

5 DISKUSSION

Die aktuell in Deutschland geführte Diskussion über eine Neuregelung der Organspende nach dem Vorbild anderer europäischer Länder verdeutlicht die Brisanz des hier zu Lande herrschenden Organmangels.

Jahr für Jahr sterben hunderte Patienten, die durch eine Organtransplantation vermutlich hätten gerettet werden können, für die jedoch nicht rechtzeitig ein Organ zur Verfügung stand. Organmangel stellt zwar ein chronisches Problem der Transplantationsmedizin in allen Ländern dar, in Deutschland ist das Problem jedoch besonders ausgeprägt. Vergleiche zeigen, dass in Deutschland bezogen auf die Zahl der Einwohner weniger Organspenden durchgeführt werden als in anderen Ländern (Stellungnahme zur Organspende des Nationalen Ethikrats, April 2007).

Der Nationale Ethikrat stellte im April diesen Jahres daher die Frage in den Raum, ob es ethisch und verfassungsrechtlich vertretbar sei, die geltende gesetzliche Regelung hinsichtlich der erforderlichen ausdrücklich erklärten Zustimmung der Spender bzw. ihrer Angehörigen zu ändern, um den Organmangel zu lindern. Hierbei wird ein Stufenmodell vorgeschlagen, das Elemente einer Erklärungsregelung mit Elementen einer Widerspruchsregelung verbindet. So liegt es in der Verantwortung des Staats über das häufig tabuisierte Thema Organspende zu informieren und aufzuklären und in der Verantwortung jedes einzelnen sich mit Fragen der Organspende und dem eigenen Tod zu beschäftigen und zu einer verantwortlichen und frühzeitigen eigenen Urteilsbildung zu kommen. Der Wissenschaft obliegt es, durch Verbesserung der Techniken und vor allem durch die Findung geeigneter Alternativen, Leiden zu lindern und Leben zu retten.

Derzeit stehen drei alternative Ansätze im Mittelpunkt der Forschung: die Entwicklung künstlicher Organe, das mit therapeutischem Klonen verbundene *tissue engineering* sowie die Xenotransplantation.

Mit den derzeit verfügbaren künstlichen Organen lässt sich das Leben vieler Patienten zwar verlängern, bis ein Spenderorgan verfügbar wird, doch sind sie noch weit davon entfernt, ein permanenter Ersatz zu werden. Abgesehen von der Schwierigkeit, Organe zu entwickeln, die implantierbar sind, besteht bei der Verwendung künstlicher Organe das Problem, dass sie imstande sein müssen, die Funktionen menschlicher Organe in hinreichender Weise zu übernehmen. Im Falle physiologisch simpler Organe wie des Herzens ist dies eine zu bewältigende, im Falle physiologisch komplexer Organe wie der Leber dagegen eine äußerst schwierige Aufgabe.

Auch das *tissue engineering* auf Basis embryonaler Stammzellen steckt noch in den Kinderschuhen. Bisher ist es gelungen, u.a. Vorläuferzellen von Herzmuskelzellen (HE et al., 2003, MUMMERY et al., 2003), Leberzellen (LAVON et al., 2004, CAI et al., 2007) und Pankreaszellen (HANSSON et al., 2004, SHIM et al., 2007) aus humanen embryonalen Stammzellen zu generieren. Die bisher unternommenen Versuche sind jedoch eher der Grundlagenforschung zuzuschreiben. Hinzu kommt die Regelung durch das 1991 in Kraft getretene Embryonenschutzgesetz, das in Deutschland das Arbeiten mit humanen embryonalen Stammzellen, also die Erzeugung eines Embryos, „zu einem anderen Zweck als der Herbeiführung einer Schwangerschaft“ verbietet. Zudem untersagt es die Verwendung eines Embryos „zu einem nicht seiner Erhaltung dienenden Zweck“ (Embryonenschutzgesetz).

Eine vielversprechende Alternative zur Überbrückung des Allotransplantatmangels ist die Xenotransplantation, die zumindest hinsichtlich der Transplantation von Inselzellen, in nahe Zukunft rückt. Der bedeutendste Vorteil der Xenotransplantation ist der, dass sich mit ihrer Hilfe der ständig wachsende Bedarf an transplantierbaren Organen decken ließe. Des Weiteren ist die ständige Verfügbarkeit von Organen, die es zudem erlauben würde, den Patienten immunologisch gezielt auf das Transplantat vorzubereiten, von großer Bedeutung. Zudem würde die Xenotransplantation viele Lebendspenden überflüssig machen. Die Xenotransplantation porziner Zellen, Gewebe oder Organe birgt jedoch das Risiko der Transmission von Mikroorganismen auf den humanen Rezipienten (DENNER, 1998, ONIONS UND WITT, 2000, STOYE et al., 1998, WEISS et al., 1999). Hierbei wird den porzinen endogenen Retroviren eine besondere Bedeutung beigemessen, da sie sich nicht wie die meisten anderen Pathogene durch Zucht und Haltung unter SPF-Bedingungen eliminiert werden können (DENNER, 1998, MANG et al., 2001). Für die Minimierung des Übertragungsrisikos der PERVs ist die Auswahl geeigneter Schweine sowie die Entwicklung von Strategien zur Prävention der Virusübertragung von fundamentaler Bedeutung. Insbesondere nachdem gezeigt werden konnte, dass PERVs in der Lage sind, humane Zellen *in vitro* zu infizieren (PATIENCE et al., 1997).

5.1 Evaluierung des PERV-Übertragungsrisikos bei der Xenotransplantation

5.1.1 PERV-C-Provirusintegration in Schweinen verschiedener Rassen sowie transgenen und multitransgenen Schweinen

Zur Einschätzung des PERV-C-Vorkommens in den Schweinebeständen der Kooperationspartner des DFG-Transregio-Projekts „Xenotransplantation“ Prof. Niemann (Institut für Tierzucht, Mariensee) und Prof. Wolf (Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, München) wurden 184 Schweine verschiedener Rassen und Kreuzungen sowie transgene, für die Xenotransplantation relevante Schweine hinsichtlich ihres PERV-Integrationsstatus untersucht. Ziel dieser Untersuchungen war die Identifizierung PERV-C-negativer Tiere mit der Empfehlung, diese Tiere für die weitere Zucht zu verwenden. Wie bereits beschrieben, besteht aufgrund der hohen Sequenzhomologien zwischen den PERV-Subtypen die Möglichkeit einer Rekombination zwischen PERV-A und PERV-C, die mit einer Adaption an humane Zellen und einer gesteigerten Virusreplikation einhergehen kann (1.2.6, WILSON et al., 1998, WILSON et al., 2000, DENNER et al., 2003a). Als ein weiteres Problem muss die mögliche Rekombination oder die Pseudotypisierung von PERV mit humanen endogenen Retroviren (HERV) angesehen werden. So zeigten Yang und Kollegen, dass PERV-C durch Pseudotypisierung mit dem xenotropen Murinen Leukämie Virus (X-MLV) auf humane Zellen übertragen wurde (YANG et al., 2004). Auch Martina et al. beobachteten, dass der natürliche Tropismus der PERVs durch Pseudotypisierung mit X-MLV erweitert werden kann (MARTINA et al., 2005). Da Hüllproteinsequenzen, die durch die humanen endogenen Retroviren HERV-W (PERRON et al., 2005, CHRISTENSEN et al., 2005), HERV-E (BESSIS et al., 2004) oder HERV-K (FLOCKERZI et al., 2005) kodiert werden, als funktionale Proteine in unterschiedlichen humanen Geweben exprimiert

werden, kann somit eine Pseudotypisierung der PERVs mit diesen Sequenzen im humanen Patienten nach einer Xenotransplantation nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund der großen Sequenzunterschiede der HERV- und PERV-Hüllproteinsequenzen ist eine solche Pseudotypisierung jedoch unwahrscheinlich (BÜSCHER, 2006, SULING et al., 2003).

