

**Evaluierung der biologischen Sicherheit von Xenotransplantaten:
Untersuchungen zur Übertragung von porzinen endogenen
Retroviren *in vitro* und *in vivo***

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

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

von
Diplom-Biochemiker, Markus Irgang

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. J. Mlynek

Dekan der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. T. Buckhout, Ph.D.

Gutachter:

Prof. Dr. R. Kurth

Prof. Dr. D. Krüger

PD Dr. T. Wolff

Tag der Einreichung: Dienstag, den 28.09.2004

Tag der mündlichen Prüfung: Mittwoch, den 23.03.2005

Abstrakt:

Einleitung: Die im Genom der Schweine integrierten porzinen endogenen Retroviren (PERV) gehören zu den potentiellen humanpathogenen Erregern, die eines der Risiken bei der Xenotransplantation darstellen. Für die Abschätzung des Infektionsrisikos von PERV sind drei Verfahrensweisen von Bedeutung: Erstens die Evaluierung der PERV-Freisetzung aus porzinen Zellen und Geweben; Zweitens die Etablierung eines *In vivo*-Infektionsmodells und Drittens ein retrospektives Screenen von Patienten. **Methoden:** Die PERV-Expression in Inselzellen von Schweinen der Deutschen Landrasse wurde *in vitro* und *in vivo* evaluiert. Anschließend wurde PERV auf nicht-humanen Primatenzellen passagiert. In einem zweiten Modellversuch wurde murinen Zellen *in vitro* und SCID-Mäusen *in vivo* zellfreies PERV appliziert. Schließlich wurden Seren von Patienten analysiert. **Ergebnisse:** Die untersuchten Inselzellen setzten keine Viruspartikel frei und konnten somit weder humane Zellen noch BALB/c-Mäuse infizieren. Die verwendeten Affenzellen produzierten infektiöses PERV mit geringer Replikation. Weder in den murinen Modellversuchen noch in den untersuchten Patienten wurde eine Übertragung von PERV beobachtet. **Schlussfolgerung:** Schweine der Deutschen Landrasse könnten als Ausgangsbasis für die Zucht sicherer Schweine für die Xenotransplantation dienen. Da keine Infektion verschiedener muriner Zellen mit PERV beobachtet wurde, muss angenommen werden, dass Publikationen anderer Arbeitsgruppen, die eine PERV-Infektion in SCID-Mäusen diagnostizierten, ein falsch-positives Ergebnis aufgrund von Mikrochimärismus oder aufgrund von Pseudotypisierungen mit murinen endogenen Retroviren wiedergeben. Unsere Befunde werden dadurch erhärtet, dass der Rezeptor für PERV-A auf murinen Zellen nicht exprimiert wird und diese auch *in vitro* nicht infiziert werden konnten. In Übereinstimmung mit den weltweit etwa 200 behandelten Patienten konnte auch in den beiden neuen Studien keine Übertragung von PERV festgestellt werden.

Schlagwörter: Porzine endogene Retroviren, Xenotransplantation, Transmission, Tiermodell

Abstract:

Objective: Porcine endogenous retroviruses (PERVs) are integrated in the porcine genome and are able to infect human cells *in vitro*. Therefore, PERVs are one of the possible pathogens which poses a risk for xenotransplantations. In this study three significant methods were used to evaluate the infectious risk of PERV: The release of PERV particles from porcine cells and tissues, the formation of an *in vivo* infection model and a retrospective screening of patients. **Methods:** Islet cells from german landrace pigs were co-cultivated with human cells *in vitro* and were transplanted in BALB/c mice *in vivo*. Serial passaging experiments were performed with nonhuman primate cells. Murine cells were incubated *in vitro* and SCID mice *in vivo* with PERV. Sera of patients who were treated *ex vivo* with porcine liver cells and who had received islet cells were investigated for antibodies against PERV. **Results:** No virus release were observed in german landrace islet cells, thus they were neither able to infect human cells nor BALB/c mice. The used nonhuman primate cells released low replicating PERVs. None of the murine cells could be infected by PERV and no provirus integration was observed in different SCID mice organs. PERV-specific antibodies were found in none of the investigated patients. **Conclusion:** German landrace pigs could be used as a source for breeding safe genetically modified pigs suitable for xenotransplantation. Since there were no detectable PERV infection of different murine cells and SCID mice, it have to be supposed, that previously reported PERV transmissions to SCID mice might be due to microchimerism or to pseudotyping of murine endogenous retroviruses. Our results were confirmed by the fact, that the receptor for PERV-A is not expressed on murine cells and that these cells could not be infected *in vitro*. The absence of a PERV transmission in the investigated patients, correspond to the results obtained from approximately twohundred treated patients worldwide.

Keywords: Porcine endogenous retroviruses, Xenotransplantation, Transmission, Animal model

1.	EINLEITUNG	7
1.1	Xenotransplantation	7
1.2	Tiere als Organquelle für die Xenotransplantation	7
1.3	Retroviren	15
1.3.1	Aufbau retroviraler Viruspartikel	17
1.3.2	Genomaufbau der Retroviren	18
1.3.3	Retrovirale Proteine	19
1.4	Porzine endogene Retroviren	22
1.5	Zielsetzung	26
2.	MATERIAL UND METHODEN	28
2.1	Zellbiologische Methoden	28
2.1.1	Primäre Zellen und Zelllinien	28
2.2	Molekularbiologische Methoden	31
2.2.1	Proteinisolierung	31
2.2.2	Rekombinante virale Proteine und Peptide	31
2.2.3	Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
2.2.4	DNA Isolierung aus Zellen und Geweben	33
2.2.5	RNA Isolierung aus Zellen und Geweben	34
2.2.6	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	34
2.2.7	Sensitivität der verwendeten Primer	35
2.2.8	RT-PCR	36
2.3	Immunologische Methoden	36
2.3.1	PERV-spezifische Antiseren	36
2.3.2	Spezies-spezifische Antikörper	37
2.3.3	Western Blot	37
2.3.4	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)	38
2.3.5	Durchflusszytometrie	39
2.4	Virologische Methoden	39
2.4.1	Virusisolate	39
2.4.2	Isolierung von Viruspartikeln aus Zellkulturüberständen	40
2.4.3	Bestimmung der Reversen Transkriptase Aktivität	40
2.4.4	Infektionsstudien <i>in vitro</i>	40
2.4.5	Infektionsstudien <i>in vivo</i>	41

2.4.6	Klinische Studien	42
3.	ERGEBNISSE	45
3.1	Keine Übertragung von PERV auf humane Zellen nach Kokultivierung mit porzinen Inselzellen der Deutschen Landrasse	45
3.2	Keine Infektion von BALB/c-Mäusen mit PERV nach Transplantation verkapselter Inselzellen der Deutschen Landrasse	47
3.3	Analyse der Expression PERV-spezifischer mRNA und Proteine in Inselzellen der Deutschen Landrasse.....	48
3.4	Untersuchung der Infektion von Zelllinien nicht-humaner Primaten mit PERV	50
3.5	Etablierung einer Methode zur Detektion von gespleißter und ungespleißter PERV-spezifischer mRNA	53
3.6	Analyse der Expression ungespleißter und gespleißter mRNA von PERV in infizierten Zelllinien nicht-humaner Primaten	55
3.7	Analyse der Replikationsfähigkeit des an Affenzellen adaptierten PERV-A/C.....	57
3.8	Keine Übertragung von PERV auf murine Zellen <i>in vitro</i>	59
3.9	Keine Infektion von SCID-Mäusen mit PERV-A/C <i>in vivo</i>	61
3.10	Höhere Sensitivität neuer Nachweismethoden durch Verwendung rekombinanter viraler Proteine	62
3.11	Keine Übertragung von PERV auf Patienten nach extrakorporealer Leberunterstützung.....	64
3.12	Antikörper gegen porcine Leberproteine in Patienten, die mit einem extrakorporealen Leberunterstützungssystem behandelt wurden	68
3.13	Keine Übertragung von PERV auf Patienten nach Transplantation porciner Inselzellen	70
4.	DISKUSSION	72
4.1	Evaluierung der PERV-Freisetzung aus porzinen Inselzellen der Deutschen Landrasse <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	72
4.2	Versuche der Etablierung eines <i>In vivo</i> -Infektionsmodells mit nicht-humanen Primaten	74
4.3	Versuche zur Etablierung eines <i>In vivo</i> -Infektionsmodells mit Kleintieren.....	80
4.4	Retrospektive Untersuchung von Patienten, die mit porzinen Zellen und Geweben behandelt wurden	82
5.	ZUSAMMENFASSUNG	88

6.	LITERATUR	90
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	116
8.	ANHANG	118
8.1	Danksagung.....	118
8.2	Erklärung.....	119

1. Einleitung

1.1 Xenotransplantation

Durch die stete Zunahme erfolgreicher Transplantationen in den letzten Jahrzehnten besteht heute ein Mangel an verfügbaren Spenderorganen, so dass etwa ein Viertel der Patienten, die auf ein Transplantat warten, im Verlauf ihrer Wartezeit versterben. Neben der Entwicklung künstlicher Organe (Malchesky, 2004) und der Herstellung von Geweben aus körpereigenen Zellen mittels Tissue Engineering (Tanczos, et al., 1999) hat die moderne Medizin auf der Suche nach Alternativen zur Allotransplantation die Forschung auf dem Gebiet der Xenotransplantation in den letzten Jahren intensiviert. Die Xenotransplantation könnte eine Möglichkeit bieten, den akuten Organmangel zumindest zeitweise zu verringern. Unter Xenotransplantation versteht man die Transplantation und Implantation von Zellen, Geweben und Organen einer Spezies in eine andere. In Erweiterung der Definition wird auch der *ex vivo* Kontakt von Körperflüssigkeiten, Zellen, Geweben und Organen einer Spezies mit denen einer anderen Spezies als Xenotransplantation bezeichnet. Die Xenotransplantation hat gegenüber der Allotransplantation einige potentielle Vorteile: Erstens bietet sie eine beinahe unbegrenzte Quelle an Zellen, Geweben und Organen, zweitens ist die Zeitplanung nicht mehr von der unvorhersehbaren Verfügbarkeit eines Spenderorgans abhängig, was eine bessere Planung der Organentnahme für die sofortige Transplantation als auch eine immunologische Vorbehandlung des Empfängers, falls nötig, erlaubt, und drittens das Risiko einer Infektion kann minimiert werden durch die Kontrolle von möglichen Pathogenen, denen die Spendertiere in der Haltung ausgesetzt sind, und durch intensive Voruntersuchungen vor der Organentnahme. Jedoch birgt die Xenotransplantation auch zahlreiche Risiken. Diese beinhalten immunologische Komplikationen, wie das Risiko der hyperakuten und akuten vaskulären Abstoßung, was möglicherweise eine erhöhte Immunsuppression erfordert, die wiederum das Risiko einer größeren Infektionsgefahr birgt. Weiterhin besteht das Risiko einer möglichen Infektion mit Pathogenen über die Grenzen einer Spezies hinaus. Schließlich bestehen zahlreiche ethische, rechtliche und soziale Bedenken gegen die Xenotransplantation.

1.2 Tiere als Organquelle für die Xenotransplantation

Die immunologische Akzeptanz eines Xenotransplantates ist direkt proportional zu der phylogenetischen Entfernung zwischen dem Spendertier und dem humanen Rezipienten. Xenotransplantate von nicht-humanen Primaten, im Besonderen von Schimpansen, die phylogenetisch dem Menschen am nächsten sind, bergen die geringsten immunologischen

Risiken. Von diesem Standpunkt aus stellen nicht-humane Primaten die ideale Spezies als Donor von Zellen, Geweben und Organen für die Xenotransplantation dar. Allerdings ist die Verwendung von Xenotransplantaten nicht-humaner Primaten mit besonderen Herausforderungen verbunden. So könnte die phylogenetische Nähe einerseits die immunologische Akzeptanz eines Xenotransplantates nicht-humaner Primaten erleichtern, andererseits jedoch die Infektion eines Menschen mit einem infektiösen Material ermöglichen (Allan, 1998). Die Übertragung von Pathogenen über die Speziesgrenzen hinaus wird Zoonose, im Spezialfall der Xenotransplantation auch Xenose genannt. Zu den Beispielen verheerender humaner Krankheiten, die von nicht-humanen Primaten übertragen wurden, gehören HIV-1 von Schimpansen (Gao, et al., 1999), HIV-2 von Rauchgrauen Mangaben (Daniel, et al., 1987), das Marburg Virus von afrikanischen grünen Meerkatzen (Smith, et al., 1967) und das cercopithicine Herpes Virus 1 (B Virus) von Makakken (CDC, 1998). Jedoch haben auch andere Spezies, die nicht zu den Primaten gehören, gefährliche Krankheiten auf den Menschen übertragen, wie zum Beispiel die Nipah Virus induzierte Encephalitis vom Schwein (Paton, et al., 1999), das pulmonäre Syndrom von Hantaviren der Maus (Chapman and Khabbaz, 1994) und SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) von Coronaviren der Zibetkatze (Drosten, et al., 2003; Ksiazek, et al., 2003; Kuiken, et al., 2003). Zusätzlich zu dem Risiko, dass infektiöses Material nicht-humaner Primaten aufgrund der phylogenetischen und immunologischen Nähe zum Menschen einen Vorteil bei der Etablierung einer Infektion im Menschen haben wird, erhöht sich das Risiko einer Infektion des Menschen durch persistierende Viren, die in nicht-humanen Primaten bisher nicht erkannt wurden. Nicht-humane Primaten sind oft mit persistierenden Viren infiziert, die in den Spezies, in denen sie endemisch sind, keine offensichtlichen Krankheiten verursachen, aber gefährliche Krankheiten in Menschen oder anderen nicht-humanen Primaten auslösen können, zum Beispiel das cercopithicine Herpes Virus 1, das in Makakken apathogen ist, aber im Menschen und anderen Primaten schwere Encephalitis verursachen kann (CDC, 1998; Holmes, et al., 1995); das simiane hämorrhagische Fieber Virus, das unauffällig in Patas Affen persistiert, aber in Makakken fatale hämorrhagische Krankheiten verursacht (Dalgard, et al., 1992); und das simiane Immunschwäche Virus (SIV), das keine Immunschwäche-Krankheit in Rauchgrauen Mangaben auslöst, aber in Makakken (Daniel, et al., 1987). Zusätzlich persistieren in nicht-humanen Primaten Retroviren, die sich nur schwer oder gar nicht aus einer Population eliminieren lassen. Das Genom des simianen Foamy-Virus (SFV) ist latent in allen Zellen der natürlich infizierten afrikanischen grünen Meerkatzen vorhanden, während die Replikation viraler Partikel nur in der Mundschleimhaut beobachtet werden

kann. Somit ist das SFV in vielfachen Kopien in den Sekreten des Mundes der afrikanischen grünen Meerkatze präsent und kann einfach von Primat zu Primat übertragen werden, ohne sexuelle oder elterliche Exposition (Falcone, et al., 1999). Das Ergebnis daraus ist, dass bei fast allen gefangenen nicht-humanen Primaten eine SFV-Infektion vorhanden ist. Deshalb würde der Versuch, eine SFV-freie Zucht für die Xenotransplantation zu entwickeln, einen erheblichen finanziellen und zeitlichen Aufwand erfordern, und bliebe möglicherweise doch erfolglos. Phylogenetische Analysen von SFV zeigen, dass das Virus Spezies-spezifische Gruppen bildet, die auf eine Koevolution von bestimmten SFV mit bestimmten Primatenspezies hindeuten. Trotz der Spezies-spezifischen Eigenschaften von SFV, sind einige Spezies-übergreifende Infektionen von Menschen mit SFV von Pavianen, afrikanischen grünen Meerkatzen und Schimpansen dokumentiert (Heneine, et al., 1998b; Schweizer, et al., 1997). Doch wurden bisher keine SFV-assoziierten Krankheiten oder Transmissionen von Mensch zu Mensch in Verbindung mit SFV-infizierten Individuen beobachtet. Eine große Anzahl von Altwelt-Affen, einschließlich des Pavians, sind mit dem simianen T-lymphotropen Virus (STLV) infiziert, das mit dem humanen T-lymphotropen Virus Typ 1 (HTLV-1) nahe verwandt ist (Chikobaeva, et al., 1993; Gessain and de The, 1996; Mone, et al., 1992). Eine HTLV-1 Infektion ist mit einer lymphoproliferativen Krankheit und Myelopathie verbunden (Manns, et al., 1999). Aufgrund der Ähnlichkeit von STLV zu HTLV, könnte das STLV durch eine Transplantation leicht übertragen werden. Sequenzen des exogenen simianen Retrovirus (SRV), das in asiatischen Makakken gefunden wurde und Immunschwäche-Krankheiten verursacht (Lerche, et al., 1987), wurden in Tumorgewebe nachgewiesen (Grant, et al., 1995). Schließlich findet man bei Pavianen ein endogenes Retrovirus (Baboon endogenous Retrovirus, BaEV) im Genom integriert. BaEV kommt in verschiedenen Varianten vor (Todaro, et al., 1974b; van der Kuyl, et al., 1996), es ist im Genom jeder Zelle des Pavians vorhanden und es ist in der Lage, Zelllinien anderer Spezies zu infizieren (Huang, et al., 1989).

Obwohl Versuche, spezifiziert Pathogen-freie (SPF) Kolonien nicht-humaner Primaten für Forschungszwecke zu entwickeln, zu einigen kleinen Kolonien führten, mit Tieren, die frei von einer limitierten Anzahl an Viren waren, bleiben diese Zuchtmethoden hinter denen von SPF Schweinen zurück. Die lange Zeitspanne zwischen Geburt und sexueller Reife, die verlängerte Tragezeit, die geringe Nachkommenschaft (im Allgemeinen ein Junges pro Geburt) und die komplexen sozialen Erfordernisse von nicht-humanen Primaten, erhöhen deutlich die Zeit und die Kosten, die benötigt werden, um Kolonien zu entwickeln, die genauso frei von Infektionen sind wie die industriell gezüchteter SPF Schweine. Als Folge

davon bleibt die endemische, mikrobielle Flora in den existierenden Populationen nicht-humaner Primaten weniger gut definiert und die Möglichkeit, den Kontakt zu infektiösen Mikroorganismen oder Viren zu limitieren bleibt undurchführbar, im Vergleich zu domestizierten Arten wie dem Schwein. Auch andere Betrachtungsweisen schränken die potentielle Verwendung von nicht-humanen Primaten als Quelle von Xenotransplantaten ein. Viele Menschen sind der Ansicht, dass die phylogenetische Nähe von nicht-humanen Primaten zum Menschen und deren intellektuelle und soziale Komplexität eine besondere ethische Betrachtung verdient (Nuffield Council on Bioethics, 1996). Besonders die Nutzung von Schimpansen, die mit dem Menschen am nächsten verwandt sind, in therapeutischen Anwendungen ist durch ihren Status als gefährdete Art fragwürdig. Aufgrund der oben genannten Gründe werden zukünftige Xenotransplantationen möglicherweise mit Zellen, Geweben und Organen des Schweins durchgeführt.

Die Organe eines ausgewachsenen Minischweins erreichen eine Größe, die sie potentiell kompatibel mit den Organen eines erwachsenen Menschen machen. Die Lebenserwartung eines Schweins von ungefähr dreißig Jahren ist ebenfalls akzeptabel für die Verwendung von Xenotransplantaten in erwachsenen Menschen (Sachs, 1994). Trotz der geringen phylogenetischen Übereinstimmung werden biologische Produkte vom Schwein effektiv zur Therapie von einigen humanen Erkrankungen, wie zum Beispiel das porcine Insulin bei Diabetes oder der porcine Gerinnungsfaktor VIII bei der Behandlung von Hämophilie, verwendet. Die frühe sexuelle Reife, die relativ kurze Tragezeit und die große Anzahl an Nachkommen, erlaubt eine schnelle, logistisch und funktionell durchführbare Etablierung von großen Zuchtherden mit SPF Schweinen. Die weitverbreitete gesellschaftliche Akzeptanz zur Verwendung von Schweinen als Lebensmittel lässt auch auf eine breite gesellschaftliche Toleranz bei der Nutzung von Schweinen für medizinische Zwecke hoffen. Zusätzlich könnte die Tatsache, dass Menschen und Schweine schon seit Tausenden von Jahren eng nebeneinander koexistieren, dafür sprechen, dass Schweine ein geringeres Infektionsrisiko als Quelle von Organspendern für Menschen darstellen als nicht-humane Primaten. Im Gegensatz zu der Situation mit nicht-humanen Primaten sind die Zuchtmethoden zur Generierung und Überwachung von SPF-Schweineherden weit entwickelt. Allerdings bestehen Bedenken darüber, ob die anatomischen und physiologischen Unterschiede zwischen Menschen und Schweinen nicht deren Einsatzmöglichkeiten auf einige wenige klinische Anwendungen beschränkt (Cooper, et al., 2002; Hammer and Thein, 2002; Soin, et al., 2001). Die geringere phylogenetische Übereinstimmung zwischen Menschen und Schweinen führt des Weiteren zu einigen immunologischen Komplikationen.

Eines der größten Hindernisse ist die Abstoßung des Xenotransplantats durch die angeborene und adaptive Immunität des Rezipienten. Es lassen sich mindestens drei verschiedene Arten der Abstoßung definieren: Erstens die hyperakute Abstoßung, die schon Minuten nach der Transplantation einsetzen kann, zweitens die akute vaskuläre oder verzögerte Xenotransplantat-Abstoßung, die frühestens 24 Stunden nach der Transplantation einsetzt bzw. erst nach 3 bis 4 Tagen beginnt, wenn die hyperakute Abstoßung verhindert werden konnte, und drittens die zellvermittelte Abstoßung, die nach einigen Tagen oder Wochen in vaskularisierten Spenderorganen einsetzen kann, wenn die hyperakute und akute vaskuläre Abstoßung überwunden werden konnten. Über die Mechanismen, die zu einer akuten vaskulären und im weiteren Verlauf zu einer zellvermittelten Abstoßung eines Xenotransplantates führen, ist noch wenig bekannt (Buhler, et al., 1999; Dooldeniya and Warrens, 2003; Dorling, 2003; Logan, 2000). Im Gegensatz dazu sind die Mechanismen der hyperakuten Abstoßung relativ genau untersucht worden. Bei der hyperakuten Abstoßung werden die endothelialen Zellen des Xenotransplantats durch im Blut des Empfängers zirkulierende xenoreaktive Antikörper gebunden und durch die anschließende Aktivierung der Komplement-Kaskade zerstört (Sachs, et al., 2001). Die für die hyperakute Abstoßung hauptsächlich verantwortlichen Antikörper sind gegen das Karbohydrat-Epitop Galaktose- $\alpha(1-3)$ -Galaktose ($\text{Gal}\alpha 1-3\text{Gal}$) gerichtet und über 80% der Komplement-fixierenden xenoreaktiven Antikörper in Humanseren erkennen dieses Epitop (Parker, et al., 1994). Anti- $\text{Gal}\alpha 1-3\text{Gal}$ -Antikörper werden im Menschen und Altwelt-Affen ein Leben lang produziert, machen etwa 1% der zirkulierenden Immunglobuline im Körper aus (Galili, 2001) und aktivieren effizient die Komplement-Kaskade (Mollnes and Fiane, 2003). Deshalb beruhen die Strategien zur Prävention der hyperakuten Abstoßung auf der Neutralisierung der Effekte der Anti- $\text{Gal}\alpha 1-3\text{Gal}$ -Antikörper und des Komplements.

Die Anti- $\text{Gal}\alpha 1-3\text{Gal}$ -Antikörper lassen sich eliminieren durch Plasmaphorese (Byrne, et al., 2002; Kobayashi, et al., 2000), durch Immunadsorption von Immunglobulinen (Brenner, et al., 2000) oder spezifischen Anti-Schwein-Antikörpern (Lucchiari, et al., 1997) und durch Anti- $\text{Gal}\alpha 1-3\text{Gal}$ -Immunaффinitätschromatographie (Xu, et al., 1998). Der Effekt dieser Methoden ist jedoch transient, da Antikörper kontinuierlich produziert werden. Darum wurden Versuche unternommen, das $\text{Gal}\alpha 1-3\text{Gal}$ -Antigen zu reduzieren oder zu entfernen. Dazu zählen Versuche wie enzymatische Behandlungen, um die Expression des $\text{Gal}\alpha 1-3\text{Gal}$ -Antigens auf Endothelzellen zu vermindern (Ogawa, et al., 2002) oder durch single-chain-Antikörper (Sepp, et al., 1999; Vanhove, et al., 1998), durch genetische Modifikationen des

Donors und durch Induktion der Toleranz im Rezipienten (Tanemura, et al., 2002), die intrazelluläre α 1-3Galaktosyltransferase zu neutralisieren. Genetische Modifikationen beinhalten die Generierung transgener Schweine, die das Gen für die humane Fukosyltransferase in sich tragen (Costa, et al., 2002; Osman, et al., 1997; Sharma, et al., 1996) oder die Herstellung von Schweinen, bei denen das Galaktosyltransferase-Gen entfernt wurde, sogenannte Galaktosyltransferase Knock-out-Schweine (Lai, et al., 2002; Phelps, et al., 2003). Die Inhibierung der Komplement-Kaskade umfasst lösliche und membrangebundene Komplementregulatoren (Mollnes and Fiane, 2003). Zu den wichtigsten membrangebundenen Komplement-regulierenden Proteinen gehören CD46 (Membrane cofactor protein, MCP), CD55 (Decay accelerating factor, DAF) und CD59 (Protectin). Mit diesen humanen Komplement-inhibierenden Proteinen wurden transgene Schweine entwickelt, die entweder nur eins oder mehrere dieser Proteine exprimieren (Costa, et al., 2002; Cozzi and White, 1995; Langford, et al., 1996; Lavitrano, et al., 2002; Storck, et al., 1997). Bei der Transplantation von Organen solcher transgener Schweine in Primaten konnte die hyperakute Abstoßung verzögert werden (Byrne, et al., 1997; Cozzi, et al., 2000; Schmoeckel, et al., 1998; Schuurman, et al., 2002).

Die Beeinflussung der Expression des Gal α 1-3Gal-Antigens und die Einführung von humanen Komplement-regulierenden Proteinen in genetisch veränderten Schweinen, könnten auch negative Konsequenzen haben. So ist das Gal α 1-3Gal-Antigen möglicherweise bei der Abwehr von bestimmten Viren wichtig (Welsh, et al., 1998). Zusätzlich dienen CD46 und CD55 als Rezeptoren für humantropen Viren, wobei CD46 von Masernviren und CD55 von Echoviren und Coxsackie B Picornaviren als Rezeptoren verwendet werden (Bergelson, et al., 1994; Dorig, et al., 1993; Shafren, et al., 1995). Dadurch könnten CD46- und CD55-transgene Schweine empfänglich für diese humanen Erreger werden. Andererseits könnten sich tierische, Masernvirus-ähnliche Viren und tierische Picornaviren an die humanen Komplement-regulierenden Proteine adaptieren und somit Menschen infizieren (Weiss, 1998). Zu den Viren, die in den letzten Jahren in Schweinen identifiziert wurden und möglicherweise im Menschen als Pathogen wirken könnten, gehören: das porcine Cytomegalovirus (PCMV), das lymphotrope Herpesvirus (PLHV), das Torovirus, das Hepatitis E Virus (HEV), das Schweine-Influenza-Virus, das Encephalomyocarditis Virus (EMCV), das Circovirus und das Rotavirus (Tab. 1). Das porcine Cytomegalovirus ist in der Schweinepopulation endemisch (Fryer, et al., 2001). Es hat die Fähigkeit, nach einer primären Infektion lebenslang im Wirt zu verbleiben, was mit einer latenten Phase und periodisch

auftretender Virusproduktion verbunden sein kann, die potentiell eine Erkrankung verursachen könnte. Normalerweise sind keine klinischen Symptome mit einer endemischen PCMV Infektion verbunden, obwohl das Virus Totgeburten, Rhinitis und Pneumonien auslösen kann (Clark, et al., 2003).

Tabelle 1: Mögliche humanpathogene porcine Viren

Virus	Virusfamilie	Pathogenität im Menschen	Referenz
Porzines Cytomegalovirus (PCMV)	<i>β-Herpesviridae</i>	Risiko der Transmission und Pathogenität unbekannt	Fryer et al., 2001; Clark et al., 2003
Porzines lymphotropisches Herpesvirus (PLHV)	<i>γ-Herpesviridae</i>	Risiko der Transmission und Pathogenität unbekannt	Ehlers et al., 1999; Chmielewicz et al., 2003
Porzines Torovirus	<i>Coronaviridae</i>	Risiko der Transmission und Pathogenität unbekannt	Kroneman et al., 1998
Porzines Hepatitis E Virus	Nicht klassifiziert	Lebererkrankung, Hepatitis	Meng et al., 1997, 1998; Halbur et al., 2001
Schweine Influenza Virus	<i>Orthomyxoviridae</i>	Grippe (Influenza)	Wells et al., 1991; Taubenberger et al., 1997
Porzines Encephalomyocarditis Virus (EMCV)	<i>Picornaviridae</i>	Fieber, Delirium, Kopfschmerzen, Erbrechen	Brewer et al., 2001
Porzines Circovirus	<i>Circoviridae</i>	Risiko der Transmission und Pathogenität unbekannt	Mankertz et al., 1997, 2000
Porzines Rotavirus	<i>Rotaviridae</i>	Diarrhö	Santos et al., 1999

Zusätzlich ist PCMV nah mit den humanen Herpesviren 6 und 7 (HHV-6 und -7) und humanem CMV verwandt (Goltz, et al., 2000; Rupasinghe, et al., 2001). Dies könnte ein mögliches Risiko bei der Xenotransplantation von Schweineorganen in den Menschen bedeuten, da gezeigt werden konnte, dass bei der Transplantation von porcinen Organen in Paviane neben PCMV auch CMV vom Pavian aktiviert wurde (Mueller, et al., 2002).

Allerdings war die Expression von PCMV und CMV vom Pavian hauptsächlich auf Spezies-spezifisches Gewebe konzentriert. Schließlich konnte keine Übertragung von PCMV auf humane Zelllinien bei Kokultivierungsexperimenten festgestellt werden (Tucker, et al., 1999). Von PLHV existieren drei Subtypen PLHV-1, -2 und -3 (Chmielewicz, et al., 2003; Ehlers, et al., 1999), die häufig im Blut und lymphoiden Organen von domestizierten und wilden Schweinen aus verschiedenen geographischen Standorten gefunden werden. Im Blut werden die PLHV hauptsächlich in B-Zellen gefunden. Sie sind dort weitverbreitet und verursachen wahrscheinlich eine persistierende B-lymphotrope Infektion. Da PLHV-1 an der Entstehung einer porzinen lymphoproliferativen Erkrankung (Posttransplant lymphoproliferative disease, PTLD) beteiligt zu sein scheint (Goltz, et al., 2002), die nach einer allogenen Transplantation porziner hämatopoietischer Stammzellen auftreten kann, sind die porzinen lymphotropen γ -Herpesviren bei der Verwendung von Schweinen in der Xenotransplantation besonders zu beachten. Jedoch wurde in der Literatur bisher noch von keiner Übertragung von PLHV bei einer Transplantation von Schwein zu Primaten berichtet. Das porzine Torovirus ist mit den equinen und bovinen Toroviren nahe verwandt und wird in den Exkrementen von Ferkeln gefunden (Kroneman, et al., 1998). Im Menschen sind Toroviren mit einer Gastroenteritis verbunden (Jamieson, et al., 1998) und eine Übertragung von porzinen Toroviren auf den Menschen könnte ähnliche Auswirkungen haben. Das porzine HEV ist weitverbreitet in der allgemeinen Schweinepopulation, führt aber bei jungen Schweinen zu keinen sichtbaren klinischen Symptomen (Meng, et al., 1997). Es ist dem humanem HEV sehr ähnlich und ist in der Lage, nicht humane Primaten *in vivo* zu infizieren bzw. lassen sich SPF Schweine mit humanem HEV infizieren (Halbur, et al., 2001; Meng, et al., 1998). Allerdings konnten in einer untersuchten SPF-Schweineherde keine Antikörper gegen porzines HEV gefunden werden (Meng, et al., 1997). Schweine-Influenza-Viren sind in fast jeder Herde zu finden und sorgen meist im Herbst für einen Ausbruch der Erkrankung, die bereits nach einigen Tagen abklingt (Paul, et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass porzines Influenza-Virus die Speziesbarrieren überwinden und auch Menschen infizieren kann (Wells, et al., 1991). Zusätzlich dienen Schweine für die Influenza-Viren als Zwischenstation zur Generierung neuer Virenstämme, die durch genetische Neuordnung des viralen Genoms entstehen. Schließlich wird vermutet, dass der Schweine-Influenza-Virus Subtyp H1N1 für den Tod von 20 Millionen Menschen verantwortlich ist, die bei der Influenza Pandämie von 1918 gestorben sind (Taubenberger, et al., 1997). Da porzines EMCV in vielen Schweinepopulationen endemisch ist, gehören Schweine zu den am häufigsten infizierten Tieren (Billinis, et al., 1999). EMCV verursacht akute Myocarditis und den plötzlichen Tod

von jungen Schweinen, während die Infektion über die Plazenta von Säuen mit fötaler Mummifikation und Aborten verbunden ist (Joo, 1999). Die Infektion von älteren Schweinen verläuft asymptomatisch. Trotz fehlender Studien zur Bestimmung der porzinen Zellen, in denen die EMCV-Replikation stattfindet und EMCV möglicherweise persistiert, konnte gezeigt werden, dass die Titer von EMCV im Herzen, in der Leber und in den Nieren höher sind als im Blut (Craighead, et al., 1963). Studien deuten darauf hin, dass EMCV auch andere Spezies infizieren kann (Hubbard, et al., 1992; Knowles, et al., 1998; Reddacliff, et al., 1997). So ist porzines EMCV in der Lage, primäre humane Myocardiozyten *in vitro* zu infizieren (Brewer, et al., 2001). Schließlich konnte gezeigt werden, dass Genome von Picornaviren in transplantierten humanen Herzen zum Verlust des Transplantates bei Kindern führte (Shirali, et al., 2001). Vom porzinem Circovirus (PCV) existieren zwei Subtypen, PCV-1 und -2 (Fenaux, et al., 2000; Mankertz, et al., 1997). PCV-2 wird mit dem postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in Verbindung gebracht, das bei Schweinen zu einer hohen Sterberate führt (Mankertz, et al., 2000; Sorden, et al., 1999), während PCV-1 nicht virulent ist. PCV ist in allen Schweineherden auf der ganzen Welt vorhanden, kann persistierende Infektionen auslösen und wird vertikal übertragen (Paul, et al., 2003). Jedoch sind bisher noch keine Übertragungen auf den Menschen beobachtet worden (Allan and Ellis, 2000; Allan, et al., 1994; Ellis, et al., 2000). Porzine Rotaviren sind porzine Pathogene, die häufig eine weitverbreitete Diarrhö in Kindern und Ferkeln verursachen können (Santos, et al., 1999). Möglicherweise dienen auch hier wieder die Schweine als Zwischenlager, um neue, humanpathogene Virenstämme durch genetische Neuordnung hervorzubringen (Gouvea and Brantly, 1995). Fast alle diese beschriebenen porzinen Viren lassen sich durch eine intensive Haltung unter SPF-Bedingungen und durch eine strenge Kontrolle der Schweine, eliminieren (Tucker, et al., 2002). Allerdings sind in das Genom der Schweine auch endogene Retroviren integriert, die sich durch Züchtung und gentechnische Verfahren nicht so einfach entfernen lassen.

1.3 Retroviren

Wirbeltiere und Retroviren sind seit vielen Millionen Jahren miteinander verbunden und durch die Mechanismen der Virusabwehr einerseits und der Infektion eines Wirtes andererseits haben Retroviren und Wirbeltiere eine gemeinsame Evolution durchlaufen, die bis heute anhält. Die Familie der *Retroviridae* umfasst sieben Genera, die α -, β -, γ -, δ - und ε -Retroviren sowie die Lentiviren und Spumaviren. Alle diese Retroviren sind durch einen einzigartigen Replikationsmechanismus miteinander vereint (Coffin, 1996; Luciw and Leung,

1992; Swanstrom and Vogt, 1990). Dieser Mechanismus besitzt zwei besondere Merkmale. Erstens, der übliche genetische Informationsfluss von DNA über RNA ist umgekehrt. Das heißt, extrazelluläre Retroviren haben ein RNA-Genom, das durch die virale Reverse Transkriptase (RT) nach der Infektion einer Wirtszelle in DNA umgeschrieben wird. Das zweite ungewöhnliche Merkmal der retroviralen Replikation beinhaltet die Integration des viralen Genoms in die chromosomale DNA des Wirtes, ein Prozeß der von dem viralen Enzym Integrase (IN) vermittelt wird. Das in das Wirtsgenom integrierte retrovirale DNA-Genom wird als Provirus bezeichnet. Provirale Gene werden durch die Wechselwirkung zwischen retroviraler LTR und zellulärer Mechanismen und Faktoren exprimiert, und ermöglichen dadurch die Synthese von neuen retroviralen Virionen. Zusätzlich kann man zwischen exogenen und endogenen Retroviren unterscheiden (Aaronson and Stephenson, 1976; Hughes, et al., 1981; Larsson, et al., 1989; Lower, et al., 1993). Das Genom der Retroviren beinhaltet alle Informationen, die für einen vollständigen Infektionszyklus mit Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln nötig sind. Die exogenen Viren sind in der Lage sich horizontal von Organismus zu Organismus zu verbreiten. Allerdings können einige dieser Viren defekt sein, das bedeutet, ihnen fehlen essentielle Informationen zur Vervollständigung ihres produktiven Infektionszyklus. Diese Viren benötigen für ihre Weiterverbreitung die Hilfe eines anderen Retrovirus, das die fehlenden Funktionen ergänzt. Im Gegensatz dazu sind die endogenen Retroviren im Genom aller Zellen eines Organismus einschließlich der Keimbahnzellen integriert und werden vertikal von den Eltern auf die Nachkommen übertragen. Durch bestimmte Ereignisse können diese Viren zur Produktion von infektiösen Partikeln angeregt werden. Viele der endogenen Retroviren sind jedoch genetisch so stark degeneriert, dass selbst Helferviren sie nicht mehr aktivieren können. Nur noch die Ähnlichkeit der ins Zellgenom integrierten DNA lässt darauf schließen, dass es sich ursprünglich um retrovirale Sequenzen handelt. Diese weitverbreiteten Retrotransposons machen etwa ein Prozent des menschlichen Genoms aus.

1.3.1 Aufbau retroviraler Viruspartikel

Die Partikel der Retroviren haben einen Durchmesser von circa 100 nm (Abb. 1 (Modrow, et al., 2003)). Das Capsid wird von einer Membran umgeben, die von der Wirtszellmembran abgeleitet ist. Mit der Hüllmembran sind die viralen Glykoproteine TM (transmembranes Hüllprotein) und SU (Surface-Hüllprotein) verbunden. Das TM ist mit einer aus ca. 20 hydrophoben Aminosäuren bestehenden Sequenz in der Hüllmembran verankert, während das SU-Protein über Disulfidbrücken (nur bei γ -Retroviren) oder nichtkovalenten Bindungen mit dem externen Teil des TM-Proteins verbunden ist. Die Matrixproteine (MA) sind durch aminoterminal angefügte Myristinsäurereste mit dem inneren Teil der Hüllmembran verbunden. Die retroviralen MA-Proteine assoziieren zu Trimeren, die miteinander eine netzartige Oberfläche bilden, die den Viruspartikeln eine isometrische Struktur verleiht. Im Inneren der Virionen befindet sich das Capsid (CA), das bei den α -, β -, γ - und δ -Retroviren eine sphärisch-ikosaedrische und bei den Lentiviren eine konische Form aufweist. Die Capside beinhalten zwei identische Moleküle einzelsträngiger RNA, die nicht durch Basenpaarung miteinander verbunden sind. Die beiden RNA-Stränge sind mit Nucleocapsidproteinen (NC) komplexiert. Schließlich befinden sich noch die viralen Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR) im Viruspartikel.

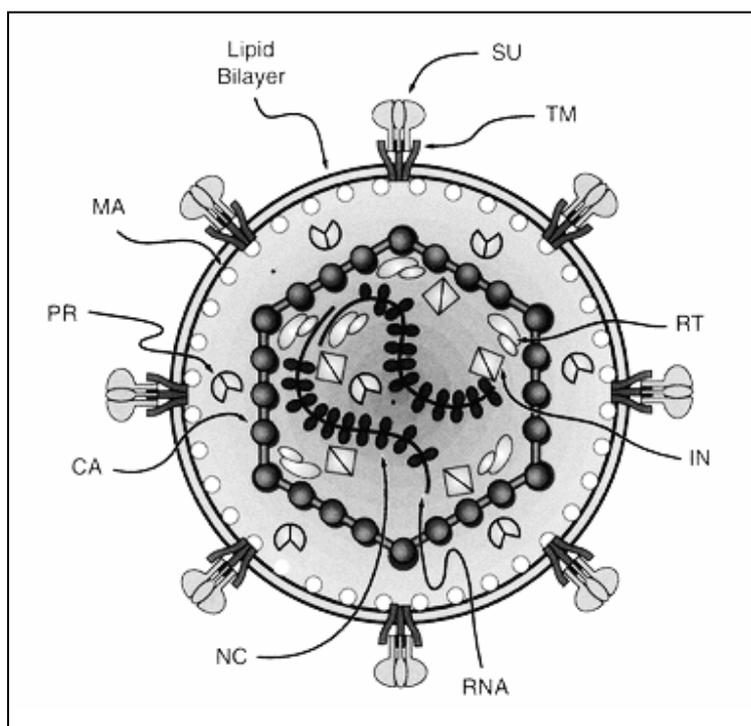


Abbildung 1: Genereller Aufbau eines Retrovirus. Die Virenhülle wird von einer zellulären Lipiddoppelmembran gebildet. SU und TM verkörpern die viralen Hüllproteine. MA, CA und NC sind die viralen Strukturproteine. Die Enzyme PR, RT und IN sind für die Reifung des Viruspartikels und die Integration des Virusgenoms in die Wirtszelle essentiell (Coffin et al., 1997).

1.3.2 Genomaufbau der Retroviren

Die retrovirale RNA weist mit ihrer 5'-Cap-Struktur und der Polyadenylierung am 3'-Ende alle Merkmale einer eukaryotischen mRNA auf (Abb. 2 (Modrow, et al., 2003)). Das RNA-Genom kann je nach Virustyp zwischen 7 und 12 Kilobasen lang sein. An die Primer-Bindungsstelle (PBS), eine 18 Nucleotide umfassende Sequenz im 5'-Bereich der RNA, ist eine zelluläre tRNA hybridisiert. Die Aminosäurespezifität der tRNA ist bei den einzelnen Virustypen unterschiedlich. Die Genome aller Retroviren codieren für die Genprodukte *gag* (gruppenspezifische Antigene), *pol* (enzymatische Proteine) und *env* (Glykoproteine). Die sich am 5'- und 3'-Ende der codierenden Regionen befindenden Sequenzen erfüllen wichtige, regulatorische Funktionen, die für die reverse Transkription und die Integration des viralen Genoms in die zelluläre DNA essentiell sind.

