVs, welche von infizierten Mv1Lu-Zellen freigesetzt werden (PERV/Mv1Lu), bei der Inokulation von humanen 293 Zellen auf

diesen signifikant schneller replizieren, als auf parallel inokulierten Mv1Lu Zellen ([Abbildung 3.3](#)). Diese und andere Daten zeigten, daß die humanen 293 Zellen als eine besonders susceptible Zell-Linie für die Infektion mit PERV angesehen werden kann (siehe [3.1.1.1](#); [3.1.3](#) und [3.1.4](#)).

Bei der weiteren Charakterisierung von PERV/Mv1Lu, wurden die infizierten Nerz-Zellen elektronenmikroskopisch analysiert. Im Zytoplasma der infizierten Mv1Lu-Zellen war eine Vielzahl von multivesikulären Strukturen („Multi vesicular bodies“, MVBs) zu beobachten ([Abbildung 3.5](#)), welche weder in uninfizierten Mv1Lu Zellen, noch in uninfizierten oder in infizierten 293 Zellen vorkamen. Im Innern der MVBs lagen große Mengen von Virus-ähnlichen Partikeln („virus-like particles“, VLP) mit einem Durchmesser von etwa 60 nm vor. Immun-Fluoreszenzmikroskopische Analysen zeigten, daß die Partikel der VLPs Virus-spezifische Proteine enthielten ([Abbildung 3.6](#)). Vermutlich handelt sich bei den VLPs um in (Golgi)-Vesikeln akkumulierte virale Protein-Komplexe, welche aus ungeklärten Gründen von der Zelle nicht freigesetzt werden. Die Ursachen solcher Defekte können vielfältig sein. Möglichkeiten dafür könnten **A**) Defekte in der Regulation der Transkription und/oder Translation der viralen Gene; **B**) Defekte beim Transport der viralen Proteine zur Zytoplasmamembran oder **C**) Defekte beim Zusammenbau des Virions sein. VLPs enthaltende MVBs ähnlicher Morphologie wurden bereits als natürlich vorkommende Komponenten in neuronalen und sekretorischen Zellen beschrieben. Auch konnten VLPs mit einem Durchmesser von 30-50 nm in fötalem bovinem Serum (Dalton, 1974) und in humaner Milch gezeigt werden (Feller und Chopra, 1971; Seman et al., 1971). Da darüber hinaus VLPs in Zellkulturen von humanen Brusttumoren (Feller et al., 1967), in Kulturen von Patienten mit infektiöser Mononukleosis (Moses et al., 1968) und in Mäusen mit Leukose-ähnlichem Syndrom (Denner und Dorfman, 1977) beschrieben wurden, gab es in frühen Studien die Vermutung, daß VLPs an der Auslösung von Tumorkrankheiten beteiligt sein könnten (Maynard et al., 1975; Foa und Carcassonne, 1976). Diese Theorie ließ sich allerdings bis heute nicht beweisen. Dieser Aspekt konnte im Verlauf der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt werden, doch bietet er einen interessanten Ansatz für weitere Forschung auf diesem Gebiet.

4.1.2 Die produktive Infektion von Zellen nicht-humaner Primaten

Zellen nicht-humaner Primaten galten lange Zeit als nicht susceptible für eine Infektion mit PERV. In initialen Untersuchungen gelang es nicht, PERVs auf Zellen von Rhesus-Affen oder Schimpansen zu übertragen (Todaro et al., 1974; Bouillant et al., 1975; Lieber et al., 1975). Auch konnte Anfangs mittels Pseudotypen, welche jeweils das Env-Protein von PERV-A, PERV-B oder PERV-C und ein Core des murinen Leukämievirus (MuLV) trugen, die Präsenz der entsprechenden zellulären Rezeptoren nicht gezeigt werden (Takeuchi et al., 1998). Allerdings ergaben weiterführende Studien mit den

gleichen Pseudotypen eine Infektion von primären Fibroblasten von Pavianen, Gorillas und Schimpansen mit PERV-A, was die Anwesenheit des Rezeptors für mindestens diesen Subtyp von PERV auf den Zellen der nicht-humanen Primaten bewies (Blusch et al., 2000a). In Kokultivierungs-Experimenten mit replikationskompetenten PERVs, welche von der porcinen Zell-Linie PK-15 oder primären Endothelzellen der porcinen Aorta freigesetzt wurden, konnte zusätzlich die Anwesenheit des Rezeptors für PERV-B gezeigt werden (Blusch et al., 2000a). Allerdings wurde in diesen Experimenten nur die Integration der jeweiligen Proviren gezeigt. Doch in Infektionsstudien mit Zell-Linien der B-Lymphozyten von Paviane gelang es, mRNA-Expression von PERV-A und PERV-B zu zeigen, was die ersten Hinweise einer Replikation von PERV in Zellen nicht-humaner Primaten lieferte (Blusch et al., 2000a).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden darüber hinaus primäre PBMCs und Milzzellen von Pavianen produktiv mit PERV-A/C (PERV/5^o) infiziert (siehe 3.1.2; Specke et al., 2001a; 2002a,b). Die Detektion viraler RT-Aktivität (Tabelle 3.2), sowie die Isolation von viraler RNA aus pelletierten Partikeln des Kulturüberstands der infizierten Zellen (Tabelle 3.3) beweist die Replikation und Freisetzung von PERV aus den infizierten Pavian-Lymphozyten.

In dieser Arbeit konnte weiterhin erstmals die Infektion von Zellen der Rhesus-Affen und Schweins-Affen gezeigt werden (Abbildung 3.7; Specke et al., 2002b), die bis zu diesem Zeitpunkt als uninfizierbar galten (Takeuchi et al., 1998; Blusch et al., 2000a). Dabei konnte für die PBMCs der Rhesus-Affen ebenfalls eine produktive Infektion mit PERV-A/C festgestellt werden (Tabelle 3.2), da auch hier RT-Aktivität und virale RNA in den Kulturüberständen zu detektieren war. Zusätzlich ließ sich für die PBMCs der Paviane und der Rhesus-Affen erstmals eine Infektion mit replikationskompetentem PERV-B zeigen (Abbildung 3.7). Diese Infektion resultierte allerdings nicht in einer über die Integration des Provirus hinausgehenden Replikation von PERV-B (Tabelle 3.2; Specke et al., 2002b).

Die PBMC der Schweins-Affen waren nicht mit PERV-A/C infizierbar. Die Suszeptibilität dieser Spezies konnte allerdings durch die Infektion von Milz- und Nierenzellen der Schweins-Affen mit PERV-A/C erbracht werden (Abbildung 3.7). Dabei konnte die Integration proviraler DNA gezeigt werden, jedoch war der Nachweis einer Expression viraler Proteine dagegen nicht möglich (Tabelle 3.2). Eine Infektion von Zellen der Schweins-Affen mit replikationskompetentem PERV-B wurde bislang nicht durchgeführt.

Diese Daten zeigten die Suszeptibilität von Zellen verschiedenen Spezies und verschiedener Gewebe der nicht-humanen Primaten. Zusätzlich zu früheren Studien konnte die Replikation von rekombiniertem PERV-A/C, sowie von PERV-B in primären Lymphozyten von Pavianen und Rhesus-Affen gezeigt werden (Specke et al., 2002b).

4.1.3 Die produktive Infektion von humanen Zellen

Im Zusammenhang mit der Xenotransplantation ist die Überprüfung der Suszeptibilität humaner Zellen für eine Infektion mit PERV von zentraler Bedeutung. Die Übertragung von PERV auf die humane Zell-Linie 293 zeigte, daß Zellen der Spezies Mensch mit PERV infizierbar sind (Patience et al., 1997). Dabei kam es zur Transmission von PERV-A und PERV-B, welche von der porcinen Zell-Linie PK-15 freigesetzt wurden (LeTissier et al., 1997). Auch konnte PERV aus primären porcinen Endothelzellen auf die humanen Zell-Linien 293 (Martin et al., 1998a) und HeLa (Wilson et al., 1998) übertragen werden. Doch sind Zell-Linien aufgrund ihrer Transformation und Immortalisierung nur limitiert repräsentativ für eine Aussage über die Suszeptibilität des gleichen Zelltyps *in vivo*. Daher wurde in dieser Arbeit die Verwendung von primären humanen Zellen favorisiert. Die Infektionsstudien zeigten, daß humane primäre Endothelzellen (HAEC, HPAEC, HUVEC) sowie primäre Fibroblasten (HCTFC) für PERV permissiv sind (Tabelle 3.4; Specke et al., 2001b). In der DNA dieser Zellen war provirale DNA von PERV nachweisbar. Darüber hinaus konnte in den Kulturüberständen der infizierten Zellen RT-Aktivität detektiert werden, sowie freie Viruspartikel pelletiert und mittels RT-PCR virale RNA nachgewiesen werden (Tabelle 3.4). Ähnliche Daten konnten auch für andere humane primäre Endothelzellen und primäre Fibroblasten gezeigt werden (Martin et al., 2000).

In der DNA von primären glatten Muskelzellen (HCASMC) konnte die Integration von PERV-proviraler DNA detektiert werden, jedoch unterstützten diese Zellen die Replikation von PERV offensichtlich nicht, da hier kein Nachweis einer produktiven Infektion möglich war (Tabelle 3.4).

In anderen Infektionsstudien konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß hämatopoetische Vorläuferzellen nicht mit PERV infizierbar sind (Martin et al., 2000). Im Gegensatz dazu gelang es in dieser Arbeit, humane lymphoide Zell-Linien (C8166, THP-1, WIL2.NS.6TG) und primäre humane PBMCs erstmals mit PERV zu infizieren (Tabelle 3.4; Specke et al., 2001b). Aus diesen *in vitro* Daten läßt sich schließen, daß die Suszeptibilität humaner Zellen gegenüber einer Infektion mit PERV entsprechend dem Zelltyp, und möglicherweise auch entsprechend dem Differenzierungsgrad der Zelle, variiert. Offensichtlich existieren im humanen Organismus Zellen, welche nicht für eine Infektion mit PERV suszeptibel sind, sowie solche, die zwar mit PERV infizierbar sind, aber die Replikation dieser Viren nicht unterstützen. Jedoch scheinen die Gefäßauskleidenden Endothelzellen, und die durch das Gefäßsystem zirkulierenden Blutzellen für PERV permissiv zu sein. Bei allen bislang getesteten Zellen dieser Typen, ließ sich neben der Provirus-Integration auch die Replikation von PERV zeigen.

Diese Daten sind für die Frage der Virussicherheit bei der Xenotransplantation von zentraler Bedeutung. Da *in vitro* für die Endothelzellen porciner Gefäße die Freisetzung von PERV gezeigt werden konnte (Martin et al., 1998a), könnten die suszeptiblen hu-

manen Blutzellen, welche beim Durchströmen eines porcinen Xenotransplantates in direkten Kontakt mit diesen porcinen PERV-produzierenden Zellen kommen würden, potentiell mit PERV infiziert werden. Diese infizierten Blutzellen würden dann das Virus über den Blutkreislauf im ganzen Körper des Rezipienten verteilen. Bei der Abknospung von den Blutzellen würden die PERVs an jedem Ort des Organismus auf die umgebenden suszeptiblen Endothelzellen der humanen Gefäße treffen und diese wiederum potentiell infizieren. Zwar konnte den PERVs bislang kein tumorigenes Potential zugeordnet werden, doch kann dieses aufgrund der hohen Homologie der PERVs zu anderen Tumor-induzierenden Gammaretroviren nicht ausgeschlossen werden (siehe **1.2.2.1**).

Als ein weiteres Problem muß die mögliche Rekombination von PERV angesehen werden (siehe **4.1.3.1**). Dies könnte einerseits mit humanen endogenen Retroviren erfolgen, andererseits existieren bereits erste Hinweise, daß die einzelnen Subtypen von PERV untereinander rekombinieren (**Abbildung 4.4**; Wilson et al., 2000; Tönjes et al., 2000; Niebert et al., 2002). Die daraus resultierenden Viren können aufgrund genetischer oder morphologischer Veränderungen potentiell eine neue Pathogenität entwickeln.

4.1.3.1 PERVs adaptieren sich *in vitro* an humane Zellen

Neben Rekombinationen, kann es bei einer Xenotransplantations-bedingten Infektion mit PERV auch zu einer Adaptation der Viren an den humanen Wirtsorganismus kommen. Dabei erfolgt die Adaptation, wie bei jedem umhüllten Virus, im Verlauf des Budding-Prozeß durch die Inkorporation von Membranproteinen der Wirtszelle (siehe **1.2.2.4**). Im Zusammenhang mit der hyperakuten Transplantatabstoßung wurde bereits erwähnt, daß humane Zellen und Zellen der nicht-humanen Altweltaffen keine α -Gal Epitope auf ihrer Oberfläche exprimieren (Lin et al., 1998; vergleiche **1.1.2** und **1.2.3**). Diese Epitope befinden sich allerdings auf den Hüllmembranen der porcinen Viren, und machen sie daher für die Virolyse des humanen Immunsystems empfindlich (Takeuchi et al., 1994; Rother et al., 1995). Nach der Replikation von PERV auf humanen Zellen verliert allerdings das Virus diese Epitope, und wird damit gegenüber der α -Gal-vermittelten Virolyse resistent (Patience et al., 1997).

Unter Adaptation versteht man weiterhin genetische oder morphologische Veränderungen der Viren. So können Veränderungen im regulativen LTR-Bereich des viralen Genoms zu Modifikationen der Replikation des Virus führen. Auch besteht die Möglichkeit, daß das Virus sich im Bereich der Bindungsdomäne seines zellulären Rezeptors verändert. Die daraus resultierende Veränderung in der Bindungsaffinität kann sich in einer Modifikation der Infektionsrate auswirken. Darüber hinaus können Veränderungen im Bereich der Rezeptorbindungsstelle dem Virus eventuell auch ermöglichen, andere Rezeptoren zu binden, und damit neue Zielzellen innerhalb seines Wirtes, oder

möglicherweise sogar eine andere, neue Wirts-Spezies zu infizieren (Coffin et al., 1997).

Die im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten Infektionsversuche mit humanen Zellen zeigten, daß die Zell-Linie 293 besonders suszeptibel für eine Infektion mit PERV war (siehe 3.1.3 und 3.1.4; [Abbildung 4.1](#)).

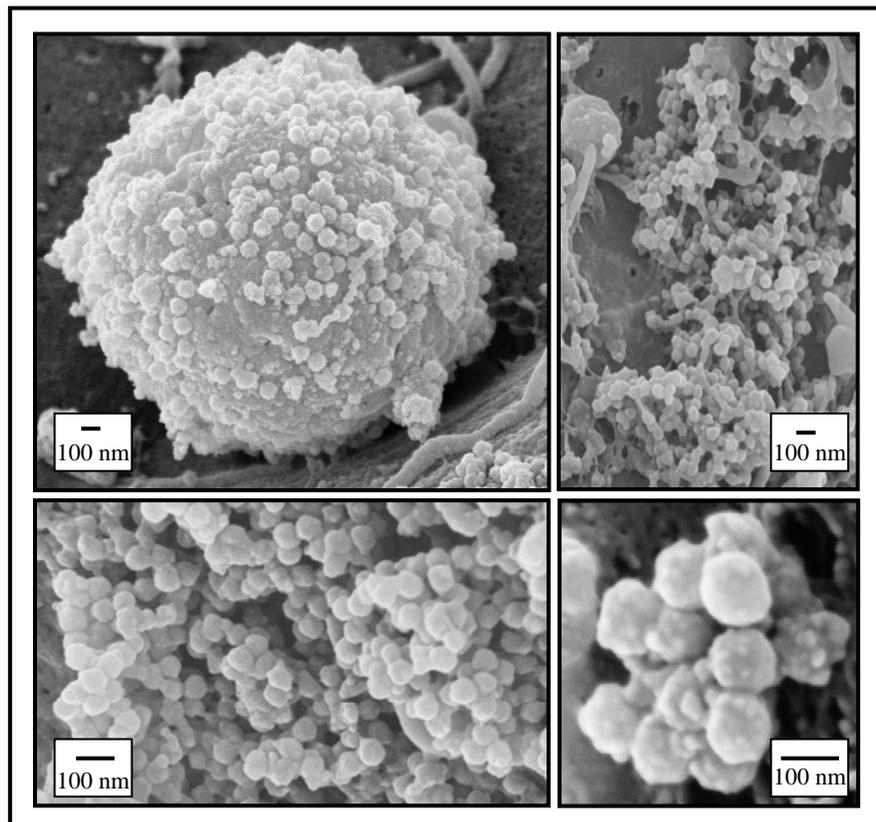


Abbildung 4.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von PERV/5°. Von allen bisher untersuchten humanen Zellen unterstützt die humane Zell-Linie 293 die Replikation von PERV am besten. Insbesondere nach der seriellen Passagierung von PERV auf 293 Zellen kommt es zur Freisetzung von hohen Virus-Titern. Diese und andere Beobachtungen deuten auf eine Adaptation des Virus an humanen Zellen hin. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. M. Özel; RKI; Berlin).

Die serielle Passagierung eines rekombinierten PERV-A/C ([Abbildung 4.4](#)) auf diesen humanen 293 Zellen ([Abbildung 3.13](#)) ging daher vorrangig der Frage einer potentiellen genetischen Veränderung von PERV im Verlauf eines möglichen Adaptationsprozesses nach. Dabei ließ sich mit Anstieg der Passagenzahl eine Verlängerung der LTR-Region im proviralen Genom beobachten ([Abbildung 3.14](#)). Die Klonierung und Sequenzierung der PERV-A/C LTRs der jeweiligen Passagen zeigte, daß die Expansion der LTR auf einer Multimerisierung von repetitiven Sequenzabschnitten im Bereich der U3 Region der LTRs beruht ([Abbildung 3.15](#)). Gleiche Beobachtungen konnten bei der Passagie-

rung einer PERV-A/PERV-B-Mischpopulation (PERV/293) gemacht werden ([Abbildung 3.17](#); Denner et al., 2001; 2002b), sowie bei der Passagierung von molekularen Klonen von PERV-A und PERV-B (Czuderna et al., 2000).

Ähnliche Multimerisierungen von bestimmten Sequenzmotiven konnten bereits auch in anderen retroviralen LTRs wie z.B. in denen der endogenen Leukämieviren der Maus und der Katze beobachtet werden (DesGroseillers und Jolicoeur, 1984; Golemis et al., 1990; Athas et al., 1995; Starkey et al., 1998). Dabei ist die Struktur der viralen LTR einerseits maßgeblich für den Zelltropismus (Rudell, 1995; Palmarini et al., 2000), sowie andererseits für die Infektiösität und Onkogenität der Viren verantwortlich (Robinson et al., 1982; Lenz und Haseltine, 1983; Brown et al., 1988). Bei FeLV und MLV ist mit der veränderten LTR-Struktur durch die Multimerisierung der jeweiligen Sequenzmotive meist eine Zunahme der Pathogenität assoziiert (Rohn und Overbaugh, 1995). Für PERV konnte jedoch bislang noch kein pathogenes Potential ermittelt werden.

Im Fall von PERV kam es allerdings mit jeder Passage von PERV-A/C und des PERV-A/PERV-B Gemisches (PERV/293) auf humanen 293 Zellen zu einem Anstieg des viralen Titers ([Abbildung 3.16](#)). Da für viele Viren bereits gezeigt werden konnte, daß ihre Pathogenität mit der Viruslast verknüpft ist (Fauci, 1988), könnte eine gesteigerte Replikation von PERV auf humanen Zellen ebenfalls das Risiko von potentiell pathogenen Folgen erhöhen. Die Ursache dieser erhöhten Replikation von PERV läßt sich auf die Multimerisierung der repetitiven Sequenzabschnitte („Repeats“) im Bereich der LTR zurückführen. In Expressionsstudien konnte den repetitiven Sequenzmotiven bereits eine Transkriptions-regulierende Funktion zugeordnet werden ([Abbildung 4.2](#); Denner et al., 2002b; Scheef et al., 2001).

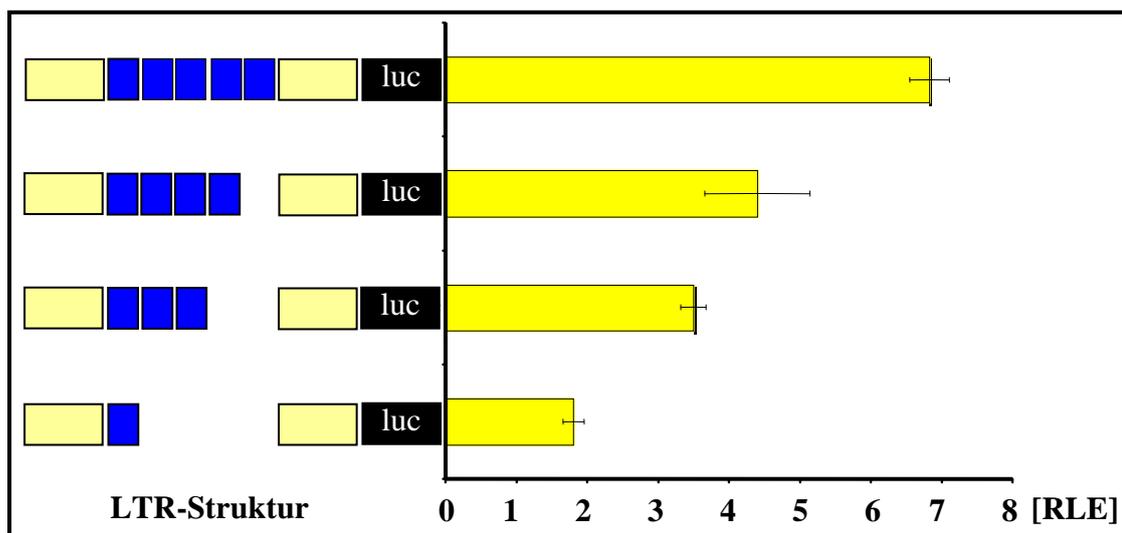


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Expression eines Marker-Gens in Abhängigkeit von der Struktur der PERV-LTR. Die unterschiedliche Anzahl von Repeats in der PERV-A/C LTR reguliert die Expression des nachfolgenden Luziferase-Gens. Die Expression erfolgt um so stärker, je mehr Repeats sich in einer LTR befinden. Die Expression der Luziferase ist in relativen Lichteinheiten (RLE) nach Abzug der basalen Lumineszenz angegeben. Die Standardabweichung ergibt sich aus Messungen von Triplikaten.

