

**Charakterisierung, Wirtsbereich und Diagnostik
Porciner Endogener Retroviren (PERV) im Rahmen
der Xenotransplantation**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim
Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Stefan Tacke
aus Münster/Westf.

Frankfurt/Main 2001

DF1

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Engels

Gutachter: Prof. Dr. Bernd Ludwig
Prof. Dr. Reinhard Kurth

Datum der Disputation: 26.07.2001

INHALT

INHALT	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
I. EINLEITUNG	1
I.1. Was sind Xenotransplantationen und warum brauchen wir sie?	1
I.1.1. Der Organmangel bei Allotransplantationen	1
I.1.2. Die Xenotransplantation als eine Alternative zur Allotransplantation.....	2
I.2. Welche Tierspezies eignet sich für Xenotransplantationen?	3
I.2.1. Nicht-humane Primaten.....	3
I.2.2. Schweine	4
I.3. Immunologische Probleme bei der Xenotransplantation	5
I.3.1. Die hyperakute Abstoßungsreaktion (HAR)	6
I.3.2. Vaskuläre und zelluläre Abstoßungsreaktionen	6
I.3.3. Ansätze zur Verhinderung der immunologischen Abstoßung.....	7
I.4. Xenozoonosen	10
I.4.1. Definition	10
I.4.2. Mögliche Xenozoonosen.....	11
I.5. Retroviren	12
I.5.1. Charakterisierung der Retroviren.....	12
I.5.2. Endogene Retroviren.....	14
I.5.3. Porcine Endogene Retroviren	15
I.5.4. Transspeziesübertragung von exogenen und endogenen Retroviren.....	16
I.6. Pathogenese retroviraler Erkrankungen	17
I.6.1. Tumore und Immunschwächen.....	17
I.6.2. Mechanismus der Immunsuppression durch Retroviren.....	18
I.7. Wissenschaftliche und gesellschaftliche Diskussionen	21
II. ZIELSETZUNG	23
III. MATERIAL UND METHODEN	24
III.1. Zellbiologische Methoden	24
III.1.1. Kulturbedingungen.....	24
III.1.2. Präparation von primären Zellen.....	25
III.1.3. Proliferationsassays	26
III.1.4. Infektionsversuche	27
III.1.5. Elektronenmikroskopie.....	28
III.2. Reinigung von Viruspartikeln	28
III.2.1. Gradientenultrazentrifugation	28
III.2.2. Aktivitätsassay der Reversen Transkriptase.....	29
III.3. Proteinchemische Methoden	30
III.3.1. Proteinbestimmung	30
III.3.2. Denaturierende Gelelektrophorese	30
III.3.3. Sequenzierung von Proteinen und Sequenzanalyse.....	30
III.3.4. Peptidsynthese	31
III.3.5. Kopplung von Peptiden an Trägerproteine	31
III.3.6. Reinigung von rp15E	32

III.4. Molekularbiologische Methoden	33
III.4.1. Präparation von Nukleinsäuren.....	33
III.4.2. Polymerase-Kettenreaktion (DNA-PCR).....	33
III.4.3. Polymerase-Kettenreaktion nach reverser Transkription (RT-PCR)	34
III.4.4. Agarose-Gelelektrophorese	36
III.4.5. Sequenzierung von PCR-Produkten und Sequenzanalyse	36
III.5. Immunologische Methoden.....	37
III.5.1. Gewinnung von Antiseren.....	37
III.5.2. ELISA	37
III.5.3. Western Blot	38
III.5.4. Immunfluoreszenzmikroskopie.....	39
IV. RESULTATE.....	40
IV.1. Biochemische und immunologische Charakterisierung von PERV	40
IV.1.1. Morphologische Charakterisierung	40
IV.1.2. Präparation von Viruspartikeln.....	41
IV.1.3. Untersuchung der viralen Proteine mittels Gelelektrophorese	43
IV.1.4. Generierung und Analyse von PERV-Antiseren.....	46
IV.1.5. Expression und Reinigung von rekombinantem p15E-Protein	51
IV.2. Inhibition der Proliferation lymphoider humaner Zellen durch PERV	53
IV.2.1. Untersuchungen mit gereinigtem PERV.....	53
IV.2.2. Untersuchungen mit synthetischen Peptiden	54
IV.3. Indirekte immunologische Detektionsmethoden für PERV-Infektionen.....	56
IV.3.1. Entwicklung eines kombinierten ELISA- & Western Blot-Testverfahrens	57
IV.3.2. Validierung der Assays.....	58
IV.3.3. Einsatz der Detektionssysteme in präklinischen und klinischen Studien.....	59
IV.4. In vitro-Untersuchung des Wirtsspektrums	68
IV.4.1. Infektion von humanen Zellen	69
IV.4.2. Infektion von nicht-humanen Zellen	70
IV.5. Expression von PERV-Partikeln bei Schweinelymphozyten.....	72
V. DISKUSSION.....	76
V.1. Biologische Eigenschaften von PERV.....	76
V.2. Nachweissysteme für PERV und ihre (prä-)klinische Bedeutung.....	78
V.3. Expression und Infektion.....	83
V.4. Beitrag zur Risikobewertung.....	85
VI. ZUSAMMENFASSUNG	76
VII. SUMMARY	90
VIII. LITERATUR.....	91
IX. DANKSAGUNG	110
PUBLIKATIONSLISTE	111
LEBENS LAUF	112

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α -Gal	Galaktosyl- α -1,3-Galaktosyl-Rest
aa	Aminosäure (<i>amino acid</i>)
AGM	Afrikanische Grüne Meerkatze (<i>cercopithecus aethiops</i>)
AIDS	erworbenes Immunschwäche-Syndrom (<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AVR	Akute Vaskuläre Abstoßungsreaktion (<i>acute vascular rejection</i>)
BaEV	endogenes Pavian-Retrovirus (<i>baboon endogenous retrovirus</i>)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CA	Kapsidprotein (<i>capsid protein</i>)
ConA	Concanavalin A
cpm	radioaktive Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
DNA	Desoxyribonukleisäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotide
EDC	1-[3-Dimethyl-Aminopropyl-]3-ethylcarbodiimide
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	extrakorporale Immunadsorption
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (<i>enzyme linked immunosorbant assay</i>)
Env, <i>env</i>	retrovirales Hüllprotein (<i>envelope</i>), Gen der Hüllproteine
ERV	endogenes Retrovirus
FeLV	Felines Leukämievirus
FLV	Friend-Leukämievirus
FPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (<i>fast performance liquid chromatography</i>)
$\times g$	Vielfaches der Erdbeschleunigung
Gag, <i>gag</i>	retrovirales Strukturprotein (<i>group specific antigen</i>), Gen des gruppenspez. Antigens
GALV	Gibbon Leukämievirus (<i>gibbon ape leukemia virus</i>)
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
gp	Glykoprotein
HAR	Hyperakute Abstoßungsreaktion (<i>hyperacute rejection</i>)
hDAF	humaner Komplementregulationsfaktor CD55 (<i>human decay accelerating factor</i>)
HERV	Humanes Endogenes Retrovirus
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HTLV	Humanes T-Lymphozyten-trophes Retrovirus
ido	immundominante Domäne
IFN	Interferon
IgG, IgM	Immunglobulin G, Immunglobulin M
IL	Interleukin
IPA	Immunperoxidaseassay

IPTG	Isopropylthiogalaktosid
isu	immunsuppressive Domäne
kDa	kilo Dalton
KLH	Hämocyanin der Schlüsselloch Napfschnecke (<i>keyhole limpet hemocyanin</i>)
LTR	lange, terminale, direkte Sequenzwiederholungen (<i>long terminal repeat</i>)
MA	Matrix-Protein
MBP	Maltosebindungsprotein
MHC	Hauptgewebekompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
mRNA	messenger RNA
MuLV	Murines Leukämievirus
MWCO	Ausschlußgröße (<i>molecular weight cut-off</i>)
n.g.	nicht getestet
NC	Nukleokapsid-Protein
PAEC	primäre Aortaendothelzellen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	Periphere Mononukleäre Blutzellen (<i>periphery blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PERV	Porcines Endogenes Retrovirus
PHA	Phytohämagglutinin
PMFV	permanentes, menschliches Fibroblasten-Virus
Pol, <i>pol</i>	Polymerase-Protein, Polymerase-Gen
PR	Protease-Protein
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rp15E	rekombinantes p15E-Protein
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Polymerase-Kettenreaktion nach reverser Transkription (<i>reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>)
SCID	schwere kombinierte Immundefizienz (<i>severe combined immunodeficiency</i>)
sCR I	löslicher Komplementrezeptor I (<i>soluble complement receptor I</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
SLA	Schweine Lymphozytenantigen
SMC	Mononukleäre Milzzellen (<i>spleen mononuclear cells</i>)
spf	frei von spezifischen Pathogenen (<i>specific pathogen-free</i>)
SU	Oberflächen-Hüllprotein (<i>surface</i>)
TBS	Tris-gepufferte Saline (<i>tris buffered saline</i>)
TM	Transmembranes Hüllprotein
TNF	Tumornekrosefaktor
TPA	<i>o</i> -Tetradecanoylphorbol-13-acetat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
vRNA	virale Ribonukleinsäure (<i>viral ribonucleic acid</i>)
XT	Xenotransplantation

I. EINLEITUNG

I.1. Was sind Xenotransplantationen und warum brauchen wir sie?

I.1.1. Der Organmangel bei Alлотransplantationen

In Deutschland werden jährlich rund 3500 Transplantationsoperationen durchgeführt, um ein akutes oder chronisches Organversagen zu behandeln (Eurotransplant, 2001). Für viele dieser Patienten, z.B. mit schweren Herz- oder Leberschäden, ist die Transplantation eines Fremdorgans lebensnotwendig. Für eine Reihe anderer Patienten stehen zwar überbrückende Maßnahmen wie z.B. die Dialyse bei Patienten mit Nierenversagen zur Verfügung, ihre Lebensqualität wird durch eine Transplantation aber deutlich verbessert. Es besteht jedoch eine eklatante Diskrepanz zwischen der Zahl der für eine Transplantation zur Verfügung stehenden menschlichen Organe und der Zahl der Patienten auf den Wartelisten für solche Alлотransplantationen (gr. *allos* – anders; lat. *transplantare* – verpflanzen). So führt Eurotransplant[†] eine Liste mit mehr als 14.000 Patienten (davon über 10.000 Patienten in Deutschland), die dringend auf ein Spenderorgan warten. Nur etwas mehr als ein Drittel der notwendigen Transplantationen kann derzeit durchgeführt werden (Abbildung I-1). Diese Differenz wächst weiter, da z.B. die Behandlung von Schwerstkranken durch Fortschritte in

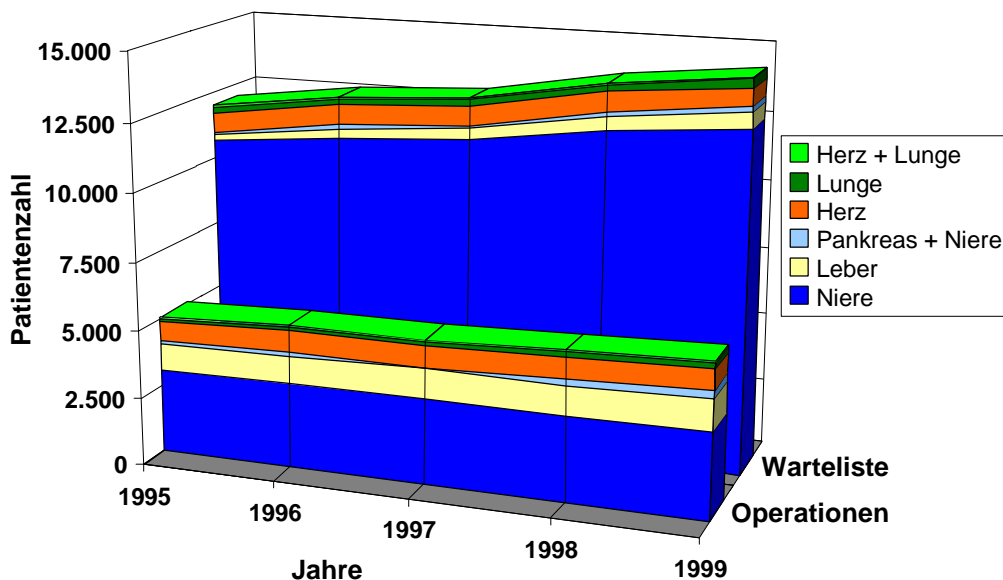


Abbildung I-1: Vergleich zwischen der Zahl der durchgeführten Transplantationen und der Zahl der Patienten auf der Warteliste für verschiedene Organe. Dargestellt sind Daten im Zeitraum zwischen 1995 und 1999 im Verantwortungsbereich von Eurotransplant (Eurotransplant, 2001).

[†] Eurotransplant ist eine unabhängige, gemeinnützige Stiftung mit Sitz in Leiden (Niederlande), die die Koordination und den internationalen Informationsaustausch bei Transplantationen in Deutschland, Benelux, Österreich, Slowenien und den Niederlanden übernimmt.

der Medizin ständig verbessert wird und so für immer mehr Patienten eine Organtransplantation in Frage kommt. Die Mortalität der Patienten auf der Warteliste ist sehr hoch. Je nach zu transplantiertem Organ versterben bis zu 30% dieser Patienten, bevor sie ein Transplantat erhalten (Alexander & Zola, 1996; Smith, 1997).

Einerseits wird versucht, durch verbesserte Aufklärung, Diagnostik und mit präventiven Behandlungsverfahren die Zahl der Patienten mit schweren Organschäden zu reduzieren. Andererseits wäre durch eine höhere Organspendebereitschaft der Bevölkerung eine Reduzierung der Differenz ohne Zweifel möglich. In Deutschland wird daher auf politischer Ebene eine Änderung des Transplantationsgesetzes diskutiert, so daß die bestehende Zustimmungslösung durch eine Widerspruchsregelung abgelöst werden könnte (Transplantationsgesetz, 1997). Weiterreichende medizinische Möglichkeiten wie das „Tissue Engineering“, die bedarfsgerechte Entwicklung („Züchtung“) von einzelnen Geweben oder Organen, oder dauerhafte und zuverlässige künstliche Organe werden in näherer Zukunft noch nicht zum Einsatz kommen (Amiel *et al.*, 2000). Daher werden alternative Quellen für Organe erwogen.

1.1.2. Die Xenotransplantation als eine Alternative zur Allotransplantation

Ein Weg, den bestehenden Mangel zu beheben, ist die Xenotransplantation (gr. *xenos* – fremd), die Transplantation von Organen, Geweben oder Zellen zwischen verschiedenen Spezies, also insbesondere auch der Transfer von tierischen Geweben in den Menschen (Kaufman *et al.*, 1995; Lanza *et al.*, 1997; Auchincloss & Sachs, 1998). Man unterscheidet in diesem Zusammenhang zwischen konkordanter und diskordanter Xenotransplantation, welche die Übertragung von Organen zwischen phylogenetisch und immunologisch eng verwandten Spezies, wie Maus zu Ratte, bzw. zwischen sehr unterschiedlichen Spezies (z.B. Hund-zu-Schwein-Transplantation) beschreibt.

Durch den freizügigeren Zugang zu den Tiergeweben eröffnet die Xenotransplantation über die bei der Allotransplantation bekannten Möglichkeiten hinaus neue Therapiemöglichkeiten. So wird beispielsweise versucht, *Ex vivo*-Therapien zu entwickeln, wozu einerseits die zeitweilige Durchblutung von soliden Organen wie Leber und Nieren außerhalb des menschlichen Körpers gehören (Chari *et al.*, 1994). Andererseits wird auch der Einsatz von künstlichen Organsystemen, welche auf der Funktion von isolierten, tierischen Zellen basieren, wie z.B. die „bioartifizielle Leber“ in klinischen Studien erprobt (Lazar *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 1997). Es gibt auch Bestrebungen, Patienten, die an der Parkinsonschen Krankheit, an Alzheimer oder an Chorea Huntington leiden, mit transplantierten neuronalen Zellen zu therapieren (Deacon *et al.*, 1997; Isacson & Breakefield, 1997; Fink *et al.*, 2000).

Die Tabelle I-1 gibt einen kurzen Überblick über die aktuelle Situation bei der Realisierung der Xenotransplantation und den Ergebnissen bei Tiermodellen mit orthotopen (an Stelle des vorhandenen Organs implantiert, Lebenserhaltungsmodelle) bzw. heterotopen Xenotransplantationen (zusätzlich zum vorhandenen Organ implantiert).

Tabelle I-1: Übersicht über einige durchgeführte klinische und präklinische Xenotransplantationen von Schweinegeweben und den derzeitigen Stand der Entwicklung

Transplantat	Erkrankung	Stand der Entwicklung – Überlebensdauer
bereits durchgeführte klinische Xenotransplantationen beim Menschen		
Herzklappen	Herzklappeninsuffizienz	anerkannte Standard-Therapie; ungefährlich, da nicht-proliferierendes Gewebe
Bioartifizielle Leber	akutes & chron. Leberversagen	klinische Phase I-Studien lieferten gute Ergebnisse als Bridging-Therapie (Watanabe <i>et al.</i> , 1997)
(verkapselte) Inselzellen	Diabetes Typ I	es besteht Notwendigkeit für verbesserte Präparations-, Immunsuppressions- und Verkapselungsprotokolle (Ulrichs <i>et al.</i> , 1999)
Neuronalzellen	Parkinson, Alzheimer	geringe Erfolge; aufgrund der immunologischen Lokalisation schwierige Immuntherapie (Fink <i>et al.</i> , 2000; Larsson & Widner, 2000)
bereits durchgeführte experimentelle Xenotransplantationen bei nicht-humanen Primaten		
Niere	Organversagen	39 Tage Median (5-78 Tage) bei orthotoper XT von hDAF-transgenen Spenderorganen in Cynomolgen (Cozzi <i>et al.</i> , 2000a)
Lunge		medizinisch schwierigste Transplantation, Organe nicht-transgener Tiere für bis zu 28 h in Pavianen funktionell (Martin <i>et al.</i> , 2001)
Herz		bei hDAF-transgenen Organen keine HAR in Pavianen; 39 Tage bei orthotoper XT (Vial <i>et al.</i> , 2000); 26 Tage Median (10-99 Tage) bei heterotoper XT (Bhatti <i>et al.</i> , 1999)
Leber		bis 8 Tage bei orthotoper XT von hDAF-transgenen Organen (Ramirez <i>et al.</i> , 2000)

I.2. Welche Tierspezies eignet sich für Xenotransplantationen?

Bei der Verwendung von Organen aus Tieren für die Xenotransplantation stellt sich die Frage, welches Tier man als Organdonor nutzen soll. Dahinter verstecken sich eine Reihe von Schwierigkeiten, zu denen nicht nur medizinische, sondern insbesondere auch immunologische, physiologische und nicht zuletzt ethische Probleme gehören.

I.2.1. Nicht-humane Primaten

Aufgrund der phylogenetischen Nähe der nicht-humanen Primaten zum Menschen bieten sie scheinbar günstige, unproblematische Spenderorgane. So haben die Menschenaffen (Schimpanse oder Gorilla) eine vergleichbare Organphysiologie und -größe, eine vergleichbare Morphologie und eine aufrechte Körperhaltung. Andere Primaten (z.B. Paviane) sind jedoch zu klein für Erwachsene, ihre Organe könnten in Ausnahmefällen für Kinder verwendet werden. Die Genome von Mensch und Schimpanse unterscheiden sich nur um etwa 3% (Hammer, 1991). Diesen Vorteilen stehen zum einen ethische sowie tier- und artenschutz-

rechtliche Schwierigkeiten gegenüber (Hughes, 1998; Cruz *et al.*, 2000). Zum anderen sind aber auch rein praktische Fragen problematisch, wie eine langsame Reproduktion mit geringen Nachkommenzahlen, schwierige Züchtung, gesetzliche Auflagen für die Tierhaltung, die eine spf-Haltung (*specific pathogen-free*) erschweren, bis hin zu dem hohen Risiko einer Infektionsübertragung (Xenozoonose, Kap. I.4) durch die geringe Speziesbarriere von Affe zu Mensch (Allan, 1998; Allan *et al.*, 1998; Michaels *et al.*, 2001).

Schon zu Beginn der sechziger Jahre wurden erste Xenotransplantationsexperimente durchgeführt (Calne, 1966; Reemtsma, 1966). Die ersten konkreteren Xenotransplantationsversuche wurden erst gegen Ende der sechziger Jahre von Reemtsma und Starzl mit Menschenaffen durchgeführt (Reemtsma, 1969; Giles *et al.*, 1970). Diese schienen durch die Entwicklung und den klinischen Einsatz der ersten spezifischen immunsuppressiven Pharmaka (Azathioprin, Actinomycin C und Steroide; White & Nicholson, 1999) in den Bereich der medizinischen Möglichkeit gerückt zu sein. Aufgrund immunologischer Probleme, die durch die Immunsuppressiva nicht kontrolliert werden konnten, wurden in den siebziger und achtziger Jahren nur wenige Versuche durchgeführt, welche auch nur vor geringer klinischer Bedeutung waren, zumal die Allotransplantation an Bedeutung gewann. Medizinisch-pharmazeutischer Fortschritt auf dem Gebiet der Immunsuppression und des Verständnisses der immunologischen Abstoßungsreaktionen ermöglichten neue Experimente mit *Ex vivo*-Perfusionssystemen, aber auch Primat-zu-Mensch-Xenotransplantationen von Zellen oder ganzen Organen verliefen zunehmend erfolgreicher (Bailey, 1985; Starzl *et al.*, 1993).

1.2.2. Schweine

Schon in den siebziger Jahren wurde über die Legitimität und die Problematik der Spendertiere für Xenotransplantationen nachgedacht (Balner, 1974). Da Primaten als Donoren ausscheiden (s.o.), wurde der Einsatz anderer großer Wirbeltiere, trotz der damit verbundenen, durch die phylogenetische Divergenz hervorgerufenen immunologischen Probleme diskutiert.

Zur Zeit werden Schweine als Organspender favorisiert. Ihre Verwendung ist ethisch gesehen vergleichsweise unproblematisch, da Schweine in Europa seit langem als Schlachtvieh gehalten werden. Die Akzeptanz in der Bevölkerung ist ebenso wie bei den Betroffenen, die auf eine Organtransplantation warten bzw. ein Transplantat bekommen haben, recht groß (Schlitt *et al.*, 1999; Hagelin *et al.*, 2000). Ebenfalls sind die wirtschaftlichen Faktoren günstig. Ihre Haltung ist gegenüber der von Schafen, Ziegen, Rindern oder gar Primaten vergleichsweise günstig. Sie haben große Nachkommenzahlen und eine ausreichend große anatomische Ähnlichkeit mit dem Menschen (Cozzi & White, 1995).

Allerdings gibt es hier neben den zu erwartenden immunologischen Schwierigkeiten aufgrund der großen phylogenetischen Entfernung einige, teilweise bedeutende physiologische Probleme. So sind bereits eine Reihe von inkompatiblen Hormonen, Enzymen, Wachstumsfaktoren und anderen Proteinen bekannt. Beispielsweise ist das Erythropoetin des Schweins trotz einer Homologie von 82% im Primaten nicht funktionell (Hammer, 1998). Fragen der Sicherheit bei der Übertragung von Krankheiten sind wegen der phylogenetischen Differenzen anders als bei Affen zu bewerten (Kap. I.4).

Ein weiteres Argument, das für Schweine als Organspender spricht, ist die ethische Vertretbarkeit von genetischen Manipulationen beim Schwein (Kap. I.3.3). So wurden transgene Tiere entwickelt (Cozzi & White, 1995; Niemann, 1999) und Klonierungsexperimente durchgeführt (Kap. I.5.4; Onishi *et al.*, 2000; Polejaeva *et al.*, 2000), um bestehende Probleme durch gentechnische Methoden zu umgehen.

I.3. Immunologische Probleme bei der Xenotransplantation

Die größten Probleme einer jeden Transplantation sind die Abwehrreaktionen des Körpers gegen das fremde Gewebe. Obgleich bei der Allotransplantation das Immunsystem des Rezipienten durch moderne Immunsuppressiva in ausreichendem Maße reguliert werden kann, ist es immer noch unerlässlich, das Gewebe entsprechend der Oberflächenantigene (HLA – *human lymphocyte antigen*) zu typisieren und so einen möglichst optimalen Rezipienten zu wählen. Auf diese Weise wird die Abstoßung des Allotransplantats durch eine vorwiegend T-Zell-vermittelte Immunreaktion limitiert und ein langfristiges Transplantatüberleben gesichert (Dorling *et al.*, 1996b).

Bei einer diskordanten Transplantation treten noch weitere immunologische Abwehrreaktionen auf, die im folgenden kurz erörtert werden sollen. Dabei sind jedoch prinzipielle Unterschiede zwischen Transplantationen von einzelnen Zellen und der Übertragung eines ganzen, vaskularisierten Organs zu beachten. Anschließend sollen mögliche Techniken zur Überwindung dieser Probleme insbesondere mit Hinblick auf das mögliche Xenozoonose-Risiko (Kap. I.4) diskutiert werden, wobei besonderes Augenmerk den Retroviren gilt (Kap. I.5). Zur Untersuchung dieser immunologischen Fragestellungen im Rahmen der Machbarkeit von Xenotransplantationen werden in der Regel Paviane als nicht-humanes Tiermodell herangezogen, da Menschenaffen für derartige Experimente aus ethischen, art- und tierschutzrechtlichen Gründen ausscheiden. Andere Spezies, insbesondere Kleintiere, scheiden als Tiermodell aufgrund der erheblichen physiologischen und immunologischen Unterschiede für konkrete Aussagen aus.

1.3.1. Die hyperakute Abstoßungsreaktion (HAR)

Die auffälligste Reaktion bei einer diskordanten Abstoßung von Organen ist die sogenannte hyperakute Abstoßungsreaktion (HAR – *hyperacute rejection*). Besonders bei *Ex vivo*-Perfusionsversuchen ist deutlich mit bloßem Auge zu verfolgen, wie das Organ innerhalb weniger Minuten durch extensive Thrombosen und extravasculäre Hämorrhagien zerstört wird.

Hervorgerufen wird diese Reaktion durch die Aktivierung der Komplementkaskade des Rezipienten durch präformierte, xenoreaktive Antikörper in seinem Blut. Diese sind polyreaktiv, aber zu einem großen Teil gegen Carbohydrat-Seitenketten, insbesondere α -Gal-1,3- α -Gal-Gruppen (α -Gal), gerichtet, die bei fast allen Tieren mit Ausnahme der Altweltaffen und des Menschen als Oberflächenantigene auftreten (Rother *et al.*, 1995). Die präformierten Antikörper werden während der frühen Wachstumsphase als Immunantwort auf das natürliche Umfeld entwickelt (Cramer, 2000). Diese anti- α -Gal Antikörper im Blut des Rezipienten binden an das Endothel der Blutgefäße des Transplantats und initiieren dadurch das Komplementsystem über den sogenannten klassischen Weg. Die Gefäßpermeabilität nimmt zu, so daß es zur Infiltration von Lymphozyten und Plasma in das Gewebe (Ödembildung) kommt. Durch den lytischen Reaktionsweg des Komplementsystems sterben die Endothelzellen ab, es kommt zu Einblutungen in das Gewebe (Hämatome) und schließlich zur Auflösung des gesamten Endothels (Bach *et al.*, 1995).

Bei Transplantationen von vereinzelt Zellen (z.B. von Langerhansschen Inseln unter die Nierenkapsel) kommt es ebenfalls zu Abstoßungsreaktionen, die aber weniger dramatisch ausfallen. Betrachtet man die Applikation von neuronalen Zellen, so muß berücksichtigt werden, daß das Gehirn durch die Blut-Hirn-Schranke eine immunologische Sonderstellung einnimmt (Barker *et al.*, 2000).

1.3.2. Vaskuläre und zelluläre Abstoßungsreaktionen

Eine der HAR nachgelagerte Abstoßung, die akute vaskuläre Abstoßungsreaktion (AVR – *acute vascular rejection*), ist trotz der Schwierigkeiten, diese Reaktionen unter Umgehung der HAR zu untersuchen (Kap. I.3.3), zumindest teilweise verstanden. Dieser Vorgang läuft in einem Zeitraum von einigen Stunden bis zu wenigen Tagen ab (Platt *et al.*, 1998).

Es handelt sich dabei um eine unkontrollierte Aktivierung von Thrombozyten, Makrophagen und Natürlichen Killerzellen durch fremde Antigene, die von Endothelzellen präsentiert werden. Die lokale Freisetzung von pro-inflammatorischen Cytokinen (z.B. $\text{IFN}\gamma$, IL-1, $\text{TNF}\alpha$) aktiviert die Endothelzellen. Es kommt zur Anlagerung und zur Infiltration von Lymphozyten sowie zur Plättchenaggregation (Bach *et al.*, 1995). Dieser Vorgang entspricht nahezu einer

gewöhnlichen Entzündungsreaktion. Diese Entzündung führt zusammen mit der Thrombenbildung aufgrund der Plättchenaggregationen zum Organversagen (Platt, 1998).

Eine weitere wichtige Abstoßungsreaktion ist die zelluläre Immunantwort. Sie läuft in einem Zeitraum von mehreren Tagen bis zu mehreren Monaten ab. Diese Reaktion beruht auf der Aktivierung von T-Zellen durch die Präsentation von Antigenen durch die Hauptgewebekompatibilitätsproteine (MHC – *major histocompatibility complex*). Sie ist, wie schon gesagt, die wichtigste immunologische Problematik bei Allotransplantationen, weshalb hier die MHC-Antigene zwischen Spender und Empfänger abgeglichen werden. Obgleich die direkte T-Zell-Aktivierung durch Interaktionen zwischen T-Zell-Rezeptor des Empfängers und MHC des Spenders bei weit entfernten Spezies möglicherweise nicht effektiv ist, wurde im Fall der Mensch-zu-Schwein-Xenotransplantationen eine hohe Homologie dieser Rezeptoren, wie auch weiterer für eine T-Zell-Aktivierung notwendiger Rezeptoren, gefunden (Yamada *et al.*, 1995; Dorling *et al.*, 1996b). Die indirekte T-Zell-Aktivierung durch Antigen-präsentierende Zellen des Empfängers ist ein weiterer Weg der zellulären Immunantwort. Obwohl *In vivo*-Untersuchungen derzeit aufgrund der geringen Überlebensdauer noch keine Rückschlüsse auf die Effizienz der Wechselwirkungen zulassen, ist davon auszugehen, daß auch die zelluläre Immunantwort durch eine geeignete Immunsuppressionstherapie unterdrückt werden muß (Gill, 1992; Dorling *et al.*, 1996a).

1.3.3. Ansätze zur Verhinderung der immunologischen Abstoßung

Für die Lösung der Vielzahl von Problemen, die die Immunreaktionen des Empfängers im Rahmen der Xenotransplantation mit sich bringen, sind jeweils eine Reihe von unterschiedlichen, teilweise überlappenden Ansätzen verfolgt worden. Hier sollen nur die wichtigsten erwähnt werden.

Die Xenotransplantation wird erst nach Überwindung der HAR als klinische Therapie diskutabel. Daher wurden hier bereits früh erste Arbeiten durchgeführt und die These diskutiert, daß die HAR wegen der Inkompatibilität der feed-back-Regulationselemente bei diskordanten Übertragungen so fulminant ausfällt (Miyagawa *et al.*, 1988; Dalmaso *et al.*, 1991). Ein aussichtsreicher Lösungsansatz ist daher die Entwicklung transgener Spender-Schweine, die einen oder mehrere menschliche Komplementregulationsfaktoren wie humanes DAF (*decay accelerating factor*, CD55), CD59 oder MCP (*membrane cofactor protein*, CD46) exprimieren (Cozzi *et al.*, 2000b). Erste präklinische Studien mit Pavianen lieferten vielversprechende Ergebnissen (Cozzi *et al.*, 1997; Niemann, 1999; Cowan *et al.*, 2000) und zeigten sogar eine reduzierte AVR (Cozzi, 1997).

Diese Methodik hat entscheidende Auswirkungen auf die Immunantwort des Organismus auf möglicherweise exprimierte Retroviren (Kap. I.5.4). Da diese Viren auch zelluläre Oberflächenproteine in ihre Virushülle einbauen, sind sie gleichfalls durch die humanen Regulatorproteine vor dem Komplementsystem geschützt, welches einen wichtigen Abwehrmechanismus darstellt (Le Tissier *et al.*, 1997; Weiss, 1998a; Weiss, 1998b). Demgegenüber ist die Abwehr anderer Keime von dieser Methode wenig beeinflusst.

Ein anderer Ansatz zur Überwindung der HAR ist die Reduktion xenoreaktiver Antikörper im Blut des Empfängers. Dies kann durch die Plasmapherese und extrakorporale Immunadsorption (EIA) geschehen. Die EIA erfolgt durch Adsorption der Immunglobuline an ein *ex vivo*-perfundiertes Schweineorgan oder durch Bindung der Antikörper des Plasmas an Säulenmaterial mit α -Gal-Epitopen (Cooper *et al.*, 1994). Der Körper reagiert jedoch nach Beendigung der Therapie mit erhöhten Antikörperspiegeln, so daß kein nachhaltiger Schutz des Transplantats erreicht wird (Martin *et al.*, 2001).

Die Bedeutung für etwaige Xenozoonosen ist gravierend, da durch eine Depletion der natürlichen Antikörper nicht nur das Transplantat, sondern auch Retroviren und andere Pathogene mit α -Gal-Epitopen (z.B. Bakterien) vor der Komplementantwort geschützt sind.

Durch die Anwendung der verschiedensten Pharmaka wird insbesondere die akut vaskuläre und die zelluläre Abstoßung unterdrückt. In experimentellen Xenotransplantationen werden aber auch Komplement-Deaktivatoren für die Inhibition des Komplementsystems bei der HAR verwendet. Anwendung finden hier der Cobra Venum Factor, der die Faktoren C3 und C5 aus der Regulationskette entfernt (Vogel *et al.*, 1996; Platt & Saadi, 1999), lösliche C1-Inhibitoren (Dalmaso & Platt, 1993), löslicher Komplement-Rezeptor (sCR I; Pruitt *et al.*, 1991) oder Compstatin, ein Peptid-Inhibitor der C3-Konvertase vermittelten Spaltung von C3 (Fiane *et al.*, 1999). Langfristig wird die HAR durch den Einsatz von transgenen Tieren als Organspender unterdrückt werden (s.o.), unter anderem auch, da alle das Komplementsystem supprimierenden Pharmaka zu einer Erhöhung des Infektionsrisikos beitragen.

Die Immunsuppressionstherapie hat sich in den vergangenen Jahren deutlich weiterentwickelt. Wurde bei den ersten Xenotransplantationen mit den bei der Allotransplantation üblichen Protokollen gearbeitet, wird zwischenzeitlich auch Cyclophosphamid zusätzlich zu Cyclosporin, Azathioprin und Steroiden eingesetzt, wobei ständig neu entwickelte, verbesserte Immunsuppressiva hinzukommen (z.B. Mycophenolat-Mofetil, RAD), die zum Teil bei Xenotransplantationen effektiver als bei Allotransplantationen wirken. Zusätzlich ist es wichtig, neue diagnostische Methoden zur schnelleren Anpassung der Immunsuppressionstherapie

an die Reaktionen des Körpers zu entwickeln, um z.B. den Status der Aktivierung des Komplementsystems bzw. der T-Zell-Aktivierung etc. schnell abfragen zu können.

Mögliche Auswirkungen auf die Xenozoonose-Problematik sind in diesem Falle im Detail schlecht abzuschätzen. Allgemein ist aber von einer Steigerung des Risikos durch die pharmakologische Inaktivierung des Immunsystems auszugehen.

Die Verkapselung des Transplantats stellt eine weitere Strategie zur Verringerung der immunologischen Reaktionen dar. Sie ist auf Einzelzellen und Zellverbände beschränkt, welche ohne direkte Zellinteraktionen wirken können. Insbesondere bei der Anwendung von Langerhansschen Inselzellen kann sie eingesetzt werden (Siebers *et al.*, 1997; Duvivier *et al.*, 1998). Je nach den Eigenschaften des Kapselmaterials bietet sie vor allem Schutz gegen zelluläre Immunreaktionen. Es werden aber auch Kapseln entwickelt, deren Poren eine Infiltration von Makromolekülen wie z.B. Antikörpern verhindern. Aber auch wenn Antikörper ungehindert eindringen können, scheint das Überleben des Transplantats bei der HAR gesichert (White & Nicholson, 1999). Ungeklärt ist aber die mechanische Langzeitstabilität der Kapseln und die Überlebensdauer der verkapselten Zellen.

Das Xenozoonose-Risiko wird durch dieses Verfahren gesenkt, da hier durch die Präparation der Zellverbände eine zusätzliche Schranke für mögliche Pathogene aufgebaut wird. Inwieweit freigesetzte Keime betroffen sind, hängt von der Porengröße der Kapseln ab. Es werden auch Materialien getestet, die z.B. Viruspartikel zurückhalten.

Die operative Entfernung der Milz (Splenektomie) ist ein häufig getestetes Verfahren, um die Reifung neuer Lymphozyten zu unterbinden (Schmoeckel *et al.*, 1999). In der Milz werden Antigene präsentiert und die Aktivierung von T-Zellen und auch B-Zellen wird initiiert. Durch die Resektion wird die Immunantwort gegen das Xenotransplantat verlangsamt, da keine Lymphozyten gegen neue Antigene gebildet werden. Die Reifung neuer Lymphozyten kann aber auch in anderen Bereichen (z.B. Lymphknoten, Thymus) stattfinden, weshalb auch eine Thymektomie zur Verhinderung der T-Zellreifung mit anschließender Transplantation von fötalem Thymusgewebe erwogen wird (Zhao *et al.*, 2000).

Die Induktion einer Toleranz des Empfängerorganismus gegenüber dem Transplantat wäre die optimale „Immunsuppression“ im Rahmen der Xenotransplantation. Erste Modelle hierfür sind vorhanden, dennoch ist eine klinische Anwendung noch nicht absehbar (Lin *et al.*, 1998). Prinzipiell unterscheidet man eine periphere, vorübergehend wirkende Induktion von einer zentral induzierten, langfristigen Toleranz. Bei der ersteren werden immunkompetente Zellen des Spenders (PBMC oder Milzzellen) infundiert; bei letzterer werden diese entweder direkt

in den Thymus injiziert oder aber Stammzellen (Knochenmark) infundiert (Sachs *et al.*, 1995).

Bei Nagern konnte durch einen sogenannten gemischten Chimärismus (*mixed chimaerism*) eine Langzeittoleranz bei Allotransplantationen und bei konkordanten Xenotransplantationen erreicht werden. Dabei wurde vor einer Organtransplantation eine Knochenmarktransplantation vorgenommen, wobei ein Teil des Empfänger-Knochenmarks gegen das des Spenders ausgetauscht wurde. Dadurch kommen Stammzellen des Spenders und des Empfängers nebeneinander vor. Erste Studien für diskordante Schwein-zu-Affen-Xenotransplantationen führten jedoch deshalb nicht zu einem Erfolg, weil das Schweine-Knochenmark nicht vom Empfänger angenommen wurde. Dies konnte z.T. auf eine Inkompatibilität von Wachstumsfaktoren zurückgeführt werden (Sachs *et al.*, 1995; Hammer, 1998).

Bei einer Toleranzinduktion könnte das Risiko für eine Xenozoonose besonders gering sein, wenn die Toleranz nur gegen zelluläre Faktoren gerichtet ist. Dann wären die meisten Pathogene von dieser Toleranz gänzlich unberührt. Eine Sonderstellung nehmen die endogenen Retroviren ein, da eine induzierte Toleranz möglicherweise auch diese Keime mit einschließen könnte.

I.4. Xenozoonosen

I.4.1. Definition

Die Übertragung einer Infektion von einer Tierspezies auf den Menschen wird allgemein als Zoonose bezeichnet. Derartige Vorgänge treten auch in der Natur auf (Enserink, 1999; Martin *et al.*, 1999a; Enserink, 2000). Zur Abgrenzung von solchen natürlichen Übertragungen wurde der Begriff der Xenozoonose für den besonderen Fall des Transfers von Keimen vom Spendertier auf den menschlichen Empfänger bei der Xenotransplantation kreiert. Dieser Vorgang unterscheidet sich deutlich vom natürlichen Geschehen (Takeuchi, 2000): (i) Bei der Xenotransplantation erfolgt ein Transfer von Zellen an der Hautbarriere vorbei. (ii) Es werden ganze Gewebeverbände mit unterschiedlichen Zelltypen transplantiert. (iii) Das Gewebe ist zum dauerhaften Verbleib im menschlichen Körper bestimmt, d.h. es wird für eine längerfristige Exposition gesorgt, so daß ein Erreger auch die Möglichkeit zur Anpassung an den Empfängerorganismus erhält. (iv) Der Rezipient ist dauerhaft immunsupprimiert und somit empfänglicher für Infekte. (v) Die zur Unterdrückung der Komplementantwort verwendeten transgenen Tiere erleichtern möglicherweise die Ausbreitung von Erregern (Le Tissier *et al.*, 1997; Weiss, 1998a).

1.4.2. Mögliche Xenozoonosen

Zusätzlich zu den vielen Bakterien, Pilzen und Parasiten, die sowohl den gesunden Menschen als auch das Schwein befallen können, müssen im Falle einer Xenotransplantation auch solche Pathogene beachtet werden, die einem immunsupprimierten Patienten gefährlich werden könnten (Fishman, 1994). Für eine Reihe von diesen Erregern bestehen diagnostische Testsysteme, für manche ist die Pathogenität verstanden. In diesen Bereichen muß dennoch die Wissenslage weiter verbessert werden.

Gegenüber der Allotransplantation, die oftmals sehr kurzfristig organisiert werden muß, hat man bei der Xenotransplantation ausreichend Vorbereitungszeit und die Möglichkeit, optimal geeignete Spendertiere auszuwählen. Bei ihnen können durch eine spf-Haltung, die heutzutage bei der Zucht dieser Tiere schon Standard geworden ist, und durch Screening oder Behandlungen wie Impfungen oder Medikamentengabe optimale Gesundheitskonditionen hergestellt werden (Michaels & Simmons, 1994; Swindle, 1998).

Pilze und Parasiten bilden im allgemeinen keine bedeutende Gefahr, da sie meist nur lokal auftreten und nur bei einer systemischen Infektion gefährlich werden (Fishman, 1997; Fishman, 2000). Virusinfektion bei immunologisch naiven Wirten führen aber oftmals zu schwerwiegenden Erkrankungen. Obgleich Viren meist speziesspezifisch sind, kommt es gelegentlich auch zu Transspeziesübertragungen. Viele schwerwiegende Epidemien hervorgerufen durch Immundefizienz-, Influenza-, Ebola-, Hanta- und Nipah-Viren sind infolge von Zoonosen entstanden (Le Guenno *et al.*, 1995; Enserink, 1999; Webster, 1997; zum Thema Retroviren Kap. I.5.4 und Onions *et al.*, 2000). Zwar steht für viele Viren eine zuverlässige Diagnostik jedoch nur selten eine kausale Therapie zur Verfügung. Die Diagnostik ist auch meist nur im Schwein erprobt und eine mögliche Adaptation des Virus an den Menschen könnten die Testsysteme beeinflussen. Bei einer Xenotransplantation ist der Verlauf einer Virusinfektion daher kaum vorherzusagen und ein Restrisiko nur schwer auszuschließen.

Eine andere Problematik ist die mögliche Existenz von noch unbekanntem Erregern und Viren. So wurden erst kürzlich ein neues Schwein-Hepatitis-Virus (*swine HEV*; Meng *et al.*, 1997) und die sogenannten Porcinen Lymphotropen Herpesviren (PLHV-1 and PLHV-2; Ehlers *et al.*, 1999) entdeckt, so daß möglicherweise noch eine Reihe von Viren unentdeckt sind.

Als weitere übertragbare Erkrankungen sind die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSE), die auch als Prion-Erkrankungen bezeichnet werden, in letzter Zeit öffentlich vermehrt diskutiert worden. Es gibt zwar bisher keine Hinweise auf ein natürliches Vorkommen von TSE-Erkrankungen in Schweinen, es ist jedoch zu beachten, daß das allgemeine Schlachttalter der Schweine von 6 Monaten für eine Krankheitssymptomatik zu gering ist.

Allerdings läßt sich TSE durch eine experimentelle Übertragung von Geweben BSE-erkrankter Rinder in Schweinen auslösen (Ryder *et al.*, 2000). Nach dem heutigen Stand des Wissens wird die Gefahr der Übertragung durch eine Xenotransplantation als gering eingeschätzt (Onions *et al.*, 2000).

Neben den bisher beschriebenen Mikroorganismen bilden die Retroviren eine weitere Gruppe von möglicherweise pathogenen Keimen, die bei der Xenotransplantation von Bedeutung sein könnte. Sowohl bei den exogenen wie auch bei den endogenen Retroviren (Kap. I.5) sind verschiedene natürliche und experimentelle Übertragungen von einer Spezies zur anderen bekannt (Günzburg & Salmons, 2000; Denner, 2001).

I.5. Retroviren

I.5.1. Charakterisierung der Retroviren

Viren sind Mikroorganismen, die keinen eigenen Stoffwechsel aufweisen, sondern ihr Erbmateriale in fremde Zellen einschleusen und dort die Produktion von viralen Proteinen initiieren, um sich so zu reproduzieren. Man unterscheidet nach der Art des Erbmaterials DNA- und RNA-Viren. Zu der Gruppe der Viren mit RNA-Genom gehört u.a. die Gruppe der Retroviren.