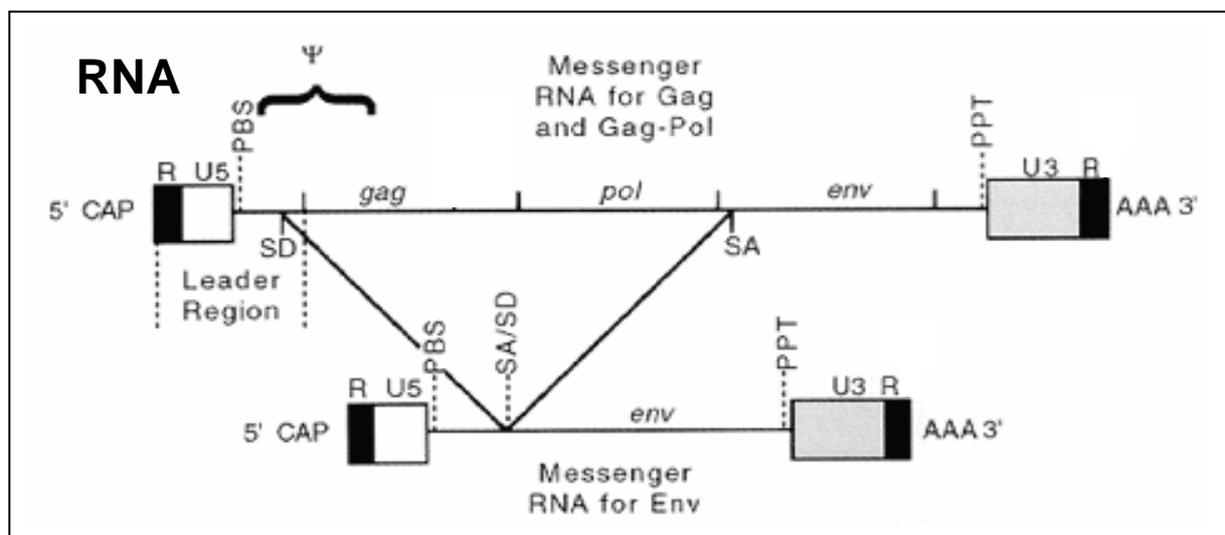


Abbildung 2: Genomische Organisation der retroviralen RNA. R, Redundant; U, Unique; PBS, Primerbindungsstelle; SD, Spleißdonor; SA, Spleißakzeptor; PPT, Polypurintrakt (Coffin, et al., 1997).

Es lassen sich folgende Abschnitte unterscheiden: Zunächst schließt direkt an die 5'-Cap-Struktur die R-Region (R für Redundant) an. Sie ist zwischen 15 und 240 Nucleotide lang und liegt in identischer Basenfolge und Orientierung auch am 3'-Ende des viralen Genoms vor. Auf die R-Region folgt am 5'-Ende des Genoms der als U5 (U für unique) bezeichnete Abschnitt. Er besteht aus 75 bis 200 Basen und enthält Sequenzen, die für die Integration des Provirus in das Zellgenom wichtig sind. An die U5-Region schließt sich die PBS an. Die sich zwischen der PBS und dem Anfang des *gag*-Gens befindende Sequenz wird Leaderregion genannt. Sie enthält eine Spleißdonorstelle (SD), die für die Bildung aller gespleißten mRNA-Moleküle verwendet wird, und eine ψ -Sequenz, durch die sich die genomischen viralen RNAs

bei der Morphogenese an die Nucleocapsidproteine der sich ausbildenden Viruspartikel anlagern. Im Anschluss an die Leaderregion folgen die viralen Gene *gag*, *pol* und *env*, die je nach Virustyp verschieden lang sein können. An sie schließt sich entweder eine kurze nichtcodierende Region an oder sie gehen direkt in nachfolgende Sequenzelemente über, wie es bei den Lenti- und Spumaviren üblich ist. Hier findet man einen bei allen Retroviren vorhandenen Polypurintrakt (PP), der aus mindestens neun Adenosin- und Guanosinresten besteht. Der PP ist für die Initiation der Synthese des DNA-Doppelstranges wichtig. Dem Polypurintrakt folgt die U3-Region, die abhängig vom Virustyp zwischen 450 und 1200 Basen lang sein kann. Da die U3-Region, genauso wie die U5-Region, nach der reversen Transkription der RNA in doppelsträngige DNA das 5'-Ende der LTR (Long terminal repeat) bildet, befinden sich auch hier wichtige Elemente für die Integration. Zusätzlich ist die U3-Region auch für die Genexpression des Provirus unverzichtbar, da sie Promotoren und cis-aktive Elemente enthält, an die sich zelluläre transaktive Proteine binden und dadurch die virale Transkription und Genexpression regulieren können. An die U3-Region schließt sich ein weiterer R-Bereich an, dem ein PolyA-Schwanz von circa 200 Adenosineinheiten folgt. Das integrierte Provirus besitzt am 5'- und 3'-Ende identische Sequenzen, die durch das Umschreiben der RNA in DNA entstehen und die viralen Gene flankieren (Abb. 3). Sie werden als long terminal repeats (LTR) bezeichnet. Die LTR besteht aus den U3-, R- und U5-Regionen und enthält die Promotor- und Enhancer-Elemente, die die retrovirale Genexpression kontrollieren.

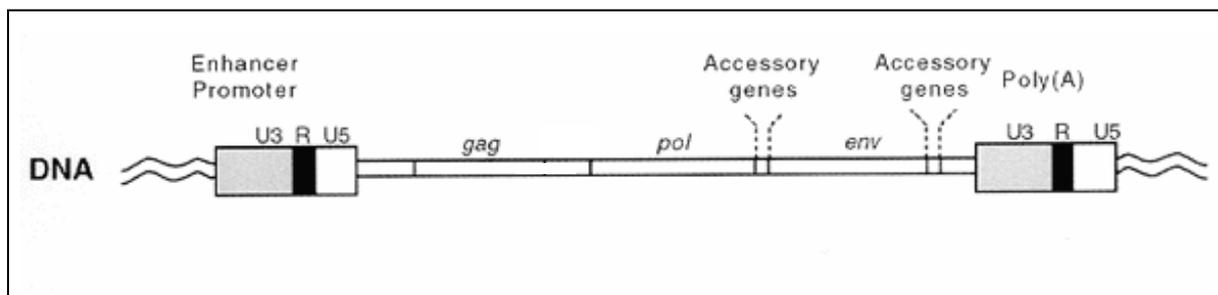


Abbildung 3: Genetische Organisation des Provirus (Coffin, et al., 1997).

1.3.3 Retrovirale Proteine

Die Gag-Proteine werden als gemeinsames Vorläuferprodukt synthetisiert, das während der Virusmorphogenese von der viralen Protease in die einzelnen Komponenten gespalten wird (Modrow, et al., 2003). Die Reihenfolge der MA-, CA- und NC-Proteine im Gag-Vorläuferprodukt ist bei den verschiedenen Retroviren immer gleich (Abb. 4): Am

aminoterminalen Ende befinden sich die MA-Sequenzen, gefolgt von den CA-Bereichen und am carboxyterminalen Ende sind die NC-Proteine zu finden. Die Synthese der Gag-Proteinvorläufer findet an freien Ribosomen im Zytoplasma der Zelle statt. Die Myristylierung an der α -Aminogruppe eines Glycins an der Position 2 erfolgt während der Translation, wobei das aminoternale Methionin entfernt wird. Anschließend transportieren zelluläre Faktoren die modifizierten Gag-Proteinvorläufer zur Zellmembran, mit der sie über Fettsäuren interagieren, indem sie sich als kleine, virusähnliche Lipid-Protein-Vesikel von der Zelloberfläche abschnüren. Dabei spielen die MA- und CA-Proteinanteile eine aktive Rolle. Die in den NC-Proteinen enthaltenen Aminosäuresequenzen bewirken eine spezifische Wechselwirkung mit den ψ -Sequenzen der RNA-Genome. Diese Domänen können den Zinkfingermotiven DNA-bindender Proteine ähneln oder aus basischen, argininreichen Regionen bestehen. Die MA-Proteine geben den reifen Viruspartikeln ihre äußere Struktur und können den Transport der doppelsträngigen, viralen DNA in den Zellkern fördern.

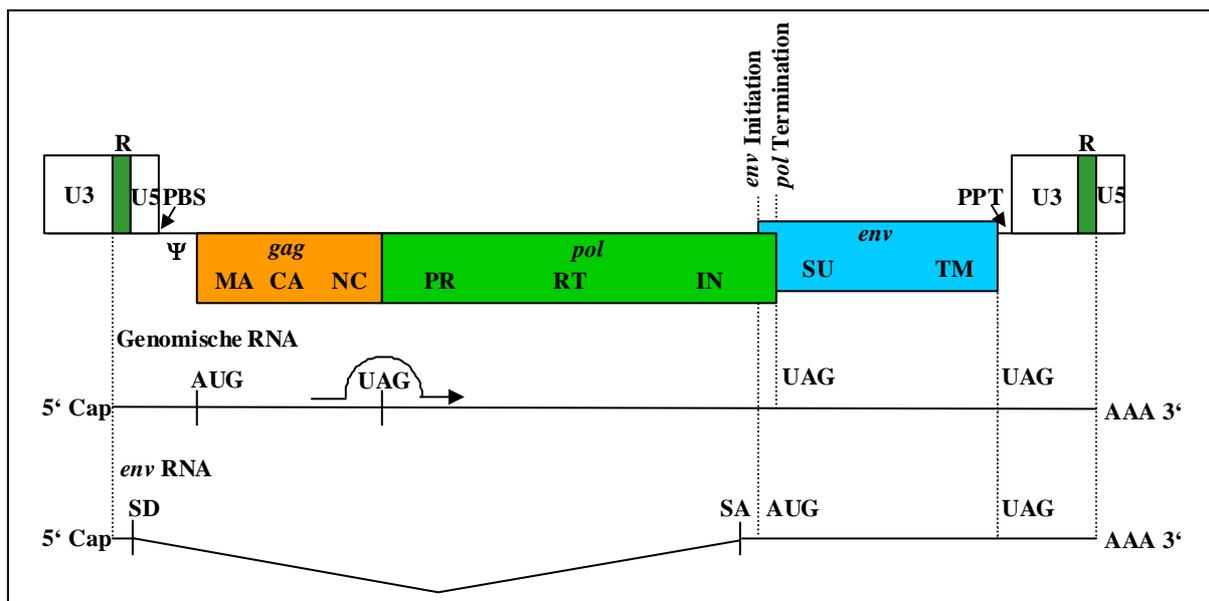


Abbildung 4: Anordnung der retroviralen Proteine, die von den *gag*, *pol* und *env* Genen codiert werden. AUG = Startcodon, UAG = Stopcodon.

Die viralen Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase werden ebenfalls als Bestandteil des Gag/Pol-Vorläuferproteins synthetisiert. Diese Gag/Pol-Fusionsproteine haben Molekulargewichte zwischen 150 und 200 kD. Sie entstehen durch die Verschiebung des ribosomalen Leserasters um -1 oder $+1$. Grund der Verschiebung ist die fehlerhafte Erkennung der Codongrenzen durch die Ribosomen, was zu einem Überlesen des Stopcodons der Gag-Proteinsynthese führt, und somit in die Synthese der Pol-Proteine übergeht. Dieser Leserastersprung findet bei ungefähr 5% der Translationsvorgänge statt. Die Gag/Pol-

Fusionsproteine werden ebenfalls am aminoterminalen Ende myristyliert und sind dadurch in der Zytoplasmamembran verankert. Die Spaltung in die einzelnen Enzyme durch die virale Protease erfolgt bei den meisten Retroviren erst bei der Reifung des von der Zellmembran abgelösten Viruspartikels. Die aktive Protease von HIV-1 liegt als aus zwei identischen Proteineinheiten bestehendes Dimer vor, mit einem Molekulargewicht von 9 bis 10 kD. Im aktiven Zentrum des Enzyms sind zwei funktionell wichtige Asparaginsäurereste lokalisiert, die für die Wirkung des Enzyms als Aspartatprotease verantwortlich sind. Die Prozessierung der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine in die einzelnen Komponenten durch die Protease, erfolgt durch Spaltung zwischen Phenylalanin- oder Tyrosin- und Prolinresten. Zusätzlich ist die dreidimensionale Struktur der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine für die Erkennung der Schnittstellen wichtig. Die Reverse Transkriptase ist ein Mg^{2+} -abhängiges Enzym, das als RNA- und auch als DNA-abhängige Polymerase wirken kann. Es besitzt außerdem noch eine RNaseH-Aktivität, die den RNA-Anteil von DNA/RNA-Hybriddoppelsträngen abbaut. Die Reverse Transkriptase von HIV-1 ist ein Heterodimer, bestehend aus einer 66 und einer 51 kD großen Untereinheit. Die kleinere Untereinheit entsteht durch proteolytische Spaltung am carboxyterminalen Ende und ist daher mit dem aminoterminalen Teil der großen Untereinheit identisch. Die Aktivität der RNaseH ist im carboxyterminalen Bereich der größeren Untereinheit lokalisiert, während die Polymerasefunktionen durch die aminoterminalen Aminosäuren bestimmt werden. Durch die fehlende Kontrolle der Lesegenauigkeit werden mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-3} bis 10^{-4} falsche Basen in die neusynthetisierten DNA- bzw. RNA-Stränge eingebaut. Diese Leseungenauigkeit führt zu der relativ hohen Mutationsrate mancher Retroviren. Schließlich wird die Integrase im 3'-Bereich des *gag/pol*-Gens codiert. Sie wirkt sowohl als Endonuclease, ist also in der Lage doppelsträngige DNA zu schneiden, als auch als Ligase. Des Weiteren kann die IN an die Enden des linearen, in doppelsträngige DNA transkribierten Virusgenoms binden und so für seine Integration in das Genom der Wirtszelle sorgen.

Die Hüllproteine SU und TM werden vom *env*-Gen codiert und sind in die Zellmembran infizierter Zellen bzw. in die virale Membran eingelagert. Beide Proteine werden aus einer einfach gespleißten mRNA als gemeinsames Vorläuferprotein translatiert, wobei man die Aminosäuresequenz des SU am aminoterminalen Ende findet. Eine ebenfalls aminoterminalen Signalsequenz ist für die Translation des Proteins an der Membran des endoplasmatischen Reticulums (ER) und den Transport der Aminosäurekette in das Lumen verantwortlich. Die Verankerung in der Membran findet über eine hydrophobe 20 Aminosäurereste lange Sequenz im TM-Teil des Vorläuferproteins statt. Im ER werden die Aminosäuren des SU-

und TM-Vorläuferproteins nach einem Abbau basischer Aminosäuren in SU und TM gespalten. Hierfür ist eine mit dem Golgi Apparat assoziierte zelluläre Protease verantwortlich. Bei einigen Retroviren findet im ER auch die Glykosylierung des SU/TM-Vorläuferproteins statt (z.B. bei HIV oder MuLV). Das Molekulargewicht von SU liegt zwischen 46 und 120 kD, das von TM zwischen 15 und 45 kD. Die SU-Hüllproteine sind für die Adsorption der Viruspartikel an Zellmembranen verantwortlich. Zusätzlich bieten sie geeignete Angriffspunkte für wirtseigene Abwehrmechanismen. Das SU lässt sich in weitere Bereiche einteilen, die aus sehr variablen Elementen (V) und relativ hoch konservierten Bereichen (C) bestehen. Die V-Bereiche befinden sich meist an sehr exponierten Stellen, so dass gegen sie oft neutralisierende Antikörper gebildet werden. Die V-Domänen sind allerdings auch oft hoch glykosyliert. Die C-Bereiche sind meist für die Wechselwirkung mit zellulären Rezeptoren verantwortlich, was zu einer recht hohen Konservierung dieser Bereiche in den meisten Retroviren führt. Schließlich ist das TM der meisten Retroviren für die Fusion mit der Wirtszelle zuständig. Die sogenannte Fusionsdomäne befindet sich am aminoterminalen Ende des TM.

Die komplexen Retroviren wie die Lenti- und Spumaviren sowie die δ -Retroviren besitzen weitere regulatorische und akzessorische Proteine, die einen Einfluss auf die Transkription und die Infektiosität der Viren haben.

1.4 Porzine endogene Retroviren

In den 70er Jahren wurden porzine endogene Retroviren (PERV) zum ersten Mal in porzinen Zelllinien als Viruspartikel beschrieben (Armstrong, et al., 1971; Breese, 1970; Lieber, et al., 1973; Todaro, et al., 1974a). Die PERVs, die zum Genus der einfachen γ -Retroviren gehören (Abb. 5), zeigen hohe Homologien zu dem Leukämievirus der Gibbons (GALV (Patience, et al., 1997)), dem endogenen Koala Retrovirus (KoRV (Hanger, et al., 2000)) und einem induzierbaren murinen endogenen Retrovirus (MDEV (Miller, et al., 1996; Wolgamot, et al., 1998)). Des Weiteren bestehen Ähnlichkeiten zu Sequenzen der felines und murinen γ -Retroviren sowie zu Sequenzen von γ -Retroviren anderer Primaten (Akiyoshi, et al., 1998; Czauderna, et al., 2000). Die Genomstruktur der PERVs ist typisch für γ -Retroviren. Es besteht aus drei offenen Leserahmen, die für die *gag*-, *pol*- und *env*-Gene codieren. Diese sind von zwei LTRs eingefasst, die wichtige Elemente für die reverse Transkription, die Integration, die Transkription und Translation enthalten. Eine ungespleißte genomische RNA

dient als Vorlage für die Translation der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine. Das MA-Protein hat in etwa ein Molekulargewicht von 15 kD (p15), die CA-Proteine von 12 und 27 kD (p12 und p27) und das NC von 7 kD (p7). Eine zweite, gespleißte RNA dient als Vorlage zur Translation der SU (gp70)- und TM (p15E)-Vorläuferproteine.

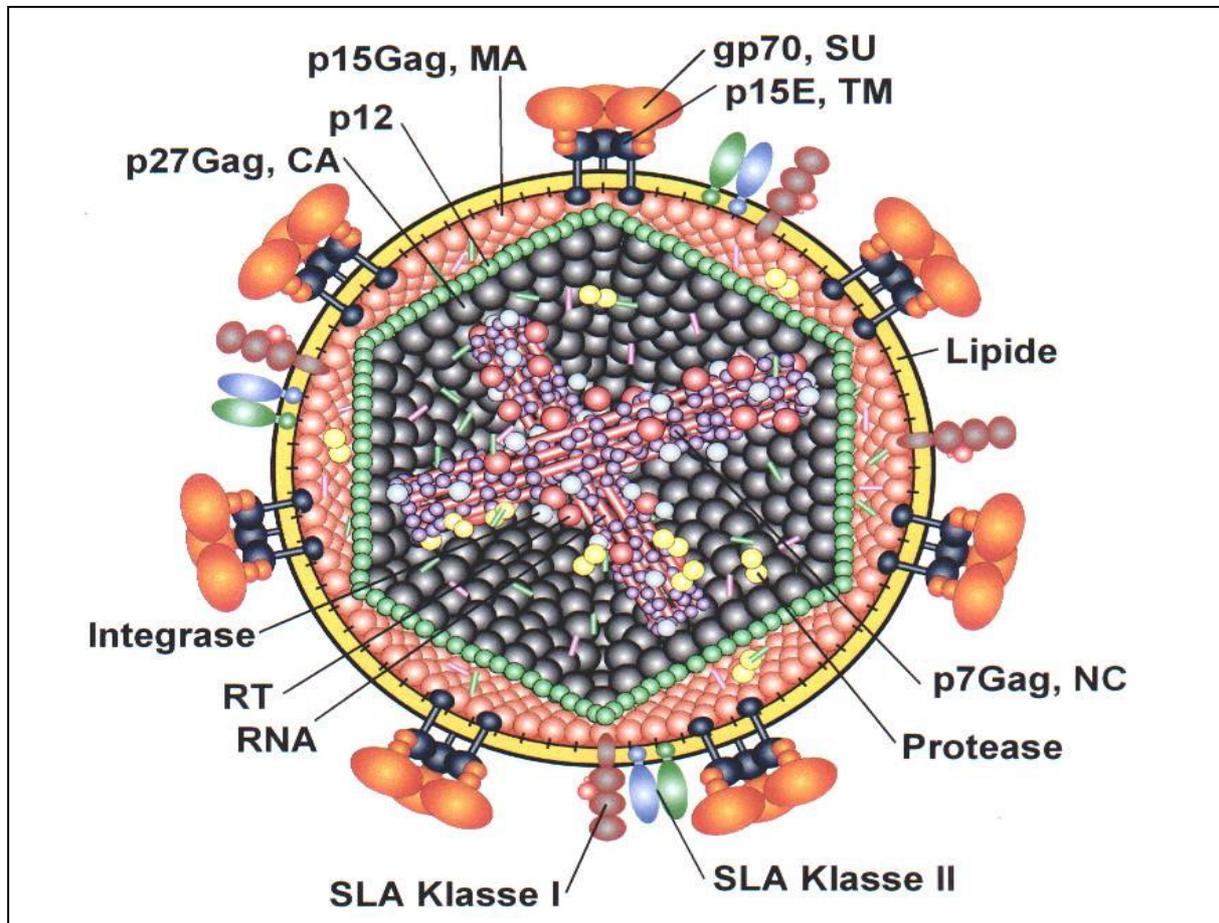


Abbildung 5: Aufbau eines PERV Partikels. SLA I und II, Schweineleukozytenantigen Klasse I und II (Dr S. Norley, Dr. S. Tacke).

Die Familie der replikationsfähigen porzinen endogenen γ -Retroviren umfasst drei eng miteinander verwandte Subtypen, die sich durch unterschiedliche Sequenzen der *env*-Gene auszeichnen und mit PERV-A, -B und -C bezeichnet wurden (Takeuchi, et al., 1998). Die Sequenzunterschiede manifestieren sich in den variablen Regionen ihrer SU-Hüllproteine, die für die Rezeptorspezifität von besonderer Bedeutung sind und darauf hindeuten, dass die verschiedenen PERV-Subtypen unterschiedliche Rezeptoren verwenden. PERV-A und -B wurden aus der porzinen Nierenzelllinie PK15 isoliert und kloniert (Czuderna, et al., 2000; Krach, et al., 2001; Le Tissier, et al., 1997). Die Hüllproteine von PERV-A und -B weisen eine Länge von 660 und 657 Aminosäuren auf (Le Tissier, et al., 1997). Das TM der beiden Subtypen zeigt eine 92%ige Übereinstimmung auf Aminosäureebene zueinander und eine

63%ige bis 67%ige Übereinstimmung zu korrespondierenden Regionen von GALV, feline Leukämievirus (FeLV) und murine Friend-Leukämievirus (F-MuLV). PERV-A und -B gehören zu den polytropen Viren, die Zellen verschiedener Spezies (Specke, et al., 2001b; Specke, et al., 2002a) einschließlich des Menschen (Patience, et al., 1997; Specke, et al., 2001a; Takeuchi, et al., 1998) und nicht-humaner Primaten (Blusch, et al., 2000; Denner, 2001; Specke, et al., 2002b) *in vitro* infizieren können. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei PERV-C um ein ecotropes Virus, das nur porcine Zellen infizieren kann (Akiyoshi, et al., 1998; McIntyre, et al., 2003; Takeuchi, et al., 1998). PERV-C wurde aus stimulierten PBMC von Miniaturschweinen kloniert (PERV-MSL (Akiyoshi, et al., 1998)) bzw. aus porcinen Lymphomzellen (PERV-Tsukuba-1 (Suzuka, et al., 1985; Suzuka, et al., 1986)) isoliert. Zusätzlich zu den drei replikationsfähigen PERV-Subtypen existieren in den Genomen der Schweine noch weitere γ - und β -retrovirale Sequenzen, die aber bisher alle mindestens einen Defekt in ihrem Genom aufweisen und daher nicht replikationsfähig sind (Patience, et al., 2001). Jedoch besteht die Möglichkeit, dass durch Rekombinationen aus replikationsfähigen und replikationsunfähigen Proviren neue infektiöse Partikel entstehen. Zusätzlich könnten aus nicht humanotropen PERVs durch Rekombination humanotrope Viren entstehen. So konnte gezeigt werden, dass sich aus primären porcinen PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells), die mit Mitogenen stimuliert wurden, PERV-Partikel freisetzen lassen, die in der Lage sind, humane Zellen zu infizieren (Wilson, et al., 2000; Wilson, et al., 1998). Die in den humanen Zellen gefundenen Viren enthalten Sequenzen der Subtypen A und C, wobei ein kleiner Teil aus dem SU von PERV-A und der Rest des Genoms von PERV-C stammt. Diese PERV-A/C-Rekombinante besitzt die Fähigkeit, sich an humane Zellen zu adaptieren, in dem sie durch sequentielle Multimerisierungen im replikationsregulierenden Bereich der U3-Region der LTR ihre Promotoraktivität erhöht, die zu einer Erhöhung des Virustiters führt (Denner, et al., 2001; Wilson, et al., 2000). Das wurde auch für PERV-A und -B (Denner, et al., 2002a) und davon abgeleitete molekulare Klone gezeigt (Scheef, et al., 2001). Durch Untersuchungen möglicher Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren innerhalb dieser repetitiven Sequenzen, ergaben sich Homologien zu Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors NF-Y (Denner, et al., 2002a; Denner, et al., 2003; Scheef, et al., 2002). NF-Y wird vorwiegend in proliferierenden Zellen gebildet (Mantovani, 1999). Dies deutet darauf hin, dass PERVs die Transkriptionsregulation sich teilender Zellen nutzen, um ihre Proviren zu exprimieren. Die Multimerisierung bestimmter Sequenzmotive in der LTR wird auch bei anderen γ -Retroviren, wie MuLV und FeLV beobachtet. Bei diesen Viren korreliert die Multimerisierung in der LTR mit einer Zunahme der Pathogenität (Übersicht siehe

(Denner, et al., 2002b)).

Die Proviren der beiden replikationsfähigen PERV Subtypen A und B sind in allen Zellen der Schweine vorhanden und mit 32 bis 64 Kopien pro Zellgenom relativ häufig vertreten (Patience, et al., 2001), während PERV-C nicht in allen Schweinerassen vertreten ist (Bosch, et al., 2000; Denner, 2001; Jin, et al., 2000). Die Expression von PERV-mRNA in verschiedenen Geweben der Schweine variiert, wobei der Pankreas die geringste und die Niere die höchste Expression an PERV-mRNA aufweisen (Akiyoshi, et al., 1998; Clemenceau, et al., 1999). Des Weiteren bestehen zwischen verschiedenen Schweinestämmen erhebliche Unterschiede bei der Freisetzung von PERV-Partikeln (Tacke, et al., 2000; Tacke, et al., 2003). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch primäre porcine Endothelzellen unterschiedlicher Schweinerassen PERV exprimieren und humane Zellen *in vitro* infizieren können (Martin, et al., 1998a). Endothelzellen stellen den hauptsächlichen Kontakt zwischen einem Xenotransplantat und den Leukozyten bzw. dem Gewebe des Rezipienten dar. Schließlich konnte gezeigt werden, dass transgene Schweine, die die humanen Komplementinhibitoren CD55 und CD59 produzieren, nicht nur PERV-mRNA exprimieren (Langford, et al., 2001) sondern auch diese Komplementinhibitoren in PERV-Partikel verpacken (Takefman, et al., 2002). Allerdings wurden PERV-Partikel nur in zwei von fünf transgenen Schweinen, deren PBMC stimuliert wurden, freigesetzt und humane Zelllinien ließen sich nicht mit diesen PERV-Partikeln infizieren (Langford, et al., 2001). Zusätzlich konnten die Komplementinhibitoren-enthaltenden PERVs von humanem Serum neutralisiert werden (Takefman, et al., 2002).

Obwohl sich Zellen verschiedener Spezies einschließlich nicht-humaner Primaten und Menschen *in vitro* mit PERV infizieren lassen, konnte bisher noch keine Transmission von PERV *in vivo* nachgewiesen werden. Bei Infektionsversuchen im Kleintiermodell konnte weder bei immunsupprimierten Tieren (Specke, et al., 2002b) noch bei der Verwendung von Spezies-adaptierten PERV-Partikeln (Specke, et al., 2002a) eine Übertragung beobachtet werden. Jedoch gibt es Studien, die eine PERV-Übertragung bei SCID- (severe combined immunodeficiency) und Nacktmäusen beschreiben (Clemenceau, et al., 2002; Deng, et al., 2000; van der Laan, et al., 2000). Allerdings wurde in diesen Experimenten Mikrochimärismus beobachtet. Beim Mikrochimärismus wandern wirtsfremde Zellen vom Applikationsort in andere Gewebe und Organe ein, ohne vom Immunsystem sofort eliminiert zu werden. Mikrochimärismus kann also zu falsch-positiven Resultaten führen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Mäuse keinen Rezeptor für PERV-A auf ihren Zelloberflächen exprimieren (Ericsson, et al., 2003). Schließlich sind die Daten hinsichtlich der Expression

eines PERV-B-Rezeptors in Mäusen widersprüchlich (Irgang, et al., 2004; Takeuchi, et al., 1998). Die Transplantation von porzinen Zellen, Geweben und Organen in nicht-humane Primaten bzw. die Inokulation hoher Dosen von PERV in immunsupprimierte Tiere führte bisher ebenfalls nicht zu einer PERV-Infektion (Martin, et al., 2002; Specke, et al., 2002b; Switzer, et al., 2001). Schließlich zeigten auch die klinischen Anwendungen der Xenotransplantation beim Menschen bis heute keine Übertragung von PERV (Heneine, et al., 1998a; Irgang, et al., 2003; Levy, et al., 2000; Paradis, et al., 1999; Patience, et al., 1998; Pitkin and Mullon, 1999; Schumacher, et al., 2000; Tacke, et al., 2001). Jedoch waren die Anwendungen in den meisten Fällen zeitlich begrenzt oder das porzine Material war vor dem Immunsystem der Rezipienten geschützt. Zwei humane Rezeptoren für PERV-A wurden kürzlich identifiziert und kloniert (Ericsson, et al., 2003). Diese beiden Rezeptoren werden in vielen humanen Geweben exprimiert und durchqueren, wie viele andere γ -retrovirale Rezeptoren, die Zellmembran mehrfach.

Auf Grund der immensen Fortschritte bei der Suche nach effektiveren Immunsuppressiva für den Einsatz in der Xenotransplantation und der Entwicklung transgener Schweine (Costa, et al., 2002; Lai, et al., 2002; Phelps, et al., 2003), die eine hyperakute Abstoßung eines Xenotransplantates verhindern, ist eine längere Verweildauer im Rezipienten zu erwarten, und damit erhöht sich das Risiko einer Transmission und/oder Infektion mit PERVs. Des Weiteren bergen die Möglichkeiten der Rekombination von PERVs untereinander sowie die Rekombination mit humanen Retroviren und die Adaptation von PERVs an humane Zellen, weitere Gefahren für die Rezipienten eines Langzeitxenotransplantates. Aus diesen Gründen, muss das potentielle Risiko für den einzelnen Rezipienten und die Gesellschaft im Ganzen weiterhin sorgfältig, auf hohem wissenschaftlichen Niveau untersucht und ethisch vertretbar abgewogen werden.

1.5 Zielsetzung

Die Verwendung von porzinen Zellen, Geweben und Organen in der Xenotransplantation stellt eine Möglichkeit dar, die zunehmende Kluft zwischen der Zahl der durchgeführten Allotransplantationen und der steigenden Zahl an Patienten, die auf ein Transplantat warten, zu überbrücken. Jedoch besteht das Risiko der Übertragung von Mikroorganismen und Viren, die für den Menschen pathogen sein könnten. Die im Genom der Schweine integrierten porzinen endogenen Retroviren (PERV) stellen einen dieser potentiell humanpathogenen Erreger dar, da die Subtypen PERV-A und PERV-B in der Lage sind, humane primäre Zellen

und Zelllinien *in vitro* zu infizieren. Daraus ergeben sich drei Verfahrensweisen, die für die Abschätzung des Infektionsrisikos von PERV von Bedeutung sind und angewendet werden sollen:

1. Die Evaluierung der PERV-Freisetzung aus porzinen Zellen und Geweben, um Transplantate mit geringem Infektionsrisiko zu selektieren. Aufgrund der Tatsache, dass der Pankreas von Schweinen nur eine geringe mRNA-Expression von PERV aufweist und durch die Vorarbeiten von Tacke et al. (2000, 2003), die gezeigt haben, dass stimulierte PBMC von Schweinen der Deutschen Landrasse keine PERV-Partikel freisetzen, soll im Rahmen dieser Arbeit die Expression von PERV in Inselzellen der Deutschen Landrasse *in vitro* und *in vivo* evaluiert werden.

2. Die Etablierung eines *In vivo*-Infektionsmodells, um die Pathogenität von PERV abschätzen zu können. Da die Transplantation von porzinen Zellen, Geweben und Organen in nicht-humane Primaten bzw. die Inokulation hoher Dosen von PERV in immunsupprimierte Tiere bisher nicht zu einer PERV-Infektion führte und aufgrund der Beobachtung, dass die Adaptation von PERV an die Zellen einer Spezies zu einer Erhöhung des Virustiters führt, soll in dieser Arbeit PERV zunächst an Zellen nicht-humaner Primaten adaptiert werden, um zu einem späteren Zeitpunkt dieses adaptierte PERV nicht-humanen Primaten *in vivo* applizieren zu können. Des Weiteren soll die Infektion ausgewählter muriner Zelllinien und primärer Zellen *in vitro* und *in vivo* mit den Subtypen A und B von PERV unter Vermeidung von Mikrochimärismus evaluiert werden.

3. Ein retrospektives Screenen von Patienten, die bereits mit porzinen Zellen und Geweben behandelt wurden. Bisher wurden weltweit etwa 200 Patienten mit Zellen und Geweben vom Schwein oder mit einer *Ex vivo*-Perfusion unter Zuhilfenahme von Schweinezellen behandelt. Im Rahmen dieser Arbeit sollen zwei neue Studien analysiert werden. In der einen wurden Patienten mit akutem Leberversagen *ex vivo* mit einem Bioreaktor, der Leberzellen vom Schwein enthielt, behandelt. In der anderen wurden Diabetes-Kranke mit porzinen Inselzellen behandelt. Der Nachweis der Infektion durch Messung von Antikörpern gegen PERV in den Seren der Patienten soll indirekt, mit neu entwickelten immunologischen Methoden, erfolgen.

2. Material und Methoden

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Primäre Zellen und Zelllinien

Die Isolierung von primären porcinen Langerhanschen Inselzellen wurde nach Zhang et al. durchgeführt (Zhang, et al., 2001). Die Bauchspeicheldrüsen von ausgewachsenen Schweinen wurden aus lokalen Schlachthäusern bezogen. Nach der Schlachtung wurden die Organe sofort entnommen, um die warme Ischämie auf weniger als 10 Minuten zu reduzieren. Das Hauptblutgefäß der Bauchspeicheldrüse wurde mit einer Kanüle verbunden, mit einer 0,6%igen Kollagenase-Lösung (Serva, Heidelberg) perfundiert und in einem speziell entworfenen Restriktions-Filtrations-Gerät kontinuierlich bei 37°C für 18 bis 20 Minuten inkubiert. Das enzymatisch zerkleinerte Gewebe wurde anschließend durch ein Sieb mit einer Porengröße von 350 µm gepresst, um unverdaute größere Gewebestücke zu entfernen. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und das Sediment wurde in einem kontinuierlichen Nycodenz-Dichtegradienten (Nycodenz® Pulver, Gibco BRL, Karlsruhe), mit einer Dichte von 1,055 bis 1,095 g/ml zentrifugiert. Ein Cobe 2991 Zellseparierer wurde verwendet, um freie Inselzellen von exokrinem Gewebe zu trennen. Die angereicherte Inselzellfraktion wurde anschließend durch ein Sieb mit einer Porengröße von 45 µm gepresst, um einzelne Zellen und Inselzellfragmente zu entfernen. Die aufgereinigten Inselzellen wurden für Infektionsstudien mittels Kokultivierung verwendet. Dafür wurden die Inselzellen in Gewebekulturflaschen (TPP, Schweiz) in DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium mit 4,5 g/l D-Glucose; Biochrom KG, Berlin), 10% inaktiviertem, fötalem Kälberserum (FKS; Biochrom KG, Berlin), 2 mM L-Glutamin, (Biochrom), 100 U/ml Penicillin (Biochrom), 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom) und 15 mM HEPES (Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure, Biochrom) bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit (Brutschrank BBD 6220, Kendro, Langenselbold) kultiviert. Die Isolierung primärer muriner Zellen wurde nach Specke et al. durchgeführt (Specke, et al., 2001b). Nieren und Embryos von NMRI- bzw. BALB/c-Mäusen (Charles River Laboratories, Sulzfeld) wurden aseptisch entfernt, zerkleinert und mit 1 ml 0,25%igem Trypsin, gelöst in PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung; 10 mM Na-Phosphat, pH 7.5, 130 mM NaCl (Merck, Darmstadt)), pro 5mg Gewebe unter Verwendung eines Magnetrührers bei 37°C inkubiert. Die Einzelzellsuspensionen wurden in DMEM und 10% FKS kultiviert.

Die verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die humane embryonale Nierenzelllinie 293 (ATCC No. CRL-1573), die sich als hochsuszeptibel für eine Infektion mit PERV gezeigt hat, wurde mit einer Resistenz gegen das Antibiotikum Neomycin ausgestattet. Dafür wurden die 293-Zellen mit dem Neomycin-Resistenzgen tragenden pcDNA3.1+ Vektor (Invitrogen) unter Verwendung des TransFast Transfektionsreagenz (Promega, Mannheim, Germany) transfiziert und durch die anschließende Behandlung mit G418 (Gibco BRL, Karlsruhe, Germany) auf stabil-transfizierte 293-Zellen hin selektioniert (293^{neo+}). Die Zelllinien 293, 293^{neo+}, PK15, 293/PERV, 293/PERV-A/C, 293/PERV-B, 3T3 und 3T6 wurden in Gewebekulturflaschen versetzt mit DMEM, FKS, L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin und HEPES bei 37°C unter 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Rhesusaffen-Zelllinie LLCMK2 wurde in DMEM versetzt mit 5% FKS und 1% nicht-essentiellen Aminosäuren (Sigma, Taufkirchen) kultiviert, während die Schimpansen-Zelllinie EB176 in RPMI-1640 Medium (Biochrom KG, Berlin), mit 15% FKS und 4 mM L-Glutamin kultiviert wurde. Schließlich wurde die murine T-Zelllinie CTLL-2 in RPMI-1640 Medium versetzt mit 10% FKS und 100 IU/ml Interleukin-2 (IL-2) kultiviert.

Tabelle 2: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft	Referenzen
293	Humane embryonale Nierenzellen	ATCC	(Graham, et al., 1977)
293 ^{neo+}	Mit einem Neomycin-Resistenzgen transfizierte 293 Zellen	Dr. J. Denner	
PK15	Adhärente Schweine Nierenzellen; produzieren PERV-A und PERV-B	ATCC	(Armstrong, et al., 1971; Pirtle and Woods, 1968)
293/PERV	Humane embryonale Nierenzellen; produzieren PERV-A und PERV-B	Dr. R. Weiss	(Le Tissier, et al., 1997; Takeuchi, et al., 1998)
293/PERV-A/C (PERV/5°)	5. Passage des PERV/NIH/3° (3. Passage)-Virus auf 293 Zellen; produzieren PERV-A/C	Dr. J. Denner	(Denner, et al., 2003; Wilson, et al., 2000; Wilson, et al., 1998)
293/PERV-B	PERV-B Klon, passagiert auf 293 Zellen	Dr. D. Onion	
LLCMK2	Adhärente Nierenzellen von <i>Macaca mulatta</i> (Rhesusaffe)	ATCC	(Hull, et al., 1962)
EB176	EBV transformierte lymphoblastoide Zellen aus peripheren Lymphozyten eines männlichen Schimpansen	ECACC	Nicht verfügbar
3T3	Adhärente, murine embryonale Fibroblasten	ATCC	(Andersson, et al., 1979; Jainchill, et al., 1969)
3T6	Adhärente, murine embryonale Fibroblasten	ATCC	(Todaro and Green, 1963)
CTLL-2	murine T-Zellen	ATCC	(Gillis and Smith, 1977)

Die PERV-produzierenden Zelllinien PK15, 293/PERV, 293/PERV-A/C und 293/PERV-B wurden für die Virusproduktion und als Effektoren in Infektionsstudien verwendet. Die Zelllinien 293, 293^{neo+}, LLCMK2 und EB176 sowie die murinen Zelllinien 3T3, 3T6 und CTLL-2 dienten als Zielzellen in Infektionsstudien.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Proteinisolierung

Zur Herstellung von Proteinlysaten aus Geweben und Organen wurden je 200 bis 300 mg in einem Mörser (Roth, Karlsruhe) unter Zugabe von flüssigem Stickstoff (Linde, Berlin) zu einer homogenen Masse zerkleinert, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt, mit 1 ml RIPA-Puffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.0 (Roth); 150 mM NaCl (Merck); 2% Triton-X 100 (Roth), 0,5% Natriumdeoxycholat (Merck) und 0,1% SDS (Natriumdodecylsulfat, Merck)) versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Proteinlysat bei 20000 x g (Eppendorf 5403; Eppendorf, Hamburg) für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt. Dazu wurde ein Proteinstandard mit 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und 1,0 mg/ml BSA aus einer 2mg/ml BSA-Stammlösung (bovines Serumalbumin Fraktion V, Roth) hergestellt und je 10 µl der verschiedenen Standards wurden in eine 96-Well Mikrotiterplatte (Falcon™, Becton Dickinson, Heidelberg) pipettiert. Von den zu messenden Proteinproben wurden 10-100 µl eingesetzt. Die Proteinstandards und die Proben wurden anschließend mit 90 µl Bradford-Reagenz (1:5 verdünnt; Bio-Rad, München) versetzt und für 10 Min. inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 595 nm im UV-Spektrometer (Tecan Spectra, Crailsheim) gemessen und anschließend die Proteinkonzentration bestimmt. Der statistische Fehler der BSA-Standards und der Proteinproben wurde durch Dreifachbestimmung ermittelt.

2.2.2 Rekombinante virale Proteine und Peptide

Zwei rekombinante Proteine wurden generiert, das transmembrane Hüllprotein p15Env und das Capsidprotein p27Gag. Zur Herstellung von p15Env wurden die Vorwärtsprimer 5'-GTACGTACGTGGATCCCTAATCACAGGACCGCAACA und die Rückwärtsprimer 5'-ACGTACGTACGAATTCTCAGTTGAACCATCCTTAAAACCA für die Amplifikation einer Sequenz aus PK15 Zellen verwendet. Die amplifizierte Sequenz, die der Ectodomäne des transmembranen Hüllproteins p15Env (Aminosäuren 488-597) entspricht, wurde in den pCAL-n-Vektor (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) kloniert und in *E.coli* exprimiert. Die Sequenzierung dieses Klons zeigte, dass das transmembrane Hüllprotein von PERV-A exprimiert wurde (Fiebig, et al., 2003). Für die Herstellung des Capsidproteins p27Gag von PERV-C wurde die Sequenz des gesamten gag-Gens amplifiziert, in den pQ-n-Vektor kloniert und in *E.coli* exprimiert (QIAGEN, Hilden). Das exprimierte Protein wurde durch

Affinitätschromatographie mittels einer Ni-NTA Säule (QIAGEN) und 8 Molar Harnstoff (Sigma) bei pH 4.0 aufgereinigt.

Peptide, die der immundominanten und immunsuppressiven Domäne von p15Env entsprechen (Tab. 3) wurden für ELISA Tests verwendet (Tacke, et al., 2001).