Die Auswahl PERV-C-negativer Schweine könnte das Risiko solcher Rekombinationen und Pseudotypisierungen minimieren. Die Subtypen PERV-A und -B konnten erwartungsgemäß im Genom aller untersuchten Tiere detektiert werden. Von 63 Tieren, die den Rassen Deutsche Landrasse (DL), Duroc, Duroc/DL und Schwäbisch-Hällisch angehörten, wurde nur ein Tier der Deutschen Landrasse PERV-C-negativ getestet (Tab. 4.1). Unter den 103 transgenen Tieren fanden sich nur vier PERV-C-negativ getestete Tiere, die hinsichtlich ihres genetischen Hintergrunds bis zu 50% DL enthielten (Tab. 4.2).

Während PERV-A und PERV-B im Genom aller bisher untersuchten Schweinearten präsent sind, trifft dies nicht für den Subtyp PERV-C zu. Etwa 50 provirale PERV-Kopien wurden bisher im Schweinegenom mittels Southern-Blot-Analyse detektiert (PATIENCE et al., 1997). PERV-A-Proviren haben daran einen Anteil von 10 bis 23 Kopien und PERV-B-Proviren sind mit 7 bis 12 Kopien (LE TISSIER et al., 1997) vertreten. Im Genom der Schweinerasse Minipig wurden 8 bis 15 Kopien von PERV-C-Proviren beschrieben. Sowohl die Zahl der Kopien als auch die Integrationsorte von PERV-C variieren jedoch beträchtlich zwischen unterschiedlichen Schweine-Stämmen (AKIYOSHI et al., 1998). PCR-Analysen unter Verwendung Subtyp-spezifischer Primer zeigten das Vorhandensein von *env*-Sequenzen der Subtypen A und B in allen Tieren einer französischen „Large White“ Schweineherde, jedoch die Abwesenheit des PERV-Subtyps C in einigen Tieren dieser Herde (BOSCH et al., 2000). Des Weiteren konnten PERV-C-negative Tiere der Rassen hDAF-„Large White“ (HERRING et al., 2001b), Meishan, Middle White, Berkshire und Mexican Hairless (JIN et al., 2000), sowie Chinese Bana Minipig (LI et al., 2006b) und Shaza Ling Pigs (XING et al., 2006) identifiziert werden. Schweine der Deutschen Landrasse, die einen großen Teil der Bestände der Kooperationspartner des DFG-Transregioprojekts „Xenotransplantation“ ausmachen, wurden bis zu Beginn dieser Arbeit noch nicht hinsichtlich des PERV-C-Status untersucht. Weiterhin ist weder die Zahl der Kopien noch die Verteilung auf die Chromosomen sowie die Integrationsorte von PERV-C in dieser Rasse bekannt.

Ausgehend von der Annahme, dass im Genom der Deutschen Landrasse ähnlich viele PERV-C-Proviren verankert sind, wie im Genom des Minipigs (8 bis 15, AKIYOSHI et al., 1998), sind die geringen Prozentsätze PERV-C-negativ getesteter Tiere (5,26% (1/19) und 3,88% (4/103)) ungewöhnlich. Das Alter von PERV-C wird auf 1,5 bis 3,5 Millionen Jahre geschätzt (NIEBERT et al., 2005). Bei diesem Alter ist eine Fixierung im Genom der Schweine sehr wahrscheinlich. Zumindest eines der Elternteile müsste heterozygot sein und PERV-C-negative Allele besitzen. Stammbaumanalysen, weitere Kreuzungen mit diesen Tieren sowie Southern-Blot-Analysen könnten hierbei zur Bestimmung der PERV-C-Kopienzahl und somit zum weiteren Verständnis beitragen. Bei weiteren Kreuzungen dieser Tiere müssten zur Bestätigung der Befunde alle Folgegenerationen ebenfalls PERV-C negativ sein.

Zur Vermeidung falsch negativer Resultate wurde die DNA der negativ getesteten Tiere mit Hilfe eines weiteren *envC*-Primersets sowie einer *envC-real-time* PCR analysiert und die Abwesenheit von PERV-C bestätigt. Die Nachweisgrenze der *envC-real-time* PCR lag bei ca. 100 *envC*-Amplifikaten. DNA aus ca. 15 Zellen würde somit ausreichen um die mit 8 bis 15 Kopien geschätzte Anwesenheit von PERV-C zu detektieren. 1 pg doppelsträngige DNA enthält $0,978 \times 10^9$ bp (VINOGRADOV et al., 2005). Bei einer Genomgröße des Schweins von 3×10^9 bp lässt sich für einen Chromosomensatz des Schweins eine Masse von 3,07 pg berechnen. Da in die PCR-Ansätze mindestens 50 ng eingesetzt wurden, müsste sich sogar eine einzelne *envC*-Kopie pro Genom nachweisen lassen.

Bei Mutationen in der Primerbindungsstelle der *envC*-Region würden vorhandene PERV-C-Kopien nicht detektiert werden können. Bei einer Zahl von 8 bis 15 PERV-C-Kopien erscheint eine solche Mutation in allen Kopien jedoch unwahrscheinlich. Für zukünftige Versuche, PERV-C-negative Tiere zu identifizieren und einzuordnen, wäre, wie bereits erwähnt eine Ausweitung der Kenntnisse über PERV-C-Kopienzahlen in verschiedenen Rassen notwendig. Mittels *real-time* PCR unter der Verwendung eines Plasmid-Standards sowie durch Southern-Blot-Analysen könnte beispielsweise die Kopienzahl bestimmt werden. Mit Hilfe einer Ligations-vermittelten PCR, ließen sich zudem Integrationsorte und somit die Verteilung auf die Chromosomen bestimmen. An die Fragmente enzymatisch geschnittener chromosomaler DNA werden hierbei *linker*-DNA-Sequenzen, die eine Primerbindestelle enthalten, ligiert. Mit Hilfe eines zu dieser Sequenz komplementären Primers sowie eines zur *envC*-Sequenz komplementären Primers lassen sich *envC*-Sequenzen mit entsprechenden flankierenden Sequenzen amplifizieren, die nach Klonierung in einen geeigneten Vektor sequenziert und mit einer Datenbank abgeglichen werden können. Erst mit diesem Wissen werden Selektion, gezielte Zucht und potentielle Herauskreuzung von PERV-C möglich.

5.1.2 Normalisierung und relative Quantifizierung von PERV-mRNA

Zur Quantifizierung von PERV-mRNA wurde ein *one-step RT real-time PCR-assay* basierend auf dem SUPERSCRIPT™ III PLATINUM® ONE-STEP QRT-PCR KIT (Invitrogen) etabliert, der die Detektion viraler Vollängen-RNA ermöglicht. Die von Invitrogen empfohlenen Konzentrationen von 10 µM für die jeweiligen Primer und die Sonde erwiesen sich als geeignet, da eine Effizienz von nahezu 100% erreicht werden konnte (Abb. 4.1).

Die Quantifizierung von mRNA benötigt zur Normalisierung einen festen Bezug. Aufgrund unterschiedlicher PCR-Bedingungen kann eine mRNA-Quantifizierung nur bedingt über einen Plasmidstandard normalisiert werden. Daher wird häufig die relative Quantifizierung herangezogen. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgens mit der eines, im Idealfall nicht regulierten und in allen Proben gleichermaßen exprimierten, *house keeping* Gens normalisiert (LIVAK UND SCHMITTGEN, 2001).

Die Vorteile der Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der reversen Transkription innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das *house keeping* Gen betreffen.

Zahlreiche Studien haben jedoch ergeben, dass eine Evaluierung des entsprechenden *house keeping* Gens hinsichtlich der stabilen Expression unter den gegebenen Bedingungen unumgänglich ist (BUSTIN 2002, TRICARICO et al. 2002, VANDESOMPELE et al. 2002, STAHLBERG et al. 2004).