Die Retroviren zeichnen sich durch ihren einzigartigen Lebenszyklus aus. Bei der Infektion schleusen sie ihr RNA-Genom in eine Zelle ein. Das virale Enzym Reverse Transkriptase (RT), eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, nutzt diese RNA als Matrize für die DNA-Synthese. Dieser DNA-Strang kann dann in das zelluläre Genom eingebaut, transkribiert und in neues, virales Protein translatiert werden. In der infizierten Zelle bilden sich unterhalb der Membran Kapside aus viralem Protein, welche das Genom sowie die notwendigen viralen Enzyme beherbergen. Durch ihre Abschnürung von der Zelle mitsamt der Zellmembran entstehen kugelförmige, membranumhüllte Viruspartikel mit einem Durchmesser von 100-200 nm (Abbildung I-2).

Das Virusgenom ist im einfachsten Fall aus vier Abschnitten aufgebaut (Abbildung I-3). Die drei Gene *gag* (*group specific antigen*), *pol* (*polymerase*) und *env* (*envelope*) werden von den *LTR*-Bereichen (*long terminal repeats*) umgeben. Diese repetitiven Sequenzen sind für die Integration des Virus in die Wirts-DNA wichtig und enthalten Promotor-, Transkriptionsaktivator- und Repressor-Sequenzen (Vogt, 1997).

Bei der Expression des Retrovirus werden diese Gene nach Aktivierung des viralen Promotors in der *LTR* abgelesen, und es werden Proteine gebildet. Es sind Polyproteine, d.h. die zunächst gebildete Polypeptidkette muß noch proteolytisch gespalten werden, um die einzelnen funkti-

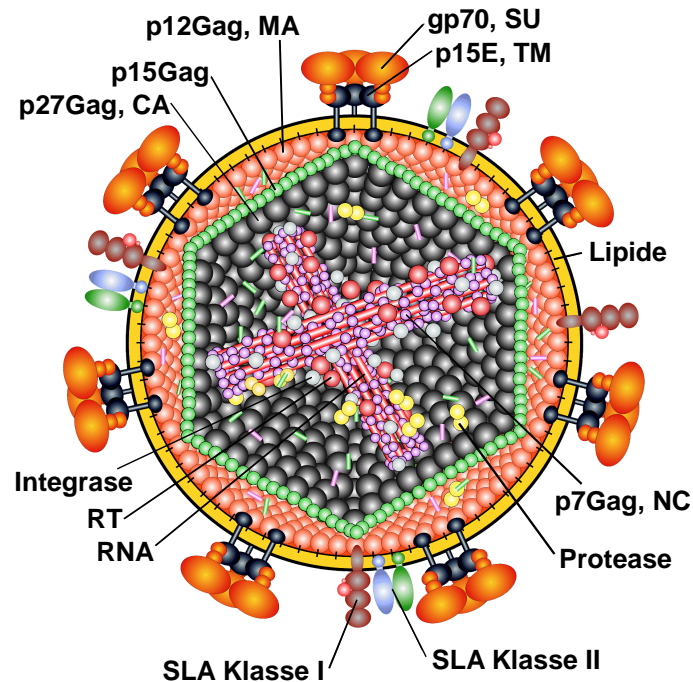


Abbildung I-2: Schematische Darstellung eines C-Typ Retroviruspartikels. Für Erläuterungen siehe Text. (modifiziert und mit freundlicher Genehmigung von Dr. Stephen Norley)

onsfähigen Proteine zu bilden. Dies geschieht durch die virale Protease (PR), welche im Pol-Protein kodiert ist und sich selbst von der Polymerase (Reverse Transkriptase, RT) und der Integrase abspalten kann. Sie spaltet nachfolgend das Gag-Polypeptid in die folgenden Strukturproteine: Matrix-Protein (MA), p15Gag-Protein, Kapsid-Protein (CA) und das Nukleokapsid-Protein (NC) (Swanstrom & Wills, 1997). Das Envelope-Protein wird in das Endoplasmatische Retikulum exportiert, so daß der transmembrane Teil des Proteins in die Membran inseriert, und anschließend durch eine zelluläre, Subtilisin-ähnliche Protease, welche die Oberflächen-(SU-) von der Transmembranen-(TM-)Untereinheit trennt, prozessiert (Garten *et al.*, 1994).

Zunächst hat man die Retroviren nach ihrer Morphologie in verschiedene Gruppen (Typ A- bis Typ D-, Lenti-, Lymphotrope Retroviren sowie Spumaviren) eingeteilt (Gelderblom, 1991). Dabei diente insbesondere die Form des Kapsids als Kriterium. Mittlerweile werden

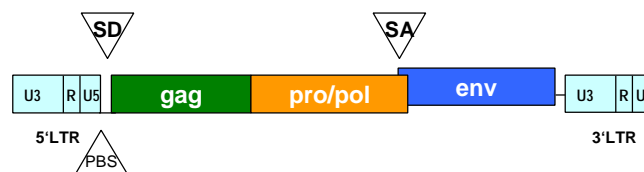


Abbildung I-3: Schematische Darstellung eines Retrovirusgenoms. Dargestellt sind die drei Hauptstrukturgene (*gag* – gruppenspezifisches Antigen, *pro/pol* – Protease/Polymerase, *env* – Hüllproteine) sowie die flankierenden, repetitiven Regionen (*ltr* – direkte terminale Sequenzwiederholungen). Die Bindungsstelle für die tRNA (*pbs* – Primerbindungsstelle) sowie die Donor (SD)- und Akzeptor (SA)-Stellen für die Prozessierung der messengerRNA (*splicing*) sind markiert (modifiziert nach Czauderna *et al.*, 2000).

auch die Morphogenese und die Struktur des retroviralen Genoms als Merkmale zur Einteilung herangezogen (Abbildung I-3; Vogt, 1997).

Da sie die tödlich verlaufende Immunschwächekrankheit AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) hervorrufen, sind die Humanen Immundefizienzviren (HIV), die zu den Lentiviren gehören, in der Bevölkerung besonders bekannt geworden. Ihre Kapside sind gestreckt bis keulenförmig, und ihr Genom umfaßt neben den Hauptstrukturgenen noch regulatorische Gene (*vif, rev, nef* etc.; Vogt, 1997).

Viele exogene Retroviren zeichnen sich durch die Typ C-Morphologie aus. Sie haben ein regelmäßiges, ikosaedrisch geformtes Kapsid und in der Regel eine einfache Genomstruktur (Abbildung I-3). In diese Gruppe gehören insbesondere die Leukämieviren der Maus (*murine leukemia virus*, MuLV) und der Katze (*feline leukemia virus*, FeLV). Da sehr viele Vertreter Tumore induzieren, wurden sie auch als Onkoviren bezeichnet (Denner, 1987; Leib-Mösch *et al.*, 1990).

1.5.2. Endogene Retroviren

Wenn ein Retrovirus eine Keimzelle oder deren Vorläuferzellen infiziert, so wird das Retrovirusgenom als Provirus an den aus dieser Keimzelle entstehenden Organismus weitergegeben. Seine Erbinformation ist dann in jeder Körperzelle enthalten und wird auch an alle Tochterorganismen weitergegeben (Boeke & Stoye, 1997). Die Verbreitung dieses Virus erfolgt somit automatisch vertikal durch Vererbung nach den Mendelschen Regeln. Ein solches Retrovirus wird als endogenes Retrovirus (ERV) bezeichnet. Aufgrund des fehlenden Selektionsdruckes (eine Expression ist zur Vermehrung nicht mehr nötig) sind sie oft degeneriert und defektiv. Einige ERVs können aber auch unter bestimmten Umständen (*in vitro* aber auch *in vivo*) exprimiert werden, d.h. Partikel bilden, und dann ausgehend von einem Individuum ein anderes Individuum infizieren und sich so horizontal vermehren (Eichberg *et al.*, 1981). Es unterscheidet sich somit aber von den üblichen Verbreitungsmechanismen für exogene Retroviren, welche sich ausschließlich horizontal verbreiten.

Wurden endogene Retroviren zuerst für die Maus beschrieben, sind heute zahlreiche ERVs in fast allen Säugetieren entdeckt worden (Boeke & Stoye, 1997). Unter anderem wurden auch eine Reihe von Humanen Endogenen Retroviren (HERVs) gefunden (Hohenadl *et al.*, 1996; Löwer *et al.*, 1996; Tönjes *et al.*, 1996).

Exprimierte endogene Retroviren können, wie alle exogenen Retroviren, andere Organismen auch über die Speziesgrenzen hinweg infizieren, und dort auch pathogen wirken (Lieber *et al.*, 1975b; Denner, 2000b). Im Organismus, in dem sie residieren, werden sie meist nicht exprimiert, d.h. sie bilden weder Partikel noch wirken sie pathogen. Möglicherweise sind sie evo-

lutionär nicht eliminiert worden, weil sie Aufgaben im Organismus übernehmen (Oostendorp *et al.*, 1993). So sind Funktionen bei der Schwangerschaft der Säugetiere diskutiert worden (Nilsson *et al.*, 1999). Ein Zusammenhang der Glucocorticoid-vermittelten Immunomodulation und einer gesteigerten Expression von endogenen retroviralen Transmembranproteinen wurde ebenfalls postuliert (Fiegl *et al.*, 1995).

Die Retroviren werden in die Gruppe der Retroelemente eingegliedert, welche noch weitere Elemente umfasst, z.B. die Retrotransposons. Sie alle haben die Fähigkeit, innerhalb des Genoms von einer Stelle an eine andere Stelle zu springen (Boeke & Stoye, 1997).

1.5.3. Porcine Endogene Retroviren

Zu Beginn der siebziger Jahre wurden zunächst im Kulturüberstand einiger Schweinezelllinien retrovirale Partikel des C-Typs gefunden (Armstrong *et al.*, 1971; Moennig *et al.*, 1974; Bouillant *et al.*, 1975) und charakterisiert (Woods *et al.*, 1973; Todaro *et al.*, 1974; Lieber *et al.*, 1975a). Erst viel später wurde erkannt, daß es sich dabei um ein exprimiertes ERV handelte, welches im Genom aller Schweine vorkommt. Auch die Annahme, diese Viren seien alle ecotrop, d.h. nur für Schweinezellen infektiös, wurde widerlegt, da es, entgegen früheren Untersuchungen, infektiös für humane Zellen ist (Le Tissier *et al.*, 1997; Patience *et al.*, 1997). Daraus ergab sich sofort die Frage nach der Sicherheit der Xenotransplantation von Schweineorganen (Kap. I.7 & I.5.4; Denner, 1999a).

Wie bereits in den ersten Untersuchungen gezeigt, handelt es sich morphologisch um Typ C-Retroviren (Armstrong *et al.*, 1971). Sequenzanalysen des Erbgutes ergaben auch die hierfür typische Genomstruktur (Abbildung I-3; Akiyoshi *et al.*, 1998; Czuderna *et al.*, 2000). Im Schweinegenom wurden zahlreiche Proviren gefunden. Darunter waren auch unterschiedliche Subtypen (als PERV-A, PERV-B und PERV-MSL bzw. PERV-C bezeichnet) die sich insbesondere im Bereich der Hüllproteine unterscheiden (Takeuchi *et al.*, 1998). Die Typen A und B werden von der Zelllinie PK 15 freigesetzt (Le Tissier *et al.*, 1997), während PERV-MSL *in vitro* bei mitogener Stimulation von Peripheren Mononukleären Lymphozyten (PBMC) des Mini-Schweins gebildet wird (Akiyoshi *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1998). Auch primäre Endothelzellen des Schweins können Viruspartikel produzieren (Martin *et al.*, 1998a). Aktuelle Ergebnisse belegen die Existenz einer Reihe von weiteren Proviren (Ericsson *et al.*, 2001; Patience *et al.*, 2001).

In den vergangenen drei Jahren wurden verschiedene Detektionssysteme entwickelt (Martignat *et al.*, 1998; Hoopes & Platt, 1999; Matthews *et al.*, 1999; Paradis *et al.*, 1999; Switzer *et al.*, 1999; Blusch *et al.*, 2000b; Galbraith *et al.*, 2000; Stephan *et al.*, 2001), verschiedene Eigenschaften von PERV untersucht (Denner, 1998; Nyberg *et al.*, 1999; Rogel-

Gaillard *et al.*, 1999; Tönjes, 1999; Czauderna *et al.*, 2000; Falasca *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2000) und zahlreiche Tierversuche zur Evaluation der Sicherheit durchgeführt (Heneine *et al.*, 1998b; Martin *et al.*, 1998b; Berg, 1999; Martin & Steinhoff, 1999; Martin *et al.*, 1999b; Blusch *et al.*, 2000a; Deng *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2000; van der Laan *et al.*, 2000; Specke *et al.*, 2001).

1.5.4. Transspeziesübertragung von exogenen und endogenen Retroviren

Die bekannteste dieser Transspeziesübertragungen exogener Retroviren ist die Infektion von Menschen mit dem Simianen Immundefizienzvirus SIV_{cpz} des Chimpansen (*chimpanzee*, *Pan troglodytes*; Gao *et al.*, 1999) bzw. SIV_{sm} der Mangaben (*sooty mangabey*, *Cercocebus atys*; Gao *et al.*, 1992). Diese sind bei diesen Affen apathogen, im Menschen rufen sie jedoch als Humane Immundefizienzviren HIV-1 bzw. HIV-2 die tödliche Immunschwächekrankheit AIDS hervor. Daher muß vor dem Einsatz von Xenotransplantaten unbedingt sichergestellt werden, daß geeignete diagnostische Methoden für das Screening der Spendertiere zur Verfügung stehen, um eine Xenozoonose auszuschließen.

Endogene Retroviren (Kap. I.5.2) sind fest im Genom verankert und daher nicht durch Screening, Vaccinierung oder medikamentöse Behandlung zu eliminieren. Da sie aber z.B. bei Mäusen (*murine endogenous retrovirus*) und bei Pavianen (*baboon endogenous retroviruses*, BaEV) unter bestimmten Bedingungen freigesetzt werden können (Eichberg *et al.*, 1981; Löwer *et al.*, 1996; Boeke & Stoye, 1997), stellen sie eine besondere Gefährdung im Rahmen der Xenotransplantation dar. Es sind eine Reihe von Transspeziesübertragungen dieser exprimierten, endogenen Retroviren bekannt. So wurde beispielsweise ein apathogenes endogenes Retrovirus der Maus (*Mus caroli*) auf natürlichem Wege auf den Gibbonaffen übertragen, wo es nachfolgend Leukämien hervorrufen kann (*gibbon ape leukemia virus*, GALV; Lieber *et al.*, 1975b; Denner, 2000b).

Da das Infektionsrisiko und das pathogene Potential solcher endogenen Retroviren nach Transspeziesübertragung kaum vorherzusagen ist, aber die bekannten Fälle das Ausmaß der Gefährdung zeigen, müßten *knock out*-Schweine entwickelt werden, um jedes Risiko zu eliminieren. Dies ist aber aus heutiger Sicht nahezu unmöglich, da zum einen die *knock out*-Technik für Schweine noch nicht zur Verfügung steht. Zum anderen liegen sehr viele retrovirale Sequenzen (es werden bis zu 50 Kopien geschätzt; Le Tissier *et al.*, 1997) im Genom vor, die alle identifiziert, lokalisiert und nacheinander aus dem Genom entfernt werden müßten. In diesem Zusammenhang hat die Entwicklung der Klonierungstechnik für Schweine kürzlich für Aufsehen gesorgt, weil diese eine Voraussetzung für *knock out*-Verfahren ist (Onishi *et al.*, 2000; Polejaeva *et al.*, 2000).

Daher wird man PERV lediglich als exprimiertes Retrovirus wie bei den anderen exogenen Retroviren an einer Infektion hindern können. Dabei kann auf die konventionellen Methoden zur Abwehr der Infektion wie z.B. Vaccinierung, Antikörper-Therapie oder direkte anti-virale Therapie (Inhibitoren der Reverse Transkriptase und der viralen Protease oder Infektionsinhibitoren; Flexner, 1998; Michael & Moore, 1999) zurückgegriffen werden. Darüber hinaus müssen die Gefahren in diesem Fall experimentell durch *In vitro*-Studien, aber auch durch *In vivo*-Untersuchungen mit geeigneten Tiermodellen, die möglichst nahe am Menschen liegen (z.B. nicht-humane Primaten), untersucht werden. Da auch hier aus Gründen des Tierschutzes und der Ethik Versuche an Menschenaffen ausscheiden, werden die Paviane für die Evaluation von Sicherheitsfragen als Modellspezies, die immunologisch und physiologisch möglichst nahe am Menschen liegt, eingesetzt (Martin *et al.*, 1998b; Blusch *et al.*, 2000a; Specke *et al.*, 2001).

I.6. Pathogenese retroviraler Erkrankungen

I.6.1. Tumore und Immunschwächen

Bei retroviralen Infektionen unterscheidet man im wesentlichen drei Typen von Erkrankungen: (i) proliferative-neoplastische, (ii) degenerative und (iii) Immundefizienzerkrankungen (Hardy, 1982; Denner, 1987)

Die Infektion einer Zelle durch einen Retrovirus hat nur in seltenen Fällen einen direkten pathogenen Effekt auf diese Zelle. Auch die Produktion der Virusnachkommen ist nicht unmittelbar letal. Bei der Integration des retroviralen Genoms als Provirus in das Erbgut einer Zelle, kann es aber durch Insertionsmutagenese zur Inaktivierung zellulärer Gene, darunter Tumorsuppressorgene, kommen. Auch können dadurch zelluläre Gene aktiviert werden, wobei es zur Aktivierung von zellulären Proto-Onkogenen kommen kann (Barker *et al.*, 1991). In verschiedenen Tiermodellen wurde diese Tumorentstehung nachgewiesen (Fan, 1994). Darüber hinaus tragen auch eine Reihe von Retroviren Onkogene in ihrem Genom, deren Expression Tumore auslösen (Leib-Mösch *et al.*, 1990).

Neben diesen neoplastischen Effekten rufen Retroviren auch proliferationsinhibierende Erkrankungen, insbesondere Anämien und Atrophien lymphoider Zellen sowie degenerative Erkrankungen des zentralen Nervensystems hervor (Hardy, 1982).

Über diese onkogenen und degenerativen Effekte hinaus treten bei retroviralen Infektionen weitergehende Defekte des Immunsystems auf, welche als Immunschwächeerkrankungen bezeichnet werden. Das wohl bekannteste Beispiel hierfür ist das durch das Lentivirus HIV hervorgerufene AIDS. Obgleich sich Typ C-Retroviren in Morphologie und Genomstruktur

von den Lentiviren unterscheiden, zeigen beispielsweise auch die murinen oder felines Leukämieviren parallel zu den onkogenen Eigenschaften starke immunmodulatorische Wirkungen (Botti *et al.*, 1998). FeLV-infizierte Katzen sterben nur zu einem geringen Prozentsatz an einer Leukämie, wie es der Name des Virus vermuten ließe. Die überwiegende Mehrheit der erkrankten Tiere stirbt an opportunistischen Infektionen, wie dies für Immundefizienzviren typisch ist (Hardy, 1982; Denner, 2000b).

1.6.2. Mechanismus der Immunsuppression durch Retroviren

Da bei retroviralen Infektionen die Immunschwächen häufiger als onkogene Erkrankungen auftreten, wurde der Mechanismus der Immunsuppression vielfach untersucht. Die Pathogenese dieser Immundefizienzen ist aber noch immer nicht vollständig verstanden (Denner *et al.*, 1993). Nach einer vielfach vertretenen Arbeitshypothese sind die viralen Proteine für die immunsuppressive Wirkung der Retroviren maßgeblich verantwortlich (Denner, 1987; Fauci, 1988; Cohen *et al.*, 1997). Eine These, die gut mit den beobachteten Verlauf der Viruslast im HIV-Infizierten korreliert (Pantanleo *et al.*, 1993). Da *In vivo*-Modelle noch nicht zur Verfügung stehen, werden zahlreiche *In vitro*-Untersuchungen durchgeführt, wobei die Inhibition der mitogeninduzierten Proliferation von Zellen und die Modulation von Cytokin-Expressionsmustern als gängige Standardtests etabliert sind (Phillips *et al.*, 1975; Hebebrand *et al.*, 1977; Mathes *et al.*, 1978; Haraguchi *et al.*, 1995a).

Die sogenannte Protein-Hypothese (Denner, 2000a) wurde Ende der siebziger Jahre aufgestellt, als gezeigt wurde, daß inaktiviertes FeLV die mitogeninduzierte Proliferation von Lymphozyten der Katze inhibiert (Hebebrand *et al.*, 1977). Auch intakte und inaktivierte Viruspräparationen verschiedener Retroviren (Denner *et al.*, 1980; Denner *et al.*, 1985a; Denner *et al.*, 1985b; Denner *et al.*, 1986a), sowie aus Viruspräparationen gereinigtes TM-Protein der C-Typ Retroviren (Mathes *et al.*, 1978; Mathes *et al.*, 1979; Neil *et al.*, 1980) bzw. anderer Retroviren wie HIV (Pahwa *et al.*, 1985) zeigte diese Proliferationsinhibition von immunkompetenten Zellen. Es wurden auch weitere Effekte identifiziert, darunter z.B. auch die Inhibition der Makrophagen-Akkumulation bei Entzündungsreaktionen *in vivo* (Cianciolo *et al.*, 1980; Haraguchi *et al.*, 1997). Da nahezu alle Retroviren ein immunsuppressives Potential aufweisen, wurden ihre Gemeinsamkeiten untersucht. Die immunsuppressive Aktivität könnte einer bei allen Retroviren hochkonservierten Domäne des transmembranen Hüllproteins zugeordnet werden (Abbildung I-4), welche als immunsuppressive Domäne (isu-Domäne) bezeichnet wurde (Denner *et al.*, 1986b; Denner *et al.*, 1993; Denner *et al.*, 1994). Danach wurde verstärkt mit synthetischen Peptiden, wobei das der immunsuppressiven Domäne der Typ C-Retroviren entsprechende Peptid oft als CKS-17 bezeichnet wird (Cianciolo *et al.*,

1985), und rekombinant exprimiertem Protein gearbeitet (Schmidt *et al.*, 1987; Shugars *et al.*, 1996; Berg, 1999).

Insbesondere mit Peptiden, die von dieser immunsuppressiven Domäne abgeleitet sind (Abbildung I-4), wurde eine Reihe weiterer Aktivitäten der TM-Proteine entdeckt, welche sich vielfach mit Beobachtungen in infizierten Tieren bzw. Patienten decken (Wang *et al.*, 1995). So wurde nicht nur die Hemmung der Mitogen-, Alloantigen- oder IL 2-stimulierte Proliferation von Lymphozyten nachgewiesen (Cianciolo *et al.*, 1985; Cianciolo *et al.*, 1988; Ruegg *et al.*, 1989a; Ruegg *et al.*, 1989b; Denner *et al.*, 1996), sondern auch die Inhibition der Aktivität von Natürlichen Killerzellen und von Cytotoxischen T-Lymphozyten (Harris *et al.*, 1987; Ogasawara *et al.*, 1990). Ferner konnten Auswirkungen in den Bereichen der Signaltransduktion von lymphoiden Zellen (Oostendorp *et al.*, 1992a; Oostendorp *et al.*, 1992b), bei der Aktivität der Proteinkinase C (Ruegg *et al.*, 1990) bzw. der Calcium-Ionen-Verteilung (Ruegg & Strand, 1990b; Ruegg & Strand, 1991), und der Expression von Cytokinen nachgewiesen werden (Kleinerman *et al.*, 1987; Haraguchi *et al.*, 1992a; Haraguchi *et al.*, 1992b; Haraguchi *et al.*, 1993; Haraguchi *et al.*, 1995a; Haraguchi *et al.*, 1995b; Haraguchi *et al.*, 1997). Letztere Beobachtung hat zu der Hypothese geführt, daß die immunsuppressive Wirkung nicht nur direkt, sondern auch indirekt durch eine Modulation der Cytokin-Sekretionsmuster bestimmter Zellen vermittelt werden könnte (Haraguchi *et al.*, 1997).

Ein sehr interessanter Ansatz, um die lokale Immunsuppression durch transmembrane Hüllproteine nachzuweisen, ist die Expression von TM auf Tumorzellen der Maus. Normalerweise werden diese Zellen vom Immunsystem der Maus nach subcutaner Injektion eliminiert. Injiziert man jedoch Zellen, die p15E(MuLV) auf ihrer Oberfläche exprimieren, bilden diese Tumore wie in immuninkompetenten Mäusen (Mangeny & Heidmann, 1998). Dies verdeutlicht die lokale Unterdrückung der Immunreaktionen durch dieses Protein *in vivo*.

Interessant ist ebenfalls, daß eine Reihe von Proteinen, die auf den ersten Blick keine Verwandtschaft mit dem retroviralen Transmembranprotein haben, dennoch ähnliche Funktionen oder Sequenzen zeigen. Obwohl die Sequenzhomologie vergleichsweise gering ist, konnten die räumlichen Strukturen der retroviralen TM-Proteine mit Hilfe der bekannten Struktur des Hämagglutinins, des Transmembranproteins des Influenza-Virus, gelöst werden (Fass *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 1997; Weissenhorn *et al.*, 1997). Für das Transmembranprotein LMP1 des Epstein-Barr Virus, ein γ -Herpesvirus, wurden ebenfalls immunmodulatorische Effekte beschrieben (Dukers *et al.*, 2000). Das Nef-Protein von HIV hat einen zur isu-Domäne homologen Bereich und inhibiert die Proliferation von PBMC und moduliert die Expressionmuster der Cytokine *in vitro* (Collette *et al.*, 1996), obgleich es keine den TM-Proteinen vergleichba-

re Struktur oder Funktion zu besitzen scheint. Interferone, die Aufgaben in der interzellulären Regulation haben, weisen zwei Bereiche mit hoher Homologie zur immunsuppressiven Domäne auf, wobei einer dieser Bereiche besonders zu p15E der Typ C-Retroviren homolog ist während der zweite Abschnitt dem TM-Protein von Lentiviren ähnelt (Abbildung I-4). Für sie wurden immunsuppressive Eigenschaften und immunologische Verwandtschaften zu TM-Proteinen nachgewiesen (Ruegg & Strand, 1990a; Seibold *et al.*, 2001).

Hinzu kommt, daß die immunsuppressive Domäne und die flankierenden Bereiche des transmembranen Hüllproteins weitere Funktionen ausüben. So scheinen diese Bereiche für den Infektionsprozeß bedeutsam zu sein (Wild *et al.*, 1994b), und Mutationen führen zu Veränderungen der Infektiösität (Wild *et al.*, 1992), der Fusionseigenschaften (Dubay *et al.*, 1992; Denesvre *et al.*, 1995; Gatot *et al.*, 1998) oder auch der Reifung bzw. Abknospung von der Zelle (Brody & Hunter, 1992; Burns *et al.*, 1995). Vermittelt werden diese Funktionen durch das C-terminale R-Peptid, welches zur Herstellung der Fusogenität bei der Partikelreifung abgespalten wird, bzw. durch das Fusionspeptid am N-Terminus des TM Proteins, welches vermutlich in die Zellmembran integriert und so die Fusion von Virus- und Zellmembran einleitet (Green *et al.*, 1981; Ragheb & Anderson, 1994; Zhu *et al.*, 1998). Eine weitere wichtige Domäne ist die sogenannte immundominante Domäne (ido) die aufgrund einer intramolekularen Cystein-Cystein-Schleife sehr immunogen ist (Gnann *et al.*, 1987; Viveros *et al.*, 2000).

Über den Wirkungsmechanismus dieser Proteine bzw. Peptide ist bisher wenig bekannt. Die Struktur ist bei Proteinen naturgemäß für ihre Funktion entscheidend. Im bzw. auf dem Viruspartikel liegen die TM-Proteine als Trimere vor (Fass *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 1997; Weissenhorn *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2000), wobei die Ektodomäne des transmembranen Proteins eine Leucin-Zipper-Struktur annimmt (Delwart *et al.*, 1990; Li *et al.*, 1996; Ramsdale *et al.*, 1996). Allerdings kommt es beim Vorgang der Infektion zu einer Konformationsänderung des TM-Proteins, von einer gestreckten Form, in der die Proteine auf einem reifen Viruspartikel zusammen mit den SU-Proteinen vorliegen, zu einer fusionskompetente Form, bei der die SU-Einheit abgelöst ist, das C-terminale Fusionspeptid des TM-Proteins exponiert vorliegt und der Abstand zwischen Zell- und Virusmembran verkürzt ist (Wild *et al.*, 1994a; Binley & Moore, 1997). Es ist daher nicht eindeutig geklärt, in welcher Konformation die isu-Domäne vorliegen muß, um ihre immunsuppressive Wirkung zu entfalten. Die Peptide werden daher an ein Trägerprotein gekoppelt, um die Möglichkeit zu erhalten, die notwendige Multiplizität und Konformation zu erreichen (Ruegg *et al.*, 1989b).

PERV-A	532	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L	C
PERV-B	529	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	R	E	G	G	L	C
PERV-C	511	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L	C
PERV-MSL	511	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L	C
GALV	559	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L	C
MuLV	538	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L	C
FeLV	514	L	Q	N	R	R	G	L	D	I	L	F	L	Q	E	G	G	L	C
BaEV	440	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	T	A	E	Q	G	G	I	C
HTLV-I	376	A	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	W	E	Q	G	G	L	C
HIV-1	576	L	Q	A	R	I	L	A	V	E	R	Y	L	K	D	Q	Q	L	L
HIV-2	575	L	Q	A	R	V	T	A	I	E	K	Y	L	Q	D	Q	A	R	L
nef (HIV-1)	80	M	T	Y	K	A	A	V	D	L [#]	H	F	L	K	E [*]	G	G	L	E
hum. IFN- α 1	9	L	D	N	R	R	T	L	M	L	L	-	A	Q	M	S	R	I	S
hum. IFN- α 1	113	N	A	D	S	I	L	A	V	K	K	Y	F	R	R	I	T	L	Y

Abbildung I-4: Sequenzvergleich der immunsuppressiven Domänen von PERV mit denen anderer Retroviren. Identische Aminosäuren sind dunkel-grau unterlegt, konservierte Austausche zwischen polar-geladenen, polar-ungeladenen oder unpolaren Seitenketten sind hell-grau unterlegt. GenBank-Nummern: PERV-A, Y12238; PERV-B, Y12239; PERV-C, AF038600; PERV-MSL(Tsukuba-1), AF038599; FeLV, M18247; MuLV, J02255; GALV, M26927; BaEV, 218569; HTLV-I, J02029; HIV-1, K03455; HIV-2, M15390; nef, K03455; humanes IFN- α 1 G69653. – Deletion, [#]Insertion: Serin, ^{*}Insertion: Lysin.

Um den Wirkungsmechanismus zu beleuchten, wurden bereits Bindungsproteine für die isu-Domäne von HIV bzw. von Typ C-Onkoviren gesucht, welche einen Effekt vermitteln könnten. Dabei sind eine Reihe von potentiellen Rezeptorproteinen auf lymphoiden Zellen gefunden worden, jedoch konnten bisher keine Funktionen oder Signaltransduktionswege identifiziert werden (Qureshi *et al.*, 1990; Kizaki *et al.*, 1991; Ebenbichler *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1995; Denner, 1995; Ebenbichler *et al.*, 1996; Speth *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000).

I.7. Wissenschaftliche und gesellschaftliche Diskussionen

Die mögliche Gefährdung des Transplantatempfängers durch eine Transspeziesübertragung von Krankheitserregern, insbesondere durch PERV, hat zu weitreichenden wissenschaftlichen und gesellschaftlichen Diskussionen geführt (Hughes, 1998; Cruz *et al.*, 2000). Erörtert wurde dabei auch ein mögliches epidemiologisches Risiko, da ausgehend von einer Übertragung eines pathogenen Keims auf den Rezipienten und einer möglichen Anpassung des Keimes an den Menschen als Wirt, das Risiko einer fortschreitenden Infektion in der Bevölkerung besteht. Die negativen Erfahrungen mit Epidemien nach Transspeziesübertragungen anderer immunsuppressiver Retroviren, speziell mit SIV/HIV, hat die Diskussion intensiviert und auch emotionalisiert. Eine weitere Problematik, die allerdings noch wenig untersucht und diskutiert wurde, ist die Infektion des Empfängers mit pathogenen Erregern der Spenderspe-

zies, die für den Menschen apathogen sind, aber das Transplantat nach der Xenotransplantation infizieren können.

Die Forderungen, die in den vielfältigen Diskussionen gestellt wurden, reichten von einem Appell an das Sicherheitsbewußtsein der beteiligten Forscher und Mediziner, über die Forderung nach einem vorübergehenden Aufschub der präklinischen und klinischen Studien der Xenotransplantation, bis hin zu einem vollständigen Verbot jeglicher Xenotransplantationen oder gar einem prinzipiellen Umdenken im medizinischen Verständnis bei der Gestaltung der Zukunft (Murphy, 1996; Williams, 1997; Bach *et al.*, 1998; Butler, 1998).

Im Zuge der wissenschaftlichen Diskussion und öffentlicher Aufklärung, wurden von den verantwortlichen administrativen Stellen verschiedene Gremien mit dem Ziel ins Leben gerufen, Regeln zum Umgang mit der Xenotransplantation und deren Gefahren aufzustellen (DHHS, 1996; WHO, 1998; Bundesärztekammer, 1999; UKXIRA, 1999). In Deutschland wurde unter anderem die Deutsche Arbeitsgemeinschaft Xenotransplantation (DAX) geschaffen, in der Naturwissenschaftler, Ärzte, die Pharma-Industrie und zulassende Behörden zusammen den Umgang mit den Problemen und die Gestaltung von Leitlinien erörtern (Denner, 1999b).

In der Regel wurde in den verschiedenen Leitlinien einerseits zu verstärkter Forschung der Bio- und Medizinwissenschaften im Bereich der Infektionsgefährdung, -prävention, Diagnostik und Physiologie der in der Xenotransplantation auftretenden Pathogene aufgefordert. Andererseits wurden vorübergehend weitere präklinische und klinische Studien eingeschränkt, bis konkrete Aussagen über die Sicherheit dieser Methode gemacht werden können. Hierzu wurde die Charakterisierung der Pathogene verstärkt und damit einhergehend Tiermodelle, insbesondere nicht-humane Primatenmodelle, für *In vivo*-Untersuchungen geschaffen. In diesem Kontext wurde auch die hier vorliegende Studie begonnen.

II. ZIELSETZUNG

Im Vorfeld dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß es Porcine Endogene Retroviren (PERV) gibt und das diese Viren menschliche Zellen *in vitro* infizieren können. Das Ziel der vorliegenden Studie ist es nun, PERV näher zu charakterisieren und mögliche Gefahren einer Transspeziesübertragung im Zusammenhang mit der Xenotransplantation, der Transplantation von Schweineorganen in den Menschen, zu untersuchen.

Um den Reifungszustand und die Verwandtschaft zu anderen Retroviren zu bestimmen, sollten die Viren gereinigt, morphologisch typisiert und die viralen Proteine biochemisch und immunologisch charakterisiert werden. Basierend darauf sollten immunologische Detektionssysteme etabliert werden, damit diese in ersten präklinischen und klinischen Xenotransplantationsstudien eingesetzt werden konnten, um eine mögliche Virusinfektion von Versuchstieren bzw. Patienten nachzuweisen. In diesem Rahmen sollten auch eine Reihe verschiedener neuer, virusspezifischer Antiseren generiert werden, die sensitive Detektionsmöglichkeiten und eine Basis für weitere Testsysteme bilden. Dadurch sollten die notwendigen Testverfahren zur Identifikation von Infektionen nach Xenotransplantationen bei weiteren präklinischen und zukünftigen ersten klinischen Studien zur Verfügung gestellt werden.

Zur Evaluierung der biologischen Eigenschaften von PERV sollte der Wirtsbereich des Virus durch verschiedene *In vitro*-Infektionsstudien mit etablierten Zelllinien und unterschiedlichen primären Zellen verschiedener Spezies analysiert werden. Darauf aufbauend sollte eine möglicherweise als *In vivo*-Tiermodell geeignete Tierspezies identifiziert werden. In diesem Zusammenhang war auch die Expression von PERV aus Geweben des Schweins von Interesse.

In früheren Untersuchungen wurden die immunsuppressiven Eigenschaften, die bei Retroviren beobachtet werden, auf einen Bereich des transmembranen Hüllproteins (isu-Domäne) zurückgeführt. Daher sollte die proliferationshemmende Wirkung von PERV und von PERV abgeleiteter synthetischer Peptide *in vitro* untersucht werden, um eine mögliche Gefährdung eines Xenotransplantatrezipienten durch ein immunsuppressives Potential von PERV bei einer Infektion zu evaluieren.

III. MATERIAL UND METHODEN

III.1. Zellbiologische Methoden

III.1.1. Kulturbedingungen

Die Kultivierung von Zellen erfolgte generell bei 37°C in einem Cytoperm-Inkubator (Heraeus, Hanau) bei einer CO₂-Konzentration von 5% und 98% Luftfeuchtigkeit. Adhärenz Zellen wurden in Dublecco's Modified Minimal Essential Medium (DMEM-Medium) und Suspensionszellen in RPMI 1640-Medium gehalten. Die Medien wurden mit folgenden Substanzen supplementiert (Endkonzentrationen in Klammern): Fötalem Kälberserum (FKS, Seromed, 10%), HEPES (10 mM), Glutamin (1 %), Neomycin (100 µg/ml), Streptomycin (100 µg/ml) und Penicillin (100 U/ml).

Primäre Zellen wurden mit folgenden Mitogenen stimuliert: Concanavalin A (ConA, Sigma, Deisenhofen), Phytohämagglutinin (PHA, Murex Biotech, Dartford, England), Tetradecanoylphorbolacetat (TPA, Sigma, Deisenhofen) oder rekombinantes humanes Interleukin-2 (IL-2, EuroCetus, Ratingen). Die Medien wurden regelmäßig 2-3 mal wöchentlich erneuert. Konfluente Kulturen adhärenz Zellen wurden durch Inkubation mit Trypsinlösung (0,12% in PBS/Versen 1:1) vom Träger abgelöst, resuspendiert und ein Teil rekultiviert.

Die Bestimmung der Zellzahl und die Kontrolle der Viabilität erfolgte durch den Trypan-Blau-Ausschluß-Test (Fong & Kissmeyer-Nielsen, 1972). Hierzu wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl einer 5%igen ethanolischen Trypan-Blau-Lösung (Sigma) versetzt und im Phasenkontrast-Mikroskop in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

In der Tabelle III-1 sind die verwendeten immortalisierten Zelllinien aufgeführt. Die römische Numerierung der 293-Zellen weist darauf hin, daß es sich um mit PERV infizierte Zellen handelt, die ursprünglich durch Virus aus PK 15-Zellen infiziert wurden (293/I; Le Tissier *et al.*, 1997). Durch Virus dieser infizierten 293/I-Zellen wurden uninfizierte 293-Zellen erneut infiziert, so daß das Virus passagiert wurde (293/II). Eine erneute Passage ergab 293/III. Im Gegensatz dazu weist die arabische Numerierung auf Zellen hin, die ursprünglich durch Virus aus stimulierten PBMC von Schweinen infiziert wurden (293/1; Wilson *et al.*, 1998). Dabei handelt es sich um Pseudotyp-Konstrukte, die mit Antibiotika-Selektionsmarkern und dem β -Galaktosidase-Gen ausgestattet sind (Panicali *et al.*, 1986; Wilson *et al.*, 2000). Durch Virus dieser infizierten 293/1-Zellen wurden uninfizierte 293-Zellen erneut infiziert, so daß das Virus passagiert wurde (293/2). Eine weitere sequentielle Passage ergab 293/3, wobei der Selektionsdruck durch die Antibiotika aufrecht erhalten wurde. Auf dieser Ebene wurde der Selektionsdruck aufgehoben, so daß der Pseudotyp vom „Wildtyp“ verdrängt wurde. Eine

β -Galaktosidase-Färbung zeigte, daß in den verwendeten 293/3-Zellen keine Pseudotyp-Konstrukte mehr nachweisbar waren. Eine weitere Passage ergab 293/4.

Tabelle III-1: Verwendete Zelllinien.

Linie	Virus	Spezies	Gewebe	Morphologie	Collection
PK 15	PERV/PK	Schwein	adulte Niere	epithelial	ATCC CCL-33
293	---	Mensch	embryonal, Niere (Adenovirus transformiert)	epithelial	ATCC CRL-1573
293/I...293/III [†]	PERV/I...III		(ser. Passagen von Virus aus PK 15-Zellen infiziert)		
293/3...293/4 [†]	PERV/3...4		(ser. Passagen von Virus aus stimulierten PBMC)		
293T	---	Mensch	embryonal, Niere (T-Antigen)	epithelial	---
C8166	---	Mensch	T-Zelle (leukämisch)	lymphoid	ECACC
THP-1	---	Mensch	Monozyten (leukämisch)	lymphoid	ATCC TIB-202
CTL-6	---	Maus	T-Zelle	lymphoid	--- §
FEM	FLV	Maus	embryonal (Balb3T3-Maus)	fibroblastoid	--- **
NIH 3T3	---	Maus	embryonal	fibroblastoid	ATCC CRL-1658
rat2	---	Ratte	embryonal	fibroblastoid	ATCC CRL-1764

III.1.2. Präparation von primären Zellen

Primäre mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden aus heparinisiertem Vollblut von Ratten, Pferden, Pavianen, Afrikanischen Grünen Meerkatzen (AGM), Cynomolgen, Rhesusaffen und Schweinen durch ein Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Kissen (Histopaque 1077, Sigma) präpariert. Humane PBMC wurden aus Vollblut oder Buffy-Coats ohne Plasma (Blutbank des Deutschen Roten Kreuzes, Frankfurt) gewonnen. Vollblut der Affen wurde vom Deutschen Primatenzentrum (Göttingen), das Blut von Pferden vom Gut „Der Kronenhof“ (Langen) zur Verfügung gestellt. PBMC von Schweinen wurde aus Blut von Schweinen der Deutschen Landrasse (Paul-Ehrlich-Institut) und von Mikro-Schweinen (Paul-Ehrlich-Institut & Charles-River, Saint-Aubin-Lès-Elbeuf, Frankreich; Sachs, 1992) bezogen. Zur Entfernung von kontaminierenden Erythrozyten wurden die Zellen mit Ammoniumchlorid für 30 min bei 37°C behandelt (Pelegri *et al.*, 1995).

Primäre Gewebekulturen der Ratte wurden von Milz und Niere angelegt. 10 Tiere (Wistar) wurden mit Metofane (Janssen-Cilag, Neuss) narkotisiert, ausgeblutet und beide Nieren sowie die Milz präpariert.

[†] 293/I-Zellen wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. R. A. Weiss (Wohl Virion Centre, University College, London, GB) überlassen. 293/3-Zellen hat Dr. C. A. Wilson (Food and Drug Administration, Bethesda, MA, USA) zur Verfügung gestellt.

[§] (Denner *et al.*, 1994)

^{**} FEM-(Friend-Evelyne-Monolayer-)Zellen sind uns freundlicherweise von Dr. H.-J. Thiel (Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen) zur Verfügung gestellt worden.

Die Milz wurde durch ein feines Sieb homogenisiert. Die Suspensionszellen wurden in PBS gewaschen, zentrifugiert und mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in RPMI-Medium kultiviert. Sie wurden am Tag der Präparation durch Zugabe von PHA (70 $\mu\text{g/ml}$) und ab Tag 3 mit IL-2 (100 U/ml) stimuliert.

Die Nieren wurden in kleinen Stücken in eine 0,25%ige Trypsinlösung in PBS überführt und bei 37°C für drei Zyklen von je 20 min unter leichtem Rühren inkubiert. Die Zellsuspension wurde jeweils abgenommen und die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen/ml in DMEM-Medium kultiviert.

III.1.3. Proliferationsassays

Die Proliferationsaktivität von stimulierten PBMC wurde durch die Inkorporation von ^3H -markiertem Thymidin in die DNA gemessen (Phillips *et al.*, 1975). Hierzu wurden PBMC in 96-Loch Mikrotiterplatten (Becton Dickinson, Heidelberg) mit flachen Böden mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml in RPMI-Medium kultiviert. Dem Medium wurde als Mitogen ConA (Sigma) in zuvor optimierter Endkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben. Proliferationsinhibierende Substanzen wie die Peptid-Konjugate (Kap. III.3.5), wurden in serieller Verdünnung (Verdünnungsschritte 1:2) zugegeben. Nach 4 Tagen Inkubation wurde 1 $\mu\text{l/well}$ ^3H -Thymidin (Amersham Pharmacia, Freiburg) entsprechend 37 kBq zugegeben. Die Zellen wurden 24 Stunden danach in einem 96-Loch-Cell Harvester (Inotech, Dottikon, Schweiz) durch Nylonfilter gesaugt, so daß die DNA auf dem Filter verblieb. Inkorporiertes Tritium wurde in einem β -Counter (Inotech) gemessen. Alle Messungen wurden als Triplikate angefertigt. Als Kontrollen wurden eine Meßreihe mit stimulierten und eine mit unstimulierten Zellen verwendet. Die Ergebnisse wurde in „Prozent Proliferation“ ausgedrückt:

$$\text{Proliferation(\%)} = \frac{\text{cpm}(\text{PBMC}_{\text{stimuliert}} + \text{Konjugat}) - \text{cpm}(\text{PBMC}_{\text{unstimuliert}})}{\text{cpm}(\text{PBMC}_{\text{stimuliert}}) - \text{cpm}(\text{PBMC}_{\text{unstimuliert}})} \times 100$$

Die Mitogenkonzentrationen wurden in Dosis-Effekt-Kurven optimiert. Die Viabilität der Zellen wurde durch einen Trypan-Blau-Test überprüft (Kap. III.1.1).