Dabei wurde deutlich, daß die Replikation der Proviren in Abhängigkeit von der Anzahl der Repeats erfolgt. Je mehr Repeats sich in einer PERV-LTR befinden, umso stärker erfolgt die Transkription der nachfolgenden viralen Gene. Der mit der Passagenzahl ansteigende Virustiter korreliert daher direkt mit der genetischen Modifikation in der LTR der Viren.

Bei PERV/5° und dessen verwandten Passagen handelt es sich bei den Repeats um eine 37 bp lange Sequenz, welche kurz vor der viralen TATA-Box in der U3-Region der LTR zu finden ist ([Abbildung 3.17](#)). Die Nukletotidsequenz der PERV/5°-LTR ist dabei stark homolog zu den bekannten Sequenzen der proviralen PERV-C LTRs, welche u. a. im Genom von Mini-Schweinen verankert sind ([Abbildung 3.17](#)). Die im Genom dieser Schweine vorkommenden PERV-C Proviren enthalten allerdings in ihren LTRs vermutlich nur eine Abfolge dieser repetitiven Sequenzen (PERV-MSL, Akiyoshi et al., 1998; PERV-Tsukuba-1, Suzuka et al., 1986).

Die Repeats von PERV/293 (PERV-A/PERV-B) und dessen Passagen, sowie der Passagen der molekularen Klone von PERV-A und PERV-B, sind dagegen 18 bp und 21 bp lang. Diese Repeats lassen sich zu einem 39 bp langem Sequenzmotiv zusammenschließen, welches hohe Homologie zu den 37 bp Repeats der PERV-A/C LTRs besitzt ([Abbildung 4.3](#)). In der LTR-Sequenz von PERV-A und PERV-B Proviren in der DNA von PK-15 Zellen findet man 1-4 dieser 39 bp langen repetitiven Sequenzfolgen (Krach et al., 2001). Im Verlauf der seriellen Passagierung kommt es pro Passage zum Hinzufügen von einem bis mehreren Repeats. Die Anzahl der repetitiven Sequenzmotive in den jeweiligen LTRs scheint variabel zu sein, denn provirale DNA aus den Zellen einer Passage weisen unterschiedliche Anzahl von Repeats auf. In Passage 5 von PERV-A/C findet man maximal 5 Repeats. Die gleiche maximale Anzahl von Repeats wurde für passagierte Moleklarklone von PERV-A und PERV-B beschrieben (Scheef et al., 2001). Über diese Anzahl hinaus, scheint eine weitere Verlängerung der LTR nicht mehr möglich zu sein ([Abbildung 3.14](#)). Eventuell beruht diese Limitierung auf Interferenzen bei der Verpackung des viralen RNA-Genoms (Martiney et al., 1999). Die statistische Mehrheit der Proviren einer Passage enthält jedoch die gleiche Anzahl an Repeats ([Abbildung 3.15](#), Denner et al., 2001; Scheef et al., 2001), was vermuten läßt, daß es sich dabei um die für das Virus unter den gegebenen Bedingungen optimale Anzahl handelt.

Diese Daten ließen den Schluß zu, daß es sich bei den einzelnen Repeats um Elemente mit „Enhancer“-Funktion handeln muß, welche die Replikation von PERV beeinflussen. Datenbankanalysen ergaben eine Homologie eines Bereiches innerhalb dieser repetitiven Sequenzen zu Transkriptionsfaktorbindestellen für den Transkriptionsfaktor NF-Y ([Abbildung 4.3](#); Denner et al., 2001; Denner et al., 2002b).

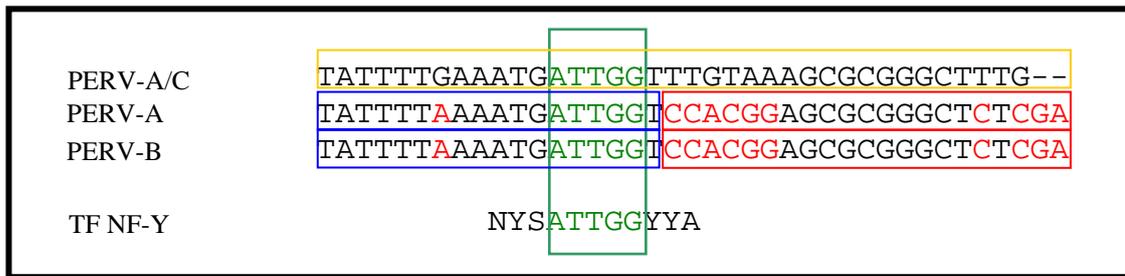


Abbildung 4.3: Sequenzvergleich der repetitiven Sequenzmotive, in der LTR von PERV-A/C, PERV-A und PERV-B. Die Repeats in PERV-A/C bestehen aus 37 bp. In PERV-A und PERV-B kommen dagegen 18 bp und 21 bp lange Repeats vor, die sich zu einem 39 bp Element zusammenfügen. Dieses 39 bp Element weist hohe Homologie zu den Repeats in PERV-A/C auf. Die Unterschiede in der Nukleotidabfolge zu der Repeat-Sequenz von PERV-A/C sind rot gekennzeichnet. Die Sequenz des grün umrahmten Bereichs weist hohe Homologie zu einer Transkriptionsfaktorbindungsstelle des TF NF-Y auf.

Obwohl viele der Transkriptionsfaktorbindestellen innerhalb der U3-Region verschiedener Gammaretroviren hoch konserviert sind (Golemis et al., 1990), ist das Vorkommen einer Transkriptionsfaktorbindungsstelle für NF-Y wie in der PERV-LTR bei viralen LTRs bislang selten. Der Transkriptionsfaktor (TF) NF-Y ist ein sehr häufig vorkommender TF, und entsprechende Bindungsstellen konnten schon in über 150 verschiedenen eukaryotischen Promotoren identifiziert werden (Bucher, 1990). Repetitiv vorkommende Bindungsstellen für NF-Y sind dagegen sehr selten und in den meisten eukaryotischen Promotoren findet man in der Regel nur eine dieser Bindungsstellen (Mantovani, 1999). Ausnahmen davon bilden die Promotoren der Genfamilien, welche im Verlauf der Antigenpräsentation über den MHC-Komplex II (Mach et al., 1996), sowie für die allgemeine Regulation des Zell-Zyklus und die Proliferation aktiviert werden (Zwicker et al., 1995). Zwar erfolgt die Bildung von NF-Y in Abhängigkeit von Zelltyp und Entwicklungsstadium der jeweiligen Zelle (Good und Chen, 1996), doch das häufige Vorkommen des TF NF-Y ermöglicht PERV somit eine „Replikations-Garantie“ in einem breiten Spektrum von Zellen. Da NF-Y vorwiegend in proliferierenden Zellen gebildet wird, und die Integration von endogener Retroviren in die zelluläre DNA nur bei proliferierenden Zellen erfolgen kann (Coffin et al., 1997), nutzt das Virus die Transkriptionsregulation sich teilender Zellen für die Expression seiner eigenen Proviren. Die im Verlauf einer viralen Infektion induzierte Aktivierung der MHC-Komplex II-Gene, sowie vieler für Zytokine kodierender Gene über NF-Y, sichern dem Virus zusätzlich seine Replikation in den infizierten Zellen. Darüber hinaus steigert der zelluläre Streß der viralen Infektion nochmals die Bildung von NF-Y (Ubeda und Habener, 2000), was im Anbetracht der mehrfach vorkommenden NF-Y Bindungsstellen in der PERV-LTR automatisch immer weiter zu einer Steigerung der PERV-Replikation führen würde.

Neben NF-Y konnten in den Repeats von PERV-A/C LTRs auch Bindungsstellen für den TF CEBPB identifiziert werden (Abbildung 3.20). Dieser ubiquitär vorkommende TF ist ein Transaktivator vieler Interleukin-Gene, welche im Rahmen einer viralen In-

fektion aktiviert werden. Die Bildung dieses TF könnte neben der Regulation durch NF-Y die Replikation von PERV in infizierten Zellen weiter steigern.

Darüber hinaus konnten Bindungsstellen für weitere TF im Bereich der gesamten LTR-Sequenz identifiziert werden (Abbildung 3.20). Jedoch wurde deren Rolle in der Regulation der Replikation von PERV bislang nicht weiter untersucht. Viele dieser TF werden Zelltyp-spezifisch oder nur während bestimmter Entwicklungsstadien der Zelle gebildet (siehe 3.1.4). Damit bieten sie dem Virus keine sichere Grundlage seiner Replikation, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, daß auch diese TF unter bestimmten Bedingungen in die Replikation von PERV regulativ eingreifen könnten.

Um den Anstieg des viralen Titers im Verlauf der Passagierung von PERV auf humanen Zellen (Abbildung 3.16) eindeutig den genetischen Modifikationen in der LTR zuzuweisen zu können, galt es eine Veränderung in der Rezeptor-bindenden Domäne des äußeren Glykoproteins SU auszuschließen. Dieses hätte dem Virus ermöglichen können, vermehrt humane Zellen zu infizieren, und damit ebenfalls zu einer gesteigerten Virusfreisetzung geführt.

Bei PERV/5° handelt es sich um die fünfte Passage eines rekombinierten Virus aus Sequenzbereichen von PERV-A und PERV-C auf humanen 293 Zellen (Denner et al., 2001). Die initiale Infektion der humanen Zellen erfolgt mit einer PERV-Mischpopulation, bestehend aus PERV-A, PERV-B und PERV-C, welche aus Mitogen-stimulierten PBMCs eines Mini-Schweins freigesetzt wurde (Wilson et al., 1998). Sequenzanalysen zeigten, daß die Rekombination in dem für den TM-Bereich kodierenden Abschnitt des *env*-Gens im Verlauf der ersten Passage von PERV (PERV/1°) auf der humane Zell-Linie 293 stattfand (Abbildung 4.4; Wilson et al., 2000).

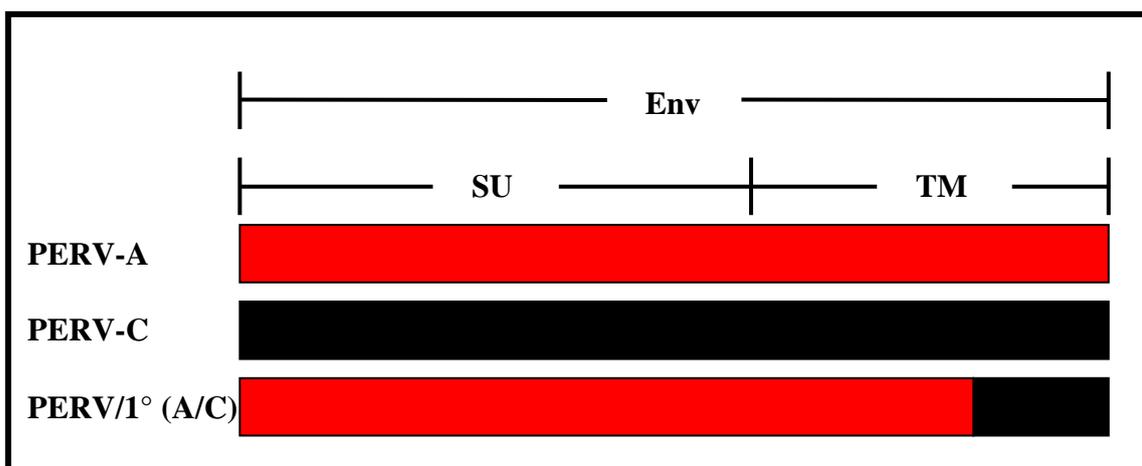


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der Rekombination von PERV-A/C. Im TM-Bereich des *env*-Gens von PERV/1° kam es zu einer Rekombination von PERV-A und PERV-C (Abbildung verändert nach Wilson et al., 2000).

Das daraus resultierende Virus enthält ein komplettes PERV-C-Genom, mit einem *env*-Gen, welches für ein Oberflächenglykoprotein (SU) von PERV-A kodiert. Dementsprechend weist diese PERV-A/C Rekombinanten auch den Wirtstropismus von PERV-A auf. Ähnliche Rekombinationen von PERV-A und PERV-C konnten auch von anderen Gruppen gezeigt werden (Niebert et al., 2002). Darüber hinaus konnten auch Rekombinationen von PERV-A und PERV-B gefunden werden (Tönjes et al., 2000).

Durch die Klonierung und Sequenzierung der SU Region von PERV/3° und PERV/5° ließ sich der PERV-A Tropismus auch für diese Passagen von PERV-A/C bestätigen (Abbildung 3.19). Weiterhin zeigte sich, daß es im Verlauf der Passagierung nicht zu einer Modifikation von SU im Bereich der Rezeptorbindungsstelle gekommen war (Abbildung 3.19). Außer einem R-G Aminosäureaustausch zeigten sich die Sequenzen der Passage 3 und der Passage 5 von PERV-A/C als 100% homolog. Der beobachtete Anstieg des Virustiters im Verlauf der seriellen Passagierung von PERV auf humanen Zellen konnte damit eindeutig der Multimerisierung von Transkriptionsfaktorbindungsstellen im Bereich der U3 Region der viralen LTR, und der damit vermehrten Bindung von Transkriptionsfaktoren an diese *cis*-Elementen zugeordnet werden (Denner et al., 2002b). Allerdings gilt dabei zu berücksichtigen, daß die beschriebenen Adaptationsprozesse von PERV an humane Zellen bislang nur in der Zell-Linie 293 gezeigt wurden. Dies gibt damit zwar erste Hinweise auf eine Adaptation des Virus an humane Zellen, doch bleibt zu prüfen, ob der beobachtete Effekt nicht ausschließlich in der für ihre Immortalisierung mit Adenovirus 5-Sequenzen transformierten Zell-Linie 293 erfolgt. Für eine abschließende Beurteilung der Daten, muß daher die Adaptation von PERV noch zusätzlich mit primären humanen Zellen und in einem adäquaten Tiermodell *in vivo* verifiziert werden.

4.2 Keine Übertragung von PERV *in vivo*

Die Infektion vieler Zellen unterschiedlichster Spezies mit PERV *in vitro* zeigte, daß das Wirtsspektrum von PERV weit gefächert ist. Jedoch beweist die Infektion von Zellen einer Spezies *in vitro* nicht die Suszeptibilität dieser Spezies *in vivo*. Für die Evaluierung der Virussicherheit bei der Xenotransplantation ist allerdings das Infektionspotential von PERV *in vivo* von fundamentaler Bedeutung. Doch bislang konnten in ersten experimentellen Xenotransplantationen mit nicht-humanen Primaten (Martin et al., 1998b; Winkler et al., 1999; Switzer et al., 2001), oder in ersten klinischen Xenotransplantationen (Paradis et al., 1999; Patience et al., 1998) keine Hinweise einer Übertragung von PERV *in vivo* gefunden werden. Dabei gilt zu bedenken, daß bei den experimentellen Xenotransplantationen mit nicht-humanen Primaten die Überlebenszeiten der porcinen Xenotransplantate, und somit auch die der Rezipienten, meist sehr kurz waren. Somit bleibt fraglich, ob innerhalb der erreichten Zeiträume von einigen Stunden bis hin zu wenigen Tagen, das zu evaluierende Risiko einer PERV-Transmission von einem für Jahre implantierten Xenotransplantat in einem humanen Rezipienten ausreichend abgeschätzt werden kann. Auch bleibt immer die Frage offen, ob die in nicht-humanen Primaten erhobenen Daten im vollen Umfang auf die Situation im Menschen übertragbar sind.

Ähnlich gestaltet sich die Aussagekraft der klinischen Xenotransplantationen. Zwar wurde hierbei die klinische Situation einer Xenotransplantation direkt im humanen Rezipienten untersucht, doch sind für die Interpretation der Ergebnisse verschiedene Aspekte zu bedenken:

1. Die Kontaktzeit der porcinen Gewebe im humanen Rezipienten war auch hier meist sehr kurz (Patience et al., 1998; Paradis et al., 1999), so daß sie mit der Verweildauer eines dauerhaft implantierten Organs nicht zu vergleichen ist.
2. Bei der Transplantation von z.B. neuronalen Zellen (Fink et al., 2000; Schumacher et al., 2000) oder Inselzellen (Heneine et al., 1998) entspricht die Zellzahl von etwa 400.000 Zellen nur einem Bruchteil der Zellmasse eines soliden Organs.
3. Bei vielen der zellulären Xenotransplantate handelte es sich um verkapseltes Zellmaterial (Elliott et al., 2000; Petersen et al., 2002), welches so vor dem Zugriff des humanen Immunsystems geschützt wurde. Diese Möglichkeit scheidet allerdings bei der Implantation von Organen aus.
4. Bei vielen der klinischen Xenotransplantationen handelte es sich um extrakorporale Perfusionssysteme (Pitkin und Mullon, 1999; Levy et al., 2000). Die Perfusion durch ein externes porcines Organ oder bioartifizielle Perfusionsreaktoren vermindern die Kontaktfläche der porcinen Zellen mit dem humanen Rezipienten um ein Vielfaches. Ein porcines Organ würde dagegen an den natürlichen Schutzbarrieren des Menschen vorbei vollständig in den Organismus eingebracht werden.

5. Die Immunsuppression der humanen Rezipienten war zum Teil gering, und entsprach den Bedingungen einer Allotransplantation. Dagegen müßt für die Durchführung einer Xenotransplantation die Immunsuppression aufgrund der stärkeren Abstoßung deutlich erhöht werden, was dem Übertragungsrisiko von PERV förderlich sein könnte.
6. Der für die Verminderung der immunologischen Abstoßungsreaktionen angestrebte Einsatz von gentechnisch veränderten Schweinen ist *in vivo* bislang kaum untersucht. Auf die Problematik der Verwendung von porcinen Xenotransplantaten von α -Gal-knock-out Schweinen (Lai et al., 2002; Dai et al., 2002), oder von Schweinen, welche humane Komplementregulatorproteine exprimieren (Schmoeckel et al., 1997; Byrne et al., 1997), wurde unter 1.1.2 und 1.2.3 bereits eingegangen. Die genetische Modifikation von Spendertieren könnte daher ebenso das Risiko einer Übertragung von PERV *in vivo* signifikant erhöhen (Weiss et al., 1998; 1999).

Vor dem Hintergrund dieser Aspekte, und der dennoch bestehenden Notwendigkeit eines Tiermodells für PERV, wurden im Verlauf dieser Arbeit verschiedene *in vivo* Studien durchgeführt. Dabei wurde aus ethischen, sowie praktischen Gründen vorrangig der Aufbau eines Kleintiermodells angestrebt. Andererseits wurde mit Hinblick auf eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die klinische Situation beim Menschen eine experimentelle Studie mit nicht-humanen Primaten durchgeführt.

Basierend auf dem Nachweis des zellulären Rezeptors für mindestens PERV-B auf Ratenzellen (Takeuchi et al., 1998), wurden Ratten als eine Spezies für die Etablierung eines Tiermodells gewählt (Specke et al., 2001a). Die Tiere wurden dabei in Gruppen unterteilt, welche entweder zellfrei oder zellassoziiert mit PERVs verschiedenen Ursprungs inokuliert wurden. Ferner wurden für die Simulation einer klinischen Xenotransplantation einige Gruppen der Tiere immunsupprimiert (Tabelle 3.5).

Nach der Inokulation wurde den Tieren regelmäßig Blut entnommen und auf die Bildung von Antikörpern gegen PERV, sowie auf die Integration von PERV-Proviren untersucht. Alle vier Wochen wurde ein Tier jeder Gruppe euthanasiert, und die DNA von Lymphknoten, Milz und Niere ebenfalls auf die Integration proviraler DNA von PERV untersucht. Innerhalb von drei Monate nach der Inokulation zeigte keines der Tiere eine Bildung von Antikörpern gegen PERV. Auch war bei keinem der Tiere eine Integration von PERV-Proviren in die DNA von Blutzellen oder Zellen verschiedener Organe nachweisbar (Abbildung 3.21; Specke et al., 2001a).

Parallel zu den Ratten-Experimenten wurden Meerschweinchen als ein weitere Spezies für die Etablierung eines Tiermodell genutzt (Tabelle 3.5; Specke et al., 2001a), da diese Spezies als suszeptibel für eine Infektion mit PERV gilt (Onions et al., persönliche

Mitteilung). Naive Meerschweinchen wurden dazu zellfrei mit PERV/PK und PERV/293 inokuliert und über drei Monate auf eine Infektion mit PERV untersucht. Bei keinem der Tiere ließ sich in regelmäßigen Serumanalysen eine Produktion von Antikörpern gegen PERV nachweisen, sowie eine Provirus-Integration in Blutzellen oder Zellen verschiedener Organe detektieren ([Abbildung 3.21](#)).