Die Anforderung an ein *house keeping* Gen besteht in einer relativ stabilen Expression des Gens in unterschiedlichen Proben unter verschiedenen experimentellen Konditionen (BUSTIN et al., 2000). Da alle Gene, die als *house keeping* Gene in Betracht kommen, wichtige Funktionen in Zellen erfüllen und unterschiedliche Expressionsregulierungen erfahren, ist ein idealer Kandidat, der in jeder Situation unverändert bleibt, nicht verfügbar (BUSTIN et al., 2000, GIULIETTI et al., 2001, BUSTIN et al., 2002). Tatsächlich konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass alle bisher untersuchten Kandidatengene Variationen des Expressionslevels unter verschiedenen Bedingungen zeigen (SACCO et al., 1996, NEUMANN et al., 1997, FOSS et al., 1998, THELLIN et al., 1999, SCHMITTGEN UND ZAKRAJSEK, 2000, HAMALEINEN et al., 2001, VANDESOMPELE et al. 2002, BAS et al., 2004). In einer von Duvigneau et al. veröffentlichten Arbeit wurde die Eignung unterschiedlicher *house keeping* Gene für Cytokinexpressionsstudien in porzinen PBMCs evaluiert (DUVIGNEAU et al., 2005). Die am häufigsten verwendeten *house keeping* Gene in Expressionsstudien immunologisch relevanter Gene im porzinen System sind GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase), Cyclophilin (Peptidylprolyl Isomerase A) und β -Actin (LEDGER et al., 2004), da deren Expressionsniveaus vergleichbar mit denen der Zielgene sind. Das für die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase, ein Enzym des Purinmetabolismus, kodierende Gen HPRT wird als geeignetes Referenzgen für unterschiedliche porzine Gewebe und Zellen des Immunsystems betrachtet, da es reproduzierbar einen ähnlichen Expressionslevel wie immunologisch relevante Gene aufweist (FOSS et al., 1998, LEDGER et al., 2004). Andere Studien zeigen jedoch, dass die Expression von HPRT stärker durch Stimulation mit ConA und LPS beeinflusst wird als die Expression der *house keeping* Gene GAPDH und Cyclophilin (DUVIGNEAU et al., 2005). Zahlreiche Studien für GAPDH in humanen und Nager-Expressionssystemen zeigten dessen Regulation unter verschiedenen experimentellen Bedingungen. Des Weiteren wurde von Pseudogenen für GAPDH (PIECHACZYK et al., 1984) und HPRT (SELLNER UND TURBETT, 1996) in diesen Spezies berichtet. Diese könnten mit der Interpretation der Expressionsergebnisse interferieren. GAPDH wird dennoch als akzeptable interne Referenz für Studien mit porzinen Immunzellen angesehen (VEZINA et al., 1995, FOSS et al., 1998, DUFOUR et al., 1999). Auch Duvigneau et al. befanden GAPDH auf Grund geringer Variationen zwischen verschiedenen Individuen als geeignet (DUVIGNEAU et al., 2005). Weiterhin wurde Cyclophilin (Peptidylprolyl Isomerase A) in den letzten Jahren immer häufiger als *house keeping* Gen zur RNA-Normalisierung verwendet. Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien und Gewebetypen zeigten, dass die mRNA-Level von Cyclophilin im Vergleich zu GAPDH stabiler sind (FEROZE-MERZOUG et al., 2002).

In dieser Arbeit eignete sich keines der beschriebenen *house keeping* Gene (HPRT, GAPDH und Cyclophilin) uneingeschränkt zur Normalisierung, da deren Expressionslevel zum Teil stark von dem der PERV-Expression abwichen, sich die Expressionslevel in verschiedenen Geweben unterschieden und durch Veränderungen der experimentellen

Konditionen ebenfalls veränderten (Tab. 5.1). Der Level der Expression von HPRT war dem der PERV-Expression am ähnlichsten, die Expression in PBMCs wurde jedoch nach Stimulation durch PHA hochreguliert. Die Expressionslevel der Gene GAPDH und Cyclophilin waren in den meisten Fällen weitaus höher als die von PERV. Normalisierungen auf solche *house keeping* Gene führen meist zu Ungenauigkeiten der Ergebnisse und hohen Standardabweichungen. Auch die Expression dieser Gene in PBMCs unterlag einer Hochregulierung durch PHA-Stimulation. Die geringsten Expressionsvariationen zwischen verschiedenen Organen und Individuen konnte für das Gen Cyclophilin ermittelt werden. Die Art der Normalisierung wurde für somit jeden Versuchsansatz abhängig vom Level der PERV-Expression, der Stabilität der Expression der *house keeping* Gene unter den gewählten Bedingungen sowie der Vergleichbarkeit der *house keeping* Genexpression in den entsprechenden Zellen oder Organen gewählt. Bei Expressionsanalysen in PBMCs wurde zumeist die Normalisierung auf gleiche Mengen eingesetzter Gesamt-RNA bevorzugt. In den meisten Fällen konnten durch Normalisierung auf die *house keeping* Gene HPRT, GAPDH und Cyclophilin jedoch tendenziell ähnliche Ergebnisse ermittelt werden.

Tabelle 5.1: Vergleich der *house keeping* Gene HPRT, GAPDH und Cyclophilin

	HPRT	GAPDH	Cyclophilin
Expressionslevel im Vergleich zur PERV-Expression	ähnlich	höher $\Delta CT \cong 4$ bis 6	höher $\Delta CT \cong 6$ bis 9
Einfluss der PHA-Stimulation auf die Expressionslevel in PBMCs	hoch reguliert	hoch reguliert	hoch reguliert
Expressionslevel in unterschiedlichen Organen verschiedener Individuen	Milz: höher Muskel: niedriger	Herz, Milz, Muskel: höher	Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, Muskel: ähnlich
	Herz, Lunge, Leber, Niere: ähnlich	Lunge, Leber, Niere: ähnlich	

5.1.2 Variable PERV-Expression in Schweinen verschiedener Rassen sowie transgenen und multitransgenen Schweinen

Die Expression von PERV-mRNA variiert zwischen verschiedenen Schweinestämmen (TACKE et al., 2000b, TACKE et al., 2003). Zur Einschätzung der PERV-Expression in den Schweinebeständen des DFG-Transregioprojekts „Xenotransplantation“ (Prof. Wolf, Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, München) wurden daher Schweine verschiedener Rassen sowie transgene Schweine verschiedener Kreuzungen hinsichtlich ihrer PERV-Expression untersucht. Ziel dieser Untersuchungen war die Identifizierung und Auswahl von Schweinerassen, die wenig PERV exprimieren, um somit das PERV-Übertragungsrisiko hinsichtlich der Xenotransplantation zu reduzieren.

In den untersuchten Würfen der Rassen Deutsche Landrasse (DL), Duroc, Schwäbisch-Hällisch sowie der Kreuzung Duroc x DL konnte mittels RT *real-time* PCR eine variable PERV-Expression ermittelt werden, die im Vergleich zu den hochexprimierenden Zelllinien PK15 und 293/5° unter 2% bzw. 1% lag (Abb. 4.2, Tab. 4.3). Zwischen den getesteten Schweinerassen bzw. Kreuzungen war kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der PERV-Expression zu beobachten (Tab. 4.3). Unter den getesteten Rassen ist somit keine Rasse hinsichtlich geringer PERV-Expression besonders zu favorisieren.