Es wurden auch CTL-6-Zellen für Proliferationsassays verwendet. Abweichend vom beschriebenen Protokoll, wurden diese in einer Zelldichte von 3×10^5 Zellen/ml eingesetzt und mit 12,5 U/ml IL-2 stimuliert. Die Zugabe von ^3H -Thymidin erfolgte nach 18 h Inkubation.

Stimulationsassays wurden als Dosis-Effekt-Kurven zur Optimierung der Mitogenkonzentration in Form eines Proliferationsassays mit sequentieller Ausverdünnung der mitogenen Substanz durchgeführt. Die Ergebnisse der ^3H -Thymidin-Inkorporation wurden um die Inkorporation in nicht stimulierte Zellen (Kontrollreihe) korrigiert. Alternativ oder parallel zur

Messung der Proliferation der Zellen wurde auch die Aktivität der RT im Kulturüberstand nach 4 bis 5 Tagen gemessen, um die Freisetzung von Viruspartikeln zu bestimmen.

Es wurden auch Stimulationsassays mit Ausverdünnung zweier Mitogene in 2 Dimensionen durchgeführt. Dazu wurde in getrennten 96-Loch-Platten je ein Mitogen vertikal bzw. waagrecht ausverdünnung und in einer dritten Platte die Mitogenverdünnungen vereinigt, so daß jede Vertiefung eine unikale Kombination an Konzentrationen der beiden Mitogene erhält. Schließlich wurden Zellen zugegeben und die ^3H -Thymidin-Inkorporation oder die Aktivität der RT im Kulturüberstand gemessen.

III.1.4. Infektionsversuche

Um Zellen auf ihre Suszeptibilität für eine Infektion mit PERV zu untersuchen, wurden sie dem Virus exponiert. Es wurden verschiedene Virusquellen verwendet:

a) Infektion mit virushaltigem Überstand

Zur Infektion wurden nicht infizierte Zellen mit Kulturüberständen von virusproduzierenden Zellen kultiviert. Zur Vermeidung zellulärer Kontaminationen wurde der frisch abgenommene Überstand über 0,45 μm -Spritzenvorsatzfilter mit Polyvinylidenfluorid-Membran (Millipore, Bedford, MA) filtriert. In der Regel wurde 2-3 Tage inkubiert.

b) Infektion mit präpariertem Virus

Es wurden auch Infektionsversuche mit präpariertem Virus durchgeführt. Dafür wurde das Virus durch Gradientenzentrifugation gereinigt (Kap. III.2.1) oder durch Ultrazentrifugation pellettiert.

c) Infektion durch Co-Kultur mit infizierten Zellen

Zur Infektion von uninfizierten, kultivierten Zellen (*Target*-Zellen) mit *in situ*-freigesetztem Virus wurden sie mit infizierten Zellen (*Producer*-Zellen) co-kultiviert. Um eine Trennung der neu infizierten Zellen von den *Producer*-Zellen zu ermöglichen wurden die produzierenden Zellen entweder mit einer letalen Dosis hochenergetischer γ -Strahlung bestrahlt oder in durch Membranen abgetrennten Kompartimenten kultiviert. Die Bestrahlung mit 300 rad erfolgte in einer Cäsium-Strahlungsquelle (Amersham/STS, Braunschweig), so daß die DNA der Zellen so geschädigt wurde, daß zwar noch Stoffwechselaktivität, jedoch keine Proliferation mehr möglich war. Die Kultivierungsdauer betrug zwischen 5 und 14 Tagen. Bei der Co-Kultivierung in getrennten Kompartimenten wurden Trans-Well-6-Loch-Platten (Corning Life Science, Acton, MA) mit 1 μm -Filtereinsätzen eingesetzt. Die Co-Kultivierungsdauer betrug 3-8 Tage bei regelmäßigem Wechsel des Mediums. Die Virusproduktion der infizierten, wie

auch der produzierenden Zellen wurde durch ständige Kontrolle der RT-Aktivität kontrolliert (Kap. III.4.2).

Für Infektionsversuche wurden die *Target*-Zellen stets in optimalen Proliferationsbedingungen gehalten, d.h. immortalisierte Zellen wurden frisch rekultiviert, primäre Zellen wurden frisch in Kultur genommen und optimal mit Mitogenen stimuliert. Teilweise wurden polyionische Substanzen zugegeben, die die Infektion von Retroviren begünstigen: Polybrene (Hexadimethrinbromid, Sigma) mit 6-10 µg/ml oder Protaminsulfat (aus Lachs, Sigma) mit 8-16 µg/ml (Endkonzentrationen; Cornetta & Anderson, 1989). In diesem Fall wurden die *Target*-Zellen über Nacht mit infektiösem Material inkubiert und am nächsten Tag mit frischem Medium rekultiviert, da sonst zytotoxische Effekte auftreten können.

Die eingesetzten Virusmengen wurden durch Messung der RT-Aktivität normiert. Die Detektion von Infektionen erfolgte mittels Bestimmung der RT-Aktivität oder des Provirusnachweises durch PCR (Kap. III.4.2). Bei letzterem wurden falsch-positive Ergebnisse durch die Anwesenheit von *Producer*-Zellen mittels spezifischer Kontrollprimer ausgeschlossen.

III.1.5. Elektronenmikroskopie

Für elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden die Zellen durch Zugabe von Glutaraldehyd (Endkonzentration 2,5%) zum Kulturmedium für 45 min bei Raumtemperatur fixiert. Die fixierten Zellen wurden vom Träger geschabt, in flüssiger, warmer Agarose resuspendiert und sofort auf Eis gekühlt. Die feste Agarose wurde in kleine Würfel geschnitten. Diese wurden in 1% Osmiumtetroxid in PBS nachfixiert, in einer abgestufteren Reihe von Ethanolverdünnungen dehydriert und anschließend in Epon 812 (Fluka, Neu-Ulm) nach Herstellerangaben eingebettet. Epon-Würfel wurden im Ultracut 4-Mikrotom (Leica, Bensheim) in 80 nm dicke Scheiben geschnitten. Die Scheiben wurden mit 2% Uranylacetat für 10 min und 2% Bleiacetat für 2 min bei Raumtemperatur kontrastiert. Die Aufnahmen wurden an einem CEM 902 oder EM 109 (Zeiss, Göttingen) Elektronenmikroskop im ESI-Modus erstellt.

III.2. Reinigung von Viruspartikeln

III.2.1. Gradientenultrazentrifugation

Zur präparativen Reinigung von PERV-Partikeln wurden Überstände von subkonfluenten Kulturen infizierter 293- bzw. PK 15-Zellen gesammelt und durch Zentrifugation (10.000 ×g, 30 min, 4°C) von Zelltrümmern befreit. Das Virus wurde anschließend durch Ultrazentrifugation (54.000 ×g, 3 h, 4°C) konzentriert. Um größere Mengen anzusammeln wurde das Pellet bei -80°C konserviert. Mehrere Pellets wurden nach dem Auftauen sanft homogenisiert und durch ein 20%iges Saccharose-Kissen (in Puffer: 20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 10 mM Na-

triumchlorid; 0,1 mM EDTA) pelletiert (140.000 ×g, 3 h, 4°C). Das resuspendierte Pellet wurde auf einen Saccharose-Gradienten (20-50%) geladen und durch Ultrazentrifugation (200.000 ×g, 3 h, 4°C) aufgetrennt. Fraktionen aus diesem Gradienten wurden gesammelt und auf Proteingehalt und RT-Aktivität getestet. Die Dichte (ρ) wurde aus der Messung des Brechungsindex (n_D^{20}) der Fraktionen bei 20°C am Refraktometer (Milton Roy, Pont-Saint-Pierre, Frankreich) berechnet:

$$\rho \left[\frac{\text{g}}{\text{ml}} \right] = 2,6448 \times n_D^{20} - 2,5263.$$

Um das Virus aus dem saccharosehaltigen Puffer zu entfernen, wurden die Fraktionen 1:2 mit Puffer verdünnt und erneut zentrifugiert (245.000 ×g, 15 min, 4°C). Ausgewählte Pellets wurden gepoolt und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Inaktivierung der Viruspartikel wurde die Viruspräparation mit einem Volumen eiskaltem Diethylether (Merck, Darmstadt) versetzt und vorsichtig *end-over-end*-rotiert. Der Ether wurde anschließend im trockenen Stickstoffstrom verdampft.

III.2.2. Aktivitätsassay der Reversen Transkriptase

Die Aktivität der Reversen Transkriptase (RT) wurde zur Detektion und Quantifizierung von Retroviren eingesetzt. Dazu wurde ein kommerzieller, auf einem ELISA basierender RT-Aktivitäts-Assay (Cavidi-Tech, Uppsala, Schweden) eingesetzt.

Vorhandene RT synthetisiert bei diesem Test einen komplementären Strang aus Bromdesoxy-Uridintriphosphat an die kovalent samt Primer an den Plattenboden gebundene Matrize aus Polyadenosin. Durch Bindung von enzymgekoppeltem Antikörper gegen Bromdesoxyuridin wird in einer Farbreaktion ein Maß für die Enzymaktivität ermittelt.

Die Absorption wurde in einem Spektrometer für 96-Loch-Platten (Easy Reader, Tecan, Crailsheim) bei 405 nm mit 560 nm als Korrekturwellenlänge gemessen. Zur Quantifizierung der Aktivität wurde ein Standard aus rekombinant exprimierter RT des Moloney-Maus-Leukämievirus in unterschiedliche Verdünnung nach linearer Regression benutzt. Dieser Assay ist für die RT von C-Typ Retroviren spezifisch, da der Reaktionspuffer Mn^{2+} -Ionen, die die RT als Cofaktor benötigt, enthält.

Die Dauer des Reaktionsschrittes wurde der erwarteten Aktivität angepaßt: Bei Aktivitäten größer ca. 5 mU/ml wurde für 3 h inkubiert, während bei geringeren Aktivitäten für 12 h inkubiert wurde. Bei sehr geringen Konzentrationen wurde der Aktivitätstest mit gesteigerter Sensitivität (High-Sensitive Assay, Cavidi Tech) verwendet.

III.3. Proteinchemische Methoden

III.3.1. Proteinbestimmung

Die Konzentration von Proteinen wurde durch kolorimetrische Messung unter Verwendung des BCA-Protein-Assays (Pierce, Rockford, IL, USA) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Der Test beruht auf der Messung von Cu^{1+} -Ionen durch Komplexbildung mit Bicinchoninsäure nach deren Bildung aus Cu^{2+} -Ionen durch die Biuret-Reaktion (Smith *et al.*, 1985). Der Test wurde in 96-Loch-Platten (Becton Dickinson) durchgeführt. Zur Quantifizierung wurde ein Standard einer BSA-Lösung (Pierce) in unterschiedlichen Konzentrationen nach linearer Regression verwendet. Von Standard und Proben wurden Triplikate getestet. Die Absorption wurde nach Inkubation bei 37°C nach 30, 60 und 120 min in einem Spektrometer für 96-Loch-Platten (Tecan) bei 560 nm mit 492 nm als Referenzwellenlänge gemessen.

III.3.2. Denaturierende Gelelektrophorese

Die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde diskontinuierlich mit Tris/Tricin-Puffern in Mighty Small-Apparaturen (Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt (Schägger & Von Jagow, 1987). Nach dem Lauf wurden die Gele mit GelCodeBlue (Pierce) gefärbt und in Wasser bis zu einem ausreichenden Kontrast entfärbt. Anschließend wurden sie mit dem GelDry-System (Novex, Frankfurt) getrocknet und dokumentiert.

Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel entsprechend zum möglichen Auftragsvolumen verdünnt, 1:2 mit Tricine-LoadingBuffer (Biorad) versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Danach wurde auf Eis abgekühlt, Kondenswasser abzentrifugiert und die Probe aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandards wurden Mark12 oder MultiMark (Novex) verwendet.

III.3.3. Sequenzierung von Proteinen und Sequenzanalyse

Zur Sequenzierung wurden virale Proteine nach denaturierender Gelelektrophorese auf Polyvinylidenfluorid-Membranen transferiert (Kap. III.3.2 & III.5.3), mit Coomassie blue angefärbt (Neuhoff *et al.*, 1988) und die entsprechende Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die N-terminale Sequenzierung mittels schrittweisem Edman-Abbau wurde von TOPLAB GmbH (Martinsried) durchgeführt (Hunkapiller *et al.*, 1983). Die erhaltenen Sequenzabschnitte wurden in einer online-Datenbanksuche mit BLASTP (V2.0.10) mit den Einträgen der NIH-GenBank verglichen, um Informationen über das gesuchte Protein zu erhalten. Die Sequenzen wurden mit Hilfe des PROTEAN-Moduls aus dem LASERGENE-Programm (DNASar, Madison, WI, USA) analysiert.

III.3.4. Peptidsynthese

Synthetische Peptide (Tabelle III-2) wurden nach der Festphasen-Methode an einem LKB Biolyx 4170 Peptid-Synthesizer erstellt (Merrifield & Stewart, 1965). Es wurden Fmoc-geschützte Aminosäuren (Calbiochem, Bad Soden) verwendet. Die Abspaltung vom Trägermaterial erfolgte mittels Trifluoressigsäure und 5% Thioanisol (Denner *et al.*, 1994). Die Reinheit und Identität (Länge) der Peptide wurde durch MALDI-(*matrix assisted laser desorption ionisation*)-Massenspektrometrie in Kooperation mit Applied Biosystems (Langen) überprüft (Hillenkamp & Karas, 1990).

Tabelle III-2: Aminosäuresequenzen der verwendeten Peptide und die Quelle der Sequenzangaben.

Name	Sequenz	Quelle, GenBank-Nummer
PERV-Aisu	LQNRRLDLDLFLKEGGLC	CAA 72927 (aa 532 - 549)
PERV-Bisu	LQNRRLDLDLFLREGGLC	CAA 72928 (aa 529 - 549)
PERV-Aido	FLKEGGLCVALKKECCFYVD	CAA 72927 (aa 542 - 561)
PERV-Bido	FLREGGLCAALKECCFYVD	CAA 72928 (aa 539 - 558)
HIV-isu	KELQARILAVERYLKDQQL	AAB 50262 (aa 575 - 593)
PERV-R	QIMVLRQQYQGGLLSQGETDL	CAA 72927 (aa 641 - 660)
PERV-Aenv	GRWKDWQQRVQKDVNRNKQIS	CAA 72927 (aa 176 - 195)
PERV-Benv	EPPHNLPVPQLTSLRPDITQ	CAA 72928 (aa 253 - 272)
PERV-Cenv	TYTSSGQFNLTWIRTGSPK	AAC 16765 (aa 161 - 180)

III.3.5. Kopplung von Peptiden an Trägerproteine

Um die Immunogenität der synthetischen Peptide zu erhöhen bzw. um die proliferationshemmende Wirkung des immunsuppressiven Peptids zu erhalten, wurden die Peptide mit zwei unterschiedlichen Methoden an Trägerproteine gekoppelt.

Für die Immunisierung von Tieren mit Peptiden (Kap. III.5.1) wurde eine Glutaraldehyd-Kopplung an KLH (*keyhole limpet hemocyanine*; Calbiochem) durchgeführt (Briand *et al.*, 1985). Hierzu wurden 30 mg Peptid in 4 ml PBS gelöst. Die Peptidlösung wurde mit 4 ml KLH-Lösung in PBS (2 mg/ml) gemischt und langsam, unter ständigem Rühren tropfenweise mit 8 ml 0,2% Glutaraldehyd (Sigma) versetzt. Nach 20 min Inkubation wurde das Kopplungsprodukt in Membranen (MWCO 10 kDa, Schleicher&Schüll, Dassel) extensiv gegen PBS dialysiert.

Zum Nachweis der proliferationsinhibierenden Wirkung von Peptiden (Kap. III.1.3) wurden diese an BSA (bovines Serumalbumin; Sigma) gekoppelt. Als *cross-linker* wurde EDC (1-[3-Dimethyl-Aminopropyl]-3-ethylcarbodiimide; Pierce) verwendet. Dabei wurden zwei Teile einer EDC-Lösung (63 mg/ml in *aqua dest.*) zu vier Teilen der Lösung des entsprechenden

Peptids (3 mmol/l in *aqua dest.*) gegeben. Nach 5 min Reaktionszeit wurde ein Teil BSA-Lösung (20 mg/ml) hinzugegeben und für ca. 4 h im *end-over-end-rotator* (Hedolph, Schwabach) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Kopplungsreaktion durch Zugabe von 1/10 des Gesamtvolumens der Stop-Lösung (2 M Essigsäure; 2 M Ethanolamin; pH 4,5) gestoppt. Anschließend wurde in Membranen (MWCO 10 kDa, Schleicher&Schüll) extensiv gegen PBS dialysiert.

III.3.6. Reinigung von rp15E

Zur rekombinanten Expression eines löslichen Fragmentes des transmembranen Hüllproteins von PERV (rp15E) wurde die entsprechende Sequenz, die Aminosäuren 488 bis 597 der Sequenz des Hüllproteins (aa 25-134 des TM-Proteins), durch entsprechend abgeleitete Primer-Oligonukleotide samt notwendiger Restriktionsschnittstellen (*EcoR* I und *BamH* I) von DNA aus PK 15-Zellen mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pMal-p2x (New England Biolabs, Schwalbach) kloniert. Die Sequenzierung der Vektoren zeigte, daß sie mit der publizierten Sequenz von PERV-A (GenBank-Nr. Y12238) identisch sind. *Escherichia coli*-TOP10F'-Zellen wurden mit diesem Konstrukt transformiert. Exprimierende Klone wurden identifiziert und selektiert (Berg, 1999). Es wird ein Fusionsprotein mit dem Maltose-Bindungsprotein (MBP) gebildet (Kellermann & Ferenci, 1982). Der MBP-Teil dient der Reinigung des rekombinanten Proteins durch Affinitätschromatographie über Amylose-Sephrose (di Guan *et al.*, 1988; Maina *et al.*, 1988).

Der Vektor enthält eine Ampicillin-Resistenz als Selektionsmarker. Das Gen für das Fusionsprotein liegt unter Kontrolle eines mit IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktosid) induzierbaren P_{tac} -Promotors, der durch den *lacI^q*-Repressor im Vektor im nicht-induzierten Zustand unterdrückt wird. Das Fusionsprotein enthält N-terminal das MBP mit intakter Signalsequenz, gefolgt von einer Protease-Schnittstelle (Faktor Xa) und dem rp15E-Anteil. Das erwartete Molekulargewicht des Fusionsproteins ist 55 kDa, das des durch Faktor Xa abgespaltenen Proteins beträgt 12 kDa.

Das Fusionsprotein sollte aufgrund der Signalsequenz in das Periplasma exportiert werden. Vermutlich ist dieser Export insuffizient, da auch nach Periplasma-Aufschluß im Zytoplasma große Mengen Fusionsprotein detektiert werden können (Berg, 1999). Daher wurde im Folgenden mit einem Gesamtzellaufschluß gearbeitet.

Die Expression des Fusionsproteins erfolgte in Luria-Bertani-Medium (Sambrook *et al.*, 1989), supplementiert mit 50 μ g/ml Ampicillin (Sigma) und 2,5 g/l Glucose (Merck). 10 ml Übernachtskulturen wurden direkt aus Glycerin-Gefrierkulturen angeimpft. 5 l Kulturmedium wurden mit der Übernachtskultur angeimpft. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte

nach 5 Stunden Wachstum bei einer OD_{600} von 0,8 durch Zugabe von IPTG (0,2 mM). 4 Stunden nach Induktion wurden die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert. Die Pellets wurden anschließend in 2 ml/mg Aufschlußpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 200 mM Natriumchlorid; 5 mM Magnesiumchlorid; 1 mM EDTA; 1 mg/ml Lysozym (Sigma); 400 U/ml Dnase I (Gibco); 1:100 Protease-Inhibitor-Cocktail (Calbiochem)) auf Eis resuspendiert und die Zellen mit Ultraschall in einem Branson Sonifier 250 (Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA) für $3 \times$ je 3 min (Stufe 4, 50% Intervall) aufgeschlossen. Die verbliebenen Zelltrümmer wurden abzentrifugiert ($10.000 \times g$, 20 min, $4^\circ C$) und der Überstand mit einer Flußrate von 1 ml/min auf eine FPLC-(*FastPerformanceLiquidChromatography*-)Säule (Pharmacia Biotech) mit Amylose-Resin (New England Biolabs) gegeben. Anschließend wurde mit Säulenpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 200 mM Natriumchlorid; 1 mM EDTA; 1 mM Dithiothreitol) gewaschen. Die Elution erfolgte mit Säulenpuffer, supplementiert mit 10 mM Maltose (Merck). Alle FPLC-Schritte wurden an einer automatisierten FPLC-Anlage LCC-501Plus mit P-500 Kolbenpumpen (Pharmacia Biotech) bei $4^\circ C$ durchgeführt.

III.4. Molekularbiologische Methoden

III.4.1. Präparation von Nukleinsäuren

Zur Isolation von Nukleinsäuren wurden je nach Art, Zelltyp und gewünschter Menge verschiedene kommerzielle Präparationssysteme verwendet:

DNA aus PBMC und kultivierten Zelllinien wurde mit dem QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen, Hilden), virale RNA mit dem QIAamp Viral RNA Kit (Qiagen) oder dem Nucleospin Virus L (Machery-Nagel, Düren) und zelluläre RNA mit dem QIAamp Total RNA Kit (Qiagen) präpariert. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren, wobei die Variationen zur Ausbeutemaximierung stets angewandt wurden. Die Ausbeute und Reinheit der Nukleinsäuren wurden spektroskopisch durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm und der Ratio 260 nm/280 nm bestimmt.

III.4.2. Polymerase-Kettenreaktion (DNA-PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit DNA-Template wurde in der Regel zur Provirusanalyse eingesetzt. Es wurden Ampli-Taq-Polymerase, Desoxynukleotide (GeneAmp dNTP-Mix) und PCR-Puffer I (Applied Biosystems, Weiterstadt) sowie nukleasefreies Wasser (Promega, Madison, USA) in Ansätzen von 50 μ l oder 25 μ l nach Herstellerangaben verwendet (Tabelle III-3). Die spezifischen Primer (Tabelle III-5) wurden von Sigma-ARK (Darmstadt) synthetisiert und nach HPLC-Reinigung geliefert. Die Reaktionen wurden in 0,2 ml-Gefäßen durchgeführt. Für die Polymerasereaktion wurde der PCR-Cycler PTC-200 (MJ-

Research, Waltham, MA, USA) mit dem in Tabelle III-4 dargestellten Temperaturprofil genutzt. Die PCR-Ansätze wurden mit BlueJuice (Gibco Life Technologies, Rockville, MD, USA) versetzt und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.


Zur Validierung der PCR-Reaktion wurde stets eine Leerkontrolle ohne Zugabe von DNA, eine Negativkontrolle unter Verwendung von DNA aus nicht infizierten Zellen sowie eine Positivkontrolle mit DNA aus infizierten Zellen verwendet.

Tabelle III-3: Zusammensetzung von PCR-Ansätzen.

Lösung	typische Volumina (für 50 µl-Ansatz)	Endkonzentration
PCR-Puffer I (10-fach)	5 µl	1-fach (1,5 mM MgCl ₂)
Wasser	32,5 – 34 µl	–
Desoxynukleotide (dNTPs)	5 µl	250 µM (je Nukleotid)
Primer A (20 µM)	2,5 µl	1 µM
Primer B (20 µM)	2,5 µl	1 µM
Ampli-Taq-Polymerase	0,5 µl	0,05 mU/µl
DNA	0,5 – 2 µl	10 – 100 µg

Tabelle III-4: Verwendetes Temperaturprofil für analytische PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer	Funktion
1	95°C	5 min	erste Denaturierung
2	95°C	30 sec	Denaturierung
3	55 – 60°C [#]	45 sec	Annealing
4	72°C	45 sec	Elongation
5	72°C	5 min	komplette Elongation


 40 Zyklen

[#] abhängig vom verwendeten Primer, entspricht T_m aus Tabelle III-5

III.4.3. Polymerase-Kettenreaktion nach reverser Transkription (RT-PCR)

Zum Nachweis und zur Identifikation und Charakterisierung des viralen RNA-Genoms wurde die PCR nach der Synthese von cDNA durch reverse Transkription aus der präparierten viralen RNA (vRNA) eingesetzt.

Um falsch-positive Ergebnisse durch Kontaminationen der vRNA mit zellulärer DNA zu vermeiden, wurde die RNA nach der Präparation (Kap. III.4.1) mit RNase-freier DNase I (Gibco Life Technologie) behandelt. 50 µl der vRNA-Präparation wurden mit 6 µl DNase-Puffer und 6 µl DNase I versetzt und für 15 min bei 25°C inkubiert. Nach Zugabe von 6 µl 25 mM EDTA-Lösung wurde die DNase I für 10 min bei 65°C inaktiviert.

Tabelle III-5: Auflistung aller verwendeten Primer-Oligonukleotide

Name	Zielgen	T _m	Größe Amplikon	Sequenz	Referenz / GenBank-Nummer
PK-1	PERV pol	60°C	817 bp	TTGACTTGGGAGTGGGACGGGTAAC	Czauderna <i>et al.</i> , 2000 U77599
PK-6	protease- RT			GAGGGTCACCTGAGGGTGTGGAT	
gag 1	PERV gag	58°C	662 bp	GCGACCCACGCAGTTGCATA	Paradis <i>et al.</i> , 1999 AF038601
gag 2				CAGTTCCTTGCCAGTGCCTT	
gag 3	PERV gag	58°C	261 bp	TGATCTAGTGAGAGAGGCAGAG	Paradis <i>et al.</i> , 1999 AF038601
gag 4	nested gag 1/2			CGCACACTGGTCTTGTGCG	
envA1	PERV A env	58°C	360 bp	TGGAAAGATTGGCAACAGCG	Le Tissier <i>et al.</i> , 1997 Y12238
envA2				AGTGATGTTAGGCTCAGTGG	
envB1	PERV B env	55°C	263 bp	TTCTCCTTTGTCAATTCCGG	Le Tissier <i>et al.</i> , 1997 Y12239
envB2				TACTTTATCGGGTCCCACTG	
envC1	PERV C env	55°C	280 bp	CTGACCTGGATTAGAAGTGG	Takeuchi <i>et al.</i> , 1998 AF038600
envC2				ATGTTAGAGGATGGTCCTGG	
pigmt1	Cytochrom- Oxidase II (Schwein, mitochondrial)	58°C	255 bp	TCACCCATCATAGAAGAAGTCTCTACA	Switzer <i>et al.</i> , 1999 U18827
pigmt2				TTTTACGGTTAAGGCTGGGTTATAATT	
β-actin forw	β-Actin human/mouse	55°C	528 bp [#]	CTACAATGAGCTGCGTGTGG	R&D, Wiesbaden M10277; X00351
β-actin rev			969 bp*	AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC	
GAPDH-(3')	GAPDH-Gen (human)	60°C	550 bp	CTCAGTGTAGCCCAGGATGC	O. Hohn, PEI J04038
GAPDH-(5')				ACCACCATGGAGAAGGCTGG	
Shih forw	MuLV pol RT degeneriert	55°C	ca. 123 bp	TGGAAAGTG YTRCCMCARGG	Shih <i>et al.</i> , 1989 ---
Shih rev				GGMGGCCAGCAGSAKGTCCAYGTA	

[#] bei Verwendung von cDNA; * bei Verwendung von genomischer DNA

Tabelle III-6: Verwendete Kontrollen zur Validierung der RT-PCR.

Kontrolle	Zugabe von
Leerkontrolle	Wasser
Negativkontrolle	vRNA [#] nicht-produzierender Schweine PBMC vRNA [#] nicht infizierter 293-Zellen
Positivkontrolle	vRNA von PERV-produzierenden Zellen (PK 15) vRNA von PERV infizierten 293-Zellen vRNA von FLV-produzierenden FEM-Zellen mRNA von PERV infizierten 293-Zellen
DNA-Negativkontrolle	genomische DNA von nicht infizierten 293-Zellen
DNA-Kontrolle	genomische DNA von PERV-produzierenden Zellen (PK 15) genomische DNA von PERV-infizierten 293-Zellen

[#] Diese Proben enthalten keine vRNA, da im Kulturüberstand keine Retroviren vorliegen. Es sind Präparationen, die durch analoges Verfahren wie bei der Präparation von vRNA erhalten wurden.

Für die RT-PCR wurde das Superscript One-Step-RT-PCR-Kit (Gibco Life Technologies) mit genspezifischen Primern (Tabelle III-5) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Eine typische Zusammensetzung für einen RT-PCR-Ansatz ist in der Tabelle III-7 dargestellt. Die Reaktionen wurden analog zu den in Kapitel III.4.2 dargestellten Techniken durchgeführt. Die cDNA-Synthese erfolgte während eines, dem in Tabelle III-4 dargestellten Programm vorangestellten Schrittes von 30 min bei 50°C. Zur Absicherung der PCR-Ergebnisse wurden Kontrollen, die in Tabelle III-6 aufgeführten sind, durchgeführt.

Tabelle III-7: Zusammensetzung eines RT-PCR-Ansatzes.

Lösung	typische Volumina (für 25 µl-Ansatz)	Endkonzentration
Reaktion-Mix (2-fach)	12,5 µl	1-fach (1,2 mM Mg ₂ SO ₄)
Wasser	7,5 – 8,5 µl	–
Primer A (20 µM)	1,25 µl	1 µM
Primer B (20 µM)	1,25 µl	1 µM
RT-Taq-Mix	0,5 µl	– k.A. – [#]
RNA	1 – 2 µl	50 – 200 ng

[#] vom Hersteller werden keine Konzentrationen angegeben

III.4.4. Agarose-Gelelektrophorese

Um die Resultate einer PCR-Reaktion, insbesondere die Größe und Stärke der gebildeten Fragmente, analysieren zu können, wurden die Ansätze nach der Reaktion in der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Dabei wurden die Ansätze mit *BlueJuice*-Gelpuffer (Gibco Life Technologies) im Verhältnis 1:20 gemischt und in die Taschen von Flachbettgelen eingebracht. Es wurden Gele aus 1,5% (v/w) *UltraPureAgarose* (Roth) in TAE-Puffer (40 mM Tris, pH 8,0; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA) mit *Submerged Horizontal Gel Nucleic Acid Electrophoresis Systems*-Kammern benutzt. Als Größenstandard wurde die 100 Basenpaar-Leiter (Gibco Life Technologies) verwendet.

III.4.5. Sequenzierung von PCR-Produkten und Sequenzanalyse

Zur Sequenzierung der Produkte der DNA- bzw. RT-PCR wurden die Reaktionsansätze auf einem Agarosegel aufgetragen (Kap. III.4.4) und die entsprechende Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Aufarbeitung des Amplifikats aus dem Gel und die Sequenzierung wurden von der TOPLAB GmbH (Martinsried) durchgeführt. Die Sequenzen wurden mit Hilfe des SEQMAN-Moduls aus dem LASERGENE-Programm (DNASar, Madison, WI, USA) analysiert und mit dem MEGALIGN-Modul mit bekannten Sequenzen verglichen.

III.5. Immunologische Methoden

III.5.1. Gewinnung von Antiseren

Es wurden verschiedene Antiseren gegen PERV entwickelt (Kap. III.5.3). Dabei dienten entweder synthetische Peptide, gereinigte virale Proteine oder Viruspräparationen als Antigene.

Je ein Kaninchen wurde mit den in Kapitel III.1.3 gezeigten synthetischen Peptiden nach Konjugation an KLH (Kap. III.3.5) immunisiert. Die Injektion erfolgte an drei Stellen intramuskulär mit je 0,3 ml in Form einer Emulsion zusammen mit *Freund's Incomplete Adjuvants* (Pierce).

Ein Kaninchen wurde mit p27Gag-Protein, eine Ziege mit p15E-Protein aus Viruspräparationen von PK 15-Zellen immunisiert. Dazu wurden Proben der Viruspräparation in einer präparativen denaturierenden Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wurde nach dem Lauf in 300 mM KCl durch ausfallendes Kaliumdodecylsulfat invers gefärbt (Sandri *et al.*, 1993), die Proteinbanden ausgeschnitten, zerkleinert und in ca. 2 ml PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Eluat wurde mit Adjuvant intramuskulär injiziert. Die Reinheit der Präparation wurde durch analytische SDS-Gelelektrophorese überprüft.

Ein Kaninchen erhielt gradientgereinigte Viruspräparation von infizierten 293-Zellen nach Zugabe von Adjuvants.

Nach der Erstimmunisierung erfolgten im Abstand von ca. 4 Wochen mindestens zwei weitere Immunisierungen, um die Antikörperspiegel zu erhöhen. Dabei sowie 4 Wochen nach der letzten Immunisierung wurden den Tieren Blutproben entnommen und Serum gewonnen.

Alle Tiere wurden entsprechend den Richtlinien des NIH und der USDA zur Haltung und Nutzung von Versuchstieren gehalten.

III.5.2. ELISA

Für ELISA(*enzyme linked immunosorbant assay*)-Tests wurden flexible 96-Loch-Platten (Becton Dickinson) mit 1 µg Peptid, gelöst in 50 µl *aqua dest.*, beschichtet und über Nacht bei 37°C getrocknet. Anschließend wurden die Platten mit Waschwasser (PBS; 0,05% Tween 20) in einem Platten-Waschgerät (Tecan) gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde mit 100 µl Inkubationspuffer (PBS; 3% BSA; 10% Fötale Kälberserum) für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Seren (50 µl/Loch) appliziert. Serumverdünnungen (mind. 1:50) wurden in Inkubationspuffer + 0,05% Tween 20 durchgeführt. Nach 1 h bei 37°C wurde fünffach gewaschen und mit Peroxidase-gekoppeltem, speziesspezifischen Antikörpern (Sigma) in 1:1000-Verdünnung

oder Peroxidase-gekoppeltem Protein-G (Biorad) in 1:5000-Verdünnung inkubiert. Die Farb-reaktion erfolgte mit *o*-Phenylidendiamin und Wasserstoffperoxid in PBS und wurde durch Absorptionsmessung im 96-Loch-Plattenspektrometer (Easy Reader, Tecan) bei 492 nm gegen 560 nm als Referenz quantifiziert. Zur Ermittlung der unteren Empfindlichkeitsgrenze wurde ein *cut-off* als Mittelwert aller Meßwerte zuzüglich der dreifachen Standardabweichung berechnet.

III.5.3. Western Blot

Zur immunologischen Detektion wurden Proteine mittels SDS-PAGE (Kap. III.3.2) aufgetrennt und anschließend auf Immobilon-P (Polyvinylidenfluorid-) Membranen (Millipore) immobilisiert. Das Gel wurde nach der Elektrophorese in Transfer-Puffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% Methanol) equilibriert und auf die PVDF-Membran zwischen Millipore Filterpapiere luftblasenfrei gelegt. Die Proteine wurden dann in der TankBlot Apparatur (Pharmacia Biotech) bei konstant 100 V für 2 h bei 4°C auf die Membran transferiert. Die Membran wurde anschließend mit Methanol entwässert und getrocknet.

Tabelle III-8: Verwendete Antiseren und Antikörper gegen Virusproteine.

Name	Spezies	Präparation – Spezifität	Referenz
anti-p15E(isu)	Kaninchen	KLH-gekoppeltes Peptid (PERV-Bisu)	
anti-p15E(ido)	Kaninchen	KLH-gekoppeltes Peptid (PERV-Bido)	
anti-R-Peptid	Kaninchen	KLH-gekoppeltes Peptid (PERV-R)	
anti-PERV-Aenv	Kaninchen	KLH-gekoppeltes Peptid (PERV-Aenv)	
anti-PERV-Benv	Kaninchen	KLH-gekoppeltes Peptid (PERV-Benv)	
anti-p27Gag	Kaninchen	PAGE-gereinigtes Virusprotein (PK 15)	
anti-PERV	Kaninchen	Gradientgereinigtes Virus (293/l)	
anti-p15E(#18)	Ziege	PAGE-gereinigtes Virusprotein (PK 15)	
anti-p15E(Cal)	Ziege	rekombinantes p15E mit Calmodulin-Tag	O. Stephan, PEI
anti-NC	Kaninchen	synthetisches Peptid	Czauderna <i>et al.</i> , 2000
anti-gp71(FLV)	Ziege	gereinigtes Virusprotein	R. Kurth, RKI
anti-p27Gag(FeLV)	monoklonal	?	Biodesign (RT-BDM-2)

Die Detektion erfolgte nach Zurechtschneiden der Blot-Membran (per Hand bzw. mit *MembraneCutter*, Novex) nach blasenfreier Equilibrierung in TTBS-Puffer (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,85 g/l NaCl; 0,1% Tween 20). Anschließend wurde der Primärantikörper (Tabelle III-8) zugegeben (Verdünnung 1:10 bis 1:5.000). Nach 2 h Inkubation unter leichtem Schwenken bei 20°C (alternativ über Nacht bei 4°C) wurde die Membran mindestens dreimal mit dem dreifachen Volumen TTBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde mit dem peroxidasegekoppeltem sekundären Antikörper, speziesspezifischem anti-IgG (Verdünnung 1:1.000;

Sigma) oder peroxidasegekoppeltem Protein G (Verdünnung 1:5.000; Biorad), in TBS-Puffer (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,85 g/l NaCl) für 1 h bei 20°C unter Schwenken inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit dem dreifachen Volumen TBS-Puffer wurde die Farbdetektion mit Diaminobenzidin und Peroxid (*metal-enhanced Diaminobenzidine-Substrate Kit*, Pierce) nach Herstellerangaben durchgeführt.

III.5.4. Immunfluoreszenzmikroskopie

Adhärente Zellen in Schweine-PBMC-Kulturen nach TPA-Stimulation (Kap. IV.5) wurden durch Immunfluoreszenzmikroskopie charakterisiert. Dazu wurden die PBMC direkt auf 10-Loch-Objektträgern (Dunn, Asbach) für 4 Tage unter den gleichen Stimulationsbedingungen kultiviert (Kap. III.1.3). Zur Entfernung von Suspensionszellen wurden die Objektträger mit reichlich PBS gewaschen. Die Suspensionszellen wurden separat auf 3-Loch-Adhäsions-Objektträgern (Biorad, München) präpariert. Adhärente und Suspensions-Zellen wurden mit 0,2%iger Formaldehydlösung (20 min bei 20°C) fixiert. Teilweise wurde die Zellmembran durch Inkubation mit 0,5% Triton-X 100 (20 min bei 20°C) in PBS permeabilisiert. Die Bindung der Antikörper (Tabelle III-9) erfolgte in PBS mit 2% fettfreiem Milchpulver für 1 h bei 20°C. Danach wurde dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Fluorescein-isothiocyanat-gekoppelten, sekundären Antikörper (Dianova, Hamburg) für 30 min bei 20°C. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Präparate mit Mowiol (Calbiochem) und Objektgläsern eingedeckt und im Fluoreszenzmikroskop Axiphot (Zeiss) analysiert.

Tabelle III-9: Monoklonale Antikörper gegen porcine Oberflächenantigene zur Charakterisierung von PBMC mittels Immunfluoreszenz.

Name	Spezifität	Lieferant	Referenz
anti-CD4a	porcines CD4-Homolog	PharMingen	Pescovitz <i>et al.</i> , 1984
anti-CD8	porcines CD8-Homolog	PharMingen	Smith <i>et al.</i> , 1994
anti-SWC8	Granulozyten, B-Zellen, T-Zell-Subset	NatuTec	Saalmüller <i>et al.</i> , 1994
anti-SWC3a	Monozyten, Granulozyten	PharMingen	Pescovitz <i>et al.</i> , 1984
anti-MIL2	Monozyten, Makrophagen, Granulozyten	NatuTec	Haverson <i>et al.</i> , 1994
anti-MIL4	Eosinophile, einige Polymorphkernige, evtl. NK-Zellen (event. porcines CD11b-Homolog)	NatuTec	Haverson <i>et al.</i> , 1994

IV. RESULTATE

IV.1. Biochemische und immunologische Charakterisierung von PERV

Die Viren und die viralen Proteine wurden morphologisch, biochemisch und immunologisch charakterisiert, um Rückschlüsse auf die biologischen Eigenschaften des Virus ziehen zu können. Insbesondere bei endogenen Retroviren treten häufig Probleme bei der Expression, der Prozessierung oder dem Transport von Proteinen oder bei der Bildung reifer Partikel auf. Daher wurde zunächst die Morphologie des Virus analysiert. Anschließend wurden die viralen Proteine untersucht, wobei die Präparationen darüber hinaus die Grundlage für Nachweissysteme bildeten.

IV.1.1. Morphologische Charakterisierung

Durch Dünnschnitt-Elektronenmikroskopie wurden die von PK 15- und infizierten 293/I-Zellen freigesetzten PERV-Partikel morphologisch charakterisiert (Abbildung IV-1). Deutlich sind die für Typ C-Retroviren typischen, oktaedrisch geformten Kapsidquerschnitte zu erkennen, so daß die Zuordnung zu dem C-Typ Retroviren bestätigt werden konnte (Armstrong *et al.*, 1971). Die Aufnahmen zeigen auch, daß die meisten Partikel gereift sind, denn das retro-

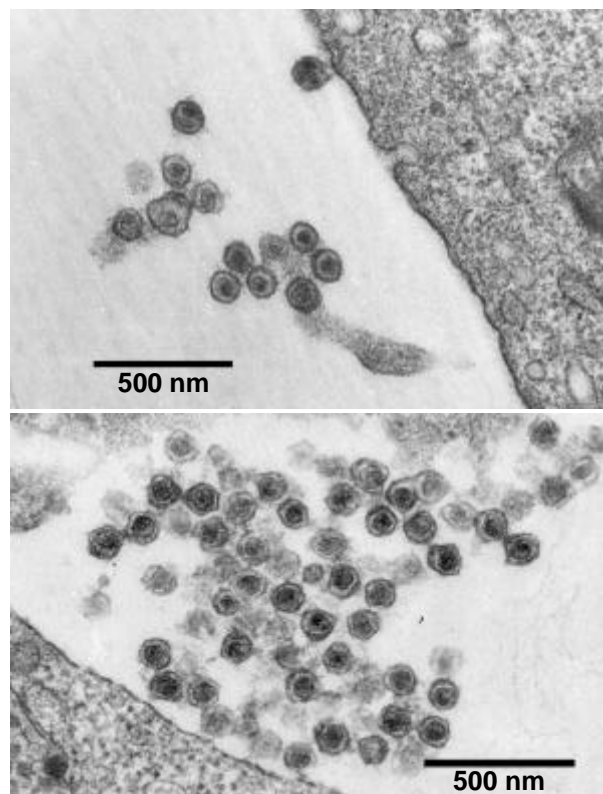


Abbildung IV-1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Porcinen Endogenen Retroviren (PERV) von PK 15- (oben) bzw. von infizierten 293/I-Zellen (unten; mit freundlicher Genehmigung von Dr. K. Boller, Paul-Ehrlich-Institut).

virale Kapsid ist beim Abknospen des Partikels von der Zellmembran (*budding*) noch eher kugelförmig und nimmt erst danach seine endgültige Form an (Swanstrom & Wills, 1997).

IV.1.2. Präparation von Viruspartikeln

Um die Proteine des Virus zu untersuchen, wurden die Partikel durch Ultrazentrifugation im Saccharose-Gradienten präpariert. Als Ausgangsmaterial dienten Kulturüberstände von PK 15-Zellen, einer Schweinezelllinie, welche permanent Viruspartikel freisetzt, sowie von verschiedenen infizierten humanen 293-Zellen (Abbildung IV-2). Die 293-Zellen waren mit Virus von PK 15-Zellen (römische Numerierung) oder mit Virus von stimulierten Schweine-PBMC (arabische Numerierung) infiziert. Als Kontrolle für die Präparationsmethode und für spätere analytische Methoden wurde Friend-Leukemia-Virus (FLV), ein murines Leukämievirus aus FEM-Zellen, parallel präpariert. Da die Mengen an freigesetztem Virus bei PERV-produzierenden Zellen vergleichsweise gering sind, mußten größere Mengen von Zellkulturüberstand eingesetzt werden.