Die produktive Infektion der Nerzzell-Line Mv1Lu ([3.1.1.1](#) und [Abbildungen 3.3](#) und [3.4](#)) bedingte durch die Inkorporation von Plasmamembranproteinen die Adaptation von PERV/Mv1Lu an die Spezies Nerz. Diese Tatsache wurde in einer experimentellen Studie mit naiven Nerzen genutzt, um eine potentielle Verbreitung eines an die Empfänger-spezies adaptierten PERV *in vivo* zu untersuchen ([Tabelle 3.6](#); Specke et al., 2001c). Dieser Ansatz war von besonderem Interesse, da hierbei die Transspezies-Übertragung bereits *in vitro* erfolgt war. Darüber hinaus konnte im Verlauf von seriellen Passagierungen von PERV/Mv1Lu auf Nerz-Zellen eine ähnliche genetische Adaptation beobachtet werden ([Abbildung 3.22](#)), wie bei der seriellen Passagierung von PERV auf humanen Zellen (siehe [3.1.4](#)). Die Inokulation der Nerze mit PERV/Mv1Lu bot damit die Möglichkeit, die potentielle Ausbreitung von PERV nach seiner initialen Übertragung auf Zellen der Spezies in den Tieren zu untersuchen. Da es im Verlauf von drei Monaten nicht zu einer Bildung von Antikörpern gegen das inokulierte Virus kam, und sich keine Integration von PERV-Proviren in die DNA von Blutzellen oder Zellen verschiedener Organe detektieren ließ ([Abbildung 3.23](#)), muß davon ausgegangen werden, daß es auch bei der Verwendung des Spezies-adaptiertem PERV/Mv1Lu zu keiner Infektion der Nerze *in vivo* gekommen ist.

Es läßt sich damit abschließend festhalten, daß es unter den gewählten Versuchsbedingungen bei keiner der Studien zu einer Übertragung von PERV *in vivo* gekommen ist. Auch ließ sich bei keinem der inokulierten Tiere eine Produktion von Antikörpern gegen PERV nachweisen. Dies deutet darauf hin, daß die inokulierte Virusmenge entweder für die Aktivierung der zellulären Immunantwort zu gering war, oder es durch das natürliche Immunsystem zu einer schnellen Eliminierung von PERV gekommen ist. Dabei läßt sich allerdings nicht ausschließen, daß es bei einer Inokulation höherer Titer von PERV zu einer Transmission des Virus auf die Ratten, die Meerschweinchen oder die Nerze *in vivo* kommen könnte.

Diesen Daten steht die Infektion von SCID-Mäusen gegenüber, in welchen nach der Implantation porciner Pankreaszellen provirale Sequenzen von PERV detektiert werden konnten (Van der Laan et al., 2000; Deng et al., 2000). Die Amplifikation von PERV-Sequenzen erfolgte dabei vorwiegend in der DNA von Milz und Leber, jedoch auch in anderen Organen der Tiere. Da den SCID-Mäusen porcine Zellen implantiert wurden, ist das Auftreten von Mikrochimerismen bei diesen Studien als äußerst problematisch für

die Analyse der Daten anzusehen. Da jedoch in den Zellen der Milz und der Leber keine porcine DNA detektiert werden konnte, muß zumindest in diesen Geweben von einer Integration von PERV ausgegangen werden. Trotz dieser Tatsache bleibt die Aussagekraft der Infektion von SCID-Mäusen für die Xenotransplantation limitiert. Die Immundefizienz der SCID-Mäuse, welche auf einem Defekt in der Differenzierung von B- und T-Zellen basiert, ist nicht mit der pharmakologischen Immunsuppression einer klinischen Xenotransplantation zu vergleichen. Selbst unter stärkster Immunsuppression wird der humane Rezipient weiterhin über eine angeborene Immunität verfügen. Dieses ermöglicht ihm über die im humanen Serum präformiert vorliegenden natürlichen Antikörper (NAs) (Avrameas, 1991) das Virus zumindest ansatzweise zu eliminieren.. NAs wurden auch im Serum normaler immunkompetenter Mäuse gefunden (Herzenberg und Kantor, 1993), doch da NAs vorwiegend von CD5-positiven B-Zellen gebildet werden (Herzenberg und Kantor, 1993; Casali und Notkins, 1989), kann ihre Bildung aufgrund des oben genannten Immundefektes in SCID-Mäusen nicht erfolgen.

Trotzdem zeigen die Infektionen der SCID-Mäuse, daß eine Transspezies-Übertragung von PERV auch *in vivo* erfolgen könnte. Daher ist das Risiko einer Transmission von PERV im Rahmen einer Xenotransplantation, insbesondere bei Applikation hoher Dosen potenter Immunsuppressiva, oder der Verwendung von Organen gentechnisch veränderter Schweine, sorgfältig gegenüber dem Nutzen für Rezipient und Gesellschaft abzuwägen (siehe unten).

Um ein Tiermodell zu etablieren, welches so nahe wie möglich an der Situation des humanen Xenotransplantat-Rezipienten orientiert ist, wurde in dieser Arbeit weiterhin eine *in vivo* Studie mit nicht-humanen Primaten durchgeführt (siehe 3.2.2; Specke et al., 2001d; 2002a-c). Hierbei wurde eine Situation simuliert, welche ein „worst case scenario“ mit starker Virusfreisetzung nach einer Xenotransplantation widerspiegelt. Dafür wurden drei Spezies nicht-humaner Primaten gewählt, für die *in vitro* gezeigt werden konnte, daß primäre Zellen der Tiere die Replikation von PERV unterstützen (siehe 3.1.2; Specke et al., 2002b;). Die Tiere wurden dabei analog zu einer klinischen Xenotransplantation pharmakologisch immunsupprimiert (siehe 2.5.5.3), und mehrfach mit hohen Titern von PERV inokuliert (siehe 2.5.5.3 und [Abbildung 2.5](#)). Bis zu einem Zeitraum von einem Jahr wurden die Tiere auf Antikörperbildung gegen PERV und die Integration von Proviren untersucht. In sequentiellen Western Blot-Analysen konnte während dieser Zeit bei keinem der Tiere eine Produktion von Antikörpern gegen PERV detektiert werden ([Abbildung 3.24A](#)). Diese Daten konnten weiterhin in ELISAs mit den rekombinanten Proteinen p27Gag und p15Env von PERV verifiziert werden. Auch in diesen Tests gelang kein Nachweis von Antikörpern gegen PERV im Serum der Tiere, was darauf hindeutet, daß es zu keiner persistenten Infektion der Affen gekommen war. Diese Daten wurden weiterhin durch die Tatsache gestützt, daß sich in dem Serum

der Tiere weder RT-Aktivität mittels eines Gammaretroviren-spezifischen RT-Assays, noch virale RNA mittels RT-PCR detektieren ließ.

Das Ausbleiben einer Antikörperreaktion gegen das inokulierte Virus könnte auf die Wirkung der applizierten Immunsuppressiva zurückzuführen sein. Doch zeigten die Tiere eine Immunreaktion gegen fötales Kälberserum, welches als Bestandteil des Kulturmediums der PERV-produzierenden Zellen mit dem Virus-haltigen Überstand inokuliert wurde ([Abbildung 3.26](#)). Auch erfolgte im Verlauf der Studie bei allen Tieren ein Aussetzen der Immunsuppression von mindestens 60 Tagen ([Abbildung 2.5](#)), was im Fall einer PERV-Infektion mit nachfolgender Replikation des Virus einen ausreichenden Zeitraum darstellt, um detektierbare Antikörper gegen das Virus zu bilden.

Um auszuschließen, daß es zu einer Integration von PERV Proviren in die zelluläre DNA der Tiere gekommen ist, wurde das Blut der Tiere parallel zu den immunologischen Untersuchungen mittels nested-PCR auf provirale DNA von PERV untersucht. Diese mit spezifischen Primern für die Sequenzabschnitte von *gag*, *pol* und *env* von PERV durchgeführten PCR-Analysen zeigten, daß keine Integration von PERV proviraler DNA erfolgt war ([Abbildung 3.27](#)). Diese Daten stehen in deutlichem Widerspruch zu den vorhergehenden *in vitro* Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, daß PBMCs der selben Tiere für eine Infektion mit PERV aus dem selben Virusstock suszeptibel sind (siehe [3.1.2](#); Specke et al., 2002b).

Da weiterhin die Möglichkeit bestand, daß sich das inokulierte Virus in die DNA von Zellen anderer Organe integriert hat, wurde nach der Euthanasie der Tiere DNA aus den Lymphknoten, der Leber, der Lunge, der Milz, den Nieren und dem Herz isoliert, und auf PERV Proviren untersucht. In der DNA der jeweiligen Organe der Rhesus-Affen 178 und 179, sowie der beiden Paviane war eine Amplifikation von PERV proviraler DNA nicht möglich ([Abbildung 3.28](#)).

Bei dem Rhesus-Affen 180 war es dagegen zu der Bildung von Tumoren an den Applikationsstellen des Virus gekommen ([Abbildung 3.30](#)). Über spezifische PCR-Methoden konnte jedoch nachgewiesen werden, daß die entstandenen Tumore nicht durch PERV induziert wurden, sondern auf einem onkogenen Potential der inokulierten 293 Zellen beruhten. Das onkogene Potential der 293 Zellen konnte bereits in früheren Studien bei der Inokulation von Nackt-Mäusen beobachtet werden (Busutil et al., 1986). Vermutlich basiert die Onkogenität der 293 Zellen auf den für die Immortalisierung der Zelllinie eingebrachten E1-Sequenzen des Adenovirus 5 (Graham und Smiley, 1977; Louis et al., 1997), da für dieses bereits ein pathogenes Potential *in vivo* gezeigt werden konnte (Ackrill und Blair, 1988). Diese Sequenzbereiche des Adenovirus 5 ermöglichten über die spezifische Amplifikation des E1A-Gens eine Identifikation der Tumorzellen als proliferierende 293 Zellen (siehe [Abbildung 3.32](#)), so daß auch für diesen Affen eine Infektion mit PERV *in vivo* ausgeschlossen werden konnte.

Zusammenfassend ließ sich daher sagen, daß bei keinem der nicht-humanen Primaten im Verlauf der durchgeführten Langzeitstudie eine Übertragung von PERV *in vivo* nachweisbar war, obwohl

1. Zellen der selben Tiere *in vitro* mit PERV produktiv infizierbar waren,
2. die Tiere täglich eine hohe Immunsuppression durch Dreifachkombination von Cs-A, RAD und Prednisolon erhielten,
3. sehr hohe Titer von PERV (1×10^9 TCID₅₀) mehrfach (3X) und über verschiedene Injektionsarten (ip, im, iv, sc) appliziert wurden,
4. neben zellfreiem Virus auch zellassoziertes Virus inokuliert wurde, wobei der Zell-Zell-Kontakt vielen Viren eine sehr effiziente Möglichkeit der Infektion bietet.

Diese Daten lassen vermuten, daß es trotz der applizierten Immunsuppression zu einer effizienten Eliminierung des Virus durch das natürliche Immunsystem der Tiere gekommen sein muß. Hierbei könnten natürliche Antikörper (NAs) eine elementare Rolle gespielt haben. Die meisten NAs gehören zu dem Isotyp der IgM-Antikörper (Ochsenbein und Zinkernagel, 2000), wobei bereits auch NAs der Isotypen IgG und IgA beschrieben wurden (Avrameas, 1991). Für NAs konnte gezeigt werden, daß sie zu einer sofortigen und hoch effizienten Neutralisierung von Viren aus dem Blutkreislauf beitragen (Gobet et al., 1988; Ochsenbein et al., 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Viren über eine NA-induzierte Aktivierung des Komplementsystems eliminiert werden können (Carroll, 1998). Dabei bindet C1q an das Retrovirus, induziert die Spaltung von C3 und C4 Molekülen, deren Spaltungsprodukte letztlich die direkte Lyse der Viren einleiten (Lachmann und Davies, 1997). Ähnliche Daten konnten bereits für die Eliminierung des simianen Immundefizienz Virus (SIV) gezeigt werden. Nach der Inokulation hoher Dosen von SIV in Rhesus-Affen wurde das Virus innerhalb kürzester Zeit aus dem Blutkreislauf eliminiert. Die Halbwertszeit des Virus im Plasma der Tiere wurde dabei mit 3,3 Minuten ermittelt (Zhang et al., 1999). Die meisten Retroviren sind zwar in der Lage, sehr schnell (ca. 5 Minuten) über die Ausbildung von Mikrospiques an die Zielzelle zu adhären (Gilbert et al., 1990), doch benötigen sie für die Fusion mit der Zelle von 15 Minuten bis zu mehreren Stunden (Coffin et al., 1997). Innerhalb dieses Zeitraums bleiben die Viren für das Immunsystem angreifbar und können bis zur vollständig erfolgten Endozytose von diesem eliminiert werden (Srivastava et al., 1991). Neben den NAs und den Proteinen des Komplementsystems befinden sich im humanen Serum noch eine Reihe weiterer natürlich vorkommender „antiviral“ wirkender Substanzen (Baron et al., 2000). Die meisten dieser Inhibitoren viraler Infektionen sind bislang jedoch weitgehend uncharakterisiert. Dabei scheinen einige der Inhibitoren nur gegen Infektionen bestimmter Gruppen von Viren aktiv zu sein. So konnten spezifische Infektions-Inhibitoren für Myxoviren (Kriznova und Rathova, 1969), für Togaviren

(Shortridge und Ho, 1974) und für Retroviren (Welsh et al., 1976) identifiziert werden. Allerdings scheinen mindestens vier Inhibitoren im humanen Serum zu existieren, welche gegen ein breites Spektrum von viralen Infektionen Aktivität zeigen (Baron et al., 2000). Dabei kommen Interferon und der Tumor Necrosis Factor (TNF) als Inhibitoren vor, deren Bildung z.B. durch eine virale Infektion induziert wird (Czarniecki, 1993; Wallace et al., 1994). Das Glykoprotein UTI β und das high-density Lipoprotein (HDL) kommen dagegen konstitutiv im humanen Serum vor. UTI β verhindert vermutlich die Anlagerung des Virus („Attachment“) an die Zelle, wohingegen HDL die Fusion mit der zellulären Membran verhindert (Singh et al., 1999). Diese Effekte ermöglichen dem natürlichen und adaptiven Immunsystem über einen längeren Zeitraum Zugriff auf die freien Virionen, was in einer effizienteren Eliminierung der Viren, und damit zu einer Verminderung der Infektionsrate führt.

Das Vorkommen von natürlichen Antikörpern, sowie von Proteinen des Komplementsystems oder antiviral wirkenden Inhibitoren könnte daher die Ursache sein, daß für viele virale Infektionen *in vivo* vielfach höhere Virus-Titer nötig sind, als für die Infektion von Zellen der gleichen Spezies *in vitro* (Baron et al., 2000). Da die im Verlauf dieser Arbeit etablierten Tiermodell eine Übertragung von PERV *in vivo* zeigten (siehe 3.2.1 und 3.2.2), obwohl Zellen der selben Spezies *in vitro* infizierbar waren (siehe 3.1.1 und 3.1.2), kann daraus der Schluß gezogen werden, daß die inokulierte Virusmenge nicht ausreichend war, um eine Infektion *in vivo* zu induzieren. In diesem Zusammenhang ist zu berücksichtigen, daß die Freisetzung von PERV aus porcinem Gewebe vermutlich sehr gering ist. In *in vitro*-Studien konnte gezeigt werden, daß die Freisetzung von PERV aus primären porcinen Zellen und Zell-Linien im Vergleich zu der Freisetzung aus Zellen anderer Spezies nur schwach erfolgt (Specke et al., 2001a). Damit läßt sich für die Fragestellung dieser Arbeit nach der Virussicherheit bei der Xenotransplantation vorläufig sagen, daß sich aus dieser und anderen Arbeiten zum jetzigen Zeitpunkt keine Hinweise einer Transspezies-Übertragung von PERV *in vivo* ergeben haben. Doch sind für eine endgültige Risikoabschätzung bei der Xenotransplantation noch verschiedene weitere Implikationen zu berücksichtigen.

4.3. Implikationen für die Xenotransplantation

Der immer weiter steigende Bedarf an Alлотransplantaten zwingt die heutige Medizin zu der Suche nach einer innovativen Lösung, um den bereits bestehenden Mangel an verfügbaren Transplantaten zu decken. Dabei bietet die Xenotransplantation gegenüber den anderen diskutierten Ansätzen, wie z.B. dem „Tissue Engineering“ oder der Stammzelltherapie, eine schnelle Möglichkeit, diesen Mangel zumindest kurzzeitig zu überbrücken. Allerdings beinhaltet die Xenotransplantation die Gefahr der Übertragung von porcinen Pathogenen auf den humanen Rezipienten (Onions und Witt, 2000). Die Infek-

tion von humanen Zellen mit PERV *in vitro* (Patience et al., 1997) und die Übertragung von PERV auf SCID-Mäuse *in vivo* (Deng et al., 2000; Van der Laan et al., 2000) zeigen, daß eine Übertragung von PERV im Rahmen einer Xenotransplantation potentiell erfolgen könnte. Doch zeigte keine der bisher durchgeführten experimentellen und klinischen Xenotransplantationen eine Transmission von PERV auf den jeweiligen Rezipienten (Martin et al., 1998; Winkler et al., 1999; Switzer et al., 2001; Patience et al., 1998; Paradis et al., 1999; Pitkin und Mullon, 1999; Levy et al., 2000; Herring et al., 2001). Auch führten die in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo* Studien zu keine Übertragung von PERV auf Kleintiere oder nicht-humane Primaten (siehe 3.1; Specke et al., 2001a,c, 2002a-c).

Doch bleiben die Folgen der bereits erwähnten Aspekte der Verwendung von gentechnisch veränderten Schweinen als Organspender (Abbildung 4.5; Schmoeckel et al., 1997; Byrne et al., 1997; Niemann, 2001; Takefman et al., 2002; Lai et al., 2002; Dai et al., 2002), des Einsatzes von neuen, auf die Gegebenheiten der Xenotransplantation ausgerichteten Immunsuppressiva, die Möglichkeiten von Rekombinationen von PERVs untereinander (Wilson et al., 2000; Tönjes et al., 2000; Niebert et al., 2002), sowie die Rekombination mit humanen Retroviren, und die Adaption von PERV an humane Zellen *in vivo* noch nicht erforscht. Diese Möglichkeiten sind daher vor Beginn der klinischen Realität der Xenotransplantation gründlich zu analysieren, und die eventuellen Folgen für den Rezipienten und die Gesellschaft sorgfältig gegeneinander abzuwägen (Bach et al., 1998; Persson et al., 2001).

Demgegenüber stehen einige Ansätze, die eine Verminderung des mikrobiologischen Risikos, und insbesondere des Risikos einer Infektion mit PERV, zur Intention haben.

Als ein erstes Ziel ist dabei die Eliminierung der PERV Proviren aus dem porcinen Genom zu nennen. Dies scheint zur Zeit aber insbesondere aus technischen Gründen unmöglich, da mindestens 50 Proviren an verschiedenen Loci des porcinen Genoms integriert sind (Akiyoshi et al., 1998; Patience et al., 2001). Selbst bei der genetischen Eliminierung der bislang bekannten vollständigen Proviren von humanotropen PERVs, bleibt das Risiko der Rekombination von defekten Proviren zu neuen, infektiösen Viren. Zwar scheinen alle bisher bekannten Schweinerassen PERV zu exprimieren (Jin et al., 2000; Ericsson et al., 2001), doch konnten in diesem Zusammenhang bereits Schweinerassen identifiziert werden, welche vergleichsweise weniger PERV exprimieren, so daß durch Züchtung durchaus Rassen gewonnen werden könnten, welche eine geringere PERV-Expression zeigen (Dorey, 2000; Wilson, 2001; Tacke et al., 2002).

Aber auch bei der Verwendung von Xenotransplantaten solcher oder anderer Schweinerassen ist die Überprüfung des Rezipienten auf eine potentielle Infektion mit PERV trotzdem unerlässlich. Daher wurden in letzter Zeit eine Vielzahl von sensitiven Detektionsmethoden etabliert, um im Vorfeld das Spendertier, sowie im Fall einer klinischen Anwendung den Patienten adäquat untersuchen zu können (Matthews et al., 1999; Gal-

braith et al., 2000; Tacke et al., 2001; Blusch et al., 2000b; Stephan et al., 2001). Würde es dabei dennoch zu einer Übertragung von PERV kommen, konnten bereits verschiedene Ansätze für eine antivirale Sofortmaßnahme und eventuell mögliche Therapie der PERV Infektion entwickelt werden (Powell et al., 2000; Qari et al., 2001; Stephan et al., 2001; Leventhal et al., 2001).

Trotz dieser Aspekte bleibt die Xenotransplantation weiterhin mit dem Risiko einer Übertragung von PERV mit dem porcinen Xenotransplantat auf den humanen Rezipienten behaftet. Dabei ist nicht nur das eventuell tumorigene Potential von PERV zu berücksichtigen, sondern auch seine potentiell immunsuppressiven Eigenschaften (Denner et al., 1998). Die Erfahrungen mit anderen tierischen Viren, wie z.B. SIV/HIV, welche Epidemie-artig die menschliche Spezies infiziert haben, lassen im Fall der Xenotransplantation begründete Vorsicht walten. Obwohl aufgrund aller bisherigen Daten, inklusive der Ergebnisse dieser Arbeit, das Risiko einer Infektion mit PERV als niedrig angesehen werden kann, muß bis auf weiteres, insbesondere mit Hinblick auf das Risiko für die Gesellschaft, die potentielle Gefahr für diese und den einzelnen Rezipienten individuell abgewogen werden.