Auch bei den untersuchten transgenen Tiere der unterschiedlichen Kreuzungen (Tab. 4.3, MP x Du x DL, DE x MP x Du x DL, DE x MP x Du) ließ sich eine variable PERV-Expression innerhalb der Würfe feststellen. Die PERV-Expression in diesen transgenen Tieren ist im Vergleich zu den bereits beschriebenen unveränderten Tieren der Rassen Du, DL, Du x DL und SH leicht erhöht und liegt bezogen auf die PERV-Expression der Zelllinien PK15 und 293/5° unter 7% bzw. 2%. Da jedoch keine nicht-transgenen sowie reinrassigen Vergleichstiere zur Verfügung standen, lässt sich hierzu keine zuverlässige Aussage treffen.

Die Transgenität der Schweine wurde durch Mikroinjektion nackter DNA-Konstrukte in den Vorkern, Injektion lentiviraler Partikel, die das Transgen exprimieren, in den perivitellinen Raum des Embryos oder durch Nukleus-Transfer aus bereits transgenen primären Zellen in eine Spendereizelle erreicht. Die Integration des Transgens in die chromosomale DNA erfolgt hierbei rein zufällig. Da Beeinflussungen der benachbarten Gene durch eine Transgenintegration bereits beschrieben wurden (CLARK et al., 1994), ist daher nicht auszuschließen, dass durch die Integration der für die Xenotransplantation relevanten Gene TRAIL, hDAF, und HLA-E, die Möglichkeit einer Beeinflussung der Expression porciner endogener Retroviren besteht.

Über die PERV-Integrationsorte im porcinen Genom ist wenig bekannt. Mittels FISH identifizierten Lee et al. 39 PERV-Integrationsstellen im Genom von Schweinen der Rasse Westran und ordneten diesen auch Positionen auf den Chromosomen zu (LEE et al., 2002). Ähnliche Studien mit Tieren der Rassen Deutsche Landrasse, Duroc, Deutsches Edelschwein und Minipig wurden bisher noch nicht durchgeführt. Daher lässt sich auch nach Bestimmung des Integrationsortes des Transgens bisher nicht klären, ob die Integration des Transgens, mit davor geschaltetem Promotor, in räumliche Nähe zu PERV-Expressionsorten tritt und somit die PERV-Expression beeinflussen könnte.

5.1.3 Variable PERV-Expression in unterschiedlichen Organen eines Tieres

Wie bereits publiziert, variiert die PERV-Expression nicht nur zwischen verschiedenen Schweinestämmen (TACKE et al., 2000b, TACKE et al., 2003), sondern auch in unterschiedlichen Organen und Geweben der Schweine (AKIYOSHI et al., 1998, CLEMENCEAU et al., 1999). Untersuchungen der Organe Thymus, Lunge, Lymphknoten, Milz, Leber, Niere und Herz eines Miniaturschweins mittels Northern-Blot-Analyse zeigten die höchste PERV-Expression im Thymus und der Lunge (AKIYOSHI et al., 1998). Die höchste PERV-Expression in Organen des Large White Schweins wurden in der Niere und im Thymus detektiert (CLEMENCEAU et al., 1999). Für andere Rassen liegen bisher noch keine Daten hinsichtlich einer variablen PERV-Expression in den Organen vor.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Organe von transgenen Tieren der Deutschen Landrasse (DL) und der Kreuzung DL x Minipig sowie nicht-transgene DL-Tiere hinsichtlich der PERV-Expression untersucht. Bei den transgenen Tieren # 366 (DL), #374 (DL x Minipig) und #375 (DL x Minipig) konnte jeweils in der Lunge die höchste PERV-Expression detektiert werden (Abb. 4.3). Dies korreliert mit den Daten, die bereits für Miniatur Schweine erhoben wurden (AKIYOSHI et al., 1998). Biopsien vom Thymus standen nicht zur Verfügung. Bei den nicht-transgenen DL Tieren wurde in der Milz die höchste PERV-Expression bestimmt (Abb. 4.4). Diese Beobachtungen konnten auch bei

der Untersuchung der PERV-Expression in Melanomen und unverändertem Gewebe von Münchner Miniatur Schweinen Troll gemacht werden (Abb. 4.11).

Basierend auf den bisherigen Daten lässt sich eine Organ- bzw. Gewebe-spezifische PERV-Expression vermuten. Die Zahl der untersuchten Tiere in den bisher durchgeführten Studien (AKIYOSHI et al., 1998: 1 Miniatur Schwein, CLEMENCEAU et al., 1999: 14 Large White Schweine) sowie in der vorliegenden Untersuchung ist jedoch zu klein, um eine signifikante Aussage über Gewebe-spezifische Expressionsmuster treffen zu können. Für unterschiedliche Familien der humanen endogenen Retroviren (HERV) wurden bereits Gewebe-spezifische Expressionsmuster beschrieben (SEIFARTH et al., 2005, PICHON et al., 2006).

Organ-spezifische Unterschiede, welche die höchste PERV-Expression im Thymus (AKIYOSHI et al., 1999) und der Milz zeigen (Abb. 4.3 und 4.9), könnten durch die im Vergleich zu anderen Organen größere Zahl von Lymphozyten und einer damit verbundenen immunologischen Stimulation in diesen Geweben erklärt werden. Des Weiteren wurden in Lymphozyten bereits *de novo* Integrationen von exogenen PERV-A/C Rekombinanten, die nicht in der Keimbahn vorhanden sind (WILSON et al., 1998, BARTOSCH et al., 2004, WOOD et al., 2004, SCOBIE et al., 2004) und höhere Virus-Titer sowie genetische Veränderungen aufweisen (WILSON et al., 2000, DENNER et al., 2003, HARRISON et al., 2004) beschrieben.

Da die untersuchten transgenen Schweine nicht unter SPF-Bedingungen gehalten werden, sind Infektionen der Atemwege nicht auszuschließen. Eine mögliche Ursache für eine erhöhte PERV-Expression in der Lunge könnten daher virale Infektionen darstellen, die in einer Aktivierung der porcinen endogenen Retroviren resultiert. Solche Virus-induzierten Transkriptionsaktivierungen wurden bereits für das humane endogene Retrovirus HERV-W, (NELLAKE et al., 2006, RUPRECHT et al., 2006) sowie für HIV-1 gezeigt (FLORY et al., 2000). So führten beispielsweise Influenza-Infektionen zu erhöhten HERV-W- (NELLAKE et al., 2006) sowie HIV-1-Expressionen (FLORY et al., 2000). Auch für Parasiten, wie *Toxoplasma gondii* wurde bereits ein aktivierender Effekt auf Retroviren wie HIV (GAZZINELLI et al., 1996) und unterschiedliche HERV-Familien (FRANK et al., 2006) gezeigt.

In allen untersuchten Schweinen konnte im Pankreas stets die geringste PERV-Expression nachgewiesen werden (AKIYOSHI et al., 1998, CLEMENCEAU et al., 1999, Abb. 4.3). Inselzellen stellen die favorisierten Zellen für erste klinische Xenotransplantationen dar. Durch die Sicherheitsmaßnahme der Alginat-Verkapselung der Insulin produzierenden Inselzellen des Pankreas, welche die Passage kleiner Moleküle wie Insulin und Glukose erlaubt, nicht jedoch den Austritt porciner endogener Retroviren, wird das Risiko für eine PERV-Übertragung bei der Xenotransplantation zudem vermindert.

5.1.3 Keine PERV-Freisetzung nach Simulation einer Immunantwort porciner Zellen *in vitro*

Bei jeder Transplantation werden zusammen mit dem Organ PBMCs des Spenders übertragen. Verschiedene Untersuchungen zeigten bereits, dass porcine endogene Retroviren von PBMCs und anderen primären Zellen freigesetzt werden (MARTIN et al., 1998a, TACKE et al., 2000b, WILSON et al., 1998) und zumindest *in vitro* in der Lage sind, humane Zellen zu infizieren (MARTIN et al., 2000, SPECKE et al., 2001b). Durch den

Transfer der porzinen PBMCs in den Körper des Rezipienten, und damit in ein artfremdes Milieu, besteht die Möglichkeit einer Aktivierung der PBMCs. Es konnte gezeigt werden, dass primäre humane Endothelzellen, sowie primäre Fibroblasten mit PERV produktiv infizierbar sind (SPECKE et al., 2001b, MARTIN et al., 2000). Beim Durchströmen des porzinen Xenotransplantats könnten porzine PBMCs in den humanen Blutstrom gelangen, somit über den ganzen Körper des Rezipienten verteilt werden und umgebende suzeptible Endothelzellen der humanen Gefäße infizieren.