Die Ergebnisse für FLV entsprechen den publizierten Daten, wonach Retroviren in einem

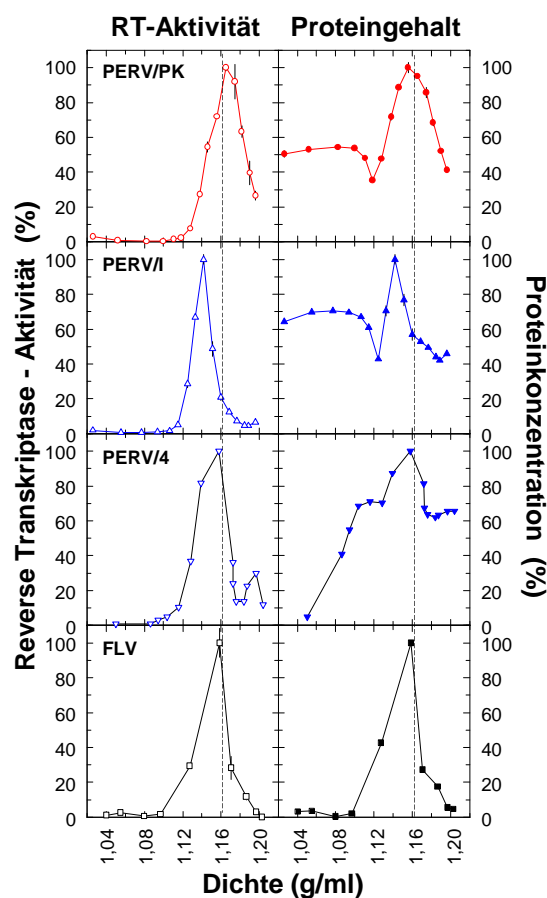


Abbildung IV-2: Reinigung von Viruspartikeln im Saccharose-Gradient. Dargestellt ist die Aktivität der Reversen Transkriptase (links) bzw. der Proteingehalt (rechts) in den Fraktionen des Gradienten bei Präparationen von PERV/PK aus PK 15-Zellen, PERV/I und PERV/4 aus 293-Zellen und FLV aus FEM-Zellen. Dargestellt sind relative Werte, wobei der höchste Meßwert beim jeweiligen Virus willkürlich als 100% festgelegt wurde. Zur Orientierung ist die Dichte 1,16 g/ml markiert.

scharfen Peak bei einer Dichte von ca. 1,16 g/ml bandieren (Patience *et al.*, 1996). Die Kurven für Proteingehalt und RT-Aktivität verlaufen nahezu identisch. Bei den präparierten PERV-Varianten zeigt sich ein uneinheitliches Bild. Das Virus von PK 15-Zellen zeigt einen ähnlichen Kurvenverlauf, wobei der Peak insgesamt breiter und weniger scharf erscheint, was möglicherweise auf eine Spanne von Viren mit unterschiedlicher Reifung hinweisen könnte. Bei Virus von 293/I-Zellen ist eine recht scharfe Virusbande mit einem deutlich zu geringeren Dichten verschobenen Maximum (ca. 1,14 g/ml) zu erkennen. Dies könnte auf einen großen Anteil unreifer Partikel hinweisen. PERV/4-Virus zeichnet sich durch einen vergleichsweise breiten Peak aus, dessen Maximum aber bei der erwarteten Dichte von 1,16 g/ml liegt. Man kann aber beim Verlauf der RT-Aktivität eine Schulter bei geringeren Dichten erkennen, eine Beobachtung, die durch die Proteinmessung bestätigt wird. Bei dieser Präparation könnte man daher verschiedene Fraktionen des Virus erwarten: (i) eine Bande mit unreifen Partikeln bei etwa 1,14 g/ml, (ii) ein Hauptteil reifer Partikel, die bei einer Dichte von 1,16 g/ml bandieren und (iii) Kapsid-Partikel, die bei deutlich höherer Dichte (ca. 1,20 g/ml) eine Bande bilden (Frazier, 1985). Auch der Verlust der Oberflächen-Untereinheit der Virushülle (gp70 bzw. SU – *surface*) aufgrund der mechanischen Kräfte bei der Präparation (*shedding*) könnte ein Grund für die Verschiebung der Virusbande sein.

Die Tabelle IV-1 gibt einen Überblick über die Resultate der verschiedenen Viruspräparationen. Dabei fallen nicht nur die geringe PERV-Produktion der einzelnen Zellen im Vergleich zur FLV-Freisetzung, sondern auch deutliche Unterschiede im Verhältnis von RT-Aktivität zu Protein auf. Dieses Verhältnis kann ein Maßstab für Reinheit (Kap. IV.1.3) oder den Reifungszustand des Virus sein. Der Wert für das PERV/4-Virus ist besonders hoch, was auf eine mögliche Anpassung des mehrfach auf menschlichen 293-Zellen passagierten Virus hinweisen könnte (Schwendemann, 2000).

Tabelle IV-1: Vergleich der Viruspräparation von verschiedenen virusproduzierenden Zelllinien. Aufgeführt sind die freigesetzte Virusmenge, gemessen als RT-Aktivität im Kulturmedium, die bei den Gradientenpräparationen erhaltene RT-Aktivität und Proteinmenge sowie deren Verhältnis.

Zelle	Virus	freigesetzte RT-Aktivität (mU/ml)	Resultat pro 1 Liter Kulturmedium		RT – Aktivität Protein
			RT (U)	Protein (µg)	
PK 15	PERV/PK	59 - 133	19	382	0,05
293	PERV/I	166 - 284	77	309	0,25
293	PERV/4	209 - 435	410	641	0,64
FEM	FLV	870 - 1234	680	1373	0,50

IV.1.3. Untersuchung der viralen Proteine mittels Gelelektrophorese

Zur Analyse der Viruspräparation wurde grundsätzlich eine denaturierende Gelelektrophorese (PAGE) durchgeführt. Dabei wurde die Reinheit der Präparationen, die Verteilung der viralen Proteine in den Fraktionen und die Größe der einzelnen Proteine festgestellt. Beim Vergleich mit dem morphologisch verwandten Typ C-Retrovirus FLV zeigten sich wie erwartet viele Gemeinsamkeiten aber auch einige Unterschiede (Abbildung IV-3).

Es wurde schon aufgrund der stark unterschiedlichen Produktion aus den Zellkulturen (Tabelle IV-1) erwartet, daß die PERV-Präparationen deutlich mehr Kontaminationen beinhalten würden als die des FLV. Dennoch wurde ein ausreichender Reinigungsgrad erreicht. Auffälligstes Merkmal und mengenmäßig Hauptbestandteil der Präparationen ist naturgemäß das Kapsidprotein (CA; Abbildung I-2), das bei FLV aufgrund seines Molekulargewichtes als p30Gag bezeichnet wird. Das entsprechende PERV-Protein migriert schneller in der Elektrophorese, so daß sich ihm ein Molekulargewicht von 27 kDa zuordnen läßt, weshalb es als p27Gag bezeichnet wurde. Weitere Gemeinsamkeiten sind die Precursorproteine des Gag-Proteins: das als Pr60Gag bezeichnete Vollängen-Produkt und die verschiedenen (Teil-) Precursorproteine. Sie zeigen nicht oder nur unvollständig prozessierte Gag-Proteine. Sie sind somit ein Maß für den Reifungszustand des Virus. Als ein weiterer, kleiner Unterschied fällt die Größe des Nukleokapsid-Proteins auf. Das für FLV als p6Gag benannte Protein erhält bei PERV aufgrund des höheren Molekulargewichtes die Bezeichnung p7Gag. Die Identität konnte durch Western Blot-Analysen geklärt werden (Kap. IV.1.4).

Neben den Gag-Proteinen sind auch die Hüllproteine (*envelope*) zu erkennen. Hier zeigen sich jedoch recht deutliche Differenzen. Während bei FLV eine deutliche Bande des transmembranen Hüllproteins p15E zu identifizieren ist, läßt sich bei PERV von 293-Zellen nur eine extrem dünne, bei Virus von PK 15-Zellen aber keine Bande mehr identifizieren. Dies kann mit einer geringeren Inkorporation der Hüllproteine bei der Bildung der Partikel erklärt werden. Da das p15E als membranständiger Teil der Hüllproteine die Funktion eines Ankers für das SU-Protein hat, ist verständlicherweise ebenfalls nur wenig gp70 in den Elektrophoresen nachzuweisen. In der Präparation von FLV ist SU auch nur als eine schwache Bande zu erkennen, was mit *shedding*, dem Verlust des SU-Proteins aufgrund mechanischer Scherkräfte, erklärt werden kann. Demgegenüber ist mehr gp85Env-Protein in den Präparationen von PERV enthalten.

Die Präparationen von PERV enthalten ein Protein mit einer Größe von ca. 10 kDa, welches auch durch Western Blot-Analysen nicht als ein virales Protein identifiziert werden konnte. Um Aufschluß über dessen Identität zu bekommen, wurde das Protein N-terminal mittels

Edmann-Abbau sequenziert. Die Analyse ergab mit hoher Zuverlässigkeit zwei Sequenzen: als dominierende Hauptsequenz „VLSAADKG“ und als Nebensequenz „MLSAEEKA“. Ein online-Datenbankvergleich ergab eine gute Übereinstimmungen mit Hämoglobin und zwar mit der α -Kette für die Hauptsequenz und mit der β -Kette für die Nebensequenz. In Tabelle IV-2 ist ein Sequenzvergleich mit einigen ausgewählten Spezies dargestellt.

Das Ergebnis zeigt, daß es sich bei diesem Protein um eine Kontamination von bovinem, fötalem Hämoglobin aus dem fötalen Kälberserum des Kulturmediums handelt. Es konnte nicht geklärt werden, warum Hämoglobin mit PERV-Partikeln assoziiert präpariert wird, zumal dies bei FLV trotz des identischen Kulturmediums keineswegs der Fall ist. Auch kann ausgeschlossen werden, daß es in den produzierenden Zellen synthetisiert wird und daher in die Partikel inkorporiert wird. Das untersuchte Virus stammt von PK 15-Zellen, also von Schweinezellen, die erhaltene Sequenz unterscheidet sich aber insbesondere in der β -Kette signifikant von der des Schweine-Hämoglobins.

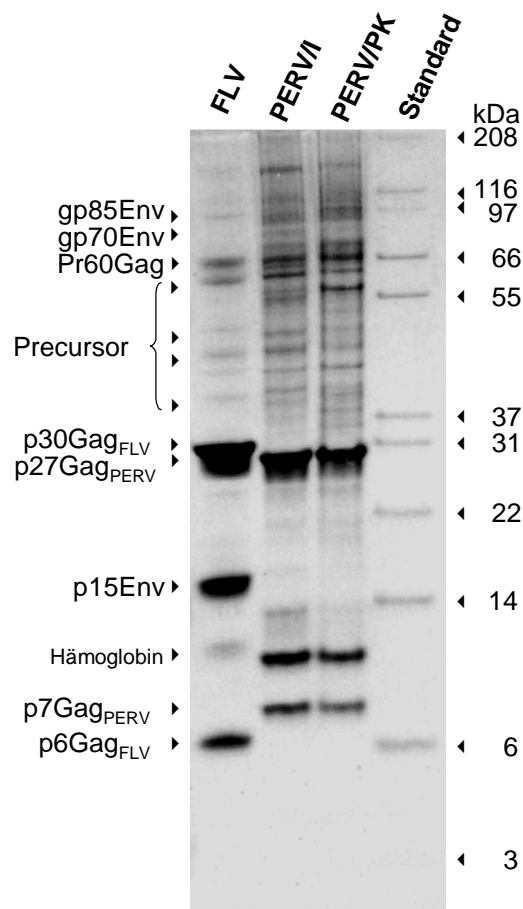


Abbildung IV-3: SDS-PAGE-Analyse der Präparationen von FLV und PERV im Vergleich. Aufgetragen wurden jeweils 20 μ g Virusprotein von FLV aus FEM-, PERV/I aus 293- und PERV/PK aus PK 15-Zellen auf ein 10-20%-Gradientengel in Tricin-Puffer. Die identifizierten Proteine sind links, die Molekulargewichte des Proteinstandards sind rechts markiert.

Tabelle IV-2: Sequenzvergleich zwischen Ergebnissen der Sequenzierung und Datenbankeinträgen. Die erhaltenen Sequenzen (Haupt- und Nebensequenz) wurden mit Hämoglobin-Sequenzen einiger Spezies aus der NIH-GenBank verglichen. Das gesamte Molekulargewicht, die Homologie der gezeigten Sequenz (Similarity Index – SI) und die GenBank-Nummer sind angegeben. Die Sequenzauswahl erfolgte manuell, sie stellt keine Homologiereihe dar. Sequenzidentitäten sind dunkelgrau, konservierte Austausche hellgrau unterlegt.

Name	Spezies	Sequenz	Größe (kDa)	SI (%)	GenBank-Nummer
Hauptsequenz		V L S A A D K G	ca. 10	---	---
Hämoglobin	Rind/fötal	V L S A A D K G	15,0	100,0	HABO
(α-Kette)	Ziege	V L S A A D K S	15,0	88,9	HAGT
	Schwein	V L S A A D K A	15,0	87,5	HAPG
	Maus	M V L S G E D K S	15,0	62,5	HAMS
	Hase	M V L S P A D K T	15,5	75,0	HARB
	Mensch	M V L S P A D K T	15,2	75,0	HAHU
	Nebensequenz		M L S A E E K A	ca.12	---
Hämoglobin	Rind/fötal	M L S A E E K A	15,9	100,0	HBBOF
(β-Kette)	Rind/adult	M L T A E E K A	15,9	87,5	HBBOB
	Ziege/fötal	M L S A E E K A	15,9	100,0	HBGTF
	Schwein	M V M L S A E E K E	16,2	75,0	HBPB
	Maus	M V H F T A E E K A	16,5	62,5	NP032245
	Hase	M V H L S S E E K S	16,1	62,5	HBRB
	Mensch	M V H L T P E E K S	16,0	50,0	HBHU

In der Abbildung IV-4 sind verschiedene Fraktionen des Saccharosegradienten der Reinigung von PERV/4 in einer PAGE analysiert worden, um die Verteilung der viralen Proteine im Gradienten in einem Bereich um die Virusbande herum (gezeigter Dichtebereich 1,103 bis 1,172 g/ml) genauer zu untersuchen. Es ist einerseits klar zu erkennen, daß in allen untersuchten Fraktionen das p27Gag-Protein dominiert, in den Fraktionen um 1,16 g/ml aber die stärksten Banden bildet. Mit dem Gradienten des Kapsidproteins einher gehen auch die Verläufe bei anderen Proteinen, insbesondere bei den Precursorproteinen des Gag-Polyproteins, bei der starken Bande des NC-Proteins p7Gag sowie bei den Envelope-Proteinen p15E und gp70, deren stärkste Banden ebenfalls bei 1,16 g/ml liegen. Dies zeigt, daß die aufgrund der Dichte und des RT-Aktivitätsprofils ausgewählten, vereinigten Fraktionen auch den Hauptteil der intakten Partikel umfassen, da in diesen Fraktionen alle viralen Proteine enthalten sind. Auch beim Hämoglobin sind Unterschiede in den Fraktionen zu sehen, wobei die größere β-Kette in den weniger dichten Fraktionen bei 1,10 g/ml stärker vertreten ist als das α-Hämoglobin, welches mit dem Viruspartikeln bandiert. Bei einer Reihe von Verunreinigungen, die in den Präparationen zu sehen sind, ist ein entgegengesetzter Gradient erkennbar,

d.h. der Anteil der nicht-viralen Proteine sinkt zur Virusbande hin. Dies zeigt, daß die Methode für eine Präparation von PERV-Partikeln geeignet ist.

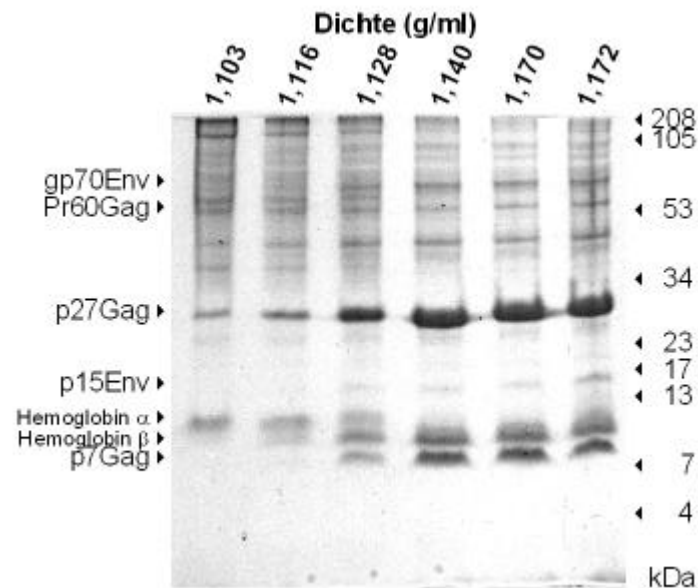


Abbildung IV-4: Vergleich der Verteilung viraler Proteine in verschiedenen Gradientenfractionen. Gleiche Proteinmengen von verschiedenen aufeinanderfolgenden Fractionen einer Präparation von PERV/4 wurden in einer denaturierenden Gelelektrophorese analysiert. Die Dichte der Fractionen ist oben angegeben. Die identifizierten Proteine sind links, die Molekulargewichte des Proteinstandards sind rechts markiert.

IV.1.4. Generierung und Analyse von PERV-Antiseren

Bei immunologischen Assays besteht die Gefahr von falsch-positiven und, insbesondere bei direkten Methoden wie z.B. Immunfluoreszenz- oder Immunperoxidaseassays (IPA), von falsch-negativen Ergebnissen. Basis für aussagekräftige immunologische Testsysteme, die im folgenden entwickelt werden sollten (Kap. IV.3), ist daher einerseits ein effektives Antigen. Andererseits sind aber auch verlässliche Kontrollen unentbehrlich, um beispielsweise bei Western Blot-Verfahren mögliche Kreuzreaktionen mit kontaminierenden oder inkorporierten, zellulären Proteinen von Reaktionen gegen virale Proteine unterscheiden zu können. Hierzu können kreuzreagierende Seren, die gegen Proteine verwandter Viren generiert wurden, eingesetzt werden. Dies kann für indirekte immunologische Testsysteme, wie ELISA- oder Western Blot-Tests, ausreichend sein, ist aber gerade im vorliegenden Fall problematisch, da es mindestens drei verschiedene PERV-Subtypen mit Sequenzvariationen gibt, so daß ein kreuzreagierendes Serum möglicherweise nicht alle Subtypen erkennt.

Aus diesem Grunde wurden Seren gegen verschiedene PERV-Antigene entwickelt. Dabei wurden mit den immunsuppressiven und den immundominanten Domänen von PERV-A und von PERV-B zunächst Bereiche ausgewählt, die bekanntermaßen stark immunogen und auch unter den C-Typ Retroviren hoch konserviert sind, um eine starke und möglichst breite Reak-

tivität zu erreichen. Die entsprechenden Bereiche von PERV-C sind homolog zu denen von PERV-A (Abbildung I-4).

Um ein sensitives Serum zu gewinnen, wurde als weiteres Antigen das mengenmäßig dominierende Protein im Viruspartikel, das CA-Protein p27Gag, zur Immunisierung gewählt. Da die Sequenzinformationen zu Beginn der Arbeiten nicht vorlagen, und die Gewinnung eines Serum mit möglichst breiter Reaktivität gegen eine Vielzahl von Antigenepitopen und Subtypen angestrebt war, wurde p27Gag zur Immunisierung durch Gelelektrophorese aus Viruspräparationen gereinigt. Es wurde PERV/PK-Virus von porcinen Zellen verwendet, weil hier die Varianz der Antigene aufgrund der Vielzahl von Proviren möglicherweise besonders hoch ist. Durch die gleiche Methode wurde das TM-Protein p15E präpariert, um ein Serum gegen das transmembrane Hüllprotein zu gewinnen. Allerdings wurde ein Tris-Glycin-Acrylamidgel verwendet (Laemmli, 1970), welches im niederen Molekularbereich nur eine geringe Trenneffizienz aufweist. Eine spätere Kontrolle mit einem Tris-Tricin-Gel zeigte, daß nur das p27Gag Protein in guter Reinheit und Ausbeute präpariert werden konnte, wogegen das p15E-Protein durch p7Gag und Hämoglobin verunreinigt war (Abbildung IV-5). Das erhaltene anti-p15E-Ziegenserum, im folgenden als Ziegenserum #18 bezeichnet, reagiert daher mit allen drei Proteinen (Abbildung IV-6).

Ein weiteres Antiserum sollte gegen alle viralen Proteine und Konformationsepitope auf der Oberfläche der viralen Proteine gerichtet sein. Daher wurde ein Kaninchen mit PERV/I-Virus von humanen 293-Zellen, dessen Lipidhülle durch das zugegebene Adjuvant zerstört wurde, immunisiert. Hier wurde Virus gewählt, welches auf humanen Zellen replizierte, da Antikör-

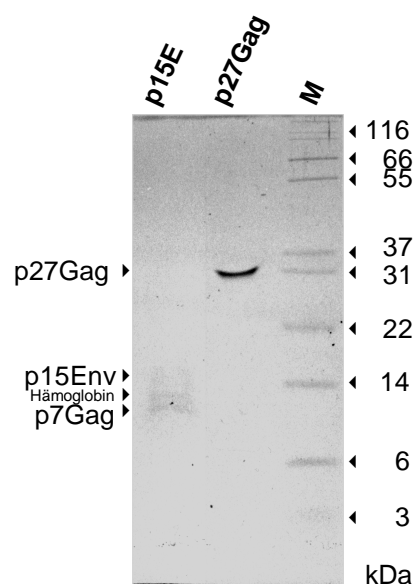


Abbildung IV-5: Charakterisierung der Proteinpräparationen zur Immunisierung. Denaturierende Gelelektrophorese der aus einem Polyacrylamidgel eluierten viralen Proteine p15E und p27Gag. Die identifizierten Proteine sind links, die Molekulargewichte des Proteinstandards sind rechts markiert.

per, die gegen in die Virushülle inkorporierte zelluläre Proteine gebildet werden, gegen die humanen und nicht gegen die porcinen Proteine gerichtet sind. Dadurch können Reaktionen gegen porcine, zelluläre Epitope, die bei experimentellen Xenotransplantationen vorhanden sind, möglicherweise ausgeschlossen werden.

Das transmembrane Hüllprotein der Typ C-Retroviren (p15E) besitzt im C-terminalen Bereich eine intrazelluläre, zytoplasmische Domäne, von denen die letzten etwa 16 Aminosäuren, R-Peptid genannt, von der viralen Protease nach dem *budding* des Partikels abgespalten werden (Rein *et al.*, 1994). Dieser Reifungsprozeß ist für die Infektiosität der Partikel entscheidend (Thomas *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1998). Durch Nachweis des R-Peptids im Virus kann der Reifungszustand der Hüllproteine überprüft werden. Daher wurde ein Kaninchen mit einem synthetischen Peptid, das der Aminosäuresequenz des R-Peptids von PERV entspricht, immunisiert.

Schließlich sollte eine Möglichkeit geschaffen werden, die Subtypen von PERV immunologisch zu differenzieren. Da sich die Sequenzen der Subtypen im wesentlichen in einem kleinen Bereich des Oberflächenhüllproteins gp70 unterscheiden, der vermutlich auch für die Bindung an den Zellrezeptor und damit für den Zelltropismus entscheidend ist, konnte nicht mit Vollängen-Protein immunisiert werden. Auch hier wurden synthetische Peptide verwendet, deren Sequenz von diesen Bereichen mit geringer Homologie abgeleitet wurde.

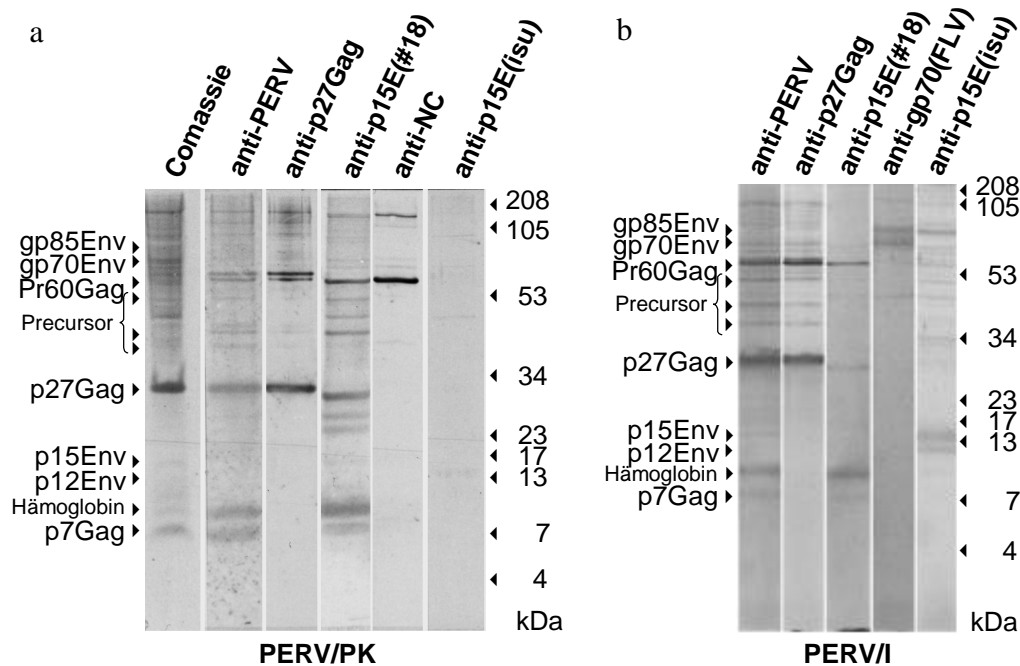


Abbildung IV-6: Reaktivität der Kontrollseren gegen PERV/PK (a) und PERV/I (b). Abgebildet sind Western Blot, die die Reaktionen der verschiedenen Kontrollseren gegen virale Proteine in der Viruspräparation von PK 15-Zellen (a) und 293/I-Zellen (b) im Western Blot zeigen. Die linke Bahn in Abbildung a zeigt eine Comassie blue-Färbung einer Membran. Die identifizierten Proteine sind links, die Molekulargewichte des Proteinstandards sind rechts markiert.

Die Seren gegen synthetische Peptide wurden in ELISA-Assays auf ihre Reaktivität gegen ungekoppelte Peptide überprüft (z.B. Kontrollen in Abbildung IV-16). Dabei konnte gezeigt werden, daß die gegen das immunsuppressive und immundominante Peptid gewonnenen Seren sowohl mit dem identischen, aber auch in abgeschwächter Form mit dem jeweiligen anderen Peptid reagieren. Dies ist nicht verwunderlich, da sich isuA- und isuB-, wie auch idoA- und idoB-Peptid nur in einer bzw. in zwei Aminosäuren unterscheiden und die ido- bzw. isu-Peptide sich um einige Aminosäuren überlappen (Tabelle III-2).

Die Reaktivität der gewonnenen Antiseren gegen PERV von PK 15- und 293-Zellen sowie gegen FLV wurde in Western Blot-Assays getestet, um die einzelnen viralen Proteine zu identifizieren (Abbildung IV-6 bis Abbildung IV-8). Darüber hinaus wurden auch kreuzreagierende Antiseren eingesetzt, die gegen Proteine anderer Typ C-Retroviren entwickelt worden waren.

Die Reaktivität des p15E-Serums (anti-PERV-Bisu) ist gering, in der Bahn, die mit anti-p15E(isu) inkubiert wurde (Abbildung IV-6 b), war daher die dreifache Proteinmenge aufgetragen worden. Dabei sind deutlich die Reaktionen gegen p15E sowie gegen das gereifte, nur im Viruspartikel vorliegende p12E, bei dem das R-Peptid abgespalten wurde, zu erkennen. Darüber hinaus erkennt das Serum natürlich auch das Precursorprotein gp85Env. Dieses wird ebenfalls vom Serum gegen gp70 von FLV erkannt, ebenso wie das gp70. Das Ziegen Serum #18 reagiert in erster Linie gegen das p7Gag-Protein. Dabei handelt es sich um das NC-Protein, da ein spezifisches NC-Serum (Krach *et al.*, 2000) ebenfalls gegen dieses Protein

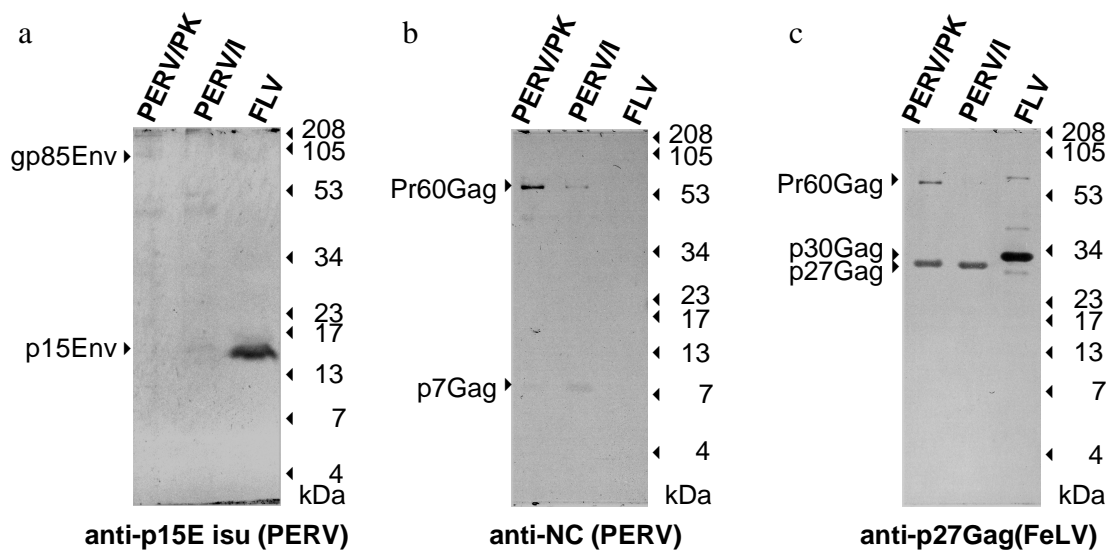


Abbildung IV-7: Vergleich der Reaktionen von einigen Seren gegen PERV bzw. FLV. PERV/PK-, PERV/I- und FLV-Präparationen wurden nebeneinander in gleichen Mengen aufgetragen. Zur Detektion wurde das anti-isuB-Kaninchenserum (a), das anti-NC-Kaninchenserum (Krach *et al.*, 2000b) und ein monoklonaler anti-p27Gag(FeLV)-Antikörper (c) eingesetzt. Die identifizierten Proteine sind links, die Molekulargewichte des Proteinstandards sind rechts markiert.

reagiert (Abbildung IV-6 & Abbildung IV-7). Daneben werden vom Ziegenserum #18 aber auch das Hämoglobin, Precursorproteine (insbesondere bei PK 15) und auch in geringem Umfang das p15E/p12E erkannt. Das Serum gegen p27Gag reagiert stark mit dem reifen Kapsidprotein und den Precursorproteinen. Die gleichen Proteine werden auch vom Serum gegen das gesamte Virus detektiert, welches zusätzlich auch p7Gag und Hämoglobin, wie auch p15E und gp70/gp85 erkennt, wobei letztere Reaktionen schwach sind.

Die schwachen Reaktionen gegen die Hüllproteine sind deutlich auf die vergleichsweise geringen Proteinmengen in den Präparationen zurückzuführen. Dies wird auch in der Abbildung IV-7 deutlich, wo gleiche Mengen der Präparationen von PERV/PK, PERV/I und FLV nebeneinander mit dem gleichen Serum detektiert wurden.

Die Kreuzreaktionen der PERV-Seren (Abbildung IV-7 & Abbildung IV-8) mit den Proteinen des verwandten C-Typ Virus FLV bestätigen die immunologische Verwandtschaft von PERV zu anderen Typ C-Retroviren. Das anti-PERVB-isu-Serum und das Serum #18 detektieren das p15E/p12E-Protein des FLV (Abbildung IV-7 a & Abbildung IV-8). Demgegenüber ist das ungespaltene Vollängenhüllprotein gp85 im FLV-Viruspartikel im Gegensatz zu PERV kaum zu finden (Abbildung IV-7 a). Dies unterstreicht die Vermutung, daß die Inkorporation der Hüllproteine in die Viruspartikel bei PERV vergleichsweise gering ist. Das CA-Protein der

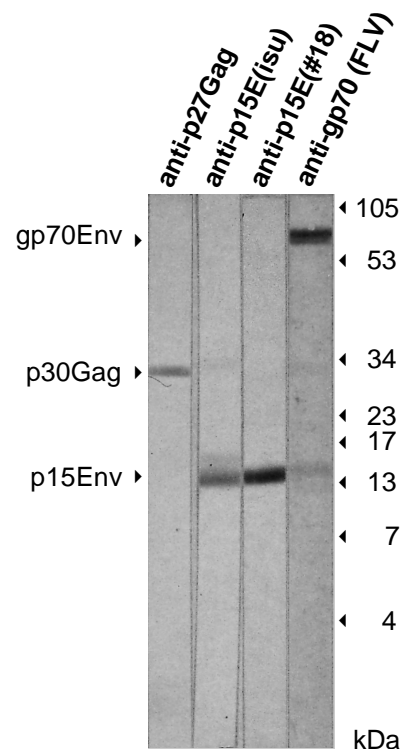


Abbildung IV-8: Kreuzreaktivität der neu generierten Seren mit FLV-Virus. In Western Blot-Assays wurden die Reaktionen der Kaninchenserum gegen p27Gag und p15E (isuB), sowie des Ziegenserums #18 und des Ziegenserums gegen gp70(FLV) mit FLV-Proteinen untersucht. Die identifizierten Proteine sind links, die Molekulargewichte des Proteinstandards sind rechts markiert.

Viren zeigt weiterhin die Verwandtschaft von PERV zu anderen C-Typ Viren. So reagieren sowohl p30Gag(FLV) als auch p27Gag(PERV) mit einem anti-p27Gag-Serum gegen das feline Leukämievirus (FeLV; Abbildung IV-7 c) aber auch mit Seren gegen p30Gag des Gibbonaffen-Leukämievirus (GALV) oder des endogenen Pavianvirus (BaEV), zum anderen detektiert das anti-p27Gag(PERV) auch das CA-Protein von FLV (Abbildung IV-8).

IV.1.5. Expression und Reinigung von rekombinantem p15E-Protein

Da die Verwendung von gereinigten Viruspartikeln aus Kulturüberständen infizierter Zellen als Antigen für einige Nachweismethoden mit Problemen behaftet ist, wurden Proteine in großen Mengen rekombinant hergestellt. Hierzu muß einerseits die genetische Sequenzinformation vorliegen, andererseits muß jedes einzelne Antigen, jedes virale Strukturprotein, separat konstruiert und produziert werden.

Da zu Beginn dieser Arbeit für PERV lediglich die Sequenzen der Hüllproteine bekannt war, und ein Hauptaugenmerk der Arbeit auf die immunsuppressive Wirkung des transmembranen Hüllproteins gerichtet war, wurde dieses Protein rekombinant exprimiert. Bei transmembranen Proteinen ist das Verhalten in wäßrigen Lösungen aufgrund ihres ausgeprägt hydrophoben Charakters problematisch. Die Löslichkeit ist aber generell Voraussetzung für eine geordnete Expression in Bakterien und für den Einsatz dieses Proteins in zellulären Assays. Aus diesem Grunde wurde ein verkürztes Protein (rp15E; aa 15-139) konstruiert und als Fusionsprotein mit dem Maltosebindungsprotein (MBP) exprimiert. Letzteres dient der einfacheren Präparation des reinen Proteins mittels Affinitätschromatographie (Berg, 1999). Die Auswahl des Fragments aa 15-139 erfolgte nach Analyse der Sequenz mittels Hydrophobizitätsplot

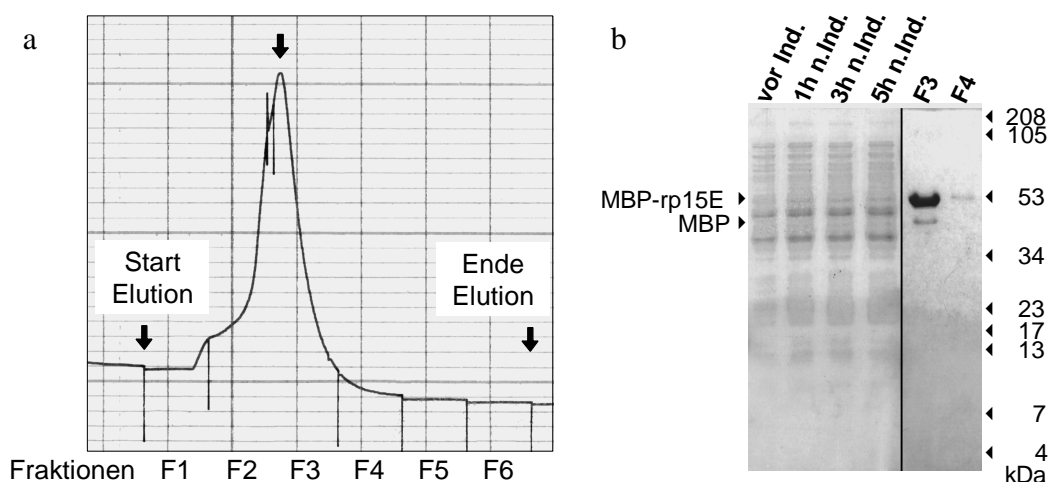


Abbildung IV-9: Expression und Reinigung von rp15E als Fusionsprotein. (a) Dargestellt ist das Elutionsprofil der Affinitätschromatographie des rp15E (als Fusionsprotein mit dem Maltose-Bindungsprotein – MBP) von der Amylose-Säule mittels FPLC. Markiert sind Start- und Endpunkt der Elution sowie die Fraktionen. (b) SDS-PAGE-Analyse von Proben vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der rp15E-Expression sowie aus Elutionsfraktionen. Die Banden des Fusionsproteins (MBP-rp15E) und des MBP ohne p15E (MBP) sind links, die Molekulargewichte des Proteinstandards sind rechts markiert.

(Kyte & Doolittle, 1982) und umfaßt den Bereich zwischen dem Fusionspeptid und dem Transmembransegment.

Das Konstrukt wurde von den Bakterien nach Induktion exprimiert. Allerdings waren das Wachstum der Bakterien und die Expression des Fusionsproteins gering (Abbildung IV-9 b). Mittels denaturierender Gelelektrophorese konnten in der Elutionsfraktion F3 zwei Proteine detektiert werden, welche durch Western Blot unter Verwendung eines anti-p15E-Serums und eines anti-MBP-Antikörpers als das Fusionsprotein und das freie MBP identifiziert werden konnten. Es bleibt unklar, ob der p15E-Anteil von den Bakterien teilweise nicht produziert oder aber abgespalten wird.

Die anschließende Spaltung des Fusionsproteins durch Faktor Xa in das MBP und das rp15E-Protein erwies sich jedoch als ineffizient. Es konnte nur ein geringer Teil des Fusionsproteins gespalten werden. Jedoch konnte in der Gelelektrophorese das rekombinante Protein detektiert und auch im Western Blot mit Antiseren gegen p15E und gegen PERV nachgewiesen werden, wobei diese Seren (wie auch viele andere) unspezifisch mit dem freien MBP reagierten (Abbildung IV-10). Dabei fällt eine unerwartete, zusätzlich Bande bei ca. 70 kDa auf („???“ in Abbildung IV-10), die nur bei Western Blots mit anti-p15E-Antikörpern auftritt, in einer Gelelektrophorese nicht zu detektieren ist. Möglicherweise handelt es sich hier um eine dimerisierte Form des rp15E-Anteils (MBP-pr15E + rp15E). Derartige Multimerisierungen in Gegenwart von SDS sind beschrieben worden (Pinter *et al.*, 1989). Versuche, die Spaltungseffizienz durch gering dosierte Detergenzien oder Denaturierungsmittel zu erhöhen, schlugen

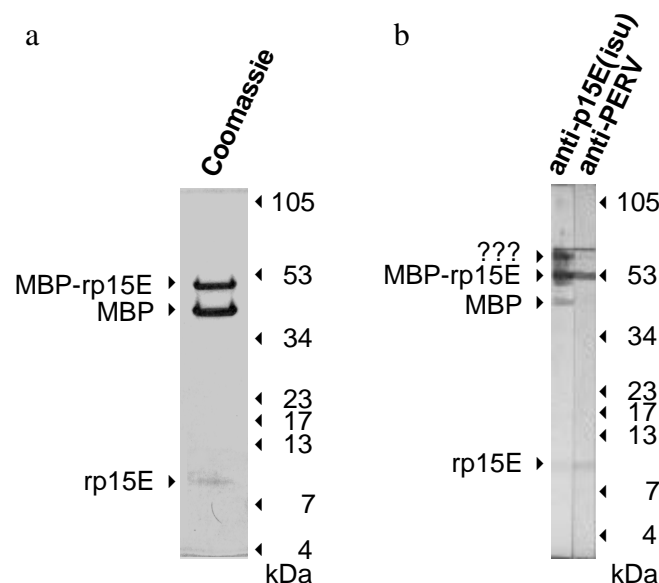


Abbildung IV-10: Gelelektrophorese und Western Blot von rp15E nach Spaltung des Fusionsproteins: Denaturierende Gelelektrophorese mit Coomassie-Färbung (a) und Western Blot mit anti-p15E- und anti-PERV-Antikörper (b) des Fusionsproteins nach Faktor Xa-Behandlung. Die Banden des Fusionsproteins, des abgespaltenen MBP und des rp15E sind links, die Molekulargewichte des Proteinstandard sind rechts angegeben.

fehl.

Wegen der geringen Spaltungseffizienz wurde das Protein nicht für ELISA-, sondern für Western Blot-Nachweismethoden verwendet, die bei den klinischen und präklinischen Untersuchungen Einsatz fanden (Kap. IV.3).

IV.2. Inhibition der Proliferation lymphoider humaner Zellen durch PERV

Die meisten Retroviren induzieren im infizierten Wirt eine Suppression des Immunsystems. Diese drückt sich beispielsweise bei den feline Leukämieviren, Retroviren des C-Typs, dadurch aus, daß nur ein Teil der infizierten Tiere eine Leukämie entwickelt, aber ein viel größerer Teil stirbt in Folge von opportunistischen Infektionen (Olsen *et al.*, 1981; Hardy, 1982). HIV, ein Lentivirus, ruft wie die Immundefizienzviren allgemein fast ausschließlich immunsuppressive Effekte hervor (Fauci, 1988). Es ist unklar, ob für alle Retroviren ein einheitlicher Wirkungsmechanismus gilt. Nach einer Arbeitshypothese ist eine Domäne der transmembranen Hüllproteine der Retroviren, die auch unter den verschiedenen Typen der Retroviren hoch konserviert ist, an diesen Immunsuppressionseffekten maßgeblich beteiligt (Denner, 1998; Denner, 2000a). Diese Domäne wird auch als immunsuppressive Domäne bezeichnet (Cianciolo *et al.*, 1985; Brody & Hunter, 1992). Da die *In vivo*-Situation schwer zu untersuchen ist, wurde die Inhibition der mitogeninduzierten Proliferation von PBMC als *In vitro*-Analyseverfahren entwickelt. So konnte gezeigt werden, daß sowohl infektiöse als auch inaktivierte, nicht infektiöse Viruspräparationen, aus Viruspartikeln präpariertes TM-Protein und synthetische Peptide von HIV und anderen Retroviren einen proliferationsinhibierenden Effekt zeigen (Mathes *et al.*, 1979; Cianciolo *et al.*, 1985; Orosz *et al.*, 1985; Schmidt *et al.*, 1987; Haraguchi *et al.*, 1997).

Um nun eine mögliche Gefährdung von PERV durch ein solches immunsuppressives Verhalten zu überprüfen, wurde dieser Effekt *in vitro* untersucht.

IV.2.1. Untersuchungen mit gereinigtem PERV

Zunächst wurde die proliferationshemmende Wirkung von PERV-Präparationen untersucht, wobei intakte, infektiöse aber auch ether- bzw. detergenzinaktivierte Viruspräparationen verwendet wurden. Durch die Inaktivierung kann ausgeschlossen werden, daß es sich bei den proliferationsinhibitorischen Effekten um infektionsbedingte Hemmungen handelt, da PERV in der Lage ist, humane Zellen zu infizieren. Für die Untersuchungen wurden humane PBMC mit Concanavalin A (ConA) stimuliert und mit PERV von PK 15- oder infizierten humanen 293-Zellen sowie als Kontrolle mit Präparationen des murinen Leukämievirus FLV aus FEM-Zellen inkubiert.

Wie in der Abbildung IV-11 zu sehen ist, konnte eine deutliche Inhibition der mitogen-induzierten Proliferation der humanen PBMC nachgewiesen werden. Dabei zeigt sich kein wesentlicher Unterschied zwischen intakten und inaktivierten Viren. Auch stimmen die Ergebnisse, die mit PERV erhalten wurden, mit denen für FLV und den bereits publizierten Ergebnissen für andere Retroviren überein (Mathes *et al.*, 1978; Denner *et al.*, 1980; Denner *et al.*, 1985a; Denner *et al.*, 1985b; Orosz *et al.*, 1985). Untersucht wurden in erster Linie humane PBMC, da die für die Risikoabschätzung von größter Bedeutung sind. Der proliferationshemmende Effekt ist allerdings speziesunabhängig (Kap. IV.2.2; Denner *et al.*, 1996).

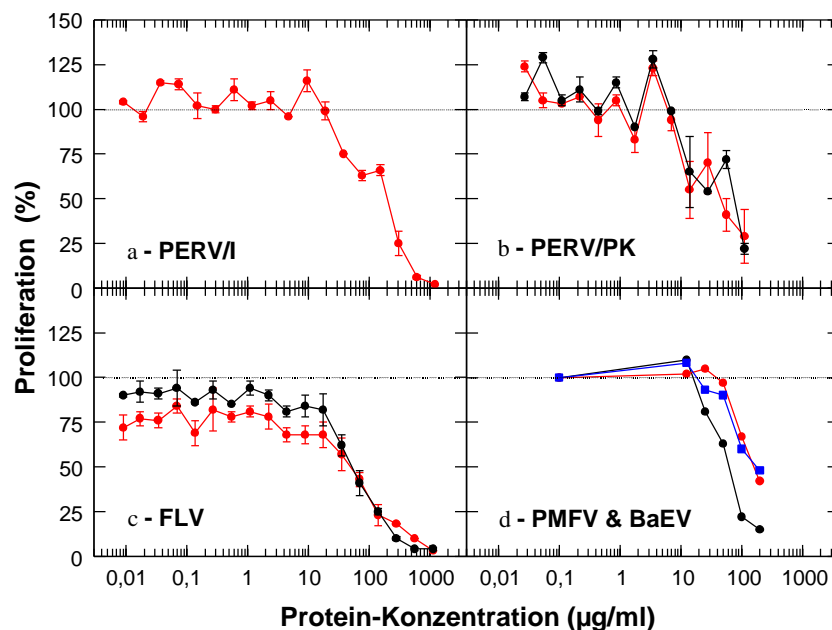


Abbildung IV-11: Inhibition der Proliferation von ConA-stimulierten humanen PBMC durch verschiedene Retroviren. Intakte, infektiöse Viren (?) oder Viren nach Inaktivierung durch Ether (a-c) bzw. durch Triton X-100 (d) wurden nach serieller Ausverdünnung zu den Zellen gegeben. Die Proliferation ist prozentual in Abhängigkeit von der Virusprotein-Konzentration (logarithmisch) aufgetragen. Dargestellt sind die Ergebnisse für PERV/I (a), PERV/PK (b) und FLV (c). Zum Vergleich sind in (d) Ergebnisse für ein Typ D-Retrovirus, das permanente menschliche Fibroblastenvirus (PMFV) aus humanen ovariellen Karzinomzellen (?), und für das inaktivierte endogene Retrovirus des Pavians (*baboon endogenous retrovirus*, BaEV) aus humanen Rhabdomyosarcomazellen (◐) abgebildet (Denner *et al.*, 1980; Denner *et al.*, 1985b).