Abbildung 4.5: Die gentechnische Veränderung von Schweinen soll die immunologische Abstoßung von Xenotransplantaten vermindern. Dies könnte dagegen das Risiko einer Übertragung von PERV erhöhen. Werbung der Firma Harlan für den Vertrieb der von Imutran Ltd. gentechnisch veränderten Schweine. Diese Tiere exprimieren zur Verminderung der Komplementaktivierung den humanen Komplementregulator hDAF auf der Oberfläche ihrer Zellen (A). Den u. a. von der Firma PPT klonierten Schweinen wurde eines der kodierenden Gene für die α 1,3-Galaktosyltransferase gentechnisch entfernt. Diese Manipulation könnte damit die hyperakute Abstoßung von xenogenen Transplantaten deutlich vermindern (Titelblatt von Nature Biotech., 20; 2002) (B).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Mangel an verfügbaren Alлотransplantaten und deren notwendigen Bedarf für die Klinik, resultiert in der Entwicklung neuer Ansätze für die Therapie der betroffenen Patienten. Die Transplantation von tierischen Zellen, Geweben und Organen auf den Menschen, die sogenannte Xenotransplantation, wird dabei als eine vielversprechende Möglichkeit angesehen. Aus vielfachen Gründen werden zur Zeit Schweine als potentielle Spender von Xenotransplantaten favorisiert. Jedoch ist mit der Verwendung porciner Xenotransplantate das Risiko einer Übertragung von Mikroorganismen auf den humanen Rezipienten verbunden. Dabei wird vermutlich das größte Risiko von den porcinen endogenen Retroviren (PERVs) ausgehen, welche mit über 50 Proviren an zahlreichen Loci im porcinen Genom integriert sind. Im Gegensatz zu den anderen bekannten Mikroorganismen des Schweins gelingt es momentan noch nicht, die PERVs aus dem Schwein zu eliminieren.

PERVs gehören in die Gruppe der Gammaretroviren und sind nahe verwandt mit den Leukämieviren der Maus (MuLV) und der Katze (FeLV), welche neben der Verursachung von Leukämien auch Tumore und Immundefizienzen hervorrufen. Für mindestens zwei Subtypen der PERVs konnte gezeigt werden, daß sie humane Zellen *in vitro* infizieren. Die Transplantation porziner Organe auf den Menschen beinhaltet daher das Risiko einer Übertragung dieser Viren.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit einerseits das Spektrum infizierbarer humaner Zellen untersucht und näher charakterisiert, andererseits Zellen verschiedener Spezies mit Hinblick auf die Etablierung eines Tiermodells auf ihre Suszeptibilität gegenüber einer Infektion mit PERVs getestet.

Dabei konnte eine Vielzahl von primären humanen Zellen und Zell-Linien unterschiedener Gewebe produktiv mit PERVs infiziert werden, was darauf hindeutet, daß es im humanen Organismus ein weites Spektrum PERV-suszeptibler Zellen gibt.

In diesem Zusammenhang konnte erstmals gezeigt werden, daß sich PERVs an humane Zellen adaptieren. Die serieller Passagierung von PERVs auf humanen 293 Zellen resultierte dabei in einer gesteigerten Replikation der Viren, welche auf genetische Modifikationen in der U3-Region der LTRs zurückgeführt werden konnten. Diese Modifikationen beruhten auf einer Multimerisierung von repetitiven Sequenzen, welche Motive einer Transkriptionsfaktorbindestelle des Transkriptionsfaktors NF-Y enthalten. Dieser ubiquitär vorkommende Transkriptionsfaktor scheint wesentlich dazu beizutragen, daß sich die Viren in den unterschiedlichsten humanen Geweben effizient vermehren können.

Für die Evaluierung des Risikos einer Übertragung von PERVs im Rahmen einer Xenotransplantation ist das Infektionspotential von PERVs *in vivo* von besonderem Interesse. Für die Untersuchung dieses Transmissionsrisikos *in vivo* wurden verschiedene Kleintiermodelle etabliert, indem naive Ratten, Cyclosporin-A (Cs-A) und Cobra Venom Faktor (CVF) immunsupprimierte Ratten, Meerschweinchen und Nerze mit PERVs inokuliert wurden. Bei keinem der Tiere konnte drei Monate nach der Virus-Applikation eine Antikörperproduktion gegen PERVs, sowie eine Integration proviraler DNA in das Genom verschiedener Gewebezellen beobachtet werden.

Des Weiteren wurde ein Tiermodell mit nicht-humanen Primaten etabliert, in welchem ein „worst case scenario“ mit starker Virusfreisetzung nach einer Xenotransplantation simuliert wurde. Um die Situation einer klinischen Xenotransplantation widerzuspiegeln, wurden die nicht-humane Primaten täglich pharmakologisch mit einer Dreifachkombination aus Cs-A, dem Rapamycin-Derivat RAD und Prednisilon immunsupprimiert. Den Tieren wurden hohe Titer an zellfreiem Virus inokuliert, wobei einige Tiere zusätzlich zellassoziertes Virus in Form von PERV-produzierenden Zellen erhielten. Bei keinem der Tiere ließen sich während des Zeitraumes von einem Jahr freie Virionen oder eine Antikörperbildung gegen PERVs im Serum nachweisen, sowie eine Integration von PERV proviraler DNA in Blutzellen oder Zellen anderer Gewebe detektieren. Die Daten dieser *in vivo* Studie stehen damit den Ergebnissen von vorausgegangenen *in vitro* Untersuchungen dieser Arbeit gegenüber, in welchen erstmals die produktive Infektion von primären Zellen der nicht-humaner Primaten gezeigt werden konnte. Da es zu keiner Infektion der Tiere *in vivo* gekommen ist, obwohl Zellen der selben Tiere für PERV *in vitro* suszeptibel sind, obwohl eine starke Immunsuppression appliziert wurde und obwohl hohe Titer von PERV inokuliert wurden, bleibt zu vermuten, daß das natürliche Immunsystem der Tiere ausgereicht haben muß, das inokulierte Virus effizient zu eliminieren. Für eine abschließende Einschätzung des Risikos einer Transmission von PERV im Rahmen einer Xenotransplantation, und die daraus eventuell resultierenden Folgen für den Xenotransplantatempfänger und die Gesellschaft, sind daher intensive weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet notwendig, um vor der klinischen Realisierung der Xenotransplantation eine ausreichende Virussicherheit der porcinen Xenotransplantate gewährleisten zu können.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- ◆ **Ackrill AM, Blair GE (1988).** Expression of hamster MHC class I antigens in transformed cells and tumour induced by human adenoviruses. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **24**:1745-1750.
- ◆ **Akiyoshi DE, Denaro M, Zhu H, Greenstein JL, Banerjee P, Fishman JA (1998).** Identification of full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine. *J. Gen. Virol.*, **72**:4503-4507.
- ◆ **Allan JS (1998).** The risk of using baboons as transplant donors. *Ann NY Acad. Sci.*, **862**:87-99.
- ◆ **Allan JS, Broussard SR, Michaels MG, Starzel TE, Leighton KL, Withehead EM, Comuzzi AG, Lanford RE, Leland MM, Switzer WM, Heneine W (1998).** Amplification of simian retroviral sequences from human recipients of baboon liver transplants. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **14**:821-824.
- ◆ **Amadori A, Faulkner-Valle GP, De Rossi A, Zanovello P, Collavo D, Chieco-Bianchi L (1988).** HIV-mediated immunosuppression: In vitro inhibition of T-lymphocyte proliferation response by ultraviolet-inactivated virus. *Cell Immunol. Immunopathol.*, **46**:37-54.
- ◆ **Amemiya K, Traub R, Durham L, Major EO (1989).** Interaction of a nuclear-1-like protein with the regulatory region of the human polyomavirus JC virus. *J. Biol. Chem.*, **264**:7025-7032.
- ◆ **Andersen KB, Nexø BA (1983).** Entry of murine retrovirus into mouse fibroblasts. *Virology*, **125**:85-98.
- ◆ **Anderson LJ, Jarrett WFH, Jarrett O, Laird HM (1971).** Feline leukemia-virus infection of kittens: mortality associated with atrophy of the thymus and lymphoid depletion. *J. Natl. Cancer Inst.*, **47**:807-817.
- ◆ **Anderson JB, Wood HG, Allaire PE, Bearnson G, Khanwilkar P (2000).** Computational flow study of the continuous flow ventricular assist device, prototype number 3 blood pump. *Artif. Organs*, **24**:377-385.
- ◆ **Armstrong JA, Porterfield JS, De Madrid AT (1971).** C-type virus particles in pig kidney cell lines. *J. Virol.*, **10**:195-198.
- ◆ **Artrip JH, Minanov OP, Kwiatkowski PA, Michler RE (1997).** Cardiac xenotransplantation. *Curr. Opin. Cardiol.*, **12**:172-178.
- ◆ **Athas GB, Lobelle-Rich P, Levy LS. (1995).** Function of a unique sequence motif in the long terminal repeat of feline leukemia virus isolated from an unusual set of naturally occurring tumor. *J. Virol.*, **69**: 3324-3332.
- ◆ **Auchincloss H, Sachs DH (1998).** Xenogenic transplantation. *Annu. Rev. Immunol.*, **16**:433-470.
- ◆ **Avrameas S (1991).** Natural autoantibodies: from „horror autotoxicus“ to „gnothi seauton“. *Immunol. Today*, **12**:154-159.
- ◆ **Bach FH, Fishman JA, Daniels N, Proimos J, Anderson B, Carpenter CB, Forrow L, Robson SC, Fineberg HV (1998).** Uncertainty in xenotransplantation: individual benefit versus collective risk. *Nat. Med.*, **4**:141-144.
- ◆ **Baily LL, Nehlsen-Cannarella S, Conception W, et al. (1985).** Baboon to human cardiac xenotransplantation in a neonate. *JAMA*, **254**:3385.
- ◆ **Baltimore D (1970).** Viral RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature*, **226**:1209-1211.

- ◆ **Barnard CN, Wolpowitz A, Losman JG (1977).** Heterotopic cardiac transplantation with a xenograft for assistance of the left heart in cardiogenic shock after cordiopulmonary bypass. *S. Afr. Med. J.*, **52**:1035.
- ◆ **Baron S, Singh I, Chopra A, Coppenhaver D, Pan J (2000).** Innate antiviral defences in body fluids and tissues. *Antivir. Res.*, **48**:71-89.
- ◆ **Battini JL, Danos O, Heard JM (1992).** Receptor choice determinants in the envelope glycoprotein of amphotropic xenotropic and polytropic murine leukemia virus. *J. Virol.*, **66**:1468-1475.
- ◆ **Battini JL, Heard JM, Danos O (1995).** Receptor binding domain of murine leukemia virus envelope glycoprotein. *J. Virol.*, **69**:713-719.
- ◆ **Becker J, Craig EA (1994).** Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur. J. Biochem.*, **219**:11-23
- ◆ **Beckmann JP, Brem G, Eigler FW, Günzburg W, Hammer C, Müller-Ruchholtz W, Neumann-Held EM, Schreiber HL (2000).** Xenotransplantation von Zellen, Geweben oder Organen. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
- ◆ **Ben-David Y, Lavigneur A, Cheong GY, Bernstein A (1990).** Insertional inactivation of the p53 gene during Friend leukemia: A new strategy for identifying tumor suppressor genes. *New Biol.*, **2**:1015-1023.
- ◆ **Bendinelli M, Matteucci D, Friedman H (1985).** Retrovirus induced acquired immunodeficiencies. *Adv. Cancer Res.*, **45**:125-181.
- ◆ **Beneviste RE, Lieber MM, Todaro GJ (1974).** A distinct class of inducible murine type C viruses which replicate in the rabbit SIRC cell line. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **71**:602-606.
- ◆ **Ben-Levy R, Faktor O, Berger I, Shaul Y (1989).** Cellular factors that interact with the hepatitis B virus enhancer. *Mol. Cell Biol.*, **9**:1804-1809.
- ◆ **Bernhard W (1958).** Electron microscopy of tumor cells and tumor viruses: A review. *Cancer Res.*, **18**:491-509.
- ◆ **Blusch JH, Patience C, Takeuchi Y, Templin C, Roos C, Von der Helm K, Steinhoff G, Martin U (2000a).** Infection of nonhuman primate cells by pig endogenous retrovirus. *J. Virol.*, **74**:7687-7690.
- ◆ **Blusch JH, Roos C, Nitschko H (2000b).** A polymerase chain reaction-based protocol for the detection of transmission of pig endogenous retroviruses in pig to human xenotransplantation. *Transplantation*, **69**:2167-2172.
- ◆ **Bolander FF, Jr. (1996).** Requirements for mouse mammary tumour virus internalization in mouse mammary epithelial cells. *J. Gen. Virol.*, **77**:793-796.
- ◆ **Bontrop RE, Kenter M, Otting N, Jonker M (1993).** Major histocompatibility complex class II polymorphisms in humans and chimpanzees. *J. Med. Primatol.*, **1**:50-56.
- ◆ **Bork P, Sudol M (1994).** The WW domain: A signalling site in dystrophin? *Trends Biochem. Sci.*, **19**:531-533.
- ◆ **Bouillant AMP, Greig AS, Lieber MM, Todaro GJ (1975).** Type C virus production by a continuous line of pig oviduct cells (PFT). *J. Gen. Virol.*, **27**:173-180.
- ◆ **Breese SS, Jr. (1970).** Virus-like particles occurring in cultures of stable pig kidney cells lines. *Arc. d. Ges. Virusf.*, **30**:401-404.
- ◆ **Brown D, Blais WB, Robinson H (1988).** Long terminal repeat sequences influence the pathogenic potential of recombinants between Rous-associated virus types 0 and 1. *J. Virol.*, **62**:3431-3437.
- ◆ **Brown PO, Bowerman B, Varmus HE, Bishop JM (1987).** Correct integration of retroviral DNA in vitro. *Cell*, **49**:347-356.

- ◆ **Bucher P (1990).** Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promotor elements derived from 502 unrelated promotor sequences. *J. Mol. Biol.*, **212**:563-578.
- ◆ **Bushman FD, Craigie R (1991).** Activities of human immunodeficiency virus (HIV) integration protein in vitro: Specific cleavage and integration of HIV DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**:1339-1343.
- ◆ **Busuttil A, O`Conor GT, Foster ME, Gurtsevitch V, Morten JE, Steel CM (1986).** The gross pathology and histological features of tumours produced by inoculation of human cell lines into immunodeprived mice. *J. Pathol.*, **148**:293-300.
- ◆ **Byrne GW, McCurry KR, Martin MJ, McClellan SM, Platt JL, Logan JS (1997).** Transgenic pigs expressing human CD59 and decay-accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement-mediated damage. *Transplantation*, **63**:149-155.
- ◆ **Campbell S, Vogt VM (1995).** Self assembly in vitro of purified CA-NC proteins from Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus type I. *J. Virol.*, **69**:6487-6497.
- ◆ **Carrel A (2001).** The transplantation of organs: a preliminary communication. 1905 [classical article]. *Yale J. Biol. Med.*, **74**:239-241.
- ◆ **Carroll MC (1998).** The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, **16**:545-568.
- ◆ **Casali P, Notkins AL (1989).** CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. *Immunol. Today*, **10**:364-368.
- ◆ **Chen YH, Ebenbichler C, Vornhagen R, Schulz T, Steindl F, Böck G, Katinger H, Dierich MP (1992).** HIV-1 gp41 contains two sites for interaction with several proteins on the helper T-lymphoid cell line, H9. *AIDS*, **6**:533-539.
- ◆ **Cianciolo GJ, Copeland TD, Oroszlan S, Snyderman R (1985).** Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope proteins. *Science*, **230**:453-455.
- ◆ **Clemenceau B, Lalain S, Martignat L, Sai P (1999).** Porcine endogenous retroviral mRNAs in pancreas and a panel of tissues from specific pathogen-free pigs. *Diabetes and Metabolism*, **25**:518-525.
- ◆ **Coffin JM, Billeter MA (1976).** A physical map of the Rous sarcoma virus genome. *J. Mol. Biol.*, **100**:293-318.
- ◆ **Coffin JM, Hughes S, Varmus H (1997).** Retroviruses; Cold Spring Harbour Laboratory-Press
- ◆ **Cook GC (1996).** The smallpox saga and the origin(s) of vaccination. *J. R. Soc. Health*, **116**:253-255.
- ◆ **Cooley DA, Heneman GL, Bloodwell RD et al. (1968).** Human heart transplantation, *Am. J. Cardiol.*, **22**:804-810.
- ◆ **Cooper DKC (1998).** Xenoantigens and xenoantibodies. *Xenotransplantation*, **5**:6-17.
- ◆ **Cotter SM, Hardy WD Jr., Essex M (1975).** Association of feline leukemia virus with lymphosarcoma and other disorders in the cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **166**:449-454.
- ◆ **Cowen P, Shinkel TA, Aminian A, Romanelle M, Wigley PL, Lonie AJ, Nottle MB, Pearse MJ, d`Apace AJF (1998).** High-level co-expression of complement regulators on vascular endothelium in transgenic mice: CD55 and CD59 provide greater protection from human complement-mediated injury than CD59 alone. *Xenotransplantation*, **5**:184-190.
- ◆ **Cozzi E, Langford GA, Pino-Chavez G, Wright L, Levy A, Miller N, Davis HFF, Chatterjee M, Lancaster R, Tolan MJ, White DJG (1996).** Longitudinal analysis of the expression of human decay accelerating factor (hDAF) on lymphocytes in the plasma and in the skin biopsies of transgenic pigs. *Xenotransplantation*, **3**:128-133.

- ◆ **Craigie R, Fujiwara T, Bushman F (1990).** The IN protein of Moloney murine leukemia virus precesses the viral DNA ends and accomplishes their integration in vitro. *Cell*, **62**:829-837.
- ◆ **Craven RC, Leure-duPree AE, Erdie CR, Wilson CB, Wills JW (1993).** Necessity of the spacer peptide between CA and NC in the Rous sarcoma virus Gag protein. *J. Virol.*, **67**:6246-6252.
- ◆ **Czarniecki CW (1993).** The role of tumor necrosis factor in viral disease. *Antiviral Res.*, **22**:223-258.
- ◆ **Czauderna F, Fischer N, Boller K, Kurth R, Tönjes RR (2000).** Establishment and characterization of molecular clones of porcine endogenous retroviruses replicating on human cells. *J. Virol.*, **74**:4028-4038.
- ◆ **Dai Y, vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, Monahan JA, Jobst PM, McCreath KJ, Lamborn AE, Cowell-Lucero JL, Wells KD, Colman A, Polejaeva IA, Ayares DL (2002).** Targeted disruption of the α 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat. Biotech.*, **20**:251-255.
- ◆ **Dalton AJ (1975).** Microvesicles and vesicles of multivesicular bodies versus „virus like“particles. *J. Natl. Cancer Inst.*, **54**:1137-1148.
- ◆ **Daniel R, Katz RA, Skalka AM (1999).** A role for DNA-PK in retroviral DNA integration. *Science*, **284**:644-647.
- ◆ **Davis NL, Rueckert RR (1972).** Properties of a ribonucleo-protein particle isolated from Nonidet P-40-treated Rous sarcoma virus. *J. Virol.*, **10**:1010-1020.
- ◆ **Deng YM, Tuch BE, Rawlinson WD (2000).** Transmission of porcine endogenous retroviruses in severe combined immunodeficient mice xenotransplanted with fetal porcine pancreatic cells. *Transplantation*, **70**:1010-1016.
- ◆ **DeHarven E (1974).** Remarks on the ultrastructure of type A, B, and C virus particles. *Adv. Virus Res.*, **19**:221-264.
- ◆ **Denner J, Dorfman NA (1977).** Small virus-like particles in leukosis-like syndromes induced by certain antigens and immunostimulators. *Acta Biol. Med. Germ.*, **36**:1451-1458.
- ◆ **Denner J, Wunderlich V, Bierwolf D (1980).** Suppression of human lymphocyte mitogen response by disrupted primate retroviruses of type C (baboon endogenous virus) and type D (PMFV). *Acta Biol. Med. Germ.*, **39**:K19-26.
- ◆ **Denner J, Indzhia V, Wunderlich V, Sydow G, Bierwolf D, Lapin BA (1985a).** Suppression of human lymphocyte mitogen response by retroviruses of type D II. Nonactivity of Mason-Pfizer Monkey Virus versus activity of human cell line derived virus PMFV. *Arch. Virol.*, **86**:187-196.
- ◆ **Denner J, Wunderlich V, Sydow G (1985b).** Suppression of human lymphocyte mitogen response by retroviruses of type D. I. Action of purified intact and disrupted virus. *Arch. Virol.*, **86**:177-186.
- ◆ **Denner J, Wunderlich V, Bierwolf D (1986).** Suppression of human lymphocyte mitogen response by proteins of the type-D retrovirus PMFV. *Int. J. Cancer*, **37**:311-316.
- ◆ **Denner J (1987).** Immunosuppression by oncogenic retroviridae. Immune modulation by infectious agents. (W. Zschiesche, Ed.), Gustav Fischer Verlag, Jena.
- ◆ **Denner J, Vogel T, Norley S, Ennen J, Kurth R (1993).** The immunosuppressive (ISU)-peptide of HIV-1: Binding to lymphocyte surface proteins. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **119**:28.
- ◆ **Denner J, Norley S, Kurth R (1994).** The immunosuppressive peptide of HIV-1: functional domains and immune response in AIDS patients. *AIDS*, **8**:1063-1072.
- ◆ **Denner J, Vogel T, Norley S, Hoffmann A, Kurth R (1995).** The immunosuppressive (ISU-) peptide of HIV-1: Binding proteins on lymphocyte detected by different methods. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **121**:35.