Zur Evaluierung der möglichen PERV-Freisetzung aus porzinen PBMCs hinsichtlich des Risikos für die Xenotransplantation wurde mit Hilfe des T-Zell-Mitogens Phytohämagglutinin (PHA) eine Antigen-induzierte Aktivierung der PBMCs simuliert. Hierfür wurden PBMCs zahlreicher transgener, Xenotransplantations-relevanter Schweine aus den Beständen von Prof. Wolf (Institut für Molekulare Tierzucht Tierzucht und Biotechnologie, München) verwendet.

Die Freisetzung endogener Retroviren nach Stimulation von Immunzellen wurde bereits für andere Spezies beschrieben, beispielsweise für Mäuse, nach der Stimulation mit B-Zell-Mitogenen (DE LAMARTER et al., 1981, STOYE et al., 1983), während gemischten Lymphozytenreaktionen und auch *in vivo* während Interaktionsreaktionen zwischen Transplantat und Wirt (HIRSCH et al., 1972) sowie nach Immunisierung mit Antigenen und unterschiedlichen Adjuvanzen (DENNER, 1977). PERVs können durch T-Zell-Mitogene allein aktiviert werden (Tacke et al., 2003). Im Gegensatz dazu konnten murine endogene Retroviren nur aktiviert werden, wenn zusätzlich zu dem T-Zell Mitogen PHA das Thymidinanalogon Bromodeoxyuridin gegeben wurde (STOYE et al., 1983, HIRSCH et al., 1972).

Da bereits Unterschiede hinsichtlich der PERV-Freisetzung zwischen verschiedenen Schweinestämmen sowie Individuen eines Stammes beschrieben wurden (WILSON et al., 1998, TACKE et al., 2000b, TACKE et al., 2003), war das Ziel der vorliegenden Untersuchungen weiterhin die Identifizierung von Schweinen aus den Beständen der Kooperationspartner, die weniger PERV exprimieren und freisetzen und somit für weitere Kreuzungen eingesetzt werden können.

In den meisten Fällen konnte ein Anstieg der PERV-Expression in den PBMCs nach PHA-Stimulation im Vergleich zu den nicht stimulierten PBMCs beobachtet werden. Zwischen den Tieren einer Kreuzung ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede der PERV-Expression, die eine Selektion nach hoch- und niedrig-exprimierenden Tieren ermöglichen, feststellen. Ein Expressionsanstieg der Vollängen-mRNA muss jedoch nicht zwangsläufig zu einer erhöhten Partikel-Freisetzung führen. Mutationen in Bereichen, die für die Virusmorphogenese erforderlich sind, sowie quantitative Unterschiede der exprimierten viralen Proteine könnten eine Ursache für eine fehlende Partikelbildung darstellen. So wurde bereits beschrieben, dass zahlreiche PERV-Proviren Mutationen aufweisen und somit keine intakten Viruspartikel bilden können (PATIENCE et al., 2001, LEE et al., 2002).

Mit Ausnahmen der Tiere 9426 (PHA: $1,72 \text{ mU/mL} \pm 0,11$) und 9432 (PHA: $2,76 \pm 0,16$) konnte in den Überständen der PBMCs keine Reverse Transkriptase-Aktivität detektiert werden (Nachweisgrenze: $0,02 \text{ mU/ml}$) (Tab. 4.4). Die Tiere 9426 und 9432 entstammen einer Kreuzung der Rassen Minipig, Duroc und Deutsche Landrasse. Bei keinem der

getesteten Tiere der anderen Kreuzung (Deutsches Edelschwein x Minipig x Duroc) konnte ein Nachweis Reverser Transkriptase-Aktivität erbracht werden. Dies gilt auch für die PHA-stimulierten PBMCs der Tiere 9075 und 9232, die eine stark erhöhte PERV-Expression zeigten (Tab. 4.4). Mutationen sowie Regulationen der Provirus-Sequenzen im Genom der Tiere mit dem Stammhintergrund Deutsches Edelschwein könnten hierfür eine Erklärung darstellen. Basierend auf dieser Annahme, wären Tiere dieser Kreuzung hinsichtlich des geringeren Risikos der PERV-Übertragung zu bevorzugen.

5.1.4 Keine PERV-Übertragung nach Transplantation porziner Inselzellen auf Cynomolgus-Affen

In einer prospektiven Studie wurde die *in vivo* Übertragung porziner endogener Retroviren und anderer porziner Viren nach Transplantation porziner Inselzellen auf diabetische Cynomolgus-Affen untersucht. Den porzinen endogenen Retroviren wurde hierbei ein besonderer Stellenwert beigemessen, da sie im Genom aller Schweine vertreten sind (PATIENCE et al., 1997), viele γ -Retroviren in der Lage sind, Leukämien und Immundefizienzen auszulösen und PERVs nicht wie die meisten anderen Pathogene durch SPF-Zucht eliminiert werden können.

Die Studie erfolgte in Kooperation mit der Firma Living Cell Technologies Ltd in Auckland, Neuseeland (Dr. Garkavenko). Bei acht männlichen Cynomolgus-Affen wurde Diabetes induziert. Drei Wochen nach dieser Diabetes-Induktion erfolgte die Transplantation der Affen mit Alginat-verkapselten porzinen Inselzellen. Sieben Tiere überlebten mehr als 3 Monate und deren Insulin-Bedarf war 30% geringer als bei einer Kontrollgruppe. Mit keiner der verwendeten Methoden (PCR (durchgeführt von Living Cell Technologies Ltd), ELISA, Western-Blot-Analyse, Test auf RT-Aktivität) konnte ein Hinweis auf eine PERV-Infektion der Affen erbracht werden (Tab. 4.5, Abb. 4.5).

Die Verkapselung der transplantierten Inselzellen erlaubt die Passage kleiner Moleküle wie Insulin und Glukose, nicht jedoch den Eintritt von zytotoxischen T-Zellen und Antikörpern, sowie die Freisetzung porziner Mikroorganismen. Diese Tatsache reduziert das Infektionsrisiko der Affen erheblich. Sollten einige dieser Kapseln während der Applikation oder der Überlebenszeit im Tier Schaden nehmen, ist die Menge der freigesetzten PERVs und somit das Infektionsrisiko gering, da bereits gezeigt wurde, dass die Injektion großer Mengen replikationskompetenter PERV-Partikel nicht zu einer Infektion von nicht-humanen Primaten führte (DENNER, 2003b, SPECKE et al., 2002b). Ein Kritikpunkt an dieser Studie ist, dass noch immer nicht geklärt ist, ob Cynomolgus-Affen suszeptibel für porzine endogene Retroviren sind, da keine der vorherigen Versuche einer *in vitro* Übertragung zu einer Infektion führten (SPECKE et al., 2001a, RITZHAUPT et al., 2002). Diese Tatsache induzierte z.B. die Etablierung eines Drei-Spezies-Modells zur weiteren Untersuchung der PERV-Übertragung (WINKLER et al., 2005). Auch in diesen Experimenten wurde keine PERV-Übertragung von porzinen Zellen auf humanes Gewebe in den Cynomolgus-Affen beobachtet.