IV.2.2. Untersuchungen mit synthetischen Peptiden

Nachdem die proliferationshemmende Wirkung der viralen Proteine von PERV nachgewiesen werden konnte, wurden synthetische Peptide eingesetzt. Ihre Sequenzen wurden aus den transmembranen Hüllproteinen der bekannten drei Subtypen von PERV abgeleitet und entsprechen in Position und Sequenz im wesentlichen den bereits bekannten immunsuppressiven Domänen von HIV und MuLV (Abbildung I-4). Da die Aminosäuresequenzen von PERV-A und PERV-C in diesem Bereich zu 100% homolog sind, wurden nur zwei verschiedene Peptide (PERV-Aisu und PERV-Bisu) eingesetzt. Diese Peptide unterscheiden sich in einer einzel-

nen Position (Tabelle IV-3). Als Kontrolle wurde das immunsuppressive Peptid von HIV verwendet.

Tabelle IV-3: Sequenzen der verwendeten Peptide. Aminosäuren, die von der PERV-Konsensus-Sequenz abweichen, sind fett gedruckt, Aminosäuren, die einen konservativen Austausch darstellen, sind grau unterlegt.

Name	Sequenz
PERV-Aisu	LQNRRLGLDLLFL K EGGLC
PERV-Bisu	LQNRRLGLDLLFL R EGGLC
HIV-isu	K ELQ A R I L A V E R Y L K D QQL

Da die Peptide nicht als Monomere aktiv sind, wurden sie chemisch an BSA als Trägermolekül gekoppelt (Denner *et al.*, 1994). Dadurch wird es den Peptiden ermöglicht, durch eine höhere lokale Konzentration die notwendige Multiplizität zu erreichen und durch die parallele Anordnung die aktive Konformation einzunehmen – im „nativen“ Zustand liegen die transmembranen Proteine im Virus als Trimer von parallelen Helices vor, wobei die immunsuppressive Domäne maßgeblich an der Multimerisierung beteiligt ist. Die Herstellung der Peptid-BSA-Konjugate erfolgte mittels EDC als Kopplungsreagenz. Dabei reagiert das Carbo-diimid mit einer freien Carboxylgruppe (C-Terminus oder Seitenkette) des Peptids zu einem aminoreaktiven Intermediat, welches anschließend mit einer primären Aminogruppe des Trägerproteins BSA reagieren kann (Grabarek & Gergely, 1990). Das Resultat der Kopplungsreaktion wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Die BSA-Peptid-Konjugate ließen sich deutlich von BSA-Monomeren unterscheiden, da sie diffus bei einer mittleren Größe von ca. 80 kDa bandierten. Zusätzlich waren auch deutlich BSA-Multimere zu sehen, weshalb zu Kontrollzwecken BSA an BSA gekoppelt wurde.

Der proliferationsinhibitorische Effekt ist speziesunabhängig (Denner *et al.*, 1996). Daher wurden auch Zellen anderer Spezies getestet. Neben den menschlichen Zellen wurden PBMC von Pferden, die unter den gleichen Bedingungen wie die humane PBMC kultiviert wurden, und die permanente, IL-2 abhängige Mauszelllinie (CTL-6) untersucht.

Bei allen untersuchten Konjugaten des immunsuppressiven Peptids ist deutlich zu erkennen, daß bei Peptidkonzentrationen über ca. 10 µg/ml die Proliferation aller untersuchten Zellen deutlich inhibiert wird, während die BSA-Multimere keine Hemmung der Proliferation hervorrufen (Abbildung IV-12). Lediglich Pferde-PBMC zeigen eine leichte Inhibition durch BSA-Multimere, weisen aber gleichzeitig den höchsten Inhibitionseffekt auf, so daß bei einer Peptidkonzentration von 60 µg/ml nur noch eine Proliferation von weniger als 20% erreicht wird. Deutlich wird auch, daß sich die einzelnen Peptide nur wenig in ihrer Wirkung unterscheiden.

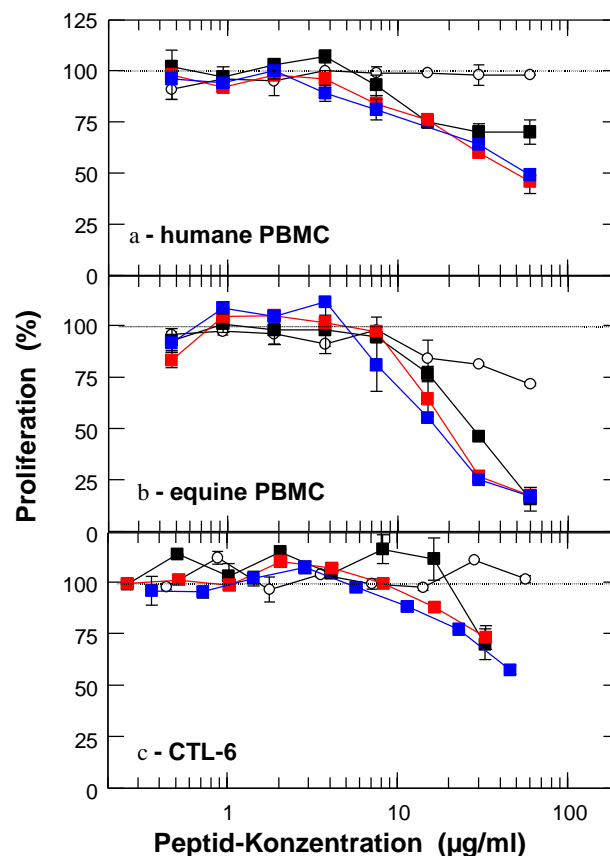


Abbildung IV-12: Inhibition der Proliferation durch immunsuppressive Peptide. Die Inhibition der Proliferation von ConA-stimulierten humanen PBMC (a), ConA-stimulierten equinen PBMC (b) und Interleukin-2 stimulierten murinen CTL-6-Zellen (c) durch verschiedene, seriell ausverdünnte, an BSA gekoppelte immunsuppressive Peptide wurde untersucht. Die Proliferation ist prozentual in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration (logarithmisch) aufgetragen. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse für die Peptide PERV-Aisu (○), PERV-Bisu (◻), HIV-isu (◻) und der BSA-Multimer-Kontrolle (?).

IV.3. Indirekte immunologische Detektionsmethoden für PERV-Infektionen

Retrovirale Infektionen können entweder direkt oder aber indirekt, durch die Untersuchung einer Antikörperantwort gegen das Virus, nachgewiesen werden. Direkte Methoden (z.B. Nachweis des integrierten Genoms in infizierten Zellen und Geweben mittels PCR oder Untersuchung von Partikeln im Blut mit Hilfe der RT-PCR) haben den entscheidenden Nachteil,

daß sie nur dann effektiv eingesetzt werden können, wenn die infizierten Gewebe bekannt und auch im Patienten zugänglich sind.

Demgegenüber haben die indirekten, immunologischen Methoden den Vorteil, daß die im Verlauf einer Infektion gebildeten Antikörper lange im Blut präsent sind und sich somit eine Infektion relativ leicht nachweisen läßt. Daher wurden verschiedene immunologische Detektionsverfahren zur Untersuchung von Patienten nach zukünftigen Xenotransplantationen auf eine mögliche PERV-Infektion etabliert.

IV.3.1. Entwicklung eines kombinierten ELISA- & Western Blot-Testverfahrens

Zunächst wurde auf Basis von synthetischen Peptiden ein ELISA etabliert. Da die vorliegenden Sequenzinformationen zunächst noch sehr begrenzt waren und über das Infektionsverhalten des Virus nur wenig bekannt war, wurde auf Erfahrungen mit anderen Retroviren zurückgegriffen. Das immundominante Peptid war insbesondere bei der Diagnose von HIV-Infektionen aber auch für Untersuchungen des humanen endogenen Retrovirus HERV-K erfolgreich eingesetzt worden (Löwer *et al.*, 1998). Obgleich auch gegenteilige Untersuchungsergebnisse für FeLV vorliegen (Fontenot *et al.*, 1992), wurde es hier verwendet, da es aufgrund der auch bei PERV zu vermutenden intramolekularen Cystein-Cystein-Schleife als besonders immunogen gilt (Pancino *et al.*, 1995). Darüber hinaus ist auch das immunsuppressive Peptid zur Diagnose geeignet, da auch gegen dieses Epitop häufig Antikörper gebildet werden (Denner *et al.*, 1994; Viveros *et al.*, 2000).

Aufgrund der hohen Sequenzhomologien zwischen den verschiedenen Retroviren im Bereich des immunsuppressiven bzw. des immundominanten Peptids stellt dieser ELISA vermutlich kein PERV-spezifisches Testsystem dar. Infektionen mit verwandten Retroviren könnten ebenfalls erfaßt werden. Der ELISA wurde somit als Vortest angesehen, da zwar falsch-positive jedoch keine falsch-negative Ergebnisse zu erwarten waren.

Für den spezifischen Nachweis einer PERV-Infektion wurde auf ein aussagekräftigeres immunologisches Analysesystem, den Western Blot, unter Verwendung von hoch gereinigtem Virusprotein zurückgegriffen. Bei der Immunantwort auf eine retrovirale Infektion werden in der Regel Antikörper gegen die Hauptstrukturproteine gebildet. Insbesondere das CA-Protein (im Fall von PERV p27Gag) ist ein sehr immunogenes und zahlenmäßig das dominante Protein in den Viruspartikeln und ruft daher eine besonders deutliche Antikörperantwort hervor. Darüber hinaus sind stets Antikörper gegen die Hüllproteine SU und TM (hier als gp70 und p15E identifiziert) und meist auch gegen die anderen Gag-Proteine, das NC-, das MA- und das p15Gag-Protein, vorhanden. Die eingesetzten Viruspräparationen wurden aus den Über-

ständen von porcinen PK 15-Zellen und infizierten humanen 293-Zellen präpariert (Kap. IV.1.2) und sorgfältig charakterisiert (Abbildung IV-3 & Abbildung IV-5).

IV.3.2. Validierung der Assays

Zur Überprüfung der Aussagefähigkeit und der Empfindlichkeit wurden die Seren von insgesamt 651 gesunden Blutspendern getestet (Tabelle IV-4).

Unter den Spendern waren auch 38 schwangere Frauen, da in früheren Studien gezeigt werden konnte, daß im Serum Schwangerer kreuzreaktive Antikörper vorliegen können, die das TM-Protein von Typ C-Retroviren detektieren (Hirsch *et al.*, 1978; Boller *et al.*, 1997). Auch wurden Seren von 44 Schlachtern aus Schlachthöfen und Metzgereien untersucht. Aufgrund des intensiven Kontakts mit frischem Schweinematerial und –blut wurde vielfach vermutet, daß Schlachter mit großer Wahrscheinlichkeit Antikörper gegen PERV entwickeln würden.

Alle Seren wurden zunächst im ELISA auf Reaktionen gegen das immunsuppressive und das immundominante Peptid untersucht. Hier wurden insgesamt 42 Seren mit positiven Ergebnissen gezählt. Diese Proben und eine Zufallsauswahl von 61 ELISA-negativen Seren wurden im Western Blot mit Viruspräparationen getestet. 15 Seren mit positiven ELISA-Ergebnissen wurden darüber hinaus im Western Blot auf Antikörper gegen rp15E untersucht. Bei keinem der untersuchten Seren wurden Antikörper gegen PERV-Proteine gefunden. Folglich ist eine Infektion unwahrscheinlich.

Tabelle IV-4: Übersicht über die Ergebnisse der Assay-Validierung.

Assay	Peptid-ELISA		Western Blot (rp15E)		Western Blot (Virusprotein)			
	positiv/getestet	(%)	positiv/getestet	(%)	p27Gag		Virus	
Donorgruppe	positiv/getestet	(%)	positiv/getestet	(%)	positiv/getestet	(%)	positiv/getestet	(%)
Blutspender	37 / 569	7 %	0 / 15 [#]	0 %	4 / 80	5 %	0 / 113	0 %
Schwangere	0 / 38	0 %	n.g.	–	n.g.	–	n.g.	–
Schlachter:								
- Tötung	2 / 14	14 %	n.g.	–	3 / 14	21 %	0 / 14	0 %
- Verarbeitung	3 / 30	10 %	n.g.	–	2 / 19	11 %	0 / 19	0 %
gesamt	42 / 651	6 %	0 / 15	0 %	9 / 113	8 %	0 / 113	0 %

[#] alle Sera waren positiv im Peptid-ELISA

Bei den Western Blot-Analysen mit Viruspräparationen wurden jedoch insgesamt 9 Reaktionen gegen das p27Gag-Protein identifiziert (Tabelle IV-4). Wie in der Abbildung IV-13 dargestellt, zeigen auch gesunde Blutspender Reaktionen gegen das CA-Protein. Dies ist jedoch kein Nachweis für eine Virusinfektion, denn es werden in derartigen Testsystemen oft kreuzreagierende Antikörper nachgewiesen (Biggar *et al.*, 1985; Sayre *et al.*, 1996). Auch die Reaktionen der zwei Schlachter im Bereich >70 kDa sind nicht gegen virale Proteine gerich-

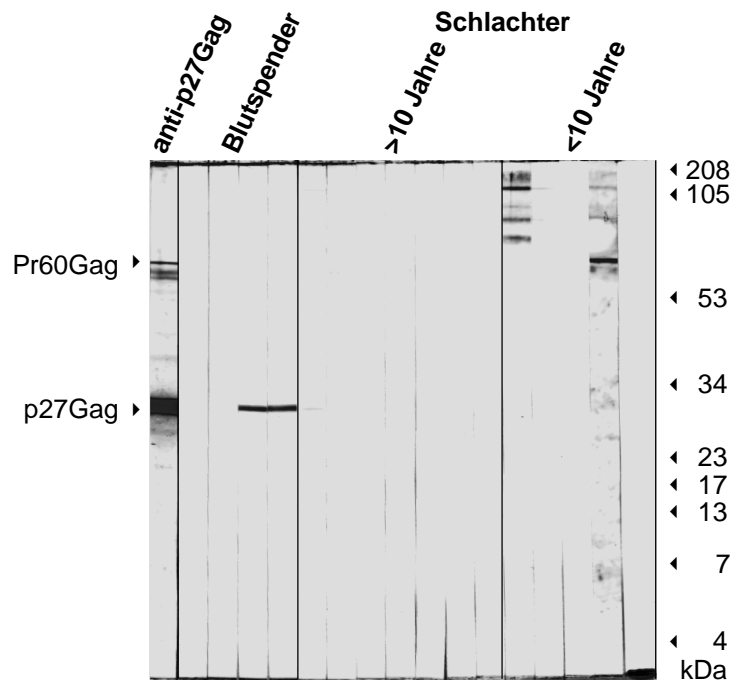


Abbildung IV-13: Western Blot-Analyse der Seren von 4 Blutspendern, 7 langjährigen und 5 weiteren Schlachtern auf Antikörper gegen PERV/I. Als Kontrolle ist das anti-p27Gag-Kaninchenserum abgebildet. Die identifizierten Proteine sind links, die Molekulargewichte des Proteinstandards sind rechts markiert.

tet, wie durch die entsprechenden Kontrollseren gezeigt werden konnte. Eine Infektion gilt erst dann als sicher nachgewiesen, wenn Antikörper gegen mindestens zwei Strukturproteine unabhängig voneinander identifiziert wurden (Jenum, 1988; Van Doornum *et al.*, 1998).

IV.3.3. Einsatz der Detektionssysteme in präklinischen und klinischen Studien

Die etablierten Detektionssysteme wurden in verschiedenen experimentellen, präklinischen und auch klinischen Studien verwendet, um immunologische Reaktionen gegen PERV und damit eine mögliche Infektion nachzuweisen.

a) Patienten mit Herzklappenimplantationen

Bei chronischer Herzklappeninsuffizienz wird als eine Standardtherapie die Transplantation von porcinen Herzklappen durchgeführt. Obwohl eine solche Übertragung von Schweineherzklappen auf den Menschen strenggenommen auch eine Xenotransplantation darstellt, ist eine mögliche Gefährdung durch PERV aufgrund der vorherigen Fixierung der Herzklappen mit Glutaraldehyd als eher gering einzuschätzen. Um ein Restrisiko auszuschließen, wurde erstens die Expression retroviraler Sequenzen in kommerziell erhältlichen, für Transplantationen vorgesehenen Herzklappen mittels PCR bzw. RT-PCR analysiert (Moza *et al.*, 2001). Zweitens wurden Blutproben von 18 Rezipienten porciner Herzklappen, die zwischen 6 Monaten und 3 Jahren nach der Operation genommen wurden, mit PCR-Methoden auf das Vorhandensein von Viruspartikeln sowie deren PBMC auf Provirusintegration untersucht.

Um darüber hinaus sicherzustellen, daß auch keine längere Exposition der Rezipienten mit freigesetzten PERV-Partikeln stattfand, wurde drittens das Serum der Patienten mit den etablierten indirekten immunologischen Methoden auf Antikörper gegen PERV getestet.

In frisch präparierten Herzklappen konnten für maximal eine Woche geringe Mengen retroviraler RNA nachgewiesen werden. Im Serum der Patienten wurden jedoch keine Partikel und in PBMC auch keine retroviralen Sequenzen detektiert, so daß eine Integration des Virus ausgeschlossen werden kann (Moza *et al.*, 2001). Auch die Ergebnisse der Western Blot-Untersuchung (Abbildung IV-14) zeigen, daß keine Infektion mit PERV vorliegt. Bei 5 Patienten (c, e, f, h, j) konnte eine leichte Reaktion gegen das p27Gag-CA-Protein, bei 4 Patienten (e, g, i, j) eine Reaktion mit dem gp70Env-SU-Protein beobachtet werden. Die Reaktionen gegen das p27Gag-Protein sind jedoch vergleichsweise schwach. Da dieses Protein immunologisch dominant ist, wie dies auch in den Kontrollen deutlich wird, sind die Reaktionen gegen das gp70Env unverhältnismäßig stark. Eine solche Reaktivität tritt gelegentlich auf, wenn Antikörper gegen die Kohlenhydratketten des Glykoproteins vorliegen. Diese sind jedoch nicht virusspezifisch, so daß diese Ergebnisse nicht als Anzeichen für eine Infektion zu bewerten sind.

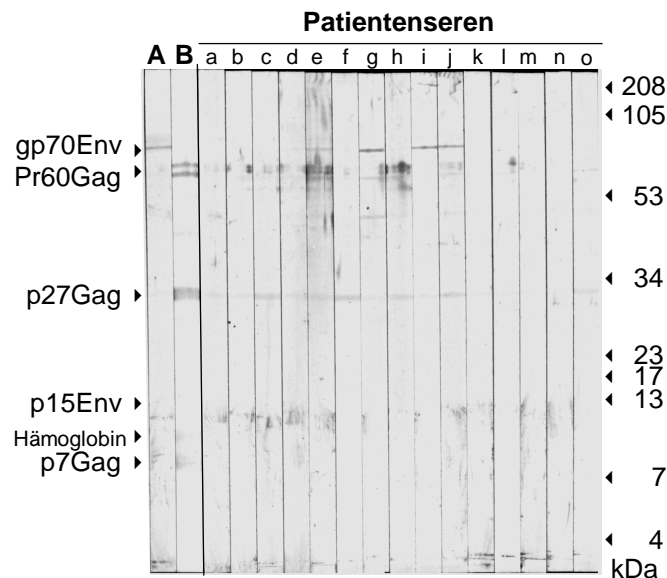


Abbildung IV-14: Western Blot-Analyse der Seren von Herzklappen-Rezipienten. Seren von 15 Patienten nach Implantation von präparierten Herzklappen aus Schweinen (a-o) wurden im Western Blot auf ihre Reaktivität gegen PERV (Virus 293/4) getestet. Als Kontrollseren wurden ein anti-gp71(FLV) (A) und ein anti-p27Gag (B) verwendet. Die identifizierten Proteine sind links, die Molekulargewichte des Proteinstandards sind rechts markiert.

b) Patienten nach klinischen Xenotransplantationen

Schon längere Zeit finden verschiedene Xenotransplantationstechniken klinische Anwendung. Hierzu gehören u.a. *Ex vivo*-Perfusionen von Niere, Milz und Leber bzw. von einer bioartifi-

ziellen Leber (HepatAssist, Circe Biomedical, Lexington, MA, USA) (Watanabe *et al.*, 1997), sowie die Übertragung von Langerhansschen Inseln (Groth *et al.*, 1994) und Haut des Schweins.

Daher wurden Serumproben von 160 Rezipienten solcher Therapien in einer dezentralen Studie (XENIII-Studie) auf Antikörper gegen PERV-Proteine und auf Provirusintegration in PBMC untersucht. Die Serumtests wurden im CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC) in den Vereinigten Staaten und der Firma Q-ONE in Glasgow, Schottland, durchgeführt (Paradis *et al.*, 1999). Dabei wurden bei 156 Probanden keine Anzeichen für eine PERV-Virämie gefunden. Interessanterweise konnte bei den PBMC von 23 Patienten ein Mikrochimärismus bis zu 8,5 Jahre nach der Xenotransplantation nachgewiesen werden. Als Mikrochimärismus wird die Existenz von einzelnen Donorzellen im Gewebe eines Transplantatempfängers außerhalb des Transplantates selbst bezeichnet. Bei 7 Serumproben von 4 Patienten konnte in dieser Studie kein einheitliches, reproduzierbares Reaktionsmuster erhalten werden. Diese Serumproben wurden freundlicherweise von der Firma IMUTRAN (Cambridge, England) zur Verfügung gestellt und konnten in den etablierten Western Blot-Assays überprüft werden (Tabelle IV-5; Abbildung IV-15).

Tabelle IV-5: Reaktivität der getesteten Patientenseren aus der XENIII-Studie nach Xenotransplantation gegen PERV (Paradis *et al.*, 1999). Aufgeführt sind die Arten der durchgeführten Xenotransplantationen, der Zeitpunkt der Serumnahme in Monaten nach der Transplantation, die erhaltenen Testergebnisse im Rahmen der Studie und eigene Ergebnisse aus Western Blot-Analysen (Abbildung IV-15). Die verwendeten Testverfahren sind als Fußnoten angegeben.

Patient	Behandlung	Zeitpunkt der Probenahme Monate n.T.	Ergebnisse (Studie)		Daten Western-Blot
			Q-One	CDC	
10018	<i>Ex vivo</i> -Leber-Perfusion (HepatAssist, USA)	0,03	n.g.	(+)*	+ °
		58,9	- #o	+ *	+ °
06062	<i>Ex vivo</i> -Milz-Perfusion (Rußland)	4,6	+ #o*	- #*	+ °
		11,6	+ #o	- *	+ °
06052	<i>Ex vivo</i> -Milz-Perfusion (Rußland)	73,2	+/- #o*	- #o*	+ °
		80,2	- #o	- #o*	+ °
08004	Inselzell-Therapie (Schweden)	0,1	- #o	+ *	+ °

Test mit p27(Gag) als Antigen, ° Western Blot mit gereinigtem Virus, * Western-Blot mit Zellysat von PERV-infizierten 293-Zellen

Mit Hilfe der Blot-Analyse konnte gezeigt werden, daß in allen Patientenseren Antikörper gegen das CA-Protein von PERV/I vorhanden sind, wenngleich in unterschiedlicher Konzentration. Eine Ausverdünnung der Seren (auf Virus von PK 15-Zellen, Abbildung IV-15 b) zeigt auch, daß die Bandenstärke in Abbildung IV-15 a mit der tatsächlichen Antikörperkon-

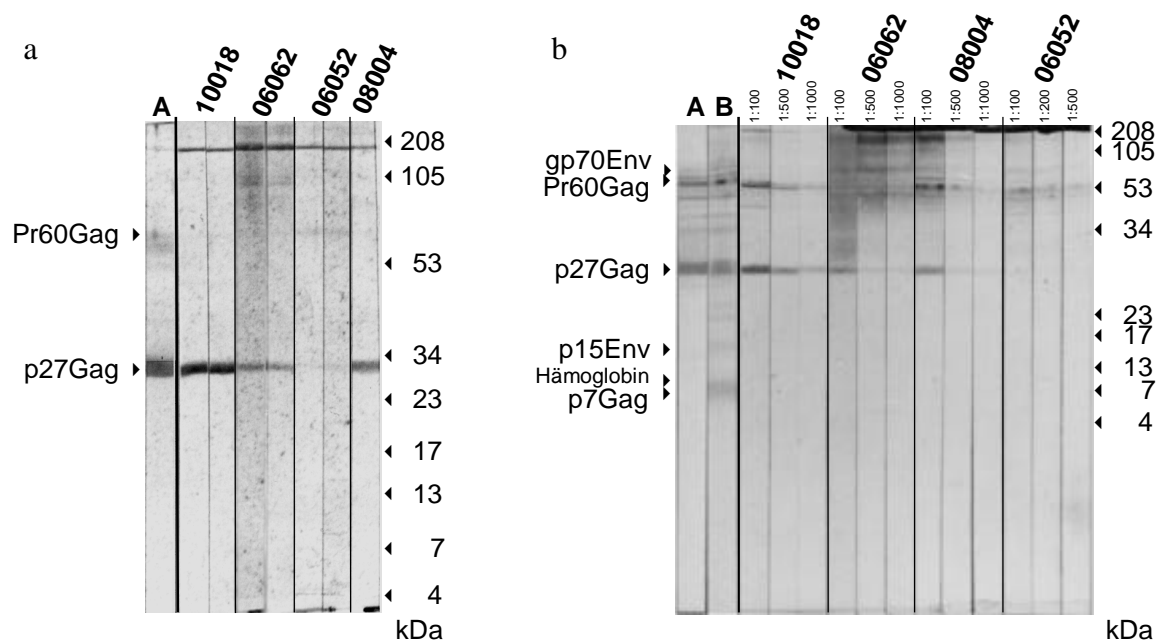


Abbildung IV-15: Western Blot-Analyse der Seren von Patienten nach Xenotransplantationen (XENIII-Studie, Tabelle IV-5; Paradis *et al.*, 1999). (a) PERV/I-Viruspräparation, Serumverdünnung 1:100. (b) PERV/PK-Viruspräparation, verschiedene Serumverdünnungen wie oben angegeben. Als Kontrollseren wurden anti-PERV (A) und anti-p27Gag(PERV) (B) verwendet. Die identifizierten Proteine sind links, die Molekulargewichte des Proteinstandards sind rechts angegeben.

zentration korreliert. Da bei allen Patienten keine Reaktionen gegen weitere PERV-Proteine festgestellt wurden, kann eine Infektion mit PERV ausgeschlossen werden.

c) Experimentelle Xenotransplantationen bei Pavianen

Die in den Untersuchungen in Kapitel IV.3.3a) und Kapitel IV.3.3b) durchgeführten Xenotransplantationen spiegeln nur zum Teil eine klinische Xenotransplantation eines vaskularisierten Organs in den Menschen wider. Es wurden nur wenige Zellen oder nicht-proliferierendes Material transplantiert und keine oder lediglich eine geringe Immunsuppressionstherapie durchgeführt. Die Dauer des Kontakts der Rezipienten mit Schweinegewebe war oftmals recht gering. In einer zukünftigen Xenotransplantation jedoch werden auch ganze, vaskularisierte Organe transplantiert werden, die zudem von transgenen Tieren stammen werden. Es wird eine starke, pharmakologische Immunsuppression appliziert werden. Relevante Aussagen über das Verhalten der PERV bei einer Xenotransplantation können nur unter vergleichbaren Bedingungen getroffen werden.

Da Pavianzellen *in vitro* mit PERV infiziert werden können, gelten sie aufgrund der großen evolutionären Nähe zum Menschen als ein gutes Tiermodell (Blusch *et al.*, 2000a; Specke *et al.*, 2001). Deshalb wurden experimentell Zellen und Organe von Schweinen der Deutschen oder Russischen Landrasse auf Paviane übertragen. Das Studiendesign von zwei verschiedenen Untersuchungen ist in Tabelle IV-6 und Tabelle IV-7 dargestellt. Diesen Tieren wurden

in der ersten Studie primäre Endothelzellen der Aorta (PAEC) transplantiert, in der zweiten zusätzlich auch PBMC und mononukleäre Milzzellen (SMC) infundiert bzw. temporär Lungen transplantiert. Es wurden Endothelzellen der Blutgefäße verwendet, da diese bei Organtransplantationen selbstverständlich mittransplantiert werden, ebenso PBMC. Zusätzlich wurden Milzzellen eingesetzt, da es lymphoide Zellen sind, die möglicherweise bei der Induktion von Toleranz benutzt werden. Lungen schließlich wurden als Organe ausgewählt, weil für dieses Organ als einziges, lebenswichtiges Organ kein günstiges, praktikables und adäquates Bridging-Verfahren bei Organversagen zur Verfügung steht wie beispielsweise eine Dialysetherapie bei Nierenversagen. Von Endothelzellen und Lymphozyten ist bekannt, daß sie PERV freisetzen können (Martin *et al.*, 1998a; Wilson *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurden durch den Einsatz von massiver pharmakologischer Immunsuppression und EIA ein zukünftigen Xenotransplantationen vergleichbares, supprimiertes Immunsystem geschaffen.

Tabelle IV-6: Studienaufbau (I). Transplantations- und Immunsuppressions-Protokolle für die Xenotransplantation der Paviane. Allen Pavianen wurden (je Zeitpunkt) 1×10^7 primäre Aortaendothelzellen (PAEC) infundiert und sie erhielten die angegebenen Dosen an Immunsuppressiva. Der Zeitpunkt der Blutentnahme in Tagen nach Transplantation ist angegeben. (Abkürzungen: CyP: Cyclophosphamid, Mycph: Mycophenolat)

Pavian-Nr.	Zeitpunkt der Transpl. Tage	Immunsuppressions-Protokoll		Tage	Entnahme Blutprobe Tage
		mg kg - Körpergewicht & Tag			
85	1	----	----	----	705
264	1	----	----	----	703
390	1	----	----	----	743
257	1	45	CyP	1-4	706
4026	1	30	CyP	1-7	628
		40	Mycph	4-31	
25559	1	15	CyP	1-4	743
26195	1	45	CyP	1-4	743
226	1	30	CyP	1-4	----
	197	30	CyP	1-6	705
376	1	30	CyP	1-7	----
	120	40	Mycph	4-31	627
392	1	----	----	----	----
	237	30	CyP	1-6	743
25809	1	----	----	----	----
	238	30	CyP	1-6	746

Tabelle IV-7: Studienaufbau (II). Transplantations- und Immunsuppressions-Protokolle für die Xenotransplantation der Paviane. Den Pavianen wurden primäre Aortaendothelzellen (PAEC) oder primäre mononukleäre Blutzellen (PBMC) infundiert oder Schweinelungen, orthotrop links einseitig, transplantiert. Die Verweildauer der Lungen und die Dosen an Immunsuppressiva, sowie der Zeitpunkt der Blutentnahme in Tagen nach Transplantation sind angegeben. (Abkürzungen: MePr: Methylprednisolon, Tabelle IV-6)

Pavian-Nr.	Transplantiertes Material	Zeitpunkt der Transpl. Tage	Immunsuppressions-Protokoll		Zusatzbehandlungen	Entnahme Blutprobe Tage	
			mg kg - Körpergewicht & Tag	Tage			
31509	----	----	----	----	----	1	
31590	6x10 ⁹ PBMC	1	20	CyP	1-3	1x EIA	1
	10 ⁸ PBMC	55	----	----	----	----	55
375	10 ⁷ PAEC	1	15	CyP	1-4	----	743
	Lunge (28h)	820	10	MePr	1	----	1205
52	10 ⁷ PAEC	1	----	----	----	----	704
	Lunge (50 min)	789	----	----	----	----	1197
	10 ⁸ PBMC	1197	----	----	----	1x EIA Fucoidin*	1198
108	10 ⁷ PAEC	1	30	CyP	1-7	----	629
	Lunge (3 h)	717	40	Mycoph	4-31	----	1086
	10 ⁸ PBMC	1086	----	----	----	----	1087

* Fucoidin ist ein Selektinblocker und verhindert die Lymphozyten-Adhäsion und -Infiltration in Geweben (Ritter *et al.*, 1998)

In dieser Studie wurden somit eine Reihe von Punkten thematisiert, die zuvor nicht untersucht worden waren, wenngleich keine transgenen Schweine verwendet wurden und die Expositionszeiten der vaskularisierten Organe nur bei wenigen Stunden lagen (Tabelle IV-7). Dennoch stellt diese Studie einen weiteren Schritt in Richtung auf die klinische Anwendung dar.

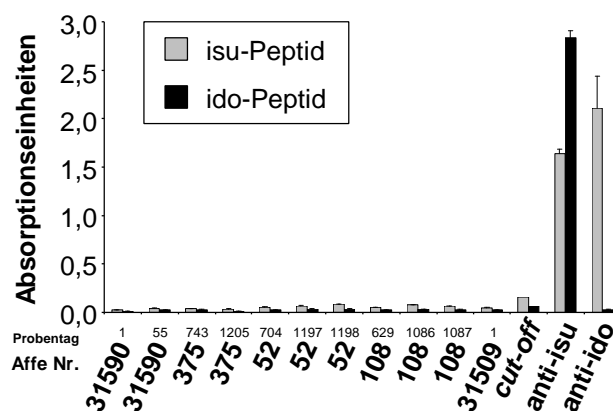


Abbildung IV-16: Peptid-ELISA der Plasmaproben von Pavianen nach experimentellen Xenotransplantationen. Plasmaproben der Paviane (Tabelle IV-7) wurden auf Antikörper gegen das immunsuppressive (isu) und das immundominante (ido) Peptid von PERV getestet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Absorptionswerte von Triplikaten der Plasmaproben (Tiernummer und der Tag der Blutentnahme sind unten angegeben), des *cut-off* (Material und Methoden) und der Kaninchenseren als Positivkontrollen.

Wie in vorangegangenen Studien wurde hier erstens die Immunreaktion gegen PERV und zweitens auch das Vorhandensein von Mikrochimärismen oder Provirusintegrationen untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, daß ein Mikrochimärismus nur bei wenigen Tieren über einen längeren Zeitraum nachzuweisen war (max. 535 Tage). Darüber hinaus ergab die genomische Analyse keine Anhaltspunkte für eine Infektion mit Integration des Provirus in Haut, Lymphknoten, Leber und PBMC, von denen Biopsie-Proben untersucht wurden (Martin *et al.*, 2001).

Die immunologische Untersuchung der Plasmaproben der Paviane im Peptid-ELISA ergab Meßwerte, die deutlich geringer als der *cut-off* ausfielen (Abbildung IV-16). Auch die Seren der Paviane mit Endothelzellinfusionen zeigten keine Reaktivität gegen die Peptide. Die Western Blot-Untersuchungen mit Viruspräparationen von 293/I-Virus (Abbildung IV-17) und PK 15-Virus zeigten im wesentlichen keine Reaktionen. Nur bei den Seren weniger Paviane traten Banden auf, welche jedoch nicht auf Antikörper gegen virale Proteine zurückzuführen sind. Insbesondere Pavian 25559, der Endothelzellen erhalten hatte, zeigt zwei deutliche sowie eine weitere, schwache Reaktion. Auch die Paviane 376 und 226 aus der Gruppe 1 (Endothelzelltransplantation, Tabelle IV-6) sowie Pavian 108 aus der 2. Studiengruppe (Tabelle IV-7) zeigten bereits nach der ersten Xenotransplantation mit Endothelzellen leichte Reaktionen. Diese Banden lassen sich jedoch meist nicht den Proteinen, die in einer Reaktion der Kontrollseren erkannt werden, zuordnen, so daß sie nicht auf Antikörper gegen virale

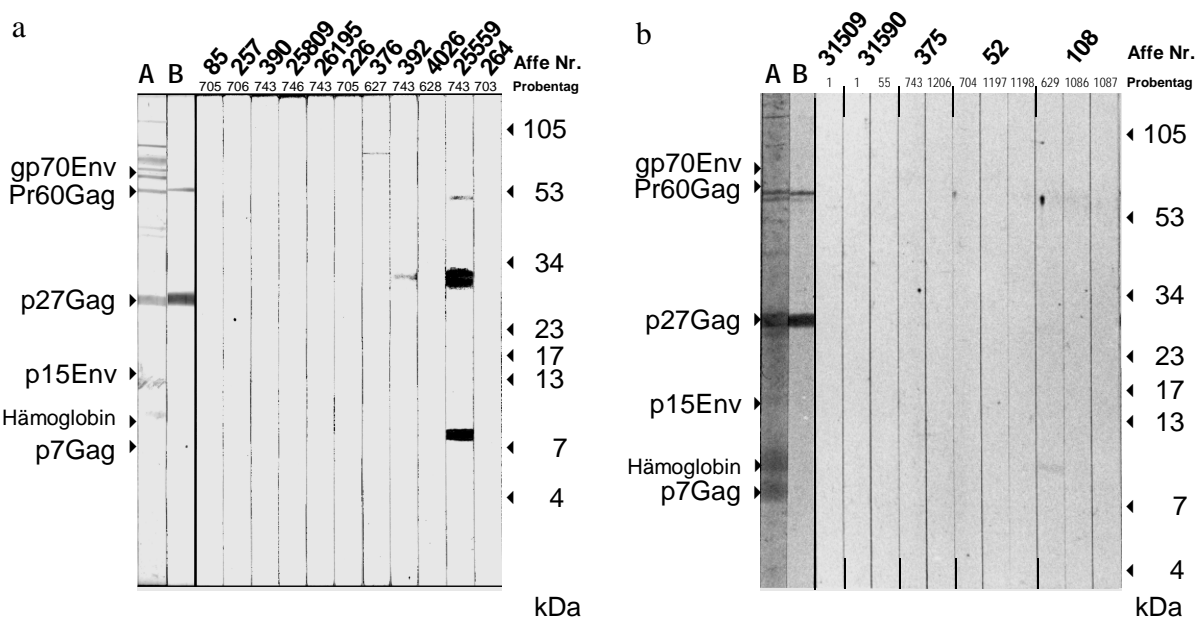


Abbildung IV-17: Western Blot-Analyse von Plasmaproben der Paviane nach Xenotransplantationen. Die Proben der Paviane aus Tabelle IV-6 (a) und Tabelle IV-7 (b) wurden im Western Blot auf Antikörper gegen PERV/I getestet. Die Tiernummer und der Tag der Blutprobe sind oben angegeben. Als Kontrollseren sind anti-PERV (A) und anti-p27Gag(PERV) (B) dargestellt. Die identifizierten Proteine sind links, die Molekulargewichte des Proteinstandards sind rechts markiert.

Proteine zurückzuführen sein können. Lediglich die Bande bei 10 kDa, die bei den Seren der Paviane 25559 und 108 auftritt, wird auch vom Serum gegen PERV-Virus erkannt. Sequenzanalysen dieses Protein ergaben jedoch, daß es sich nicht um ein virales Protein handelt (Kap. IV.1.3).

Somit konnte gezeigt werden, daß in diesen Pavianen nach experimentellen Xenotransplantationen weder immunologische Antworten gegen PERV noch Provirusintegrationen nachzuweisen sind. Infolgedessen ist eine Infektion ausgeschlossen.

In einer dritten Studie wurde versucht, vor der Xenotransplantation von Organen eine Toleranz des Immunsystems der Paviane gegen das fremde, porcine Gewebe zu induzieren (Ierino *et al.*, 1999). Hierzu wurde den Tieren Knochenmark entnommen, CD34-positive, pluripotente und langlebige Stammzellen durch Retroviren transduziert, so daß es porcine Hauptgewebekompatibilitätskomplexe (SLA DR^d) exprimiert, und nach Zerstörung des verbliebenen Knochenmarks dieses modifizierte Knochenmark wieder retransplantiert. Dadurch soll der T-zellabhängige Antwort im Rahmen der AVR vermindert werden. Als Xenotransplantationen wurden zuvor durch Perfusion mit löslichem Komplementrezeptor I (sCR I) konditionierte Nieren, heterotop mit einseitiger Ligatur der eigenen Ureter transplantiert sowie porcine Knochenmarkzellen infundiert. Das Gewebe stammte von nicht-transgenen Mikro-Schweinen (Sachs, 1992). Es wurde eine schwere pharmakologische Immunsuppressionstherapie angewandt und xenoreaktive anti- α -Gal-Antikörper wurden bei einigen Tieren durch EIA entfernt. Tabelle IV-8 gibt einen Überblick über das Studiendesign und Tabelle IV-9 zeigt das Standardprotokoll der begleitenden pharmakologischen Immunsuppression.

Die Tiere zeigten eine transiente Expression von mRNA des SLA-Transgens in PBMC und teilweise auch im Knochenmark, jedoch konnte keine Proteinexpression durch Fluoreszenzmarkierungen mit monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden. Dennoch konnte vorübergehend der Anteil von anti-porcinen Antikörpern, die nicht gegen α -Gal-Epitope gerichtet sind, reduziert werden. Die histologische Untersuchung der Xenotransplantate nach der Entnahme zeigte deutliche Zeichen einer hyperakuten und zellulären Abstoßung.

Auch hier ist die Frage, ob es zu einer Expression von und Infektion mit PERV kommt, von besonderem Interesse. Da das Virus auch durch in seiner Hülle inkorporiertes, zelluläres SLA, als fremd erkannt und eliminiert werden kann, wird durch die Induktion der Toleranz gegen SLA eine Abwehrreaktion gegen PERV bedeutend geschwächt. Dies erhöht möglicherweise das Infektionsrisiko, verhindert aber natürlich nicht die Bildung von anti-PERV-Antikörpern gegen virale Strukturproteine und die daraus resultierende Immunantwort.

Tabelle IV-8: Transplantations- und Behandlungs-Protokolle für die Xenotransplantation und Toleranzinduktion der Paviane. Den Pavianen wurden nach letaler, myeloablativer Bestrahlung des Knochenmarks modifiziertes, autologes Mark eingepflanzt, bevor Nieren bzw. porcine Knochenmarkzellen transplantiert wurden. Die Verweildauer der Nieren, die Zeitpunkte der EIA und der Entnahme der Blutproben relativ zur Transplantation (am Tag 1) sind in Tagen angegeben; negative Zahlen deuten auf Tage vor der Xenotransplantation hin. Standardimmunsuppressionstherapien sind in Tabelle IV-9 angegeben.

Pavian	Transplantiertes Material	Zeitpunkt der Transpl.	Behandlung	Entnahme Blutprobe	
		Tage		Tage	Tage
B75-18	-----	-----	Bestrahlung des Knochenmarks	-114 -111	-----
	Knochenmark [#]	-109	-----	-----	-----
	-----	-----	EIA	-2 -1	-----
	Niere (10 Tage)	1	Splenektomie	1	1 37

B75-34	-----	-----	Bestrahlung des Knochenmarks	-112	-139 -90
	Knochenmark*	-111 -109	EIA	-3 -2 -1	-1
	Niere (14 Tage)	1	-----	-----	-----
	3×10 ¹⁰ Zellen [†]	449	-----	-----	465

B116-26	-----	-----	Bestrahlung des Knochenmarks	-145 -144	-141
	Knochenmark [#]	-141	-----	-----	-133 -7
	Niere (7 Tage)	1	-----	-----	36

B57-16	-----	-----	-----	-----	-8
	1×10 ¹¹ Zellen [†]	1	-----	-----	31
		3 4	-----	-----	58

[#] autologes Knochenmark transduziert mit SLA-DR^d; * autologes Knochenmark transduziert mit Vektor, der nur die als Selektionsmarker verwendete Neomycin-Resistenz enthält; [†] porcine Knochenmarkzellen

Tabelle IV-9: Protokoll für die Immunsuppressionstherapie der Paviane mit Toleranzinduktion.

Medikament	Dosis	Applikation
	mg kg - Körpergewicht & Tag	Tage
Cyclosporin A	15 - 25	+1 - +29
Mycophenolat Mofetil	40	-6 - +15
15-Desoxyspergualin	6	-6 - +15
Methylprednisolon	125	+4 - +10 [#]
löslicher Komplementrezeptor I (sCR I)	12,5 oder 25	+1 - +10

[#] in den letzten drei Tagen stufenweise abnehmende Dosierung

Diese Immunantwort wurde mittels Western-Blot-Analyse der Seren einiger Tiere dieser Studie überprüft (Abbildung IV-18). Interessanterweise sind in einigen Seren Antikörper gegen das CA-Protein und gegen das Hüllprotein gp70Env (bzw. gp85Env) nachweisbar. So reagieren beide verfügbaren Seren (Tage 1 & 37) von Pavian B75-18 sowie zwei Serumproben (Tage -133 & -7) von Pavian B116-26 mit beiden viralen Proteine. Dies würde auf eine Infektion hindeuten. Da aber diese Reaktionen im ersten Falle bereits am Tage der Transplantation und im zweiten Fall sogar schon vor der Transplantation auftreten, kann es sich hierbei nicht um Reaktionen des Immunsystems auf den Kontakt mit porcinem Material bei der Transplantation handeln. Es sind offensichtlich Kreuzreaktionen, möglicherweise hervorgerufen durch Antikörper gegen das endogene Retrovirus des Pavians (BaEV), nicht jedoch um Antikörper gegen PERV. Eine Infektion ist daher ausgeschlossen.