Tabelle 3: PERV-spezifische Proteine und Peptide

Proteine/ Peptide	Präparation	Beschreibung/Herkunft	Methode
rp27Gag	Rekombinantes Protein exprimiert in E.coli, gereinigt über Affinitätschromatographie	PERV-C Gag, Capsidprotein	Western Blot
rp15Env	Rekombinantes Protein exprimiert in E.coli, gereinigt über Affinitätschromatographie	PERV-A Env, transmembranes Hüllprotein	Western Blot
PERV-ido	Synthetisches, von p15Env abgeleitetes Peptid: immundominante Domäne	PERV-A Env (Aminosäuren 544-562)	ELISA
PERV-isu	Synthetisches, von p15Env abgeleitetes Peptid: immunsuppressive Domäne	PERV-A Env (Aminosäuren 529-546)	ELISA

2.2.3 Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteinlysate in ihre einzelnen Bestandteile aufzutrennen, wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE durchgeführt. Dafür wurden zwei je 1 mm dicke 12%ige SDS-PAGE Trenngele, bestehend aus 4,2 ml einer 30%igen Mischung aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid (37,5:1, Roth, Rotiphorese Gel 30), 3,5 ml Gelpuffer (3 M Tris-Base (Roth), 0,3% SDS), 2,8 ml H₂O (Bidest.), 70 µl einer 10%igen Ammoniumpersulfatlösung (APS, Bio-Rad) und 7 µl TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin, Invitrogen), verwendet. Die flüssige Trenngel-Lösung wurde zwischen zwei Glasplatten (Bio-Rad) gegossen, bis zu einem Zentimeter unter den oberen Rand. Anschließend wurden die Trenngele mit Isopropanol (Roth) überschichtet. Nachdem die Trenngele vollständig auspolymerisiert waren (nach ca. 30 min.), wurde das Isopropanol entfernt und es wurden für 4%ige Sammelgele 560 µl 30%iges Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid, mit 1,4 ml Gelpuffer, mit 2,24 ml H₂O (Bidest.), mit 70 µl 10%igem APS und mit 7 µl TEMED gemischt, diese Lösung wurde auf die Trenngele gegossen und in die noch flüssige Lösung wurden präparative Kämme gesteckt. Nach dem Erhärten der Sammelgele wurden die Gele senkrecht in eine Gelkammer (Bio-Rad Mini-System) gespannt, die innere Kammer mit 1x

Kathodenpuffer (0,1 M Tris-Base, 0,1 M Tricin (Sigma), 0,1% SDS) und die äußere Kammer mit 1x Anodenpuffer (0,2 M Tris-Base) gefüllt. Die Proteinlysate wurden vor dem Auftragen mit 1x Laemmli- Probenpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8; 4% SDS; 12% Glycerol (Sigma); 0,01% Bromphenolblau (Bio-Rad); 5% 2-Mercaptoethanol (Sigma)) versetzt und für 5 Minuten bei 95°C gekocht (Eppendorf comfort). Zur Bestimmung der Größe der Banden wurde ein vorgefärbter Größenstandard (Seebblue® Plus2-Marker, Invitrogen) mitgeführt. Die Elektrophorese (PowerPac 300, Bio-Rad) wurde anhand der Bromphenolblau Bande verfolgt und lief bei 100 Volt für 1 bis 1,5 Stunden.

2.2.4 DNA Isolierung aus Zellen und Geweben

Für die Isolierung der DNA wurden adhärente Zellen für 15 Minuten bei 37°C mit 2 ml einer 0,25%igen Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit einem Zellschaber (TPP) vom Boden der Gewebekulturflasche gelöst, mit 8 ml frischem Medium versetzt, vereinzelt und mit 470 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Kendro). Anschließend wurden die Zellen 1x mit 10 ml sterilem PBS gewaschen (470 x g, 10 Minuten, Raumtemperatur), mit 5 ml Lysepuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4 (Roth); 1 mM EDTA (Merck), 100 mM NaCl (Merck); 100 µg/ml Proteinase K (20 mg/ml, Invitrogen), 0,5% SDS (10%)) versetzt und für 2 Stunden bei 60°C im Wasserbad inkubiert (Fa. Memmert über Neolab Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Berlin).

Zur Phenolextraktion wurde das Zelllysat mit einem halben Volumen Phenol (Roti-Phenol, Roth) versetzt, gemischt und bei circa 3200 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Falconröhrchen (TPP) überführt und die Phenolextraktion wiederholt. Zur Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die wässrige Phase in ein neues Falconröhrchen überführt, mit 1 Volumen Phenol/Chloroform (Roth) versetzt und zentrifugiert. Anschließend wurde die Phenol/Chloroform-Extraktion wiederholt. Schließlich wurde die wässrige Phase in ein neues Falconröhrchen überführt, mit einem zehntel Volumen einer 3M NaAcetat-Lösung, pH6.5 (Merck) und dem zweifachen Volumen aus eiskaltem absolutem Ethanol (Roth) versetzt und die DNA wurde über Nacht bei -80°C gefällt. Anschließend wurde die DNA bei 4°C abzentrifugiert, 1x mit 70%igem Ethanol gewaschen und das DNA-Pellet wurde getrocknet. Zuletzt wurde die DNA in 50 bis 100 µl TE-Puffer, pH 8.0 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

Für die DNA-Isolierung aus Geweben und Organen wurden 25 bis 35 mg Gewebe in einem sterilen Mörser mit flüssigem Stickstoff versetzt, zerkleinert und in einen mit 5 ml Lysepuffer (300 µg/ml Proteinase K) gefüllten, eisgekühlten Homogenisator überführt. Das zerkleinerte

Gewebe wurde für 10 Minuten homogenisiert, in ein 15 ml-Falconröhrchen dekantiert und anschließend 2 Stunden bei 60°C inkubiert. Zur Fällung der DNA wurde eine Phenol- und Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt.

2.2.5 RNA Isolierung aus Zellen und Geweben

Um aus 1×10^7 Zellen pro ml die RNA zu isolieren, wurde 1 ml TRI-Reagenz (Sigma) zu den in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführten Zellen gegeben, homogenisiert und die Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter dem Abzug inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Chloroform (Roth) dazugegeben, gemischt und für 15 Minuten inkubiert. Zur Phasentrennung wurde das Gemisch bei $12000 \times g$ für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen 70%igem Ethanol (hergestellt mit DEPC-Wasser: 0,1% Diethylpyrocarbonat (Sigma)) gelöst in H₂O (Bidest.) und anschließend autoklaviert) versetzt. Für die Fällung und Elution der RNA wurde die alkoholische Lösung nach den Angaben des RNeasy Mini Kits (QIAGEN) behandelt. Die RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

2.2.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der PCR wurde verwendet, um provirale Sequenzen in zellulärer genomischer DNA nachzuweisen. Dafür wurden maximal 1 µg genomische DNA in einem Reaktionsansatz von 20 µl für die Amplifikation eingesetzt. Der Reaktionsansatz enthielt außerdem je 250 µM der vier Desoxyribonucleotidtriphosphate ATP, CTP, GTP und TTP (Applied Biosystems), 1,5 mM MgCl₂ (Applied Biosystems), 0,5 µM Primer, 2 µl 10x PCR-Puffer (Applied Biosystems) und eine Einheit Taq DNA-Polymerase („Ampli-Taq“ Gold, Applied Biosystems). Die für die Amplifikation der PERV-spezifischen Sequenzen verwendeten Primer sind in Tabelle 4 dargestellt. Die Bedingungen für die Amplifikation waren: 1 Zyklus mit 10 Minuten bei 95°C; danach 35 Zyklen mit je 45 Sekunden bei 94°C, 45 Sekunden bei 55°C und 1 Minute bei 72°C; sowie 1 Zyklus mit 7 Minuten bei 72°C (Multicycler PTC-200, MJ Research, Waltham, MA, USA). Zur Kontrolle gleicher Mengen an aufgetragener DNA wurden β-Actin Primer (Tab. 4) verwendet. Nach der Amplifikation wurden die Amplifikate mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch die Verwendung von Ethidiumbromid (Sigma) mit anschließender UV-Bestrahlung (Gel-Doc, Bio-Rad) sichtbar gemacht.

Tabelle 4: Sequenzen und Bezeichnungen der verwendeten Primer

Region	Sequenz (5'→3')	Amplifikations- produkt (Bp)	Referenz
<i>gag</i>	GCGACCCACGCAGTTGCATA CAGTTCCTTGCCCAGTGTCTT	662	(Paradis, et al., 1999)
<i>pol</i>	TTGACTTGGGAGTGGGACGGGTAAC GAGGGTCACCTGAGGGTGTGGAT	815	(Czauderna, et al., 2000)
<i>envA</i>	TGGAAAGATTGGCAACAGCG AGTGATGTTAGGCTCAGTGG	360	(Le Tissier, et al., 1997)
<i>envB</i>	TTCTCCTTTGTCAATTCCGG TACTTTATCGGGTCCCCTG	263	(Le Tissier, et al., 1997)
Porzine COII	TCACCCATCATAGAAGAACTCCTACA TTTTACGGTTAAGGCTGGGTTATTAATT	255	(Switzer, et al., 1999)
β-Actin	CTACAATGAGCTGCGTGTGG AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC	528	R&D Systems Inc. Kat.-Nr.: RDP-38
MoMLV <i>p15Env</i>	TAGGAACAGGGACTACTGCTCTAATG TTAAACAGTCCCTCAAACCATCCTTG	380	(Irgang, et al., 2004)

2.2.7 Sensitivität der verwendeten Primer

Die Bestimmung der Sensitivität der Primer in der PCR gibt einen Hinweis darauf, wie spezifisch das jeweilige Primerpaar ist. Zur Bestimmung der Sensitivität der PERV-spezifischen Primer *PERV-gag*, *-pol*, *-envA* und *-envB* wurden je 1×10^6 293-Zellen mit Verdünnungen von 293/PERV-A/C-, 293/PERV-B- und PK15-Zellen beginnend mit 1×10^6 bis 1×10^0 gemischt. Anschließend wurde die DNA der Zellgemische mit Hilfe des DNA Blood Mini Kits (QIAGEN) isoliert und die Konzentration photometrisch bestimmt (Biospec-1601; Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg). Die Konzentration der jeweiligen DNA-Gemische wurde mit TE-Puffer auf 100 ng/μl eingestellt. Für die anschließende PCR wurden 100 ng DNA pro Reaktionsansatz eingesetzt.

2.2.8 RT-PCR

Für das Umschreiben von mRNA in cDNA wurde der One-Step RT-PCR Kit (Invitrogen) verwendet. Diese Methode ermöglicht die reverse Transkription von mRNA in cDNA und eine anschließende PCR mit spezifischen Primern in einem Schritt. Für die RT-PCR wurden 100 ng mRNA in einem Reaktionsansatz von 20 µl eingesetzt. Die verwendeten Primer waren:

5'- TGCTGTTTGCATCAAGACCGC (vor SD; Vorwärtsprimer),

5'- ACAGACACTCAGAACAGAGAC (hinter SD; Rückwärtsprimer) und

5'- ATGGAGGCGAAGCTTAAGGGGA (hinter SA; Rückwärtsprimer). Die aufgetragene Menge an RNA wurde durch Verwendung von β -Actin Primern (Tab. 4) überprüft. Zur Kontrolle von DNA-Kontaminationen wurden parallel Reaktionsansätze ohne RT mitgeführt. Die Bedingungen für die Amplifikation waren: 1 Zyklus mit 30 Minuten bei 50°C; gefolgt von 1 Zyklus mit 2 Minuten bei 94°C; danach 35 Zyklen mit je 45 Sekunden bei 94°C, 45 Sekunden bei 55°C und 1 Minute bei 72°C; sowie 1 Zyklus mit 7 Minuten bei 72°C. Nach der Amplifikation wurden die Fragmente auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

2.3 Immunologische Methoden

2.3.1 PERV-spezifische Antiseren

Es wurden verschiedene PERV-spezifische Antiseren generiert, die in Tabelle 5 zusammengefasst sind. Einige Kontroll-Seren wie Anti-PERV-ido und Anti-PERV-isu wurden schon von Tacke et al. beschrieben (Tacke, et al., 2001). Für die Evaluierung der neu etablierten Methoden wurde ein Ziegenserum gegen das rekombinante transmembrane Hüllprotein p15Env entwickelt (Fiebig, et al., 2003). Zusätzlich wurde ein Antiserum gegen das rekombinante Capsidprotein p27Gag durch Immunisierung einer Ziege mit dem rekombinanten Protein generiert. Beide Seren reagierten in ELISA Tests, Western Blots und Immunfluoreszenztests. Schließlich wurden kreuzreagierende Antiseren gegen p30Gag und gp70Env des murinen Friend-Leukämievirus (FLV) verwendet.

Tabelle 5: Verwendete Antiseren und Antikörper

Antiserum/ Antikörper	Für die Immunisierung verwendetes Antigen	Beschreibung/Herkunft	Spezies
Anti-rp27Gag	rp27Gag	PERV-C Gag	Ziege
Anti-rp15E	rp15Env	PERV-A Env	Ziege
Anti-PERV-ido	PERV-ido (AS 544-562)	PERV-A Env	Kaninchen
Anti-PERV-isu	PERV-isu (AS 529-546)	PERV-A Env	Kaninchen
Anti-p30Gag		FLV	Ziege
Anti-gp70Env		FLV	Ziege
Anti-Ziege IgG	Ganzes Molekül	Isoliert durch Affinitätschromatographie; Peroxidase konjugiert/Sigma	Kaninchen
Anti-Ziege IgG	Ganzes Molekül	FITC konjugiert/Sigma	Kaninchen
Anti-Maus IgG	Fab Fragment	Peroxidase konjugiert/Sigma	Ziege
Anti-Human IgM	μ -Kette	Sigma	Ziege
Anti-Human IgG	Fc Fragment	Sigma	Ziege

2.3.2 Spezies-spezifische Antikörper

Die in den immunologischen Untersuchungen verwendeten sekundären Antikörper sind ebenfalls in Tabelle 5 zusammengefasst.

2.3.3 Western Blot

Für die Untersuchung von Seren verschiedener Spezies auf das Vorhandensein spezifischer Antikörper, wurden entsprechende Antigene mittels SDS-PAGE in ihre Bestandteile getrennt und auf PVDF-Membranen (Immobilon™-psq, Millipore, Eschborn) übertragen. Dazu wurden die PVDF-Membran und zwei 3-Millimeter dicke Whatman-Filterpapiere (Bio-Rad) auf Gelgröße zurecht geschnitten, die PVDF-Membran in absolutem Methanol (Roth) angefeuchtet und zusammen mit den Filterpapieren und Gelen in Transferpuffer (48 mM Tris-Base; 39 mM Glycin (Sigma); 3,75 ml 10%iges SDS; 200 ml Methanol; mit H₂O (Bidest.) auf einen Liter aufgefüllt) für circa 20 Minuten equilibriert. Anschließend wurde der Blot wie folgt zusammengesetzt: Auf die untere Platin-Anode einer Semi Dry Transferzelle (Bio-Rad) wurde ein Whatman-Filterpapier luftblasenfrei aufgelegt. Die PVDF-Membran und das Gel wurden nacheinander auf das Filterpapier gelegt und die Luftblasen entfernt. Schließlich wurde auf das Gel das zweite Filterpapier ebenfalls luftblasenfrei aufgebracht. Die

Transferzelle wurde mit der Kathode verschlossen und die Proteine wurden 1 Stunde lang bei 15 Volt auf die PVDF-Membran transferiert.

Vor dem Auftragen der jeweiligen Seren wurde die PVDF-Membran viermal je 5 Minuten mit 1x PBS auf einem Schüttler gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Bindungen mit PBS/3% BSA für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurde die Membran in eine Multiscreen-Kammer (Mini-Protean II; Bio-Rad) eingespannt und die Seren wurden in 1:100 Verdünnungen mit PBS/0,3% BSA aufgetragen. Nach der Inkubation für 16 Stunden bei 4°C wurde die Membran mit PBS/0,05% Tween 20 (PBST; Serva, Heidelberg) gewaschen und mit einer 1:1000 Verdünnung der jeweiligen spezies-spezifischen Antikörper (Tab. 4) für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde die Membran fünfmal mit PBST gewaschen und die Bindung der Antikörper wurde durch die Verwendung einer DAB-Lösung (10 mg 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid Dihydrat (Pierce, Sankt Augustin, Deutschland) gelöst in 25 ml 25 mM Tris, pH 8.0) und Peroxid (3 µl einer 30%igen H₂O₂-Lösung (Merck)) visualisiert.

2.3.4 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Synthetische, von PERV abgeleitete, Peptide (siehe Tab. 3) wurden mit 1 µg pro Well in 96-Well Platten über Nacht bei 37°C immobilisiert. Die Platten wurden einmal mit PBST gewaschen und für 1 Stunde mit 100 µl pro Well PBST/3% BSA bei Raumtemperatur inkubiert. Je 50 µl Testserum pro Well wurden als 1:100 Verdünnungen und in dreifacher Ausführung nach dem waschen der Platten mit PBST aufgetragen und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBST, wurden die Platten für eine weitere Stunde mit 1:1000 Verdünnungen von Peroxidase-gekoppelten, anti-humanen und anti-kaninchen γ -Immunglobulin-Antikörpern (IgG; Sigma) inkubiert. Die Bindung der Antikörper wurde durch die Verwendung von 30 mg *o*-Phenylendiamin (Sigma) gelöst in 100 ml H₂O (Bidest.) und der Zugabe von 30 µl Peroxid-Lösung visualisiert. Die Farbentwicklung wurde durch die Zugabe von 2,5 M Schwefelsäure (Roth) gestoppt und bei 492 nm im UV-Spektrometer, mit 620 nm als Referenzwellenlänge, photometrisch gemessen. Platten ohne Peptide dienten als Kontrollen. Die Absorption der Negativkontrollen (Platten ohne Peptide) wurde von den mit Peptiden beschichteten Platten abgezogen. Die Ergebnisse wurden als Positiv bewertet, wenn sie größer als der Durchschnitt plus dreimal die Standardabweichung der Negativkontrollen waren.

Die Bestimmung der Konzentration des aus porzinen Langerhans'schen Inselzellen freigesetzten Insulins wurde mit einem kommerziellen Insulin-ELISA Test nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (BioSource Europe S.A., Nivelles, Belgien).

2.3.5 Durchflusszytometrie

Um die Expression der PERV-spezifischen Proteine p15Env und p27Gag zu überprüfen, wurden 1×10^6 Zellen mit 500 μ l 3,7%igem Formalin (Formaldehyd-Lösung (Merck) in PBS) versetzt und für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS/2% FKS bei 500 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abgenommen und für 15 Minuten mit 500 μ l 0,5% Triton X-100 (Roth) inkubiert. Nach zweimaliger Zentrifugation mit PBS/2% FKS bei 2300 UpM, wurden die Zellen für 20 Minuten mit PBS/5% Magermilchpulver inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal zentrifugiert und für 1 Stunde mit 1:1000 Verdünnungen der Primärantikörper Anti-rp15Env, Anti-rp27Gag und den jeweiligen Isotyp-Kontrollen (Tab. 5) inkubiert. Nach zwei Zentrifugationsschritten wurden die Zellen für eine weitere Stunde mit einer 1:6000 Verdünnung des FITC-gekoppelten Sekundärantikörpers Anti-Ziege IgG inkubiert, zentrifugiert und in 300 μ l FACS-Lysingsolution (BD Biosciences, Erembodegem-Aalst, Belgien) resuspendiert. Die Messung erfolgte am FACScalibur (BD Biosciences).

2.4 Virologische Methoden

2.4.1 Virusisolate

Für die Infektionsstudien wurden sterilfiltrierte Zellkulturüberstände von der porzinen Nierenzelllinie PK15, die PERV-A und PERV-B produzierte (PK15/PERV), und von der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293, die ebenfalls PERV-A und PERV-B produzierte (293/PERV; zur Verfügung gestellt von Dr. R. Weiss, London, England), verwendet. Zusätzlich wurden die Isolate von PERV-B und des rekombinanten PERV-A/C (PERV/5°) verwendet. Dazu wurden Zellkulturüberständen der mit PERV-B bzw. PERV-A/C produktiv infizierten humanen Nierenzelllinie 293 verwendet. Bei PERV-B handelt es sich um einen molekularen Klon, der von Dr. D. Onion (Glasgow, England) zur Verfügung gestellt wurde. PERV-A/C wurde ursprünglich aus stimulierten primären PBMC von Mikroschweinen isoliert (Wilson, et al., 2000; Wilson, et al., 1998). Die Passagierung von PERV-A/C auf 293-Zellen führte zu einer Erhöhung des viralen Titers, die durch genetische Veränderungen in der

viralen LTR bedingt war (Denner, et al., 2003). In den hier beschriebenen Experimenten wurde die 5. Passage des PERV-A/C verwendet. Die Titer der sterilfiltrierten Zellkulturüberstände von PK15/PERV, von 293/PERV, von PERV-B und von PERV-A/C betragen $1 \times 10^{1.3}$, $1 \times 10^{2.2}$, $1 \times 10^{1.7}$ und 1×10^4 TCID₅₀/ml (Tissue culture infectivity dose) wie durch Endpunkt-Titration auf humanen 293-Zellen bestimmt werden konnte.

2.4.2 Isolierung von Viruspartikeln aus Zellkulturüberständen

In 12 ml-Zentrifugationsröhrchen (Beckmann GmbH, München) wurden 2 ml einer 20%igen Saccharose Lösung vorgelegt und mit 10 ml Zellkulturüberstand PERV produzierender 293-Zellen überschichtet. Es wurde in einen swing-out-Rotor (SW-41, Beckmann) für 3 Stunden bei 25000 UpM und 4°C ultrazentrifugiert (Beckmann L8-70). Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Viruspellet wurde zur Proteinisolierung in RIPA-Puffer resuspendiert.

2.4.3 Bestimmung der Reversen Transkriptase Aktivität

Für die Bestimmung der Aktivität viraler Reverser Transkriptase, wurde der C-type-RT™ Activity Assay (Cavidi Tech, Uppsala, Schweden) nach den Anweisungen des Herstellers verwendet.

2.4.4 Infektionsstudien *in vitro*

Die Infektion der Zelllinien 293^{neo+}, 293, LLCMK2 und EB176 fand auf zwei unterschiedliche Arten statt. Einerseits wurden 293^{neo+}-Zellen für 7 Tage mit der gleichen Menge porziner Inselzellen, mit und ohne Zugabe von 8 µg/ml Polybren (Sigma) während der ersten 16 Stunden, inkubiert. Polybren erleichtert das Eindringen von Viruspartikeln in die Zielzelle. Nach sieben Tagen Kokultivierung wurden die Zellen mit 400 µg/ml G418 behandelt, um die porzinen Inselzellen zu entfernen. Ein bis vier Wochen nach der Behandlung mit G418 wurden die 293-Zellen lysiert und die DNA isoliert.

Andererseits wurden 2×10^6 293-, LLCMK2- und EB176-Zellen mit je 10 ml zentrifugiertem ($3200 \times g$ für 10 Minuten) und sterilfiltriertem (Sterilfilter mit einem Porendurchmesser von 0,45 µm; Schleicher & Schuell) Zellkulturüberstand PERV-produzierender Zellen versetzt. Nach einer Infektionszeit von mindestens einer Woche, wurden die Zellen lysiert und die DNA isoliert.

Die Infektion von murinen Zelllinien und primären Zellen erfolgte auf drei unterschiedliche Arten: 1. 10 ml zellfreies Virus wurden zu 5×10^6 Zellen in Anwesenheit von 6 bis 16 $\mu\text{g/ml}$ Polybren (Sigma) gegeben. 2. 1×10^5 PERV-A/C-produzierende 293-Zellen, die sich in den oberen Wells einer 6-Well Transwell-Platte (Costar®, Vitaris AG, Baar) befanden, wurden für fünf Tage mit 1×10^5 unifizierten murinen Zellen, die sich in den unteren Wells der Transwell-Platte befanden, inkubiert. Die RT-Aktivität in den Transwell-Platten betrug 500 mU/ml. 3. Die Mauszelllinie 3T6 wurde mit dem Neomycinresistenzgen transfiziert durch Transfektion mit dem pcDNA3.1-Vektor (Invitrogen) unter Verwendung des Transfast Transfektionsreagenz (Promega) und anschließender Selektion mit G418 (Gibco BRL). 1×10^5 3T6-Zellen wurden dann für fünf Tage mit der gleichen Anzahl an PERV-A/C-produzierenden 293-Zellen inkubiert, in An- bzw. Abwesenheit von 8 $\mu\text{g/ml}$ Polybren während der ersten 16 Stunden. Alle Zellen wurden anschließend mit 400 $\mu\text{g/ml}$ G418 behandelt, um die Virus-produzierenden Zellen zu eliminieren und am Tag 6, 10 und 15 wurden die Zellen gesplittet. Die Zellen wurden am Tag 20 mit Proteinase K bei 56°C für drei Stunden lysiert und die DNA wurde für PCR-Analysen mit Hilfe des QIAgen Blood Mini Kits isoliert.

2.4.5 Infektionsstudien *in vivo*

Die *in vivo* Untersuchungen lassen sich in Mausmodelle und erste klinische Studien im Menschen unterteilen. Für die Infektion mit PERVs *in vivo* wurden zunächst männlichen BALB/c-Mäusen Barium-Alginat-verkapselte porzine Inselzellen (Gaumann, et al., 2000) in die Peritonealhöhle injiziert. Die Mäuse wurden 14 Tage vor der Applikation der Inselzellen mit drei verschiedenen Immunsuppressiva (Zenapax, ProGraf und Rapamune) nach dem sogenannten Edmonton Protokoll (Shapiro, et al., 2000) behandelt. Die Behandlung mit den Immunsuppressiva wurde noch 14 Tage nach der Injektion der verkapselten Inselzellen fortgeführt. Nach circa 10 Monaten wurden die Inselzellen wieder entfernt und den Mäusen wurde Blut zur Serumgewinnung entnommen. Um Effekte der Immunsuppressiva unterscheiden zu können, wurde eine Kontrollgruppe mitgeführt, die keine Immunsuppression erhielt.

In einem weiteren *In vivo*-Infektionsmodell wurden SCID-Mäusen (severe combined immunodeficiency; männliche SCID-Mäuse, 10 bis 12 Wochen alt und 20 bis 25 g schwer, Charles River Laboratories, Sulzfeld) zellfreie Zellkulturüberstände PERV-A/C-produzierender 293-Zellen appliziert. Um die Überstände von Zellen und Zellresten zu befreien, wurden sie zentrifugiert und sterilfiltriert. Die Applikation zellfreier Lösungen

verhindert auftretende Komplikationen durch Mikrochimärismus. Den SCID-Mäusen wurden je 1 ml zellfreier Zellkulturüberstand intra peritoneal, intra muskulär und subcutan appliziert. Nach circa 3 Wochen wurden den Mäusen die Leber, die Milz und die Nieren entnommen und die DNA aus den Organen isoliert. Um mögliche Effekte, die durch das Zellkulturmedium ausgelöst wurden unterscheiden zu können, wurde einer Kontrollgruppe nur Zellkulturmedium verabreicht.

2.4.6 Klinische Studien

Bei den klinischen Studien handelte es sich zunächst um acht Patienten, die mit einem extrakorporalen Leberunterstützungssystem behandelt wurden, bevor sie ein humanes Lebertransplantat erhielten (Irgang, et al., 2003; Sauer, et al., 2003). Das Leberunterstützungssystem war mit porzinen Hepatozyten bestückt, die sich in einem speziell entwickelten Bioreaktor (Abb. 6 (Gerlach, 1997)) befanden. Die für den Bioreaktor verwendeten Hohlfasern bildeten ein dreidimensionales Netzwerk, in dessen Hohlräume $1,8 \times 10^{10}$ bis $4,4 \times 10^{10}$ porzine Hepatozyten in Kokultur mit nicht-parenchymalen Zellen kokultiviert wurden. Die Hepatozyten stammten von spezifizierten pathogen-freien Schweinen der Deutschen Landrasse. Die Tiere waren frei von Zoonosen-verursachenden Mikroorganismen, wie durch Serologie gezeigt werden konnte. Die Hepatozyten wurden durch eine Leberperfusion mit Collagenase in fünf Schritten erhalten (Gerlach, et al., 1994). Die Zugabe von tierischer Biomatrix und FKS wurde vermieden. Die Viabilität der in den Bioreaktor verbrachten Hepatozyten wurde durch das Trypanblau-Ausschluss Verfahren bestimmt und variierte zwischen 91 und 98%. Während der Ruhephase von 1 bis 14 Tagen vor der therapeutischen Anwendung, wurden die Bioreaktoren täglich auf Stoffwechselaktivität hin überprüft. Das Leberunterstützungssystem bestand aus einem Blutkreislauf mit einer kontinuierlichen Plasmaseparationseinheit (CRRT, B. Braun, Melsung) und einem zweiten Kreislauf zur Plasmaperfusion der Bioreaktoren (Hybrid Organ, Berlin). Der venöse Zugang wurde durch die Verwendung eines doppelwandigen Dialysekatheters (Arrow International, Reading, PA, USA) in die interne juguläre oder femorale Vene erreicht. Um die Koagulation zu verhindern, wurde eine kontinuierliche Infusion von Heparin durchgeführt. Das behandelte Plasma wurde mit der Blutzellfraktion wieder vereinigt und in den Patienten zurückgeleitet.

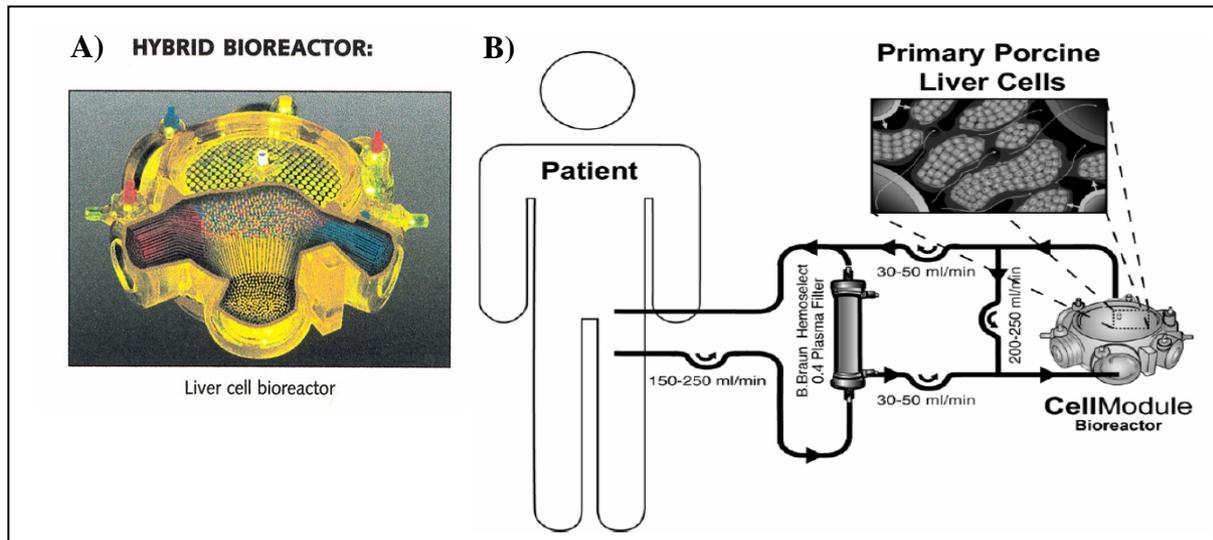


Abbildung 6: Verwendetes Leberunterstützungssystem (Gerlach, 1997). **A)** Design des mit porzinen Hepatozyten bestückten Bioreaktors. **B)** Schema der Perfusion des Bioreaktors mit dem Serum des Patienten.

Acht Patienten mit akutem oder akutem bis chronischem Leberversagen, die für eine Lebertransplantation mit hoher Dringlichkeit vorgesehen waren, wurden in die Studie aufgenommen. Das Alter der Patienten lag zwischen 26 und 58 Jahren. Die Therapie wurde initiiert, um eine weitere Verschlechterung der klinischen Konditionen der Patienten, aufgrund des Mangels eines passenden Spenderorgans, zu vermeiden und endete, sobald ein passendes Organ für die Transplantation zur Verfügung stand. Die Erlaubnis für die Therapie wurde von den relevanten öffentlichen Autoritäten und ethischen Kommissionen eingeholt. Alle Patienten wurden in einer ausgewiesenen Intensivstation für Transplantationen behandelt. Sofort nach der Aufnahme ins Krankenhaus wurden die Patienten für eine Lebertransplantation mit hoher Dringlichkeit eingestuft und für eine Transplantation bei EUROTRANSPLANT (Leiden, Niederlande) registriert. Alle Behandlungen wurden in voller Übereinstimmung mit der Helsinki-Erklärung von 1975 durchgeführt. Die Dauer der Behandlung lag zwischen 8 und 46 Stunden. Serumproben der Patienten wurden vor der Bioreaktorbehandlung und vor der Lebertransplantation entnommen. Von sieben der acht Patienten wurden zusätzlich ein halbes, ein und drei bis fünf Jahre nach der Behandlung Serumproben entnommen. Ein Patient verweigerte die Teilnahme an serologischen Untersuchungen.

In einer weiteren retrospektiven klinischen Studie (Diatranz, Auckland, Neuseeland), wurden 18 Typ I Diabetes Patienten porcine Inselzellen auf drei unterschiedliche Arten transplantiert: Erstens, als verkapselte Inselzellen; zweitens, als ein Gemisch aus Sertoli- und Inselzellen in einem speziell entworfenen Behältnis und drittens, als freie Inselzellen. Die porcinen Inselzellen wurden aus den Schweinerassen Large White und Camrough isoliert. Diese Schweine wurden intensiv auf konventionelle Mikroorganismen und Viren, die relevant für die Xenotransplantation sind (PLHV, PCMV und PCV), untersucht. Alle Patienten erhielten circa 10000 Inselzelläquivalente pro Kilogramm Körpergewicht. Die Sertoli-Inselzellstrukturen bestanden aus 20 bis 100 Sertolizellen pro Inselzelläquivalent. Die Patienten wurden bis zu neun Jahre lang regelmäßig auf pathogene Veränderungen untersucht. Von 14 Patienten wurde das Serum vor der Transplantation und zu bestimmten Zeitpunkten nach der Transplantation für die PERV-Serologie entnommen.

3. Ergebnisse

3.1 Keine Übertragung von PERV auf humane Zellen nach Kokultivierung mit porzinen Inselzellen der Deutschen Landrasse

Um die Freisetzung von PERV aus porzinen Inselzellen, die potentiell für die Behandlung von Diabetes mellitus verwendet werden würden, zu evaluieren, wurden Inselzellen von Schweinen der Deutschen Landrasse zusammen mit 293^{neo+}-Zellen für 7 Tage kokultiviert. Während dieses Zeitraums waren die Inselzellen lebendig, wie mittels eines Trypanblau-Ausschluss Tests gezeigt werden konnte, und produzierten Insulin, das mittels eines Insulin-ELISA nachgewiesen wurde (Abb. 7). Die Inselzellen in den ersten beiden Experimenten produzierten hohe Mengen an Insulin, während die Zellen aus der dritten Isolierung weniger Insulin freisetzten. Ein bis vier Wochen nach der Behandlung der Zellen mit G418, wurde die DNA der 293^{neo+}-Zellen mit Hilfe von PERV-spezifischen Primern in der PCR auf eine Integration von PERV-Proviren untersucht. Durch die Verwendung Neomycin-resistenter 293^{neo+}-Zellen und der anschließenden Selektion mit G418 wurden die porzinen Inselzellen eliminiert und ein Mikrochimärismus wurde verhindert. In drei unabhängigen Experimenten mit verschiedenen Inselzellisolaten aus Schweinen der Deutschen Landrasse, die von unterschiedlichen Schlachthäusern und Farmen aus Schleswig-Holstein stammten, konnten bei der Analyse der 293^{neo+}-Zellen keine Sequenzen von PERV-*envA* oder -*envB* amplifiziert werden (Abb. 8), trotz der Kokultivierung und der Verwendung von Polybren zur Erhöhung der Infektion der Zielzellen. Zusätzlich konnten auch bei einer PCR mit PERV-*gag* und PERV-*pol* Primern keine proviralen Sequenzen von PERV amplifiziert werden (Daten nicht gezeigt), während aus der DNA von PK15-Zellen PERV-spezifische *gag*-, *pol*-, *envA*- und *envB*-Sequenzen amplifiziert werden konnten. Des Weiteren war in der isolierten 293^{neo+}-DNA keine DNA porziner Inselzellen mehr vorhanden, wie durch die Abwesenheit von porzinen mitochondrialen COII-Amplifikationsprodukten (Untereinheit II der Cytochromoxidase) bestätigt werden konnte. Die Abwesenheit von Kontaminationen wurde durch die Verwendung von unbehandelten 293^{neo+}-Zellen und Wasser überprüft. Diese Ergebnisse zeigten keine Virusfreisetzung aus Inselzellen von Schweinen der Deutschen Landrasse, die lebendig waren und kontinuierlich Insulin produzierten.

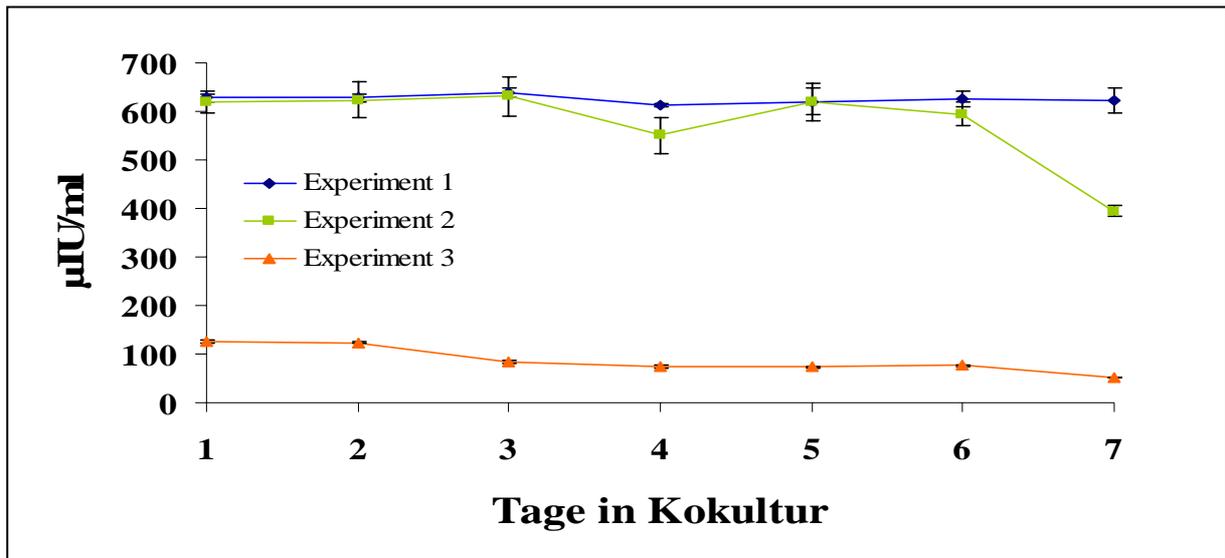


Abbildung 7: Insulinfreisetzung der porzinen Inselzellen in den ersten 7 Tagen. Die Insulinkonzentration ist in Mikroinsulineinheiten pro Milliliter ($\mu\text{IU/ml}$) angegeben. Die internen Kontrollen einer geringen und einer hohen Insulinfreisetzung hatten Werte von $22,9 \pm 1,9 \mu\text{IU/ml}$ und $122,4 \pm 22,6 \mu\text{IU/ml}$ ($19,4 \pm 3,9$ und $87 \pm 17 \mu\text{IU/ml}$ nach den Angaben des Herstellers).

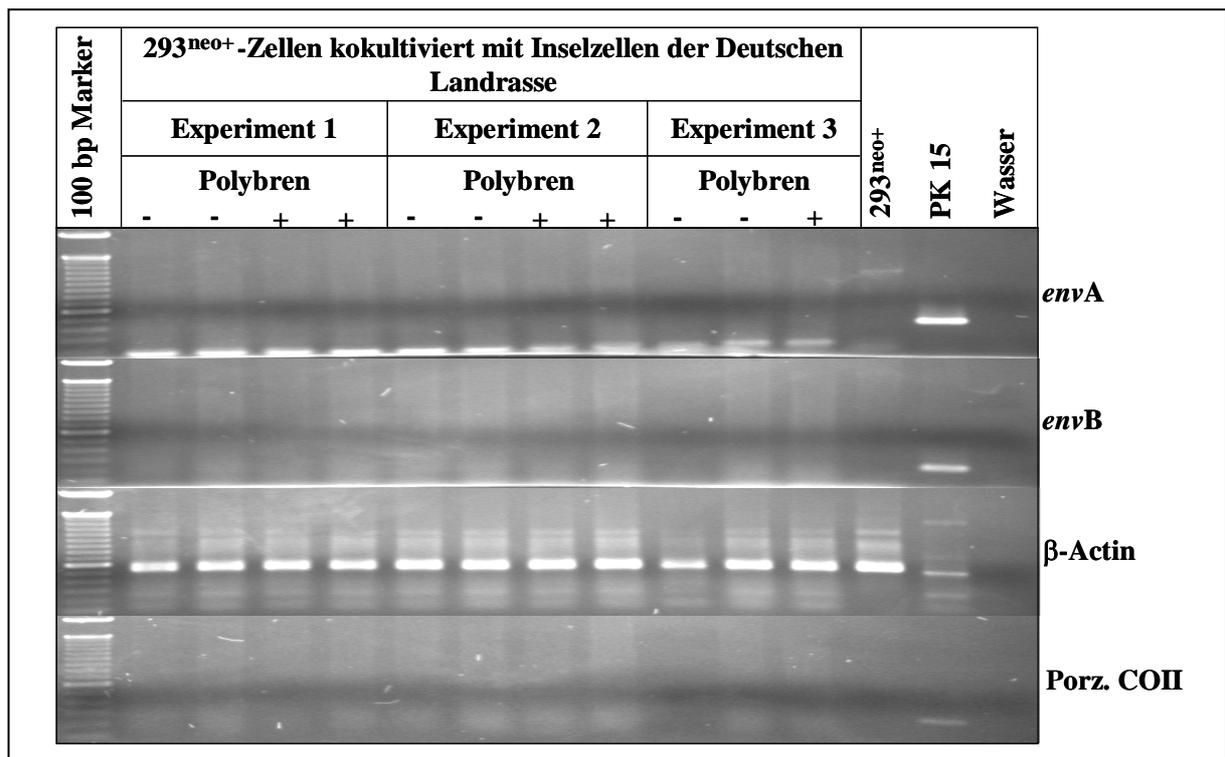


Abbildung 8: Keine Infektion mit PERV von 293^{neo+}-Zellen kokultiviert mit porzinen Inselzellen von Schweinen der Deutschen Landrasse. Der 100 Bp (Basenpaar) Marker zeigt DNA-Fragmente mit Längen zwischen 100 und 2000 Basenpaaren (Invitrogen). Die Amplifikationsprodukte PERV-*envA* und -*envB* sind 360 bzw. 263 Bp lang. β -Actin und die porzine COII (Porz. COII) zeigen Amplifikationsprodukte von 528 und 255 Bp-Länge.