- ◆ **Denner J, Persin C, Vogel T, Haustein D, Norley S, Kurth R (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 (1998).** Immunosuppression by retroviruses: implication for xenotransplantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **862**:75-86.
- ◆ **Denner J, Kurth R (2001).** Infektionen bei Immunschwächen (einschließlich AIDS). In *Medizinische Mikrobiologie*; 8. Auflage (Editor: Köhler et al.). S. 793-811. Urban und Fischer Verlag; München, Jena.
- ◆ **Denner J, Specke V, Schwendemann J, Tacke SJ (2001).** Porcine endogenous retroviruses (PERVs): Adaptation to human cells and attempts to infect small animals and non-human primates. *Ann. Transpl.*, **6**:25-33.
- ◆ **Denner J, Ulrichs K, Specke V, Karlas A, Bühler C, Meyer T, Breuer S, (2002a).** No transmission of porcine endogenous retroviruses (PERVs) in a long term pig to rat xenotransplantation model and no infection of immunosuppressed rats. *Xenotransplantation*, eingereicht
- ◆ **Denner J, Specke V, Karlas A, Thiesen U, Özel M, Kurth R (2002b).** Characterization of human-adapted porcine endogenous retroviruses (PERVs): Increased virus production and changes in LTR length. *J. Gen. Virol.*, eingereicht
- ◆ **Dent PB (1972).** Immunosuppression by oncogenic viruses. *Prog. Med. Virol.*, **14**:1-35.
- ◆ **Dorey E (2000).** PERV data renew xeno debat. *Nat. Biotechnol.*, **18**:1032-1033.
- ◆ **DesGroseillers L, Jolicoeur P (1984).** The tandem direct repeat within the long terminal repeat of murine leukemia viruses are the primary determinant of their leukemogenic potential. *J. Virol.*, **52**:945-953.
- ◆ **Dorling A, Lechler R (1998).** T cell-mediated xenograft rejection: specific tolerance is probably required for long term xenograft survival. *Xenotransplantation*, **5**:234-245.
- ◆ **Durbin RK, Manning JS (1982).** The core of murine leukemia virus requires phosphate for struktural stability. *Virology*, **116**:31-39.
- ◆ **Edbauer CA, Naso RB (1983).** Cytoskeleton-associated Pr65Gag and retrovirus assembly. *Virology*, **130**:415-426.
- ◆ **Elliott RB, Escobar L, Garkavenko O, Croxson MC, Schroeder BA, McGregor M, Ferguson G, Beckman N, Ferguson S (2000).** No evidence of infection with porcine endogenous retroviruse in recipients of encapsulated porcine islet xenografts. *Cell Transspl.*, **9**:895-901.
- ◆ **Ericsson T, Oldmixon B, BlombergJ, Rosa M, Patience C, Andersson G (2001).** Identification of novel porcine endogenous retrovirus sequences in miniatur swine. *J. Virol.*, **75**:2765-2770.
- ◆ **Essex M, Snyder SP (1973).** Feline oncornavirus-associated cell membrane antigen. I. Serologic studies with kitten exposed to cell-free materials from various feline fibrosarcomas. *J. Natl. Cancer Inst.*, **51**:1007-1012.
- ◆ **Ezzell C (1988).** Wild chimpanzees upgraded to endangered species. *Nature*, **336**:511.
- ◆ **Fauci AS (1988).** The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science*, **239**:617-622.
- ◆ **Feller WF, Chopra HC, Bepko F (1967).** Studies on the possible viral etiology of human breast cancer. *Surgery*, **62**:750-755.
- ◆ **Feller WF, Chopra HC (1971).** Virus-like particles in human milk. *Cancer*, **28**:1425-1430.

- ◆ **Fink JS, Schumacher JM, Elias SL, Palmer EP, Saint-Hilaire M, Shannon K, Penn R, Starr P, VanHorne C, Kott HS, Dempsey PK, Fishman AJ, Raineri R, Manhart C, Dinsmore J, Isacson O (2000).** Porcine xenografts in Parkinson`s disease and Huntington`s disease patients: preliminary results. *Cell Transplantation*, **9**:273-278.
- ◆ **Fleissner E, Tress E (1973).** Isolation of a ribonucleoprotein structure from oncornaviruses. *J. Virol.*, **12**:1612-1615.
- ◆ **Foa C, Foa J, Carcassonne Y (1976).** Morphologic study of virus-like particles in a case of acute leukemia. *Cancer*, **37**:1718-1724.
- ◆ **Frazier, M. E. (1985).** Evidence for retrovirus in miniature swine with radiation-induced leukemia or metaplasia. *Arch. Virol.*, **83**:83-97.
- ◆ **Galbraith DN, Kelly HT, Dyke A, Reid G, Haworth C, Beekman J, Shepherd A, Smith KT. (2000).** Design and validation of immunological tests for the detection of Porcine endogenous retrovirus in biological materials. *J Virol Methods*, **90**:115-124.
- ◆ **Gao F, Yue L, Robertson DL, Hill SC, Hui H, Bigga RJ, Neequayee AE, Whelan TM, Ho DD, Shaw GM, Hahn BH (1994).** Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J. Virol.*, **68**:7433-7447.
- ◆ **Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH (1999).** Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes. *Nature*, **397**:436-441.
- ◆ **Gelderblom H (1990).** Morphogenesis, maturation, and fine structure of lentiviruses. *In: Retroviral proteases: Maturation and morphogenesis* (Pearl LH, ed.), S.: 159-180. Stockton Press, New York.
- ◆ **Ghazal P, Lubon H, Fleckenstein B, Henninghausen L (1987).** Binding of transcription factors and creation of a large nucleoprotein complex on the human cytomegalovirus enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**:3658-3662.
- ◆ **Gilbert JM, Mason D, White JM (1990).** Fusion of Rous sarcoma virus with host cells does not require exposure to low pH. *J. Virol.*, **64**:5106-5113.
- ◆ **Golemis EA, Speck NA, Hopkins N (1990).** Alignment of U3 region sequences of mammalian type c viruses: identification of highly conserved motifs and implications for enhancer design. *J. Virol.*, **64**:534-542.
- ◆ **Good LF, Chen KY (1996).** Cell-cycle and age dependent transcriptional regulation of the human thymidine kinase gene: the role of NF-Y and CBP/TK binding complex. *Biol. Signals*, **5**:163-169.
- ◆ **Good RA, Haraguchi S, Lorenz E, Day NK (1991).** In vitro immunomodulation and in vivo immunotherapy of retrovirus-induced immunosuppression. *Int. J. Immunopharm.*, **13**:1-7.
- ◆ **Goodman M, Bailey WJ, Hayasaka K, Stanhope MJ, Slighton J, Czelusniak J (1994).** Molecular evidence on primate phylogeny from DNA sequences. *Am. J. Phys. Antropol.*, **1**:3-24.
- ◆ **Graham FL, Smiley J (1977).** Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human Adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.*, **36**:59-74.
- ◆ **Grandgenett DP, Vora AC, Schiff RD (1978).** A 32.000 dalton nucleic acid binding protein from avian retrovirus cores possesses DNA endonuclease activity. *Virology*, **89**:119-132.
- ◆ **Gronostajski RM, Nagata K, Hurwitz J (1984).** Isolation of human DNA sequences that bind to nuclear factor I, a host protein involved in adenovirus DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**:4013-4017.
- ◆ **Gunther CV, Nye JA, Bryner RS, Graves BJ (1990).** Sequence-specific DNA binding of a proto-oncoprotein ets-1 defines transcriptional activator sequence within the long terminal repeat of the Moloney murine sarcoma virus. *Genes Dev.*, **4**:667-679.

- ◆ **Hannon JP, Bossone CA, Wade CE (1990).** Normal physiological values for conscious pigs used in biomedical research. *Lab. Anim. Sci.*, **40**:293-298.
- ◆ **Haraguchi S, Good RA, Day NK (1995).** Immunosuppressive retroviral peptides: cAMP and cytokine patterns. *Immunol. Today*, **16**:595-603.
- ◆ **Harcourt AH, Fossey D, Stewart KJ, Watts DP (1980).** Reproduction in wild gorillas and some comparisons with chimpanzees. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **28**:59-70.
- ◆ **Hardy JD, Kurrus FE, Chavaz CM, Al E (1964).** Heart transplantation in man: Developmental studies and review of the case. *JAMA*, **188**:1125-1132.
- ◆ **Hardy, W. D. (1993).** Feline oncoretroviruses. In: *The retroviruses.*, Vol. 2, pp. 109-180. Edited by J. A. Levy: Plenum Press, New York.
- ◆ **Henderson LE, Krutzsch HC, Oroszlan S (1983).** Myristyl amino terminal acylation of murine retrovirus proteins: An unusual post translational protein modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**:339-443.
- ◆ **Henderson LA, Qureshi MN (1993).** A peptide inhibitor of human immunodeficiency virus infection binds to novel cell surface polypeptides. *J. Biol. Chem.*, **268**:16291-16297.
- ◆ **Henderson AJ, Zou X, Calame KL (1995).** C/EBP proteins activate transcription from the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat in macrophages/monocytes. *J. Virol.*, **69**:5337-5344.
- ◆ **Henderson AJ, Connor RI, Calame KL (1996).** C/EBP activators are required for HIV-1 replication and proviral induction in monocytic cell lines. *Immunity*, **5**:91-101.
- ◆ **Heneine W, Tibell A, Switzer WM, Sandstrom P, Rosales GV, Mathews A, Korsgren O, Chapman LE, Folks TM, Groth CG (1998).** No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts. *Lancet*, **352**:695-699.
- ◆ **Herring C, Cunningham DA, Whittam AJ, Fernandez-Suarez XM, Langford GA (2001).** Monitoring xenotransplant recipients for infection by PERV. *Clin. Biochem.*, **34**:23-27.
- ◆ **Herzenberg LA, Kantor AB (1993).** B-cell lineages exist in the mouse. *Immunol. Today*, **14**:79-83.
- ◆ **Hinz B, Schröder H (1998).** Prednisolon. *Dtsch. Med. Wschr.*, **123**:943-944
- ◆ **Holzschu DL, Martineau D, Fodor SK, Vogt VM, Bowser PR, Casey JW (1995).** Nucleotide sequence and protein analysis of a complex piscine retrovirus, walleye dermal sarcoma virus. *J. Virol.*, **69**:5320-5331.
- ◆ **Hoover EA, Perryman LE, Kociba GJ (1973).** Early lesions in cats inoculated with feline leukemia virus. *Cancer Res.*, **33**:145-152.
- ◆ **Hummell DS, Dooley JS, Kahn AS, Lawton AR (1993).** Coordinate transcriptional control of murine endogenous retrovirus and Ig genes during B cell differentiation. *J. Immunol.*, **151**:3131-3139.
- ◆ **Ibanez CE, Lipsick JS (1990).** Trans activation of gene expression by v-myb. *Mol. Cell Biol.*, **10**:2285-2293.
- ◆ **Jaboulay M (1906).** Greffe de rein au pli du coude par soudures arterielles et vain. *Lyon Med.*, **107**:575.
- ◆ **Janeway CA, Travers P (1997).** Die T-Zell-vermittelte Immunität. In: *Immunologie*. 2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- ◆ **Jiang H, Wagner E, Zhang H, Frank MM (2001).** Complement 1 inhibitor is a regulator of the alternative complement pathway. *J. Exp. Med.*, **194**:1609-1616.
- ◆ **Jin H, Inoshima Y, Wu D, Morooka A, Sentusi H (2000).** Expression of porcine endogenous retrovirus in peripheral blood leukocytes from ten different breeds. *Transpl. Infect. Dis.*, **2**:11-14.
- ◆ **Katz RA, Skalka AM (1994).** The retroviral enzymes. *Annu. Rev. Biochem.*, **63**:133-173.

- ◆ **Kawaguchi Y, Tomonaga K, Maeda K, Ono M, Miyazawa T, Kohomoto M, Tohya Y, Mikami T (1995).** The C/EBP site in the feline immunodeficiency virus (FIV) long terminal repeat (LTR) is necessary for its efficient replication and is also involved in the inhibition of the FIV LTR-directed gene expression by pseudorabies virus ICP4. *Virology*, **208**:492-499.
- ◆ **Kim A, Terzian C, Santamaria P, Pelisson A, Prud'homme N, Bucheton A (1994).** Retroviruses in invertebrates: The gypsy retrotransposon is apparently an infectious retrovirus of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**:1285-1289.
- ◆ **Knippers R (1995).** Regulation proteincodierender Gene. *In: Molekulare Genetik*. 6. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart
- ◆ **Krach U, Fischer N, Czauderna F, Tönjes RR (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.
- ◆ **Kräuslich HD, Welker R (1996).** Intracellular transport of retroviral capsid components. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **214**:25-63.
- ◆ **Kriznova O, Rathova V (1969).** Serum inhibitors of myxoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **47**:125-151.
- ◆ **Kryszke MH, Piette J, Yaniv M (1987).** Induction of a factor that binds to the polyoma virus A enhancer on differentiation of embryonal carcinoma cells. *Nature*, **328**:254-256.
- ◆ **Kung HC, Boerkoel C, Carter TH (1991).** Retroviral mutagenesis of cellular oncogenes: A review with insight into the mechanisms of insertional activation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **171**:1-25.
- ◆ **Kuyl van der AC, Dekker JT, Goudsmith J (1995).** Full-length provirus of baboon endogenous retrovirus (BaEV) and dispersed BaEV reverse transcriptase retroelements in the genome of baboon species. *J. Virol.*, **69**:5917-5924.
- ◆ **Laan van der LJW, Lockely C, Griffeth BC, Fraiser FS, Wilson CA, Onions DE, Hering J, Long Z, Otto E, Torbett BE, Salomon DR (2000).** Infection by porcine endogenous retrovirus after xenotransplantation in SCID mice. *Nature*, **407**:501-504.
- ◆ **Lachmann PJ, Davies A (1997).** Complement and immunity to viruses. *Immunol. Rev.*, **159**:69-77.
- ◆ **Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS (2002).** Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, **295**:1089-1092.
- ◆ **Langford GA, Galbraith D, Wittam AJ, McEwan P, Fernandez-Suarez XM, Black J, Shephert A, Onions D (2001).** In vivo analysis of porcine endogenous retrovirus expression in transgenic pigs. *Transplantation*, **72**:1996-2000.
- ◆ **LeTissier PI, Stoye JP, Takeuchi Y, Patience C, Weiss RA (1997).** Two sets of human-tropic pig retrovirus. *Nature*, **389**:681-682.
- ◆ **Lenz J, Haseltine WA (1983).** Localization of the leukemogenic determinants of SL3-3, an ecotropic XC-positive murine leukemia virus of AKR origin. *J. Virol.*, **47**:317-328.
- ◆ **Leventhal JR, Su A, Kaufman DB, Abecassis MI, Stuart FP, Anderson B, Fryer JP (2001).** Altered infectivity of porcine endogenous retrovirus by "protective" avian antibodies: implications for pig-to-human xenotransplantation. *Transplant. Proc.*, **33**:690.
- ◆ **Levy MF, Crippin J, Sutton S, Netto G, McCormack J, Curiel T, Goldstein RM, Newman JT, Gowan TA, Bancherau J, Diamond LE, Byrne G, Logan J, Klintmalm GB (2000).** Liver allotransplantation after extracorporeal hepatic support with transgenic (hCD55/hCD59) porcine livers. *Transplantation*, **69**:272-280.

- ◆ **Li SF, Neethling FA, Tangiguchi S, Yeh JC, Kobayashi T, Ye Y, Koren E, Cummings RD (1996).** Glycans derived from porcine stomach mucin are effective inhibitors of natural anti-alpha-galactosyl antibodies in vitro and after intravenous infusion in baboons. *Transplantation*, **62**:1324-1331.
- ◆ **Lieber MM, Benveniste RE, Livingston DM, Todaro GJ (1973).** Mammalian cells in culture frequently release type Cviruses. *Science*, **182**:56-59.
- ◆ **Lieber MM, Sherr CJ, Benveniste RE, Todaro GJ (1975).** Biologic and immunologic properties of porcine type C viruses. *Virology*, **66**:616-619.
- ◆ **Lin SS, Wieder BC, Diamond LE, Lawson JH, Hoopes CW, Daniels LJ, Daggett CW, Parker W, Harland RC, Davis RD, Bollinger RR, Logan JS, Platt JL (1998).** The role of antibodies in acute vascular rejection of pig-to-baboon cardiac transplants. *J. Clin. Invest.*, **101**:1746-1756.
- ◆ **Louis N, Eveleigh C, Graham FL (1997).** Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology*, **233**:423-429.
- ◆ **Löwer R, Löwer J, Kurth R (1996).** The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **93**:5177-5184.
- ◆ **Mach B, Steimle V, Martinez-Soria E, Reith W (1996).** Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu. Rev. Immunol.*, **14**:301-331.
- ◆ **Makowka L, Wu WD, Hoffmann A, et al. (1994).** Immuno-histo-pathological lesion associated with the rejection of a pig to human liver xenograft. *Transpl. Proc.*, **26**:1074.
- ◆ **Mantovani R (1999).** The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene*, **239**:15-27.
- ◆ **Mang R, Maas J, Chen X, Goudsmit J, Kuyl van der AC (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.
- ◆ **Mangeny M, Heidmann T (1998).** Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immune rejection in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**:14920-14925.
- ◆ **Martin U, Kiessig V, Blusch JH, Haverich A, von der Helm K, Herden T, Steinhoff G (1998a).** Expression of pig endogenous retrovirus by primary porcine endothelial cells and infection of human cells. *Lancet*, **352**:692-694.
- ◆ **Martin U, Steinhoff G, Kiessig V, Chikobava M, Anssar M, Morschheuser T, Lapin B, Haverich A (1998b).** Porcine endogenous retrovirus (PERV) was not transmitted from porcine endothelial cells to baboons in vivo. *Transpl. Int.*, **11**:247-251.
- ◆ **Martin U, Winkler ME, Id M, Radeke H, Arseniev L, Takeuchi Y, Simon AR, Patience C, Haverich A, Steinhoff G (2000).** Productive infection of primary human endothelial cells by pig endogenous retrovirus (PERV). *Xenotransplantation*, **7**:138-142.
- ◆ **Martiney MJ, Rulli K, Beaty R, Levy LS, Lenz J (1999).** Selection of reversion and suppressors of a mutation in the CBF binding site of a lymphomagenic retrovirus. *J. Virol.*, **73**:7599-7606.
- ◆ **Masuda ES, Naito Y, Tokumitsu H, Campbell D, Saito F, hannum C, Arai K, Arai N (1995).** NFATx, a novel member of the nuclear factor of activated T cell family that is expressed predominantly in the thymus. *Mol. Cell Biol.*, **15**:2697-2706.
- ◆ **Matsusaka T, Fujikawa K, Nishio Y, Mukaida N, Matsushima K, Kishimoto T, Akira S (1993).** Transcription factor NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, Interleukin 6 and Interleukin 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:10193-10197.
- ◆ **Matthews AL, Brown J, Switzer W, Folks TM, Heneine W, Sandstrom PA (1999).** Development and validation of a western immunoblot assay for detection of antibodies to porcine endogenous retrovirus. *Transplantation*, **67**:939-943.

- ◆ **Maynard JE, Lorenz D, Bradley DW, Feinstone SM, Krushak DH, Barker LF, Purcell RH (1975).** Review of infectivity studies in nonhuman primates with virus-like particles associated with MS-1 hepatitis. *Am J Med Sci.*, **270**:81-85.
- ◆ **Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, Haynes JS, Thacker BJ, Emerson SU (1997).** A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**:9860-9865.
- ◆ **Meriggi F, Forni E, Bismuth H (1994).** What future for clinical xenograft of the liver? *Giorn. Chirurg.*, **15**:183-189.
- ◆ **Michaels MG, Jenkins FJ, StGeorge K, Nalesnik MA, Starzl TE, Rinaldo CR Jr. (2001).** Detection of infectious baboon cytomegalovirus after baboon-to-human liver xenotransplantation. *J. Virol.*, **75**:2825-2828.
- ◆ **Minanov OP, Artrip JH, Szabolcs M, Kwiatkowski PA, Galili U, Itescu S, Michler, R. E. (1998).** Triple immunosuppression reduces mononuclear cell infiltration and prolongs graft life in pig-to newborn baboon cardiac xenotransplantation. *J. Thor. Cardiovasc. Surg.* **115**, 998-1006.
- ◆ **Modrow S, Falke D (1998).** Retroviren. *In: Molekulare Virologie.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. S.: 290-334
- ◆ **Moelling K, Bolognesi DP, Bauer H, Busen W, Plassmann HW, Hausen P (1971).** Association of viral reverse transcriptase with an enzyme degrading the RNA moiety of RNA-DNA hybrids. *Nat. New Biol.*, **234**:240-243.
- ◆ **Moses HL, Glade PR, Kasel JA, Rosenthal AS, Hirshaut Y, Chessin LN (1968).** Infectious mononucleosis: detection of herpes-like virus and reticular aggregates of small cytoplasmic particles in continuous lymphoid cell lines derived from peripheral blood. *Proc. Natrl. Acad. Sci. USA*, **60**:489-496.
- ◆ **Murphy FA, Fauquet CM, Mayo MA, Jarvis AW, Ghabrial SA, Summers MD, Martelli GP, Bishop DHL (1995).** Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *In: Archives of Virology,* Springer Verlag, Wien New York
- ◆ **Niebert M, Rogel-Gaillard C, Chardon P, Tönjes RR (2002).** Characterization of chromosomally assigned replication-competent gamma porcine endogenous retroviruses derived from a large white pig and expression in human cells. *J. Virol.*, **76**:2714-2720.
- ◆ **Niemann H (2001).** Current status and perspectives for the generation of transgenic pigs for xenotransplantation. *Ann Transplant.*, **6**:6-9.
- ◆ **Ochsenbein AF, Zinkernagel RM (2000).** Natural antibodies and the complement link innate and acquired immunity. *Immunol. Today*, **21**:624-630.
- ◆ **O' h Uigin C, Sato A, Klein J (1997).** Evidence for convergent evolution of A and B blood group antigens in primates. *Hum. Genet.*, **2**:141-148.
- ◆ **Onions DE, Witt CJ (2000).** Xenotransplantation: An overview of microbiological risks and potentials for risk management. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **19**:289-301.
- ◆ **Orosz CG, Zinn NE, Olsen RG, Mathes LE (1985a).** Retrovirus-mediated immunosuppression. I. FeLV-UV and specific FeLV proteins alter T-lymphocyte behaviour by inducing hyporesponsiveness to lymphokines. *J. Immunol.*, **134**:3396-3403.
- ◆ **Orosz CG, Zinn NE, Olsen RG, Mathes LE (1985b).** Retrovirus-mediated immunosuppression. II. FeLV-UV alters in vitro murine T-lymphocyte behaviour by reversibly impairing lymphokine sekretion. *J. Immunol.*, **135**:583-590.