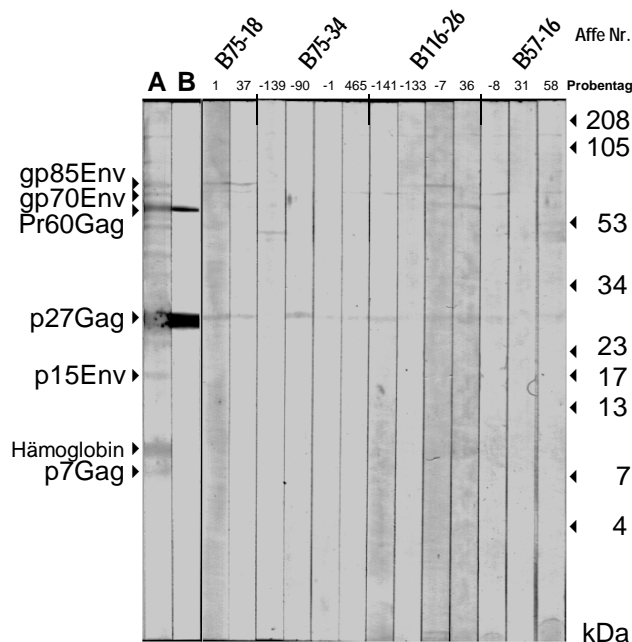


Abbildung IV-18: Western Blot-Analyse von Seren der Paviane nach Toleranzinduktion und Xenotransplantation (Tabelle IV-8). Die Pavianseren wurden auf Antikörper gegen PERV/4 getestet. Die Tiernummer und die Tage der Blutprobenentnahme bezogen auf den Tag der Transplantation sind oben angegeben. Als Kontrollseren sind anti-PERV (A) und anti-p27Gag(PERV) (B) abgebildet. Die identifizierten Proteine sind links, die Molekulargewichte des Proteinstandards sind rechts markiert.

IV.4. *In vitro*-Untersuchung des Wirtsspektrums

Der Wirtsbereich von PERV ist für die Etablierung von *In vitro*- und *In vivo*-Modellen zur Untersuchung des Infektions- und Proliferationsverhaltens von großem Interesse, um dadurch Aussagen über ein mögliches Risiko bei der Xenotransplantation machen zu können. Hierzu wurden einerseits humane Zellen verwendet, um Hinweise auf ein direktes Infektionsrisiko für den Menschen zu schließen. Andererseits wurden verschiedenen nicht-humane Zellen,

darunter auch primäre Zellen, eingesetzt, um Tierspezies, die als *In vivo*-Tiermodelle dienen könnten, zu finden. Mit Hinblick auf ein Kleintiermodell wurden insbesondere Nagerzellen untersucht. Eine Reihe von Zellen nicht-humaner Primaten wurden ebenfalls eingesetzt, mit dem Ziel, diese Spezies für die Verwendung als Großtiermodell mit geringer phylogenetischer Distanz zum Menschen zu evaluieren.

IV.4.1. Infektion von humanen Zellen

Als humane Zellen wurden PBMC und einige lymphoide Zelllinien verwendet, weil PBMC einerseits die einzigen leicht zugänglichen primären Zellen sind, und andererseits Retroviren häufig lymphoide Zellen infizieren.

Die Infektionsversuche wurden in der Regel ohne Zugabe von polyionischen Infektionsenhancern wie Polybrene und Protaminsulfat durchgeführt, um mit diesen *In vitro*-Versuchen möglichst nahe an der *In vivo*-Situation zu bleiben (Cornetta & Anderson, 1989). Zur Infektion wurden frische, zellfreie Überstände von produzierenden Zellen oder durch Ultrazentrifugation angereichertes Virus verwendet (PERV/PK und PERV/I). Einige Infektionsversuche wurden auch durch Co-Kultivierung von produzierenden Zellen (*Producer*-Zellen, PK 15 bzw. 293/I) und den zu infizierenden Zellen (*Target*) durchgeführt. Als *Producer*-Zellen wurden auch mitogenstimulierte PBMC von Schweinen verwendet (Kap. IV.5). Die Co-Kultivierung erfolgte entweder nach letaler radioaktiver Bestrahlung der *Producer*-Zellen oder durch separierte Kultivierung in *Trans-well*-Platten mit 1,0 µm-Filtern. Die Freisetzung von Partikeln wurde kontinuierlich durch Messung der RT-Aktivität im Kulturüberstand überprüft. In regelmäßigen Abständen, spätestens bei Beendigung des Versuches, wurde DNA aus den Zellen präpariert und mittels PCR auf Provirusintegration und bei Co-Kultivierungsansätzen auf Mikrochimärismus kontrolliert.

Bei den verwendeten humanen Zellen konnten weder die monozytäre THP-1-Zellen noch die C8166 (T-Zellen) infiziert werden (Tabelle IV-10). Demgegenüber zeigten die humanen PBMC eine transiente Erhöhung der RT-Aktivität 10 Tage nach Infektion. Allerdings war die Überprüfung der Provirusintegration negativ. Auch die Nierenzelllinie 293 konnte unter diesen Umständen nicht infiziert werden.

Eine Wiederholung der Infektion von 293-Zellen unter Einsatz der Infektionsenhancer Protaminsulfat und Polybrene ergab, daß eine Detektion der Expression von Partikeln erst nach mehr als 30 Tagen, bei dem langsamer proliferierenden Subklon 293T erst nach mehr als 60 Tagen zu beobachten ist (Abbildung IV-19). Auch die Integration eines Provirus konnte nicht früher detektiert werden.

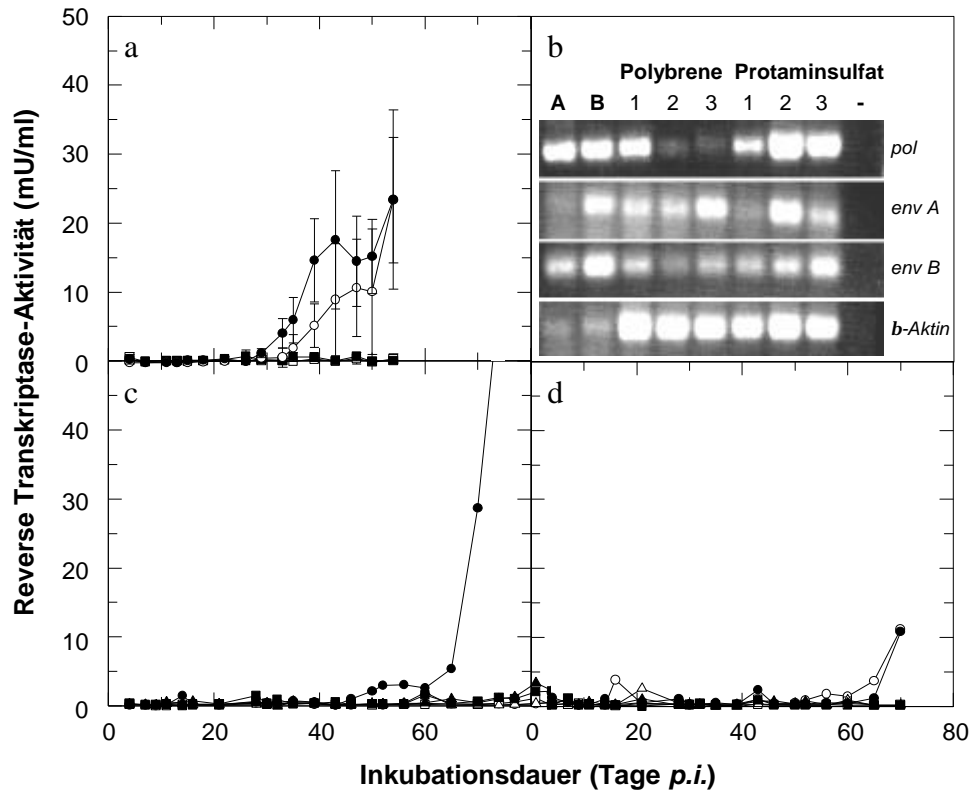


Abbildung IV-19: Infektion von humanen Zellen mit PERV. Die humane Nierenzelllinie 293 wurde mit PERV von unterschiedlichen *Producer*-Zellen mit Hilfe der Infektionsenhancer Polybrene (offenen Symbole) oder Protaminsulfat (geschlossenen Symbole) infiziert. Abgebildet ist der Verlauf der Reversen Transkriptase-Aktivität als Maß für die Partikelfreisetzung (a, c, d) bzw. die Analyse der Provirusintegration mittels PCR (b). (a) RT-Aktivität im Überstand von 293-Zellen infiziert mit PERV/I (Kreise) bzw. mit PERV/PK (Quadrate). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten. (b) DNA-PCR der in (a) mit PERV/I infizierten Zellen nach 47 Tagen. Dargestellt sind die einzelnen Ansätze (1-3) jeweils für beide Infektionsenhancer mit den rechts angegebenen Primern. Als Positivkontrollen wurden DNA von PK 15- (A) und 293/I-Zellen (B) verwendet. (c) RT-Aktivität im Überstand von 293T Zellen infiziert mit PERV/PK (6 parallele Einzelansätze). (d) RT-Aktivität im Überstand 293T Zellen infiziert mit PERV/I (6 parallele Einzelansätze).

IV.4.2. Infektion von nicht-humanen Zellen

Um Aussagen im Hinblick auf ein mögliches Kleintiermodell für PERV zu erhalten, wurden die Suszeptibilität von Ratten- und Mäusezellen für PERV-Infektion untersucht. Hierbei wurden die fibroblastoiden rat2-Zellen der Ratte sowie die fibroblastoiden NIH 3T3- und die lymphoiden CTL-6-Zellen der Maus eingesetzt. Darüber hinaus wurden auch an primären Rattenzellen (PBMC, Nieren- und Milzzellen) Infektionsstudien durchgeführt. Nierenzellen wurden unter anderen verwendet, da es sich sowohl bei der produzierenden, porcinen Zelllinie PK 15 als auch bei der produktiv infizierten, humanen Zelllinie 293 um Nierenzellen handelt. Es wäre folglich zu vermuten, daß Nierenzellen besonders suszeptibel sein könnten.

Alle Infektionsversuche wurden mit infektiösen, zellfreien Kulturüberständen von PK 15- und infizierten 293-Zellen sowie Viruspräparationen daraus ohne Verwendung von Infektionsenhancern durchgeführt. Bei den Nierenzellen lag die RT-Aktivität im Überstand über den Beobachtungszeitraum von 40 Tagen hinweg bei infizierten Zellen wie bei nicht-infizierten

Kontrollen einheitlich im Bereich von Hintergrundmeßwerten. Demgegenüber wurden bei den lymphoiden Zellen in allen Proben durchgehend bis zum Ende des Versuches deutlich höhere Meßwerte zwischen 5 und 60 mU/ml nachgewiesen. Allerdings konnte auch hier weder eine Provirusintegration mittels DNA-PCR noch PERV-RNA im Überstand mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Vermutlich handelt es sich hier um die Freisetzung von endogenen Retroviren der Ratte nach der Stimulation der lymphoiden Zellen mit Mitogenen.

Als Vorversuche für ein nicht-humanes Primatenmodell wurden PBMC verschiedener Affenspezies (AGM, Pavian, Cynomolgus- und Rhesusaffen) *in vitro* getestet. Daneben wurden auch Infektionsstudien mit PBMC von Pferden durchgeführt. Bei allen Versuchen wurde mit Zellkulturüberständen und gereinigtem Virus sowie ohne Infektionsenhancer gearbeitet. Bei Pavian- und Pferde-Zellen wurde zusätzlich versucht, die Zellen durch Co-Kultivierung mit PK 15- und 293/I-Zellen zu infizieren. Hier wurden zu Beginn der Experimente (bis Tag 8) erhöhte RT-Aktivitäten gemessen, welche aber nicht von den zur Infektion eingesetzten Virusmengen unterschieden werden konnten und auch in den nicht-infizierten Kontrollen zu erkennen sind. Beim Pavian konnte in unabhängigen Experimenten die Expression eines endogenen Retrovirus durch Stimulation der PBMC mit Mitogenen gezeigt werden. Da auch der Provirusnachweis negativ ausfiel, ist davon auszugehen, daß keine Infektion stattgefunden hatte. Die Ergebnisse aller Infektionsstudien sind in der Tabelle IV-10 zusammengefaßt.

Tabelle IV-10: Infektionsstudien zum Wirtsbereich von PERV. Die Infektion der Zellen erfolgte durch infektiöse Überstände (Ü), gereinigtes Virus (P) oder Co-Kultivierung (C).

Spezies	Zellen	Infektion	Ergebnis
Mensch	PBMC	Ü P C	+
	293	Ü P C	+
	THP-1	Ü C	-
	C8166	Ü C	-
Pavian	PBMC	Ü P C	-
Cynomolgus	PBMC	Ü P	-
Rhesus	PBMC	Ü P	-
AGM	PBMC	Ü P	-
Pferd	PBMC	Ü P C	-
Ratte	rat2	Ü P	-
	PBMC	Ü P	-
	primäre Nieren-Zellen	Ü P	-
	primäre Milz-Zellen	Ü P	-
Maus	NIH 3T3	Ü P	-
	CTL-6	Ü P	-

IV.5. Expression von PERV-Partikeln bei Schweinelymphozyten

Eine Infektion des Xenotransplantatrezipienten durch PERV setzt die Freisetzung von infektiösen Partikeln aus dem Transplantat voraus. Daher wurde die Freisetzung und Infektiösität von Partikeln aus PBMC verschiedener Schweine *in vitro* analysiert. Da bei einer gemischten Lymphozytenreaktion zwischen PBMC verschiedener Schweine und zwischen humanen und porcinen Lymphozyten keine Expression von Viren nachgewiesen werden konnte, wurden die Zellen mit Mitogenen stimuliert. Zunächst wurde der zeitliche Verlauf der Freisetzung bei verschiedenen Stimulationsbedingungen durch Messung der RT-Aktivität im Überstand bestimmt. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Rassen und einzelnen Tieren der gleichen Rasse (Abbildung IV-20).

Tabelle IV-11: Freisetzung von PERV aus Schweine-PBMC. Die Expression von PERV aus PBMC von Schweinen unterschiedlicher Rasse nach Stimulation mit PHA bzw. PHA und TPA wurde mittels RT-Aktivität im Überstand und RT-PCR der viralen RNA mit Primern, die spezifisch für die *envA*-, *envB*- und *envC*- Gene sind, analysiert. Der SLA-Haplotyp wurde bestimmt, um eine mögliche gemeinsame Abstammung verschieden stark produzierender Tiere zu untersuchen. (Abkürzungen: ++ stark produzierend > 1 mU/ml; + schwach produzierend; - nicht produzierend).

Tier-Nr.	Rasse	RT-Aktivität	RT-PCR			RT-Aktivität	RT-PCR			SLA-Haplotyp
		(PHA)	A	B	C	(PHA/TPA)	A	B	C	
347	Mikro-Schwein	+	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	H04/H38
353	Mikro-Schwein	+	n.g.	n.g.	n.g.	-	n.g.	n.g.	n.g.	H04/H38
374	Mikro-Schwein	+	n.g.	n.g.	n.g.	-	n.g.	n.g.	n.g.	H04/H21
384	Mikro-Schwein	-	n.g.	n.g.	n.g.	-	n.g.	n.g.	n.g.	H04/H21
385	Mikro-Schwein	+	++	+	++	++	++	+	++	H04/H21
393	Mikro-Schwein	-	n.g.	n.g.	n.g.	-	n.g.	n.g.	n.g.	H04/H38
614	Mikro-Schwein	++	n.g.	n.g.	n.g.	++	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
615	Mikro-Schwein	-	-	-	(+)	-	-	(+)	+	H04/H04
625	Mikro-Schwein	++	n.g.	n.g.	n.g.	++	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
627	Mikro-Schwein	++	n.g.	n.g.	n.g.	++	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
716	Mikro-Schwein	++	n.g.	n.g.	n.g.	++	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
001	Dt. Landrasse	-	n.g.	n.g.	n.g.	-	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
044	Dt. Landrasse	-	+	+	-	-	-	(+)	-	n.g.
113	Dt. Landrasse	-	n.g.	n.g.	n.g.	+	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
7541	Dt. Landrasse	-	n.g.	n.g.	n.g.	-	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.

So zeigte das Mikro-Schwein 385 (Yucatan Mikro-Schwein) eine deutliche Expression von RT-Aktivität nach Stimulation mit PHA bzw. Co-Stimulation von PHA und TPA, welches 4 bis 5 Tagen nach Kultivierung das Maximum erreichte. Demgegenüber zeigte weder die unstimulierte Kontrolle dieses Schweines, noch ein weiteres Mikro-Schwein oder ein Hauschwein der Deutschen Landrasse nach Stimulation eine Expression von PERV. Von insge-

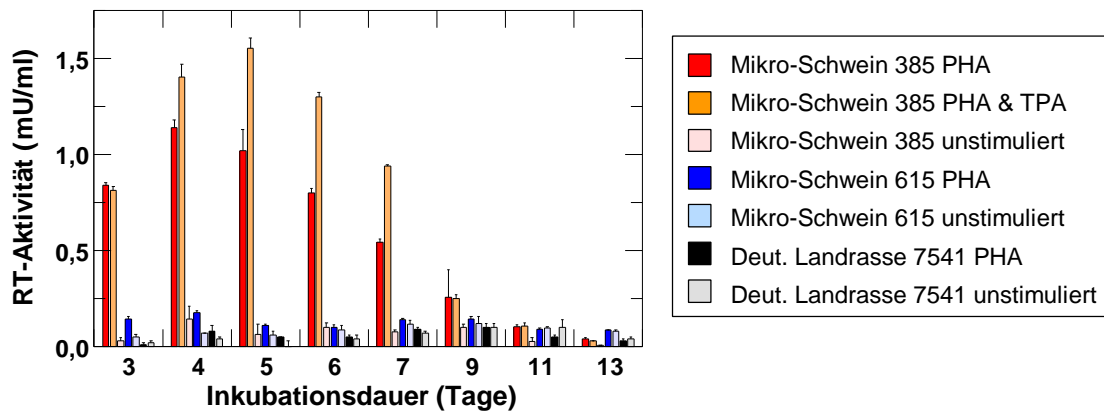


Abbildung IV-20: Zeitverlauf der Freisetzung von PERV aus Schweine PBMC. PBMC von zwei Mikro-Schweinen und einem Hausschwein der Deutschen Landrasse wurden mit PHA allein (50 µg/ml) oder PHA (50 µg/ml) und TPA (100 ng/ml) stimuliert und die RT-Aktivität im Überstand gemessen. Mittelwerte und Standardabweichung von Triplikaten sind angegeben.

samt 11 Mikro-Schweinen produzierten 8 Schweine PERV nach Stimulation, von 4 Deutschen Landrasse-Schweinen produzierte nur eins (Tabelle IV-11). Keines der Schweine zeigte Antikörper, die im Western Blot-Assay gegen PERV-Proteine nachweisbar wären.

Da die PERV-Produktion bei Co-Stimulation mit PHA und TPA höher war, wurde mit einer zweidimensionalen Ausverdünnung der beiden Mitogene nach günstigeren Stimulationsbedingungen gesucht (Abbildung IV-21). Dabei wurde festgestellt, daß es zwei unterschiedliche Bereiche von Mitogenkonzentrationen gibt, die die Zellen zu einer PERV-Produktion

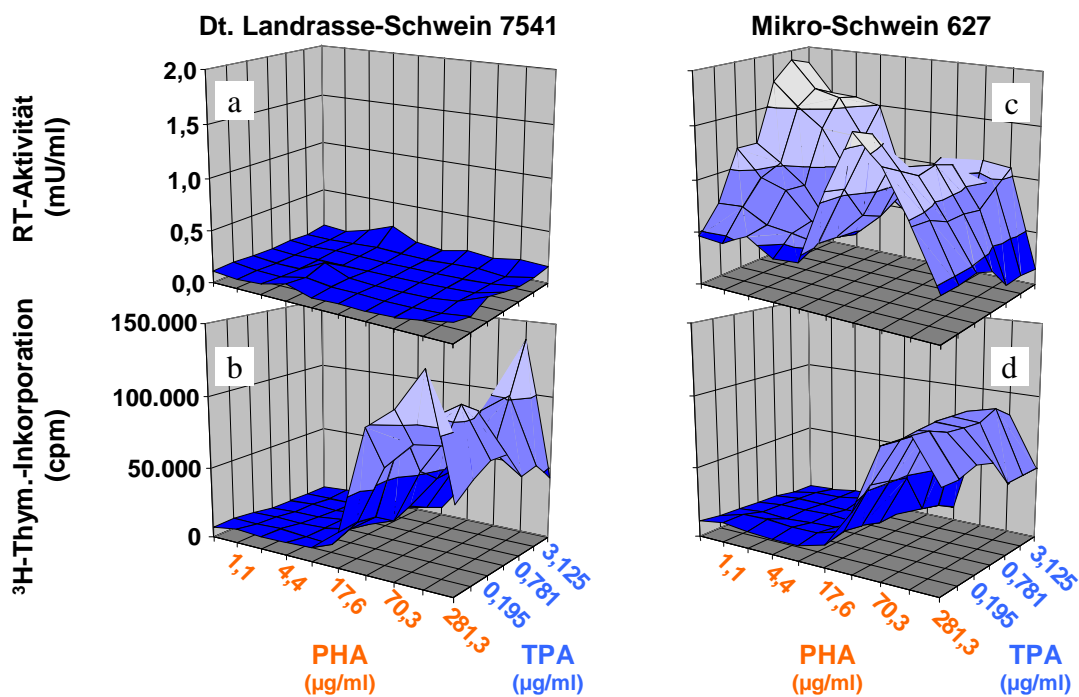


Abbildung IV-21: Stimulation von PBMC von Schweinen bei zweidimensionaler Ausverdünnung von PHA und TPA. PBMC des Deutschen Landrasse-Schweines 7541 (links; a & b) und des Mikro-Schweins 627 (rechts; c & d) wurden mit unterschiedlichen Verhältnissen von PHA und TPA co-stimuliert und die Freisetzung von RT-Aktivität (oben; a & c) sowie die Proliferation durch ^3H -Thymidin-Inkorporation (unten; b & d) gemessen.

anregen: (i) Einen Bereich bei einer PHA-Konzentration von ca. 100 µg/ml, welcher nahezu unabhängig von der TPA-Konzentration ist, und (ii) einen Bereich bei hohen TPA-Konzentrationen und geringeren PHA-Dosen.

Dieser zweite Bereich erschien aus mehreren Gründen als besonders interessant. Eine PERV-Expression in diesem Bereich konnte nur bei wenigen Mikro-Schweinen unabhängig von der Expression nach PHA-Stimulation gefunden werden, jedoch bei keinem Hausschwein. Darüber hinaus korrelierte diese Expression nicht mit einer Proliferation, die durch ^3H -Thymidin-Inkorporation gemessen wurde (Abbildung IV-21 d). Zusätzlich sind die eingesetzten TPA-Konzentrationen extrem hoch und wirken auf Zellen anderer Spezies vermutlich letal. Die Viabilität der PBMC konnte durch Trypan-Blau-Ausschluß-Tests gezeigt werden.

Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß unter diesen Bedingungen eine Differenzierung der Zellen stattfand. Es wurde eine große Zahl adhärenter Zellen mit flächiger Morphologie und langen Fortsätzen gefunden, die unter anderen Stimulationsbedingungen oder ohne Stimulation der Zellen nicht auftraten (Abbildung IV-22). Dies erklärt auch, warum keine Proliferation gemessen wurde, da der verwendete Assay nur Suspensionszellen detektieren kann. Durch eine Reihe von Antikörpern gegen verschiedene, porcine Oberflächenantigene wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie versucht, diese adhärenenten Zellen genauer zu charakterisieren. Es konnte lediglich gezeigt werden, daß diese Zellen die Oberflächenantigene CD4, CD8 und SWC3a nicht exprimieren. Die Ergebnisse bei den Antikörpern SWC8, MIL2 und MIL4 (Tabelle III-9) ließen keine eindeutigen Aussagen zu. Auch eine Analyse mit den eigenen, PERV-spezifischen Antikörpern (Tabelle III-8) erlaubten keinen eindeutigen Nachweis einer Expression von PERV-Proteinen.

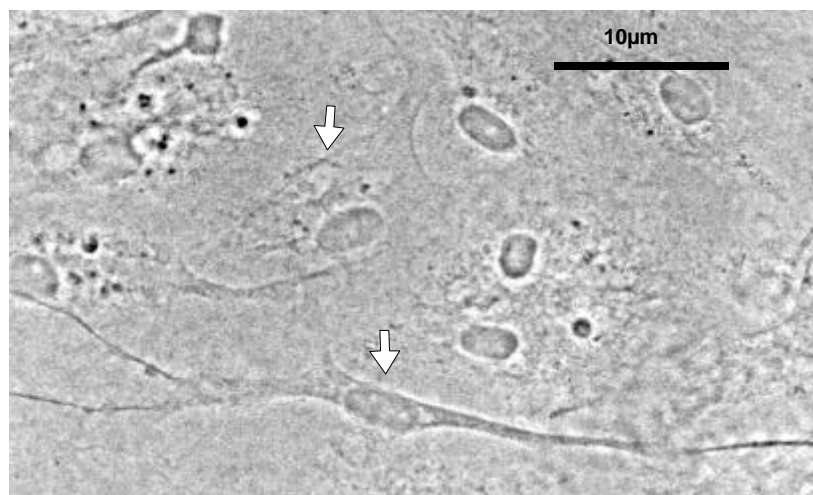


Abbildung IV-20: Lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahme von adhärenenten Zellen (Pfeile) in den PERV-Expressionsstudien aus PBMC nach Co-Stimulation mit PHA und TPA.

Um zu untersuchen, ob diese differenzierten Zellen für die Expression unter diesen Stimulationsbedingungen verantwortlich sind, wurden RT-PCR-Analysen durchgeführt (Abbildung IV-23). Dazu wurden die Suspensionszellen nach 4 Tagen der Co-Kultivierung bzw. Differenzierung separat kultiviert. Die Analyse der RT-Aktivität im Überstand zeigte, daß der Hauptteil der Aktivität in den Kulturen mit adhärennten Zellen gemessen werden konnte.

Gleichzeitig konnten in diesem Ansatz Unterschiede in der Expression verschiedener Proviren durch Vergleich der PCR-Ergebnisse der unterschiedlichen *envelope*-Typen und durch Sequenzierung der erhaltenen PCR-Produkte analysiert werden.

Die Abbildung IV-23 zeigt einige Unterschiede in der Expression der unterschiedliche *envelope*-Typen zwischen den beiden Stimulationsbedingungen. Insbesondere fällt auf, daß auch das Deutsche Landrasse-Schwein Retroviren freizusetzen scheint (Abbildung IV-23a, Tag 4), da zumindest das *env*-Gen von PERV-A nachgewiesen werden konnte, obwohl die Messung der RT-Aktivität negativ ist. Ähnliches gilt für das Mikro-Schwein 615 (Abbildung IV-23b, Tag 4, 5 adh.) und den Nachweis des *env*-Gens von PERV-C. Möglicherweise werden nur defektive Genome verpackt. Die Sequenzanalyse ergab, daß die amplifizierten Sequenzen aus der viralen RNA bei dem Mikro-Schwein 385 nach PHA-Stimulation mit den publizierten Daten für PERV-MSL identisch sind. Bei den Sequenzen der PCR-Produkte aus viraler RNA nach PHA-TPA-Co-Stimulation traten in weiten Teilen Mischsequenzen auf. Innerhalb der identifizierten Bereiche war jedoch kein verlässlicher Sequenzvergleich möglich. Es bleibt zu vermuten, daß hier tatsächlich unterschiedliche Viren exprimiert werden.

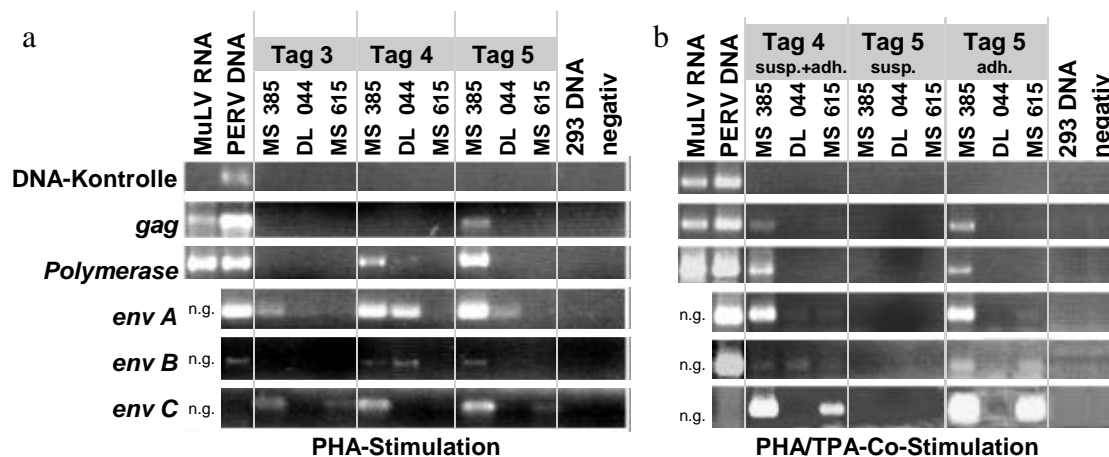


Abbildung IV-21: RT-PCR-Analyse der Expression von PERV aus PBMC von Schweinen. PBMC der Mikro-Schweine 385 und 615 und des Deutschen Landrasse-Schweins 044 wurden mit PHA- (a) bzw. mit PHA & TPA co-stimuliert (b). Virale RNA wurde zu verschiedenen Zeitpunkten aus dem Überstand präpariert und in einer RT-PCR mit Primern für PERV-*pol*-, *gag*-, und die verschiedenen *env*-Gene analysiert. Als Kontrolle für DNA-Verunreinigungen wurde eine DNA-PCR mit *pol*-Primern durchgeführt. RNA von FEM- und DNA von 293/I-Zellen diente als Positivkontrolle, DNA aus uninfizierten 293-Zellen und eine Probe ohne Nukleinsäuren als Negativkontrolle. Bei (b) wurden ab Tag 4 Suspensionszellen und adhärennte Zellen separat kultiviert.

V. DISKUSSION

Bei der Xenotransplantation, der Transplantation von Organen, Geweben oder Zellen über die Speziesgrenze hinweg, besteht die Gefahr von Transspeziesinfektionen, sogenannten Xenozoonosen. Hierbei sind PERV von besonderem Interesse, da sie in vermutlich allen Schweinerassen vorkommen (Akiyoshi *et al.*, 1998), aus Schweinegewebe freigesetzt werden können (Wilson *et al.*, 1998) und in der Lage sind, humane Zellen zu infizieren (Le Tissier *et al.*, 1997; Patience *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1998a; Wilson *et al.*, 1998). Daher wurden diese endogenen Retroviren in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht, und es wurden Detektionssysteme entwickelt, um einen Beitrag zur Risikoabschätzung leisten zu können.

V.1. Biologische Eigenschaften von PERV

Die Charakterisierung der Viruspartikel und der viralen Proteine stand zunächst im Vordergrund, um daraus Rückschlüsse auf Eigenschaften des Virus ziehen zu können. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte die C-Typ Morphologie von PERV bestätigt werden (Armstrong *et al.*, 1971). Alle Strukturproteine des Virus wurden in Präparationen der Viruspartikel nachgewiesen, dennoch werfen die Ergebnisse auch einige Fragen auf. So ergaben sich Unterschiede zwischen den Viren der verschiedenen PERV-*Producer*-Zellen und beim Vergleich von PERV mit MuLV sowohl bei der Dichte der Partikel in der Dichtegradientenultrazentrifugation als auch bei der Analyse der Proteine in der Gelelektrophorese. Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß Teile der von PK 15-Zellen freigesetzten Viruspartikel im Unterschied zu PERV/I defekt bzw. nicht vollständig gereift sind. Aber insbesondere PERV/3-Partikel sind komplett entwickelt. Die Präparationen von PERV enthalten geringere Mengen der Hüllproteine p15E und gp70 als bei FLV, obwohl beide Viren mit identischen Verfahren gereinigt wurden. Offensichtlich wird wenig TM-Protein in PERV-Partikeln inkorporiert. Zusätzlich ist der geringe Anteil an SU möglicherweise durch mechanische Scherkräfte zu erklären, da die Disulfidbindung, die die SU- an der TM-Einheit verankert, sehr labil ist (Pinter *et al.*, 1997; Opstelten *et al.*, 1998). Ein weiterer Unterschied ist das Auftreten von Hämoglobin in den PERV-Viruspräparationen. Die Ursache hierfür ist unklar. Diese Differenzen gegenüber exogenen Retroviren sind für endogene Retroviren nicht ungewöhnlich, da der Selektionsdruck durch die ständige Notwendigkeit von Neuinfektionen wie bei exogenen Retroviren nicht gegeben ist (Löwer *et al.*, 1996; Swanstrom & Wills, 1997). Im Gegensatz zu anderen endogenen Retroviren, wie z.B. HERV, ist PERV deutlich weniger degeneriert. So werden ähnlich wie bei BaEV infektiöse Partikel gebildet. Insbesondere unter der Berücksichtigung neuerer Studien kommt man zu dem Schluß, daß sich PERV grundsätz-

lich wie exogene Retroviren, z.B. MuLV oder gar SIV/HIV, verhalten könnte. Sequenzhomologie des Genoms und Kreuzreaktivität der viralen Proteine zeigen nicht zuletzt die Verwandtschaft zu anderen Typ C-Retroviren, für die neoplastische Erkrankungen beschrieben sind, so daß auch bei PERV-Infektionen die Gefahr von Tumoren oder Leukämien besteht. Daher wurden die biologischen Eigenschaften von PERV weiter untersucht.

Viele Retroviren unterdrücken das Immunsystem des infizierten Individuums, weshalb ein bei allen Retroviren einheitlicher Mechanismus vermutet wurde (Denner, 1987; Fauci, 1988; Denner *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 1997), der nach einer Arbeitshypothese auf einer immunsuppressiven Wirkung viraler Proteine beruhen könnte (Denner, 2000a). Proteinpräparationen, rekombinante Proteine und synthetische Peptide zeigten, daß eine unter den Retroviren hoch konservierte Domäne des transmembranen Hüllproteins (isu-Domäne) *in vitro* einen proliferationsinhibitorischen Effekt vermitteln kann (Cianciolo *et al.*, 1985).

Daher wurde untersucht, ob PERV auch derartige immunsuppressive Eigenschaften besitzt. Tatsächlich ließ sich sowohl mit infektiösen wie auch mit etherinaktivierten, hoch-gereinigten Viruspräparationen von PERV aus porcinen und aus humanen Zellen die Inhibition der Proliferation von stimulierten humanen PBMC zeigen. Die Stärke dieser Inhibition ist mit dem von anderen Viren wie FLV oder BaEV vermittelten Effekt vergleichbar. Auch an BSA-konjugierte synthetische Peptide, die der isu-Domäne von PERV entsprechen, inhibierten die Proliferation der PBMC. Hier konnte auch bestätigt werden, daß dieser Effekt speziesunabhängig ist, da nicht nur humane PBMC, sondern auch Pferde-PBMC und eine murine, lymphozytäre Zelllinie in der Proliferation gehemmt werden konnte. Dies zeigt, daß auch PERV ein immunsuppressives Potential aufweist.

Die Proteinkonzentrationen, bei denen ein proliferationshemmender Effekt bei Virusproteinen und bei synthetischen Peptiden auftritt, werden oft als „unphysiologisch hoch“ im Vergleich zu der Virusbelastung im infizierten Patienten kritisiert. Dies ist, wie schon in früheren Studien diskutiert (Cianciolo *et al.*, 1985; Oostendorp *et al.*, 1992b; Sadtler, 1997), dadurch zu erklären, daß die viralen Proteine in der richtigen Konformation vorliegen müssen. Im Viruspartikel treten unterschiedliche Trimerkonformationen auf, die im Verlauf des Infektionsprozesses von Bedeutung sind (Binley & Moore, 1997), wovon vermutlich nur eine die Proliferationshemmung vermittelt. Im Modellsystem mit Peptid-Konjugaten ist es besonders schwierig, die Multiplizität und Konformation der Peptide auf dem BSA-Molekül sicherzustellen, so daß möglicherweise nur ein geringer Anteil der Peptide zur beobachteten Wirkung beiträgt.

Neuere Untersuchungen haben ergeben, daß durch die Verwendung von anderen Trägermolekülen und Konjugationsreagenzien eine deutlich Steigerung der Effektivität der von PERV

abgeleiteten Peptide möglich ist (Oliver Stephan, persönliche Mitteilung). Auch wurden Anstrengungen unternommen, die Konjugation an Trägermoleküle durch eine gezielte Trimerisierung der Peptide zu ersetzen. Dadurch sollte das System weiter vereinfacht und leichter charakterisierbar gestaltet werden (Erik Seibold, persönliche Mitteilung). Dies würde die Aufklärung des Wirkungsmechanismus, der hinter dem beobachteten, proliferationsinhibitorischen Effekt steht, erleichtern.

Einen Beitrag zu dieser Aufklärung und für die Diagnostik von PERV-Infektionen (s.u.) sollte das rekombinant hergestellte TM-Protein rp15E leisten. Das gewählte Konstrukt, ein C-terminales MBP-Fusionsprotein, daß mit Periplasmaexportsignal in *Escherichia coli* kloniert wurde, erwies sich jedoch aufgrund der beobachteten geringen Expression und ineffizienten Abspaltung des MBP-Anteils als ungünstig. Das erhaltene Protein zeigte jedoch die erwünschten günstigen Eigenschaften im Bezug auf Löslichkeit und immunologische Reaktivität. Daher wurde die gewählte Sequenz im Rahmen einer anderen Promotionsarbeit ausgehend vom hergestellten Vektor in ein anderes Expressionssystem umklont. Dieses neue Konstrukt zeigte sowohl eine gute Expression und eine effiziente Spaltungsreaktion (Oliver Stephan, persönliche Mitteilung). Ergebnisse zur Proliferationsinhibition stehen noch aus.

Die Charakterisierung von PERV hat somit gezeigt, daß es sich um ein typisches Typ C-Retrovirus handelt. Es zeigt strukturelle und immunologische Verwandtschaft zu onkogenen Retroviren und besitzt *in vitro* ein immunsuppressives Potential.

V.2. Nachweissysteme für PERV und ihre (prä-)klinische Bedeutung

Für die Durchführung von präklinischen oder klinischen Studien mit Xenotransplantationen sind sensitive Detektionssysteme für PERV-Infektionen unerlässlich, nicht nur um den Transplantatrecipienten selbst zu testen und eine Infektion frühzeitig zu erkennen, sondern auch um damit Pfleger, Ärzte, Angehörige und dritte Personen vor einer sich möglicherweise ausbreitenden Infektion zu schützen. Direkte Nachweise mittels PCR oder RT-PCR sind zwar etabliert und einfach durchzuführen, erfordern aber Kenntnisse über das Verhalten des Virus (Switzer *et al.*, 1999; Blusch *et al.*, 2000b). So müssen insbesondere die zu untersuchenden, vom Virus infizierbaren Gewebe sowie Informationen über invariable Sequenzbereiche bekannt sein, was bei PERV zur Zeit noch nicht der Fall ist. Demgegenüber sind indirekte Detektionsverfahren, welche die sehr empfindliche Reaktion des Immunsystems des Wirtes auf ein infizierendes Pathogen nachweisen, nicht nur sehr sensitiv, sondern auch unkompliziert durchzuführen und vielseitig einzusetzen.

Grundlage für derartige Methoden sind verlässliche Antigene und aussagekräftige Kontrollen durch entsprechende Seren. Als Antigene wurden hier synthetische Peptide in für andere

Retroviren entwickelte und entsprechend angepaßte ELISA-Systeme eingesetzt (Denner *et al.*, 1994), die für größere Reihenuntersuchungen geeignet sind. Für detailliertere Untersuchungen mit einer Vielzahl unterschiedlicher Antigene, wurden gereinigte Viruspartikel in Western Blots verwendet. Diese Methodik ist an etablierte Methoden, die auch heute in modifizierter Form für die Untersuchung von HIV-Infizierten herangezogen werden, angelehnt. Für alle immunologischen Nachweissysteme gilt, daß mit Kreuzreaktivitäten gerechnet werden muß. Insbesondere sind auch früher schon viele Kreuzreaktionen (ca. 5-10%) gegen das CA-Protein von HIV beobachtet worden (Biggar *et al.*, 1985; Sayre *et al.*, 1996). Daher gelten Ergebnisse solcher Testsysteme erst dann als positiv, wenn Antikörper gegen mehr als ein Strukturprotein nachgewiesen werden können.

Da die geringe Mengen der Hüllproteine p15E und gp70 in den Präparationen möglicherweise problematisch sein konnte, wurde hier besonders auf deren Nachweisbarkeit Wert gelegt. Jedoch konnten auch diese Proteine im Western Blot stets detektiert werden. Zusätzlich wurde auch das rekombinante Protein (rp15E) verwendet.

Die neu entwickelten polyklonalen Kaninchen- und Ziegenserum zeigten allesamt die gewünschten Reaktionen und erlaubten so die Detektion der viralen Strukturproteine in Western Blots. Infolgedessen konnten die notwendigen Kontrollserum für PERV zur Verfügung gestellt werden. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen PERV und anderen Typ C-Retroviren sind die meisten der Serum nicht so spezifisch für PERV, daß sie ausschließlich Proteine von PERV erkennen, was auch in den Untersuchungen der Kreuzreaktivität mit FLV deutlich wird. Serum, die gegen Proteine verwandter Viren entwickelt wurden, reagieren auch mit den entsprechenden Proteinen von PERV. Weitergehende Untersuchungen zeigten, daß die neu entwickelten Serum über die Western Blot- und ELISA-Systeme hinaus auch bei Immunperoxidase-Tests (IPA) und in der Immuno-Gold-Elektronenmikroskopie erfolgreich eingesetzt werden können (Specke *et al.*, 2001; Stephan *et al.*, 2001). Nahezu alle unspezifischen Reaktionen gegen zelluläre Proteine bei Serum, die nicht aus synthetischen Peptiden generiert wurden, lassen sich durch Präadsorption an nicht-infizierte Zellen ohne Verlust der spezifischen Reaktionen eliminieren (Volker Specke, persönliche Mitteilung).

Zur Validierung der hier vorgestellten Detektionssysteme wurden die Serum von gesunden Blutspendern eingesetzt, wobei keine Anzeichen für eine Infektion eines untersuchten Spenders gefunden wurden. Dabei wurden zunächst alle Serum im ELISA getestet, was eine Vorselektion darstellt, da falsch-positive Ergebnisse allein schon wegen der Sequenzhomologie der verwendeten Peptide zu anderen Retroviren durchaus zu erwarten sind. Falsch-negative Ergebnisse sind hingegen aus der Erfahrung unwahrscheinlich (Denner *et al.*, 1994), was auch

in den hier gezeigten Ergebnissen dokumentiert ist. Bei den nachfolgenden Western Blot-Untersuchungen zeigten sich Kreuzreaktionen insbesondere mit dem CA-Protein von PERV (s.o.). Wie auch bei den oben erwähnten, zur Detektion von HIV-Infektionen etablierten Test wurde im vorliegenden Falle erst der Nachweis von mindestens zwei viralen Proteinen als Bestätigung für eine Infektion gewertet. Daher stellen diese Kreuzreaktionen im vorliegenden Fall kein Problem für die Interpretation der Ergebnisse dar, obgleich ihr Ursprung nicht klar ist.

Aufgrund des extrem engen Kontaktes von Schlachtern zu frischen Schweinegeweben und Schweineblut, wurde eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Auftretens von Infektionen bzw. von spezifischen Antikörpern bei dieser Personengruppe angenommen (Denner, 1998). Bei Schwangeren wurden häufig Antikörper gegen retrovirale Transmembranproteine gefunden. Hier werden Funktionen der endogenen retroviralen Proteine in der Plazenta diskutiert (Hirsch *et al.*, 1978; Boller *et al.*, 1997; Nilsson *et al.*, 1999). Deshalb sollten Untersuchungen der Seren von Schlachtern und Schwangeren zeigen, ob diese Bevölkerungsgruppen tatsächlich Antikörper gegen PERV-Proteine besitzen. Im Rahmen der Studie ließ sich eine Infektion wie auch ein gehäuftes Auftreten von Kreuzreaktionen ausschließen.