3.2 Keine Infektion von BALB/c-Mäusen mit PERV nach Transplantation verkapselter Inselzellen der Deutschen Landrasse

Trotz der Abwesenheit einer *In vitro*-Infektion humaner Zellen mit PERV aus Inselzellen der Deutschen Landrasse, wurden weitere Versuche zur Evaluierung der PERV-Freisetzung durchgeführt. Dazu wurden BALB/c-Mäuse verwendet. Die Verwendung eines *In vivo*-Xenotransplantationsmodells hat den Vorteil, eine größere Auswahl an potentiellen PERV-suszeptiblen Zellen und Geweben erreichen zu können. Zum Schutz der Inselzellen der Deutschen Landrasseschweine vor den Immunreaktionen der Mäuse, wurden den Mäusen Barium-Alginat-verkapselte Inselzellen appliziert. Die Verwendung von Immunsuppressiva 14 Tage vor bzw. nach der Transplantation diente ebenfalls zum Schutz der Inselzellen. Mittels Western Blot und spezifischen Antiseren gegen Hüll- und Capsidproteine von PERV konnten keine PERV-spezifischen Antikörper in männlichen BALB/c-Mäusen, denen für zehn Monate porcine Inselzell-Transplantate appliziert wurden, detektiert werden (Abb. 9). Die Qualität des Western Blots wurde durch die Verwendung tierischer Kontrollseren gegen p27Gag, rekombinantes p15Env von PERV und einem kreuzreagierenden Serum gegen gp70 von FLV evaluiert. Alle Kontrollseren zeigten positive Reaktionen, die das Vorhandensein des korrespondierenden Antigens bestätigten. Die Reaktionen der Kontrollseren gegen gp70 und p15Env waren schwächer als die gegen p27Gag, da in der Viruspräparation weniger Env-Proteine vorlagen. Die in den Seren zweier Tiere der gemischten Gruppe IV nachgewiesenen Antikörper (Abb. 9) entsprachen nicht den Molekülgrößen PERV-spezifischer viraler Proteine, waren aber auch nicht gegen porcine Proteine gerichtet, wie durch einen Western Blot mit Proteinlysaten von porcinen Inselzellen als Antigen bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Also waren es mit humanen Proteinen kreuzreagierende Antikörper, da das im Western Blot eingesetzte PERV auf 293-Zellen gezüchtet wurde. Hier konnte gezeigt werden, dass Barium-Alginat-verkapselte porcine Inselzellen keine PERV-Infektion in immunsupprimierten BALB/c-Mäusen etablierten, während in einem Modellversuch mit Barium-Alginat-verkapselten PERV-produzierenden Zellen das Virus die Kapseln passieren konnte (Daten nicht gezeigt).

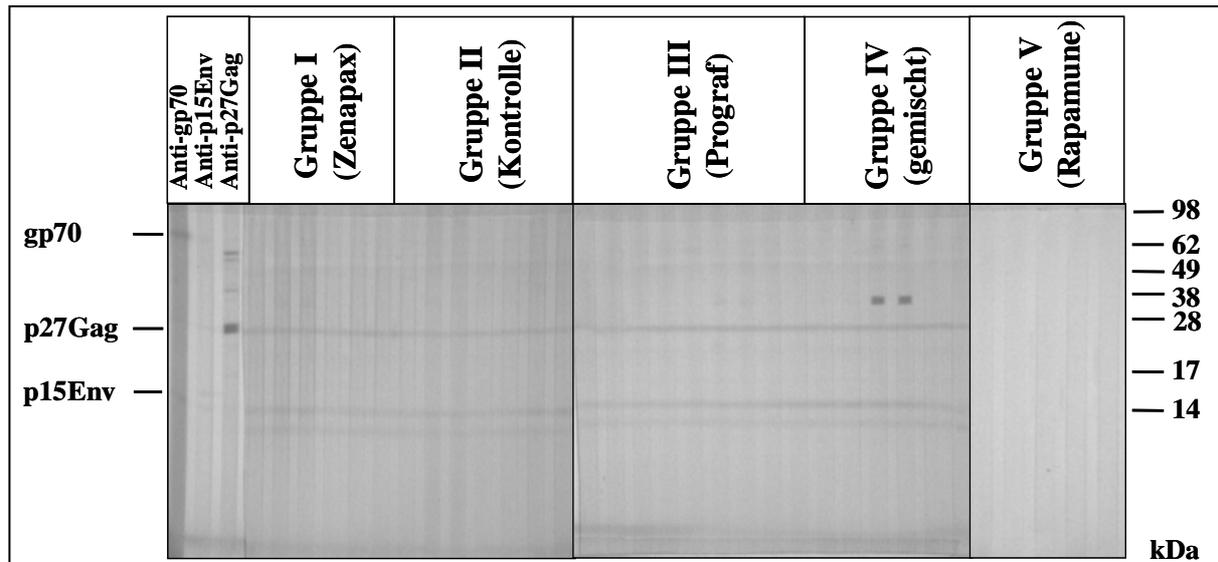


Abbildung 9: Western Blot mit Seren von BALB/c-Mäusen, die Transplantate von verkapselten porzinen Inselzellen enthielten. Der verwendete Western Blot beruhte auf einem viralen Proteinlysate des gesamten PERV als Antigen. Die Kontrollgruppe (Gruppe II) wurde nicht mit Immunsuppressiva behandelt. Der gemischten Gruppe (Gruppe IV) wurden alle drei Immunsuppressiva verabreicht: Zenapax, humanisierter IL-2R α -Antikörper; ProGraf, Lacton aus *Streptomyces tsukubaensis*; Rapamune, Antibiotika aus *S. Hygroscopicus*. Die angegebenen Molekülgrößen entsprechen denen des Seeblock® Plus2-Markers (Invitrogen).

3.3 Analyse der Expression PERV-spezifischer mRNA und Proteine in Inselzellen der Deutschen Landrasse

Da weder bei der Kokultivierung von 293^{neo+}-Zellen mit Inselzellen der Deutschen Landrasse noch bei der Transplantation der Inselzellen in BALB/c-Mäuse eine Freisetzung von infektiösem Virus beobachtet wurde, wurde die Expression von PERV-spezifischer mRNA in den Inselzellen untersucht. Mit Hilfe der RT-PCR und spezifischen Primern für *gag*, *pol* und *envA* konnte keine PERV-spezifische mRNA in den Inselzellen der Deutschen Landrasse detektiert werden (Abb. 10A). Wurde dagegen RNA von der porzinen Nierenzelllinie PK15 als Positivkontrolle verwendet, konnten distinkte und spezifische Amplifikationsprodukte für *gag*, *pol* und *envA* beobachtet werden. Durch die Amplifikation von porzinen COII-Sequenzen wurde die Verwendung gleicher Mengen an RNA von Insel- und PK15-Zellen bestätigt. Die Abwesenheit von zellulärer DNA wurde durch Weglassen der Reversen Transkriptase und fehlender Amplifikationsprodukte bestätigt. Wie erwartet, wurden PERV-Proviren in der DNA von Inselzellen der Deutschen Landrasse durch PCR-Analyse unter Verwendung von *gag*, *pol* und *envA* Primern detektiert (Abb. 10B). Hier wurde gezeigt, dass

in Inselzellen aus drei verschiedenen Schweinen der Deutschen Landrasse keine virale mRNA vorhanden war, trotz der Tatsache, dass Proviren präsent waren.

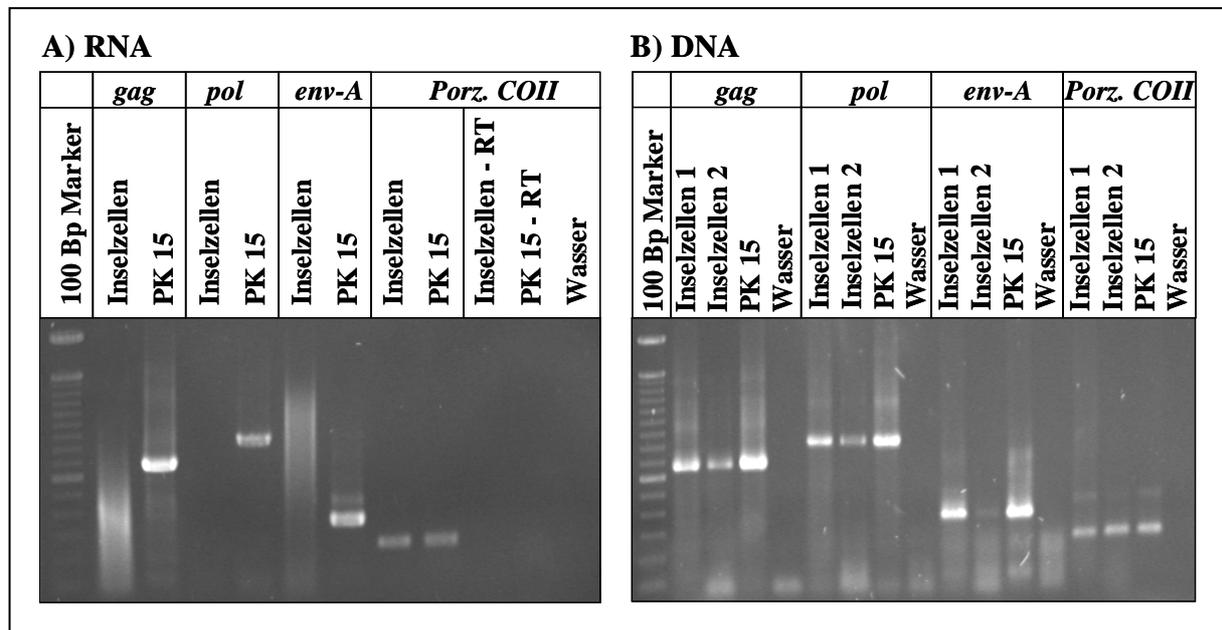


Abbildung 10: Analyse der Expression von PERV-spezifischen Sequenzen in Inselzellen der Deutschen Landrasse. A) RT-PCR mit RNA von Insel- und PK15-Zellen unter Verwendung von *gag*, *pol* und *envA* Primern. Eins der drei Inselzellisolate ist dargestellt. B) PCR mit DNA aus Insel- und PK15-Zellen. Es sind zwei der drei Inselzellisolate dargestellt.

Um die Ergebnisse aus den RT-PCR Experimenten zu bestätigen und unter Berücksichtigung der Möglichkeit, dass trotz der Abwesenheit von detektierbarer mRNA PERV-spezifische Proteine in den Inselzellen exprimiert werden könnten, wurde eine Analyse mittels Durchflusszytometrie durchgeführt (Abb. 11). Es konnten keine PERV-spezifischen Hüll- oder Capsidproteine (Env oder Gag) in permeabilisierten Inselzellen und uninfizierten 293-Zellen unter Verwendung von spezifischen Antiseren detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigten PERV-A/C-produzierende 293-Zellen starke Fluoreszenzsignale.

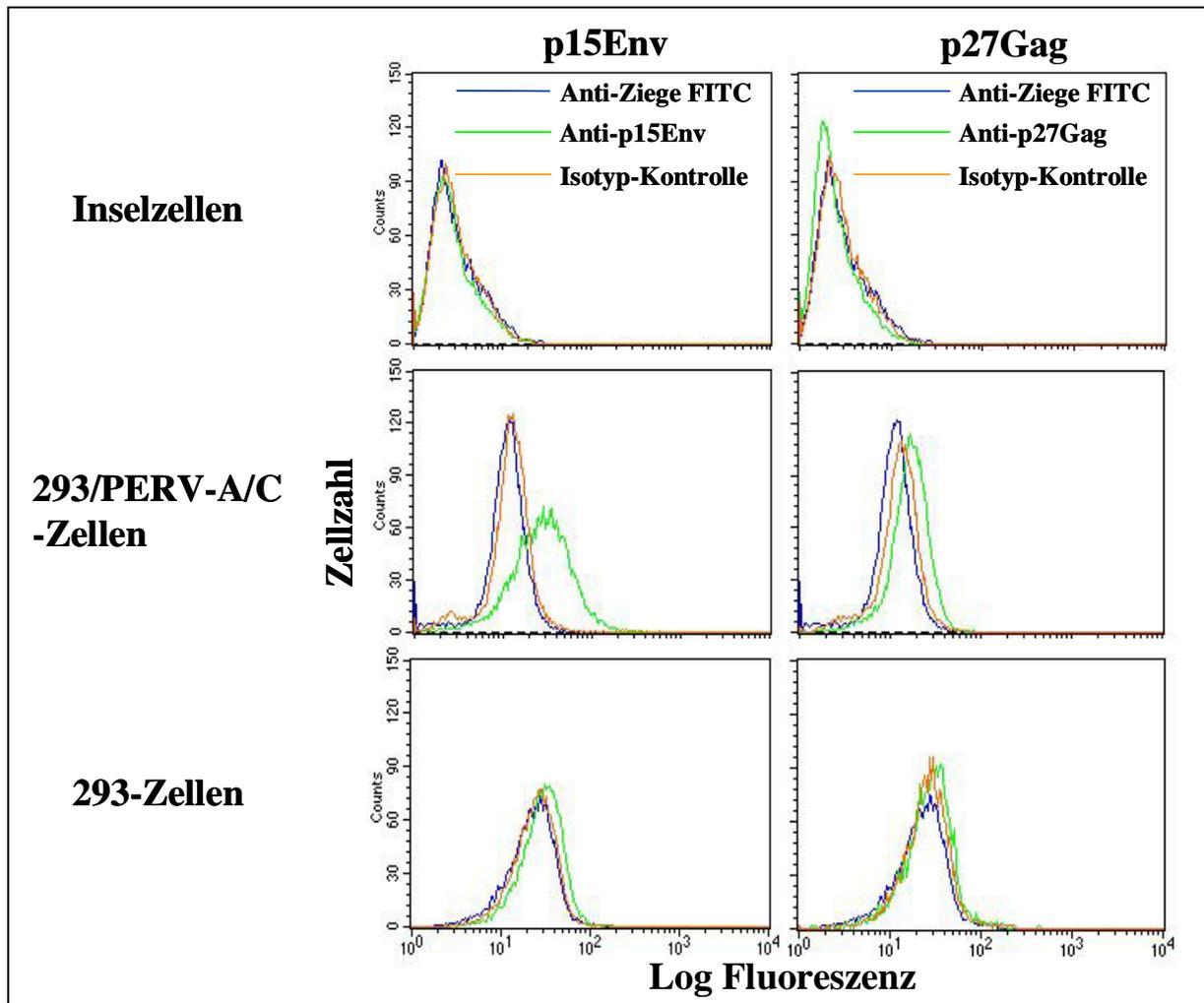


Abbildung 11: Proteinexpression von Inselzellen der Deutschen Landrasse *in vitro*. Bei den jeweiligen Isotyp-Kontrollen handelt es sich um Ziegenserum, die vor der Immunisierung mit rp15Env bzw. rp27Gag entnommen wurden.

3.4 Untersuchung der Infektion von Zelllinien nicht-humaner Primaten mit PERV

Auf Grund der phylogenetischen Nähe nicht-humaner Primaten zum Menschen, könnte die Infektion von Primaten mit PERV zahlreiche Erkenntnisse zur Pathogenität von PERV liefern. Daher wurden schon zahlreiche Versuche unternommen, Primaten *in vitro* mit PERV zu infizieren (Blusch, et al., 2000; Martin, et al., 1998a; Specke, et al., 2001b). In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich primäre Zellen und Zelllinien einiger nicht-humaner Primaten mit PERV infizieren ließen. In ersten *in vivo* Versuchen unserer und anderer Arbeitsgruppen konnte keine Übertragung von PERV nach Applikation hoher Dosen in immunsupprimierte Rhesusaffen, Paviane und Schweinsaffen beobachtet werden (Denner, et al., 2001; Martin, et al., 2002; Specke, et al., 2002b). PERV wurde deshalb auf Zellen von

Rhesusaffen und Schimpansen passagiert, um für spätere Versuche ein auf Affenzellen adaptiertes Virus zu gewinnen.

In der DNA von Zellen der Rhesusaffen-Nierenzelllinie LLCMK2, die mit zellfreiem PERV-A/C- oder PERV-B inkubiert wurden, ließen sich zwei bis drei Wochen nach der Inkubation PERV-spezifische provirale Sequenzen (Abb. 12A) nachweisen. Die Infektion von LLCMK2-Zellen mit PERV-A/C war mit oder ohne Polybren erfolgreich (Abb. 12A), wie durch die Amplifikation von *PERV-pol* und *PERV-envA* Sequenzen erkennbar war. Bei der Verwendung von *envA*-spezifischen Primern wurden in den LLCMK2-Zellen zusätzlich zelluläre Sequenzen amplifiziert, die möglicherweise verwandte endogene Retroviren darstellen. Bei der Infektion von LLCMK2-Zellen mit PERV-B ohne Zugabe von Polybren, waren sowohl *pol*-spezifische als auch *envB*-spezifische Sequenzen amplifizierbar, während bei den Zellen, die mit Polybren behandelt wurden, nur *envB*-spezifische Sequenzen detektierbar waren. Des Weiteren ließ sich drei Wochen nach der Inkubation mit PERV-B kaum noch *envB*-spezifische DNA amplifizieren. Schließlich waren die *pol*-spezifischen Amplifikationsprodukte der PERV-A/C bzw. PERV-B infizierten LLCMK2-Zellen schwächer als die von 293/PERV-A/C- und 293/PERV-B-Zellen, die als Positivkontrollen dienten (Abb. 12A). Die Verwendung gleicher Mengen an LLCMK2-DNA konnte durch die Amplifikation von β -Actin Sequenzen bestätigt werden.

Bei der lymphoiden Schimpansenzelllinie EB176 ließen sich eine Woche nach der Inkubation mit PERV-A/C in der DNA der EB176-Zellen Proviren nachweisen, wie durch die Amplifikation von *pol*- und *envA*-spezifischen Sequenzen bestätigt werden konnte (Abb 12B). Auch hier hatte Poybren keinen Einfluss auf die Effektivität der Infektion. Die Verwendung von *envA*-spezifischen Primern führte ebenfalls zur Amplifikation zusätzlicher zellulärer Sequenzen. Auf Grund der unterschiedlichen Sensitivität der PCR bei der Verwendung der *PERV-pol* Primer zu den *PERV-envB* Primern von $1:10^3$ zu $1:10^4$, ließen sich nach der Inkubation von EB176-Zellen mit PERV-B zunächst nur *envB*-spezifische Sequenzen detektieren, während *pol*-spezifische Sequenzen kaum amplifiziert wurden. Zwei Wochen nach der Infektion unter Verwendung von Polybren, konnten schließlich auch *pol*-spezifische Sequenzen amplifiziert werden. Allerdings waren die *pol* und *envB*-spezifischen Amplifikationsprodukte wiederum schwächer als die von 293/PERV-B-Zellen.

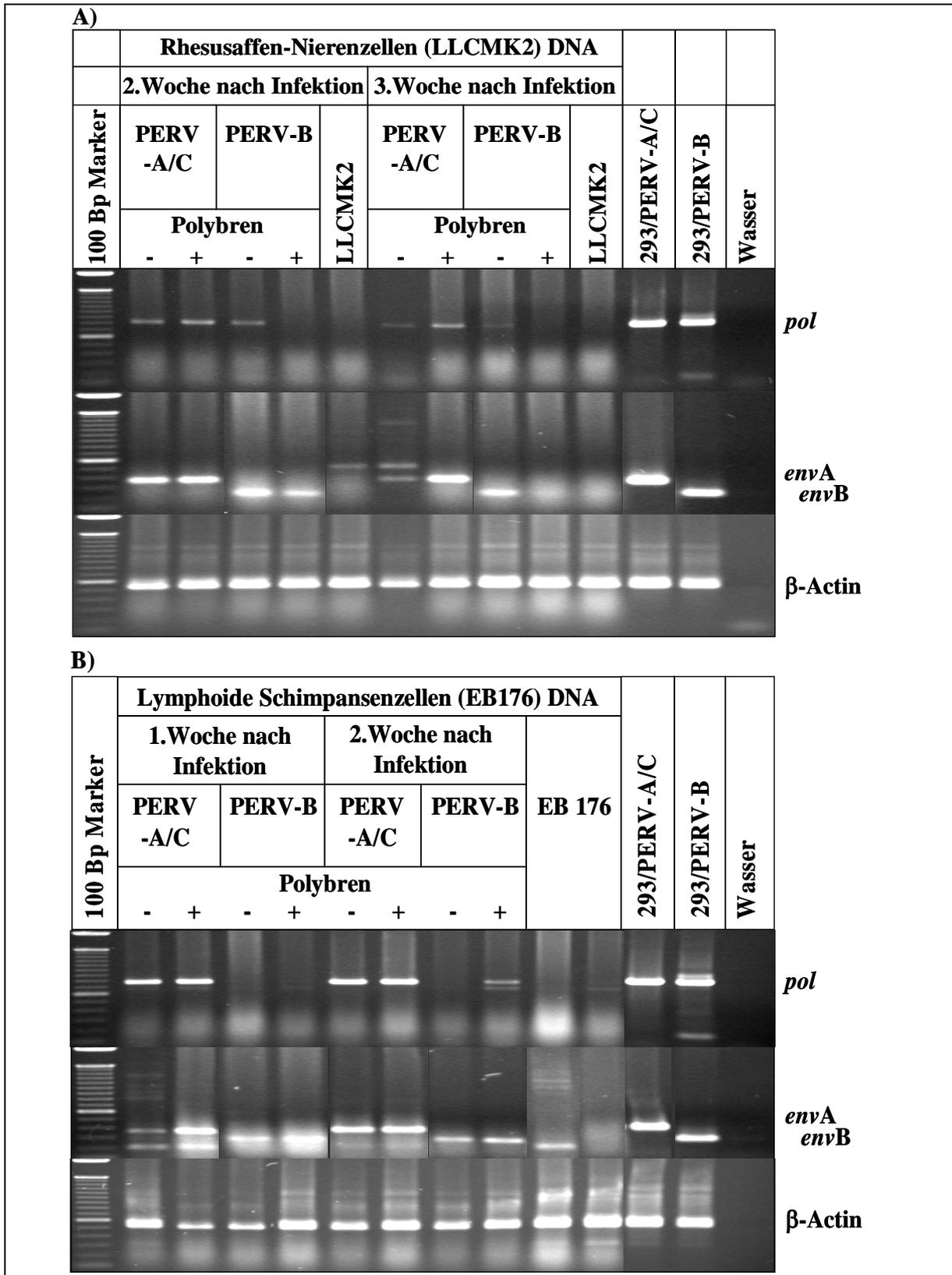


Abbildung 12: Nachweis von PERV-Proviren in Zelllinien nicht-humaner Primaten. A) Die DNA aus LLCMK2-Zellen wurde 2 bis 3 Wochen nach der Infektion mit PERV isoliert und mittels PCR auf das Vorhandensein von proviralen Sequenzen überprüft. **B)** PCR mit der DNA aus EB176-Zellen

Die Verwendung gleicher Mengen an EB176-DNA wurde durch die Amplifikation von β -Actin Sequenzen bestätigt. In diesen Versuchen konnte die Infektion von Zelllinien von Rhesusaffen und Schimpansen mit verschiedenen PERV-Subtypen gezeigt werden.

3.5 Etablierung einer Methode zur Detektion von gespleißter und ungespleißter PERV-spezifischer mRNA

Nach der Integration des Provirus ins Wirtsgenom ist ein weiterer wichtiger Schritt zur Vervollständigung des Replikationszyklus, die Expression der Vollängen und der gespleißten viralen mRNA. Zusätzlich gibt die Expression von gespleißter und ungespleißter viraler mRNA erste Hinweise darauf, ob virale Proteine synthetisiert werden und ob letztendlich Viruspartikel freigesetzt werden können. Aus diesen Gründen wurde eine Methode entwickelt, die es erlaubt, zwischen ungespleißter und gespleißter viraler mRNA unterscheiden zu können. Dazu wurden für die Detektion der Vollängen-mRNA von PERV Primer entwickelt, die links und rechts von der Spleißdonorstelle lagen (Abb. 13A). Für die Detektion gespleißter viraler mRNA wurden Primer entwickelt, die links von der Spleißdonorstelle und rechts von der Spleißakzeptorstelle lagen (Abb. 13A). Um die Spezifität der entwickelten Primer zu überprüfen, wurde die RNA von 293/PERV-A/C-, von PK15- und von 293-Zellen in einer RT-PCR eingesetzt (Abb. 13B). Die Primer zur Amplifikation der Vollängen-mRNA von PERV zeigten Amplifikationsprodukte von circa 220 Bp-Länge bei 293/PERV-A/C- und PK15-Zellen. Das Amplifikationsprodukt der gespleißten mRNA von 293/PERV-A/C hatte eine Länge von circa 470 Bp, während die RT-PCR mit PK15-RNA Amplifikationsprodukte von circa 380 und 480 Bp-Länge zeigte. Die unterschiedlichen Produktlängen entstanden durch Sequenzunterschiede der drei Subtypen PERV-A, PERV-B und PERV-C. PERV-A und PERV-B wurden von den PK15-Zellen produziert. PERV-A/C besteht überwiegend aus PERV-C und wurde von den 293/PERV-A/C-Zellen freigesetzt. Die Spezifität der verwendeten Primer wurde durch das Fehlen von Amplifikationsprodukten in der RNA nicht infizierter 293-Zellen bestätigt. Die Qualität der RT-PCR wurde durch fehlende Amplifikationsprodukte in einer Wasserprobe bestätigt. Der Auftrag gleicher Mengen an RNA wurde durch Amplifikation mit β -Actin Primern bestätigt. Durch fehlende Amplifikationsprodukte ohne Reverse Transkriptase wurde die Abwesenheit zellulärer DNA bestätigt. Mit dieser Methode wurde zum ersten Mal die Amplifikation ungespleißter und gespleißter mRNA von PERV gezeigt. Des Weiteren ließen sich unter Verwendung der Primer zur Amplifikation gespleißter mRNA die Subtypen PERV-A, PERV-B und PERV-C voneinander unterscheiden.

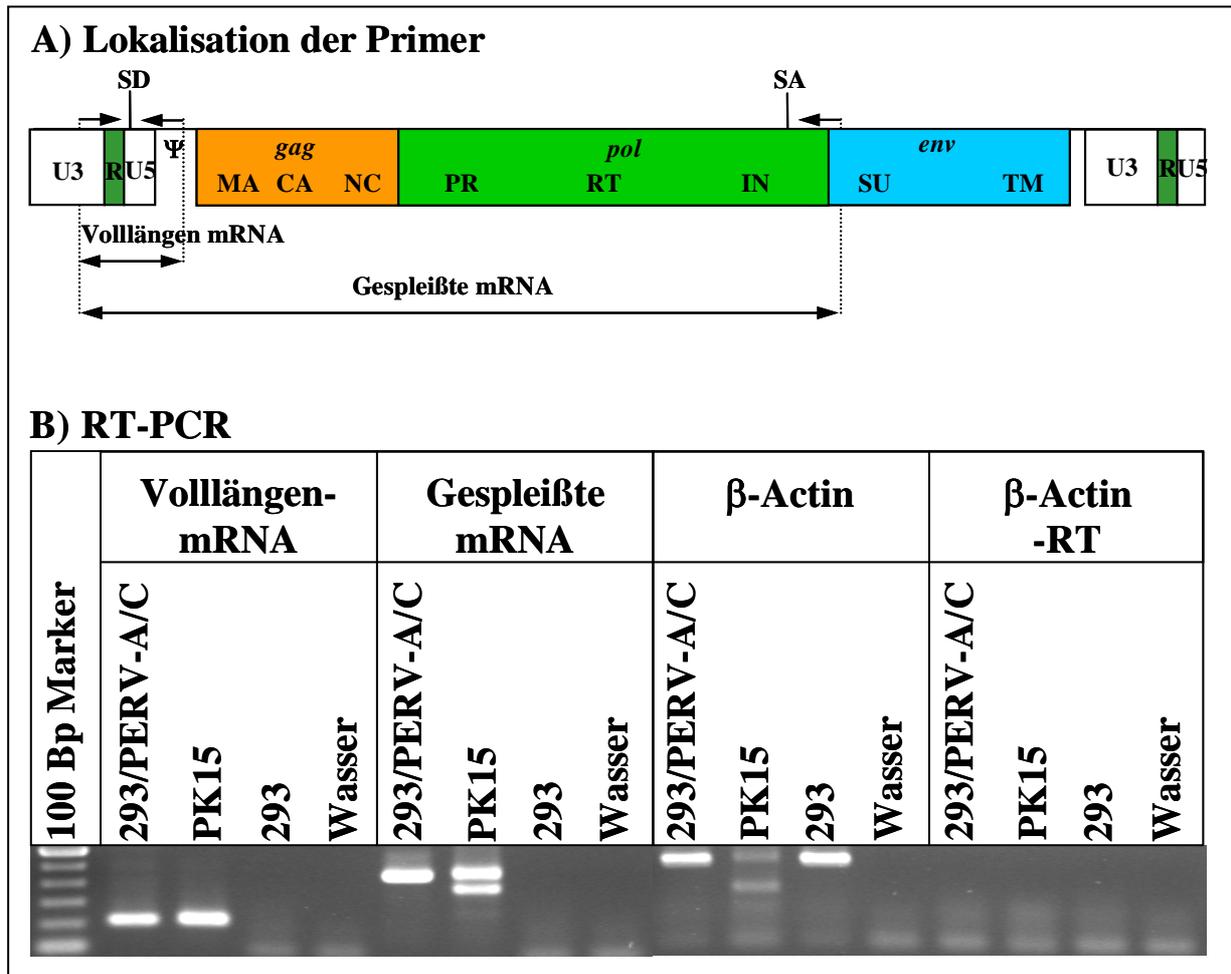


Abbildung 13: Entwicklung einer Methode zur Unterscheidung von ungespleißter und gespleißter mRNA von PERV. A) Lage der ausgewählten Primer im Provirus. SD, Spleißdonor; SA, Spleißakzeptor. B) RT-PCR mit RNA von 293/PERV-A/C-, PK15- und 293-Zellen. Die Amplifikationsprodukte der Vollängen-mRNA von 293/PERV-A/C und PK15 sind 220 Bp lang. Die Amplifikationsprodukte der gespleißten mRNA von 293/PERV-A/C und PK15 sind 470 bzw. 380 und 480 Bp lang. Die Amplifikation mit β-Actin Primern diente der Kontrolle gleicher Mengen an RNA. Die Amplifikation ohne Reverse Transkriptase (-RT) diente zur Kontrolle der Abwesenheit zellulärer DNA.

3.6 Analyse der Expression ungespleißter und gespleißter mRNA von PERV in infizierten Zelllinien nicht-humaner Primaten

Nach der erfolgreichen Infektion von Rhesusaffen- und Schimpansenzelllinien mit PERV sollte im nächsten Schritt die Expression von ungespleißter und gespleißter viraler mRNA in den Zellen analysiert werden, um damit erste Hinweise auf die Synthese viraler Proteine zu erhalten. Dafür wurde mittels RT-PCR und der von uns entwickelten Methode zur Unterscheidung von ungespleißter und gespleißter mRNA zum ersten Mal die Expression der PERV-mRNA in den Zellen der Rhesusaffen- und Schimpansenzelllinien (LLCMK2 und EB176) über mehrere Wochen hinweg untersucht. Die Vollängen-mRNA von PERV-A/C konnte bis zu sieben Wochen nach der Infektion von LLCMK2-Zellen (Abb. 14A) und bis zu acht Wochen nach der Infektion von EB176-Zellen (Abb. 14B) detektiert werden. Zusätzlich wurde die gespleißte mRNA von PERV-A/C zwei Wochen nach der Infektion von LLCMK2-Zellen und eine Woche nach der Infektion von EB176-Zellen detektiert (Abb. 14A und B). Die Detektion der Amplifikationsprodukte der gespleißten PERV-A/C-mRNA begann in der 2. Woche nach Infektion der LLCMK2-Zellen (Abb. 14A), während die der Amplifikationsprodukte der gespleißten PERV-A/C-mRNA in den EB176-Zellen bereits in der 1. Woche nach der Infektion nachgewiesen wurden (Abb. 14B). Die Amplifikationsprodukte der gespleißten PERV-A/C-mRNA waren anschließend bis zu sieben Wochen nach der Infektion von LLCMK2-Zellen und bis zu acht Wochen nach der Infektion von EB176-Zellen nachweisbar (Abb. 14A und B).

Die Vollängen-mRNA von PERV-B war zwei bis vier Wochen nach der Infektion von LLCMK2-Zellen (Abb. 14A) und zwei bis drei Wochen nach der Infektion von EB176-Zellen (Abb. 14B) nachweisbar. Die Amplifikationsprodukte der Vollängen-mRNA von PERV-B waren fünf Wochen nach der Infektion der LLCMK2-Zellen kaum noch nachweisbar (Abb. 14A). In der 6. Woche nach der Infektion war die Vollängen-mRNA von PERV-B sowohl in den LLCMK2-Zellen als auch in den EB176-Zellen nicht mehr detektierbar (Abb. 14A und B). Zum gleichen Zeitpunkt waren auch keine proviralen PERV-B-Sequenzen in der DNA der infizierten Zellen nachweisbar. Zu keinem Zeitpunkt nach der Infektion der beiden Zelllinien mit PERV-B konnte gespleißte PERV-B-mRNA detektiert werden. Die Amplifikation mit β -Actin Primern bestätigte die Verwendung gleicher Mengen an RNA. Die Abwesenheit von zellulärer DNA wurde durch fehlende Amplifikationsprodukte ohne Reverse Transkriptase bestätigt. Hier wurde zum ersten Mal die Expression der Vollängen- und gespleißten mRNA von PERV-A/C in Rhesusaffen- und Schimpansenzelllinien über den gesamten Zeitraum des

Experiments gezeigt. Die Expression der Vollängen-mRNA von PERV-B verschwand dagegen nach wenigen Wochen, korrespondierend zum Verlust des PERV-B Provirus.

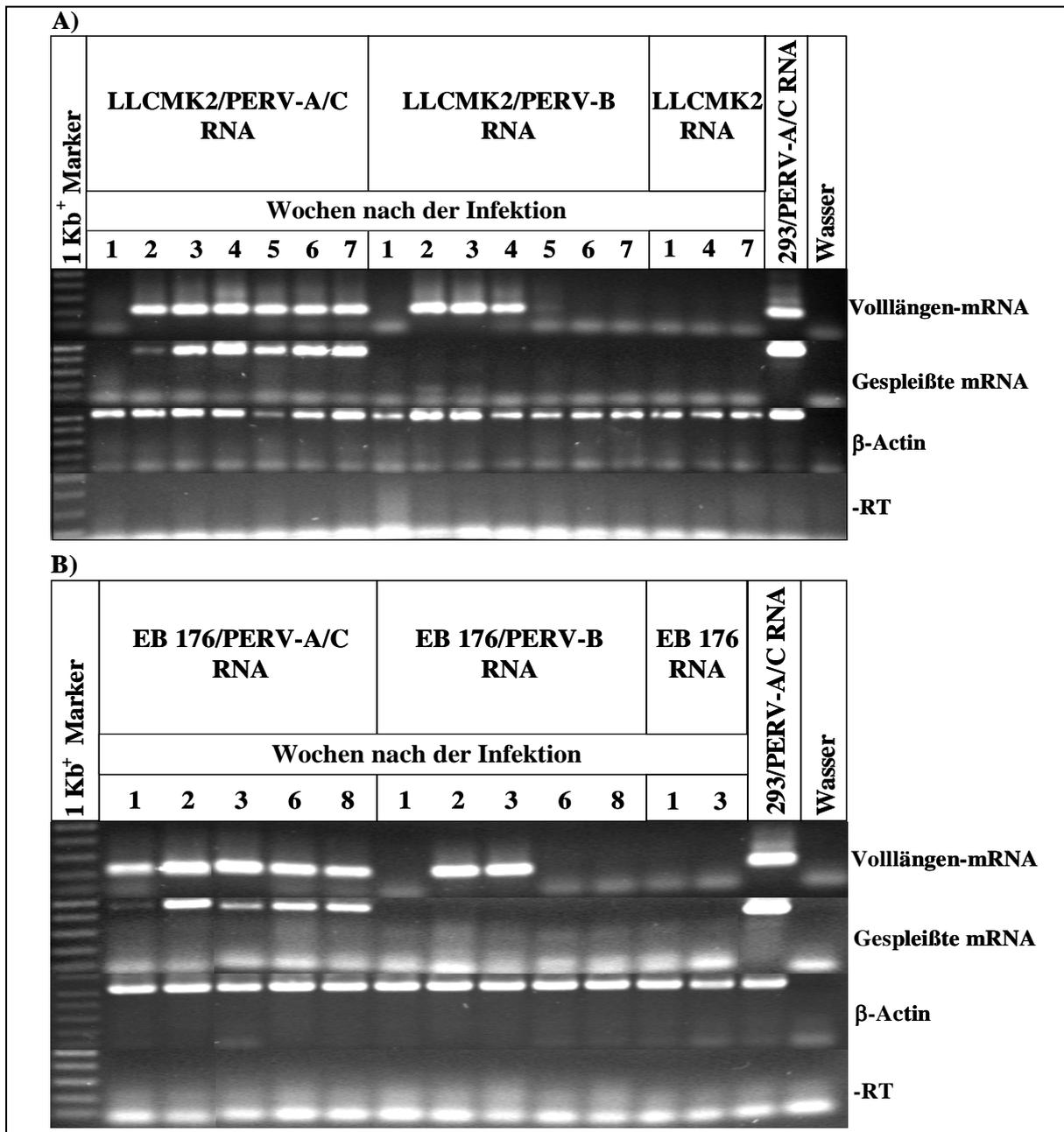


Abbildung 14: Expression ungespleißter und gespleißter PERV-spezifischer mRNA in PERV-infizierten Zelllinien nicht-humaner Primaten. A) RT-PCR mit RNA von PERV-infizierten LLCMK2-Zellen. B) RT-PCR mit RNA von EB176-Zellen. RNA von 293/PERV-A/C-Zellen diente als Positivkontrolle. Der 1 Kb⁺-Marker zeigte DNA-Fragmente zwischen 100 und 500 Bp-Länge.

3.7 Analyse der Replikationsfähigkeit des an Affenzellen adaptierten PERV-A/C

Die Expression der Vollängen-mRNA und der gespleißten mRNA von PERV-A/C in den LLCMK2- und EB176-Zellen deutete auf die Synthese viraler Proteine und die Freisetzung von Viruspartikeln hin. Um das zu untersuchen und um zu klären, ob diese Viren in der Lage sind, humane und nicht-humane Zellen zu infizieren, wurden zellfreie Zellkulturüberstände von PERV-A/C-produzierenden LLCMK2- und EB176-Zellen mehrfach über einen Zeitraum von zehn Wochen auf uninfizierte LLCMK2- bzw. EB176-Zellen und humane 293-Zellen gegeben. Mit Hilfe der PCR und den PERV-spezifischen Primern *pol* und *envA* konnte eine Woche nach der Zugabe von LLCMK2-adaptiertem PERV-A/C (LLCMK2/PERV-A/C) zu uninfizierten LLCMK2- und 293-Zellen eine Infektion beobachtet werden (Abb. 15A). Auf Grund der unterschiedlichen Sensitivität der PCR bei der Verwendung von *pol* Primern zu *envA* Primern von $1:10^3$ zu $1:10^4$ wurden in den LLCMK2- und 293-Zellen nur provirale *envA* Sequenzen detektiert. Diese waren jedoch schwächer als die *envA* Sequenzen der als Positivkontrolle dienenden LLCMK2/PERV-A/C-Zellen. Nach einer Zugabe von zellfreien Virusüberständen zweimal pro Woche über einen Zeitraum von neun Wochen waren in den 293-Zellen *pol* Sequenzen nachweisbar. Allerdings konnten nach zehn Wochen weder *pol* noch *envA* Sequenzen in den 293-Zellen beobachtet werden. Die Amplifikation von β -Actin Sequenzen bestätigte die Verwendung gleicher Mengen an DNA.

Nach einer dreiwöchigen Zugabe von Virusüberständen von EB176-adaptiertem PERV-A/C (EB176/PERV-A/C) konnten in den EB176-Zellen, im Vergleich zu den Positivkontrollen (DNA aus EB176/PERV-A/C-produzierenden Zellen) schwache *pol* und *envA* Amplifikationsprodukte detektiert werden (Abb. 15B). Diese blieben bis zur zehnten Woche nachweisbar. Nach einer Zugabe von Virusüberständen über einen Zeitraum von ein bis drei Wochen konnten in 293-Zellen schwache provirale *pol* und *envA* Amplifikationsprodukte detektiert werden. Nach vierwöchiger Zugabe von Virusüberständen zu den 293-Zellen waren starke, distinkte *pol* und *envA* Sequenzen nachweisbar, die bis zu zehn Wochen lang detektierbar blieben. Die Schwankungen des Nachweises der *pol* und *envA* Sequenzen konnte wiederum auf die unterschiedliche Sensitivität der PCR zurückgeführt werden. Die Verwendung gleicher Mengen an DNA wurde durch die Amplifikation mit β -Actin Primern bestätigt. In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass PERV-A/C von LLCMK2-Zellen und PERV-A/C von EB176-Zellen unbehandelte LLCMK2- bzw. EB176-Zellen und PERV-suszeptible humane 293-Zellen *in vitro* infizierten. Aber die Anzahl der freigesetzten

adaptierten PERV-A/C-Partikel nach der ersten Passage auf LLCMK2- bzw. auf EB176-Zellen schien relativ gering zu sein.

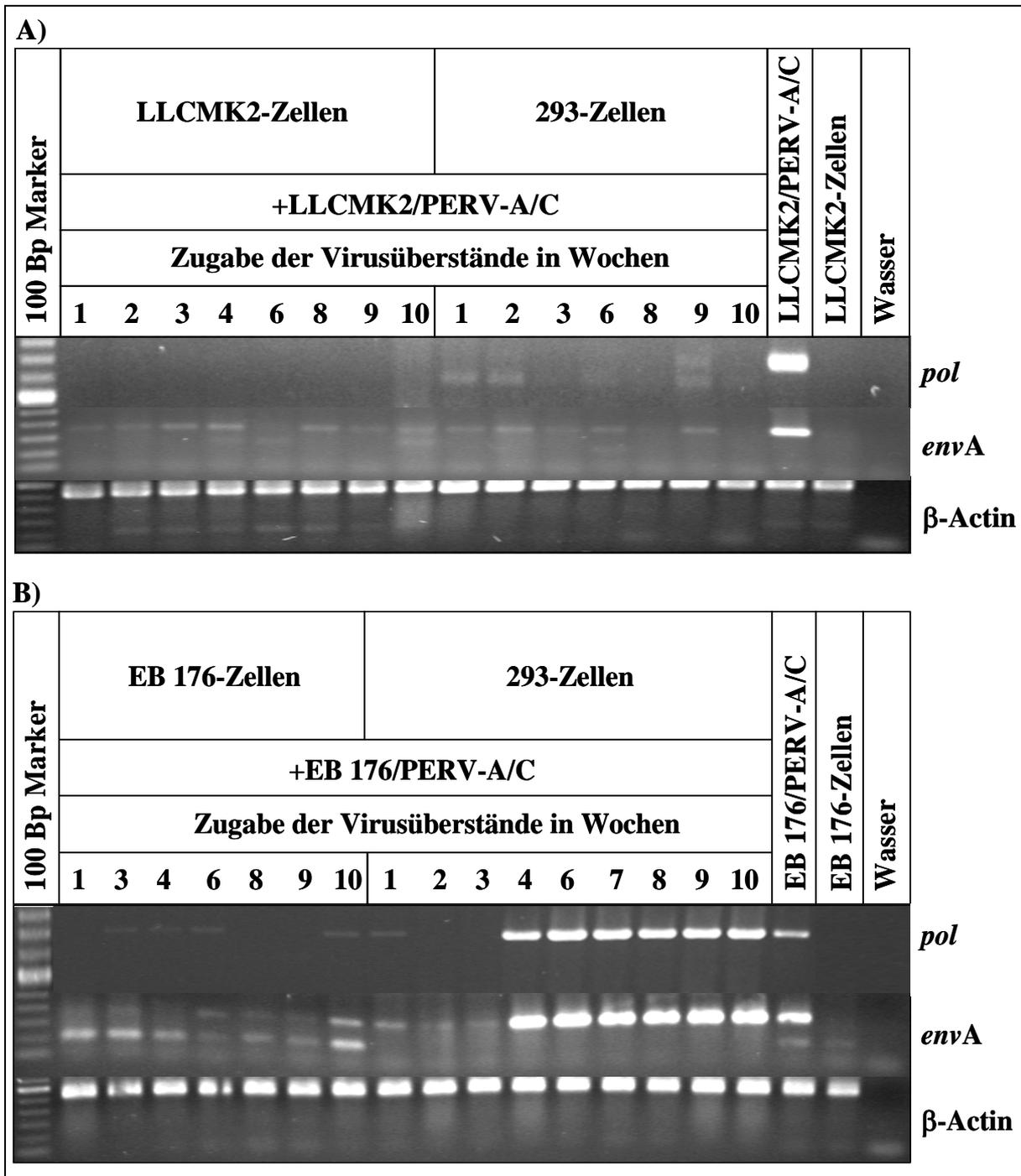


Abbildung 15: Infektion von humanen und nicht-humanen Zellen mit PERV-A/C, das an Affenzellen adaptiert war. A) PCR mit DNA aus LLCMK2- und 293-Zellen nach 10-wöchiger Zugabe von PERV-A/C von LLCMK2-Zellen. B) PCR mit DNA aus EB176- und 293-Zellen nach Zugabe von PERV-A/C von EB176-Zellen.