Auch in vorherigen präklinischen Studien mit nicht-humanen Primaten wurde bisher keine PERV-Übertragung berichtet (MARTIN et al., 1999, MARTIN et al., 2000, SWITZER et al., 2001, ELLIOT et al., 2002, MARTIN et al., 2002, SIMON et al., 2003, GARKAVENKO et al., 2004). Injektionen eines an humane Zellen adaptierten porzinen endogenen Retrovirus in drei verschiedene Spezies nicht-humaner Primaten (Rhesusaffen: *Macaca mulatta*,

Macaca nemestrina und Paviane: *Papio papio*), die unter starker pharmazeutischer Immunsuppression standen, führten auch nicht zu einer PERV-Übertragung (DENNER, 2003b, SPECKE et al., 2002b). Ähnliche Resultate ergaben Applikationen von PERV in immunsupprimierte sowie immunkompetente Kleintiere (SPECKE et al., 2001a, SPECKE et al., 2002a, SPECKE et al., 2002b). Da bislang keine Positivkontrolle in Form eines Serums eines infizierten Tieres vorliegt, bleibt in zukünftigen Experimenten zu klären, ob unter den gewählten Versuchsbedingungen tatsächlich keine PERV-Partikel freigesetzt wurden, oder ob verwendeten Methoden nicht sensitiv genug waren, um DNA, Protein, RT sowie PERV-spezifische Antikörper zu detektieren.

Bis heute wurden in klinischen Studien mehr als 200 Patienten einem Kontakt mit porzinen Zellen ausgesetzt und kein Hinweis auf eine PERV-Infektion erbracht (PARADIS et al., 1999, TACKE et al., 2001, IRGANG et al., 2003, GARKAVENKO et al., 2004). Die Abwesenheit von Hinweisen auf die Infektion mit porzinen Viren in dieser präklinischen Studie schließt jedoch die Möglichkeit derselben in zukünftigen klinischen Xenotransplantationen nicht aus. Fraglich bleibt, ob die relativ geringe Lebenszeit der Versuchstiere mit dem Transplantat ausreichte, um die Virus-Sicherheit von Xenotransplantationen realistisch beurteilen zu können. Daher sollten transplantierte Patienten einer engmaschigen Überwachung unterzogen werden.

5.1.5 Erhöhte PERV-Expression in Melanomen der Münchner Miniatur Schweine Troll

Expression und biologische Funktion der porzinen endogenen Retroviren in normalen Schweinen sowie in porzinen Tumoren wurden bislang noch nicht umfassend untersucht. Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Untersuchungen geben einen ersten Hinweis auf eine erhöhte PERV-Expression in Melanomen (Abb. 4.11, DIECKHOFF et al., 2007b) der selektiv gezüchteten Münchner Miniatur Schweine (MMS) Troll, die durch eine hohe Prävalenz für kutane Melanome charakterisiert sind. Melanome dieser Tiere und auch anderer Schweine-Stämme (PEREZ et al., 2002) repräsentieren ein gutes Modell für Untersuchungen des genetischen Hintergrundes, der Involvierung endogener Retroviren und der immunologischen Reaktionen des Wirts.

Mittels RT *real-time* PCR konnte im Vergleich zu unveränderten Geweben eine erhöhte Expression von PERV-Vollängen-mRNA in porzinen Melanomen (Abb 4.11) gezeigt werden. Diese Daten korrelieren mit Ergebnissen, die eine gesteigerte Expression des humanen endogenen Retrovirus HERV-K in humanen Melanomen (MUSTER et al., 2003) beschreiben. Das transmembrane Hüllprotein TM des HERV-K wurde von 50% der getesteten primären Tumoren exprimiert (BUSCHER et al., 2005).

Weiterhin konnten im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen erstmals rekombinante PERV-A/C-Proviren, die in Milzzellen, jedoch nicht in anderen Zellen desselben Tieres integriert sind, beschrieben werden (4.9 B, C). Exogene PERV-A/C Rekombinanten, die nicht in der Keimbahn vorhanden sind, wurden bereits beobachtet (BARTOSCH et al., 2004, WOOD et al., 2004, SCOBIE et al., 2004, MARTIN et al., 2006). Solche PERV-A/C-Rekombinanten waren assoziiert mit höheren Virus-Titern und genetischen Veränderungen im Genom (WILSON et al., 2000, DENNER et al., 2003a, HARRISON et al., 2004). Eine Anwesenheit solcher Rekombinanten in der Milz, jedoch nicht in den Melanomen deutet, wie bereits beschrieben, auf eine Aktivierung, Rekombination und

de novo Integration hauptsächlich in den Lymphozyten hin (WILSON et al., 1998, WOOD et al., 2004). Dies korreliert mit Daten, die eine erhöhte PERV-Expression in stimulierten porzinen Lymphozyten (TACKE et al., 2000b, TACKE et al., 2003) sowie eine erhöhte Expression des murinen endogenen Retrovirus in stimulierten Mäusen zeigen (HIRSCH et al., 1972, DENNER UND DORFMAN, 1977). Die hohe PERV-Expression in den Milzzellen mit und ohne Metastasen der Tiere mit Melanomen (Abb. 4.9) könnte auf der immunologischen Stimulierung durch den Tumor basieren.

Eine erhöhte PERV-Expression und sogar eine gesteigerte PERV-Freisetzung wurde des Weiteren in Lungenmetastasen-abgeleiteten Zellkulturen beobachtet (Abb. 4.12, Abb. 4.16 A). Diese Zellkulturen waren, nachdem sie ihre Fähigkeit zur Melaninproduktion während der ersten Passagen verloren hatten, amelanotisch (BUETTNER et al., 1991). Durch die Detektion der RT-Aktivität (Abb. 4.16 A) sowie durch Elektronenmikroskopie (Abb. 4.17) konnte gezeigt werden, dass die gesteigerte PERV-Expression in dieser Zelllinie in der Freisetzung von PERV-Partikeln resultierte. Im pelletierten Überstand der Zellkulturen wurde die Präsenz von PERV-A, -B und C-Genomen detektiert (Abb. 4.16 B). Die gesteigerte PERV-Expression war jedoch nicht automatisch mit der Immortalisierung der porzinen Zellen assoziiert, da die PERV-Expression in späten Passagen dieser Zellkultur weitaus höher war als in der gut charakterisierten Zelllinie PK-15 (Abb. 4.12). Im Gegensatz dazu, exprimierte die Epithelzelllinie IPEC-J2 nur geringe Mengen PERV-mRNA. Die von der Melanomzelllinie freigesetzten Partikel waren nicht in der Lage, humane 293-Zellen zu infizieren, was z.B. durch defekte Partikel oder eine zu geringe Menge an PERV-Partikeln zu erklären wäre. Im Gegensatz dazu infizierte der Überstand von PERV-infizierten 293-Zellen (293/5°), der als Positivkontrolle verwendet worden war, 293 Zellen.

Erhöhte PERV-Expression und die Freisetzung von Viruspartikeln wurde auch für andere porzine Tumorzellen gezeigt, z.B. sowohl für unbehandelte Lymphomzellen (SUZUKA et al., 1985; SUZUKA et al., 1986) als auch für mit BrdU oder DMSO behandelte (SANDSTRÖM et al., 1973, MOENNING et al., 1974) sowie für mit PHA und 5-Azacytidin behandelte Lymphomzellen (KAEFFER et al., 1990) und auch für Leukämie-Zellen (FRAZIER et al., 1985). Zusätzlich wurde die PERV-Produktion bei Ovidukt-Zellen (BOUILANT et al., 1975a,b,c) und bei porzinen primären Aortaendothelzellen (PAEC) (MARTIN et al., 1998 a) beschrieben. Eine Virusproduktion wurde des Weiteren für PAEC von Deutschen, Russischen und Französischen Landzuchten sowie für Schweine der Rassen Yucatan Micropig sowie Göttinger Minipig gezeigt (MARTIN et al., 1998a). Die Produktion von Partikeln der Subtypen PERV-A, PERV-B, PERV-C sowie der Rekombinanten PERV-A/C wurde bei Mitogen-stimulierten porzinen PBMCs beschrieben (WILSON et al., 1998, WILSON et al., 2000, TACKE et al., 2003).