- ◆ **Osman N, McKenzie IF, Ostenried K, Ioannou YA, Desnick RJ, Sandrin MS (1997).** Combined transgenic expression of alpha-galactosidase and alpha-1,2-fucosyltransferase leads to optimal reduction in the major xenoepitope Gal-alpha(1,3)Gal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**:14677-14682.
- ◆ **Ott DE, Coren LV, Kane BP, Busch LK, Johnson DG, Sowder RC, Chertova EN, Arthur LO, Henderson LE (1996).** Cytoskeletal proteins inside human immunodeficiency virus type I virions. *J. Virol.*, **70**:7734-7743.
- ◆ **Overdier DG, Ye H, Peterson RS, Clevidence DE, Costa RH (1997).** The winged helix transcriptional activator HFH-3 is expressed in the distal tubules of embryonic and adult mouse kidney. *J. Biol. Chem.*, **272**:13725-13730.
- ◆ **Pahwa S, Pahwa R, Saxinger C, Gallo RC, Good RA (1985).** Influence of the human T-lymphotropic virus/ lymphadenopathy-associated virus on functions of human lymphocytes: evidence for immunosuppressive effects and polyclonal B-cell activation by banded viral preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**:8198-8202.
- ◆ **Palmarini M, Datta S, Omid R, Murgia C, Fan H (2000).** The long terminal repeat of Jaagsiekte sheep retrovirus is preferentially active in differentiated epithelial cells of the lungs. *J. Virol.*, **74**:5776-5787.
- ◆ **Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS (1993).** The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *New Engl. J. Med.* **328**:327-335.
- ◆ **Paradis K, Langford G, Long Z, Heneine W, Sandstrom P, Switzer WM, Chapman LE, Lockey C, Onions D, The XEN 111 Study Group, Otto E (1999).** Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. *Science*, **285**:1236-1241.
- ◆ **Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA (1997).** Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pig. *Nat. Med.*, **3**:282-286.
- ◆ **Patience C, Patton GS, Takeuchi Y, Weiss RA, McClure MO, Rydberg L, Breimer ME (1998).** No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys. *Lancet*, **352**:699-701.
- ◆ **Patience C, Switzer WM, Takeuchi Y, Griffiths D, Goward EG, Heneine W, Stoye JP, Weiss RA (2001).** Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species. *J. Virol.*, **75**:2771-2775.
- ◆ **Paton NI, Leo YS, Zaki SR, Auchus AP, Lee KE, Ling AE, Chew SK, Ang B, Rollin PE, Umaphathi T, Sng I, Lee CC, Lim E, Ksiazek TG (1999).** Outbreak of Nipah virus infection among abattoir workers in Singapore: description of a new infectious disease in Malaysia and Singapore. *Lancet*, **354**:1253-1256.
- ◆ **Persson MO, Persson NH, Ranstam J, Hermeren G (2001).** Attitudes toward xenotransplantation patients waiting for transplantation versus the general public. *Transpl. Int.*, **14**:334-342.
- ◆ **Peterson RDA, Hendrickson R, Good RA (1963).** Reduced antibody forming capacity during the incubation period of passage A leukemia in C3H mice. *Proc. Soc. Exp. Med.*, **114**:517-520.
- ◆ **Petersen P, Lembert N, Zschocke P, Stenglein S, Planck H, Ammon HP, Becker HD (2002).** Hydroxymethylated polysulphone for islet macroencapsulation allows rapid diffusion of insulin but retains PERV. *Transplant. Proc.*, **34**:194-195.
- ◆ **Piette J, Yaniv M (1987).** Two different factors bind to the alpha-domain of the polyoma virus enhancer, one of which also interacts with the SV40 and c-fos enhancers. *EMBO J.*, **6**:1331-1337.
- ◆ **Pitkin Z, Mullon C (1999).** Evidence of absence of porcine endogenous retrovirus (PERV) infection in patients treated with a bioartificial liver support system. *Artif. Org.*, **23**:829-833.
- ◆ **Platt JL, Logan JS (1996).** Use of transgenic animals in xenotransplantation. *Transplantation Reviews*, **10**:69-77.

- ◆ **Platt JL, lin SS, McGregor CGA (1998).** Acute vascular rejection. *Xenotransplantation*, **5**:169-175.
- ◆ **Prineteau M (1905).** Greffe renale. *J Med. Bordeaux*, **26**:549.
- ◆ **Powell SK, Gates ME, Langford G, Gu ML, Lockey C, Long Z, Otto E (2000).** Antiretroviral agents inhibit infection of human cells by porcine endogenous retroviruses. *Antimicrob Agents Chemother.*, **44**:3432-3433.
- ◆ **Qari SH, Magre S, Garcia-Lerma JG, Hussain AI, Takeuchi Y, Patience C, Weiss RA, Heneine W (2001).** Susceptibility of the porcine endogenous retrovirus to reverse transcriptase and protease inhibitors. *J Virol.*, **75**:1048-1053.
- ◆ **Reemtsma K, McCracken BH, Schlegel J, et al. (1964).** Heterotransplantation of the kidney. Two clinical experiences. *Science*, **143**:700.
- ◆ **Regenmortel van MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (2000).** Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. In: Seventh Report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press.
- ◆ **Robinson HL, Blais BM, Tschlis PN, Coffin JM (1982).** At least two regions of the viral genome determine the oncogenic potential of avian leukosis viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**:1225-1229.
- ◆ **Rohn JL, Overbaugh J (1995).** *In vivo* selection of long terminal repeat alterations in feline leukemia virus-induced thymic lymphomas. *Virology*, **206**:661-665.
- ◆ **Rota PA, Rocha EP, Harmon MW, Hinshaw VS, Sheerar MG, Kawaoka Y, Cox NJ, Smith TF (1989).** Laboratory characterization of a swine influenza virus isolated from a fatal case of human influenza. *J. Clin. Microbiol.*, **27**:1413-1416.
- ◆ **Rother RP, Fodor WL, Springhorn JP, Birks CW, Setter E, Sandrin MS, Squinto SP, Rollins SA (1995).** A novel mechanism of retrovirus inactivation in human serum mediated by anti alpha-Galactosyl natural antibody. *J. Exp. Med.*, **182**:1345-1355.
- ◆ **Rous P (1911).** Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate. *JAMA*, **56**:198
- ◆ **Rudell A (1995).** Transcription regulatory elements of the avian retroviral long terminal repeat. *Virology*, **206**:1-7.
- ◆ **Ruegg CL, Monell CR, Strand M (1989).** Inhibition of lymphoproliferation by a synthetic peptide with sequence identity to gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.*, **63**:3257-3260.
- ◆ **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989).** Molecular Cloning: A laboratory manual (3 Volume Set). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- ◆ **Sandrin MS, McKenzie IFC (1999).** Recent advances in xenotransplantation. *Cur. Opin. Immunol.*, **11**:527-531.
- ◆ **Sandrin MS, Vaughan HA, Dabkowski PL, McKenzie IFC (1993).** Anti-pig IgM antibodies in human serum react predominantly with Gal-alpha-1,3-Gal epitopes. *Proc. Natl. Ac. Sci.*, **90**:2919.
- ◆ **Sandström H, Veijalainen P, Mönning V, Hundsmann G, Scgwarz H, Schäfer W (1974).** C-type particles produced by a permanent cell line from a leukemic pig. I. Origin and properties of the host cells and some evidence for the occurrence of C-type-like particles. *Virology*, **57**:175-178.
- ◆ **Satake M, kawagishi N, Moller E (1996).** Direct activation of human responder T cells by porcine stimulator cells leads to T cell proliferation and cytotoxic T cell development. *Xenotransplantation*, **3**:198-206.
- ◆ **Scheef G, Fischer N, Krach U, Tönjes RR (2001).** Number of U3 repeat box acting as an enhancer in long terminal repeats of polytropic replication-competent porcine endogenous retrovirus dynamically fluctuates during serial virus passages in human cells. *J. Virol.*, **75**:6933-6940.

- ◆ **Schmoeckel M, Nollert G, Shahmohammadi M, Müller-Hocker J, Young VK, Kasper-Konig W, White DJ, Hammer C, Reichart B (1997).** Transgenic human decay accelerating factor makes normal pigs function as a concordant species. *J. Heart Lung Transplant.*, **16**:758-764.
- ◆ **Schön MR, Heil W, Lemmens HP, Padval D, Matthes M, Puhl G, Neuhaus P, Hammer C (1999).** Xenogeneic, extracorporeal liver perfusion in primates improves the ratio of branched-chain amino acids to aromatic amino acids (Fischer's ratio). *Eur Surg Res.*, **31**:230-239.
- ◆ **Schröder F, Herzig S (1998).** Cyclosporin. *Dtsch. Med. Wschr.*, **123**:121-122.
- ◆ **Schumacher JM, Elias SA, Palmer EP, Kott HS, Dinsmore J, Dempsey PK, Fishman AJ, Thomas C, Feldman RG, Kassissieh S, Raineri R, Manhart C, Penney D, Fink JS, Isacson O (2000).** Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD. *Neurology*, **54**:1042-1050.
- ◆ **Schuurman HJ, Cottens S, Fuchs S, Joergensen J, Meerloo T, Sedrani R, Tanner M, Zenke G, Schuler W (1997).** SDZ RAD, a new rapamycin derivative: synergism with cyclosporine. *Transplantation* **64**:32-35.
- ◆ **Schuurman HJ, Ringers J, Schuler W, Slingerland W, Jonker M (2000).** Oral efficacy of a macrolide immunosuppressant SDZ RAD and of cyclosporine microemulsion in cynomolgus monkey kidney allotransplantation. *Transplantation* **69**:737-742.
- ◆ **Sears RC, Sealy L (1994).** Multiple forms of C/EBP beta bind the EFII enhancer sequence in the Rous sarcoma virus long terminal repeat. *Mol. Cell Biol.*, **14**:5617.
- ◆ **Seman G, Gallager HS, Lukeman JM, Dmochowski L, (1971).** Studies on the presence of particles resembling RNA virus particles in human breast tumors, pleural effusions, their tissue cultures and milk. *Cancer*, **28**:1431-1442.
- ◆ **Shen J, Chong ASF, Xiao F, Liu W, Huang W, Blinder L, Foster P, Sankary H, Jensik S, McChesney L, Mital D, Williams JW (1998).** Histological characterization and pharmacological control of chronic rejection in xenogenic and allogenic heart transplantation. *Transplantation*, **66**:692-698.
- ◆ **Shibuya H, Taniguchi T (1989).** Identification of multiple cis-elements and trans-acting factors involved in the induced expression of human IL-2 gene. *Nucleic Acids Res.*, **17**:9173-9184.
- ◆ **Shortridge KF, Ho WK (1974).** Human serum lipoproteins as inhibitors of haemagglutination for selected togaviruses. *J. Gen. Virol.*, **23**:113-116.
- ◆ **Singh IP, Chopra AK, Copperhaver DH, Anantharamaiah GM, Baron S (1999).** Lipoproteins account for part of the broad non-specific antiviral activity of human serum. *Antiviral Res.*, **42**:211-218.
- ◆ **Smith CE, Simpson DI, Bowen ET, Zlotnik I (1967).** Fatal human disease from vervet monkeys. *Lancet*, **2**:1119-1121.
- ◆ **Sommerfelt MA, Petteway SR, Dreyer GB, Hunter E (1992).** Effect of retroviral proteinase inhibitors on Mason-Pfizer monkey virus maturation and transmembran glycoprotein cleavage. *J. Virol.*, **66**:4220-4227.
- ◆ **Sommerfelt MA (1999).** Retrovirus receptors. *J. Gen. Virol.*, **80**:3049-3064.
- ◆ **SoRelle R. (2000).** First US implantation of DeBakey ventricular assist device. *Circulation*, **101**:9056-9057.
- ◆ **Specke V, Tacke SJ, Boller K, Schwendemann J, Denner J (2001a).** Porcine endogenous retroviruses (PERVs): In vitro host range and attempts to establish small animal models. *J. Gen. Virol.*, **82**:837-844.
- ◆ **Specke V, Rubant S, Denner J (2001b).** Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses. *Virology*, **285**:177-180.

- ◆ **Specke V, Plesker R, Coulibaly C, Boller K, Denner J (2001c).** Productive infection of a mink cell line with porcine endogenous retroviruses (PERVs) but lack of transmission *in vivo*. *Arch. Virol.*, **147**:305-319.
- ◆ **Specke V, Langford G, Schuurman HJ, Coulibaly C, Plesker R, Kurth R, Denner J (2001d).** Porcine endogenous retroviruses (PERVs): studies on transmission *in vitro* and inoculation of small animals and non-human primates *in vivo*. *Xenotransplantation* **8**:34-35.
- ◆ **Specke V, Schuurman HJ, Plesker R, Coulibaly C, Özel M, Langford G, Kurth R, Denner J (2002a).** Virus safety in xenotransplantation: first exploratory *in vivo* studies in small laboratory animals and non-human primates. *Transplant Immunology*, im Druck.
- ◆ **Specke V, Langford GS, Schuurman HJ, Coulibaly C, Plesker R, Galbraith D, Onions DE, Kurth R, Denner J (2002b).** No evidence for PERV transmission in non-human primates infectible *in vitro*. *Virology*, eingereicht.
- ◆ **Specke V, Schuurman H, Coulibaly C, Plesker R, Özel M, Kurth R, Denner J, (2002c).** Human-adapted PERV is not transmitted to non-human primates *in vivo* neither cell-free nor via cell-cell contact. *Xenotransplantation.*, in Vorbereitung.
- ◆ **Spector D, Purves F, Roizman B (1991).** Role of alpha-transinducing factor (VP16) in the induction of alpha genes within the context of viral genomes. *J. Virol.*, **65**:3504-3513.
- ◆ **Srivastava KK, Fernandez-Larrson R, Zinkus DM, Robinson HL (1991).** Human immunodeficiency virus type 1 NL4-3 replication in four T-cell lines: rate and efficiency of entry, a major determinant of permissiveness. *J. Virol.*, **65**:3900-3902.
- ◆ **Starkey CR, Lobelle-Rich PA, Granger S, Brightman BK, Fan H, Levy LS (1998).** Tumorigenic potential of a recombinant retrovirus containing sequences from Molony leukemia virus and from feline leukemia virus. *J. Virol.*, **72**:1078-1084.
- ◆ **Starzl T, Marchioro T, Peters G, et al. (1964).** Renal hetero-transplantation from baboon to man: experiences in six cases. *Transplantation*, **2**:752.
- ◆ **Starzl T, Fung J, Tzakis A, Todo S, Demetris AJ, Marino IR, Doyle H, Zeevi A, Warty V, Michaels M, et al. (1993).** Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet*, **341**:65-71.
- ◆ **Stephan O, Schwendemann J, Specke V, Tacke SJ, Boller K, Denner J (2001).** Immunoperoxidase assay (IPA) for the detection of porcine endogenous retroviruses in experimental and clinical xenotransplantation. *Xenotransplantation* **8**:310-316.
- ◆ **Stoye JP, LeTissier P, Takeuchi Y, Patience C, Weiss RA (1998).** Endogenous retroviruses: A potential problem for xenotransplantation? *Ann. NY Acad. Sci.*, **862**:67-74.
- ◆ **Stromberg K, Hurley NE, Davis NL, Rueckert RR, Fleissner E (1974).** Structural studies of avian myeloblastosis virus: Comparison of polypeptides in virions and core component by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Virol.*, **13**:513-528.
- ◆ **Suzuka I, Shimizu N, Sekiguchi K, Hoshino H, Kodama M, Shimotohno K (1986).** Molecular cloning of unintegrated closed circular DNA of porcine retrovirus. *FEBS Lett*, **198**:339-343.
- ◆ **Swindle MM (1998).** Defining appropriate health status and management programmes for specific-pathogen-free swine for xenotransplantation. Department of Comparative Medicine, Medical University of South Carolina, Charleston.
- ◆ **Switzer WM, Shanmugam V, Chapman L, Heneine W (1999).** Polymerase chain reaction assays for the diagnosis of infection with the porcine endogenous retrovirus and the detection of pig cells in human and nonhuman recipients of pig xenografts. *Transplantation*, **68**:183-188.

- ◆ **Switzer WM, Michler RE, Shanmugam V, Matthews A, Hussain AI, Wright A, Sandstrom P, Chapman LE, Weber C, Safley S, Denny RR, Navarro A, Evans V, Norin AJ, Kwiatkowski P, Heneine W (2001).** Lack of cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus infection to nonhuman primate recipients of porcine cells, tissues, or organs. *Transplantation*, **71**:959-965.
- ◆ **Tacke SJ, Kurth R, Denner J (2000).** Porcine endogenous retrovirus inhibit human immune cell functions: Risk for xenotransplantation. *Virology*, **268**:87-93.
- ◆ **Tacke SJ, Bodusch K, Berg A, Denner J (2001).** Sensitive and specific immunological detection methods for porcine endogenous retroviruses applicable to experimental and clinical xenotransplantation. *Xenotransplantation*, **8**:125-135.
- ◆ **Tacke SJ, Specke V, denner R (2002).** Differences in release and determination of subtype of porcine endogenous retroviruses (PERVs) produced by stimulated normal pig blood cells. *Intervirolgy*, eingereicht.
- ◆ **Takefman DM, Spear GT, Saifuddin M, Wilson CA (2002).** Human CD59 incorporation into porcine endogenous retrovirus particles: Implications for the use of transgenic pigs for xenotransplantation. *J. Virol.*, **76**:1999-2002.
- ◆ **Takeuchi Y, Porter CD, Strahan KM, Preece AF, Gustafsson K, Cosset F-L, Weiss RA, Collins MKL (1996).** Sensitization of cells and retroviruses to human serum by alpha-1,3-Galactosyltransferase. *Nature*, **379**:85-88.
- ◆ **Takeuchi Y, Cosset FL, Lachmann PJ, Okada H, Weiss RA, Collins MK, (1994).** Type C retroviruse inactivation by human complement is determined by both the viral genome and the producer cell. *J. Virol.*, **68**:8001.
- ◆ **Takeuchi Y, Patience C, Magre S, Weiss RA, Banerjee PT, Le Tissier P, Stoye JP (1998).** Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus. *J. Virol.*, **72**:9986-9991.
- ◆ **Tanczos E, Horch RE, Bannasch H, Andree C, Walgenbach KJ, Voigt M, Stark GB (1999).** Keratinocyte transplantation and tissue engineering. New approaches in treatment of chronic wounds. *Zentralbl. Chir.*, **124**:81-86.
- ◆ **Taubenberger JK, Reidl AH, Kraft AE, Bijwaard PT, Fanning TG (1997).** Initial genetic characterization of the 1918 Spanish influenza virus. *Science*, **275**:1793-1796.
- ◆ **Thall AD, Murphy HS, Lowe JB (1996).** α 1,3-Galactosyltransferase-deficient mice produce naturally occurring cytotoxic anti-Gal antibodies. *Transplant. Proc.*, **28**:556-557.
- ◆ **Thomson, A. W. (1992).** The spectrum of action of new immunosuppressive drugs. *Clin. Exp. Immunol.*, **2**:170-173.
- ◆ **Themis M, Frobes SJ, Chan L, Cooper RG, Etheridge CJ, Miller AD, Hodgson HJF, Coutelle C (1998).** Enhanced in vitro and in vivo gene delivery using cationic agent complexed retrovirus vectors. *Gene Therapy*, **5**:1180-1186.
- ◆ **Todaro GJ, Hübner RJ (1972).** The viral oncogene hypothesis: New evidence. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **69**:1009-1015.
- ◆ **Todaro GJ, Benveniste RE, Lieber MM, Sherr CJ (1974).** Characterization of type C virus released from the porcine cell line PK(15). *Virology*, **58**:65-74.
- ◆ **Tönjes RR, Czauderna F, Fischer N, Krach U, Boller K, Chardon P, Rogel-Gaillard C, Niebert M, Scheef G, Werner A, Kurth R (2000).** Molecularly cloned porcine endogenous retroviruses replicate on human cells. *Transplant Proc.*, **32**:1158-1161.
- ◆ **Tsichlis PN, Lazo PA (1991).** Virus-host interactions and the pathogenesis of murine and human oncogenic retroviruses. *Curr. To. Microbiol. Immunol.*, **171**:95-171.