3.8 Keine Übertragung von PERV auf murine Zellen *in vitro*

Neben den Versuchen, ein *In vivo*-Infektionsmodell zur Pathogenität von PERV in nicht-humanen Primaten zu etablieren, wurden Versuche unternommen, solch ein Modell auch in Kleintieren zu entwickeln. Allerdings blieben diese Versuche bisher ohne Erfolg (Specke, et al., 2001b; Specke, et al., 2002a). Eine Infektion mit PERV wurde jedoch für SCID-Mäuse (Deng, et al., 2000; van der Laan, et al., 2000) und Nacktmäuse (Clemenceau, et al., 2002), denen porcine Inselzellen transplantiert wurden, beschrieben. Da aber Mikrochimärismus in diesen Mausexperimenten nicht ausgeschlossen werden konnte und da kürzlich gezeigt wurde, dass Mäuse keinen Rezeptor für PERV-A haben (Ericsson, et al., 2003), wurden hier Infektionsversuche durchgeführt, bei denen der Mikrochimärismus vermieden werden sollte.

Zunächst wurden verschiedene Mauszelllinien (3T3, 3T6 und CTLL-2) mit Zellkulturüberständen PERV-produzierender Zellen behandelt. Diese Überstände stammten: 1. Von der porcinen Nierenzelllinie PK15, die PERV-A und PERV-B produzierte (PK15/PERV), 2. von der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293, die ebenfalls PERV-A und PERV-B produzierte (293/PERV), 3. von PERV-A/C-produzierenden 293-Zellen und 4. von PERV-B-produzierenden 293-Zellen. Keine der Mauszelllinien zeigte eine detektierbare Reverse Transkriptase-Aktivität nach der Behandlung mit den verschiedenen PERV-Überständen, obwohl uninfizierte 293-Zellen, die parallel mit den gleichen Überständen unter identischen Bedingungen inkubiert wurden, produktiv mit PERV-A, PERV-B und PERV-A/C infiziert wurden. Wenn andererseits primäre Zellen von BALB/c- und NMRI-Mäusen mit den verschiedenen Viruspräparationen inkubiert wurden, konnte eine schwache RT-Aktivität in den Zellkulturüberständen der Nierenzellen von NMRI-Mäusen (Abb. 16A) und eine starke RT-Aktivität in den Überständen embryonaler Zellen von BALB/c-Mäusen beobachtet werden (Abb. 16B). Da jedoch in den Überständen der Kontrollzellen, die nicht mit PERV inkubiert wurden, ebenfalls RT-Aktivität detektiert wurde, handelte es sich möglicherweise um murine endogene Retroviren, die von den kultivierten Mauszellen freigesetzt wurden.

Obwohl keine der mit PERV inkubierten murinen Zellkulturen eine produktive Infektion zeigte, wurden die Zellen auf potentiell nicht-produktive Infektion (provirale Integration) durch PCR-Analyse von genomischer DNA mit PERV-spezifischen Primern untersucht. In keiner der murinen Zelllinien und primären Zellkulturen konnte provirale DNA mit Primern spezifisch für *pol*, *envA* und *envB* detektiert werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die in den Überständen der murinen primären Nieren- und Embryozellen detektierten RT-Aktivitäten auf die Freisetzung von murinen endogenen Retroviren zurück zu

führen sind. Schließlich wurde unter Verwendung von spezifischen Primern für p15Env vom MoMLV (Moloney murine leukaemia virus), genomische RNA des MoMLV in den Überständen beider muriner primärer Zellkulturen detektiert, unabhängig davon, ob die Zellkulturen mit PERV behandelt wurden oder nicht (Daten nicht gezeigt).

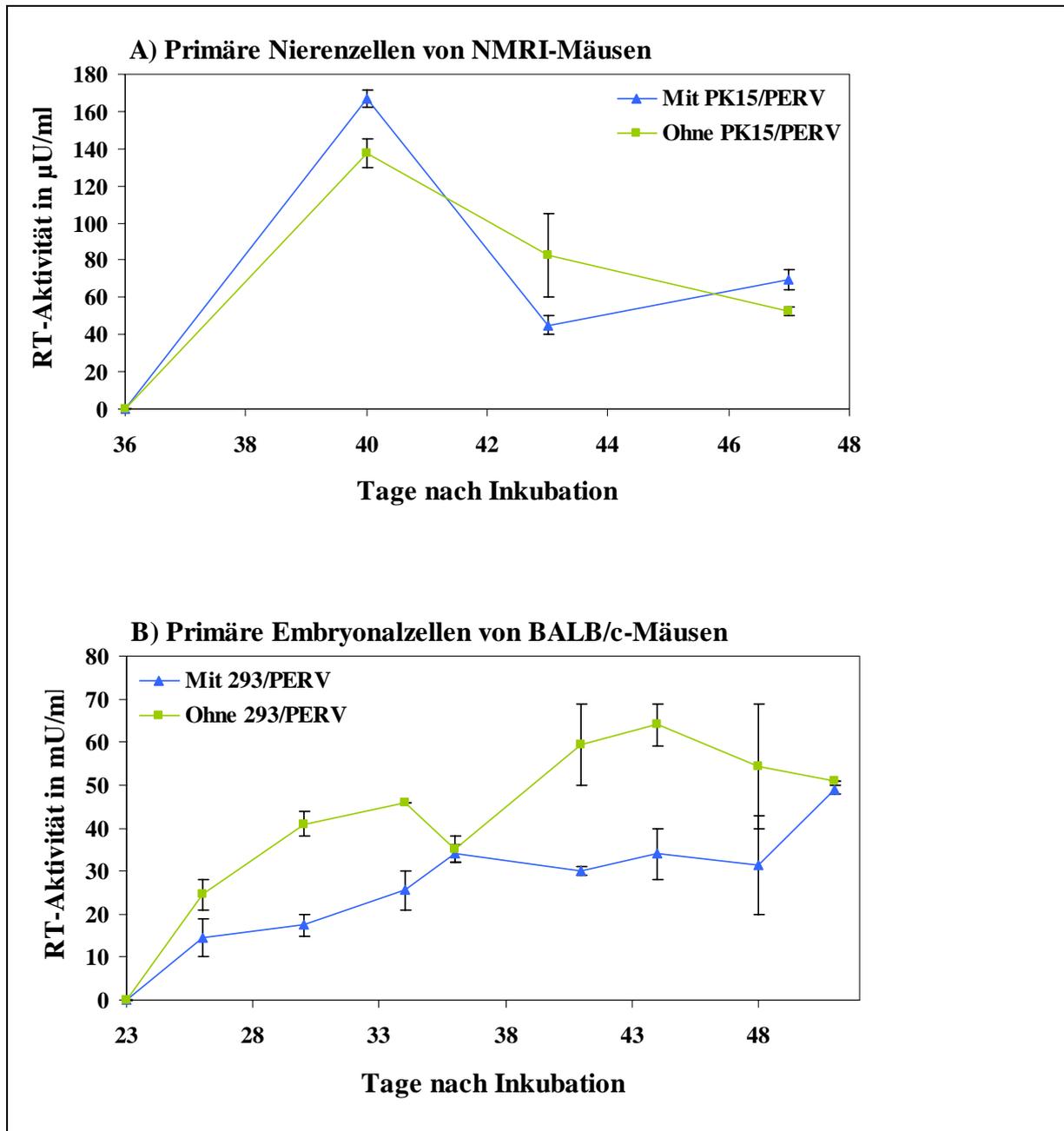


Abbildung 16: Reverse Transkriptase Aktivität in Zellkulturüberständen von primären murinen Zellen. A) RT-Aktivität in Überständen von Nierenzellen aus NMRI-Mäusen kultiviert in Abwesenheit oder Anwesenheit von PERV produziert von porzinen PK15-Zellen. B) RT-Aktivität in Überständen von embryonalen Zellen aus BALB/c-Mäusen kultiviert in Abwesenheit oder Anwesenheit von PERV produziert von infizierten 293-Zellen. In beiden Fällen wurden frisch präparierte Zellen für 24 Stunden mit PERV-enthaltenden Überständen oder nur mit Medium inkubiert.

Langzeit-Kokultivierungen von PERV-A/C- oder PERV-B-produzierenden 293-Zellen und uninfizierten 3T6-Zellen in Transwell-Platten erlaubte die kontinuierliche Inkubation mit frisch produziertem Virus, aber verhinderte direkten Zellkontakt und dadurch Mikrochimärismus. Keine PERV-Integration konnte in der DNA der murinen Zellen mittels PCR-Analyse mit PERV-spezifischen Primern detektiert werden. Da direkter Zellkontakt möglicherweise die Virusinfektion verbessert, wurden Neomycin-resistente murine 3T6^{neo+}-Zellen mit PERV-A/C-produzierenden 293-Zellen für fünf Tage kokultiviert. Um Mikrochimärismus auszuschließen, wurden die PERV-A/C-produzierenden 293-Zellen durch die Behandlung mit dem Selektionsmedium G418 eliminiert. Keine PERV-spezifischen Sequenzen konnten in den murinen Zielzellen nach Entfernung der Virus-produzierenden Zellen nachgewiesen werden. Die parallele Kokultivierung von Neomycin-resistenten 293^{neo+}-Zellen mit PERV-A/C- und PERV-B-produzierenden 293-Zellen bei gleicher Selektionsmethode, resultierte stets in der Infektion der Zielzellen.

Hier wurde gezeigt, dass murine Zelllinien und primäre Zellen unter Verwendung verschiedener Infektionsmethoden, verschiedener PERV-Subtypen und Vermeidung von Mikrochimärismus nicht mit PERV infiziert werden konnten.

3.9 Keine Infektion von SCID-Mäusen mit PERV-A/C *in vivo*

Obwohl ausgewählte murine Zellen mit PERV-A und PERV-B *in vitro* nicht infiziert werden konnten, besteht die Möglichkeit, dass andere suszeptible Zellen *in vivo* vorhanden sind. Da für SCID-Mäuse und Nacktmäuse eine PERV-Infektion nach Inokulation von porzinen Inselzellen beschrieben wurde (Clemenceau, et al., 2002; Deng, et al., 2000; van der Laan, et al., 2000), haben wir SCID-Mäuse für unsere Infektionsversuche mit zellfreiem Virus ausgewählt. Um die Chancen einer Infektion zu erhöhen, wurden hochtitrige Präparationen von PERV-A/C verwendet, ein Virus, das bessere Replikationsraten *in vitro* erreicht durch multimerisierte Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor NF-Y. Zur Vermeidung eines Mikrochimärismus wurden den SCID-Mäusen zellfreie Zellkulturüberstände von PERV-A/C-produzierenden 293-Zellen appliziert. Da SCID-Mäuse keine B- und T-Zellen haben, also keine Antikörper produzieren können, wurden nur die Organe der Mäuse hinsichtlich einer PERV-Infektion mittels PCR untersucht. In der DNA der Milz, der Leber und der Niere von SCID-Mäusen konnten keine PERV-spezifischen proviralen Sequenzen drei Wochen nach der Inokulation nachgewiesen werden (Abb. 17). Die Applikation von Zellkulturmedium blieb

ohne Auswirkungen auf die Organe der SCID-Mäuse. Die Amplifikation von β -Actin Sequenzen bestätigte die Verwendung gleicher Mengen an DNA. Dieser Versuch zeigte, dass sich SCID-Mäuse nicht mit hochtitrigem PERV-A/C infizieren lassen.

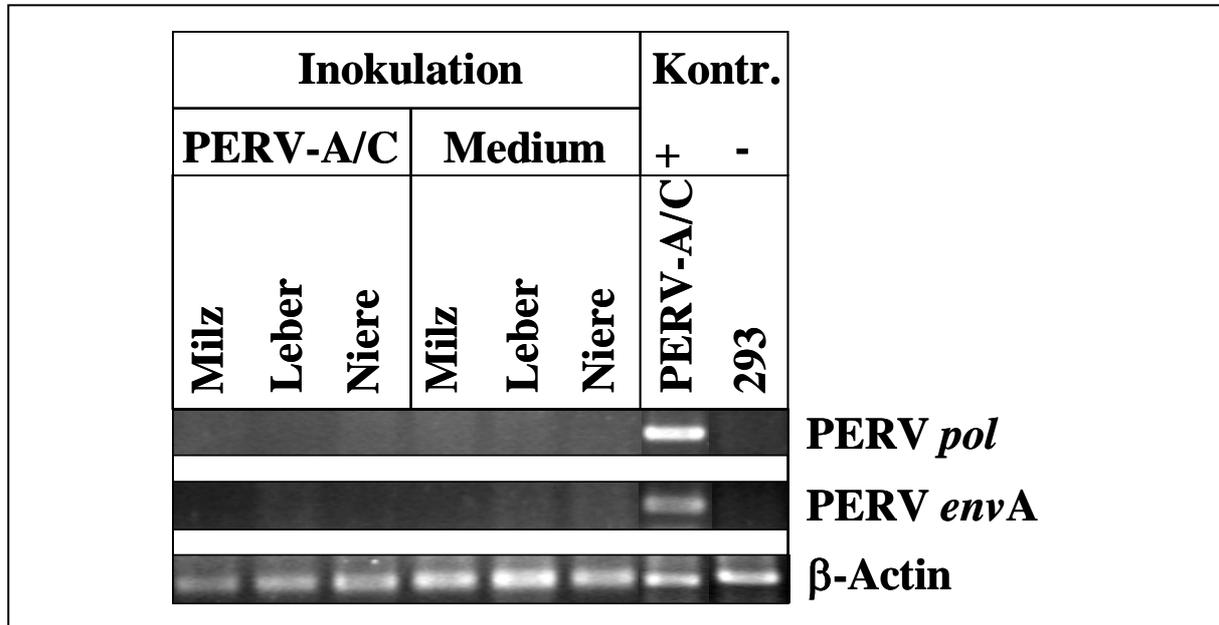


Abbildung 17: PCR mit DNA aus verschiedenen SCID-Mausorganen. Es wurden jeweils fünf Tieren PERV-A/C-Zellkulturüberstände bzw. Zellkulturmedium appliziert. Als Positivkontrolle diente DNA aus PERV-A/C-produzierenden 293-Zellen. Als Negativkontrolle wurde DNA von uninfizierten 293-Zellen verwendet.

3.10 Höhere Sensitivität neuer Nachweismethoden durch Verwendung rekombinanter viraler Proteine

Da eine Infektion mit PERV *in vivo* zunächst nur einige Zellen und Gewebe betreffen würde, wären potentielle PERV-spezifische Antikörper in nur sehr geringen Mengen im Serum vorhanden. Um also die Möglichkeit zu haben, selbst eine geringe Menge PERV-spezifischer Antikörper zu detektieren, wurden das transmembrane Hüllprotein p15Env und das Capsidprotein p27Gag rekombinant hergestellt. Die Sensitivität des Nachweises dieser rekombinanten Proteine wurde im ELISA überprüft (Abb. 18A und B). Dazu wurden die durch Immunisierung erhaltenen Antiseren gegen das rekombinante p15Env und das p27Gag ausgehend von 1:500 (Anti-rp15Env) und 1:100 (Anti-rp27Gag) Verdünnungen in 1:2 Verdünnungsschritten auf 96-Well Platten, die 1 μ g pro Well der rekombinanten Proteine oder 1 μ g PERV-A/C-Proteinlysate enthielten, ausverdünnt.

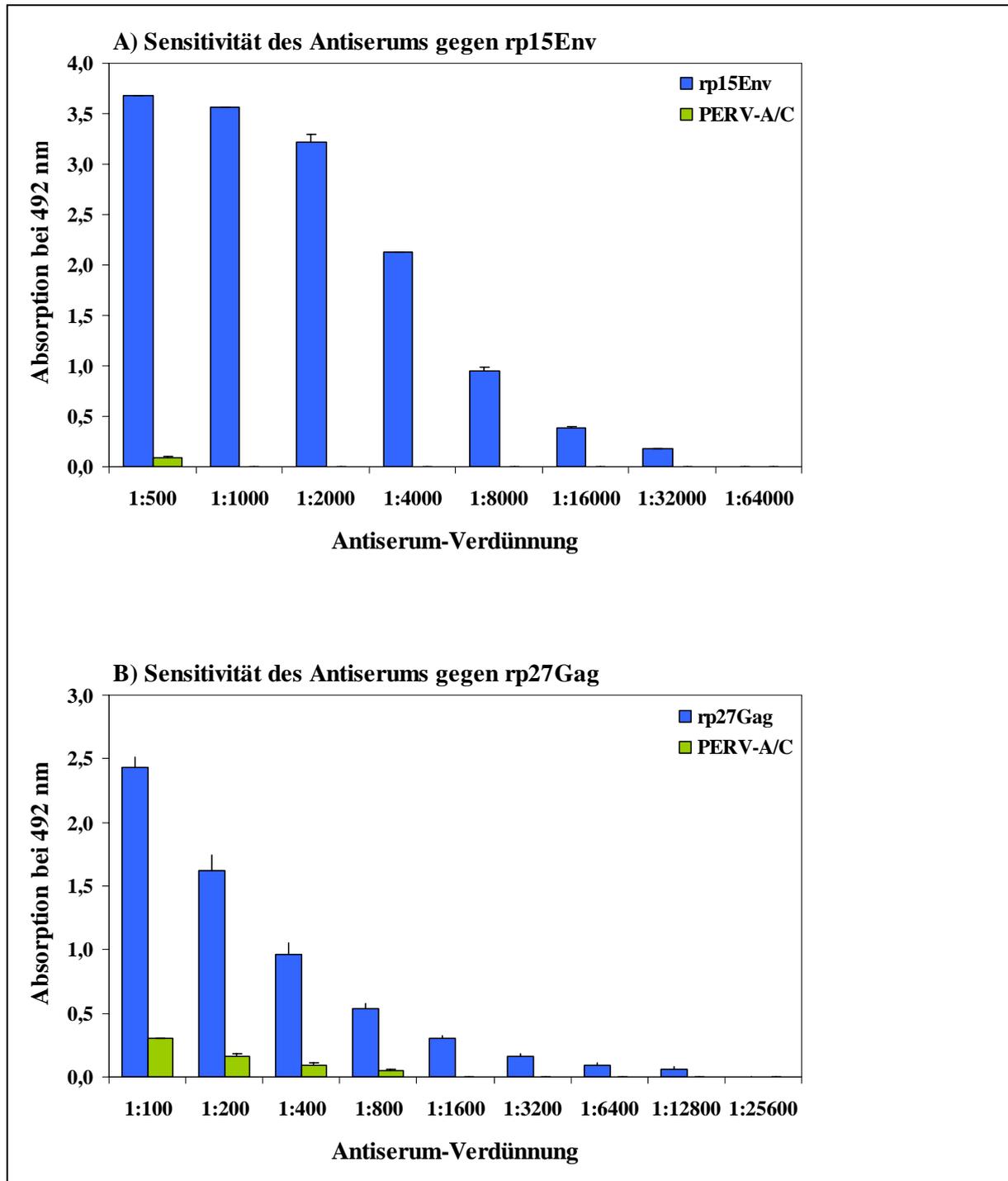


Abbildung 18: ELISA zur Bestimmung der Sensitivität der Antiseren gegen rp15Env und rp27Gag. **A)** Ausverdünnung des Antiserums gegen rp15Env in 96-Well Platten mit 1µg pro Well immobilisiertes rp15Env und PERV-A/C-Proteinlysate. **B)** Ausverdünnung des Antiserums gegen rp27Gag in 96-Well Platten mit 1µg pro Well immobilisiertes rp27Gag und PERV-A/C-Proteinlysate. In beiden Fällen wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Bis zu einer Verdünnung des Antiserums gegen rp15Env von 1:32000 konnte 1µg des rekombinanten Proteins zuverlässig nachgewiesen werden, während für den Nachweis von p15Env in 1µg eines PERV-A/C-Proteinlysats eine Antiserum-Verdünnung von 1:500 notwendig war (Abb. 18A). Das bedeutet, dass in einem Testserum bis zu 64-mal weniger Antikörper gegen p15Env vorhanden sein können, wenn 1µg rekombinantes p15Env als Antigen verwendet wird. Allerdings muss hier berücksichtigt werden, dass der Anteil von p15Env im PERV-A/C-Proteinlysat geringer ist als 1µg. Der Nachweis von 1µg rp27Gag war bis zu einer Antiserum-Verdünnung von 1:12800 und bei Verwendung von 1µg PERV-A/C-Proteinlysat bis zu einer Verdünnung von 1:800 möglich (Abb. 18B). In einem Testserum können also 16-mal weniger Antikörper gegen p27Gag vorhanden sein, wenn 1µg rp27Gag als Antigen verwendet wird. Auch hier muss angemerkt werden, dass die Menge an p27Gag im PERV-A/C-Proteinlysat nicht 1µg entspricht.

Die Erhöhung der Sensitivität des Nachweises von Antikörpern, die gegen virale Proteine gerichtet sind, konnte mittels der Verwendung von rekombinanten Proteinen als Antigene erreicht werden.

3.11 Keine Übertragung von PERV auf Patienten nach extrakorporealer Leberunterstützung

Da PERVs in der Lage sind, humane Zellen *in vitro* zu infizieren (Patience, et al., 1997; Specke, et al., 2001a; Wilson, et al., 1998) und sich sogar an humane Zellen adaptieren können (Denner, et al., 2001; Denner, et al., 2003), wuchsen die Bedenken, dass die Xenotransplantation von porcinen Geweben mit einer PERV-Infektion verbunden sein könnte (Chapman, et al., 1995). Aus diesen Gründen wurden Patienten aus ersten klinischen Studien retrospektiv hinsichtlich einer Infektion mit PERV untersucht. Zunächst wurden Seren von sieben Patienten, die mit einem Bioreaktor auf der Basis von porcinen Hepatozyten behandelt wurden, sowohl vor der Bioreaktorbehandlung und Lebertransplantation als auch ein halbes bis fünf Jahre nach der Behandlung auf Immunantworten gegen PERV untersucht. In allen Seren konnten keine PERV-spezifischen Antikörper in einem Western Blot basierend auf einem Virusproteinlysat von PERV als Antigen nachgewiesen werden (Abb. 19A). Die Qualität des Western Blots wurde durch die Verwendung von tierischen Kontrollseren gegen p27Gag, rekombinantes p15Env von PERV und einem kreuzreagierenden Serum gegen gp70 von FLV evaluiert. Alle Kontrollseren zeigten positive Reaktionen, die das Vorhandensein der korrespondierenden Antigene anzeigten.

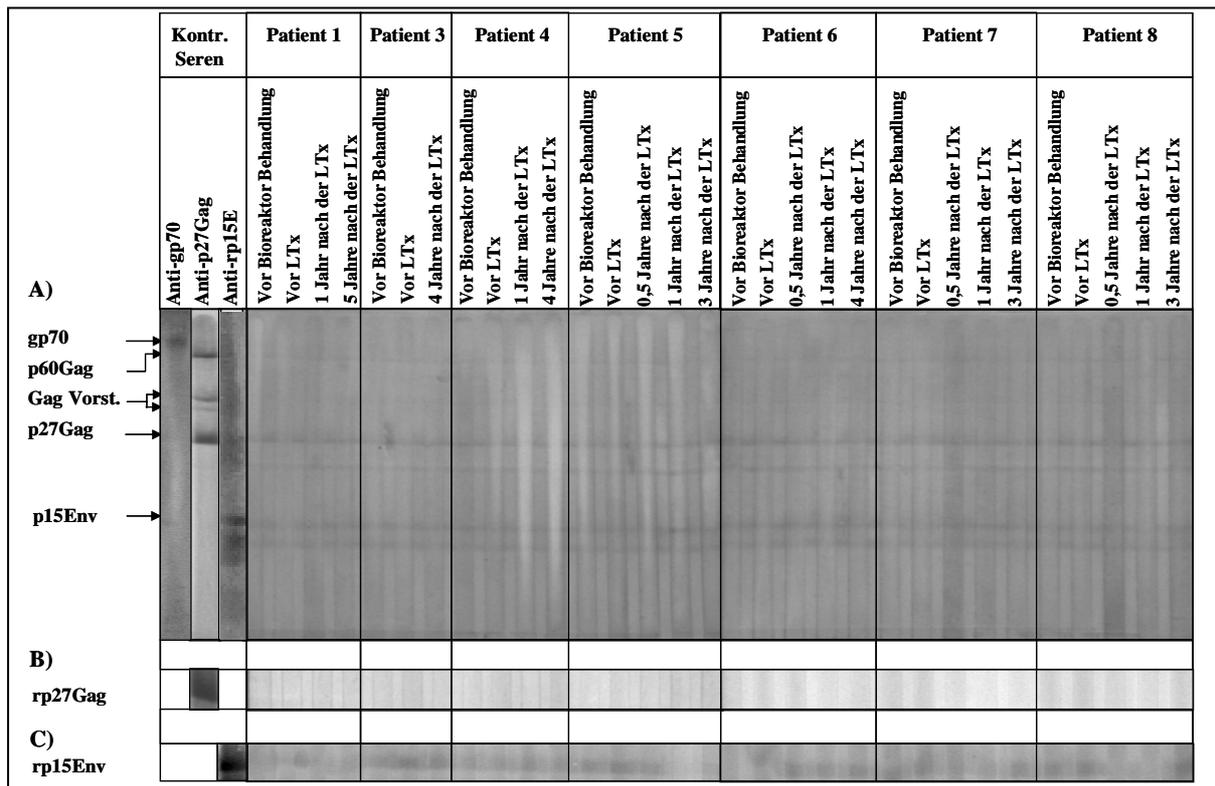


Abbildung 19: Western Blot zur Untersuchung von Antikörpern gegen PERV in Patienten, die mit einem extrakorporealen Leberunterstützungssystem behandelt wurden. **A)** Verwendung von gereinigtem PERV-Lysat als Antigen. Kreuzreagierende Antiseren gegen das Hüllprotein gp70 und das Kernprotein p27Gag von FLV und Antiseren gegen das rekombinante transmembrane Hüllprotein p15Env von PERV wurden als Positivkontrollen zur Evaluierung der Qualität des Western Blots verwendet. **B)** Verwendung des rekombinanten Gag-Proteins als Antigen. Ein Antiserum gegen das rekombinante Gag-Protein von PERV-C wurde als Positivkontrolle verwendet. **C)** Verwendung des rekombinanten p15Env als Antigen. Ein Antiserum gegen das rekombinante p15Env wurde als Positivkontrolle verwendet. LTx, Lebertransplantation; Vorst, Vorstufen.

Da einige Antigene im verwendeten Viruslysate nur zu einem geringen Anteil vorhanden waren, wie zum Beispiel p15Env und gp70, wurden neue Detektionsmethoden entwickelt (siehe Abschnitt 3.10), die zum Nachweis rekombinante Proteine nutzen. Obwohl das rekombinante p15Env nur einen Teil des viralen p15Env (AS 481-595) darstellte und möglicherweise einige putative Epitope fehlten, erlaubte die Verwendung von rekombinanten Proteinen den Einsatz größerer Mengen an Antigen. Das rekombinante p27Gag bestand aus dem gesamten Gag-Molekül von PERV-C. Auf Grund der oben genannten Gründe, waren diese Methoden sensitiver im Vergleich zu dem Western Blot mit viralem Proteinlysate. Trotz dieser Vorteile konnten in allen Seren ebenfalls keine Antikörper gegen die rekombinanten Proteine rp15Env und rp27Gag detektiert werden (Abb. 19B und C). Zusätzlich wurden die

sieben Seren in einem sensitiven ELISA analysiert, der auf der Verwendung von synthetischen Peptiden korrespondierend zur immundominanten (ido) und immunsuppressiven (isu) Domäne des transmembranen Hüllproteins p15Env von PERV beruhte (Abb. 20A und B). Diese Peptide wurden als wichtiges diagnostisches Mittel angesehen, da im Falle von HIV-1 99,9% der Seren der infizierten Individuen mit einem Peptid, das der immundominanten Domäne von gp41 entsprach, im ELISA reagierten (Denner, et al., 1994). Peptide korrespondierend zur immundominanten Domäne wurden auch bei Untersuchungen von Tumorpatienten auf Antikörper, die spezifisch für das humane endogene Retrovirus HERV-K sind, verwendet (Denner, et al., 1995) und bei Untersuchungen von Xenotransplantationspatienten, Schlachtern und normalen Blutspendern auf PERV-spezifische Antikörper (Tacke, et al., 2001). In dem hier verwendeten ELISA waren alle Seren bis auf drei negativ für beide Peptide (Abb. 20A und B), während die tierischen Kontrollseren, die durch Immunisierung mit den korrespondierenden Peptiden von PERV-p15Env hergestellt wurden, positive Signale zeigten. Die leicht positiven Seren der Patienten 5, 6 und 7 (Abb. 20A und B) enthielten kreuzreagierende Antikörper, die auch in den Seren von normalen Blutspendern gefunden wurden (Tacke, et al., 2001). Zusammengefasst gaben diese Ergebnisse keinen Hinweis auf eine Infektion der Patienten mit PERV.

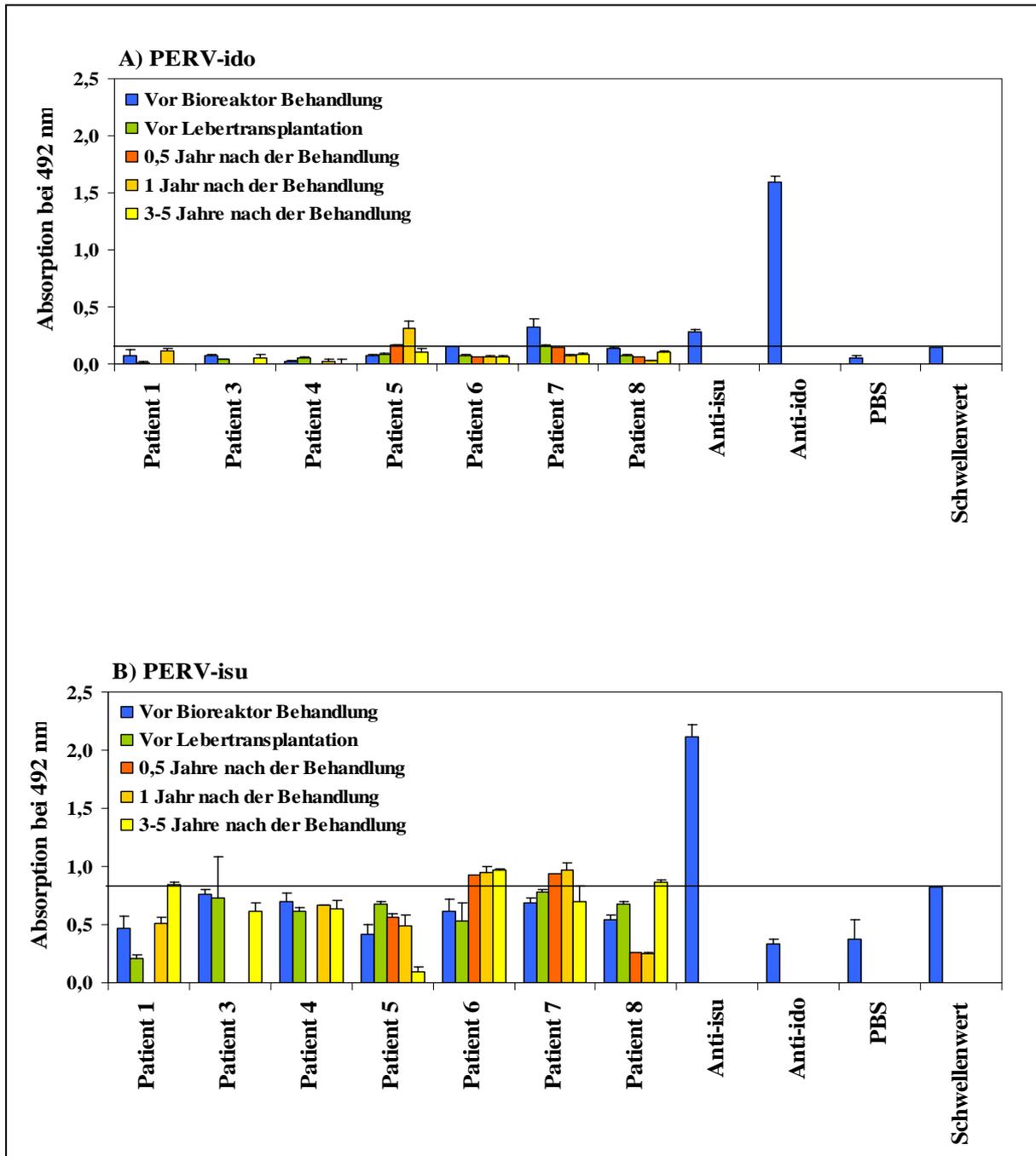


Abbildung 20: ELISA zur Untersuchung von Patientenseren, die mit einem extrakorporalen Leberunterstützungssystem behandelt wurden. A) Verwendung eines diagnostischen Peptids (PERV-ido) als Antigen, das der immundominanten Domäne von PERV-p15Env entspricht. **B)** Verwendung eines Peptids (PERV-isu) als Antigen, das der immunsuppressiven Domäne von p15Env entspricht. Antiseren gegen beide Peptide wurden als Positivkontrollen verwendet, um die Qualität des ELISA zu evaluieren. Die horizontalen Linien verdeutlichen die Schwellenwerte (Durchschnitt plus dreimal Standardabweichung der Negativkontrollen).

3.12 Antikörper gegen porcine Leberproteine in Patienten, die mit einem extrakorporealen Leberunterstützungssystem behandelt wurden

Da in den Seren der Patienten, die *ex vivo* mit einem Leberunterstützungssystem behandelt wurden, keine PERV-spezifischen Antikörper detektiert werden konnten, wurden die Seren daraufhin untersucht, ob sie Antikörper gegen porcine Proteine entwickelt hatten. Dazu wurden die Seren in einem Western Blot, der Proteinlysate von porcinen Hepatozyten als Antigen verwendete, auf Antikörper gegen Schweine-spezifische Leberproteine getestet (Abb. 21). Patient 1 entwickelte Schweine-spezifische μ -Immunglobuline (Abb. 21A) und γ -Immunglobuline (Abb. 21B) ein Jahr nach der Behandlung. Fünf Jahre nach der Behandlung waren die Schweine-spezifischen μ -Immunglobuline immer noch nachweisbar, allerdings in geringerer Menge, während die γ -Immunglobuline im Vergleich zum ersten Jahr in gleicher Menge vorhanden waren. Patient 6 entwickelte keine Schweine-spezifischen μ -Immunglobuline über den gesamten Zeitraum der Behandlung, γ -Immunglobuline konnten allerdings ein halbes bis ein Jahr nach der Behandlung detektiert werden. Vier Jahre nach der Behandlung waren keine Schweine-spezifischen γ -Immunglobuline mehr nachweisbar. Bei den Patienten 7 und 8 konnten sowohl Schweine-spezifische μ -Immunglobuline als auch γ -Immunglobuline vor der Bioreaktorbehandlung und der Lebertransplantation detektiert werden, es waren jedoch nur sehr wenig γ -Immunglobuline nachweisbar. Ein halbes Jahr nach der Behandlung zeigte Patient 7 ein verändertes Bandenmuster der μ -Immunglobuline und eine starke γ -Immunglobulin-Antwort. Ein und drei Jahre nach der Behandlung konnten keine Schweine-spezifischen μ -Immunglobuline und γ -Immunglobuline mehr nachgewiesen werden. Bei Patient 8 nahm die Bildung von Schweine-spezifischen μ -Immunglobulinen und γ -Immunglobulinen von einem halben bis zu drei Jahren nach der Behandlung stetig zu. Bei den Patienten 3, 4 und 5 konnten nur wenig Schweine-spezifische μ -Immunglobuline und γ -Immunglobuline detektiert werden. In dieser retrospektiven Studie mit Seren von Patienten, die mit einem extrakorporealen Leberunterstützungssystem als Überbrückung für eine Lebertransplantation behandelt wurden, konnten keine PERV-spezifischen Antikörper detektiert werden, obwohl einige Patienten nach der Behandlung mit den auf porcinen Zellen basierenden Bioreaktoren Schweine-spezifische μ - und γ -Immunglobuline entwickelten.

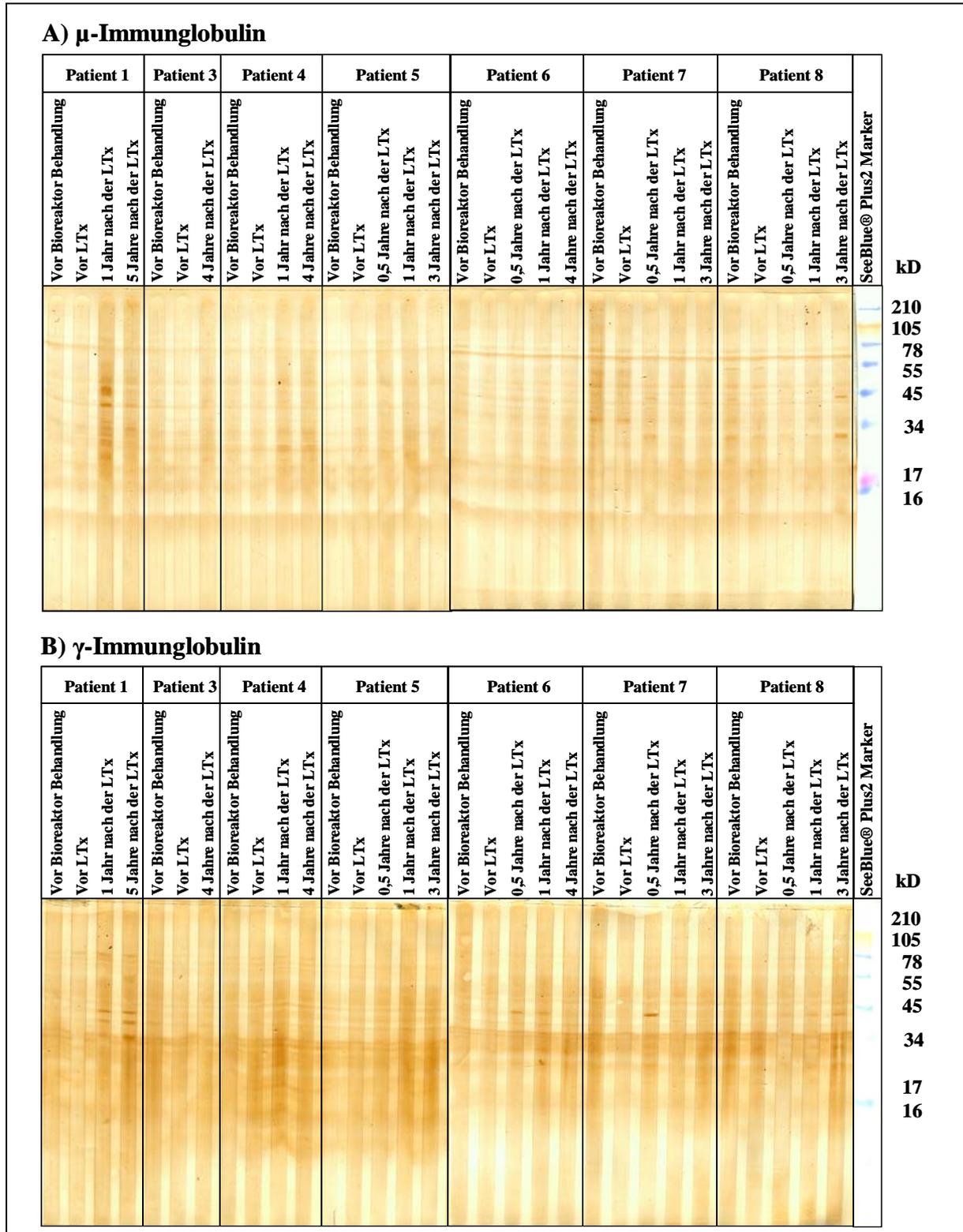


Abbildung 21: Western Blot unter Verwendung von Schweineleberproteinen als Antigen zur Untersuchung von Seren von Patienten, die mit einem extrakorporalen Leberunterstützungssystem behandelt wurden. A) Verwendung von Antiseren gegen humane μ -Ketten-spezifische Immunglobuline als Zweitantikörper. B) Verwendung von Antiseren gegen humane γ -Ketten-spezifische Immunglobuline als Zweitantikörper. LTx, Lebertransplantation.

3.13 Keine Übertragung von PERV auf Patienten nach Transplantation porziner Inselzellen

Da porzine endogene Retroviren ein Risiko für den Menschen bei der Transplantation von porzinen Organen, Geweben und Zellen darstellen könnten, war es von besonderer Bedeutung, Patienten, die porzine Inselzelltransplantate erhalten hatten, für einen langen Zeitraum nach der Transplantation regelmäßig auf eine mögliche Übertragung von PERV zu untersuchen. Dafür wurden Seren von vierzehn der achtzehn behandelten Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der Transplantation mit Hilfe von Western Blot-Analysen auf PERV-spezifische und porzine Antikörperantworten untersucht (Tab. 6). Die Seren von zwei Patienten (Patient 1 und 2) reagierten acht bzw. neun Jahre nach der Transplantation mit dem Oberflächenhüllprotein gp70 von PERV in einem Western Blot, der gereinigtes PERV-A/C als Antigen verwendete. Das Serum von Patient 4 reagierte bis zu drei Jahren nach der Transplantation schwach mit gp70. Nach acht Jahren waren keine Antikörper mehr gegen gp70 nachweisbar. Alle getesteten Seren zeigten keine Reaktion mit dem Capsidprotein p27Gag und dem transmembranen Hüllprotein p15Env im Western Blot mit PERV-A/C als Antigen. Da p15Env nur in geringen Mengen in PERV-A/C-Proteinlysaten vorhanden war, wurde zur Erhöhung der Sensitivität ein modifizierter Western Blot basierend auf den rekombinanten Proteinen von p15Env und p27Gag als Antigene entwickelt. Alle Seren wurden unter Verwendung des neuen Tests nochmals untersucht und keines zeigte eine Reaktion mit dem rekombinanten p15Env (Tab. 6). Bei drei Patienten (Patient 5, 8 und 11) konnten Antikörper gegen rekombinantes p27Gag detektiert werden. Die Seren dieser Patienten enthielten allerdings schon vor der Transplantation Antikörper gegen p27Gag, jedoch verstärkten sich nach der Transplantation bei den Patienten 5 und 8 die Reaktionen gegen p27Gag. In allen anderen Seren konnten keine Antikörper gegen p27Gag nachgewiesen werden. Neun Seren (Patienten 1, 2, 5 bis 7, 9, 10, 13 und 14) enthielten Antikörper gegen porzine Inselzellproteine.

Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse keine Übertragung von PERV auf Patienten, die bis zu neun Jahre nach einer Transplantation von porzinen Inselzellen untersucht wurden.