Da die Analyse der von porzinen PBMCs-abgeleiteten PERV-A/C-Rekombinanten (WILSON et al., 1998), sowie deren Passagierung auf humanen 293-Zellen zeigte, dass der Anstieg des Virustiters mit dem Anstieg der Zahl der Transkriptionsfaktor NF- κ B-Bindungsstellen in den LTRs des Virus assoziiert war (WILSON et al., 2000, DENNER et al., 2003a), wurde die Länge der proviralen LTRs in den Melanomzellkulturen untersucht (Abb. 4.13). Es konnte jedoch keine Multimerisierung der LTRs beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass Veränderungen im Expressionsmuster der Transkriptionsfaktoren oder Demethylierung

einen Grund für die erhöhte Expression darstellen könnten. Für die Methylierung der CpG Dinukleotide wurde eine regulierende Wirkung auf die Expression des humanen endogenen Retrovirus HERV-K in primären humanen Testistumoren gezeigt (GOTZINGER et al., 2006).

Die mittels Western-Blot-Analyse und Immunfluoreszenz gezeigte Expression des viralen p15E-Proteins in den MMS Melanomen (Abb. 4.14 A) und der Lungenmetastasen-abgeleiteten Zellkultur (Abb. 4.14 B, 4.15), könnte von großer Bedeutung für die Tumorprogression sein. Für verschiedene Retroviren wie z.B. das murine Leukämievirus (MuLV) und die Immundefizienzviren (HIV-1 und HIV-2) wurde die Induktion von Immundefizienzen im infizierten Wirt gezeigt (Review, siehe DENNER, 1998). Der Mechanismus, wie Retroviren solche Immundefizienzen induzieren, ist bislang unklar. Einige Hinweise deuten auf eine Involvierung der transmembranen Hüllproteine hin, p15E im Falle von MuLV und PERV, gp41 im Fall von HIV-1 (OOSTENDORP et al., 1993, DENNER, 2000). Kürzlich wurde gezeigt, dass die Expression des p15E-Proteins eines endogenen Maus Retrovirus für das Melanom-Wachstum *in vivo* erforderlich ist (MANGENEY et al., 2005). Die Expression des TM-Proteins gp37 des HERV-K wurde auf der Oberfläche von humanen Melanomzellen lokalisiert (BUSCHER et al., 2005). Für die TM-Proteine verschiedener Retroviren inklusive HIV-1 wurde die Induktion einer gesteigerten IL-10-Produktion gezeigt (DENNER, 1998). Erhöhte IL-10-Level wurden auch in Melanom-Patienten beschrieben (Dummer et al., 1995).

Des Weiteren könnte PERV (und im Fall humaner Melanome HERV-K) aktiv an der malignen Transformation partizipieren. Da PERVs keine Onkogene enthalten, könnte die Transformation nur ein Resultat einer Insertionsmutagenese sein, durch Zerstörung eines Tumorsuppressorgens oder durch Aktivierung eines zellulären Protoonkogens das am Multistep-Prozess der Karzinogenese beteiligt ist.

Ein murines Retrovirus, das mit Melanomen in C57BL/6 Mäusen assoziiert ist, enthält beispielsweise ebenfalls kein Onkogen. Es wurde jedoch eine Insertion in das c-maf-Protoonkogen transformierter Zellen beschrieben (LI et al., 1999). Die Situation ist bei HERV-K, das zwei potentielle Onkogene, rec und np9, enthält, eine andere. Rec kodiert für ein 14 kDa großes Protein, das im Nukleolus HERV-K-Partile-produzierender GH-Teratokarzinomzellen lokalisiert ist (LOWER et al., 1995). Das Rec-Protein ist dem HIV Rev-Protein in strukturellen Eigenschaften, sowie der intrazellulären Lokalisation und Funktion ähnlich (MAGIN et al., 2000). In Nacktmäusen exprimiertes Rec unterstützt das Tumorwachstum (BOESE et al., 2000). Das 9 kDa-Protein Np9 wurde in Biopsien von Mammakarzinomen und Keimzelltumoren, sowie in transformierten Zelllinien nachgewiesen, nicht jedoch in normalen Geweben (ARMBRUESTER et al., 2002).

Für die immunhisochemische Analyse humaner Melanome wurden bereits zahlreiche Marker beschrieben (GUO et al., 1998, PEREZ et al., 2000, REINKE et al., 2005). Zu diesen zählt der Antikörper HMB45, der das gp100-Protein erkennt (ADEMA et al., 1994, BAKKER et al., 1994). HMB45 wurde bereits erfolgreich für die Immunfärbung porziner Melanome verwendet (Abb. 4.7 C, D). Zusätzlich wurde ein *real-time* PCR-Assay entwickelt und zur Analyse der porzinen Melanome verwendet (Abb. 4.8). Da die porzinen Sequenzen für die als humane Melanommarker bekannten Gene MIA, MART-1 und gp100 nicht bekannt waren und die Primer, für die humanen Gene dieser Melanommarker (PEREZ et al., 2000)

im porzinen System nicht funktionierten, wurde eine Sybr Green-basierte *real-time* PCR für die porzine Tyrosinase etabliert. Die Bedeutung der Tyrosinase als Marker für Melanome wird kontrovers diskutiert. In Untersuchungen von 35 humanen Melanomen und anderen Tumorproben, konnte eine Sensitivität von 80%, eine Spezifität von 100% und eine Genauigkeit von 88% ermittelt werden (Guo et al., 1998). Eine andere Studie berichtet von einer Sensitivität von 71%, einer Spezifität von 49% und einer Genauigkeit von 56% (PEREZ et al., 2000). Die Erfahrungen mit der Tyrosinase im porzinen System in dieser Arbeit sind jedoch positiv. Es konnte stets eine höhere Tyrosinase-Expression in Melanomen und metastatischen Lymphknoten ermittelt werden als in normaler Haut, Lymphknoten und der Milz (Abb. 4.8). Die geringe Tyrosinase-Expression in den Milzen deutet darauf hin, dass die untersuchten Organstücke nicht viele Metastasen enthielten und die erhöhte PERV-Expression, die mit der Rekombination und der *de novo* Integration der PERV-A/C-Rekombinanten assoziiert war auf eine Immunaktivierung zurückzuführen ist.

5.2 Prävention der PERV-Übertragung bei der Xenotransplantation

Weder in Transplantations- und Infektionsstudien mit Kleintieren und nicht-humanen Primaten noch in ersten klinischen Xenotransplantationen konnte bisher der Nachweis einer PERV-Übertragung erbracht werden (vgl. 4.2), humane Zellen lassen sich jedoch *in vitro* infizieren (PATIENCE et al., 1997, WILSON et al., 1998, SPECKE et al., 2001b). So kann eine Infektion nach einer Xenotransplantation nicht ausgeschlossen werden, da sich das Transplantat in einem direkten Kontakt mit den Zellen des immunsupprimierten Rezipienten befindet.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zwar mit zwei Ausnahmen für keines der getesteten Tiere eine PERV-Freisetzung nach Stimulation deren PBMCs gezeigt werden, die Ergebnisse deuten jedoch daraufhin, dass die PERV-Expression in Tieren eines Wurfes und sogar in unterschiedlichen Organen des gleichen Tieres sehr variabel ist. Davon ausgehend gestaltet sich die lange Zeit in Betracht gezogene Sicherheitsmaßnahme, die Selektion von Tieren mit besonders geringer PERV-Expression in allen für die Xenotransplantation relevanten Organen, schwierig. Basierend auf diesen Tatsachen gilt es Strategien zur Prävention einer potentiellen PERV-Übertragung zu entwickeln. Vielversprechende Strategien stellen hierbei die Hemmung der PERV-Expression durch RNA-Interferenz sowie die Entwicklung eines Impfstoffes dar.