Im Gegensatz zu den bereits publizierten, immunologischen Nachweissystemen, die vielfach auf Präparationen von Zellysaten basieren (Matthews *et al.*, 1999), hat die Verwendung von hoch-gereinigten Viruspartikeln den Vorteil, daß die Wahrscheinlichkeit von unspezifischen Reaktionen und Kreuzreaktionen mit zellulären Proteinen drastisch reduziert ist (Galbraith *et al.*, 2000). Aufgrund der Inkorporation von zellulären Proteinen in die Viruspartikel ist dies dennoch nicht ganz ausgeschlossen. Bei der Verwendung von rekombinanten Proteinen (Paradis *et al.*, 1999; Tabelle IV-5) ist zu bedenken, daß damit nur exakt eine Sequenz vorliegt und somit nur Antikörper gegen genau diese Sequenz zu detektieren sind. Es ist jedoch nicht genug über die Biologie von PERV bekannt, um sicher sagen zu können, welche Subtypen des Virus humanes Gewebe infizieren können und welche Subtypen dann bevorzugt auftreten würden. Zur Zeit kennt man drei Subtypen, die sich im Bereich der Hüllproteine und damit in ihrem Tropismus unterscheiden. Zwei von ihnen (PERV-A und PERV-B) sind poly- und humanotrop, während der dritte Subtyp (PERV-C) als ecotrop charakterisiert ist (Takeuchi *et al.*, 1998). Aufgrund der hohen Zahl an Proviren im Schweinengenom ist zu vermuten, daß es noch andere Subtypen gibt. Da rekombinante Proteine in immunologischen Detektionssystemen möglicherweise nur einen einzelnen Subtyp nachzuweisen vermögen, können sie zur Zeit nur ergänzend verwendet werden. Darüber hinaus stehen zum ersten Mal Seren zur Verfügung, die gegen PERV entwickelt wurden und nicht nur auf Kreuzreaktionen mit Seren

gegen andere Viren basieren, so daß die Detektion deutlich sicherer erfolgen kann. Sie können auch als Grundlage für direkte immunologische Methoden dienen.

Die Anwendung der entwickelten Detektionsverfahren in klinischen Studien an Xenotransplantationspatienten (XENIII-Studie; Paradis *et al.*, 1999) sowie an Patienten mit transplantierten porcinen Herzklappen (Moza *et al.*, 2001) zeigt die Einsatzmöglichkeiten. In der Studie von Paradis *et al.* mit Patienten nach klinischen Xenotransplantationen hatten Seren von vier Patienten unklare Ergebnisse ergeben und daher für kontroverse Diskussionen Anlaß gegeben (Collignon, 1999). Diese Proben wurden mit den vorliegenden Systemen eindeutig, wiederholt und in hoher Verdünnung mit gleichbleibenden Ergebnissen getestet. Dadurch konnte eine Infektion dieser Patienten eindeutig ausgeschlossen werden. Es wurden kreuzreagierende Antikörper gegen das CA-Protein nachgewiesen, wie sie generell bei ca. 5-10% der Bevölkerung gefunden werden (s.o.). Ebenso konnte die Unbedenklichkeit des Einsatzes von Schweineherzklappen im Bezug auf PERV verifiziert werden, da auch hier bei keinem getesteten Patienten eine Infektion nachgewiesen wurde. Dies zeigt, daß die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Verfahren den in den erwähnten Studien genutzten Testsystemen bezüglich der Reproduzierbarkeit, der Sensitivität und der Vielseitigkeit überlegen sind.

Diese Untersuchungen decken nur kleine Bereiche der Xenotransplantation ab, da weder ein ganzes Organ transplantiert noch eine hierzu notwendige Immunsuppressionstherapie eingesetzt wurde. Klinische Studien in diesem Umfang sind derzeit aufgrund des vermuteten Infektionsrisikos und der immunologischen Hindernisse nicht möglich und wenig sinnvoll. Es werden aber verschiedene Untersuchungen an nicht-humanen Primaten durchgeführt, wobei zumeist Paviane eingesetzt werden. Pavianzellen sind *in vitro* suszeptibel für PERV (Blusch *et al.*, 2000a; Specke *et al.*, 2001). Darüber hinaus ist der Pavian aufgrund der phylogenetischen Verwandtschaft zum Menschen sowie aus praktischen und ethischen Gründen ein geeignetes Tiermodell für eine Evaluation des PERV-Infektionsrisikos.

Die Testverfahren wurden daher in zwei präklinischen Studien eingesetzt, in denen Endothelzellen, Lymphozyten, Milzzellen und Lungen von nicht transgenen Schweinen unter starker pharmakologischer Immuntherapie transplantiert wurden (Martin *et al.*, 2001). In einer dritten Studie wurden Nieren bzw. PBMC nicht transgener Tiere in Paviane transplantiert, die zuvor eine Knochenmarktransplantation zur Induktion einer Toleranz gegen Schweinelymphozytenantigene erhalten hatten (Ierino *et al.*, 1999). Wurden bei den ersten beiden Studien lediglich wenige kreuzreagierende Antikörper bzw. einige Antikörper, die gegen zelluläre Proteine gerichtet waren, detektiert, fielen in der dritten Studie Seren auf, die Antikörper gegen das CA-Protein und gegen Hüllproteine enthielten. Dies wären deutliche Hinweise auf eine In-

fektion. Allerdings korrelieren diese Reaktionen nicht mit dem Kontakt mit porcinem Material, sondern treten bereits vor der eigentlichen Transplantation auf. Hier muß es sich somit auch um Kreuzreaktionen handeln.

In allen Fällen konnte durch die eingesetzten Tests gezeigt werden, daß es bei keinem der Tiere zu einer Infektion gekommen ist. Interessanterweise wurden bei der Untersuchung mit PCR-Methoden in einigen Tieren ein Langzeitmikrochimärismus gefunden, bei dem auch 1,5 Jahre nach Xenotransplantation porcine DNA in den Tieren nachweisbar war. Nicht zuletzt deshalb wurde auch die Bildung von Antikörpern gegen zelluläre porcine Proteine untersucht, wobei zwar nur wenige aber dennoch deutliche Reaktionen gemessen wurden. Teilweise wurde auch die Anwesenheit von natürlichen xenoreaktiven Antikörpern untersucht, die gegen α -Gal-Epitope gerichtet sind. Dabei konnte eine deutliche Steigerung gegenüber dem Niveau vor den Xenotransplantationen gezeigt werden (Martin *et al.*, 2001). Dies bestätigt, daß auch bei massiver Immunsuppressionstherapie Antikörper, darunter vermutlich auch PERV-spezifische Antikörper, gebildet werden können, so daß indirekte Detektionsmethoden in diesen Fällen sicher auch eingesetzt werden können.

Es treten, wie schon zuvor erwähnt, gelegentlich kreuzreagierende Antikörper gegen einzelne virale Proteine auf. Da jedoch nur wenige Tiere überhaupt Antikörper gegen einzelne virale Protein zeigten, und ihr Auftreten teilweise gar nicht mit den Kontakt mit dem Schweinegewebe korreliert, ist nicht nur eine Infektion auszuschließen, sondern darüber hinaus die Wahrscheinlichkeit recht gering, daß überhaupt Viruspartikel von Schweinegewebe exprimiert wurden, obwohl PBMC und Endothelzellen *in vitro* infektiöse Partikel bilden können (Kap. V.3).

Diese Ergebnisse sind konsistent mit publizierten Resultaten anderer Gruppen, die jedoch entweder PCR-Methoden oder aber Blotanalysen mit Zellextrakten verwendet haben. Dabei wurden Patienten nach Inselzelltransplantationen (Heneine *et al.*, 1998b) bzw. nach extrakorporaler Nierenperfusion (Patience *et al.*, 1998) und auch Paviane nach Transplantation von Schweineendothelzellen untersucht (Martin *et al.*, 1999b). In allen Fällen konnte kein Transfer von PERV nachgewiesen werden.

Wie gezeigt werden konnte, stehen mit den hier entwickelten Detektionssystemen die für eine Xenotransplantation vorauszusetzenden, sensitiven Nachweismethoden zur kontinuierlichen Untersuchung von Rezipienten bei präklinischen wie auch bei eventuellen klinischen Studien zur Verfügung.

V.3. Expression und Infektion

Die Expression von Viruspartikeln aus Schweinegewebe ist Voraussetzung für die Infektion eines Transplantatrezipienten. Bereits mehrfach wurde *in vitro* die Freisetzung von für humane Zellen infektiösen Partikeln aus PBMC und Endothelzellen von Schweinen nachgewiesen (Akiyoshi *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1998a; Wilson *et al.*, 1998). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß PBMC *in vitro* nach Stimulation mit Mitogenen transient geringe Mengen von PERV bilden können. Dabei wurden auch die Stimulationsbedingungen variiert. Darunter waren auch Bedingungen, bei denen PERV von adhärennten, makrophagenähnlichen Zellen produziert wurde. Eine gemischte Lymphozytenreaktion (MLR) von humanen und porcinen PBMC reicht jedoch nicht aus. Diese Ergebnisse wurde durch die RT-PCR-Untersuchungen bestätigt. Ein Nachweis der Expression mittels Immunfluoreszenz war allerdings ebensowenig möglich wie eine Typisierung der adhärennten Zellen durch Antikörper gegen verschiedene Oberflächenantigene. Im ersten Fall lag vermutlich die Expression unterhalb des Detektionslimits der Methode. Im zweiten Fall ließ sich aufgrund der geringen Zahl von zur Verfügung stehenden Antikörpern gegen porcine Oberflächenantigene keine Aussage treffen.

Basierend auf den Ergebnissen der RT-PCR wurde auch gezeigt, daß von stimulierten PBMC alle drei bisher identifizierten Typen von PERV-Hüllproteinen freigesetzt werden (Le Tissier *et al.*, 1997; Takeuchi *et al.*, 1998). Eine Infektion von humanen 293-Zellen, wie dies publiziert wurde, konnte nicht beobachtet werden (Wilson *et al.*, 1998). Dort wurden jedoch nur Infektionen mit rekombinierten Virusgenomen gefunden, deren Grundsequenz der von PERV-C entspricht, aber große Teile des Hüllproteins von PERV-A tragen (Wilson *et al.*, 2000).

Somit konnte also gezeigt werden, daß primäre Schweinezellen in der Lage sind, für humane Zellen infektiöse Partikel freizusetzen, obwohl dies im gesunden Schwein nach unseren Erkenntnissen nicht der Fall ist. In den untersuchten Schweinen konnten keine Antikörper gegen PERV nachgewiesen werden, was nicht verwundert, da sie vermutlich gegen diese Autoantigene immun sind. Es wurden auch weder virale Nukleinsäuren noch RT-Aktivität im Serum detektiert. Allerdings ist eine Expression offensichtlich bei Tumoren des Schweins möglich (Frazier, 1985). Bei einigen gesunden Schweinen sind ebenfalls Viruspartikel im Serum gefunden worden, die jedoch nicht infektiös sind (Cunningham *et al.*, 1999; Herring *et al.*, 1999). Inwieweit transplantierte Gewebe *in vivo* PERV-Partikel bilden können, ist noch nicht abzuschätzen. Erste Ergebnisse, insbesondere bei Experimenten mit Pavianen, wie sie teilweise auch in dieser Arbeit vorgestellt wurden, sprechen eher gegen eine Expression (Heneine *et*

al., 1998a; Martin *et al.*, 1998b; Martin *et al.*, 1999b; Martin *et al.*, 2001). Es gibt bisher nur einen dokumentierten Fall, bei dem nachweislich aus Langerhansschen Inselzellen nach Transplantation in immundefiziente Mäuse *in vivo* infektiöse Partikel freigesetzt wurden (Deng *et al.*, 2000; van der Laan *et al.*, 2000).

Grundsätzlich besteht also die Gefahr einer Infektion für den Transplantatrezipienten bei einer Xenotransplantation. Um das Virus und mögliche pathogene Auswirkungen einer Infektion weiter studieren zu können, sind *In vivo*-Studien an einem Tiermodell vonnöten. Daher wurde der Wirtsbereich des Virus *in vitro* analysiert, um so Hinweise auf ein geeignetes Tiermodell zu erhalten. Einerseits wurden deshalb verschiedenen Nagerzellen für ein Kleintiermodell in die Tests einbezogen, andererseits wurden Infektionsversuche mit primären Affenzellen durchgeführt, um ein Tiermodell zu finden, welches möglichst gut mit dem Menschen vergleichbar ist. Grundlage für die Auswahl der Spezies waren auch Untersuchungen zum Wirtsbereich mit Pseudotypviren, die die verschiedenen Hüllproteine der PERV-Subtypen trugen (Takeuchi *et al.*, 1998). Hier wurden Maus- und Rattenzellen als suszeptibel für PERV-B-Pseudotypen beschrieben. Auch eine Nerzzelllinie konnte mit diesen Pseudotypen infiziert werden, weshalb auch diese Spezies in Tierversuchen eingesetzt wurde (Specke *et al.*, 2001).

Trotz der Vielzahl von *In vitro*-Infektionsversuchen konnten außer dem Hinweis darauf, daß humane PBMC möglicherweise infizierbar sind, in dieser Studie keine weiteren suszeptiblen Zellen oder Zelllinien identifiziert werden. Dabei wurde zunächst bewußt auf die Verwendung von Stoffen verzichtet, die die Infektionseffizienz erhöhen, um möglichst nahe an der *In vivo*-Situation zu bleiben (Cornetta & Anderson, 1989). Aus dem gleichen Grund wurden auch verstärkt primäre Zellkulturen eingesetzt und PERV/PK- und PERV/I-Virus verwendet. In einer vorangegangenen Studie in der Arbeitsgruppe wurden primäre Zellkulturen von Maus und Ratte auf eine mögliche Suszeptibilität untersucht, wobei ohne polyionische Infektionsenhancer gearbeitet wurde. Hier konnte keine Infektion gezeigt werden (Berg, 1999). Um diese Ergebnisse zu verifizieren und mögliche Auswirkungen von Polybrene oder Protaminsulfat auf die Infektionseffizienz zu überprüfen, wurden nochmals primäre Kulturen der Maus angelegt. Dennoch zeigte sich, daß Maus und Ratte als Kleintiermodell für PERV ausscheiden, zumal auch Studien mit mehrfach passagiertem Virus (PERV/5), einer Rekombinante von PERV-A und PERV-C fehlschlungen (Specke *et al.*, 2001).

Dies deckt sich auch mit Ergebnissen anderer Laboratorien, in denen teilweise durchgeführte *In vivo*-Untersuchungen an verschiedenen Nagerrassen keinen Erfolg erbrachten, wobei eine bestimmte Meerschweinchenrasse möglicherweise infizierbar ist (Daniel Galbraith, persönliche Mitteilung). Demgegenüber wurde publiziert, daß Mäuse mit einer angeborenen schweren

Immundefizienz, NOD/SCID-Mäuse (*non-obese diabetic, severe combined immunodeficiency*), denen porcine Langerhans'sche Inselzellen transplantiert wurden, mit PERV infiziert wurden (Deng *et al.*, 2000; van der Laan *et al.*, 2000). Dies ist die erste bekannte PERV-Infektion eines Organismus'. SCID-Mäuse sind aber ein vergleichsweise ungünstiges Modell, da diese genetische Immundefizienz nicht mit der bei der klinisch Anwendung der Xenotransplantation applizierten Immunsuppressionstherapie verglichen werden kann.

Bei anderen Spezies, insbesondere bei nicht-humanen Primaten, wurden in neueren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe unter Verwendung von Polybrene und Protaminsulfat und mehrfach passagiertem Virus (PERV/5) humane PBMC und PBMC von Pavianen sowie von lymphoide humane Zellen (C8166, THP-1) und humane Muskelzellen (WIL-2) *in vitro* mit PERV infiziert und Virusproduktion nachgewiesen (Specke *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurden auch Infektionen von primären Endothelzellen von Mensch, Gorilla, Schimpanse und Pavian und einigen lymphoiden Zelllinien des Pavians gezeigt (Blusch *et al.*, 2000a; Martin *et al.*, 2000). In der vorliegenden Studie wurden insbesondere deshalb negative Ergebnisse erhalten, da das Monitoring in erster Linie durch Messung der RT-Aktivität als Maß für eine produktive Infektion erfolgte und Virus aus porcinen Zellen bzw. nach einmaliger Passage durch humane Zellen verwendet wurden. Weiteren Aufschluß über das Wirtsspektrum würde über diese Versuche hinaus die Identifikation der zellulären Rezeptoren, mit denen das Virus an die Zelle bindet, bringen (Weiss & Taylor, 1995; Hunter, 1997).

Sehr interessant ist das Replikationsverhalten von PERV bei den Infektionsstudien mit humanen 293-Zellen. Es ist insbesondere unklar, warum eine Replikation des Virus teilweise erst 60 Tage nach der Infektion nachweisbar ist. Das Expressionsverhalten ist einerseits von der Replikationsrate der infizierten Zellen abhängig. Andererseits kann schon zu einem früheren Zeitpunkt eine Provirusintegration durch PCR-Methoden und eine Proteinexpression durch Immunperoxidasetests nachgewiesen werden. Dennoch ist die Replikation von PERV vergleichsweise langsam (Wilson *et al.*, 1998). Jedoch konnten die Replikationszyklen durch wiederholte Passagierung auf humanen Zellen entscheidend verkürzt werden (Schwendemann, 2000). Dies deutet auf mögliche Anpassungen des Virus an die entsprechende Zelllinie hin, könnte aber auch ein Zeichen für eine Auslese von bestimmten, möglicherweise mutierten oder rekombinierten Viren aufgrund des auftretenden Selektionsdruckes sein. Dies drückt sich auch in der biologischen Charakterisierung aus (Kap. V.1).

V.4. Beitrag zur Risikobewertung

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, daß normale porcine Gewebe, die bei einer Xenotransplantation in den Körper des Rezipienten übertragen werden

würden, infektiöse PERV-Partikel produzieren können. Die Infektiosität von PERV für humane Zellen wurde bestätigt, und durch neue Untersuchungen in der Arbeitsgruppe sogar ausgeweitet (Specke *et al.*, 2001; Volker Specke, persönliche Mitteilung). Die Charakterisierung der viralen Proteine zeigte nicht nur die Verwandtschaft mit anderen, exogenen und teilweise pathogenen C-Typ Retroviren, sondern auch einen für endogene Retroviren recht hohen Reifegrad. Zusätzlich wurde auch das immunsuppressive Potential, das dem anderer Typ C-Retroviren vergleichbar ist, nachgewiesen. Sollte eine Expression, Infektion und Replikation von PERV im Rezipienten nach einer Xenotransplantation stattfinden, so besteht in Analogie zu verwandten Retroviren die Möglichkeit der Tumorbildung und der generalisierten Immunsuppression und daher auch ein deutliches Gefährdungspotential.

PERV kann sich, wie andere Retroviren, durch genetische Veränderungen und Selektion recht schnell an veränderte Lebensbedingungen anpassen, wie dies auch bei wiederholt passagierten Viren, wie z.B. bei PERV/3, der Fall ist (Weiss, 1998a). Dieses Virus ist ursprünglich von mitogenstimulierten PBMC von Schweinen produziert und durch Passagen in humanen 293-Zellen selektiert worden. Hierbei hat sich ein Virusgenom durchgesetzt, daß besser an die Proliferation in und die Infektion von 293-Zellen angepaßt ist. Dabei könnten insbesondere Mutationen in den Hüllproteinen einen effektiveren Eintritt in die Wirtszelle vermitteln, was in diesem Fall bisher nicht nachgewiesen werden konnte. Auch andere Teile des Retrovirus wie RT, Protease, Integrase oder Promotoren in den *LTR*-Regionen aber auch die Glykosylierung von Proteinen können an diesen neuen Selektionsbedingungen angepaßt sein und zu einer vollständigeren Reifung der Gag-Proteine und auch einer höheren Inkorporation der Hüllproteine führen (Schwendemann, 2000). Ebenso besteht die Möglichkeit von Rekombinationen mit humanen endogenen retroviralen Sequenzen (Denner, 1998). Veränderungen im Promotorbereich der *LTR* werden zur Zeit näher untersucht. Daher ist eine generelle Gefahr einer weiteren, horizontalen Ausbreitung dieser Viren für die gesamte Bevölkerung aufgrund der Fähigkeiten des Virus zur Anpassung an den Menschen als Wirt prinzipiell denkbar.

Der Nachweis immunsuppressiver Eigenschaften von PERV hat erneut die Frage nach dem Wirkungsmechanismus aufgeworfen. Weitergehende Untersuchungen hierzu hatten einerseits gezeigt, daß die vom transmembranen Hüllprotein abgeleiteten, sogenannten immunsuppressiven Peptide sowohl direkt auf die Zellen oder aber indirekt durch die Modifikation der Ausschüttung von Cytokinen oder anderen Botenstoffen wirken können (Erik Seibold, persönliche Mitteilung; Sadtler, 1997; Denner, 1998; Huang & Huang, 1998). Auch für PERV sind Änderungen der Muster bei der Cytokin-Ausschüttung von Lymphozyten gezeigt worden, und sie entsprechen den bisher beschriebenen Effekten bei MuLV und HIV (Oliver

Stephan, persönliche Mitteilung). Andererseits konnten verschiedene zelluläre Proteine identifiziert werden, die Wechselwirkungen mit den von HIV abgeleiteten Peptiden eingehen (Qureshi *et al.*, 1990; Ebenbichler *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1995; Denner, 1995; Chen *et al.*, 2000). Dabei könnte es sich um Rezeptorproteine handeln, die die Wirkung der Peptide vermitteln könnten. Untersuchungen zu zellulären Bindungsproteinen für die immunsuppressive Domäne von PERV werden derzeit in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

Auf der anderen Seite zeigten im Bezug auf die Abschätzung des Gefährdungspotentials alle durchgeführten Studien bei klinischen und präklinischen Xenotransplantationen inklusive der hier vorgestellten Untersuchungen, daß sowohl eine Replikation des Virus im Schweinegewebe als auch eine Infektion von menschlichen Geweben durch möglicherweise gebildete Viruspartikel eher unwahrscheinlich erscheinen (Nyberg, 2000). Aber die bisherigen Studien sind nicht oder nur teilweise mit einer potentiellen, klinischen Xenotransplantation vergleichbar.

- (i) Es gibt nur wenige Studien mit transgenen Schweineorganen. Die Expression von humanen Komplementregulatorproteinen beeinflusst das Infektionsrisiko vermutlich ganz erheblich.
- (ii) Die Immunsuppression war bei diesen Studien vergleichsweise gering.
- (iii) Die Überlebenszeiten der Organe in den Tieren sind mit oftmals nur wenigen Stunden zu gering, so daß ein richtiger Infektions- und Replikationszyklus mit Hinblick auf die langen Reproduktionszeiten in den durchgeführten *In vitro*-Versuchen noch nicht in Gang gekommen sein könnte.
- (iv) Paviane sind zwar vermutlich ein gutes Tiermodell für die Untersuchung des Infektionsrisikos, dennoch bleibt es ein Modell, das erst durch klinische Studien verifiziert werden kann. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da menschliche Zellen angesichts der Vielzahl *in vitro* infizierbarer humaner Zellen möglicherweise besonders suszeptibel sind. All dies sind Faktoren, die bei der Abschätzung der Gefährdung von PERV im Rahmen der Xenotransplantation noch evaluiert werden müssen.

Daher werden zur Zeit verschiedene weitergehende Studien durchgeführt, in denen einerseits die Biologie und das Replikations- und Infektionsverhalten von PERV in verschiedenen Tiermodellen (u.a. SCID-Maus, pharmakologisch immunsupprimierte Paviane) untersucht wird (Volker Specke, persönliche Mitteilung). Andererseits werden vermehrt Untersuchungen mit Organen transgener Spendertiere durchgeführt. Zur Untersuchung des Verhaltens von humanen Geweben werden sogar Transplantationen von Organen transgener Tiere in Paviane, die zusätzlich humane Gewebe (z.B. Gefäße) transplantiert bekommen, durchgeführt (Ulrich Martin, persönliche Mitteilung).

Für eine abschließende Beurteilung der Infektionsrisiken bei der Xenotransplantation muß das Wissen über die Biologie von PERV bei einer solchen Xenotransplantation weiter vertieft

werden. Solange in derartigen Studien ein Infektionsrisiko nicht ausgeschlossen werden kann, sollten die vorhandenen Richtlinien, die von klinischen Versuchen der Xenotransplantationen bis auf weiteres abraten, bestehen bleiben. In den vergangenen Jahren sind erhebliche Fortschritte im Bereich der Xenotransplantationsforschung erzielt worden. Dies umfaßt insbesondere auch das Verständnis der Abstoßungsreaktionen des Immunsystems wie auch der Physiologie. Dennoch stellen die immunologischen Probleme besondere Hürden dar. Erst wenn diese ausgeräumt sind und somit die Xenotransplantation eine bedeutende klinische Relevanz bekommt, sollte die Gefahr von Xenozoonosen zunächst im Einzelfall abgewogen werden. Bis dahin sollte die medizinische, wissenschaftliche und gesellschaftliche Diskussion weitergeführt werden (Stoye, 1998; Fiane *et al.*, 2000).

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Porcinen Endogenen Retroviren (PERV) erstmals ausführlich biochemisch und biologisch charakterisiert sowie ihr Wirtsspektrum und ihre Expression *in vitro* näher analysiert. Es wurden sensitive immunologische Nachweismethoden entwickelt, die in experimentellen, präklinischen und ersten klinischen Studien zur Xenotransplantation angewandt wurden.

Die Charakterisierung der Viren ergab, daß es sich um Typ C-Retroviren handelt, wobei ein Teil der Partikel nicht gereift ist. In hoch gereinigten Viruspräparationen aus Überständen produzierender porciner und PERV-infizierter, humaner Zellen konnten alle Strukturproteine identifiziert werden. Dazu wurden neben Elektrophoresen Western Blot-Analysen eingesetzt, wobei kreuzreaktive Antiseren gegen verwandte Viren und neu entwickelte, erstmals gegen PERV-Proteine gerichtete Antiseren benutzt wurden. Bei der Untersuchung der biologischen Eigenschaften wurde gezeigt, daß PERV *in vitro* ein mit anderen Retroviren vergleichbares immunsuppressives Potential besitzt.

Mit diesen neuen Antiseren und den hoch gereinigten Viruspräparationen wurden sehr sensitive Western Blot-Verfahren sowie ELISAs auf der Basis synthetischer Peptide als Nachweissysteme etabliert und validiert. Zuerst wurden Seren gesunder Blutspender mit diesen Tests untersucht. Dann wurden Seren von Schlachtern und von Patienten nach Xenotransplantationen getestet. Erstmals wurden auch Seren von Pavianen, denen u.a. auch ganze Schweineorganen transplantiert wurden und die eine profunde, für zukünftige Anwendungen typische, pharmakologische Immunsuppression erhielten, auf Antikörper gegen PERV untersucht. Bei Seren einiger Patienten und gesunder Blutspendern wurden zwar Kreuzreaktionen mit viralen Proteinen gefunden, es lagen aber keinerlei Anzeichen für eine PERV-Infektion vor.

Um das Wirtsspektrum von PERV zu analysieren, wurden Zelllinien und erstmals auch primäre Zellen verschiedener Spezies einschließlich Ratte und Maus mit PERV inokuliert. Dabei wurden erstmals Hinweise auf die Suszeptibilität von humanen Blutzellen erhalten.

Es konnte gezeigt werden, daß mitogenstimulierte porcine PBMC PERV freisetzen können, wobei alle drei Subtypen der Hüllproteine nachgewiesen wurden. Eine nähere Analyse ergab daß verschiedene Schweinerassen aber auch einzelne Individuen der gleichen Rasse unterschiedliche Mengen an Virus freisetzen. Unter bestimmten Stimulationsbedingungen wurde PERV von adhärennten Zellen produziert, die nicht näher charakterisiert werden konnten.

Eine endgültige Beurteilung des Infektionsrisikos bei Xenotransplantationen ist nach Abschluß dieser Studie noch nicht möglich. Mit der Charakterisierung von PERV und den immunologischen Nachweismethoden wurden die Voraussetzung für die Analyse weiterer experimenteller und klinischer Xenotransplantationen gelegt.

VII. SUMMARY

In this work the porcine endogenous retroviruses (PERV) were biochemically and biologically characterised for the first time. Their host range and expression patterns were closer examined *in vitro* and sensitive indirect immunological detection systems were established and used in experimental, preclinical, and first clinical xenotransplantation trials.

The virus was classified as a type C-retrovirus but only part of its particles were mature. All structural viral proteins could be identified in highly-purified preparations of viral particles from supernatants of producing porcine or PERV-infected human cells. For this, beside electrophoreses, Western Blots were applied using cross-reactive antisera developed against related viruses and newly generated antisera which were for the first time directed against PERV-proteins. Examining the biological characteristics of PERV immunosuppressive effects comparable to these described for related viruses were detected *in vitro*.

Using the new antisera and the highly purified virus preparations very sensitive Western Blot-assays and ELISAs based on synthetic peptides were established and validated for the use as immunological detection systems. First, sera from healthy blood donors were tested. Then sera from butchers and from patients after first clinical xenotransplantations were examined. For the first time, sera from baboons that obtained whole organs combined with profound, pharmacological immunosuppression as needed in future clinical trials were examined for the presence of anti-PERV antibodies. Sera from several patients and healthy blood donors showed cross-reactions with viral proteins, but no signs of a PERV-infection were obtained.

Studies on the host range of the virus using cell-lines and, for the first time, primary cells amongst them rat- and mouse-cells were inoculated with PERV. Additionally, indications for the susceptibility of human blood cells were obtained.

An expression of PERV from porcine PBMC stimulated with mitogens was found. Further analysis revealed differences in the expression patterns between several pig-races but also between individuals from the same race while all three subclasses of envelope proteins could be detected. New stimulation conditions were identified where adherent cells expressed PERV though phenotyping of these cells failed.

A final assessment of the risks for a PERV-infection after xenotransplantation based on the results provided in the study is still not possible. The characterisation of PERV and the immunological detection systems build the basis for the analysis of further experimental and clinical xenotransplantations trials.

VIII. LITERATUR

- Akiyoshi, D. E., Denaro, M., Zhu, H. *et al.* (1998) Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine. *Journal of Virology* **72**, 4503-4507.
- Alexander, J. W. & Zola, J. C. (1996) Expanding the donor pool: use of marginal donors for solid organ transplantation. *Clinical Transplantation* **10**, 1-19.
- Allan, J. S. (1998) The risk of using baboons as transplant donors. Exogenous and endogenous viruses. *Annals of the New York Academy of Sciences* **862**, 87-99.
- Allan, J. S., Broussard, S. R., Michaels, M. G. *et al.* (1998) Amplification of simian retroviral sequences from human recipients of baboon liver transplants. *AIDS Research and Human Retroviruses* **14**, 821-824.
- Amiel, G. E., Yoo, J. J. & Atala, A. (2000) Renal therapy using tissue-engineered constructs and gene delivery. *World Journal of Urology* **18**, 71-79.
- Armstrong, J. A., Porterfield, J. S. & De Madrid, A. T. (1971) C-type virus particles in pig kidney cell lines. *Journal of General Virology* **10**, 195-198.
- Auchincloss, H., Jr. & Sachs, D. H. (1998) Xenogeneic transplantation. *Annual Review of Immunology* **16**, 433-470.
- Bach, F. H., Robson, S. C., Winkler, H. *et al.* (1995) Barriers to xenotransplantation. *Nature Medicine* **1**, 869-873.
- Bach, F. H., Fishman, J. A., Daniels, N. *et al.* (1998) Uncertainty in xenotransplantation: individual benefit versus collective risk. *Nature Medicine* **4**, 141-144.
- Bailey, L. L. (1985) Role of cardiac replacement in the neonate. *Journal of Heart Transplantation* **4**, 506-509.
- Balner, H. (1974) Choice of animal species for modern transplantation research. *Transplantation Proceedings* **6**, 19-25.
- Barker, D. D., Wu, H., Hartung, S., Breindl, M. & Jaenisch, R. (1991) Retrovirus-induced insertional mutagenesis: mechanism of collagen mutation in Mov13 mice. *Molecular and Cellular Biology* **11**, 5154-5163.
- Barker, R. A., Ratcliffe, E., McLaughlin, M., Richards, A. & Dunnett, S. B. (2000) A role for complement in the rejection of porcine ventral mesencephalic xenografts in a rat model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience* **20**, 3415-3424.
- Berg, A. Porcine endogene Retroviren (PERV): Untersuchungen zur Transspeziesübertragung und Herstellung des transmembranen Hüllproteins p15E von PERV (*Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Technische Universität Darmstadt*), Darmstadt, 1999.
- Bhatti, F. N., Schmoeckel, M., Zaidi, A. *et al.* (1999) Three-month survival of hDAFF transgenic pig hearts transplanted into primates. *Transplantation Proceedings* **31**, 958.
- Biggar, R. J., Gigase, P. L., Melbye, M. *et al.* (1985) ELISA HTLV retrovirus antibody reactivity associated with malaria and immune complexes in healthy Africans. *Lancet* **2**, 520-523.
- Binley, J. & Moore, J. P. (1997) HIV-cell fusion. The viral mousetrap. *Nature* **387**, 346-348.
- Blusch, J. H., Patience, C., Takeuchi, Y. *et al.* (2000a) Infection of nonhuman primate cells by pig endogenous retrovirus. *Journal of Virology* **74**, 7687-7690.

- Blusch, J. H., Roos, C. & Nitschko, H. (2000b) A polymerase chain reaction-based protocol for the detection of transmission of pig endogenous retroviruses in pig to human xenotransplantation. *Transplantation* **69**, 2167-2172.
- Boeke, J. D. & Stoye, J. P. *Retrotransposons, Endogenous Retroviruses, and the Evolution of Retroelements*. In: *Retroviruses*. Coffin, J. M., Hughes, S. H. & Varmus, H. E. (Hrsg.) 343-435. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1997.
- Boller, K., Janssen, O., Schuldes, H., Tönjes, R. R. & Kurth, R. (1997) Characterization of the antibody response specific for the human endogenous retrovirus HTDV/HERV-K. *Journal of Virology* **71**, 4581-4588.
- Botti, C., Seregni, E., Ferrari, L., Martinetti, A. & Bombardieri, E. (1998) Immunosuppressive factors: role in cancer development and progression. *International Journal of Biological Markers* **13**, 51-69.
- Bouillant, A. M. P., Greig, A. S., Lieber, M. M. & Todaro, G. J. (1975) Type C virus production by a continuous line of pig oviduct cells (PFT). *Journal of General Virology* **27**, 173-180.
- Briand, J. P., Muller, S. & Van Regenmortel, M. H. (1985) Synthetic peptides as antigens: pitfalls of conjugation methods. *Journal of Immunological Methods* **78**, 59-69.
- Brody, B. A. & Hunter, E. (1992) Mutations within the env gene of Mason-Pfizer monkey virus: effects on protein transport and SU-TM association. *Journal of Virology* **66**, 3466-3475.
- Bundesärztekammer. (1999) Stellungnahme des Wissenschaftlichen Beirates der Bundesärztekammer zur Xenotransplantation. *Deutsches Ärzteblatt* **96**, 1920-1926.
- Burns, C. C., Poss, M. L., Thomas, E. & Overbaugh, J. (1995) Mutations within a putative cysteine loop of the transmembrane protein of an attenuated immunodeficiency-inducing feline leukemia virus variant inhibit envelope protein processing. *Journal of Virology* **69**, 2126-2132.
- Butler, D. (1998) Last chance to stop and think on risks of xenotransplants. *Nature* **391**, 320-324.
- Calne, R. Y. (1966) Homo- and heterotransplantation. *Current Problems of Surgery*, 3-56.
- Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M. & Kim, P. S. (1997) Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**, 263-273.
- Chari, R. S., Collins, B. H., Magee, J. C. *et al.* (1994) Brief report: treatment of hepatic failure with ex vivo pig-liver perfusion followed by liver transplantation. *New England Journal of Medicine* **331**, 234-237.
- Chen, Y. H., Christiansen, A., Bock, G. & Dierich, M. P. (1995) HIV-2 transmembrane protein gp36 like HIV-1 gp41 binds to human lymphocytes and monocytes. *Aids* **9**, 1193-1194.
- Chen, Y. H., Xiao, Y., Wu, W. *et al.* (2000) HIV-2 transmembrane protein gp36 binds to the putative cellular receptor proteins P45 and P62. *Immunobiology* **201**, 317-322.
- Cianciolo, G. J., Matthews, T. J., Bolognesi, D. P. & Snyderman, R. (1980) Macrophage accumulation in mice is inhibited by low molecular weight products from murine leukemia viruses. *Journal of Immunology* **124**, 2900-2905.

- Cianciolo, G. J., Copeland, T. D., Oroszlan, S. & Snyderman, R. (1985) Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope proteins. *Science* **230**, 453-455.
- Cianciolo, G. J., Bogerd, H. & Snyderman, R. (1988) Human retrovirus-related synthetic peptides inhibit T lymphocyte proliferation. *Immunological Letters* **19**, 7-13.
- Cohen, O. J., Kinter, A. & Fauci, A. S. (1997) Host factors in the pathogenesis of HIV disease. *Immunological Reviews* **159**, 31-48.
- Collette, Y., Dutartre, H., Benziane, A. & Olive, D. (1996) Similarity between Nef of primate lentiviruses and p15E of murine and feline leukaemia viruses. *Aids* **10**, 441-442.
- Collignon, P. (1999) Transplants from pigs. *Science* **286**, 1855-1857.
- Cooper, D. K., Koren, E. & Oriol, R. (1994) Oligosaccharides and discordant xenotransplantation. *Immunological Reviews* **141**, 31-58.
- Cornetta, K. & Anderson, W. F. (1989) Protamine sulfate as an effective alternative to polybrene in retroviral-mediated gene-transfer: implications for human gene therapy. *Journal of Virological Methods* **23**, 187-194.
- Cowan, P. J., Aminian, A., Barlow, H. *et al.* (2000) Renal xenografts from triple-transgenic pigs are not hyperacutely rejected but cause coagulopathy in non-immunosuppressed baboons. *Transplantation* **69**, 2504-2515.
- Cozzi, E. & White, D. J. (1995) The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nature Medicine* **1**, 964-966.
- Cozzi, E. In: *Xenotransplantation*. Cooper, D. K. C., Kemp, E., Platt, J. L. & D.J.G., W. (Hrsg.) Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1997.
- Cozzi, E., Tucker, A. W., Langford, G. A. *et al.* (1997) Characterization of pigs transgenic for human decay-accelerating factor. *Transplantation* **64**, 1383-1392.
- Cozzi, E., Bhatti, F., Schmoeckel, M. *et al.* (2000a) Long-term survival of nonhuman primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts. *Transplantation* **70**, 15-21.
- Cozzi, E., Soin, B., Holmes, B. & White, D. (2000b) Genetic engineering of the donor as an approach to clinical xenotransplantation. *Transplantation Proceedings* **32**, 2701-2703.
- Cramer, D. V. (2000) Natural antibodies and the host immune responses to xenografts. *Xenotransplantation* **7**, 83-92.
- Cruz, J., Teixeira, J., Fiuza, C., Araujo, R. & Braga, A. (2000) Ethical challenges of xenotransplantation. *Transplantation Proceedings* **32**, 2687.
- Cunningham, D., Fernandez-Suarez, X., Herring, C. *et al.* (1999) Expression of porcine endogenous retroviruses in hDAF-transgenic pigs. *5th Congress of the International Xenotransplantation Association*, Nagoya, A1154.
- Czauderna, F., Fischer, N., Boller, K., Kurth, R. & Tönjes, R. R. (2000) Establishment and characterization of molecular clones of porcine endogenous retroviruses replicating on human cells. *Journal of Virology* **74**, 4028-4038.
- Dalmaso, A. P., Vercellotti, G. M., Platt, J. L. & Bach, F. H. (1991) Inhibition of complement-mediated endothelial cell cytotoxicity by decay-accelerating factor. Potential for prevention of xenograft hyperacute rejection. *Transplantation* **52**, 530-533.

- Dalmasso, A. P. & Platt, J. L. (1993) Prevention of complement-mediated activation of xenogeneic endothelial cells in an in vitro model of xenograft hyperacute rejection by C1 inhibitor. *Transplantation* **56**, 1171-1176.
- Deacon, T., Schumacher, J., Dinsmore, J. *et al.* (1997) Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. *Nature Medicine* **3**, 350-353.
- Delwart, E. L., Mosialos, G. & Gilmore, T. (1990) Retroviral envelope glycoproteins contain a "leucine zipper"-like repeat. *AIDS Research and Human Retroviruses* **6**, 703-706.
- Denesvire, C., Sonigo, P., Corbin, A., Ellerbrok, H. & Sitbon, M. (1995) Influence of transmembrane domains on the fusogenic abilities of human and murine leukemia retrovirus envelopes. *Journal of Virology* **69**, 4149-4157.
- Deng, Y. M., Tuch, B. E. & Rawlinson, W. D. (2000) Transmission of porcine endogenous retroviruses in severe combined immunodeficient mice xenotransplanted with fetal porcine pancreatic cells. *Transplantation* **70**, 1010-1016.
- Denner, J., Wunderlich, V. & Bierwolf, D. (1980) Suppression of human lymphocyte mitogen response by disrupted primate retroviruses of type C (baboon endogenous virus) and type D (PMFV). *Acta Biologica et Medica Germanica* **39**, K19-26.
- Denner, J., Indzhiia, L., Wunderlich, V. *et al.* (1985a) Suppression of human lymphocyte mitogen response by retroviruses of type D. II. Non-activity of Mason-Pfizer monkey virus versus activity of human cell line derived virus PMFV. *Archives of Virology* **86**, 187-196.
- Denner, J., Wunderlich, V. & Sydow, G. (1985b) Suppression of human lymphocyte mitogen response by retroviruses of type D. I. Action of highly purified intact and disrupted virus. *Archives of Virology* **86**, 177-186.
- Denner, J., Wunderlich, V. & Bierwolf, D. (1986a) Suppression of human lymphocyte mitogen response by proteins of the type-D retrovirus PMFV. *International Journal of Cancer* **37**, 311-316.
- Denner, J., Wunderlich, V. & Bierwolf, D. (1986b) Immunosuppression by retroviruses in tumors and immune deficiency diseases. *Archive der Geschwulstforschung* **56**, 117-124.
- Denner, J. *Immunosuppression by oncogenic retroviridae*. In: *Modulation of the immuneresponsiveness by infectious agents*. Zschiesche, W. (Hrsg.) 114-201. Fischer Verlag, Jena, 1987.
- Denner, J., Norley, S. G., Cichutek, K., Ennen, J. & Kurth, R. (1993) Factors Determining the Pathogenicity of Immunodeficiency Viruses. *AIDS-Forschung* **8**, 301-306.
- Denner, J., Norley, S. G. & Kurth, R. (1994) The immunosuppressive peptide of HIV-1: functional domains and immune response in AIDS patients. *Aids* **8**, 1063-1072.
- Denner, J. (1995) Verschiedene Peptide des transmembranen Hüllproteins gp41 hemmen die Replikation von HIV-1. *AIDS-Forschung* **10**, 467-471.
- Denner, J., Persin, C., Vogel, T. *et al.* (1996) The immunosuppressive peptide of HIV-1 inhibits T and B lymphocyte stimulation. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* **12**, 442-450.
- Denner, J. (1998) Immunosuppression by retroviruses: implications for xenotransplantation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **862**, 75-86.

- Denner, J. (1999a) Immunsuppression durch Retroviren: Implikationen für die Xenotransplantation. *Transplantationsmedizin* **11**, 223-233.
- Denner, J. (1999b) Xenotransplantation - Minisymposium am 16.04.1999 im Paul-Ehrlich-Institut. *Bundesgesundheitsblatt* **42**, 877-882.
- Denner, J. (2000a) How does HIV induce AIDS? The virus protein hypothesis. *Journal of Human Virology* **3**, 81-82.
- Denner, J. *Mikrobiologische Risiken der Xenotransplantation*. In: *Neue Perspektiven der Transplantationsmedizin im interdisziplinären Dialog*. Engels, E.-M., Badura-Lotter, G. & Schick Tanz, S. (Hrsg.) 142-169. Nomos, Baden-Baden, 2000b.
- Denner, J. *Xenotransplantation, Transspezies-Übertragung von Retroviren und AIDS*. In: *Biotechnologische Verfahren und Möglichkeiten in der Medizin*. Arndt, D. & Obe, G. (Hrsg.) MMV Medizin-Verlag, München, 2001.
- DHHS. (Department of Health and Human Services, USA, 1996) Draft PHS Guideline on Infectious Disease Issues in Xenotransplantation. *61 Federal Register* **49919**.
- di Guan, C., Li, P., Riggs, P. D. & Inouye, H. (1988) Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* **67**, 21-30.
- Dorling, A., Binns, R. & Lechler, R. I. (1996a) Cellular xenoresponses: Observation of significant primary indirect human T cell anti-pig xenoresponses using co-stimulator-deficient or SLA class II-negative porcine stimulators. *Xenotransplantation* **3**, 112-119.
- Dorling, A., Binns, R. & Lechler, R. I. (1996b) Direct human T-cell anti-pig xenoresponses are vigorous but significantly weaker than direct alloresponses. *Transplantation Proceedings* **28**, 653.
- Dubay, J. W., Roberts, S. J., Brody, B. & Hunter, E. (1992) Mutations in the leucine zipper of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein affect fusion and infectivity. *Journal of Virology* **66**, 4748-4756.
- Dukers, D. F., Meij, P., Vervoort, M. B. *et al.* (2000) Direct immunosuppressive effects of EBV-encoded latent membrane protein 1. *Journal of Immunology* **165**, 663-670.
- Duvivier, V., Darquy, S., Rouault, C. *et al.* (1998) Long-term culture of free or encapsulated islets isolated from specific pathogen-free (SPF) pigs. *Diabetes and Metabolism* **24**, 517-522.
- Ebenbichler, C. F., Roder, C., Vornhagen, R., Ratner, L. & Dierich, M. P. (1993) Cell surface proteins binding to recombinant soluble HIV-1 and HIV-2 transmembrane proteins. *Aids* **7**, 489-495.
- Ebenbichler, C. F., Stoiber, H., Schneider, R., Patsch, J. R. & Dierich, M. P. (1996) The human immunodeficiency virus type 1 transmembrane gp41 protein is a calcium-binding protein and interacts with the putative second-receptor molecules in a calcium-dependent manner. *Journal of Virology* **70**, 1723-1728.
- Ehlers, B., Ulrich, S. & Goltz, M. (1999) Detection of two novel porcine herpesviruses with high similarity to gammaherpesviruses. *Journal of General Virology* **80**, 971-978.
- Eichberg, J. W., Kalter, S. S., Heberling, R. L. *et al.* (1981) In vivo activation of the baboon endogenous virus. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* **166**, 271-276.