Tabelle 6: Antikörper gegen PERV-Proteine und porcine Inselzellproteine in Xenotransplantationspatienten

Patient	Wochen nach Tx	Antikörper gegen PERV			Antikörper gegen porcine Inselzellproteine
		gp70	p27Gag	p15Env	
1	-214,6	-	-	-	-
	15,9	-	-	-	-
	460,3	++	-	-	+
2	-6,9	-	-	-	-
	2,0	-	-	-	-
	14,4	-	-	-	-
	410,0	+++	-	-	+
3	-0,4	-	-	-	-
	2,7	-	-	-	-
	15,4	-	-	-	-
	427,6	-	-	-	-
4	2,4	+	-	-	-
	163,6	+	-	-	-
	394,4	-	-	-	-
5	2,7	-	+	-	++
	44,3	-	+++	-	++
	312,0	-	++	-	+
6	-2,3	-	-	-	+
	2,6	-	-	-	+
	42,9	-	-	-	+
	311,9	-	-	-	-
7	0,0	-	-	-	-
	1,1	-	-	-	+
8	-13,0	-	+	-	-
	1,9	-	++	-	-
	6,0	-	++	-	-
	19,1	-	++	-	-
9	-13,0	-	-	-	-
	1,9	-	-	-	+
	5,9	-	-	-	+
10	1,7	-	-	-	+
	6,6	-	-	-	+
	15,3	-	-	-	+
11	-8,9	-	++	-	-
	2,7	-	++	-	-
	4,6	-	++	-	-
12	-1,1	-	-	-	-
	1,7	-	-	-	-
	6,6	-	-	-	-
	15,3	-	-	-	-
13	-8,9	-	-	-	-
	2,7	-	-	-	+
	4,6	-	-	-	+
	7,6	-	-	-	+
14	-6,0	-	-	-	-
	2,7	-	-	-	++

Tx, Transplantation. +, schwache Reaktion; ++, mittlere Reaktion; +++, starke Reaktion.

4. Diskussion

4.1 Evaluierung der PERV-Freisetzung aus porzinen Inselzellen der Deutschen Landrasse *in vitro* und *in vivo*

In den letzten Jahren wurden große Fortschritte bei der Verbesserung der Behandlungsbedingungen und Behandlungsstrategien von Patienten mit Diabetes mellitus gemacht. Zusätzlich zu verbesserten Therapien und neuen Insulinanaloga (Bolli, et al., 1999), konzentrierten sich viele Studien auf die Transplantation von Inselzellen (Berney, et al., 2001). Die Inselzelltransplantationen beinhalteten sowohl humane (Alejandro, et al., 1997; Meyer, et al., 1998; Oberholzer, et al., 2000; Shapiro, et al., 2000) als auch xenogene Inselzellen vom Schwein (Groth, et al., 1998; Groth, et al., 1994; Heneine, et al., 1998a). Da die meisten erfolgreichen klinischen Inselzelltransplantationen durchschnittlich zwei bis vier humane Donororgane erfordern (Shapiro, et al., 2000), verhindert der zunehmende Mangel an humanen Donororganen die Behandlung von vielen Diabetes-Patienten. Im Gegensatz dazu könnten Inselzellen unbegrenzt verfügbar werden, wenn Strategien wie die Nutzung von xenogenen Inselzellen, technisch veränderten humanen Betazelllinien und *in vitro* oder *in vivo* Inselzellexpansionen klinisch anwendbar werden (Groth, et al., 1998; Newgard, et al., 1997; Ramiya, et al., 2000). Viele Fortschritte wurden bei der Anwendung von xenogenen Inselzellen gemacht. Obwohl nicht-humane Primaten dem Menschen genetisch sehr viel näher sind, sind Schweine aus mehreren Gründen als Quelle von Transplantaten geeigneter (Sachs, 1994). Schweine lassen sich schnell und in großer Anzahl züchten, ihre Haltung ist relativ günstig und einfach, und die Physiologie eines porzinen Organs ist der des humanen Organs ähnlich. Des Weiteren werden Schweine bereits genetisch modifiziert und kloniert, um die immunologische Abstossung zu verringern (Costa, et al., 2002; Ramsoondar, et al., 2003). Schließlich unterscheidet sich das porzine Insulin von humanem nur in einer Aminosäure und wurde lange Zeit zur Behandlung von Diabetes-Patienten verwendet. Allerdings wird die Xenotransplantation nur klinische Relevanz erreichen, wenn das Risiko einer Übertragung von pathogenen Mikroorganismen ausgeschlossen werden kann. Bisher konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, die meisten exogenen Mikroorganismen durch Haltung der Schweine unter qualifizierten oder spezifizierten pathogen-freien Bedingungen zu eliminieren (Tucker, et al., 2002). PERVs sind aber in das Genom der Schweine integriert und deshalb wird es schwierig werden, PERV-defiziente Schweine zu züchten oder zu klonieren.

Auf Grund der Tatsache, dass PERVs in der Lage sind, humane Zellen *in vitro* zu infizieren, in diesen Zellen zu replizieren und einen produktiven Infektionszyklus zu etablieren (Martin, et al., 1998a; Patience, et al., 1997; Specke, et al., 2001a; Wilson, et al., 1998), wurde intensiv nach Schweinestämmen gesucht, die wenig oder keine viralen Partikel freisetzen (Bosch, et al., 2000; Gorbovitskaia, et al., 2003; Herring, et al., 2001b; Lee, et al., 2002; Tacke, et al., 2000). Im Gegensatz zu anderen Schweinestämmen (Clemenceau, et al., 2002) exprimieren Inselzellen der Deutschen Landrasse wenig bis keine PERV-mRNA sowie infektiöse Partikel (Siehe Abb. 10 und 11). Andere Gewebe der Deutschen Landrasse wie Endothelzellen der Aorta hingegen, sind durchaus in der Lage PERV-spezifische mRNA und Partikel zu exprimieren (Martin, et al., 1998a). Diese Viren konnten humane Zellen *in vitro* infizieren, waren aber *in vivo* nicht übertragbar (Martin, et al., 1998b). Andererseits setzen stimulierte PBMC der Deutschen Landrasse keine PERV-Virionen frei (Tacke, et al., 2000; Tacke, et al., 2003). Im Unterschied zu den Ergebnissen dieser Arbeit konnte in einer Studie die Infektion von humanen Neomycin-resistenten 293-Zellen mit PERV aus Inselzellen von Landrasse-Schweinen gezeigt werden (van der Laan, et al., 2000). Ein Grund für diese unterschiedlichen Resultate könnte die Verwendung von Inselzellen eines anderen Landrasse-Schweinestamms, zum Beispiel der niederländischen Landrasse, sein. Oder das verwendete Landrasse-Schwein zeigte ein verändertes Expressionsmuster von PERV. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte bei Kokultivierungsexperimenten mit Inselzellen anderer Schweinestämme und humanen Zellen *in vitro* ebenfalls keine Infektion der humanen Zellen mit PERV nachgewiesen werden (Clemenceau, et al., 2001), obwohl die dort verwendeten Inselzellen PERV-spezifische mRNA exprimierten. Andererseits konnte keine PERV-spezifische RT-Aktivität in diesen Inselzellen detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass in der Studie von Clemenceau et al. (2001) ebenfalls keine viralen Proteine synthetisiert und dadurch keine infektiösen Partikel freigesetzt wurden.

Im Unterschied zu den Resultaten dieser Arbeit wurde in einer anderen Studie die Übertragung von PERV aus porzinen Inselzellen auf Nacktmäuse unter Verwendung von Inselzellen von SPF-Schweinen der Large-White-Rasse, die PERV-mRNA exprimierten, beobachtet (Clemenceau, et al., 2002). Allerdings wurden dort unverkapselte Inselzellen transplantiert, so dass ein falsch-positives Ergebnis durch Mikrochimärismus nicht ausgeschlossen werden kann. Zusätzlich konnte zwar die DNA von *gag* in verschiedenen Mausorganen detektiert werden, aber mRNA von *gag* wurde in keinem der Organe exprimiert, was auf die Abwesenheit einer produktiven Infektion von PERV in den Nacktmäusen hindeutet. In einer weiteren Untersuchung wurden verkapselte Inselzellen

verschiedener Schweinestämme in Nonobese-Diabete-Mäuse (NOD-Mäuse) und Nacktmäuse transplantiert und nach drei Monaten wurden verschiedene Mausorgane hinsichtlich einer Infektion mit PERV untersucht (Elliott, et al., 2000). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnten Elliott et al. keine PERV-spezifische DNA und mRNA in verschiedenen Mausorganen detektieren, obwohl die Alginat-verkapselten Inselzellen in der Lage waren, Insulin zu produzieren und frei zu setzen.

Auf Grund der berichteten Resultate ist es zwingend notwendig, einen intensiven Screening-Test für Schweinestämme und Schweine innerhalb eines Stammes zur Selektion von nicht-PERV-produzierenden Schweinen zu entwickeln. Diese Schweine sollten dann weiter gezüchtet werden. Beispielsweise wurden in einer Inzuchtherde von Miniaturschweinen Tiere gefunden, die keine Freisetzung von humantropen PERVs zeigten (Oldmixon, et al., 2002; Wood, et al., 2004). Obwohl verschiedene Strategien zur Prävention einer PERV-Infektion von humanen Zellen und Geweben, wie die siRNA-Technologie (Karlas, et al., 2004) oder neutralisierende Antikörper als Basis für einen Impfstoff (Fiebig, et al., 2003) entwickelt wurden, wären Knock-out-Schweine die beste Lösung. Andererseits dürfen die Risiken der Rekombination und der Komplementierung von defekten Proteinen durch das Vorhandensein der verschiedensten Gruppen retroviraler Genome im Schwein, nicht unbeachtet bleiben (Bosch, et al., 2000; Herring, et al., 2001b; Klymiuk, et al., 2003; Patience, et al., 2001).

Zusammenfassend setzten die verwendeten Inselzellen von Schweinen der Deutschen Landrasse kein PERV frei und es kam nicht zu einer Infektion von suszeptiblen humanen Nierenzellen *in vitro* und von BALB/c-Mäusen *in vivo*. Des Weiteren exprimierten die Inselzellen keine PERV-spezifische mRNA oder Proteine. In Bezug auf diese Ergebnisse stellen Schweine der Deutschen Landrasse eine vielversprechende Quelle für die Zucht von sicheren Schweinen für die Xenotransplantation dar.

4.2 Versuche der Etablierung eines *In vivo*-Infektionsmodells mit nicht-humanen Primaten

Die Tatsache, dass sich humane Zellen *in vitro* mit PERV infizieren lassen, führte zu einer intensiven Suche nach einem geeigneten Infektionsmodell, um die Pathogenität von PERV abschätzen zu können. Da nicht-humane Primaten und Menschenaffen dem Menschen phylogenetisch sehr ähnlich sind, konzentrieren sich die meisten Infektionsstudien bei der Suche nach einem geeigneten Tiermodell zur Untersuchung einer PERV-Zoonose auf diese Spezies. In den bisherigen *In vivo*-Infektionsstudien kam es bei immunsupprimierten nicht-humanen Primaten, denen porcine Zellen, Gewebe und Organe transplantiert wurden, nicht zu

einer Infektion mit PERV (Loss, et al., 2001; Martin, et al., 1998b; Martin, et al., 2002; Specke, et al., 2002b; Switzer, et al., 2001). Da nach neueren Erkenntnissen die Adaptation von PERV an Zellen anderer Spezies eine wichtige Rolle für die Infektiosität spielt (Denner, et al., 2001; Denner, et al., 2003), wurde PERV auf Zellen von Rhesusaffen und Schimpansen passagiert, um für spätere Experimente ein an Affenzellen adaptiertes Virus zur Verfügung zu haben.

Die in dieser Arbeit gezeigte *In vitro*-Infektion von Rhesusaffen- und Schimpansenzelllinien mit PERV konnte schon in anderen Studien gezeigt werden, in denen primäre Zellen und Zelllinien von verschiedenen nicht-humanen Primaten verwendet wurden (Siehe Tab. 7). Im Unterschied zu diesen Studien, konnte hier jedoch zum ersten Mal die Infektion von lymphoiden Schimpansenzellen gezeigt werden. Diese Unterschiede könnten durch die Verwendung von zellfreiem, human-adaptiertem PERV-A/C und PERV-B zustande gekommen sein. In verschiedenen Studien konnte keine Infektion von Rhesusaffen-Nierenzellen mit PERV beobachtet werden (Takeuchi, et al., 1998; Wilson, et al., 2000), obwohl bei Wilson et al. (2000) auch human-adaptiertes PERV für die Infektion von Rhesuszellen verwendet wurde. Möglicherweise war die verwendete Virusmenge von PERV zu gering, um eine Infektion in diesen Zellen zu etablieren. Für diese Hypothese sprechen die Ergebnisse einer späteren Studie, in der eine schwache Infektion der von Wilson et al. (2000) verwendeten Rhesus-Nierenzelllinie mit PERV beobachtet wurde (Ritzhaupt, et al., 2002). Es handelte sich bei dem in der Studie von Ritzhaupt et al. (2002) verwendeten PERV um die dritte Passage eines ursprünglich von Wilson et al. (1998) isoliertes rekombinantes PERV. Dieses PERV weist einen zehnfach höheren Titer auf als die zweite Passage des Virus (Ritzhaupt, et al., 2002). In dieser Arbeit wurde die fünfte Passage des von Wilson und Kollegen (1998) isolierten PERVs (PERV-A/C genannt) verwendet. Dieses PERV-A/C zeichnet sich durch genetische Veränderungen in der Primerbindungsstelle der LTR und einen dadurch bedingten höheren Titer aus (Denner, et al., 2001; Denner, et al., 2003). Andererseits könnte auch die Verwendung verschiedener Rhesusaffen- und Schimpansenzelllinien für die unterschiedlichen Resultate verantwortlich sein. Denn in einer Studie von Blusch et al. (2000) ließen sich primäre Fibroblasten von Schimpansen mit PERV-*envA*-Pseudotypen infizieren, während in anderen Studien keine Infektion mit PERV-*envA*-Pseudotypen in Fibroblasten-Zelllinien von Schimpansen nachweisbar war (Takeuchi, et al., 1998).

Tabelle 7: *In vitro*-Infektion von nicht-humanen Primatenzellen mit PERV

Spezies	Zelllinien/ Primäre Zellen	Resultat	Referenz
Schweinsaffen (<i>Macacca nemestrina</i>)	PBMC	Negativ	Specke et al., 2001
Afrikanische Grüne Meerkatzen (<i>Chlorocebus sabaeus</i>)	PBMC	Negativ	Specke et al., 2001
Rhesusaffen (<i>Macacca mulatta</i>)	PBMC	Positiv	Specke et al., 2001
Pavian (<i>Papio cynocephalus</i>)	PBMC, Milz	Positiv	Specke et al., 2001
Cynomolgusaffen (<i>macacca fascicularis</i>)	PBMC	Negativ (Ohne Polybren)	Specke et al., 2001
Gorilla (<i>Gorilla gorilla</i>), Schimpansen (<i>Pan troglodytes</i>), Pavian (<i>Papio hamadryas</i>)	Primäre Fibroblasten	Positiv: PERV-A, Negativ: PERV-B, PERV-C (Pseudotypisierung)	Blusch et al., 2000
Schweinsaffen (<i>Macacca nemestrina</i>), Cynomolgusaffen (<i>macacca fascicularis</i>), Afrikanische Grüne Meerkatzen (<i>Colobus, Saimiri, Alouatta</i>)	Primäre Fibroblasten	Negativ: PERV-A, PERV-B, PERV-C (Pseudotypisierung)	Blusch et al., 2000
Gorilla (<i>Gorilla gorilla</i>), Pavian (<i>Papio hamadryas</i>)	Primäre Fibroblasten	Positiv: PERV-A, PERV-B, PERV-C (Kokultivierung)	Blusch et al., 2000
Pavian (<i>Papio hamadryas</i>)	B-Zelllinie	Positiv: PERV-A, PERV-B (Kokultivierung)	Blusch et al., 2000

„Positiv“ bedeutet eine produktive Infektion.

Im Unterschied zu anderen Studien (Ritzhaupt, et al., 2002) konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal die Expression der Vollängen-mRNA und der gespleißten mRNA von PERV-A/C in infizierten Rhesusaffen-Nierenzellen und lymphoiden Schimpansenzellen nachgewiesen werden, während die Vollängen-mRNA von PERV-B nur begrenzte Zeit in diesen Zellen nachweisbar war. Die frühe Expression der gespleißten und ungespleißten mRNA von PERV-A/C lässt sich nur mit der Verwendung des hochtitrigen PERV-A/C erklären. Die vorübergehende Expression von ungespleißter PERV-B-mRNA stimmt mit anderen Studien nicht überein, die in Rhesus- und Schimpansenzellen keine Infektion mit Pseudotypen detektieren (Blusch, et al., 2000; Takeuchi, et al., 1998). Möglicherweise ist die in diesen Studien verwendete Methode der *lacZ*-Pseudotypisierung nicht sensitiv genug, da gezeigt werden konnte, dass die Detektion von PERV-spezifischen Antikörpern mittels Western Blot sehr viel sensitiver ist als die *lacZ*-Pseudotypisierung (Bartosch, et al., 2002). Die Ergebnisse einer Studie, in der primäre Zellen nicht-humaner Primaten laut Pseudotypisierung nur den Rezeptor für PERV-A tragen, sich aber dennoch mit PERV-B und PERV-C infizieren lassen unterstützen diese Hypothese zusätzlich (Blusch, et al., 2000). Allerdings wurde die Pseudotypisierung mit zellfreien Partikeln durchgeführt, während die Infektion durch Kokultivierung getestet wurde. Die zeitlich begrenzte Expression der Vollängen-mRNA von PERV-B korreliert mit der begrenzten Expression proviraler PERV-B Sequenzen. Dies deutet auf einen bisher unbekanntem Mechanismus hin, der das Eindringen in die Zielzelle und die Integration des Provirus noch zulässt, aber die Expression gespleißter viraler mRNA unterbindet. Im Gegensatz dazu ist die Blockierung des retroviralen Replikationszyklus zwischen dem noch möglichen Eindringen in die Zielzelle und der nicht mehr möglichen Integration des Provirus als Ursache für den limitierten Tropismus des murinen Leukämievirus (MuLV) schon lange bekannt (Goff, 1996; Lilly, 1970; Pincus, et al., 1971; Pryciak and Varmus, 1992). Die Inhibierung der MuLV-Infektion wird durch das murine Genprodukt *Fv1* verursacht. Zusätzlich sind in humanen und nicht-humanen Zellen *Fv1*-ähnliche Restriktionsfaktoren identifiziert worden (Hofmann, et al., 1999; Towers, et al., 2000). Im Menschen wird dieser Faktor Ref1 (resistance factor 1) und in nicht-humanen Primaten Lv1 (lentivirus susceptibility factor 1 (Cowan, et al., 2002)) genannt. Kürzlich wurde ein zelluläres Protein (TRIM5 α) als ein Bestandteil von Lv1 identifiziert, dass in humanen und nicht-humanen Primaten exprimiert wird (Stremlau, et al., 2004). In humanen und nicht-humanen Primaten sind diese Faktoren ebenfalls in der Lage, bestimmte Stämme von MuLV zu blockieren (Towers, et al., 2000). Des Weiteren können einige nicht-humane Primaten eine Infektion mit HIV oder SIV blockieren (Hofmann, et al., 1999). Diese

Blockade ist aber nicht irreversibel, da sie sich durch die Erhöhung des viralen Titers oder durch Vorinkubation mit dem restringierten Virus überwinden lässt (Besnier, et al., 2002). Die Resultate dieser Studien deuten darauf hin, dass es in den Rhesus- und Schimpansenzellen möglicherweise weitere Faktoren gibt, die nach der Integration des Provirus, also auf der Ebene der Expression viraler mRNA wirksam werden. Allerdings wird in den Studien zur Blockierung von Retroviren die Menge an unintegrierter proviraler DNA gemessen und nicht die Anwesenheit viraler mRNA (Besnier, et al., 2002; Cowan, et al., 2002; Towers, et al., 2000). Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass einige wenige Proviren ins Wirtsgenom integrieren und geringe Mengen an viraler mRNA exprimiert werden. Diese Annahme wird durch eine Studie unterstützt, in der geringe Mengen proviraler Sequenzen in infizierten Zellen nicht-humaner Primaten mittels PCR amplifiziert wurden (Munk, et al., 2002). Möglicherweise spielen noch andere Faktoren, die eine Infektion mit PERV-B verhindern, eine Rolle. Eine fehlerhafte reverse Transkription könnte die SD- und/oder die SA-Stellen verändert haben, so dass die virale mRNA nicht mehr gespleißt werden kann. Die reverse Transkriptase besitzt keine „Proofreading“-Aktivität und die Möglichkeit einer Mutation ist dadurch deutlich erhöht (Burns and Temin, 1994; Dougherty and Temin, 1988). Andererseits konnte trotz wiederholter Zugabe von zellfreiem PERV-B über einen längeren Zeitraum keine produktive Infektion der Rhesusaffen-Nierenzellen oder der lymphoiden Schimpansenzellen erreicht werden. Dies würde also bedeuten, dass die Mutation immer an der gleichen Stelle auftritt, was höchst unwahrscheinlich ist.

Ein weiterer wichtiger Schritt hin zu einem PERV-Infektionsmodell in nicht-humanen Primaten *in vivo* ist die Untersuchung der Freisetzung von infektiösen Partikeln von infizierten Rhesus- und Schimpansenzellen und die Adaptation dieser PERV-Partikel an Zellen nicht-humaner Primaten. Die Expression der Vollängen-mRNA und der gespleißten mRNA von PERV-A/C in den beiden Zelllinien nicht-humaner Primaten deutet darauf hin, dass infektiöse Partikel aus diesen Zellen freigesetzt werden. Allerdings konnten weder im Western Blot noch in der Durchflusszytometrie PERV-spezifische Proteine nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Diese widersprüchlichen Ergebnisse wurden auch schon in anderen Zelllinien beobachtet (Wilson, et al., 2000). Möglicherweise ist auch die Menge an freigesetzten Viruspartikeln zu gering, um mit den verwendeten Methoden detektiert zu werden. Aus diesem Grund wurden die Zellkulturüberstände der PERV-A/C-infizierten Rhesus- und Schimpansenzellen über einen Zeitraum von zehn Wochen auf die jeweils uninfizierten Primatenzellen sowie auf PERV-suszeptible 293-Zellen gegeben. Im Unterschied zu anderen Studien (Ritzhaupt, et al., 2002), ließen sich in dieser Arbeit

Rhesusaffen-Nierenzellen und 293-Zellen mit PERV von Rhesusaffenzellen (LLCMK2/PERV-A/C) infizieren. Des Weiteren konnten lymphoide Schimpansenzellen und 293-Zellen mit PERV von Schimpansenzellen (EB176/PERV-A/C) infiziert werden. Allerdings deutet die geringe Amplifikation von proviraler *pol*- und *envA*-DNA auf eine schwache Infektion der Rhesusaffen- und Schimpansenzellen mit dem jeweils adaptierten PERV-A/C hin. Nicht-humane Primaten haben möglicherweise Mechanismen entwickelt, die zwar eine Primärinfektion zulassen, aber die Ausbreitung der Infektion verhindern. So zeigte die Studie von Ritzhaupt et al. (2002) ebenfalls die Expression von viraler DNA und mRNA in neuinfizierten Nieren-, Lungen- und retinalen Endothelzellen von Rhesusaffen, doch eine Passagierung viraler Partikel war nicht möglich. Andererseits waren die Lungen- und retinalen Endothelzellen durchaus in der Lage, humane 293-Nierenzellen zu infizieren (Ritzhaupt, et al., 2002). Dies deutet allerdings eher darauf hin, dass die verwendeten Rhesuszelllinien zu wenig Viruspartikel freisetzen, um eine Infektion zu etablieren. Die Pseudotypisierung mit einem Plasmid bestehend aus VSV-G Sequenzen (Vesikularstromatitis Virus G) und PERV-*env* führte zwar zu einer Erhöhung des viralen PERV-Titers in den retinalen Endothelzellen, aber dieser reichte nicht aus, um uninfizierte Zellen nicht-humaner Primaten zu infizieren (Ritzhaupt, et al., 2002). Die Möglichkeit der Infektion von Rhesusaffenzellen scheint stark vom verwendeten Retrovirus abzuhängen. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass sich Rhesusaffenzellen zwar mit SIV oder MuLV infizieren lassen, aber kaum mit HIV (Hofmann, et al., 1999). Zusätzlich bestehen hinsichtlich der Freisetzung viraler Partikel aus verschiedenen Geweben der Rhesusaffen beträchtliche Unterschiede.

Die schwache Infektion von lymphoiden Schimpansenzellen mit EB176/PERV-A/C zeigt, dass infektiöse Partikel aus den 293/PERV-A/C-infizierten Schimpansenzellen freigesetzt werden. Allerdings deutet die langwierige Infektionsphase von bis zu zehn Wochen darauf hin, dass Schimpansenzellen nur eine geringe Menge an Viruspartikeln freisetzen. Dies liegt möglicherweise daran, dass die EB176-Zellen eine geringere Proliferationsrate haben als 293-Zellen. Da PERV zu den einfachen γ -Retroviren gehört, benötigt es zur Vollendung seines Replikationszyklus proliferierende Zellen. Ein weiterer Grund für die geringe Menge freigesetzter EB176/PERV-A/C-Partikel könnte die Methylierung der proviralen DNA darstellen. In Wirbeltieren sind 60 bis 90% der Cytidinreste in allen Cytidin/Guanosin-Dinukleotiden (CpG) methyliert. Die CpG-Methylierung ist mit einer Unterdrückung der Genexpression verbunden, deren Mechanismen noch nicht völlig aufgeklärt sind (Jones and Takai, 2001). Die Methylierung konzentriert sich hauptsächlich auf die im Genom des

Menschen vorkommenden Transposons und Retrotransposons (Yoder, et al., 1997). Transposons und Retrotransposons sind DNA-Sequenzen, die in der Lage sind, das Genom zu verlassen und an anderer Stelle wieder in das Genom zu integrieren (Smit, 1999). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die provirale DNA in PBMC von Rindern, die mit dem bovinen Leukämievirus (BLV) infiziert sind, und von HTLV-1-infizierten Patienten methyliert wird (Clarke, et al., 1984; Kashmiri, et al., 1985; Kitamura, et al., 1985; Ogawa, et al., 1985). Die Methylierung des Provirus ist auf die Enhancer- und Promotorregionen der LTR konzentriert (Koiwa, et al., 2002). Allerdings konnte für BLV *in vivo* (Tajima, et al., 2003) und für HIV-1 *in vitro* (Pion, et al., 2003) keine Korrelation zwischen der Methylierung der LTR und der Unterdrückung der Expression viraler RNA oder viraler Partikel festgestellt werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die *In vitro*-Infektion von Rhesusaffen-Nierenzellen und lymphoiden Schimpansenzellen mit PERV-A/C und PERV-B gezeigt werden. Die Expression der Vollängen-mRNA der beiden PERV Subtypen war ebenfalls in den beiden infizierten Zelllinien detektierbar. Die Expression gespleißter PERV-mRNA ließ sich dagegen nur in den PERV-A/C-infizierten Zellen beobachten. Die Replikation von PERV-A/C war in den beiden nicht-humanen Zelllinien allerdings nur gering. Auf Grund dieser Ergebnisse stellt die Verwendung eines hochtitrigen und adaptierten PERVs eine vielversprechende Möglichkeit dar, ein *In vivo*-Infektionsmodell in nicht-humanen Primaten zu etablieren.

4.3 Versuche zur Etablierung eines *In vivo*-Infektionsmodells mit Kleintieren

Die Verwendung bzw. Etablierung eines Kleintiermodells zur Simulation der Xenotransplantation und zur Untersuchung der Pathogenität von PERV bietet gegenüber nicht-humanen Primaten einige Vorteile: 1. Die für Experimente benötigte Anzahl an Versuchstieren lässt sich beliebig variieren, 2. Die Haltung der Tiere ist relativ kostengünstig und die Umweltbedingungen lassen sich konstant halten und 3. Die Manipulation der Tiere, wie zum Beispiel die Applikation von Immunsuppressiva, ist bei Kleintieren wesentlich einfacher als bei nicht-humanen Primaten. Aus diesen Gründen wurden diverse Versuche unternommen, Kleintiere mit PERV *in vivo* zu infizieren (Specke, et al., 2001b; Specke, et al., 2002a). Jedoch schlugen diese Versuche bisher fehl, trotz Immunsuppression und erfolgreicher Infektion von Zellen dieser Spezies *in vitro* und obwohl die Untersuchung verschiedener Kleintierzelllinien ergab, dass einige davon Rezeptoren für PERV-A, für PERV-B oder für beide Subtypen tragen (Takeuchi, et al., 1998). Allerdings zeigt die Studie

von Takeuchi et al. (1998) auch, dass die Suszeptibilität für PERV zwischen verschiedenen Zelllinien derselben Spezies unterschiedlich sein kann. Die Rezeptoren werden also möglicherweise nicht ubiquitär exprimiert und/oder sind polymorph in der Erkennung der Hüllproteine von PERV. Das bedeutet, dass es in einem Organismus Zellen und Gewebe geben könnte, die suszeptibel für eine PERV-Infektion sind. Aus diesem Grund wurden hier zunächst verschiedene murine Zelllinien und primäre Zellen mit einer Mischung aus PERV-A und PERV-B oder mit kloniertem PERV-B inkubiert. In Übereinstimmung mit anderen Studien (Denner, et al., 2001; Takeuchi, et al., 1998) konnte in dieser Arbeit keine Infektion muriner Zellen mit PERV-A beobachtet werden. Selbst dann nicht, wenn hochtitriges PERV-A/C für die Inkubation verwendet wurde. Für PERV-B dagegen bleibt die Situation weiterhin unklar, denn in Pseudotypisierungsexperimenten wurden für dieses Virus suszeptible murine Zellen gefunden (Takeuchi, et al., 1998), aber in unseren Experimenten war keine Infektion nach Inkubation mit einem Gemisch aus PERV-A und PERV-B oder kloniertem PERV-B detektierbar. Selbst nach Langzeit-Kokultivierung oder direktem Zellkontakt zur Verbesserung der Infektivität, konnte keine Infektion der murinen Zellen mit PERV-B beobachtet werden. Dieser Unterschied zwischen dem Vorhandensein eines PERV-B Rezeptors und der Abwesenheit einer Infektion *in vitro* und *in vivo* wurde auch schon in Infektionsstudien, die an Ratten durchgeführt wurden, beobachtet (Specke, et al., 2001b).

Eine Übertragung von PERV *in vivo* wurde für SCID- und Nacktmäuse beschrieben (Clemenceau, et al., 2002; Deng, et al., 2000; van der Laan, et al., 2000). Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ergeben sich jedoch einige Schwierigkeiten, da für die Transplantation PERV-produzierende porzine Inselzellen verwendet wurden und Mikrochimärismus auftrat. In der Studie von van der Laan et al. (2000) wurde zwar die Expression viraler mRNA und Proteine in den Inselzellen nach der Transplantation gezeigt, doch die Anzahl der Kopien porziner DNA war in allen transplantierten SCID-Mäusen wesentlich höher als die PERV-spezifischer DNA. Zusätzlich ließ sich in rund einem Drittel der untersuchten SCID-Mausorgane Mikrochimärismus nachweisen. Des Weiteren waren in der Studie von Clemenceau et al. (2002) in den Mausorganen, die PERV-spezifische Sequenzen enthielten, auch porzine Sequenzen nachweisbar und in keinem der untersuchten Organe konnte PERV-spezifische RNA detektiert werden. Aus den oben genannten Gründen, den hier präsentierten Daten und der Tatsache, dass Mauszellen ein funktionaler Rezeptor für PERV-A fehlt (Ericsson, et al., 2003), deuten die berichteten Infektionen von SCID- und Nacktmäusen darauf hin, dass diese auf Grund von zellulärem Mikrochimärismus nach

Applikation von porzinen Inselzellen oder durch Pseudotypisierung mit murinen endogenen Retroviren zustande gekommen sind.

Ein Tiermodell ist nicht nur für die Untersuchung der Infektivität und Pathogenität eines Virus nützlich, sondern auch für die Suche nach antiviral wirkenden Medikamenten und Impfstoffen. Zum Beispiel können Reverse Transkriptase-Inhibitoren wie AZT die Replikation von PERV *in vitro* hemmen (Powell, et al., 2000; Qari, et al., 2001; Stephan, et al., 2001) und neutralisierende Antikörper, die durch Immunisierung mit dem transmembranen Hüllprotein induziert wurden, könnten als Basis für einen antiviralen Impfstoff dienen (Fiebig, et al., 2003). Um zu bestimmen, ob solch ein Impfstoff in der Lage ist, eine Infektion *in vivo* zu verhindern, wird ein Tiermodell dringend benötigt. Bisher sind nur Meerschweinchen für solche Experimente geeignet, doch selbst in diesem Modell konnte nur eine transiente Replikation von PERV beobachtet werden, die nach 12 Wochen nicht mehr nachweisbar war (Argaw, et al., 2004). Diese Resultate bestätigen vorangegangene Studien von Onion et al. (2000), die eine begrenzte Infektion kurz nach der Inokulation zeigen (Onion and et al, 2000) und von Specke et al. (2002a), die keine Hinweise auf eine Infektion nach 12 Wochen zeigen (Specke, et al., 2002a). Ein anderer Ansatz, ein Tiermodell zu etablieren, könnte die Entwicklung transgener Mäuse sein, die einen normaler Weise auf Mauszellen nicht vorhandenen PERV-spezifischen Rezeptor exprimieren (Ericsson, et al., 2003).

4.4 Retrospektive Untersuchung von Patienten, die mit porzinen Zellen und Geweben behandelt wurden

Weltweit wurden bisher etwa 200 Patienten mit Zellen und Geweben vom Schwein oder mit einer *Ex vivo*-Perfusion unter Zuhilfenahme von porzinen Zellen behandelt (Dinsmore, et al., 2000; Elliott, et al., 2000; Heneine, et al., 1998a; Moza, et al., 2001; Paradis, et al., 1999; Patience, et al., 1998; Tacke, et al., 2001; Valdes, 2002). Bei keinem der behandelten Patienten konnte eine Übertragung von PERV festgestellt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei neue Studien analysiert. In der einen wurden Patienten mit akutem Leberversagen *ex vivo* mit einem Bioreaktor, der porzine Hepatozyten enthielt, behandelt. In der anderen wurden Diabetes-Kranke mit Inselzellen vom Schwein behandelt.

Zu den Hauptursachen eines akuten Leberversagens gehören: Eine akute virale Hepatitis A und B, die Überdosierung einer Medikation (z.B. Acetaminophen), die Einnahme anderer Toxine (z.B. das Gift des Knollenblätterpilzes) und Stoffwechselerkrankungen (z.B. das Reye-Syndrom). Trotz der Fortschritte in der Intensivmedizin, bleibt die Mortalitätsrate

relativ hoch (40-80 %) und hängt zum Teil mit den Begleiterscheinungen des akuten Leberversagens zusammen, die von der Bildung eines Ödems im Gehirn über Sepsis, Hyperglykämie, gastrointestinale Blutungen bis zu akutem Nierenversagen reichen (Gill and Sterling, 2001). Der Mangel an Spenderorganen und die fehlende sofortige Verfügbarkeit dieser Organe bedeutet, dass viele Patienten sterben, bevor eine orthotrope Lebertransplantation durchgeführt werden kann. Ein effektives, temporäres extrakorporeales Leberunterstützungssystem kann die Überlebenschancen verbessern, unabhängig davon, ob ein Transplantat zur Verfügung steht oder nicht. Der momentane Mangel an humanen Spenderorganen führte zu einer Suche nach alternativen Quellen von Hepatozyten (Riordan and Williams, 1999). Porzine Organe und Gewebe scheinen die vielversprechendste Wahl unter den xenogenen Materialien zu sein. Sie sind fast unbegrenzt verfügbar, die Größenverhältnisse der porzinen Organe zum Menschen sind ideal und die Kenntnis der Pathoimmunologie, der Physiologie und übertragbarer Pathogene ist sehr weit fortgeschritten, da Schweine als mögliche Organspender im letzten Jahrzehnt intensiv untersucht wurden. Die ersten klinischen Studien zur Behandlung des akuten Leberversagens mit extrakorporealen bioartifiziellen Leberunterstützungssystemen zeigten eine erfolgreiche Überbrückung bis zur Lebertransplantation, aber keine Übertragung von PERV (Kuddus, et al., 2002; Levy, et al., 2000; Mazariegos, et al., 2001; Morsiani, et al., 2002; Pitkin and Mullon, 1999). In dieser Arbeit führte die Behandlung von acht Patienten mit einem Bioreaktor basierend auf porzinen Hepatozyten zu einer klinischen Stabilisierung und schließlich zu einer erfolgreichen Lebertransplantation mit einer Überlebensrate von 100% aller acht Patienten. Unsere Ergebnisse stimmen mit anderen Studien überein, in denen keine Übertragung von PERV gezeigt werden konnte, selbst bei Patienten, die bis zu fünf Jahre lang unter immunsuppressiver Therapie standen (Kuddus, et al., 2002; Pitkin and Mullon, 1999). Die Abwesenheit von PERV-Partikeln und -Proteinen könnte eine Konsequenz aus der Verwendung mikroporöser Polyethersulfon-Membranen sein, da gezeigt werden konnte, dass diese Membranen die Freisetzung von PERV-Partikeln verhindern können, wenn sie für Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 400 000 kDa durchlässig sind (Nyberg, et al., 1999). Die in diesen Studien verwendeten Methoden basieren jedoch alle auf der Detektion proviraler DNA oder viraler RNA mittels RT-PCR, PCR und Southern Blot. Um eine Infektion durch diese Methoden bestätigen zu können, muss das infizierte Gewebe oder Organ, aus dem dann DNA isoliert wird, vorher bekannt sein. Wenn zum Beispiel das Virus sich in einem anderen Gewebe außer Blutzellen befindet, muss das relevante Biopsiematerial vom Patienten erhalten werden. Indirekte Analysen basierend auf der Detektion

immunologischer Reaktionen gegen PERV im infizierten Individuum sind deshalb wesentlich besser geeignet, um eine Infektion schnell zu detektieren. In dieser Arbeit wurden verbesserte Western Blot-Analysen in Ergänzung zu etablierten Methoden (Tacke, et al., 2001) verwendet. Durch die Verwendung der rekombinanten Proteine p27Gag und p15Env konnten größere Mengen dieser Antigene auf der Blotmembran präsentiert werden, wodurch die Sensitivität der Western Blot-Analysen erhöht wurde. Trotz dieser Vorteile konnten keine PERV-spezifischen Antikörper in den Seren der Patienten detektiert werden. In den ersten Studien zur Detektion einer PERV-Übertragung auf humane Xenotransplantatempfänger wurde nur ein rekombinantes Protein (p27Gag) oder Lysate von Virus-produzierenden Zellen verwendet (Galbraith, et al., 2000; Paradis, et al., 1999). Aus den erhaltenen Ergebnissen, darunter positive Reaktionen gegen Gag, war es nicht möglich auf die Abwesenheit einer Infektion zu schließen, da die Anwesenheit der Env-Proteine auf dem verwendeten Blot nicht demonstriert wurde bzw. Env-Proteine nicht aufgetragen wurden. Die Verwendung von gereinigten Viruspräparationen und Kontrollseren, die gegen alle viralen Proteine entwickelt wurden, um die Qualität des Western Blots zu evaluieren, sind zwingend notwendig, um eine Unterscheidung zwischen positiven und negativen Ergebnissen zu ermöglichen. Die hier angewandte Kombination aus gereinigtem Virus und rekombinanten Proteinen stellt ein sensitives und wertvolles System dar, das klar gezeigt hat, dass keine Übertragung von PERV stattgefunden hat und dass es eine Verbesserung zu bereits vorhandenen Methoden ist.

Das Fehlen einer PERV-Übertragung bei den sieben untersuchten Patienten könnte an der Inaktivierung des Virus durch natürliche Antikörper gegen Galactosyl- α -1-3-galactose (Gal α 1-3-Gal) liegen, die im menschlichen Körper zirkulieren. Die effektive Inaktivierung von PERV, das aus porzinen Zellen freigesetzt wurde, durch diese Antikörper konnte in einigen Studien gezeigt werden (Rother, et al., 1995; Takeuchi, et al., 1996). Die Entwicklung von Schweinen, die für den humanen Decay accelerating factor (hDAF) transgen sind, und von Gal α 1-3-Gal Knock-out-Schweinen könnte das Risiko einer Übertragung von PERV erhöhen, wodurch die Entwicklung sensitiver Nachweismethoden für PERV um so wichtiger wird. Wie auch schon in anderen Studien beobachtet (Baquerizo, et al., 1999; Takahashi, et al., 1993), ist die Zunahme von Anti-Schweine-spezifischen μ - und γ -Immunglobulinen in fünf Patienten, möglicherweise auf die erhöhte Menge an porzinem Albumin und anderen porzinen Antigenen im Plasma der Patienten zurück zu führen. Obwohl bisher noch nicht bekannt ist, ob überhaupt Antikörper gegen das Gal α 1-3-Gal-Epitop vorhanden waren, so sind doch 1% aller humanen B-Zellen fähig, Antikörper gegen das Blutgruppen-ähnliche Gal α 1-3-Gal-Epitop zu generieren (Galili, et al., 1993). Der Nachweis Schweine-spezifischer μ - und γ -

Immunglobuline bis zu vier Jahre nach der Behandlung stimmt mit den Beobachtungen anderer Studien überein (Lindeborg, et al., 2001), in denen Patienten xenoimmune Antikörper zwischen sechs und acht Jahre nach der Transplantation fötaler porziner Inselzell-ähnlicher Zellverbände produzierten. Dabei ist es höchst interessant, dass die Patienten 7 und 8 bereits vor der Therapie μ -Immunglobulin-Reaktionen gegen Schweine-Antigene zeigten und dass bei Patient 8 eine Zunahme der Antikörperreaktion zu beobachten war.

Fasst man die Ergebnisse unter Betrachtung der ersten klinischen Xenotransplantationen im Menschen (Paradis, et al., 1999; Tacke, et al., 2001) und der intensiven Analyse von Seren, die von Schlachtern stammten, die engen Kontakt zu Schweineblut haben, zusammen, dann ist es offensichtlich, dass PERV *in vivo* nicht einfach auf andere Spezies einschließlich dem Menschen übertragen werden kann. Diese Diskrepanz zwischen den Ergebnissen *in vitro* und denen *in vivo* mag infolge der effektiven angeborenen und adaptiven Immunität der untersuchten Spezies zustande kommen.

Auf Grund der immensen Fortschritte, die in Bezug auf die Isolierung porziner Inselzellen, auf die Abschirmung der Inselzellen vor dem Immunsystem des Empfängers und auf die Entwicklung neuer Immunsuppressiva gemacht wurden (O'Connell, 2002), ist die Xenotransplantation porziner Inselzellen in den letzten zehn Jahren schon vielfach durchgeführt worden. Durch die aufgekommenen Bedenken bezüglich einer Übertragung von PERV auf den Menschen, wurden retrospektive Studien hinsichtlich einer PERV-Übertragung durchgeführt. Bisher konnten keine Hinweise auf eine Infektion gefunden werden (Elliott, et al., 2000; Heneine, et al., 1998a; Paradis, et al., 1999). In einer neuen Studie, durchgeführt mit Diatranz Ltd., wurden achtzehn Typ I Diabetes-Kranke, die porzine Inselzelltransplantate auf drei verschiedene Arten erhalten hatten, mit einem intensiven virologischen Screening bis zu neun Jahre lang überwacht (Garkavenko, et al., 2004). Die Seren von vierzehn der achtzehn Patienten wurden auf PERV-spezifische Antikörper untersucht. Die Vorteile einer Messung der Antikörperreaktionen sind, erstens der leichte Zugang zu den Seren, zweitens die relativ geringen Kosten dieser Analyse und am wichtigsten drittens die Tatsache, dass positive serologische Analysen die Infektion eines Individuums klar demonstrieren, während direkte Methoden von infiziertem Gewebe abhängig sind. Antikörper-Analysen werden erfolgreich zum Nachweis einer Infektion mit anderen humanen und tierischen Retroviren einschließlich HIV-1 eingesetzt.