- ◆ **Ubeda M, Habener JF (2000).** CHOP gene expression in response to endoplasmatic stress requires NF-Y interaction with different domains of a conserved DNA-binding element. *Nucleic Acids Res.*, **28**:4987-4997.
- ◆ **Unger E (1910).** Nierentransplantation. *Wien Klin. Wschr.*, **47**:573.
- ◆ **Yamada K, Sachs DH, DerSimonian H (1995).** Human anti-porcine xenogenic T cell response: evidence for allelic specificity of mixed leukocyte reaction and for both direct and indirect pathways of recognition. *J. Immunol.*, **155**:5249-5256.
- ◆ **Young HH (2002).** The early diagnosis and radical cure of carcinoma of the prostate. Being a study of 40 cases and presentation of a radical operation which was carried out in four cases. 1905. *J. Urol.*, **167**:939-947.
- ◆ **Vanhove B, Renard JP, Soulillou JP (1998).** Genetic engineering in the pig. Gene knockout and alternative techniques. *Ann N. Y. Acad. Sci.*, **826**:28-36.
- ◆ **Wainberg MA, Blain N, Spira B (1987).** Inhibition of human lymphocyte mitogenesis by human and other retroviruses. Differential effect of interleukin-2 in restoration of responsiveness. *AIDS*, **1**:83-87.
- ◆ **Wallace MR, Woelfl I, Bowler WA, Olson PE, Murray NB, Brodine SK, Goldfield EC, Arvin AM (1994).** Tumor necrosis factor, interleukin-2 and interferon-gamma in adult varcella. *J. Med. Virol.*, **43**:69-71.
- ◆ **Walport MJ (2001a).** Complement. First of two parts. *N. Engl. J. Med.*, 344:1058-1060.
- ◆ **Walport MJ (2001b).** Complement. Second of two parts. *N. Engl. J. Med.*, 344:1140-1144.
- ◆ **Wang LH, Duesberg P, Beemon K, Vogt PK (1975).** Mapping RNase T1-resistant oligonucleotides of avian tumor virus RNAs: Sarcoma specific oligonucleotides are near to poly(A) end and oligonucleotides common to sarcoma and transformation-defective viruses are at the poly(A) end. *J. Virol.*, **16**:1051-1070.
- ◆ **Weiss RA (1998).** Transgenic pigs and virus adaptation. *Nature*, **391**:327-328.
- ◆ **Weiss RA (1999).** Xenografts and Retroviruses. *Science*, **285**:1221-1222.
- ◆ **Welsh RM, Jensen FC, Cooper NR, Oldstone MB (1976).** Inactivation of lysis of oncornaviruses by human serum. *Virology*, **74**:432-440.
- ◆ **West NJ (1984).** Liver transplantation. Intraoperative nursing care. *AORN J.*, **39**:40-41.
- ◆ **Wills JW, Craven RC (1991).** From function and use of retroviral gag proteins. *AIDS*, **5**:639-654.
- ◆ **Wills JW, Cameron CE, Wilson CB, Xiang Y, Bennett RP, Leis J (1994).** An assembly domain of the Rous sarcoma virus Gag protein required late in budding. *J. Virol.*, **68**:6605-6618.
- ◆ **Wilson CA, Wong S, Muller J, Davidson CE, Rose TM, Burd P (1998).** Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *J. Virol.*, **72**:3082-3087.
- ◆ **Wilson CA, Wong S, VanBrocklin M, Federspiel MJ (2000).** Extended analysis of the in vitro tropism of porcine endogenous retrovirus. *J. Virol.*, **74**:49-56.
- ◆ **Wilson CA (2001).** Will some pig breeds or tissues be less likely to express infectious PERV? *Transplantation*, **72**:1865-1866.
- ◆ **Winkler ME, Martin U, Loss M, Arends H, Rensing S, Kaup FJ, Hedrich HJ, Klempnauer J, Winkler M (1999).** Porcine endogenous retrovirus is not transmitted in a discordant porcine-to-cynomolgus xenokidney transplantation model with long term survival of organ recipient. *Transplant Proc.*, **32**:1162.
- ◆ **Withers-Ward ES, Kitamura Y, Barnes JP, Coffin JM (1994).** Distribution of targets for avian retrovirus DNA integration in vivo. *Genes Dev.*, **8**:1473-1487.

- ◆ **Woods WA, Papas TS, Hirumi H, Chirigos MA (1973).** Antigenic and biochemical characterization of the C-type particle of the stable porcine kidney cell line PK-15. *J. Virol.*, **12**:1184-1186.
- ◆ **Xu G, Solaiman F, Zink MA, Hodgson CP (2000).** Fusogenic effects of murine retroviruses and cationic enhancers of transduction. *Cancer Gene Therapy*, **7**:53-58.
- ◆ **Yasuda M, Good RA, Day NK (1987).** Influence of inactivated feline retrovirus on feline alpha interferon and immunoglobulin production. *Clin. Exp. Immunol.*, **69**:240-245.
- ◆ **Zaidi A, Schmoeckel M, Bhatti F, Waterworth P, Tolan M, Cozzi E, Chavez G, Langford G, Thiru S, Wallwork J, White D, Friend P (1998).** Life-supporting pig-to-primate renal xenotransplantation using genetically modified donors. *Transplantation*, **65**:1584-1590.
- ◆ **Zhang L, Dailey PJ, He T, Gettie A, Bonhoeffer S, Perelson AS, Ho DD (1999).** Rapid clearance of simian immunodeficiency virus from plasma of rhesus macaques. *J. Virol.*, **73**:855-860.
- ◆ **Zhou DX, Yen TS (1991).** The ubiquitous transcription factor Oct-1 and the liver-specific factor HNF-1 are both required to activate transcription of a hepatitis B virus promotor. *Mol. Cell Biol.*, **11**:1353-1359.
- ◆ **Zwicker J, Gross C, Lucibello FC, Truss M, Ehlert F, Engeland K, Muller R (1995).** Cell cycle regulation of cdc25c transcription is mediated by the periodic repression of the glutamine-rich activators NF-Y and Sp1. *Nucleic Acids Res.*, **23**:3822-3830.

7. ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

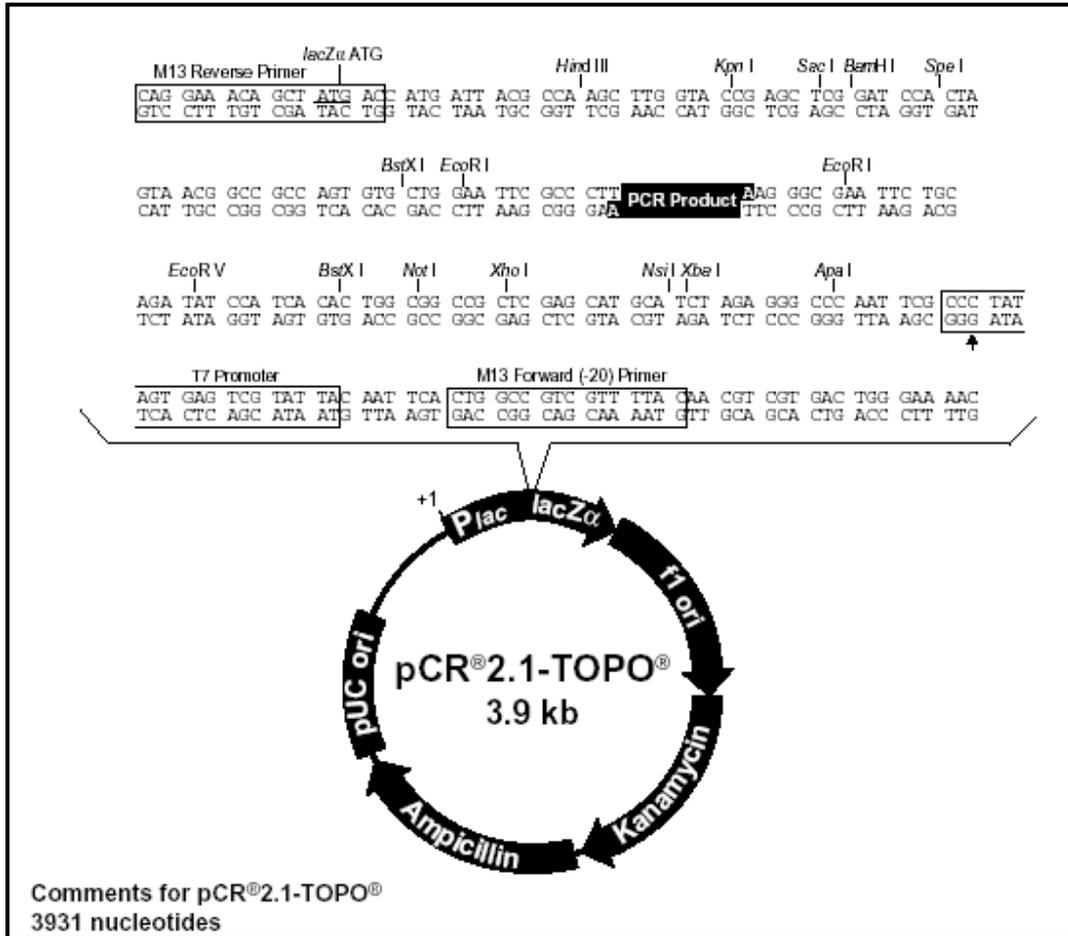
ACE	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AIDS	erworbenes Immundefektsyndrom (acquired immune deficiency syndrome)
ALV	Aviäre Leukose Viren
Amp	Ampicillin
ASLV	Aviäre Sarkom/Leukose Viren
ATCC	American Type Culture Collection
BaEV	Endogenes Pavian-Retrovirus (baboon endogenous retrovirus)
BLV	Bovines Leukämie Virus
bp	Basenpaar (base pair)
BSA	Rinderserum-Albumin (bovine serum albumin)
CA	Kapsidprotein (capsid protein)
cDNA	komplementäre DNA
DAF	decay-accelerating factor
DMF	N, N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EM	Elektronenmikroskopie
EMCV	Porcines Encephalomyocarditisvirus
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
<i>env</i>	Gen des Hüllproteins ENV (envelope)
Env-Protein	Oberflächenhüllprotein (envelope protein)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FDA	Federal Drug Administration

FeLV	felines Leukämievirus
FKS	fötale Kälberserum
FP	Fusionspeptid
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (981 cm ⁻²)
<i>gag</i>	gruppenspezifische Antigene
Gal- α -1,3-gal	Galaktosyl- α -1,3-galaktosyl
GAPDH	Glyceraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase
gp	Glykoprotein
HAR	hyperakute Abstoßungsreaktion (hyperacute rejection)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HTLV	humanes T-Zell Leukämievirus
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IN	Integrase
IPA	Immunperoxidase Assay
IPTG	Isopropylthiogalactosid
Kan	Kanamycin
Kb	Kilobasen
LTR	long terminal repeat
MA	Matrixprotein
MDEV	Mus dunni endogenes Virus
MMTV	Mausmammatumovirus
mRNA	messenger-RNA
MuLV	murines Leukämievirus
NaAC	Natriumacetat
NC	Nukleokapsidprotein (nucleocapsid protein)
OPD	o-Penyldiamin
p	Protein / Plasmid
p15E	Transmembranes Hüllprotein der C-Typ Viren
PB	primer binding Region
PBMC	peripheral blood mononuclear cell

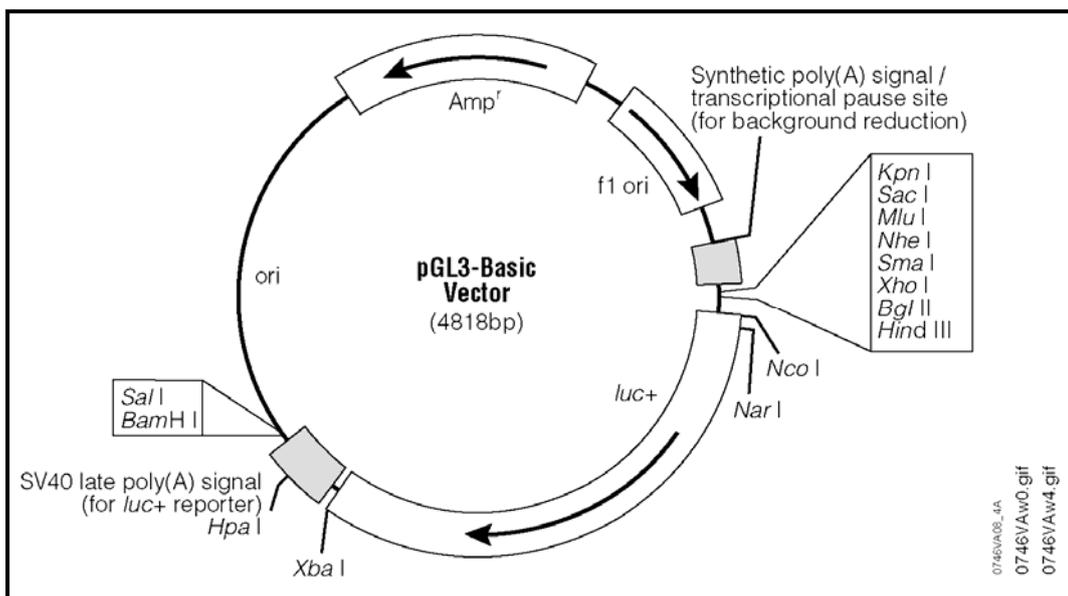
PBS	Phosphat-gepufferte-Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
PCV	Porcines Circovirus
PERV	porzines endogenes Retrovirus
PHA	Phytohämagglutinin
<i>pol</i>	Gen der reversen Transkriptase (Polymerase)
PP	Polypurinstelle
PPV	Schweineparovirus
PR	Protease
R	wiederholte (redundante) Region in der viralen LTR
RNA	Ribonukleinsäure
RSV	Rous Sarcom Virus
RT	Reverse Transkriptase
SA	Spleißakzeptor
SD	Spleißdonor
SIV	simianes Immundefizienzvirus
spf	specified-pathogen-free
SVDV	Swine Vesicular Disease Virus
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TM	transmembranes Hüllprotein / Transmembranbereich
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
U	Einheit (unit)
U3 (5)	besondere (unique) Region am 3'- (5'-) Ende der LTR
UV	Ultraviolett
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
WDSV	Walley Dermal Sarkomvirus
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl B-D-Galactop

7.2 Plasmidkarten

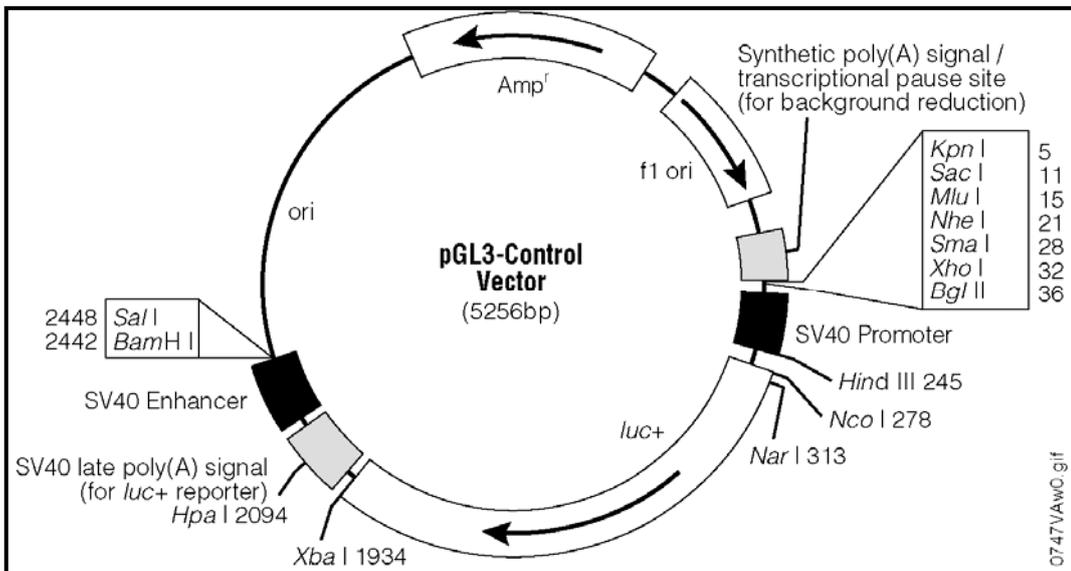
Vektor pCR2.1-TOPO (Invitrogen):



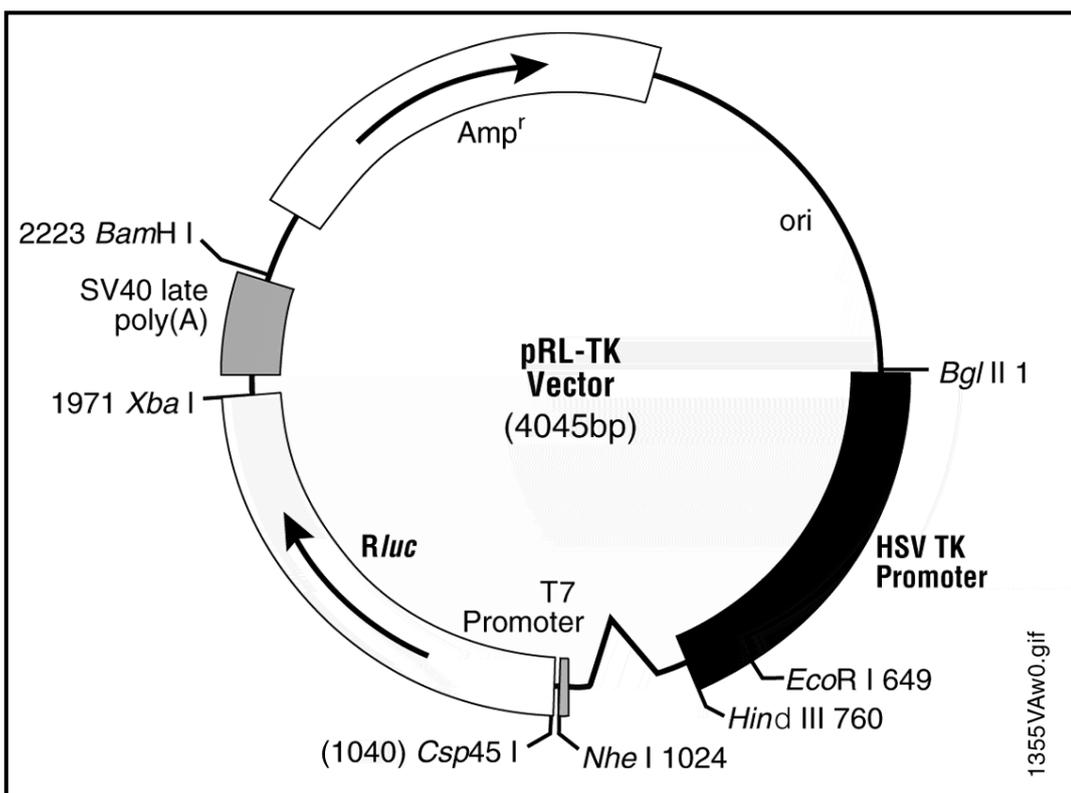
Vektor pGL3-Basic (Promega):



Vektor pGL3-Control (Promega):



Vektor pRL-TK (Promega):



7.3 DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde nur durch die praktische, ideelle und finanzielle Hilfe vieler Menschen möglich, denen ich hiermit für ihre großartige Unterstützung herzlich danken möchte.

Zuerst möchte ich Herrn Dr. J. Denner danken, der mir die Möglichkeit gegeben hat dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe am PEI und dem RKI anzufertigen. Seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft, und seine große Unterstützung bei allen theoretischen und praktischen Problemen hat maßgeblich zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Die angenehme persönliche Zusammenarbeit mit ihm war mir in allen Höhen und Tiefen meiner Forschungstätigkeit eine große Stütze.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Kurth, für die Bereitstellung großer Teile der finanziellen Mittel für die Durchführung dieser Arbeit, und für seine jederzeit wohlwollende Unterstützung meiner Arbeit. Die intensiven Gespräche mit ihm haben für diese Arbeit einen großen Beitrag geleistet.

Des weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. T. Börner danken. Wie Herr Prof. Dr. D. Krüger, Herr Prof. Dr. Lockau und Herr Prof. Dr. Schneider hat er sich spontan dazu bereit erklärt diese Arbeit zu betreuen und zu begutachten.

Mein größter Dank geht an meine Familie, meine Eltern und meine Frau Ilonka, die mich in dieser Zeit moralisch und finanziell unterstützt haben, und mit großer Zuneigung immer wohlwollendes Verständnis für alle meine Anwendungen des ganz normalen Doktoranden-Wahnsinns zeigten.

Mein Dank an das RKI:

Zu aller erst möchte ich meiner Arbeitsgruppe danken, die es mir aufgrund eines phantastischen Arbeitsklimas ermöglichte, die vergangenen drei Jahre gerne und mit viel Spaß zu überstehen. Der Arbeitsgruppe im PEI, Stefan Tacke, Oliver Stephan und Erik Seibold, sei dabei für das kameradschaftliche Arbeiten und die gegenseitige Unterstützung an dieser Stelle besonders gedankt.

Der Arbeitsgruppe im RKI, Uwe Fiebig, Mirco Schmolke, Alexander Karlas und Markus Irgang,

möchte ich ebenfalls für eine tolle Doktoranden-Zeit danken, die auch viele unvergessene private „Highlights“ hatte. Mein besonderer Dank gilt dabei Frau Ulla Thiesen für ihre immer fachgerechte technische Assistenz, da sie auch unter ungewöhnlichen Versuchsbedingungen stets gutgelaunt blieb. Auch Sabrina Kemp möchte ich danken, da ich ohne ihre Fähigkeit spontan Dinge zu organisieren oft in arge Bedrängnis gekommen wäre.

Herrn Dr. S. Norley möchte ich für seine kompetente Beratung in allen praktischen Fragen, sowie für seine Hilfe als „native speaker“ bei der Erstellung meiner Publikationen herzlich danken. Mein Dank gilt auch seiner gesamten Arbeitsgruppe, die mich jederzeit mit Rat und Tat unterstützt hat. Insbesondere Karin Vollhardt, Oliver Hohn und Dörte Radke haben dabei ein besonders großes Dankeschön verdient!!

Ein großer Dank geht an Herrn Dr. M. Özel, mit dessen Zusammenarbeit die ersten Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von PERV entstanden. Für die Bereitstellung dieser Bilder für diese Arbeit, sowie für Publikationen und Kongresse sei ihm hier nochmals besonders gedankt.