- Enserink, M. (1999) New virus fingered in Malaysian epidemic. *Science* **284**, 407, 409-410.
- Enserink, M. (2000) Emerging diseases. Malaysian researchers trace Nipah virus outbreak to bats. *Science* **289**, 518-519.
- Ericsson, T., Oldmixon, B., Blomberg, J. *et al.* (2001) Identification of Novel Porcine Endogenous Betaretrovirus Sequences in Miniature Swine. *Journal of Virology* **75**, 2765-2770.
- Eurotransplant. Internet-Präsentation: <http://www.eurotransplant.nl/>; Version vom 22.01.2001.
- Falasca, E., Baccarani, U., Pipan, C., Degrassi, A. & Donini, A. (2000) Is PERV transfer across hollow fiber membranes relevant to bioartificial liver model? *Transplantation* **69**, 1755.
- Fan, H. *Retroviruses and their role in cancer*. In: *The Retroviridae*. Levy, J. A. (Hrsg.) 313-349. Plenum Press, New York, 1994.
- Fass, D., Harrison, S. C. & Kim, P. S. (1996) Retrovirus envelope domain at 1.7 angstrom resolution. *Nature Structural Biology* **3**, 465-469.
- Fauci, A. S. (1988) The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* **239**, 617-622.
- Fiane, A. E., Mollnes, T. E., Videm, V. *et al.* (1999) Compstatin, a peptide inhibitor of C3, prolongs survival of ex vivo perfused pig xenografts. *Xenotransplantation* **6**, 52-65.
- Fiane, A. E., Mollnes, T. E. & Degre, M. (2000) Pig endogenous retrovirus--a threat to clinical xenotransplantation? *APMIS* **108**, 241-250.
- Fiegl, M., Strasser-Wozak, E., Geley, S. *et al.* (1995) Glucocorticoid-mediated immunomodulation: hydrocortisone enhances immunosuppressive endogenous retroviral protein (p15E) expression in mouse immune cells. *Clinical and Experimental Immunology* **101**, 259-264.
- Fink, J. S., Schumacher, J. M., Ellias, S. L. *et al.* (2000) Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell Transplantation* **9**, 273-278.
- Fishman, J. A. (1994) Miniature swine as organ donors for man: Strategies for prevention of xenotransplant-associated infections. *Xenotransplantation* **1**, 47-57.
- Fishman, J. A. (1997) Xenosis and xenotransplantation: addressing the infectious risks posed by an emerging technology. *Kidney International Supplement* **58**, S41-45.
- Fishman, J. A. (2000) Xenotransplantation from swine: making a list, checking it twice. *Xenotransplantation* **7**, 93-95.
- Flexner, C. (1998) HIV-protease inhibitors. *New England Journal of Medicine* **338**, 1281-1292.
- Fong, R. & Kissmeyer-Nielsen, F. (1972) A combined dye exclusion (trypan blue) and fluorochromatic technique for the microdroplet lymphocytotoxicity test. *Tissue Antigens* **2**, 57-63.
- Fontenot, J. D., Hoover, E. A., Elder, J. H. & Montelaro, R. C. (1992) Evaluation of feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus transmembrane peptides for serological diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* **30**, 1885-1890.

- Frazier, M. E. (1985) Evidence for retrovirus in miniature swine with radiation-induced leukemia or metaplasia. *Archives of Virology* **83**, 83-97.
- Galbraith, D. N., Kelly, H. T., Dyke, A. *et al.* (2000) Design and validation of immunological tests for the detection of porcine endogenous retrovirus in biological materials. *Journal of Virological Methods* **90**, 115-124.
- Gao, F., Yue, L., White, A. T. *et al.* (1992) Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature* **358**, 495-499.
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L. *et al.* (1999) Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. *Nature* **397**, 436-441.
- Garten, W., Hallenberger, S., Ortmann, D. *et al.* (1994) Processing of viral glycoproteins by the subtilisin-like endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones. *Biochimie* **76**, 217-225.
- Gatot, J. S., Callebaut, I., Mornon, J. P. *et al.* (1998) Conservative mutations in the immunosuppressive region of the bovine leukemia virus transmembrane protein affect fusion but not infectivity in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 12870-12880.
- Gelderblom, H. R. (1991) Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *Aids* **5**, 617-637.
- Giles, G. R., Boehmig, H. J., Amemiya, H., Halgrimson, C. G. & Starzl, T. E. (1970) Clinical heterotransplantation of the liver. *Transplantation Proceedings* **2**, 506-512.
- Gill, R. G. (1992) The role of direct and indirect antigen presentation in the response to islet xenografts. *Transplantation Proceedings* **24**, 642-643.
- Gnann, J. W., Jr., Nelson, J. A. & Oldstone, M. B. (1987) Fine mapping of an immunodominant domain in the transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus. *Journal of Virology* **61**, 2639-2641.
- Grabarek, Z. & Gergely, J. (1990) Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Analytical Biochemistry* **185**, 131-135.
- Green, N., Shinnick, T. M., Witte, O. *et al.* (1981) Sequence-specific antibodies show that maturation of Moloney leukemia virus envelope polyprotein involves removal of a COOH-terminal peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 6023-6027.
- Groth, C. G., Korsgren, O., Tibell, A. *et al.* (1994) Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. *Lancet* **344**, 1402-1404.
- Günzburg, W. H. & Salmons, B. (2000) Xenotransplantation: is the risk of viral infection as great as we thought? *Molecular Medicine Today* **6**, 199-208.
- Hagelin, J., Carlsson, H. E. & Hau, J. (2000) Students' acceptance of clinical xenotransplantation. *Clinical Transplantation* **14**, 252-256.
- Hammer, C. *Evolutionary, physiological, and immunological considerations on defining a suitable donor for man.* In: *Xenotransplantation. The Transplantation of Organs and Tissues Between Species.* Cooper, D. K. C., Kemp, E., Reemtsma, K. & White, D. J. G. (Hrsg.) 429-438. Springer, Berlin, 1991.
- Hammer, C. (1998) Physiological obstacles after xenotransplantation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **862**, 19-27.

- Haraguchi, S., Good, R. A., Cianciolo, G. J. & Day, N. K. (1992a) A synthetic peptide homologous to retroviral envelope protein down-regulates TNF-alpha and IFN-gamma mRNA expression. *Journal of Leukocyte Biology* **52**, 469-472.
- Haraguchi, S., Liu, W. T., Cianciolo, G. J., Good, R. A. & Day, N. K. (1992b) Suppression of human interferon-gamma production by a 17 amino acid peptide homologous to the transmembrane envelope protein of retroviruses: evidence for a primary role played by monocytes. *Cellular Immunology* **141**, 388-397.
- Haraguchi, S., Good, R. A., Cianciolo, G. J., James-Yarish, M. & Day, N. K. (1993) Transcriptional down-regulation of tumor necrosis factor-alpha gene expression by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope protein. *Journal of Immunology* **151**, 2733-2741.
- Haraguchi, S., Good, R. A. & Day, N. K. (1995a) Immunosuppressive retroviral peptides: cAMP and cytokine patterns. *Immunology Today* **16**, 595-603.
- Haraguchi, S., Good, R. A., James-Yarish, M., Cianciolo, G. J. & Day, N. K. (1995b) Induction of intracellular cAMP by a synthetic retroviral envelope peptide: a possible mechanism of immunopathogenesis in retroviral infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 5568-5571.
- Haraguchi, S., Good, R. A., Cianciolo, G. J., Engelman, R. W. & Day, N. K. (1997) Immunosuppressive retroviral peptides: immunopathological implications for immunosuppressive influences of retroviral infections. *Journal of Leukocyte Biology* **61**, 654-666.
- Hardy, W. D., Jr. (1982) Immunopathology induced by the feline leukemia virus. *Springer Seminars of Immunopathology* **5**, 75-106.
- Harris, D. T., Cianciolo, G. J., Snyderman, R., Argov, S. & Koren, H. S. (1987) Inhibition of human natural killer cell activity by a synthetic peptide homologous to a conserved region in the retroviral protein, p15E. *Journal of Immunology* **138**, 889-894.
- Hebebrand, L. C., Mathes, L. E. & Olsen, R. G. (1977) Inhibition of concanavalin A stimulation of feline lymphocytes by inactivated feline leukemia virus. *Cancer Research* **37**, 4532-4533.
- Heneine, W., Switzer, W. M., Sandstrom, P. *et al.* (1998a) Identification of a human population infected with simian foamy viruses. *Nature Medicine* **4**, 403-407.
- Heneine, W., Tibell, A., Switzer, W. M. *et al.* (1998b) No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts. *Lancet* **352**, 695-699.
- Herring, C., Whittam, A., Cunningham, D. *et al.* (1999) Analysis of porcine endogenous retrovirus variants in hDAF transgenic pigs. *5th Congress of the International Xenotransplantation Association*, Nagoya, A1154.
- Hillenkamp, F. & Karas, M. (1990) Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods in Enzymology* **193**, 280-295.
- Hirsch, M. S., Kelly, A. P., Chapin, D. S. *et al.* (1978) Immunity to antigens associated with primate C-type oncoviruses in pregnant women. *Science* **199**, 1337-1340.
- Hohenadl, C., Leib-Mosch, C., Hehlmann, R. & Erfle, V. (1996) Biological significance of human endogenous retroviral sequences. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* **13**, S268-273.

- Hoopes, C. W. & Platt, J. L. (1999) Screening by tRNA primer extension analysis of porcine kidney mRNA libraries defines a novel endogenous porcine retroviral long terminal repeat. *Transplantation* **67**, 1391-1395.
- Huang, S. S. & Huang, J. S. (1998) A pentacosapeptide (CKS-25) homologous to retroviral envelope proteins possesses a transforming growth factor-beta activity. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 4815-4818.
- Hughes, J. (1998) Xenografting: ethical issues. *Journal of Medical Ethics* **24**, 18-24.
- Hunkapiller, M. W., Hewick, R. M., Dreyer, W. J. & Hood, L. E. (1983) High-sensitivity sequencing with a gas-phase sequenator. *Methods in Enzymology* **91**, 399-413.
- Hunter, E. *Viral Entry and Receptors*. In: *Retroviruses*. Coffin, J. M., Hughes, S. H. & Varmus, H. E. (Hrsg.) 71-119. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1997.
- Ierino, F. L., Gojo, S., Banerjee, P. T. *et al.* (1999) Transfer of swine major histocompatibility complex class II genes into autologous bone marrow cells of baboons for the induction of tolerance across xenogeneic barriers. *Transplantation* **67**, 119-128.
- Isacson, O. & Breakefield, X. O. (1997) Benefits and risks of hosting animal cells in the human brain. *Nature Medicine* **3**, 964-969.
- Jenum, P. (1988) Anti-HIV screening of pregnant women in south-eastern Norway. *NIPH Annals* **11**, 53-58.
- Kaufman, C. L., Gaines, B. A. & Ildstad, S. T. (1995) Xenotransplantation. *Annual Review of Immunology* **13**, 339-367.
- Kellermann, O. K. & Ferenci, T. (1982) Maltose-binding protein from Escherichia coli. *Methods in Enzymology* **90**, 459-463.
- Kizaki, T., Mitani, M., Cianciolo, G. J. *et al.* (1991) Specific association of retroviral envelope protein, p15E, with human cell surface. *Immunological Letters* **28**, 11-18.
- Kleinerman, E. S., Lachman, L. B., Knowles, R. D., Snyderman, R. & Cianciolo, G. J. (1987) A synthetic peptide homologous to the envelope proteins of retroviruses inhibits monocyte-mediated killing by inactivating interleukin 1. *Journal of Immunology* **139**, 2329-2337.
- Krach, U., Fischer, N., Czauderna, F., Kurth, R. & Tönjes, R. R. (2000) Generation and testing of a highly specific anti-serum directed against porcine endogenous retrovirus nucleocapsid. *Xenotransplantation* **7**, 221-229.
- Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* **157**, 105-132.
- Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lanza, R. P., Cooper, D. K. & Chick, W. L. (1997) Xenotransplantation. *Scientific American* **277**, 54-59.
- Larsson, L. C. & Widner, H. (2000) Neural tissue xenografting. *Scandinavian Journal of Immunology* **52**, 249-256.
- Lazar, A., Peshwa, M. V., Wu, F. J. *et al.* (1995) Formation of porcine hepatocyte spheroids for use in a bioartificial liver. *Cell Transplantation* **4**, 259-268.

- Le Guenno, B., Formentry, P., Wyers, M. *et al.* (1995) Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola virus. *Lancet* **345**, 1271-1274.
- Le Tissier, P., Stoye, J. P., Takeuchi, Y., Patience, C. & Weiss, R. A. (1997) Two sets of human-tropic pig retrovirus. *Nature* **389**, 681-682.
- Leib-Mösch, C., Brack-Werner, R., Salmons, B. *et al.* (1990) The significance of retroviruses in oncology. *Onkologie* **13**, 405-414.
- Li, X., McDermott, B., Yuan, B. & Goff, S. P. (1996) Homomeric interactions between transmembrane proteins of Moloney murine leukemia virus. *Journal of Virology* **70**, 1266-1270.
- Lieber, M. M., Sherr, C. J., Benveniste, R. E. & Todaro, G. J. (1975a) Biologic and immunologic properties of porcine type C viruses. *Virology* **66**, 616-619.
- Lieber, M. M., Sherr, C. J., Todaro, G. J. *et al.* (1975b) Isolation from the asian mouse *Mus caroli* of an endogenous type C virus related to infectious primate type C viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**, 2315-2319.
- Lin, Y., Goebels, J., Xia, G. *et al.* (1998) Induction of specific transplantation tolerance across xenogeneic barriers in the T-independent immune compartment. *Nature Medicine* **4**, 173-180.
- Löwer, R., Löwer, J. & Kurth, R. (1996) The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 5177-5184.
- Löwer, R., Tönjes, R. R., Boller, K. *et al.* (1998) Development of insulin-dependent diabetes mellitus does not depend on specific expression of the human endogenous retrovirus HERV-K. *Cell* **95**, 11-14.
- Maina, C. V., Riggs, P. D., Grandea, A. G. d. *et al.* (1988) An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene* **74**, 365-373.
- Mangeny, M. & Heidmann, T. (1998) Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immune rejection in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 14920-14925.
- Martignat, L., Sai, P. & Jestin, A. (1998) Detection of porcine endogenous retrovirus: possible involvement in pig islet xenotransplantation. *Diabetes and Metabolism* **24**, 434-441.
- Martin, J., Herniou, E., Cook, J., O'Neill, R. W. & Tristem, M. (1999a) Interclass transmission and phyletic host tracking in murine leukemia virus-related retroviruses. *Journal of Virology* **73**, 2442-2449.
- Martin, U., Kiessig, V., Blusch, J. H. *et al.* (1998a) Expression of pig endogenous retrovirus by primary porcine endothelial cells and infection of human cells. *Lancet* **352**, 692-694.
- Martin, U., Steinhoff, G., Kiessig, V. *et al.* (1998b) Porcine endogenous retrovirus (PERV) was not transmitted from transplanted porcine endothelial cells to baboons in vivo. *Transplantation International* **11**, 247-251.
- Martin, U. & Steinhoff, G. (1999) Porcine endogenous retroviruses (PERV): in vitro artifact or a big problem for xenotransplantation? *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* **106**, 146-149.

- Martin, U., Steinhoff, G., Kiessig, V. *et al.* (1999b) Porcine endogenous retrovirus is transmitted neither in vivo nor in vitro from porcine endothelial cells to baboons. *Transplantation Proceedings* **31**, 913-914.
- Martin, U., Winkler, M. E., Id, M. *et al.* (2000) Productive infection of primary human endothelial cells by pig endogenous retrovirus (PERV). *Xenotransplantation* **7**, 138-142.
- Martin, U., Tacke, S. J., Simon, A. R. *et al.* (2001) Absence of PERV specific immune response in baboons after transplantation of porcine cells or organs. *Xenotransplantation*, (eingereicht).
- Mathes, L. E., Olsen, R. G., Hebebrand, L. C., Hoover, E. A. & Schaller, J. P. (1978) Abrogation of lymphocyte blastogenesis by a feline leukaemia virus protein. *Nature* **274**, 687-689.
- Mathes, L. E., Olsen, R. G., Hebebrand, L. C. *et al.* (1979) Immunosuppressive properties of a virion polypeptide, a 15,000-dalton protein, from feline leukemia virus. *Cancer Research* **39**, 950-955.
- Matthews, A. L., Brown, J., Switzer, W. *et al.* (1999) Development and validation of a Western immunoblot assay for detection of antibodies to porcine endogenous retrovirus. *Transplantation* **67**, 939-943.
- Meng, X. J., Purcell, R. H., Halbur, P. G. *et al.* (1997) A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 9860-9865.
- Merrifield, R. B. & Stewart, J. M. (1965) Automated peptide synthesis. *Nature* **207**, 522-523.
- Michael, N. L. & Moore, J. P. (1999) HIV-1 entry inhibitors: evading the issue. *Nature Medicine* **5**, 740-742.
- Michaels, M. G. & Simmons, R. L. (1994) Xenotransplant-associated zoonoses. Strategies for prevention. *Transplantation* **57**, 1-7.
- Michaels, M. G., Jenkins, F. J., George, K. S. *et al.* (2001) Detection of Infectious Baboon Cytomegalovirus after Baboon-to-Human Liver Xenotransplantation. *Journal of Virology* **75**, 2825-2828.
- Miyagawa, S., Hirose, H., Shirakura, R. *et al.* (1988) The mechanism of discordant xenograft rejection. *Transplantation* **46**, 825-830.
- Moennig, V., Frank, H., Hunsmann, G. *et al.* (1974) C-type particles produced by a permanent cell line from leukemic pig. II. Physical, chemical and serological characterization of the particles. *Virology* **57**, 179-188.
- Moza, A. K., Mertsching, H., Herden, T., Bader, A. & Haverich, A. (2001) Porcine endogenous retrovirus (PERV): A study to assess the probability of PERV infection in humans after AVR/MVR., eingereicht.
- Murphy, F. A. (1996) The public health risk of animal organ and tissue transplantation into humans. *Science* **273**, 746-747.
- Neil, J. C., Onions, D. E. & Jarrett, O. (1980) Polypeptides of feline leukaemia virus: identification of p15(E) and p12(E). *Journal of General Virology* **50**, 455-460.

- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. & Ehrhardt, W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-262.
- Niemann, H. (1999) Transgenic pigs for xenotransplantation for humans. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* **106**, 141-146.
- Nilsson, B. O., Jin, M., Andersson, A. C., Sundstrom, P. & Larsson, E. (1999) Expression of envelope proteins of endogenous C-type retrovirus on the surface of mouse and human oocytes at fertilization. *Virus Genes* **18**, 115-120.
- Nyberg, S. (2000) Cross-Species Transmission of PERV Appears Unlikely. *Liver Transplantation* **6**, 115-117.
- Nyberg, S. L., Hibbs, J. R., Hardin, J. A., Germer, J. J. & Persing, D. H. (1999) Transfer of porcine endogenous retrovirus across hollow fiber membranes: significance to a bioartificial liver. *Transplantation* **67**, 1251-1255.
- Ogasawara, M., Haraguchi, S., Cianciolo, G. J. *et al.* (1990) Inhibition of murine cytotoxic T lymphocyte activity by a synthetic retroviral peptide and abrogation of this activity by IL. *Journal of Immunology* **145**, 456-462.
- Olsen, R. G., Mathes, L. E. & Nichols, S. W. *FeLV-related immunosuppression*. In: *Feline leukemia*. Olsen, R. G. (Hrsg.) 149-167. CRC Press, Boca Raton, 1981.
- Onions, D., Cooper, D. K., Alexander, T. J. *et al.* (2000) An approach to the control of disease transmission in pig-to-human xenotransplantation. *Xenotransplantation* **7**, 143-155.
- Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T. *et al.* (2000) Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* **289**, 1188-1190.
- Oostendorp, R. A., Knol, E. F., Verhoeven, A. J. & Scheper, R. J. (1992a) An immunosuppressive retrovirus-derived hexapeptide interferes with intracellular signaling in monocytes and granulocytes through N-formylpeptide receptors. *Journal of Immunology* **149**, 1010-1015.
- Oostendorp, R. A., Schaaper, W. M., Post, J., Meloen, R. H. & Scheper, R. J. (1992b) Synthetic hexapeptides derived from the transmembrane envelope proteins of retroviruses suppress N-formylpeptide-induced monocyte polarization. *Journal of Leukocyte Biology* **51**, 282-288.
- Oostendorp, R. A., Meijer, C. J. & Scheper, R. J. (1993) Immunosuppression by retroviral-envelope-related proteins, and their role in non-retroviral human disease. *Critical Reviews in Oncology-Hematology* **14**, 189-206.
- Opstelten, D. J., Wallin, M. & Garoff, H. (1998) Moloney murine leukemia virus envelope protein subunits, gp70 and Pr15E, form a stable disulfide-linked complex. *Journal of Virology* **72**, 6537-6545.
- Orosz, C. G., Zinn, N. E., Olsen, R. G. & Mathes, L. E. (1985) Retrovirus-mediated immunosuppression. I. FeLV-UV and specific FeLV proteins alter T lymphocyte behavior by inducing hyporesponsiveness to lymphokines. *Journal of Immunology* **134**, 3396-3403.

- Pahwa, S., Pahwa, R., Saxinger, C., Gallo, R. C. & Good, R. A. (1985) Influence of the human T-lymphotropic virus/lymphadenopathy-associated virus on functions of human lymphocytes: evidence for immunosuppressive effects and polyclonal B-cell activation by banded viral preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 8198-8202.
- Pancino, G., Camoin, L. & Sonigo, P. (1995) Structural analysis of the principal immunodominant domain of the feline immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein. *Journal of Virology* **69**, 2110-2118.
- Panicali, D., Grzelecki, A. & Huang, C. (1986) Vaccinia virus vectors utilizing the beta-galactosidase assay for rapid selection of recombinant viruses and measurement of gene expression. *Gene* **47**, 193-199.
- Pantaleo, G., Graziosi, C. & Fauci, A. S. (1993) The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *New England Journal of Medicine* **328**, 327-335.
- Paradis, K., Langford, G., Long, Z. *et al.* (1999) Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. *Science* **285**, 1236-1241.
- Patience, C., Simpson, G. R., Colletta, A. A. *et al.* (1996) Human endogenous retrovirus expression and reverse transcriptase activity in the T47D mammary carcinoma cell line. *Journal of Virology* **70**, 2654-2657.
- Patience, C., Takeuchi, Y. & Weiss, R. A. (1997) Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nature Medicine* **3**, 282-286.
- Patience, C., Patton, G. S., Takeuchi, Y. *et al.* (1998) No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys. *Lancet* **352**, 699-701.
- Patience, C., Switzer, W. M., Takeuchi, Y. *et al.* (2001) Multiple Groups of Novel Retrovirus Genomes in Pigs and Related Species. *Journal of Virology* **75**, 2771-2775.
- Pelegri, C., Rodriguez-Palmero, M., Morante, M. P. *et al.* (1995) Comparison of four lymphocyte isolation methods applied to rodent T cell subpopulations and B cells. *Journal of Immunological Methods* **187**, 265-271.
- Phillips, S. M., Gleichmann, H., Hirsch, M. S. *et al.* (1975) Cellular immunity in the mouse. IV. Altered thymic-dependent lymphocyte reactivity in the chronic graft vs host reaction and leukemia virus activation. *Cellular Immunology* **15**, 152-168.
- Pinter, A., Honnen, W. J., Tilley, S. A. *et al.* (1989) Oligomeric structure of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology* **63**, 2674-2679.
- Pinter, A., Kopelman, R., Li, Z., Kayman, S. C. & Sanders, D. A. (1997) Localization of the labile disulfide bond between SU and TM of the murine leukemia virus envelope protein complex to a highly conserved CWLC motif in SU that resembles the active-site sequence of thiol-disulfide exchange enzymes. *Journal of Virology* **71**, 8073-8077.
- Platt, J. L. (1998) New directions for organ transplantation. *Nature* **392**, 11-17.
- Platt, J. L., Lin, S. S. & McGregor, C. G. (1998) Acute vascular rejection. *Xenotransplantation* **5**, 169-175.

- Platt, J. L. & Saadi, S. (1999) The role of complement in transplantation. *Molecular Immunology* **36**, 965-971.
- Polejaeva, I. A., Chen, S. H., Vaught, T. D. *et al.* (2000) Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* **407**, 86-90.
- Pruitt, S. K., Baldwin, W. M. d., Marsh, H. C., Jr. *et al.* (1991) The effect of soluble complement receptor type 1 on hyperacute xenograft rejection. *Transplantation* **52**, 868-873.
- Qureshi, N. M., Coy, D. H., Garry, R. F. & Henderson, L. A. (1990) Characterization of a putative cellular receptor for HIV-1 transmembrane glycoprotein using synthetic peptides. *Aids* **4**, 553-558.
- Ragheb, J. A. & Anderson, W. F. (1994) Uncoupled expression of Moloney murine leukemia virus envelope polypeptides SU and TM: a functional analysis of the role of TM domains in viral entry. *Journal of Virology* **68**, 3207-3219.
- Ramirez, P., Chavez, R., Majado, M. *et al.* (2000) The porcine liver supports metabolic homeostasis in the nonhuman primate: experimental study in a model of orthotopic liver transplantation from h-DAF transgenic pig to baboon. *Transplantation Proceedings* **32**, 1112-1113.
- Ramsdale, E. E., Kingsman, S. M. & Kingsman, A. J. (1996) The "putative" leucine zipper region of murine leukemia virus transmembrane protein (P15e) is essential for viral infectivity. *Virology* **220**, 100-108.
- Reemtsma, K. (1966) Renal heterotransplantation. *Advances in Surgery* **2**, 285-293.
- Reemtsma, K. (1969) Renal heterotransplantation from nonhuman primates to man. *Annals of the New York Academy of Sciences* **162**, 412-418.
- Rein, A., Mirro, J., Haynes, J. G., Ernst, S. M. & Nagashima, K. (1994) Function of the cytoplasmic domain of a retroviral transmembrane protein: p15E-p2E cleavage activates the membrane fusion capability of the murine leukemia virus Env protein. *Journal of Virology* **68**, 1773-1781.
- Ritter, L. S., Copeland, J. G. & McDonagh, P. F. (1998) Fucoidin reduces coronary microvascular leukocyte accumulation early in reperfusion. *Annals of Thoracic Surgery* **66**, 2063-2071.
- Rogel-Gaillard, C., Bourgeaux, N., Billault, A., Vaiman, M. & Chardon, P. (1999) Construction of a swine BAC library: application to the characterization and mapping of porcine type C endoviral elements. *Cytogenetics and Cell Genetics* **85**, 205-211.
- Rother, R. P., Fodor, W. L., Springhorn, J. P. *et al.* (1995) A novel mechanism of retrovirus inactivation in human serum mediated by anti-alpha-galactosyl natural antibody. *Journal of Experimental Medicine* **182**, 1345-1355.
- Ruegg, C. L., Monell, C. R. & Strand, M. (1989a) Inhibition of lymphoproliferation by a synthetic peptide with sequence identity to gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology* **63**, 3257-3260.
- Ruegg, C. L., Monell, C. R. & Strand, M. (1989b) Identification, using synthetic peptides, of the minimum amino acid sequence from the retroviral transmembrane protein p15E required for inhibition of lymphoproliferation and its similarity to gp21 of human T-lymphotropic virus types I and II. *Journal of Virology* **63**, 3250-3256.

- Ruegg, C. L., Clements, J. E. & Strand, M. (1990) Inhibition of lymphoproliferation and protein kinase C by synthetic peptides with sequence identity to the transmembrane and Q proteins of visna virus. *Journal of Virology* **64**, 2175-2180.
- Ruegg, C. L. & Strand, M. (1990a) Identification of a decapeptide region of human interferon-alpha with antiproliferative activity and homology to an immunosuppressive sequence of the retroviral transmembrane protein P15E. *Journal of Interferon Research* **10**, 621-626.
- Ruegg, C. L. & Strand, M. (1990b) Inhibition of protein kinase C and anti-CD3-induced Ca²⁺ influx in Jurkat T cells by a synthetic peptide with sequence identity to HIV-1 gp41. *Journal of Immunology* **144**, 3928-3935.
- Ruegg, C. L. & Strand, M. (1991) A synthetic peptide with sequence identity to the transmembrane protein GP41 of HIV-1 inhibits distinct lymphocyte activation pathways dependent on protein kinase C and intracellular calcium influx. *Cellular Immunology* **137**, 1-13.
- Ryder, S. J., Hawkins, S. A., Dawson, M. & Wells, G. A. (2000) The neuropathology of experimental bovine spongiform encephalopathy in the pig. *Journal of Comparative Pathology* **122**, 131-143.
- Sachs, D. H. *MHC-homozygous miniature swine*. In: *Swine as models in biomedical research*. Swindle, M. M., Moody, D. C. & Phillips, L. D. (Hrsg.) 3-15. Iowa State University Press, Ames, 1992.
- Sachs, D. H., Sykes, M., Greenstein, J. L. & Cosimi, A. B. (1995) Tolerance and xenograft survival. *Nature Medicine* **1**, 969.
- Sadtler, S. Immunsuppressive Peptide endogener und exogener Retroviren - Wirkungsmechanismus und Bindungsproteine (*Diplomarbeit, Fachbereich Biochemie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main*), Frankfurt/Main, 1997.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- Sandri, M., Rizzi, C., Catani, C. & Carraro, U. (1993) Selective removal of free dodecyl sulfate from 2-mercaptoethanol-SDS-solubilized proteins before KDS-protein precipitation. *Analytical Biochemistry* **213**, 34-39.
- Sayre, K. R., Dodd, R. Y., Tegtmeyer, G. *et al.* (1996) False-positive human immunodeficiency virus type 1 western blot tests in noninfected blood donors. *Transfusion* **36**, 45-52.
- Schägger, H. & Von Jagow, G. (1987) Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* **166**, 368-379.
- Schlitt, H. J., Brunkhorst, R., Haverich, A. & Raab, R. (1999) Attitude of patients toward transplantation of xenogeneic organs. *Langenbecks Arch Surg* **384**, 384-391.
- Schmidt, D. M., Sidhu, N. K., Cianciolo, G. J. & Snyderman, R. (1987) Recombinant hydrophilic region of murine retroviral protein p15E inhibits stimulated T-lymphocyte proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 7290-7294.

- Schmoeckel, M., Bhatti, F. N., Zaidi, A. *et al.* (1999) Splenectomy improves survival of HDAF transgenic pig kidneys in primates. *Transplantation Proceedings* **31**, 961.
- Schwendemann, J. Porzine endogene Retroviren (PERVs): Wirtsspektrum und biologische Eigenschaften (*Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg*), Heidelberg, 2000.
- Seibold, E., Wilbert, O. M., Kurth, R. & Denner, J. (2001) Homology between the Immunosuppressive Domain of the Transmembrane Glycoprotein gp41 of HIV-1 and the Receptor-binding Domain of Class I Interferons. *Journal of Virology*, (eingereicht).
- Shih, A., Misra, R. & Rush, M. G. (1989) Detection of multiple, novel reverse transcriptase coding sequences in human nucleic acids: relation to primate retroviruses. *Journal of Virology* **63**, 64-75.
- Shugars, D. C., Wild, C. T., Greenwell, T. K. & Matthews, T. J. (1996) Biophysical characterization of recombinant proteins expressing the leucine zipper-like domain of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41. *Journal of Virology* **70**, 2982-2991.
- Siebers, U., Horcher, A., Bretzel, R. G., Federlin, K. & Zekorn, T. (1997) Alginate-based microcapsules for immunoprotected islet transplantation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **831**, 304-312.
- Smith, C. M. (1997) Patient selection, evaluation, and preoperative management for lung transplant candidates. *Clinics in Chest Medicine* **18**, 183-197.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T. *et al.* (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**, 76-85.
- Specke, V., Tacke, S. J., Boller, K., Schwendemann, J. & Denner, J. (2001) Porcine endogenous retroviruses (PERVs): In vitro host range and animal models. *Journal of General Virology* **82**, 837-844.
- Speth, C., Prohaszka, Z., Mair, M. *et al.* (1999) A 60 kD heat-shock protein-like molecule interacts with the HIV transmembrane glycoprotein gp41. *Molecular Immunology* **36**, 619-628.
- Starzl, T. E., Fung, J., Tzakis, A. *et al.* (1993) Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet* **341**, 65-71.
- Stephan, O., Schwendemann, J., Specke, V. *et al.* (2001) Porcine endogenous retroviruses (PERVs): Generation of specific antibodies, development of an immunoperoxidase assay (IPA) and inhibition by AZT. *Xenotransplantation*, (in Druck).
- Stoye, J. (1998) No clear answers on safety of pigs as tissue donor source. *Lancet* **352**, 666-667.
- Swanstrom, R. & Wills, J. W. *Synthesis, Assembly, and Processing of Viral Proteins*. In: *Retroviruses*. Coffin, J. M., Hughes, S. H. & Varmus, H. E. (Hrsg.) 263-334. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1997.
- Swindle, M. M. (1998) Defining appropriate health status and management programs for specific-pathogen-free swine for xenotransplantation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **862**, 111-120.

- Switzer, W. M., Shanmugam, V., Chapman, L. & Heneine, W. (1999) Polymerase chain reaction assays for the diagnosis of infection with the porcine endogenous retrovirus and the detection of pig cells in human and nonhuman recipients of pig xenografts. *Transplantation* **68**, 183-188.
- Takeuchi, Y., Patience, C., Magre, S. *et al.* (1998) Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus. *Journal of Virology* **72**, 9986-9991.
- Takeuchi, Y. (2000) Risk of zoonosis in xenotransplantation. *Transplantation Proceedings* **32**, 2698-2700.
- Thomas, A., Gray, K. D. & Roth, M. J. (1997) Analysis of mutations within the cytoplasmic domain of the Moloney murine leukemia virus transmembrane protein. *Virology* **227**, 305-313.
- Todaro, G. J., Benveniste, R. E., Lieber, M. M. & Sherr, C. J. (1974) Characterization of a type C virus released from the porcine cell line PK(15). *Virology* **58**, 65-74.
- Tönjes, R. R., Löwer, R., Boller, K. *et al.* (1996) HERV-K: the biologically most active human endogenous retrovirus family. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* **13 Suppl 1**, S261-267.
- Tönjes, R. R. (1999) Xenogene porcine endogene Retroviren: Genanalyse und Replikationsverhalten. *Transplantationsmedizin* **11**, 208-216.
- Transplantationsgesetz (1997) Gesetz über die Spende, Entnahme und Übertragung von Organen. *Bundesgesundheitsblatt*, 2631.
- UKXIRA. (United Kingdom Xenotransplantation Interim Regulatory Authority, 1999) Draft Guidance Notes on Biosecurity Considerations in Relation to Xenotransplantation.
- Ulrichs, K., Hamelmann, W., Buhler, C. *et al.* (1999) Transplantation of porcine Langerhans islets for therapy of type I diabetes. The way to clinical application. *Zentralblatt für Chirurgie* **124**, 628-635.
- van der Laan, L. J., Lockey, C., Griffeth, B. C. *et al.* (2000) Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* **407**, 90-94.
- Van Doornum, G. J., Buimer, M., Gobbers, E., Bindels, P. J. & Coutinho, R. A. (1998) Evaluation of an expanded two-ELISA approach for confirmation of reactive serum samples in an HIV-screening programme for pregnant women. *Journal of Medical Virology* **54**, 285-290.
- Vial, C. M., Ostlie, D. J., Bhatti, F. N. *et al.* (2000) Life supporting function for over one month of a transgenic porcine heart in a baboon. *Journal of Heart and Lung Transplantation* **19**, 224-229.
- Viveros, M., Dickey, C., Cotropia, J. P. *et al.* (2000) Characterization of a novel human immunodeficiency virus type 1 neutralizable epitope within the immunodominant region of gp41. *Virology* **270**, 135-145.
- Vogel, C. W., Bredehorst, R., Fritzing, D. C. *et al.* (1996) Structure and function of cobra venom factor, the complement-activating protein in cobra venom. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **391**, 97-114.
- Vogt, V. M. *Retroviral Virions and Genomes*. In: *Retroviruses*. Coffin, J. M., Hughes, S. H. & Varmus, H. E. (Hrsg.) 27-69. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1997.

- Wang, H., Nishanian, P. & Fahey, J. L. (1995) Characterization of immune suppression by a synthetic HIV gp41 peptide. *Cellular Immunology* **161**, 236-243.
- Watanabe, F. D., Mullan, C. J., Hewitt, W. R. *et al.* (1997) Clinical experience with a bioartificial liver in the treatment of severe liver failure. A phase I clinical trial. *Annals of Surgery* **225**, 484-491.
- Webster, R. G. (1997) Influenza virus: transmission between species and relevance to emergence of the next human pandemic. *Archives of Virology* **13** (Suppl.), 105-113
- Weiss, R. A. & Taylor, C. S. (1995) Retrovirus receptors. *Cell* **82**, 531-533.
- Weiss, R. A. (1998a) Transgenic pigs and virus adaptation. *Nature* **391**, 327-328.
- Weiss, R. A. (1998b) Retroviral zoonoses. *Nature Medicine* **4**, 391-392.
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1997) Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**, 426-430.
- White, S. A. & Nicholson, M. L. (1999) Xenotransplantation. *British Journal of Surgery* **86**, 1499-1514.
- WHO. (World Health Organization, 1998) Xenotransplantation: Guidance of infectious disease prevention and management. *WHO/EMC/ZOO*, 98.91.
- Wild, C., Oas, T., McDanal, C., Bolognesi, D. & Matthews, T. (1992) A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 10537-10541.
- Wild, C., Dubay, J. W., Greenwell, T. *et al.* (1994a) Propensity for a leucine zipper-like domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 to form oligomers correlates with a role in virus-induced fusion rather than assembly of the glycoprotein complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 12676-12680.
- Wild, C. T., Shugars, D. C., Greenwell, T. K., McDanal, C. B. & Matthews, T. J. (1994b) Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 9770-9774.
- Williams, N. (1997) Pig-human transplants barred for now. *Science* **275**, 473.
- Wilson, C. A., Wong, S., Muller, J. *et al.* (1998) Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *Journal of Virology* **72**, 3082-3087.
- Wilson, C. A., Wong, S., VanBrocklin, M. & Federspiel, M. J. (2000) Extended analysis of the in vitro tropism of porcine endogenous retrovirus. *Journal of Virology* **74**, 49-56.
- Woods, W. A., Papas, T. S., Hirumi, H. & Chirigos, M. A. (1973) Antigenic and biochemical characterization of the C-type particle of the stable porcine kidney cell line PK-15. *Journal of Virology* **12**, 1184-1186.
- Yamada, K., Sachs, D. H. & DerSimonian, H. (1995) Human anti-porcine xenogeneic T cell response. Evidence for allelic specificity of mixed leukocyte reaction and for both direct and indirect pathways of recognition. *Journal of Immunology* **155**, 5249-5256.

- Yang, X., Farzan, M., Wyatt, R. & Sodroski, J. (2000) Characterization of stable, soluble trimers containing complete ectodomains of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *Journal of Virology* **74**, 5716-5725.
- Zhao, Y., Zhu, L., Benedict, C. A. *et al.* (1998) Functional domains in the retroviral transmembrane protein. *Journal of Virology* **72**, 5392-5398.
- Zhao, Y., Rodriguez-Barbosa, J. I., Swenson, K. *et al.* (2000) The induction of specific pig skin graft tolerance by grafting with neonatal pig thymus in thymectomized mice. *Transplantation* **69**, 1447-1451.
- Zhu, N. L., Cannon, P. M., Chen, D. & Anderson, W. F. (1998) Mutational analysis of the fusion peptide of Moloney murine leukemia virus transmembrane protein p15E. *Journal of Virology* **72**, 1632-1639.

IX. DANKSAGUNG

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. Reinhard Kurth für die Betreuung dieser Arbeit und der Überlassung des Arbeitsplatzes im Paul-Ehrlich-Institut danken, ebenso seinem Nachfolger als Leiter des Instituts, Herr PD Dr. Johannes Löwer. Für die Übernahme der universitären Betreuung und des Koreferates danke ich Herrn Prof. Dr. Bernd Ludwig ebenfalls sehr herzlich. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Joachim Denner, der mich bei der Gestaltung der Forschungsarbeiten unterstützte, mir als Fachgebietsleiter jederzeit mit seinem fachlichen Rat und organisatorischer Hilfe zur Seite stand, und mich auch in schwierigeren Situationen immer wieder motivieren konnte. Auch dem Leiter des AIDS-Forschungszentrum, Herrn Dr. Stephen Norley, möchte ich für seine Hilfsbereitschaft danken. Den vielen Mitarbeitern des Instituts, die mir durch ihre vielfältigen Hilfen die Arbeit sehr erleichterten, danke ich ebenso.

Nicht vergessen möchte ich, auch den technischen Assistenten, insbesondere René Eilenstein und Claudia Jourdan, für die ständige Hilfsbereitschaft und freundschaftliche Zusammenarbeit sowie Frau Olschewski und Frau Lust für die reibungslose Unterstützung der täglichen Laborarbeit zu danken. Allen Praktikanten, Auszubildenden und Diplomanten, insbesondere Angelika Berg, danke ich für die Mithilfe und Freude an der Arbeit und wünsche allen viel Glück in der Zukunft und für den beruflichen Werdegang.

Allen Mitarbeitern des Fachgebiets 6/4 und des Referats A/5 gilt mein ganz persönlicher Dank für die gute Zusammenarbeit und die tolle Atmosphäre. Für die angenehmen (dienstlichen wie privaten) freundschaftlichen Verbindungen danke ich besonders Volker Specke, Oliver „Foxy“ Hohn, Karin Vollhardt, Silke Holzammer, Julia Seidl, Erik Seibold, Oliver Stephan, H.-J. Ulrich, Nicky & Steve Norley, Dörte Radke und dem „Casa del Sol“.

Meiner Freundin Chris danke ich für die vielen schönen Stunden in der immer knapp bemessenen Freizeit.

Meinem Vater und meinen beiden Brüdern danke ich ganz besonders herzlich für die stete Unterstützung während der vielen Durststrecken in Studium und Promotion.

PUBLIKATIONSLISTE

- Tacke, S. J., Kurth, R. & Denner, J. (2000). Porcine endogenous retroviruses inhibit human immune cell function: risk for xenotransplantation? *Virology* **268**, 87-93.
- Tacke, S. J., Specke, V., Stephan, O., Seibold, E., Bodusch, K. & Denner, J. (2000). Porcine endogenous retroviruses: diagnostic assays and evidence for immunosuppressive properties. *Transplantation Proceedings* **32**, 1166.
- Tacke S. J., Bodusch K., Berg A. & Denner J. (2001) Sensitive and specific detection methods for porcine endogenous retroviruses applicable to experimental and clinical xenotransplantation. *Xenotransplantation* (in Druck)
- Tacke S. J., Specke V., Eilenstein R. & Denner J. Variations in the expression of porcine endogenous retroviruses from blood cells in different pig strains. (in Vorbereitung)
- Martin, U., Tacke, S. J., Simon, A. R., Schröder, C., Wiebe, K., Haverich, A., Denner, J. & Steinhoff, G. (2001). Absence of PERV specific immune response in baboons after transplantation of porcine cells or organs. *Xenotransplantation*, (eingereicht).
- Specke, V., Tacke, S. J., Boller, K., Schwendemann, J. & Denner, J. (2001). Porcine endogenous retroviruses (PERVs): In vitro host range and animal models. *Journal of General Virology* **82**, 837-844.
- Stephan, O., Schwendemann, J., Specke, V., Tacke, S. J., Boller, K. & Denner, J. (2001). Porcine endogenous retroviruses (PERVs): Generation of specific antibodies, development of an immunoperoxidase assay (IPA) and inhibition by AZT. *Xenotransplantation* (in Druck).

LEBENS LAUF

Stefan J. Tacke

Dieselstraße 1

63225 Langen

Tel. (06103) 923472

e-mail: Stefan.Tacke@gmx.de

- Geburtsdatum/-ort:** 30. September 1971 in Münster/Westfalen
- Familienstand:** ledig
- Staatsangehörigkeit:** deutsch
-
- Promotion:** seit Januar 1998 Dissertation am Paul-Ehrlich-Institut, Langen
*Charakterisierung, Wirtsbereich und Diagnostik
Porciner Endogener Retroviren (PERV) im Rahmen
der Xenotransplantation*
- Studium:** 1992 – 1997 Biochemie, Universität Bayreuth
30. Dezember 1997 Abschluß: Diplom
Mai – Dezember 1997 Diplomarbeit am Lehrstuhl Biochemie
Prof. Dr. F.-X. Schmid
Stabilität und Faltung der Dihydrofolatreduktase
- Zivildienst:** 1991 – 1992 Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Medizin. Einrichtungen, Klinik für Anästhesiologie
- Schulbildung:** 1982 – 1991 Wilhelm-Hittorf-Gymnasium Münster/Westfalen
12. Mai 1991 Abschluß: Abitur
1978 – 1982 Ludgerus-Grundschule, Münster/Westfalen