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal Antikörper gegen das Hüllprotein gp70 in Xenotransplantationspatienten (Patient 1,2 und 4) nachgewiesen. In den Seren der Patienten 1 und 2 waren diese Antikörper acht bis neun Jahre nach der Xenotransplantation nachweisbar.

Zusätzlich konnten nach diesem Zeitraum auch Antikörper gegen porcine Inselzellproteine detektiert werden. Im Serum von Patient 4 waren Antikörper gegen gp70 zwei Jahre nach der Transplantation detektierbar. Da keines der drei Seren mit einem weiteren viralen Protein (p27Gag oder p15Env) reagierte, kann man davon ausgehen, dass diese Patienten nicht mit PERV infiziert sind. Im Allgemeinen sind Reaktionen gegen mindestens zwei verschiedene Proteine (Gag oder Pol und eines der Hüllproteine) notwendig, um eine Infektion mit HIV mittels Western Blot-Analyse zu bestätigen. Zusätzlich kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die vorhandenen Antikörper gegen gp70 aufgrund von porcinen Inselzellen, die im Organismus der Patienten 1 und 2 zirkulierten (Mikrochimärismus), gebildet wurden, da auch Antikörper gegen andere Inselzellproteine nachweisbar waren. PERVs sind im Genom aller Schweine integriert und exprimierte virale Proteine werden auch auf der Zelloberfläche porciner Zellen präsentiert. Andererseits waren die Reaktionen gegen gp70 stärker als die gegen porcine Inselzellproteine. Es bleibt unklar, ob die Reaktionen gegen gp70 auf eine Kreuzreaktion von Antikörpern zurück zu führen ist, die gegen Autoantigene, gegen Antigene anderer Parasiten oder gegen einen verwandten Retrovirus gerichtet sind. Zusätzlich ist bekannt, dass normale humane Seren gegen die glykosylierten Teile viraler Proteine reagieren können und dadurch ein falsch-positives Ergebnis erzeugen (Kurth, et al., 1977). Schließlich zeigten die Patienten 1, 2, 3 und 4, die unverkapselte Inselzellen erhielten, keine provirale DNA und RNA von PERV in PBMC acht bis neun Jahre nach der Behandlung.

Die Seren von drei Patienten (Patient 5, 8 und 11) zeigten Reaktionen gegen p27Gag von PERV. Reaktionen gegen das p27Gag-Protein wurden auch schon in anderen Studien beobachtet (Paradis, et al., 1999; Tacke, et al., 2001). Es ist auffällig, dass alle drei Seren schon vor der Xenotransplantation Antikörper gegen p27Gag enthielten, wobei in einem (Patient 5) zusätzlich Antikörper gegen porcine Inselzellproteine vorhanden waren. Die bereits vorhandenen Antikörper gegen das p27Gag-Protein sind von besonderem wissenschaftlichen Interesse. So zeigten einige Seren (5%) von gesunden Blutspendern auch Reaktionen mit dem Haupt-Capsidprotein p27Gag in Western Blot-Analysen basierend auf viralen Proteinen (Tacke, et al., 2001). Weiterhin reagierten 11% der Seren von Schlachtern in deutschen Schlachthäusern mit p27Gag, was ebenfalls nicht als ein Hinweis auf eine Infektion bewertet werden kann. Immunantworten gegen einzelne virale Proteine, darunter p24Gag von HIV-1, in Abwesenheit einer Infektion wurden schon früher beschrieben (Biggar, et al., 1985; Sayre, et al., 1996). Schließlich konnte in Patient 5, der verkapselte porcine Inselzellxenotransplantate erhielt, keine provirale DNA und RNA von PERV in PBMC bis zu sechs Jahren nach der Transplantation gefunden werden und in den Patienten 8

und 11, die Aggregate aus Sertoli- und Inselzellen injiziert in vaskularisierte Kollagenreservoirs erhielten, konnten ebenfalls keine Hinweise auf eine PERV-Übertragung über einen Überwachungszeitraum von zwei Jahren gefunden werden. Die Antikörperreaktionen gegen porcine Inselzellproteine zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Xenotransplantation konnte auch schon in anderen Studien beobachtet werden (Irgang, et al., 2003; Sauer, et al., 2003). Zusätzlich wurde in einer Studie Schweine-spezifische mitochondriale DNA bis zu einem Jahr nach der Transplantation porciner Inselzellen in den Seren der Empfänger detektiert (Heneine, et al., 1998a).

Diese hier erhobenen Daten bestätigen Studien, die untersucht haben, ob eine Übertragung von PERV in Rezipienten von Xenotransplantaten stattfindet (Herring, et al., 2001a). Zum Beispiel wurden in zehn Diabetes-Patienten, die einer großen Menge unverkapselter porciner Inselzellen über einen langen Zeitraum ausgesetzt waren (Heneine, et al., 1998a), keine Hinweise auf eine PERV-Infektion gefunden. Ebenso in einer Studie von 160 Patienten, die mit verschiedenen porcinen Geweben einen Tag oder bis zu zwölf Jahre lang behandelt wurden, bevor sie analysiert wurden (Paradis, et al., 1999; Tacke, et al., 2001). Auch in einer Studie von 88 Bluterkranken, die den porcinen Gerinnungsfaktor VIII (Hyate C) erhielten, konnte keine Übertragung von PERV beobachtet werden, obwohl in allen Konzentraten des Gerinnungsfaktors PERV-spezifische RNA detektiert werden konnte (Heneine, et al., 2001). In weiteren Studien, in denen Patienten mit fötalen porcinen neuronalen Zellen (Dinsmore, et al., 2000) oder mit porcinen Herzklappen (Moza, et al., 2001) behandelt wurden, konnten wiederum keine Hinweise auf eine Übertragung von PERV gefunden werden.

Das Fehlen von Hinweisen auf eine Infektion zu diesem Zeitpunkt, schließt die Möglichkeit einer Infektion in zukünftigen klinischen Studien nicht aus. Um dies zu verhindern, sollten gut charakterisierte Schweine, die nicht mit bekannten humantropen Viren infiziert sind, verwendet werden (Clark, et al., 2003; Fishman, 1994; Matthews, 2001; Michaels, 2001; O'Rourke, 2000; Tucker, et al., 2003). In Bezug auf PERV, das in allen Schweinestämmen präsent ist, sollten spezifische Strategien einschließlich der Verwendung von Tieren, die kein PERV freisetzen (Oldmixon, et al., 2002; Scobie, et al., 2004) oder der Entwicklung eines Impfstoffes (Fiebig, et al., 2003), entwickelt werden, die eine PERV-Übertragung verhindern.

5. Zusammenfassung

Die im Genom der Schweine integrierten porzinen endogenen Retroviren (PERV) gehören zu den potentiellen humanpathogenen Erregern, die eines der Risiken bei der Xenotransplantation von porzinen Zellen, Geweben und Organen darstellen. Die daraus resultierenden drei Verfahrensweisen zur Abschätzung des Infektionsrisikos von PERV wurden angewendet und ergaben folgende Ergebnisse:

Porzine Inselzellen wurden *in vitro* und *in vivo* auf ihre Fähigkeit, PERV zu produzieren, untersucht. Solche Inselzellen würden potentiell für die Behandlung von Diabetes mellitus verwendet werden. Die untersuchten Inselzellen von Schweinen der Deutschen Landrasse setzten keine Viruspartikel frei und konnten somit auch keine humanen Zellen infizieren. Des Weiteren wurde auch keine Infektion bei BALB/c-Mäusen, denen Inselzellen appliziert wurden, beobachtet. Schweine der Deutschen Landrasse könnten deshalb als Ausgangsbasis für die Zucht sicherer Schweine für die Xenotransplantation dienen.

In ersten Versuchen der Arbeitsgruppe konnte keine Übertragung von PERV nach Applikation hoher Dosen in immunsupprimierte Rhesusaffen, Paviane und Schweinsaffen beobachtet werden. PERV wurde deshalb auf Zellen von Rhesusaffen und Schimpansen passagiert, um für spätere Versuche ein auf Affenzellen adaptiertes Virus zu gewinnen. Obwohl die verwendeten Affenzellen infektiöses PERV produzierten, war die Replikation nur gering. In einem zweiten Modellversuch wurde murinen Zellen *in vitro* und SCID-Mäusen *in vivo* zellfreies PERV in hohen Dosen appliziert. Da keine Infektion mit PERV beobachtet wurde, muss zwingend angenommen werden, dass Publikationen anderer Arbeitsgruppen, die porzine Inselzellen in SCID-Mäuse applizierten und eine PERV-Infektion diagnostizierten, ein falsch-positives Ergebnis auf Grund einer Kontamination mit porzinen Inselzellen (Mikrochimärismus) oder auf Grund von Pseudotypisierungen mit murinen endogenen Retroviren wiedergeben. Unsere Befunde werden dadurch erhärtet, dass der Rezeptor für PERV-A auf murinen Zellen nicht exprimiert wird und diese auch *in vitro* nicht infiziert werden konnten.

Weltweit wurden etwa 200 Patienten mit Zellen und Geweben vom Schwein oder einer *Ex vivo*-Perfusion unter Zuhilfenahme von Schweinezellen behandelt. Bei keinem konnte eine Übertragung von PERV festgestellt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei neue Studien analysiert. In der einen wurden Patienten mit akutem Leberversagen *ex vivo* mit einem Bioreaktor, der Leberzellen vom Schwein enthielt, behandelt. In der anderen wurden Diabetes-Kranke mit Inselzellen vom Schwein behandelt. Der Nachweis der Infektion erfolgte

indirekt; mit neu entwickelten immunologischen Methoden wurden Antikörper gegen PERV gemessen. In beiden Studien konnte keine Übertragung von PERV beobachtet werden.

Alle drei angewendeten Verfahrensweisen zeigten, dass die Wahrscheinlichkeit einer PERV-Übertragung geringer ist als früher angenommen. Diese Analysen bilden die Grundlage für neue Methoden zum Nachweis der PERV-Freisetzung von porzinen Zellen, zum Nachweis einer PERV-Infektion in Tiermodellen und klinischen Xenotransplantationen und für die Etablierung eines Tiermodells mit nicht-humanen Primaten.

6. Literatur

- Aaronson, S. A. and Stephenson, J. R. (1976): Endogenous type-C RNA viruses of mammalian cells, *Biochim Biophys Acta* (vol. 458), No. 4, pp. 323-54.
- Akiyoshi, D. E.; Denaro, M.; Zhu, H.; Greenstein, J. L.; Banerjee, P. and Fishman, J. A. (1998): Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine, *J Virol* (vol. 72), No. 5, pp. 4503-7.
- Alejandro, R.; Lehmann, R.; Ricordi, C.; Kenyon, N. S.; Angelico, M. C.; Burke, G.; Esquenazi, V.; Nery, J.; Betancourt, A. E.; Kong, S. S.; Miller, J. and Mintz, D. H. (1997): Long-term function (6 years) of islet allografts in type 1 diabetes, *Diabetes* (vol. 46), No. 12, pp. 1983-9.
- Allan, G. M. and Ellis, J. A. (2000): Porcine circoviruses: a review, *J Vet Diagn Invest* (vol. 12), No. 1, pp. 3-14.
- Allan, G. M.; Phenix, K. V.; Todd, D. and McNulty, M. S. (1994): Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus, *Zentralbl Veterinarmed B* (vol. 41), No. 1, pp. 17-26.
- Allan, J. S. (1998): The risk of using baboons as transplant donors. Exogenous and endogenous viruses, *Ann N Y Acad Sci* (vol. 862), pp. 87-99.
- Andersson, P.; Goldfarb, M. P. and Weinberg, R. A. (1979): A defined subgenomic fragment of in vitro synthesized Moloney sarcoma virus DNA can induce cell transformation upon transfection, *Cell* (vol. 16), No. 1, pp. 63-75.
- Argaw, T.; Colon-Moran, W. and Wilson, C. A. (2004): Limited infection without evidence of replication by porcine endogenous retrovirus in guinea pigs, *J Gen Virol* (vol. 85), No. Pt 1, pp. 15-9.
- Armstrong, J. A.; Porterfield, J. S. and De Madrid, A. T. (1971): C-type virus particles in pig kidney cell lines, *J Gen Virol* (vol. 10), No. 2, pp. 195-8.
- Baquerizo, A.; Mhoyan, A.; Kearns-Jonker, M.; Arnaout, W. S.; Shackleton, C.; Busuttil, R. W.; Demetriou, A. A. and Cramer, D. V. (1999): Characterization of human xenoreactive antibodies in liver failure patients exposed to pig hepatocytes after bioartificial liver treatment: an ex vivo model of pig to human xenotransplantation, *Transplantation* (vol. 67), No. 1, pp. 5-18.
- Bartosch, B.; Weiss, R. A. and Takeuchi, Y. (2002): PCR-based cloning and immunocytological titration of infectious porcine endogenous retrovirus subgroup A and B, *J Gen Virol* (vol. 83), No. Pt 9, pp. 2231-40.

- Bergelson, J. M.; Chan, M.; Solomon, K. R.; St John, N. F.; Lin, H. and Finberg, R. W. (1994): Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 91), No. 13, pp. 6245-8.
- Berney, T.; Buhler, L.; Caulfield, A.; Oberholzer, J.; Toso, C.; Alejandro, R.; Cooper, D. K.; Ricordi, C. and Morel, P. (2001): Transplantation of islets of Langerhans: new developments, *Swiss Med Wkly* (vol. 131), No. 47-48, pp. 671-80.
- Besnier, C.; Takeuchi, Y. and Towers, G. (2002): Restriction of lentivirus in monkeys, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 99), No. 18, pp. 11920-5.
- Biggar, R. J.; Gigase, P. L.; Melbye, M.; Kestens, L.; Sarin, P. S.; Bodner, A. J.; Demedts, P.; Stevens, W. J.; Paluku, L.; Delacollette, C. and et al. (1985): ELISA HTLV retrovirus antibody reactivity associated with malaria and immune complexes in healthy Africans, *Lancet* (vol. 2), No. 8454, pp. 520-3.
- Billinis, C.; Paschaleri-Papadopoulou, E.; Psychas, V.; Vlemmas, J.; Leontides, S.; Koumbati, M.; Kyriakis, S. C. and Papadopoulos, O. (1999): Persistence of encephalomyocarditis virus (EMCV) infection in piglets, *Vet Microbiol* (vol. 70), No. 3-4, pp. 171-7.
- Blusch, J. H.; Patience, C.; Takeuchi, Y.; Templin, C.; Roos, C.; Von Der Helm, K.; Steinhoff, G. and Martin, U. (2000): Infection of nonhuman primate cells by pig endogenous retrovirus, *J Virol* (vol. 74), No. 16, pp. 7687-90.
- Bolli, G. B.; Di Marchi, R. D.; Park, G. D.; Pramming, S. and Koivisto, V. A. (1999): Insulin analogues and their potential in the management of diabetes mellitus, *Diabetologia* (vol. 42), No. 10, pp. 1151-67.
- Bosch, S.; Arnould, C. and Jestin, A. (2000): Study of full-length porcine endogenous retrovirus genomes with envelope gene polymorphism in a specific-pathogen-free Large White swine herd, *J Virol* (vol. 74), No. 18, pp. 8575-81.
- Breese, S. S., Jr. (1970): Virus-like particles occurring in cultures of stable pig kidney cell lines. Brief report, *Arch Gesamte Virusforsch* (vol. 30), No. 4, pp. 401-4.
- Brenner, P.; Reichenspurner, H.; Schmoeckel, M.; Wimmer, C.; Rucker, A.; Eder, V.; Meiser, B.; Hinz, M.; Felbinger, T.; Hammer, C. and Reichart, B. (2000): Prevention of hyperacute xenograft rejection in orthotopic xenotransplantation of pig hearts into baboons using immunoabsorption of antibodies and complement factors, *Transpl Int* (vol. 13 Suppl 1), pp. S508-17.

- Brewer, L. A.; Lwamba, H. C.; Murtaugh, M. P.; Palmenberg, A. C.; Brown, C. and Njenga, M. K. (2001): Porcine encephalomyocarditis virus persists in pig myocardium and infects human myocardial cells, *J Virol* (vol. 75), No. 23, pp. 11621-9.
- Buhler, L.; Friedman, T.; Iacomini, J. and Cooper, D. K. (1999): Xenotransplantation--state of the art--update 1999, *Front Biosci* (vol. 4), pp. D416-32.
- Burns, D. P. and Temin, H. M. (1994): High rates of frameshift mutations within homooligomeric runs during a single cycle of retroviral replication, *J Virol* (vol. 68), No. 7, pp. 4196-203.
- Byrne, G. W.; McCurry, K. R.; Martin, M. J.; McClellan, S. M.; Platt, J. L. and Logan, J. S. (1997): Transgenic pigs expressing human CD59 and decay-accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement-mediated damage, *Transplantation* (vol. 63), No. 1, pp. 149-55.
- Byrne, G. W.; Schwarz, A.; Fesi, J. R.; Birch, P.; Nepomich, A.; Bakaj, I.; Velardo, M. A.; Jiang, C.; Manzi, A.; Dintzis, H.; Diamond, L. E. and Logan, J. S. (2002): Evaluation of different alpha-Galactosyl glycoconjugates for use in xenotransplantation, *Bioconjug Chem* (vol. 13), No. 3, pp. 571-81.
- CDC (1998): Fatal cercopithecine herpesvirus 1 (B virus) infection following a mucocutaneous exposure and interim recommendations for worker protection., *Morb. Mortal. Wkly Rep.* (vol. 47), pp. 1073-1076.
- Chapman, L. E. and Khabbaz, R. F. (1994): Etiology and epidemiology of the Four Corners hantavirus outbreak, *Infect Agents Dis* (vol. 3), No. 5, pp. 234-44.
- Chapman, L. E.; Folks, T. M.; Salomon, D. R.; Patterson, A. P.; Eggerman, T. E. and Noguchi, P. D. (1995): Xenotransplantation and xenogeneic infections., *N Engl J Med* (vol. 333), pp. 1498-501.
- Chikobaeva, M. G.; Schatzl, H.; Rose, D.; Bush, U.; Iakovleva, L. A.; Deinhardt, F.; Helm, K. and Lapin, B. A. (1993): [A new variant of the simian T-lymphotropic retrovirus type I (STLV-IF) in the Sukhumi colony of hamadryas baboons], *Vopr Virusol* (vol. 38), No. 6, pp. 249-53.
- Chmielewicz, B.; Goltz, M.; Franz, T.; Bauer, C.; Brema, S.; Ellerbrok, H.; Beckmann, S.; Rziha, H. J.; Lahrmann, K. H.; Romero, C. and Ehlers, B. (2003): A novel porcine gammaherpesvirus, *Virology* (vol. 308), No. 2, pp. 317-29.
- Clark, D. A.; Fryer, J. F.; Tucker, A. W.; McArdle, P. D.; Hughes, A. E.; Emery, V. C. and Griffiths, P. D. (2003): Porcine cytomegalovirus in pigs being bred for xenograft organs: progress towards control, *Xenotransplantation* (vol. 10), No. 2, pp. 142-8.

- Clarke, M. F.; Trainor, C. D.; Mann, D. L.; Gallo, R. C. and Reitz, M. S. (1984): Methylation of human T-cell leukemia virus proviral DNA and viral RNA expression in short- and long-term cultures of infected cells, *Virology* (vol. 135), No. 1, pp. 97-104.
- Clemenceau, B.; Lalain, S.; Martignat, L. and Sai, P. (1999): Porcine endogenous retroviral mRNAs in pancreas and a panel of tissues from specific pathogen-free pigs, *Diabetes Metab* (vol. 25), No. 6, pp. 518-25.
- Clemenceau, B.; Jegou, D.; Martignat, L. and Sai, P. (2001): Long-term follow-up failed to detect in vitro transmission of full-length porcine endogenous retroviruses from specific pathogen-free pig islets to human cells, *Diabetologia* (vol. 44), No. 11, pp. 2044-55.
- Clemenceau, B.; Jegou, D.; Martignat, L. and Sai, P. (2002): Microchimerism and transmission of porcine endogenous retrovirus from a pig cell line or specific pathogen-free pig islets to mouse tissues and human cells during xenografts in nude mice, *Diabetologia* (vol. 45), No. 6, pp. 914-23.
- Coffin, J.M. (1996): *Retroviridae and their replication.*, Fields, B.N. and et al, *Virology* pp. 1767-1848, Raven Press, New York.
- Coffin, J.M.; Hughes, S.H. and Varmus, H.E. (1997): *Retroviruses*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Plainview (NY).
- Cooper, D. K.; Gollackner, B.; Knosalla, C. and Teranishi, K. (2002): Xenotransplantation--how far have we come?, *Transpl Immunol* (vol. 9), No. 2-4, pp. 251-6.
- Costa, C.; Zhao, L.; Burton, W. V.; Rosas, C.; Bondioli, K. R.; Williams, B. L.; Hoagland, T. A.; Dalmaso, A. P. and Fodor, W. L. (2002): Transgenic pigs designed to express human CD59 and H-transferase to avoid humoral xenograft rejection, *Xenotransplantation* (vol. 9), No. 1, pp. 45-57.
- Cowan, S.; Hatzioannou, T.; Cunningham, T.; Muesing, M. A.; Gottlinger, H. G. and Bieniasz, P. D. (2002): Cellular inhibitors with Fv1-like activity restrict human and simian immunodeficiency virus tropism, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 99), No. 18, pp. 11914-9.
- Cozzi, E. and White, D. J. (1995): The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans, *Nat Med* (vol. 1), No. 9, pp. 964-6.
- Cozzi, E.; Bhatti, F.; Schmoeckel, M.; Chavez, G.; Smith, K. G.; Zaidi, A.; Bradley, J. R.; Thiru, S.; Goddard, M.; Vial, C.; Ostlie, D.; Wallwork, J.; White, D. J. and Friend, P. J. (2000): Long-term survival of nonhuman primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts, *Transplantation* (vol. 70), No. 1, pp. 15-21.

- Craighead, J. E.; Peralta, P. H.; Murnane, T. G. and Shelokov, A. (1963): Oral infection of swine with the encephalomyocarditis virus, *J Infect Dis* (vol. 112), pp. 205-12.
- Czauderna, F.; Fischer, N.; Boller, K.; Kurth, R. and Tonjes, R. R. (2000): Establishment and characterization of molecular clones of porcine endogenous retroviruses replicating on human cells, *J Virol* (vol. 74), No. 9, pp. 4028-38.
- Dalgard, D. W.; Hardy, R. J.; Pearson, S. L.; Pucak, G. J.; Quander, R. V.; Zack, P. M.; Peters, C. J. and Jahrling, P. B. (1992): Combined simian hemorrhagic fever and Ebola virus infection in cynomolgus monkeys, *Lab Anim Sci* (vol. 42), No. 2, pp. 152-7.
- Daniel, M. D.; Letvin, N. L.; Sehgal, P. K.; Hunsmann, G.; Schmidt, D. K.; King, N. W. and Desrosiers, R. C. (1987): Long-term persistent infection of macaque monkeys with the simian immunodeficiency virus, *J Gen Virol* (vol. 68 (Pt 12)), pp. 3183-9.
- Deng, Y. M.; Tuch, B. E. and Rawlinson, W. D. (2000): Transmission of porcine endogenous retroviruses in severe combined immunodeficient mice xenotransplanted with fetal porcine pancreatic cells, *Transplantation* (vol. 70), No. 7, pp. 1010-6.
- Denner, J. (2001): Xenotransplantation, Transspezies-Übertragung von Retroviren und AIDS., Arndt, D, Obe, G, Kleeberg, U, Biotechnologische Verfahren und Möglichkeiten in der Medizin. pp. 164-183, Urban & Vogel Medien und Medizin Verlagsgesellschaft, München.
- Denner, J.; Norley, S. and Kurth, R. (1994): The Immunosuppressive peptide of HIV-1: functional domains and immune response in AIDS patients., *AIDS* (vol. 8), pp. 1063-72.
- Denner, J.; Phelps, R. C.; Löwer, R and Kurth, R. (1995): Antibody response of pregnant women, tumor and AIDS patients against the human endogenous retrovirus HERV-K., *J Cancer Res Clin Oncol* (vol. 121), p. 5.
- Denner, J.; Specke, V.; Schwendemann, J. and Tacke, S. J. (2001): Porcine endogenous retroviruses (PERVs): adaptation to human cells and attempts to infect small animals and non-human primates, *Ann Transplant* (vol. 6), No. 3, pp. 25-33.
- Denner, J.; Specke, V.; Tacke, S.J. and Özel, M. (2002a): Porcine Endogenous Retroviruses (PERVs): Diagnostic Assays, Adaptation to Human Cells and Infection Experiments with Small Animals and Non-human Primates, Lison, AE, Transplantationsmedizin (vol. 14) pp. 171-183, Pabst Science Publishers, Lengerich (Germany).
- Denner, J.; Specke, V.; Tacke, S.J. and Boller, K. (2002b): Porcine endogene Retroviren (PERVs): Erste Tiermodelle, hochsensitive Diagnostika und immunsuppressive

- Eigenschaften, Lison, AE, *Transplantationsmedizin* (vol. 14) pp. 231-245, Pabst Science Publishers, Lengerich (Germany).
- Denner, J.; Specke, V.; Thiesen, U.; Karlas, A. and Kurth, R. (2003): Genetic alterations of the long terminal repeat of an ecotropic porcine endogenous retrovirus during passage in human cells, *Virology* (vol. 314), No. 1, pp. 125-33.
- Dinsmore, J. H.; Manhart, C.; Raineri, R.; Jacoby, D. B. and Moore, A. (2000): No evidence for infection of human cells with porcine endogenous retrovirus (PERV) after exposure to porcine fetal neuronal cells, *Transplantation* (vol. 70), No. 9, pp. 1382-9.
- Dooldeniya, M. D. and Warrens, A. N. (2003): Xenotransplantation: where are we today?, *J R Soc Med* (vol. 96), No. 3, pp. 111-7.
- Dorig, R. E.; Marcil, A.; Chopra, A. and Richardson, C. D. (1993): The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain), *Cell* (vol. 75), No. 2, pp. 295-305.
- Dorling, A. (2003): Are anti-endothelial cell antibodies a pre-requisite for the acute vascular rejection of xenografts?, *Xenotransplantation* (vol. 10), No. 1, pp. 16-23.
- Dougherty, J. P. and Temin, H. M. (1988): Determination of the rate of base-pair substitution and insertion mutations in retrovirus replication, *J Virol* (vol. 62), No. 8, pp. 2817-22.
- Drosten, C.; Gunther, S.; Preiser, W.; van der Werf, S.; Brodt, H. R.; Becker, S.; Rabenau, H.; Panning, M.; Kolesnikova, L.; Fouchier, R. A.; Berger, A.; Burguiere, A. M.; Cinatl, J.; Eickmann, M.; Escriou, N.; Grywna, K.; Kramme, S.; Manuguerra, J. C.; Muller, S.; Rickerts, V.; Sturmer, M.; Vieth, S.; Klenk, H. D.; Osterhaus, A. D.; Schmitz, H. and Doerr, H. W. (2003): Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome, *N Engl J Med* (vol. 348), No. 20, pp. 1967-76.
- Ehlers, B.; Ulrich, S. and Goltz, M. (1999): Detection of two novel porcine herpesviruses with high similarity to gammaherpesviruses, *J Gen Virol* (vol. 80 (Pt 4)), pp. 971-8.
- Elliott, R. B.; Escobar, L.; Garkavenko, O.; Croxson, M. C.; Schroeder, B. A.; McGregor, M.; Ferguson, G.; Beckman, N. and Ferguson, S. (2000): No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of encapsulated porcine islet xenografts, *Cell Transplant* (vol. 9), No. 6, pp. 895-901.
- Ellis, J. A.; Bratanich, A.; Clark, E. G.; Allan, G.; Meehan, B.; Haines, D. M.; Harding, J.; West, K. H.; Krakowka, S.; Konoby, C.; Hassard, L.; Martin, K. and McNeilly, F. (2000): Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome, *J Vet Diagn Invest* (vol. 12), No. 1, pp. 21-7.

- Ericsson, T. A.; Takeuchi, Y.; Templin, C.; Quinn, G.; Farhadian, S. F.; Wood, J. C.; Oldmixon, B. A.; Suling, K. M.; Ishii, J. K.; Kitagawa, Y.; Miyazawa, T.; Salomon, D. R.; Weiss, R. A. and Patience, C. (2003): Identification of receptors for pig endogenous retrovirus, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 100), No. 11, pp. 6759-64.
- Falcone, V.; Leupold, J.; Clotten, J.; Urbanyi, E.; Herchenroder, O.; Spatz, W.; Volk, B.; Bohm, N.; Toniolo, A.; Neumann-Haefelin, D. and Schweizer, M. (1999): Sites of simian foamy virus persistence in naturally infected African green monkeys: latent provirus is ubiquitous, whereas viral replication is restricted to the oral mucosa, *Virology* (vol. 257), No. 1, pp. 7-14.
- Fenaux, M.; Halbur, P. G.; Gill, M.; Toth, T. E. and Meng, X. J. (2000): Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2, *J Clin Microbiol* (vol. 38), No. 7, pp. 2494-503.
- Fiebig, U.; Stephan, O.; Kurth, R. and Denner, J. (2003): Neutralizing antibodies against conserved domains of p15E of porcine endogenous retroviruses: basis for a vaccine for xenotransplantation?, *Virology* (vol. 307), No. 2, pp. 406-13.
- Fishman, J. A. (1994): Miniature swine as organ donors for man: strategies for prevention of xenotransplant-associated infections, *Xenotransplantation* (vol. 1), pp. 47-49.
- Fryer, J. F.; Griffiths, P. D.; Fishman, J. A.; Emery, V. C. and Clark, D. A. (2001): Quantitation of porcine cytomegalovirus in pig tissues by PCR, *J Clin Microbiol* (vol. 39), No. 3, pp. 1155-6.
- Galbraith, D. N.; Kelly, H. T.; Dyke, A.; Reid, G.; Haworth, C.; Beekman, J.; Shepherd, A. and Smith, K. T. (2000): Design and validation of immunological tests for the detection of Porcine endogenous retrovirus in biological materials, *J Virol Methods* (vol. 90), No. 2, pp. 115-24.
- Galili, U. (2001): The alpha-gal epitope (Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc-R) in xenotransplantation, *Biochimie* (vol. 83), No. 7, pp. 557-63.
- Galili, U.; Anaraki, F.; Thall, A.; Hill-Black, C. and Radic, M. (1993): One percent of human circulating B lymphocytes are capable of producing the natural anti-Gal antibody, *Blood* (vol. 82), No. 8, pp. 2485-93.
- Gao, F.; Bailes, E.; Robertson, D. L.; Chen, Y.; Rodenburg, C. M.; Michael, S. F.; Cummins, L. B.; Arthur, L. O.; Peeters, M.; Shaw, G. M.; Sharp, P. M. and Hahn, B. H. (1999):

- Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*, *Nature* (vol. 397), No. 6718, pp. 436-41.
- Garkavenko, O.; Croxson, M. C.; Irgang, M.; Karlas, A.; Denner, J. and Elliott, R. B. (2004): Monitoring of potentially xenotic viruses in pig islet xenotransplantation, *J Clin Microbiol* (vol. Im Druck).
- Gaumann, A.; Laudes, M.; Jacob, B.; Pommersheim, R.; Laue, C.; Vogt, W. and Schrezenmeir, J. (2000): Effect of media composition on long-term in vitro stability of barium alginate and polyacrylic acid multilayer microcapsules, *Biomaterials* (vol. 21), No. 18, pp. 1911-7.
- Gerlach, J. C. (1997): Long-term liver cell cultures in bioreactors and possible application for liver support, *Cell Biol Toxicol* (vol. 13), No. 4-5, pp. 349-55.
- Gerlach, J. C.; Brombacher, J.; Kloppel, K.; Schnoy, N. and Neuhaus, P. (1994): Comparison of four methods for mass hepatocyte isolation from pig and human livers, *Transplantation* (vol. 57), pp. 1318-22.
- Gessain, A. and de The, G. (1996): Geographic and molecular epidemiology of primate T lymphotropic retroviruses: HTLV-I, HTLV-II, STLV-I, STLV-PP, and PTLV-L, *Adv Virus Res* (vol. 47), pp. 377-426.
- Gill, R. Q. and Sterling, R. K. (2001): Acute liver failure, *J Clin Gastroenterol* (vol. 33), No. 3, pp. 191-8.
- Gillis, S. and Smith, K. A. (1977): Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cells, *Nature* (vol. 268), No. 5616, pp. 154-6.
- Goff, S. P. (1996): Operating under a Gag order: a block against incoming virus by the Fv1 gene, *Cell* (vol. 86), No. 5, pp. 691-3.
- Goltz, M.; Widen, F.; Banks, M.; Belak, S. and Ehlers, B. (2000): Characterization of the DNA polymerase loci of porcine cytomegaloviruses from diverse geographic origins, *Virus Genes* (vol. 21), No. 3, pp. 249-55.
- Goltz, M.; Ericsson, T.; Patience, C.; Huang, C. A.; Noack, S.; Sachs, D. H. and Ehlers, B. (2002): Sequence analysis of the genome of porcine lymphotropic herpesvirus 1 and gene expression during posttransplant lymphoproliferative disease of pigs, *Virology* (vol. 294), No. 2, pp. 383-93.
- Gorbovitskaia, M.; Liu, Z.; Bourgeaux, N.; Li, N.; Lian, Z.; Chardon, P. and Rogel-Gaillard, C. (2003): Characterization of two porcine endogenous retrovirus integration loci and variability in pigs, *Immunogenetics* (vol. 55), No. 4, pp. 262-70.

- Gouvea, V. and Brantly, M. (1995): Is rotavirus a population of reassortants?, *Trends Microbiol* (vol. 3), No. 4, pp. 159-62.
- Graham, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C. and Nairn, R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5, *J Gen Virol* (vol. 36), No. 1, pp. 59-74.
- Grant, R. F.; Malinak, C. J.; Wu, H.; Sabo, A. and Tsai, C. C. (1995): PCR amplification and DNA sequencing of SRV-2 from archived tumor tissues, *Virus Res* (vol. 36), No. 2-3, pp. 187-200.
- Groth, C. G.; Korsgren, O.; Wennberg, L.; Song, Z.; Wu, G.; Reinholt, F. and Tibell, A. (1998): Pig-to-human islet transplantation, *Transplant Proc* (vol. 30), No. 7, pp. 3809-10.
- Groth, C. G.; Korsgren, O.; Tibell, A.; Tollemar, J.; Moller, E.; Bolinder, J.; Ostman, J.; Reinholt, F. P.; Hellerstrom, C. and Andersson, A. (1994): Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients, *Lancet* (vol. 344), No. 8934, pp. 1402-4.
- Halbur, P. G.; Kasorndorkbua, C.; Gilbert, C.; Guenette, D.; Potters, M. B.; Purcell, R. H.; Emerson, S. U.; Toth, T. E. and Meng, X. J. (2001): Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human, *J Clin Microbiol* (vol. 39), No. 3, pp. 918-23.
- Hammer, C. and Thein, E. (2002): Physiological aspects of xenotransplantation, 2001, *Xenotransplantation* (vol. 9), No. 5, pp. 303-5.
- Hanger, J. J.; Bromham, L. D.; McKee, J. J.; O'Brien, T. M. and Robinson, W. F. (2000): The nucleotide sequence of koala (*Phascolarctos cinereus*) retrovirus: a novel type C endogenous virus related to Gibbon ape leukemia virus, *J Virol* (vol. 74), No. 9, pp. 4264-72.
- Heneine, W.; Switzer, W. M.; Soucie, J. M.; Evatt, B. L.; Shanmugam, V.; Rosales, G. V.; Matthews, A.; Sandstrom, P. and Folks, T. M. (2001): Evidence of porcine endogenous retroviruses in porcine factor VIII and evaluation of transmission to recipients with hemophilia, *J Infect Dis* (vol. 183), No. 4, pp. 648-52.
- Heneine, W.; Tibell, A.; Switzer, W. M.; Sandstrom, P.; Rosales, G. V.; Matthews, A.; Korsgren, O.; Chapman, L. E.; Folks, T. M. and Groth, C. G. (1998a): No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts, *Lancet* (vol. 352), No. 9129, pp. 695-9.
- Heneine, W.; Switzer, W. M.; Sandstrom, P.; Brown, J.; Vedapuri, S.; Schable, C. A.; Khan, A. S.; Lerche, N. W.; Schweizer, M.; Neumann-Haefelin, D.; Chapman, L. E. and

- Folks, T. M. (1998b): Identification of a human population infected with simian foamy viruses, *Nat Med* (vol. 4), No. 4, pp. 403-7.
- Herring, C.; Cunningham, D. A.; Whittam, A. J.; Fernandez-Suarez, X. M. and Langford, G. A. (2001a): Monitoring xenotransplant recipients for infection by PERV, *Clin Biochem* (vol. 34), No. 1, pp. 23-7.
- Herring, C.; Quinn, G.; Bower, R.; Parsons, N.; Logan, N. A.; Brawley, A.; Elsome, K.; Whittam, A.; Fernandez-Suarez, X. M.; Cunningham, D.; Onions, D.; Langford, G. and Scobie, L. (2001b): Mapping full-length porcine endogenous retroviruses in a large white pig, *J Virol* (vol. 75), No. 24, pp. 12252-65.
- Hofmann, W.; Schubert, D.; LaBonte, J.; Munson, L.; Gibson, S.; Scammell, J.; Ferrigno, P. and Sodroski, J. (1999): Species-specific, postentry barriers to primate immunodeficiency virus infection, *J Virol* (vol. 73), No. 12, pp. 10020-8.
- Holmes, G. P.; Chapman, L. E.; Stewart, J. A.; Straus, S. E.; Hilliard, J. K. and Davenport, D. S. (1995): Guidelines for the prevention and treatment of B-virus infections in exposed persons. The B virus Working Group, *Clin Infect Dis* (vol. 20), No. 2, pp. 421-39.
- Huang, L. H.; Silberman, J.; Rothschild, H. and Cohen, J. C. (1989): Replication of baboon endogenous virus in human cells. Kinetics of DNA synthesis and integration, *J Biol Chem* (vol. 264), No. 15, pp. 8811-4.
- Hubbard, G. B.; Soike, K. F.; Butler, T. M.; Carey, K. D.; Davis, H.; Butcher, W. I. and Gauntt, C. J. (1992): An encephalomyocarditis virus epizootic in a baboon colony, *Lab Anim Sci* (vol. 42), No. 3, pp. 233-9.
- Hughes, S. H.; Toyoshima, K.; Bishop, J. M. and Varmus, H. E. (1981): Organization of the endogenous proviruses of chickens: implications for origin and expression, *Virology* (vol. 108), No. 1, pp. 189-207.
- Hull, R. N.; Cherry, W. R. and Tritch, O. J. (1962): Growth characteristics of monkey kidney cell strains LLC-MK1, LLC-MK2, and LLC-MK2(NCTC-3196) and their utility in virus research, *J Exp Med* (vol. 115), pp. 903-18.
- Irgang, M.; Sauer, I. M.; Karlas, A.; Zeilinger, K.; Gerlach, J. C.; Kurth, R.; Neuhaus, P. and Denner, J. (2003): Porcine endogenous retroviruses: no infection in patients treated with a bioreactor based on porcine liver cells, *J Clin Virol* (vol. 28), No. 2, pp. 141-54.
- Irgang, M.; Karlas, A.; Laue, C.; Specke, V.; Tacke, S.; Kurth, R.; Schrezenmeir, J. and Denner, J. (2004): Porcine endogenous retroviruses PERV-A and PERV-B infect neither mouse cells *in vitro* nor SCID mice *in vivo*, *Intervirology* (vol. Im Druck).

- Jainchill, J. L.; Aaronson, S. A. and Todaro, G. J. (1969): Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells, *J Virol* (vol. 4), No. 5, pp. 549-53.
- Jamieson, F. B.; Wang, E. E.; Bain, C.; Good, J.; Duckmanton, L. and Petric, M. (1998): Human torovirus: a new nosocomial gastrointestinal pathogen, *J Infect Dis* (vol. 178), No. 5, pp. 1263-9.
- Jin, H.; Inoshima, Y.; Wu, D.; Morooka, A. and Sentsui, H. (2000): Expression of porcine endogenous retrovirus in peripheral blood leukocytes from ten different breeds, *Transpl Infect Dis* (vol. 2), No. 1, pp. 11-4.
- Jones, P. A. and Takai, D. (2001): The role of DNA methylation in mammalian epigenetics, *Science* (vol. 293), No. 5532, pp. 1068-70.
- Joo, HS (1999): Encephalomyocarditis virus, Straw, BE, D'Allaire, S, Mengeling, WL, Taylor, DJ, *Diseases of swine* (vol. 8th Edition) pp. 139-144, Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Karlas, A.; Kurth, R. and Denner, J. (2004): Inhibition of porcine endogenous retroviruses by RNA interference: increasing the safety of xenotransplantation, *Virology* (vol. 325), No. 1, pp. 18-23.
- Kashmiri, S. V.; Mehdi, R.; Gupta, P. and Ferrer, J. F. (1985): Methylation and expression of bovine leukemia proviral DNA, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 129), No. 1, pp. 126-33.
- Kitamura, T.; Takano, M.; Hoshino, H.; Shimotohno, K.; Shimoyama, M.; Miwa, M.; Takaku, F. and Sugimura, T. (1985): Methylation pattern of human T-cell leukemia virus in vivo and in vitro: pX and LTR regions are hypomethylated in vivo, *Int J Cancer* (vol. 35), No. 5, pp. 629-35.
- Klymiuk, N.; Muller, M.; Brem, G. and Aigner, B. (2003): Recombination analysis of human-tropic porcine endogenous retroviruses, *J Gen Virol* (vol. 84), No. Pt 10, pp. 2729-34.
- Knowles, N. J.; Dickinson, N. D.; Wilsden, G.; Carra, E.; Brocchi, E. and De Simone, F. (1998): Molecular analysis of encephalomyocarditis viruses isolated from pigs and rodents in Italy, *Virus Res* (vol. 57), No. 1, pp. 53-62.
- Kobayashi, T.; Yokoyama, I.; Morozumi, K.; Nagasaka, T.; Hayashi, S.; Uchida, K.; Takagi, H. and Nakao, A. (2000): Comparative study of the efficacy of removal of anti-ABO and anti-gal antibodies by double filtration plasmapheresis, *Xenotransplantation* (vol. 7), No. 2, pp. 101-8.