Mein Dank an das PEI:

Mein besonderer Dank geht an Herrn Dr. R. Plesker und Herrn Dr. C. Coulibaly, die mir bei der Durchführung der Tierexperimente unschätzbare Hilfe geleistet haben. Ihre tierärztliche Unterstützung und ihre kritische Diskussionsbereitschaft waren elementarer Teil dieser Experimente. Auch sei an dieser Stelle allen Tierpflegern gedankt, die sich über Monate Tag und Nacht um die Versuchstiere gekümmert haben.



Ein weiterer Dank geht an die Leitung des Paul-Ehrlich-Institutes, da mir Herr Prof. Dr. J. Löwer und Herr Prof. Dr. K. Cichutek auch nach unserem Umzug an das RKI die Möglichkeit gaben, die Tierversuche weiterhin am Paul-Ehrlich-Institut durchzuführen.

Ein großer Dank geht an Dr. K. Boller für die Bereitstellung der Transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen von PERV, sowie für sein allzeit intensives Interesse an meiner Arbeit.

Mein Dank an die Kooperationspartner:

An erster Stelle möchte ich Herrn Dr. Henk-Jan Schuurman (Immerge Biotherapeutics, Boston, USA) und der Firma NOVARTIS für die Bereitstellung der in den Tierexperimenten verwendeten Immunsuppressiva danken. Ein besonderes Dankeschön an Henk für seine große Unterstützung bei der Erstellung unserer gemeinsamen Publikationen. In diesem Zusammenhang geht mein besonderer Dank auch an Frau Dr. G. Langford (Novartis Pharma AG, Cambridge, UK). Herrn Dr. C. Patience (Immerge Biotherapeutics, Boston, USA) möchte ich an dieser Stelle für seine große Diskussionsbereitschaft und Unterstützung in allen PERV-Fragen danken, die in vielerlei Hinsicht für meine Arbeit von großer Hilfe war.

Frau Dr. I. Leupi (Novartis Pharma AG, Basel, CH), Frau Dr. I. Hauser (Nephrologische Klinik, Universitätsklinikum, Frankfurt/Main) und Herrn Prof. Dr. F. Pragst (Inst. f. Rechtsmedizin, Charite, Berlin) möchte ich für die Messung der Immunsuppressiva im Plasma der Affen danken.

Frau Dr. C. Wilson (FDA, Bethesda, USA), Herrn Prof. Dr. R. Weiss und Herrn Dr. Y. Takeuchi (WVC, London, UK) und Herrn Prof. Dr. D. Onions (Q-One Biotech Ltd., Glasgow, UK) möchte ich für die Bereitstellung verschiedener Zellen danken, ohne die viele der hier durchgeführten Versuche nicht möglich gewesen wären.

Diese Arbeit wurde teilweise finanziert aus Mitteln des Bundesministeriums für Gesundheit.

Zuletzt möchte ich mich nochmals bei all denen bedanken, mit denen aus anfänglich rein beruflichen Beziehungen auch viele gute private Kontakte und Freundschaften zustande gekommen sind, und ich hoffe dieses Freundschaften auch über die Zeit dieser Arbeit hinaus aufrecht erhalten zu können. Auch danke ich all meinen Freunden für ihre große Anteilnahme an den Freuden und Leiden meiner Doktorarbeit.

7.4 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Volker Specke
Adresse: Hufelandstrasse 14
 10407 Berlin
Telefon: 030-42805255
E-mail: vspecke@aol.de
Geboren am: 03.10.1971 in Bonn
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig



Ausbildungsdaten:

09/1982-06/1991 Gymnasium mit dem Abschluss der allgemeinen Hochschulreife an der Gesamtschule Kronberg
 10/1991-12/1992 Zivildienst
 10/1992-02/1999 Studium der Biologie am Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main mit dem Abschluss des Diplom Biologen.
 Anfertigung der Diplomarbeit im Arbeitskreis Molekulare Entwicklungsbiologie und Biotechnologie von Herrn Prof. Dr. H. D. Osiewacz mit dem Titel: "Untersuchung der kupferabhängigen Genexpression bei dem Ascomyceten *Podospora anserina*".
 05/1999-12/2000 Beginn der Promotionsarbeit am Paul-Ehrlich-Institut, Langen, in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. R. Kurth und Dr. J. Denner.
 12/2000-05/2001 Umzug der Arbeitsgruppe an das Robert Koch-Institut, Berlin, und Fortführung der Promotionsarbeit in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. R. Kurth und Dr. J. Denner.
 . Titel der Promotionsarbeit: "Porcine endogene Retroviren als Risiko bei der Xenotransplantation? Infektionsstudien *in vitro* und Inokulation von Kleintieren und nicht-humanen Primaten *in vivo*."

7.5 Publikationsliste

Denner J, Tacke S, Specke V, Stephan O (1999). Porcine endogene Retroviren: Diagnostika zum Nachweis bei der experimentellen und klinischen Xenotransplantation *Transplantationsmedizin, Suppl.* **1999**:7-8.

Tacke SJ, Specke V, Stephan O, Seibold E, Bodusch K, Denner J (2000). Porcine endogenous retroviruses: Diagnostic assays and evidence for immunosuppressive properties. *Transplantation Proceedings*, **32**:1166.

Specke V, Tacke SJ, Boller K, Schwendemann J, Denner J (2001). Porcine endogenous retroviruses (PERVs): *In vitro* host range and attempts to establish small animal models. *Journal of General Virology*, **82**:837-844.

Specke V, Rubant S, Denner J (2001). Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Virology*, **285**:177-180.

Specke V, Langford G, Schuurman H-J, Coulibaly C, Plesker R, Kurth R, Denner J (2001). Porcine endogenous retroviruses (PERVs): studies on transmission in vitro and inoculation of small animals and non-human primates *in vivo*. *Xenotransplantation* **8**:34-35

Specke V, Plesker R, Coulibaly C, Boller K, Denner J (2002). Productive infection of a mink cell line with porcine endogenous retroviruses (PERVs) but lack of transmission to minks *in vivo*. *Archives of Virology* **147**:305-319.

Denner J, Specke V, Schwendemann J, Tacke SJ (2001). Porcine endogenous retroviruses (PERVs): Adaptation to human cells and attempts to infect small animals and non-human primates. *Annals of Transplantation* **6**:25-33.

Stephan O, Schwendemann J, Specke V, Tacke SJ, Boller K, Denner J (2001). Immunoperoxidase assay (IPA) for the detection of porcine endogenous retroviruses in experimental and clinical xenotransplantation. *Xenotransplantation* **8**:310-316.

Denner J, Tacke SJ, Specke V, Stephan O, Boller K, Schwendemann J (2001) Entwicklung von Testsystemen zum Nachweis porziner endogener Retroviren. *In: Xenotransplantation, Grundlagen, Chancen, Risiken.* Schattauer Verlag. Hrsg. H. Grimm. Stuttgart, New York., in press

Denner J, Specke V, Tacke SJ, Boller K (2001). Porcine endogene Retroviren (PERVs): Erste Tiermodelle, hochsensitive Diagnostika und immunsuppressive Eigenschaften.

Transplantationsmedizin, in press

Specke V, Schuurman H-J, Plesker R, Coulibaly C, Özel M, Langford G, Kurth R, Denner J (2002). Virus safety in xenotransplantation: first exploratory in vivo studies in small laboratory animals and non-human primates. *Transplant Immunology*, in press

Denner J, Specke V, Tacke SJ, Özel M (2002). Porcine endogenous retroviruses (PERVs): Diagnostic assays, adaptation to human cells and infection experiments with small animals and non-human primates. *Transplantationsmedizin*, in press

Denner J, Specke V, Plesker R, Coulibaly C, Langford G, Schuurmann HJ, Bühler C, Meyer T, Breuer S, Karlas A, Kurth R, Ulrichs K (2002).

Porcine endogenous retroviruses and xenotransplantation: Lack of infection in small animals and non-human primates despite immunosuppression and long-term exposure
Transplantation Proceedings, in press

Specke V, Langford GS, Schuurman H-J, Coulibaly C, Plesker R, Galbraith D, Onions DE, Kurth R, Denner J (2002). No evidence for PERV transmission in non-human primates infectible *in vitro*. Submitted to *Virology*

Denner J, Specke V, Karlas A, Bühler C, Meyer T, Breuer S, Popel A, Kurth R, Ulrichs K (2002). No transmission of porcine endogenous retroviruses (PERVs) in a long term pig to rat xenotransplantation model and no infection of immunosuppressed rats. Submitted to *Xenotransplantation*

Tacke JS, Specke V, Denner J (2002). Differences in release and determination of porcine endogenous retroviruses (PERVs) produced by stimulated normal pig blood cells. Submitted to *Intervirology*

Specke V, Schuurman H, Coulibaly C, Plesker R, Özel M, Kurth R, Denner J (2002). Human-adapted PERV is not transmitted to non-human primates *in vivo* neither cell-free nor via cell-cell contact. Submitted to *Xenotransplantation*

Denner J, Specke V, Karlas A, Thiesen U, Özel M, Kurth R (2002). Characterization of human-adapted porcine endogenous retroviruses (PERVs): Increased virus production and changes in LTR length. Submitted to *Journal of General Virology*

Averbeck NB, Borghouts C, Hamann A, Specke V, Osievacz H-D, (2001). Molecular control of copper homeostasis in filamentous fungi: increased expression of a metallothionein gene during aging of *Podospira anserina*. *Molecular and General Genetics* **264**: 604-612

Vorträge

Specke V, Denner J

„*In vitro* Infektionen humaner und nicht-humaner Primatenzellen mit porcinen endogenen Retroviren (PERVs) und Versuche zur Etablierung von Kleintiermodellen“

4. Symposium Xenotransplantation, Schloss Rauischholzhausen, 7.-8. 10. 2000

Specke V, Langford G, Schuurman HJ, Coulibaly C, Plesker R, Kurth R, Denner J

„Porcine endogene Retroviren (PERVs): *In vitro*-Infektionen und Inokulation von Kleintieren und nicht-humanen Primaten“

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Dresden, 14. –17. 3. 2001

Specke V, Langford G, Schuurman HJ, Coulibaly C, Plesker R, Kurth R, Denner J

„Porcine endogenous retroviruses (PERVs): Studies on transmission *in vitro* and inoculation of small animals and non-human primates *in vivo*“

7th Basic Science Symposium of the Transplantation Society, Thun/Bern (CH), 22.-26. 8. 2001

Specke V, Langford G, Schuurman HJ, Coulibaly C, Plesker R, Schwendemann J, Voigt K, Galbraith D, Onions DE, Kurth R, Denner J

„Porcine endogene Retroviren (PERVs) als Risiko bei der Xenotransplantation? Untersuchungen zur Adaptation an humane Zellen *in vitro* und Inokulation von Kleintieren und nicht-humanen Primaten *in vivo*.“

5. Symposium für innovativen Organersatz; Schloss Rauischholzhausen 22.-23.9.2001

Specke V, Langford G, Schuurman HJ, Coulibaly C, Plesker R, Kurth R, Denner J

„Porcine endogenous retroviruses (PERVs): Studies on transmission *in vitro* and inoculation of small animals and non-human primates *in vivo*.“

VI Congress of the International Xenotransplantation Association, Chicago (USA), 29.9.-3.10. 2001

Specke V, Schuurman HJ, Plesker R, Coulibaly C, Özel M, Kurth R, Denner J

“Porcine endogenous retroviruses (PERVs) as a risk in xenotransplantation? First exploratory in vivo studies in non-human primates.”

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Erlangen, 8-11. 4. 2002

Poster

Denner J, Tacke S, Specke V, Stephan O

“Xenotransplantation: Nutzen und Mikrobiologische Risiken.”

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Wien 26.-29.4.2000

Tacke S, Specke V, Stephan O, Berg A, Bodusch K, Seibold E, Kurth R, Denner J

“Porcine endogenous retroviruses (PERVs): Risk for xenotransplantation?”

International Workshop Endogenous retroviruses and evolution of the genome, Moscow, 17.-19. 5. 2000

Denner J, Tacke S, Specke V, Stephan O, Schwendemann J

“Porcine endogenous retroviruses (PERVs) and xenotransplantation”

International Meeting of the Institute of Human Virology, Baltimore, 10.-15. 9. 2000

Specke V, Boller K, Tönjes R, Denner J

„Porcine endogene Retroviren (PERVs): Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Morphologie und Infektion.“

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Dresden, 14. –17. 3. 2001

7.6 Erklärung

Die dieser Dissertation zugrundeliegende Arbeit wurde am Paul-Ehrlich-Institut, Langen, und dem Robert Koch-Institut, Berlin in der Zeit vom 01.05.1999 bis zum 30.04.2002 durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegender Dissertation selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen als Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin den 08.05.2002

Volker Specke

Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Volker Specke
Adresse: Hufelandstrasse 14
10407 Berlin
Telefon: 030-42805255
E-mail: vspecke@aol.de
Geboren am: 03.10.1971 in Bonn
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig



Ausbildungsdaten:

09/1982-06/1991 Gymnasium mit dem Abschluss der allgemeinen Hochschulreife an der Gesamtschule Kronberg
10/1991-12/1992 Zivildienst
10/1992-02/1999 Studium der Biologie am Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main mit dem Abschluss des Diplom Biologen.
Anfertigung der Diplomarbeit im Arbeitskreis Molekulare Entwicklungsbiologie und Biotechnologie von Herrn Prof. Dr. H. D. Osiewacz mit dem Titel: "Untersuchung der kupferabhängigen Genexpression bei dem Ascomyceten *Podospora anserina*".
05/1999-12/2000 Beginn der Promotionsarbeit am Paul-Ehrlich-Institut, Langen, in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. R. Kurth und Dr. J. Denner.
12/2000-05/2001 Umzug der Arbeitsgruppe an das Robert Koch-Institut, Berlin, und Fortführung der Promotionsarbeit in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. R. Kurth und Dr. J. Denner.
. Titel der Promotionsarbeit: "Porcine endogene Retroviren als Risiko bei der Xenotransplantation? Infektionsstudien *in vitro* und Inokulation von Kleintieren und nicht-humanen Primaten *in vivo*."

Berlin, den.....

.....
Volker Specke

Publikationsliste

Denner J, Tacke S, Specke V, Stephan O (1999). Porcine endogene Retroviren: Diagnostika zum Nachweis bei der experimentellen und klinischen Xenotransplantation *Transplantationsmedizin, Suppl. 1999*:7-8.

Tacke SJ, Specke V, Stephan O, Seibold E, Bodusch K, Denner J (2000). Porcine endogenous retroviruses: Diagnostic assays and evidence for immunosuppressive properties. *Transplantation Proceedings, 32*:1166.

Specke V, Tacke SJ, Boller K, Schwendemann J, Denner J (2001). Porcine endogenous retroviruses (PERVs): *In vitro* host range and attempts to establish small animal models. *Journal of General Virology, 82*:837-844.

Specke V, Rubant S, Denner J (2001). Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Virology, 285*:177-180.

Specke V, Langford G, Schuurman H-J, Coulibaly C, Plesker R, Kurth R, Denner J (2001). Porcine endogenous retroviruses (PERVs): studies on transmission *in vitro* and inoculation of small animals and non-human primates *in vivo*. *Xenotransplantation 8*:34-35

Specke V, Plesker R, Coulibaly C, Boller K, Denner J (2002). Productive infection of a mink cell line with porcine endogenous retroviruses (PERVs) but lack of transmission to minks *in vivo*. *Archives of Virology 147*:305-319.

Denner J, Specke V, Schwendemann J, Tacke SJ (2001). Porcine endogenous retroviruses (PERVs): Adaptation to human cells and attempts to infect small animals and non-human primates. *Annals of Transplantation 6*:25-33.

Stephan O, Schwendemann J, Specke V, Tacke SJ, Boller K, Denner J (2001). Immunoperoxidase assay (IPA) for the detection of porcine endogenous retroviruses in experimental and clinical xenotransplantation. *Xenotransplantation 8*:310-316.

Denner J, Tacke SJ, Specke V, Stephan O, Boller K, Schwendemann J (2001)
Entwicklung von Testsystemen zum Nachweis porziner endogener Retroviren.
In: Xenotransplantation, Grundlagen, Chancen, Risiken. Schattauer Verlag. Hrsg. H. Grimm.
Stuttgart, New York., in press

Denner J, Specke V, Tacke SJ, Boller K (2001). Porcine endogene Retroviren (PERVs): Erste Tiermodelle, hochsensitive Diagnostika und immunsuppressive Eigenschaften. *Transplantationsmedizin*, in press

Specke V, Schuurman H-J, Plesker R, Coulibaly C, Özel M, Langford G, Kurth R, Denner J (2002). Virus safety in xenotransplantation: first exploratory in vivo studies in small laboratory animals and non-human primates. *Transplant Immunology*, in press

Denner J, Specke V, Tacke SJ, Özel M (2002). Porcine endogenous retroviruses (PERVs): Diagnostic assays, adaptation to human cells and infection experiments with small animals and non-human primates. *Transplantationsmedizin*, in press

Denner J, Specke V, Plesker R, Coulibaly C, Langford G, Schuurmann HJ, Bühler C, Meyer T, Breuer S, Karlas A, Kurth R, Ulrichs K (2002). Porcine endogenous retroviruses and xenotransplantation: Lack of infection in small animals and non-human primates despite immunosuppression and long-term exposure
Transplantation Proceedings, in press

Specke V, Langford GS, Schuurman H-J, Coulibaly C, Plesker R, Galbraith D, Onions DE, Kurth R, Denner J (2002). No evidence for PERV transmission in non-human primates infectible *in vitro*. Submitted to *Virology*

Denner J, Specke V, Karlas A, Bühler C, Meyer T, Breuer S, Popel A, Kurth R, Ulrichs K (2002). No transmission of porcine endogenous retroviruses (PERVs) in a long term pig to rat xenotransplantation model and no infection of immunosuppressed rats.
submitted to *Xenotransplantation*

Tacke JS, Specke V, Denner J (2002). Differences in release and determination of porcine endogenous retroviruses (PERVs) produced by stimulated normal pig blood cells.
submitted to *Intervirology*

Specke V, Schuurman H, Coulibaly C, Plesker R, Özel M, Kurth R, Denner J (2002). Human-adapted PERV is not transmitted to non-human primates *in vivo* neither cell-free nor via cell-cell contact. submitted to *Xenotransplantation*

Denner J, Specke V, Karlas A, Thiesen U, Özel M, Kurth R (2002). Characterization of human-adapted porcine endogenous retroviruses (PERVs): Increased virus production and changes in LTR length. submitted to *Journal of General Virology*

Averbeck NB, Borghouts C, Hamann A, Specke V, Osievacz H-D, (2001). Molecular control of copper homeostasis in filamentous fungi: increased expression of a metallothionein gene during aging of *Podospira anserina*. *Molecular and General Genetics* **264**: 604-612

Vorträge

Specke V, Denner J

„*In vitro* Infektionen humaner und nicht-humaner Primatenzellen mit porcinen endogenen Retroviren (PERVs) und Versuche zur Etablierung von Kleintiermodellen“

4. Symposium Xenotransplantation, Schloss Rauischholzhausen, 7.-8. 10. 2000

Specke V, Langford GS, Schuurman HJ, Coulibaly C, Plesker R, Kurth R, Denner J

„Porcine endogene Retroviren (PERVs): *In vitro*-Infektionen und Inokulation von Kleintieren und nicht-humanen Primaten“

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Dresden, 14. –17. 3. 2001

Specke V, Langford GS, Schuurman HJ, Coulibaly C, Plesker R, Kurth R, Denner J

„Porcine endogenous retroviruses (PERVs): Studies on transmission *in vitro* and inoculation of small animals and non-human primates *in vivo*“

7th Basic Science Symposium of the Transplantation Society, Thun/Bern (CH), 22.-26. 8. 2001

Specke V, Langford G, Schuurman HJ, Coulibaly C, Plesker R, Schwendemann J, Voigt K, Galbraith D, Onions DE, Kurth R, Denner J

„Porcine endogene Retroviren (PERVs) als Risiko bei der Xenotransplantation? Untersuchungen zur Adaptation an humane Zellen *in vitro* und Inokulation von Kleintieren und nicht-humanen Primaten *in vivo*.“

5. Symposium für innovativen Organersatz; Schloss Rauischholzhausen 22.-23.9.2001

Specke V, Langford GS, Schuurman HJ, Coulibaly C, Plesker R, Kurth R, Denner J

„Porcine endogenous retroviruses (PERVs): Studies on transmission *in vitro* and inoculation of small animals and non-human primates *in vivo*.“

VI Congress of the International Xenotransplantation Association, Chicago (USA), 29.9.-3.10. 2001

Specke V, Schuurman HJ, Plesker R, Coulibaly C, Özel M, Kurth R, Denner J

“Porcine endogenous retroviruses (PERVs) as a risk in xenotransplantation? First exploratory *in vivo* studies in non-human primates.”

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Erlangen, 8-11. 4. 2002

Poster

Denner J, Tacke S, Specke V, Stephan O

“Xenotransplantation: Nutzen und Mikrobiologische Risiken.”

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Wien 26.-29.4.2000

Tacke S, Specke V, Stephan O, Berg A, Bodusch K, Seibold E, Kurth R, Denner J

“Porcine endogenous retroviruses (PERVs): Risk for xenotransplantation?”

International Workshop Endogenous retroviruses and evolution of the genome, Moscow, 17.-19. 5. 2000

Denner J, Tacke S, Specke V, Stephan O, Schwendemann J

“Porcine endogenous retroviruses (PERVs) and xenotransplantation”

International Meeting of the Institute of Human Virology, Baltimore, 10.-15. 9. 2000

Specke V, Boller K, Tönjes R, Denner J

„Porcine endogene Retroviren (PERVs): Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Morphologie und Infektion.“

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Dresden, 14. –17. 3. 2001

Berlin, den

.....

Volker Specke