- Koiwa, T.; Hamano-Usami, A.; Ishida, T.; Okayama, A.; Yamaguchi, K.; Kamihira, S. and Watanabe, T. (2002): 5'-long terminal repeat-selective CpG methylation of latent human T-cell leukemia virus type 1 provirus in vitro and in vivo, *J Virol* (vol. 76), No. 18, pp. 9389-97.
- Krach, U.; Fischer, N.; Czauderna, F. and Tonjes, R. R. (2001): Comparison of replication-competent molecular clones of porcine endogenous retrovirus class A and class B derived from pig and human cells, *J Virol* (vol. 75), No. 12, pp. 5465-72.
- Kroneman, A.; Cornelissen, L. A.; Horzinek, M. C.; de Groot, R. J. and Egberink, H. F. (1998): Identification and characterization of a porcine torovirus, *J Virol* (vol. 72), No. 5, pp. 3507-11.
- Ksiazek, T. G.; Erdman, D.; Goldsmith, C. S.; Zaki, S. R.; Peret, T.; Emery, S.; Tong, S.; Urbani, C.; Comer, J. A.; Lim, W.; Rollin, P. E.; Dowell, S. F.; Ling, A. E.; Humphrey, C. D.; Shieh, W. J.; Guarner, J.; Paddock, C. D.; Rota, P.; Fields, B.; DeRisi, J.; Yang, J. Y.; Cox, N.; Hughes, J. M.; LeDuc, J. W.; Bellini, W. J. and Anderson, L. J. (2003): A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome, *N Engl J Med* (vol. 348), No. 20, pp. 1953-66.
- Kuddus, R.; Patzer, J. F., 2nd; Lopez, R.; Mazariegos, G. V.; Meighen, B.; Kramer, D. J. and Rao, A. S. (2002): Clinical and laboratory evaluation of the safety of a bioartificial liver assist device for potential transmission of porcine endogenous retrovirus, *Transplantation* (vol. 73), No. 3, pp. 420-9.
- Kuiken, T.; Fouchier, R. A.; Schutten, M.; Rimmelzwaan, G. F.; van Amerongen, G.; van Riel, D.; Laman, J. D.; de Jong, T.; van Doornum, G.; Lim, W.; Ling, A. E.; Chan, P. K.; Tam, J. S.; Zambon, M. C.; Gopal, R.; Drosten, C.; van der Werf, S.; Escriou, N.; Manuguerra, J. C.; Stohr, K.; Peiris, J. S. and Osterhaus, A. D. (2003): Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome, *Lancet* (vol. 362), No. 9380, pp. 263-70.
- Kurth, R.; Teich, N. M.; Weiss, R. and Oliver, R. T. (1977): Natural human antibodies reactive with primate type-C viral antigens, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 74), No. 3, pp. 1237-41.
- Lai, L.; Kolber-Simonds, D.; Park, K. W.; Cheong, H. T.; Greenstein, J. L.; Im, G. S.; Samuel, M.; Bonk, A.; Rieke, A.; Day, B. N.; Murphy, C. N.; Carter, D. B.; Hawley, R. J. and Prather, R. S. (2002): Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning, *Science* (vol. 295), No. 5557, pp. 1089-92.

- Langford, G. A.; Cozzi, E.; Yannoutsos, N.; Lancaster, R.; Elsome, K.; Chen, P. and White, D. J. (1996): Production of pigs transgenic for human regulators of complement activation using YAC technology, *Transplant Proc* (vol. 28), No. 2, pp. 862-3.
- Langford, G. A.; Galbraith, D.; Whittam, A. J.; McEwan, P.; Fernandez-Suarez, X. M.; Black, J.; Shepherd, A. and Onions, D. (2001): In vivo analysis of porcine endogenous retrovirus expression in transgenic pigs, *Transplantation* (vol. 72), No. 12, pp. 1996-2000.
- Larsson, E.; Kato, N. and Cohen, M. (1989): Human endogenous proviruses, *Curr Top Microbiol Immunol* (vol. 148), pp. 115-32.
- Lavitrano, M.; Bacci, M. L.; Forni, M.; Lazzereschi, D.; Di Stefano, C.; Fioretti, D.; Giancotti, P.; Marfe, G.; Pucci, L.; Renzi, L.; Wang, H.; Stoppacciaro, A.; Stassi, G.; Sargiacomo, M.; Sinibaldi, P.; Turchi, V.; Giovannoni, R.; Della Casa, G.; Seren, E. and Rossi, G. (2002): Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 99), No. 22, pp. 14230-5.
- Le Tissier, P.; Stoye, J. P.; Takeuchi, Y.; Patience, C. and Weiss, R. A. (1997): Two sets of human-tropic pig retrovirus, *Nature* (vol. 389), No. 6652, pp. 681-2.
- Lee, J. H.; Webb, G. C.; Allen, R. D. and Moran, C. (2002): Characterizing and mapping porcine endogenous retroviruses in Westran pigs, *J Virol* (vol. 76), No. 11, pp. 5548-56.
- Lerche, N. W.; Marx, P. A.; Osborn, K. G.; Maul, D. H.; Lowenstine, L. J.; Bleviss, M. L.; Moody, P.; Henrickson, R. V. and Gardner, M. B. (1987): Natural history of endemic type D retrovirus infection and acquired immune deficiency syndrome in group-housed rhesus monkeys, *J Natl Cancer Inst* (vol. 79), No. 4, pp. 847-54.
- Levy, M. F.; Crippin, J.; Sutton, S.; Netto, G.; McCormack, J.; Curiel, T.; Goldstein, R. M.; Newman, J. T.; Gonwa, T. A.; Banchereau, J.; Diamond, L. E.; Byrne, G.; Logan, J. and Klintmalm, G. B. (2000): Liver allotransplantation after extracorporeal hepatic support with transgenic (hCD55/hCD59) porcine livers: clinical results and lack of pig-to-human transmission of the porcine endogenous retrovirus, *Transplantation* (vol. 69), No. 2, pp. 272-80.
- Lieber, M. M.; Benveniste, R. E.; Livingston, D. M. and Todaro, G. J. (1973): Mammalian cells in culture frequently release type C viruses, *Science* (vol. 182), No. 107, pp. 56-9.

- Lilly, F. (1970): Fv-2: identification and location of a second gene governing the spleen focus response to Friend leukemia virus in mice, *J Natl Cancer Inst* (vol. 45), No. 1, pp. 163-9.
- Lindeborg, E.; Kumagai-Braesch, M.; Tibell, A. and Moller, E. (2001): Continued production of xenimmune antibodies 6-8 years after clinical transplantation of fetal pig islet-like cell-clusters, *Xenotransplantation* (vol. 8), No. 4, pp. 273-83.
- Logan, J. S. (2000): Prospects for xenotransplantation, *Curr Opin Immunol* (vol. 12), No. 5, pp. 563-8.
- Loss, M.; Arends, H.; Winkler, M.; Przemec, M.; Steinhoff, G.; Rensing, S.; Kaup, F. J.; Hedrich, H. J.; Winkler, M. E. and Martin, U. (2001): Analysis of potential porcine endogenous retrovirus (PERV) transmission in a whole-organ xenotransplantation model without interfering microchimerism, *Transpl Int* (vol. 14), No. 1, pp. 31-7.
- Lower, R.; Boller, K.; Hasenmaier, B.; Korbmacher, C.; Muller-Lantzsch, N.; Lower, J. and Kurth, R. (1993): Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 90), No. 10, pp. 4480-4.
- Lucchiari, N.; Azimzadeh, A.; Wolf, P.; Regnault, V. and Cinqualbre, J. (1997): In vivo and in vitro optimization of depletion of IgM and IgG xenoantibodies by immunoadsorption using cell membrane proteins, *Artif Organs* (vol. 21), No. 4, pp. 278-86.
- Luciw, P.A. and Leung, N.J. (1992): Mechanisms of retrovirus replication., Levy, JA, *The retroviridae* pp. 159-298, Plenum Press, New York.
- Malchesky, P. S. (2004): Artificial organs 2003: a year in review, *Artif Organs* (vol. 28), No. 4, pp. 410-24.
- Mankertz, A.; Persson, F.; Mankertz, J.; Blaess, G. and Buhk, H. J. (1997): Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus, *J Virol* (vol. 71), No. 3, pp. 2562-6.
- Mankertz, A.; Domingo, M.; Folch, J. M.; LeCann, P.; Jestin, A.; Segales, J.; Chmielewicz, B.; Plana-Duran, J. and Soike, D. (2000): Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France, *Virus Res* (vol. 66), No. 1, pp. 65-77.
- Manns, A.; Hisada, M. and La Grenade, L. (1999): Human T-lymphotropic virus type I infection, *Lancet* (vol. 353), No. 9168, pp. 1951-8.
- Mantovani, R. (1999): The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y, *Gene* (vol. 239), No. 1, pp. 15-27.

- Martin, U.; Kiessig, V.; Blusch, J. H.; Haverich, A.; von der Helm, K.; Herden, T. and Steinhoff, G. (1998a): Expression of pig endogenous retrovirus by primary porcine endothelial cells and infection of human cells, *Lancet* (vol. 352), No. 9129, pp. 692-4.
- Martin, U.; Steinhoff, G.; Kiessig, V.; Chikobava, M.; Anssar, M.; Morschheuser, T.; Lapin, B. and Haverich, A. (1998b): Porcine endogenous retrovirus (PERV) was not transmitted from transplanted porcine endothelial cells to baboons in vivo, *Transpl Int* (vol. 11), No. 4, pp. 247-51.
- Martin, U.; Tacke, S. J.; Simon, A. R.; Schroder, C.; Wiebe, K.; Lapin, B.; Haverich, A.; Denner, J. and Steinhoff, G. (2002): Absence of PERV specific humoral immune response in baboons after transplantation of porcine cells or organs, *Transpl Int* (vol. 15), No. 7, pp. 361-8.
- Matthews, P. J. (2001): Zoonotic agents in swine-to-human xenotransplants, Platt, J. L., *Xenotransplantation* pp. 217-238, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Mazariegos, G. V.; Kramer, D. J.; Lopez, R. C.; Shakil, A. O.; Rosenbloom, A. J.; DeVera, M.; Giraldo, M.; Grogan, T. A.; Zhu, Y.; Fulmer, M. L.; Amiot, B. P. and Patzer, J. F. (2001): Safety observations in phase I clinical evaluation of the Excorp Medical Bioartificial Liver Support System after the first four patients, *Asaio J* (vol. 47), No. 5, pp. 471-5.
- McIntyre, M. C.; Kannan, B.; Solano-Aguilar, G. I.; Wilson, C. A. and Bloom, E. T. (2003): Detection of porcine endogenous retrovirus in cultures of freshly isolated porcine bone marrow cells, *Xenotransplantation* (vol. 10), No. 4, pp. 337-42.
- Meng, X. J.; Halbur, P. G.; Shapiro, M. S.; Govindarajan, S.; Bruna, J. D.; Mushahwar, I. K.; Purcell, R. H. and Emerson, S. U. (1998): Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus, *J Virol* (vol. 72), No. 12, pp. 9714-21.
- Meng, X. J.; Purcell, R. H.; Halbur, P. G.; Lehman, J. R.; Webb, D. M.; Tsareva, T. S.; Haynes, J. S.; Thacker, B. J. and Emerson, S. U. (1997): A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 94), No. 18, pp. 9860-5.
- Meyer, C.; Hering, B. J.; Grossmann, R.; Brandhorst, H.; Brandhorst, D.; Gerich, J.; Federlin, K. and Bretzel, R. G. (1998): Improved glucose counterregulation and autonomic symptoms after intraportal islet transplants alone in patients with long-standing type I diabetes mellitus, *Transplantation* (vol. 66), No. 2, pp. 233-40.

- Michaels, M. G. (2001): Xenotransplantation as a vector for infection, Platt, J. L., Xenotransplantation pp. 193-206, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Miller, A. D.; Bonham, L.; Alfano, J.; Kiem, H. P.; Reynolds, T. and Wolgamot, G. (1996): A novel murine retrovirus identified during testing for helper virus in human gene transfer trials, *J Virol* (vol. 70), No. 3, pp. 1804-9.
- Modrow, S.; Falke, D. and Truyen, U. (2003): Retroviren, *Molekulare Virologie* (vol. 2. Auflage) pp. 390-448, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.
- Mollnes, T. E. and Fiane, A. E. (2003): Perspectives on complement in xenotransplantation, *Mol Immunol* (vol. 40), No. 2-4, pp. 135-43.
- Mone, J.; Whitehead, E.; Leland, M.; Hubbard, G. and Allan, J. S. (1992): Simian T-cell leukemia virus type I infection in captive baboons, *AIDS Res Hum Retroviruses* (vol. 8), No. 9, pp. 1653-61.
- Morsiani, E.; Pazzi, P.; Puviani, A. C.; Brogli, M.; Valieri, L.; Gorini, P.; Scoletta, P.; Marangoni, E.; Ragazzi, R.; Azzena, G.; Frazzoli, E.; Di Luca, D.; Cassai, E.; Lombardi, G.; Cavallari, A.; Faenza, S.; Pasetto, A.; Girardis, M.; Jovine, E. and Pinna, A. D. (2002): Early experiences with a porcine hepatocyte-based bioartificial liver in acute hepatic failure patients, *Int J Artif Organs* (vol. 25), No. 3, pp. 192-202.
- Moza, A. K.; Mertsching, H.; Herden, T.; Bader, A. and Haverich, A. (2001): Heart valves from pigs and the porcine endogenous retrovirus: experimental and clinical data to assess the probability of porcine endogenous retrovirus infection in human subjects, *J Thorac Cardiovasc Surg* (vol. 121), No. 4, pp. 697-701.
- Mueller, N. J.; Barth, R. N.; Yamamoto, S.; Kitamura, H.; Patience, C.; Yamada, K.; Cooper, D. K.; Sachs, D. H.; Kaur, A. and Fishman, J. A. (2002): Activation of cytomegalovirus in pig-to-primate organ xenotransplantation, *J Virol* (vol. 76), No. 10, pp. 4734-40.
- Munk, C.; Brandt, S. M.; Lucero, G. and Landau, N. R. (2002): A dominant block to HIV-1 replication at reverse transcription in simian cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 99), No. 21, pp. 13843-8.
- Newgard, C. B.; Clark, S.; BeltrandelRio, H.; Hohmeier, H. E.; Quaade, C. and Normington, K. (1997): Engineered cell lines for insulin replacement in diabetes: current status and future prospects, *Diabetologia* (vol. 40 Suppl 2), pp. S42-7.
- Nuffield Council on Bioethics (1996): Animal-to-human transplants: the ethics of xenotransplantation., Nuffield Council on Bioethics, London, United Kingdom

- Nyberg, S. L.; Hibbs, J. R.; Hardin, J. A.; Germer, J. J. and Persing, D. H. (1999): Transfer of porcine endogenous retrovirus across hollow fiber membranes: significance to a bioartificial liver, *Transplantation* (vol. 67), No. 9, pp. 1251-5.
- Oberholzer, J.; Triponez, F.; Mage, R.; Anderegg, E.; Buhler, L.; Cretin, N.; Fournier, B.; Goumaz, C.; Lou, J.; Philippe, J. and Morel, P. (2000): Human islet transplantation: lessons from 13 autologous and 13 allogeneic transplantations, *Transplantation* (vol. 69), No. 6, pp. 1115-23.
- O'Connell, P. (2002): Pancreatic islet xenotransplantation, *Xenotransplantation* (vol. 9), No. 6, pp. 367-71.
- Ogawa, H.; Kobayashi, T.; Yokoyama, I.; Nagatani, N.; Mizuno, M.; Yoshida, J.; Kadomatsu, K.; Muramatsu, H.; Nakao, A. and Muramatsu, T. (2002): Reduction of alpha-galactosyl xenoantigen by expression of endo-beta-galactosidase C in pig endothelial cells, *Xenotransplantation* (vol. 9), No. 4, pp. 290-6.
- Ogawa, Y.; Sagata, N.; Tsuzuku-Kawamura, J.; Onuma, M.; Izawa, H. and Ikawa, Y. (1985): Methylation pattern of the bovine leukemia provirus genome in bovine leukemic cells, *Jpn J Cancer Res* (vol. 76), No. 1, pp. 5-8.
- Oldmixon, B. A.; Wood, J. C.; Ericsson, T. A.; Wilson, C. A.; White-Scharf, M. E.; Andersson, G.; Greenstein, J. L.; Schuurman, H. J. and Patience, C. (2002): Porcine endogenous retrovirus transmission characteristics of an inbred herd of miniature swine, *J Virol* (vol. 76), No. 6, pp. 3045-8.
- Onion, D. and et al (2000): Xenotransplantation Subcommittee: Report of the Food and Drug Administration Subcommittee on Xenotransplantation: meeting of 13 January 2000, Center for Biologics and Evaluation and Research, *Xenotransplantation* (vol. 7), pp. 75-79.
- O'Rourke, L. G. (2000): Xenotransplantation, Brown, C. and Bolin, C., *Emerging diseases of animals* pp. 59-84, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Osman, N.; McKenzie, I. F.; Ostenried, K.; Ioannou, Y. A.; Desnick, R. J. and Sandrin, M. S. (1997): Combined transgenic expression of alpha-galactosidase and alpha1,2-fucosyltransferase leads to optimal reduction in the major xenoepitope Galalpha(1,3)Gal, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 94), No. 26, pp. 14677-82.
- Paradis, K.; Langford, G.; Long, Z.; Heneine, W.; Sandstrom, P.; Switzer, W. M.; Chapman, L. E.; Lockey, C.; Onions, D. and Otto, E. (1999): Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group, *Science* (vol. 285), No. 5431, pp. 1236-41.

- Parker, W.; Bruno, D.; Holzkecht, Z. E. and Platt, J. L. (1994): Characterization and affinity isolation of xenoreactive human natural antibodies, *J Immunol* (vol. 153), No. 8, pp. 3791-803.
- Patience, C.; Takeuchi, Y. and Weiss, R. A. (1997): Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs, *Nat Med* (vol. 3), No. 3, pp. 282-6.
- Patience, C.; Patton, G. S.; Takeuchi, Y.; Weiss, R. A.; McClure, M. O.; Rydberg, L. and Breimer, M. E. (1998): No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys, *Lancet* (vol. 352), No. 9129, pp. 699-701.
- Patience, C.; Switzer, W. M.; Takeuchi, Y.; Griffiths, D. J.; Goward, M. E.; Heneine, W.; Stoye, J. P. and Weiss, R. A. (2001): Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species, *J Virol* (vol. 75), No. 6, pp. 2771-5.
- Paton, N. I.; Leo, Y. S.; Zaki, S. R.; Auchus, A. P.; Lee, K. E.; Ling, A. E.; Chew, S. K.; Ang, B.; Rollin, P. E.; Umaphathi, T.; Sng, I.; Lee, C. C.; Lim, E. and Ksiazek, T. G. (1999): Outbreak of Nipah-virus infection among abattoir workers in Singapore, *Lancet* (vol. 354), No. 9186, pp. 1253-6.
- Paul, P. S.; Halbur, P.; Janke, B.; Joo, H.; Nawagitgul, P.; Singh, J. and Sorden, S. (2003): Exogenous porcine viruses, *Curr Top Microbiol Immunol* (vol. 278), pp. 125-83.
- Phelps, C. J.; Koike, C.; Vaught, T. D.; Boone, J.; Wells, K. D.; Chen, S. H.; Ball, S.; Specht, S. M.; Polejaeva, I. A.; Monahan, J. A.; Jobst, P. M.; Sharma, S. B.; Lamborn, A. E.; Garst, A. S.; Moore, M.; Demetris, A. J.; Rudert, W. A.; Bottino, R.; Bertera, S.; Trucco, M.; Starzl, T. E.; Dai, Y. and Ayares, D. L. (2003): Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs, *Science* (vol. 299), No. 5605, pp. 411-4.
- Pincus, T.; Hartley, J. W. and Rowe, W. P. (1971): A major genetic locus affecting resistance to infection with murine leukemia viruses. I. Tissue culture studies of naturally occurring viruses, *J Exp Med* (vol. 133), No. 6, pp. 1219-33.
- Pion, M.; Jordan, A.; Biancotto, A.; Dequiedt, F.; Gondois-Rey, F.; Rondeau, S.; Vigne, R.; Hejnar, J.; Verdin, E. and Hirsch, I. (2003): Transcriptional suppression of in vitro-integrated human immunodeficiency virus type 1 does not correlate with proviral DNA methylation, *J Virol* (vol. 77), No. 7, pp. 4025-32.
- Pirtle, E. C. and Woods, L. K. (1968): Cytogenetic alterations in swine kidney cells persistently infected with hog cholera virus and propagated with and without antiserum in the medium, *Am J Vet Res* (vol. 29), No. 1, pp. 153-64.

- Pitkin, Z. and Mullon, C. (1999): Evidence of absence of porcine endogenous retrovirus (PERV) infection in patients treated with a bioartificial liver support system, *Artif Organs* (vol. 23), No. 9, pp. 829-33.
- Powell, S. K.; Gates, M. E.; Langford, G.; Gu, M. L.; Lockey, C.; Long, Z. and Otto, E. (2000): Antiretroviral agents inhibit infection of human cells by porcine endogenous retroviruses, *Antimicrob Agents Chemother* (vol. 44), No. 12, pp. 3432-3.
- Pryciak, P. M. and Varmus, H. E. (1992): Fv-1 restriction and its effects on murine leukemia virus integration in vivo and in vitro, *J Virol* (vol. 66), No. 10, pp. 5959-66.
- Qari, S. H.; Magre, S.; Garcia-Lerma, J. G.; Hussain, A. I.; Takeuchi, Y.; Patience, C.; Weiss, R. A. and Heneine, W. (2001): Susceptibility of the porcine endogenous retrovirus to reverse transcriptase and protease inhibitors, *J Virol* (vol. 75), No. 2, pp. 1048-53.
- Ramiya, V. K.; Maraist, M.; Arfors, K. E.; Schatz, D. A.; Peck, A. B. and Cornelius, J. G. (2000): Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells, *Nat Med* (vol. 6), No. 3, pp. 278-82.
- Ramsoondar, J. J.; Machaty, Z.; Costa, C.; Williams, B. L.; Fodor, W. L. and Bondioli, K. R. (2003): Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-knockout cloned pigs expressing human alpha 1,2-fucosyltransferase, *Biol Reprod* (vol. 69), No. 2, pp. 437-45.
- Reddacliff, L. A.; Kirkland, P. D.; Hartley, W. J. and Reece, R. L. (1997): Encephalomyocarditis virus infections in an Australian zoo, *J Zoo Wildl Med* (vol. 28), No. 2, pp. 153-7.
- Riordan, S. M. and Williams, R. (1999): Extracorporeal support and hepatocyte transplantation in acute liver failure and cirrhosis, *J Gastroenterol Hepatol* (vol. 14), No. 8, pp. 757-70.
- Ritzhaupt, A.; Van Der Laan, L. J.; Salomon, D. R. and Wilson, C. A. (2002): Porcine endogenous retrovirus infects but does not replicate in nonhuman primate primary cells and cell lines, *J Virol* (vol. 76), No. 22, pp. 11312-20.
- Rother, R. P.; Fodor, W. L.; Springhorn, J. P.; Birks, C. W.; Setter, E.; Sandrin, M. S.; Squinto, S. P. and Rollins, S. A. (1995): A novel mechanism of retrovirus inactivation in human serum mediated by anti-alpha-galactosyl natural antibody, *J Exp Med* (vol. 182), No. 5, pp. 1345-55.
- Rupasinghe, V.; Iwatsuki-Horimoto, K.; Sugii, S. and Horimoto, T. (2001): Identification of the porcine cytomegalovirus major capsid protein gene, *J Vet Med Sci* (vol. 63), No. 6, pp. 609-18.

- Sachs, D. H. (1994): The pig as a potential xenograft donor, *Vet Immunol Immunopathol* (vol. 43), No. 1-3, pp. 185-91.
- Sachs, D. H.; Sykes, M.; Robson, S. C. and Cooper, D. K. (2001): Xenotransplantation, *Adv Immunol* (vol. 79), pp. 129-223.
- Santos, N.; Lima, R. C.; Nozawa, C. M.; Linhares, R. E. and Gouvea, V. (1999): Detection of porcine rotavirus type G9 and of a mixture of types G1 and G5 associated with Wa-like VP4 specificity: evidence for natural human-porcine genetic reassortment, *J Clin Microbiol* (vol. 37), No. 8, pp. 2734-6.
- Sauer, I. M.; Kardassis, D.; Zeillinger, K.; Pascher, A.; Gruenwald, A.; Pless, G.; Irgang, M.; Kraemer, M.; Puhl, G.; Frank, J.; Muller, A. R.; Steinmuller, T.; Denner, J.; Neuhaus, P. and Gerlach, J. C. (2003): Clinical extracorporeal hybrid liver support--phase I study with primary porcine liver cells, *Xenotransplantation* (vol. 10), No. 5, pp. 460-9.
- Sayre, K. R.; Dodd, R. Y.; Tegtmeier, G.; Layug, L.; Alexander, S. S. and Busch, M. P. (1996): False-positive human immunodeficiency virus type 1 western blot tests in noninfected blood donors, *Transfusion* (vol. 36), No. 1, pp. 45-52.
- Scheef, G.; Fischer, N.; Krach, U. and Tonjes, R. R. (2001): The number of a U3 repeat box acting as an enhancer in long terminal repeats of polytropic replication-competent porcine endogenous retroviruses dynamically fluctuates during serial virus passages in human cells, *J Virol* (vol. 75), No. 15, pp. 6933-40.
- Scheef, G.; Fischer, N.; Flory, E.; Schmitt, I. and Tonjes, R. R. (2002): Transcriptional regulation of porcine endogenous retroviruses released from porcine and infected human cells by heterotrimeric protein complex NF-Y and impact of immunosuppressive drugs, *J Virol* (vol. 76), No. 24, pp. 12553-63.
- Schmoeckel, M.; Bhatti, F. N.; Zaidi, A.; Cozzi, E.; Waterworth, P. D.; Tolan, M. J.; Pino-Chavez, G.; Goddard, M.; Warner, R. G.; Langford, G. A.; Dunning, J. J.; Wallwork, J. and White, D. J. (1998): Orthotopic heart transplantation in a transgenic pig-to-primate model, *Transplantation* (vol. 65), No. 12, pp. 1570-7.
- Schumacher, J. M.; Ellias, S. A.; Palmer, E. P.; Kott, H. S.; Dinsmore, J.; Dempsey, P. K.; Fischman, A. J.; Thomas, C.; Feldman, R. G.; Kassissieh, S.; Raineri, R.; Manhart, C.; Penney, D.; Fink, J. S. and Isacson, O. (2000): Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD, *Neurology* (vol. 54), No. 5, pp. 1042-50.
- Schuurman, H. J.; Pino-Chavez, G.; Phillips, M. J.; Thomas, L.; White, D. J. and Cozzi, E. (2002): Incidence of hyperacute rejection in pig-to-primate transplantation using organs from hDAF-transgenic donors, *Transplantation* (vol. 73), No. 7, pp. 1146-51.

- Schweizer, M.; Falcone, V.; Gange, J.; Turek, R. and Neumann-Haefelin, D. (1997): Simian foamy virus isolated from an accidentally infected human individual, *J Virol* (vol. 71), No. 6, pp. 4821-4.
- Scobie, L.; Taylor, S.; Wood, J. C.; Suling, K. M.; Quinn, G.; Meikle, S.; Patience, C.; Schuurman, H. J. and Onions, D. E. (2004): Absence of replication-competent human-tropic porcine endogenous retroviruses in the germ line DNA of inbred miniature Swine, *J Virol* (vol. 78), No. 5, pp. 2502-9.
- Sepp, A.; Farrar, C. A.; Dorling, T.; Cairns, T.; George, A. J. and Lechler, R. I. (1999): Inhibition of expression of the Gal α 1-3Gal epitope on porcine cells using an intracellular single-chain antibody directed against α 1,3galactosyltransferase, *J Immunol Methods* (vol. 231), No. 1-2, pp. 191-205.
- Shafren, D. R.; Bates, R. C.; Agrez, M. V.; Herd, R. L.; Burns, G. F. and Barry, R. D. (1995): Coxsackieviruses B1, B3, and B5 use decay accelerating factor as a receptor for cell attachment, *J Virol* (vol. 69), No. 6, pp. 3873-7.
- Shapiro, A. M.; Lakey, J. R.; Ryan, E. A.; Korbitt, G. S.; Toth, E.; Warnock, G. L.; Kneteman, N. M. and Rajotte, R. V. (2000): Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen, *N Engl J Med* (vol. 343), No. 4, pp. 230-8.
- Sharma, A.; Okabe, J.; Birch, P.; McClellan, S. B.; Martin, M. J.; Platt, J. L. and Logan, J. S. (1996): Reduction in the level of Gal(α 1,3)Gal in transgenic mice and pigs by the expression of an α (1,2)fucosyltransferase, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 93), No. 14, pp. 7190-5.
- Shirali, G. S.; Ni, J.; Chinnock, R. E.; Johnston, J. K.; Rosenthal, G. L.; Bowles, N. E. and Towbin, J. A. (2001): Association of viral genome with graft loss in children after cardiac transplantation, *N Engl J Med* (vol. 344), No. 20, pp. 1498-503.
- Smit, A. F. (1999): Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes, *Curr Opin Genet Dev* (vol. 9), No. 6, pp. 657-63.
- Smith, C. E.; Simpson, D. I.; Bowen, E. T. and Zlotnik, I. (1967): Fatal human disease from vervet monkeys, *Lancet* (vol. 2), No. 7526, pp. 1119-21.
- Soin, B.; Smith, K. G.; Zaidi, A.; Cozzi, E.; Bradley, J. R.; Ostlie, D. J.; Lockhart, A.; White, D. J. and Friend, P. J. (2001): Physiological aspects of pig-to-primate renal xenotransplantation, *Kidney Int* (vol. 60), No. 4, pp. 1592-7.
- Sorden, S. D.; Harms, P. A.; Nawagitgul, P.; Cavanaugh, D. and Paul, P. S. (1999): Development of a polyclonal-antibody-based immunohistochemical method for the

- detection of type 2 porcine circovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, *J Vet Diagn Invest* (vol. 11), No. 6, pp. 528-30.
- Specke, V.; Rubant, S. and Denner, J. (2001a): Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses, *Virology* (vol. 285), No. 2, pp. 177-80.
- Specke, V.; Tacke, S. J.; Boller, K.; Schwendemann, J. and Denner, J. (2001b): Porcine endogenous retroviruses: in vitro host range and attempts to establish small animal models, *J Gen Virol* (vol. 82), No. Pt 4, pp. 837-44.
- Specke, V.; Plesker, R.; Coulibaly, C.; Boller, K. and Denner, J. (2002a): Productive infection of a mink cell line with porcine endogenous retroviruses (PERVs) but lack of transmission to minks in vivo, *Arch Virol* (vol. 147), No. 2, pp. 305-19.
- Specke, V.; Schuurman, H. J.; Plesker, R.; Coulibaly, C.; Ozel, M.; Langford, G.; Kurth, R. and Denner, J. (2002b): Virus safety in xenotransplantation: first exploratory in vivo studies in small laboratory animals and non-human primates, *Transpl Immunol* (vol. 9), No. 2-4, pp. 281-8.
- Stephan, O.; Schwendemann, J.; Specke, V.; Tacke, S. J.; Boller, K. and Denner, J. (2001): Porcine endogenous retroviruses (PERVs): generation of specific antibodies, development of an immunoperoxidase assay (IPA) and inhibition by AZT, *Xenotransplantation* (vol. 8), No. 4, pp. 310-6.
- Storck, M.; Abendroth, D.; Prestel, R.; Pino-Chavez, G.; Muller-Hoker, J.; White, D. J. and Hammer, C. (1997): Morphology of hDAF (CD55) transgenic pig kidneys following ex-vivo hemoperfusion with human blood, *Transplantation* (vol. 63), No. 2, pp. 304-10.
- Stremlau, M.; Owens, C. M.; Perron, M. J.; Kiessling, M.; Autissier, P. and Sodroski, J. (2004): The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys, *Nature* (vol. 427), No. 6977, pp. 848-53.
- Suzuka, I.; Sekiguchi, K. and Kodama, M. (1985): Some characteristics of a porcine retrovirus from a cell line derived from swine malignant lymphomas, *FEBS Lett* (vol. 183), No. 1, pp. 124-8.
- Suzuka, I.; Shimizu, N.; Sekiguchi, K.; Hoshino, H.; Kodama, M. and Shimotohno, K. (1986): Molecular cloning of unintegrated closed circular DNA of porcine retrovirus, *FEBS Lett* (vol. 198), No. 2, pp. 339-43.

- Swanstrom, R. and Vogt, P.K. (1990): Retroviruses: Strategies of replication., Swanstrom, R, Vogt, PK, Current Topics in Microbiology and Immunology (vol. 157), Springer-Verlag, Heidelberg.
- Switzer, W. M.; Shanmugam, V.; Chapman, L. E. and 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 (vol. 68), p. 183.
- Switzer, W. M.; Michler, R. E.; Shanmugam, V.; Matthews, A.; Hussain, A. I.; Wright, A.; Sandstrom, P.; Chapman, L. E.; Weber, C.; Safley, S.; Denny, R. R.; Navarro, A.; Evans, V.; Norin, A. J.; Kwiatkowski, P. and Heneine, W. (2001): Lack of cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus infection to nonhuman primate recipients of porcine cells, tissues, or organs, Transplantation (vol. 71), No. 7, pp. 959-65.
- Tacke, S. J.; Kurth, R. and Denner, J. (2000): Porcine endogenous retroviruses inhibit human immune cell function: risk for xenotransplantation?, Virology (vol. 268), No. 1, pp. 87-93.
- Tacke, S. J.; Specke, V. and Denner, J. (2003): Differences in release and determination of subtype of porcine endogenous retroviruses produced by stimulated normal pig blood cells, Intervirology (vol. 46), No. 1, pp. 17-24.
- Tacke, S. J.; Bodusch, K.; Berg, A. and Denner, J. (2001): Sensitive and specific immunological detection methods for porcine endogenous retroviruses applicable to experimental and clinical xenotransplantation, Xenotransplantation (vol. 8), No. 2, pp. 125-35.
- Tajima, S.; Takahashi, M.; Takeshima, S. N.; Konnai, S.; Yin, S. A.; Watarai, S.; Tanaka, Y.; Onuma, M.; Okada, K. and Aida, Y. (2003): A mutant form of the tax protein of bovine leukemia virus (BLV), with enhanced transactivation activity, increases expression and propagation of BLV in vitro but not in vivo, J Virol (vol. 77), No. 3, pp. 1894-903.
- Takahashi, M.; Ishikura, H.; Takahashi, C.; Nakajima, Y.; Matsushita, M.; Matsue, H.; Sato, K.; Noto, H.; Taguchi, K. and et al. (1993): Immunologic considerations in the use of cultured porcine hepatocytes as a hybrid artificial liver. Anti-porcine hepatocyte human serum, Asaio J (vol. 39), No. 3, pp. M242-6.

- Takefman, D. M.; Spear, G. T.; Saifuddin, M. and Wilson, C. A. (2002): Human CD59 incorporation into porcine endogenous retrovirus particles: implications for the use of transgenic pigs for xenotransplantation, *J Virol* (vol. 76), No. 4, pp. 1999-2002.
- Takeuchi, Y.; Patience, C.; Magre, S.; Weiss, R. A.; Banerjee, P. T.; Le Tissier, P. and Stoye, J. P. (1998): Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus, *J Virol* (vol. 72), No. 12, pp. 9986-91.
- Takeuchi, Y.; Porter, C. D.; Strahan, K. M.; Preece, A. F.; Gustafsson, K.; Cosset, F. L.; Weiss, R. A. and Collins, M. K. (1996): Sensitization of cells and retroviruses to human serum by (alpha 1-3) galactosyltransferase, *Nature* (vol. 379), No. 6560, pp. 85-8.
- Tanczos, E.; Horch, R. E.; Bannasch, H.; Andree, C.; Walgenbach, K. J.; Voigt, M. and Stark, G. B. (1999): [Keratinocyte transplantation and tissue engineering. New approaches in treatment of chronic wounds], *Zentralbl Chir* (vol. 124 Suppl 1), pp. 81-6.
- Tanemura, M.; Ogawa, H.; Yin, D. P.; Chen, Z. C.; DiSesa, V. J. and Galili, U. (2002): Elimination of anti-Gal B cells by alpha-Gal ricin1, *Transplantation* (vol. 73), No. 12, pp. 1859-68.
- Taubenberger, J. K.; Reid, A. H.; Krafft, A. E.; Bijwaard, K. E. and Fanning, T. G. (1997): Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus, *Science* (vol. 275), No. 5307, pp. 1793-6.
- Todaro, G. J. and Green, H. (1963): Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines, *J Cell Biol* (vol. 17), pp. 299-313.
- Todaro, G. J.; Benveniste, R. E.; Lieber, M. M. and Sherr, C. J. (1974a): Characterization of a type C virus released from the porcine cell line PK(15), *Virology* (vol. 58), No. 1, pp. 65-74.
- Todaro, G. J.; Sherr, C. J.; Benveniste, R. E.; Lieber, M. M. and Melnick, J. L. (1974b): Type C viruses of baboons: isolation from normal cell cultures, *Cell* (vol. 2), No. 1, pp. 55-61.
- Towers, G.; Bock, M.; Martin, S.; Takeuchi, Y.; Stoye, J. P. and Danos, O. (2000): A conserved mechanism of retrovirus restriction in mammals, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 97), No. 22, pp. 12295-9.
- Tucker, A.; Belcher, C.; Moloo, B.; Bell, J.; Mazzulli, T.; Humar, A.; Hughes, A.; McArdle, P. and Talbot, A. (2002): The production of transgenic pigs for potential use in clinical

- xenotransplantation: microbiological evaluation, *Xenotransplantation* (vol. 9), No. 3, pp. 191-202.
- Tucker, A. W.; Galbraith, D.; McEwan, P. and Onions, D. (1999): Evaluation of porcine cytomegalovirus as a potential zoonotic agent in xenotransplantation, *Transplant Proc* (vol. 31), No. 1-2, p. 915.
- Tucker, A. W.; McNeilly, F.; Meehan, B.; Galbraith, D.; McArdle, P. D.; Allan, G. and Patience, C. (2003): Methods for the exclusion of circoviruses and gammaherpesviruses from pigs, *Xenotransplantation* (vol. 10), No. 4, pp. 343-8.
- Valdes, R. (2002): Xenotransplantation trials, *Lancet* (vol. 359), No. 9325, p. 2281.
- van der Kuyl, A. C.; Dekker, J. T. and Goudsmit, J. (1996): Baboon endogenous virus evolution and ecology, *Trends Microbiol* (vol. 4), No. 11, pp. 455-9.
- van der Laan, L. J.; Lockey, C.; Griffeth, B. C.; Frasier, F. S.; Wilson, C. A.; Onions, D. E.; Hering, B. J.; Long, Z.; Otto, E.; Torbett, B. E. and Salomon, D. R. (2000): Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice, *Nature* (vol. 407), No. 6800, pp. 90-4.
- Vanhove, B.; Charreau, B.; Cassard, A.; Pourcel, C. and Soullou, J. P. (1998): Intracellular expression in pig cells of anti-alpha1,3galactosyltransferase single-chain FV antibodies reduces Gal alpha1,3Gal expression and inhibits cytotoxicity mediated by anti-Gal xenoantibodies, *Transplantation* (vol. 66), No. 11, pp. 1477-85.
- Weiss, R. A. (1998): Transgenic pigs and virus adaptation, *Nature* (vol. 391), No. 6665, pp. 327-8.
- Wells, D. L.; Hopfensperger, D. J.; Arden, N. H.; Harmon, M. W.; Davis, J. P.; Tipple, M. A. and Schonberger, L. B. (1991): Swine influenza virus infections. Transmission from ill pigs to humans at a Wisconsin agricultural fair and subsequent probable person-to-person transmission, *Jama* (vol. 265), No. 4, pp. 478-81.
- Welsh, R. M.; O'Donnell, C. L.; Reed, D. J. and Rother, R. P. (1998): Evaluation of the Galalpha1-3Gal epitope as a host modification factor eliciting natural humoral immunity to enveloped viruses, *J Virol* (vol. 72), No. 6, pp. 4650-6.
- Wilson, C. A.; Wong, S.; VanBrocklin, M. and Federspiel, M. J. (2000): Extended analysis of the in vitro tropism of porcine endogenous retrovirus, *J Virol* (vol. 74), No. 1, pp. 49-56.
- Wilson, C. A.; Wong, S.; Muller, J.; Davidson, C. E.; Rose, T. M. and Burd, P. (1998): Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells, *J Virol* (vol. 72), No. 4, pp. 3082-7.

- Wolgamot, G.; Bonham, L. and Miller, A. D. (1998): Sequence analysis of *Mus dunni* endogenous virus reveals a hybrid VL30/gibbon ape leukemia virus-like structure and a distinct envelope, *J Virol* (vol. 72), No. 9, pp. 7459-66.
- Wood, J. C.; Quinn, G.; Suling, K. M.; Oldmixon, B. A.; Van Tine, B. A.; Cina, R.; Arn, S.; Huang, C. A.; Scobie, L.; Onions, D. E.; Sachs, D. H.; Schuurman, H. J.; Fishman, J. A. and Patience, C. (2004): Identification of exogenous forms of human-tropic porcine endogenous retrovirus in miniature Swine, *J Virol* (vol. 78), No. 5, pp. 2494-501.
- Xu, Y.; Lorf, T.; Sablinski, T.; Gianello, P.; Bailin, M.; Monroy, R.; Kozlowski, T.; Awwad, M.; Cooper, D. K. and Sachs, D. H. (1998): Removal of anti-porcine natural antibodies from human and nonhuman primate plasma in vitro and in vivo by a Gal α 1-3Gal β 1-4 β Glc-X immunoaffinity column, *Transplantation* (vol. 65), No. 2, pp. 172-9.
- Yoder, J. A.; Walsh, C. P. and Bestor, T. H. (1997): Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites, *Trends Genet* (vol. 13), No. 8, pp. 335-40.
- Zhang, W. J.; Laue, C.; Hyder, A. and Schrezenmeir, J. (2001): Purity of alginate affects the viability and fibrotic overgrowth of encapsulated porcine islet xenografts, *Transplant Proc* (vol. 33), No. 7-8, pp. 3517-9.

7. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µm, nm	Mikrometer, Nanometer
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
Bidest.	Bidestilliertes Wasser
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CD	Differenzierungscluster
cDNA	Komplementäre DNA
CMV	Cytomagalovirus
CTP	Cytidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMCV	Encephalomyocarditis Virus
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FeLV	felines Leukämievirus
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
g, mg, µg, ng, pg	Gramm, Miligramm, Mikrogramm, Nanogramm, Pikogramm
G418	Geneticin
GALV	Leukämie Virus der Gibbons
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEV	Hepatitis E Virus
HIV	Humanes Immunschwäche Virus
HTLV	Humanes T-lymphotropes Virus
IgG	γ-Immunglobulin
IgM	µ-Immunglobulin
IU/ml	Internationale Einheiten pro Mililiter
kD	Kilodalton
l, ml, µl	Liter, Mililiter, Mikroliter
M, mM, µM, nM	Molar, Milimolar, Mikromolar, Nanomolar
Mg	Magnesium
MgCl	Magnesiumchlorid
Min.	Minuten
MuLV	Murines Leukämie Virus
mRNA	messengerRNA
NaCl	Natriumchlorid
NF-Y	Nukleärer Faktor Y
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PCMV	Porzines Cytomagalovirus

PCV	Porzines Circovirus
PERV	Porzines endogenes Retrovirus
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PLHV	Porzines lymphotropes Herpesvirus
Polybren	1,5-Dimethyl-1,5-diazaundecamethylenpolymethobromid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RNA	Ribonukleinsäure
RNaseH	RibonukleaseH
SARS	Severe acute respiratory syndrome
SCID	Severe combined immunodeficiency
SFV	Simian foamy Virus
SIV	Simianes Immunschwäche Virus
SPF	Spezifiziert Pathogen-frei
STLV	Simianes T-lymphotropes Virus
TCID50/ml	Die Hälfte der tissue culture infectivity dose pro Mililiter
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
tRNA	transferRNA
TTP	Thymidintriphosphat
U/ml	Einheiten pro Mililiter
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
x g	Ein Vielfaches der Erdbeschleunigung

8. Anhang

8.1 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Reinhard Kurth für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für seine Unterstützung in allen wissenschaftlichen Bereichen und für die ständige Diskussionsbereitschaft.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Joachim Denner für die Anleitung und Betreuung während meiner Promotionsarbeit.

Bei Kristina, Alex, Uwe, Mirko, Stephan, Stephanie, Jule, Sandra, Corinna, Sven, Alex J, Jörg, Sabrina, Jutta, Karin, Jaschi, Tina und allen anderen aus dem Haus 3 möchte ich mich ganz herzlich für die ständige Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung sowie für die zahlreichen Anregungen und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. Stephen Norley, Julia, Fox, Marion, Nicky und dem Rest der Arbeitsgruppe P22 für die freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter Petra, meiner Großmutter Margot und meiner geliebten Anja für ihr Verständnis, ihre Rücksicht und die Ermöglichung dieser Arbeit.

8.2 Erklärung

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

Berlin, den 27.09.2004.