5.2.1 RNA-Interferenz-vermittelte Hemmung der PERV-Expression in porzinen Zellen

Im Rahmen dieses Versuches konnte zum ersten Mal eine signifikante Hemmung der PERV-Expression in primären porzinen Zellen sowie einer porzinen Nierenzelllinie (PK-15) durch lentivirale Vektor-vermittelte RNA-Interferenz gezeigt werden (DIECKHOFF et al., 2007a).

Diese Daten basieren auf früheren Ergebnissen der Arbeitsgruppe, in denen eine siRNA (pol2), die komplementär zu einer hochkonservierten Sequenz des viralen *pol*-Gens ist,

identifiziert wurde und erfolgreich zur Hemmung der PERV-Expression infizierter 293-Zellen eingesetzt wurde (KARLAS et al., 2004). Da die Unterteilung der PERV-Subtypen ausschließlich auf Unterschieden im *env*-Gen beruhen, sollte die Ziel-Sequenz in allen funktionellen PERV-Subtypen identisch und die siRNA somit in der Lage sein, die Expression aller drei Subtypen zu hemmen. Für den PERV-Subtyp B sowie die Rekombinante A/C konnte dies bereits von Karlas et al. gezeigt werden. Durch die Insertion der pol2-siRNA in den Expressionsvektor pSuper wurde eine permanente Expression der entsprechenden pol-spezifischen shRNA und eine effiziente Hemmung der PERV-Expression in 293-Zellen erreicht (KARLAS et al., 2004, KARLAS, 2004).

Die Voraussetzung für eine spätere Erzeugung shRNA-transgener Schweine mit einer verminderten PERV-Expression war die effiziente Hemmung der PERV-Expression in primären porzinen Zellen. Da sich primäre Zellen jedoch nur schwer und mit schlechter Effizienz mit Expressionsvektoren wie pSuper transfizieren lassen, wurden die Versuche im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe zweier verschiedener lentiviraler Vektoren unternommen (pLVTHM-pol2, RRL-pGK-GFP-pol2, 4.2.1.1, Abb. 4.18). Zur Produktion von lentiviralen Partikeln wurde die Verpackungszelllinie 293T (3.4.7) mit den jeweiligen lentiviralen Vektoren sowie zwei weiteren Verpackungsplasmiden ko-transfiziert. Die Unterschiede zwischen den erhaltenen Titern für die lentiviralen Vektoren pLVTHM-pol2 und RRL-pGK-GFP-pol2 um drei Zehnerpotenzen sind auf unterschiedliche Produktionsmethoden zurückzuführen (3.4.7, 4.2.1.1, HOFMAN et al., 2003, PFEIFER et al., 2000).

Durch Transduktion der porzinen Fibroblasten SE 101, SE 105 und P1 F10 mit den lentiviralen Partikeln konnte eine pol2-shRNA-vermittelte Hemmung der PERV Vollängen-RNA-Expression von bis zu 94,8% ermittelt werden, die bei ca. 95% über Monate (171 Tage) stabil blieb (Abb. 4.21). Im Vergleich dazu konnten Miyagawa et al. in einer porzinen Endothelzelllinie mit zwei unterschiedlichen *gag*-spezifischen siRNAs hingegen nur eine Hemmung der PERV-B-Expression von 28% bis 52% zeigen (MIYAGAWA et al., 2005).

Für die porzinen PK-15-Zellen wurde nur eine Hemmung der PERV-Expression von bis zu 73,5% bestimmt (Abb. 4.22). Dies könnte zum einen auf die nur 95%-ige Transduktionseffizienz und zum anderen auf das höhere PERV-Expressionsniveau in diesen Zellen im Vergleich zu den Fibroblasten zurückzuführen sein. Bereits 5% nicht-transduzierter Zellen, die eine nicht beeinträchtigte PERV-Expression aufweisen, können erheblich zu einer Verfälschung des *knockdown*-Ergebnisses beitragen. In Zukunft empfiehlt es sich, auch für diese Zellen eine Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung durchzuführen. Weiterhin wurde die PERV-Expression in PHA-stimulierten PBMCs um 75% gehemmt. Diese Zellen lassen sich nur sehr schlecht transduzieren, was sich in einer sehr geringen Transduktionseffizienz widerspiegelt. Auch nach dreimaliger Transduktion mit den lentiviralen Partikeln, bei welchen die PBMCs zusätzlich jeweils 1,5 Stunden bei 32°C zentrifugiert wurden (MUHLEBACH et al., 2003), konnte nur eine Transduktionseffizienz von ca. 1% erreicht werden. Auch bei diesen Zellen könnte ein höheres PERV-Expressionsniveau im Vergleich zu den Fibroblasten zu einer verminderten Inhibitionseffizienz führen. Denkbar wäre weiterhin eine variable Expression der für die RNA-Interferenz erforderlichen Proteine Dicer und RISC in unterschiedlichen Zelltypen.

Möglicherweise könnte die Verwendung von mehreren shRNAs, die gegen unterschiedliche Ziele der viralen RNA gerichtet sind, zu einer insgesamt stärkeren Hemmung führen. Hierfür erscheint beispielsweise die von Karlas et al. publizierte Sequenz der siRNA pol5 vielversprechend, da sie nach Transfektion von PERV-B-infizierten 293-Zellen die Menge an viraler RNA um ca. 70% reduzierte und zudem eine komplette Homologie zu allen PERV-Subtypen aufweist (KARLAS et al., 2004). Diese von Karlas et al. publizierten Sequenzen wurden mit den ersten verfügbaren *software*-gestützten Algorithmen konzipiert. Es würde sich daher anbieten, weitere Sequenzen für hocheffektive shRNAs zu suchen, die sich mit Hilfe von verbesserter *software* und neuen thermodynamischen Kriterien leicht identifizieren lassen. Bei dieser Strategie muss jedoch bedacht werden, dass die Effizienz der verwendeten shRNAs auch durch zelluläre Faktoren, wie begrenzte Mengen an RNAi-relevanten Enzymen (z.B. Dicer) limitiert werden kann.

Der Level der shRNA-Expression nach Transduktion ist abhängig von der Zahl der integrierten Vektoren pro Zelle und der Promotoraktivität. Ein Vorteil des *double copy* lentiviralen Vektors pLVTHM-pol2 ist die Verdopplung der Expressionskassette nach der Integration des Vektors in das Wirtszellgenom (WIZNEROWICZ UND TRONO, 2003). Trotz dieser Verdopplung konnte jedoch kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der *knockdown*-Effizienz im Vergleich zum lentiviralen Vektor RRL-pGK-GFP-pol2 (Abb. 4.21) detektiert werden. Aufgrund des starken Polymerase III H1-RNA Gen-Promotors, der die ubiquitäre Expression der shRNA ermöglicht, scheint eine einzelne shRNA Expressionskassette pro lentiviralem Vektor für eine ausreichende shRNA-Expression zur Reduktion der PERV-mRNA zu einem Minimum sorgen.

Die reduzierte Expression viraler mRNA in den PK-15-Zellen führte erwartungsgemäß auch zu einer reduzierten Expression des viralen Proteins p27 Gag (Abb. 4.23), sowie zu einer reduzierten viralen RT-Aktivität in den Zellkulturüberständen. Die Gag-Proteine werden zusammen mit den durch die *pol*-Region kodierten Proteinen von der viralen Vollängen-mRNA als gemeinsames Vorläuferprotein translatiert und erst während der Virusmorphogenese von der viralen Protease in die einzelnen Komponenten gespalten. Eine shRNA, welche die *pol*-mRNA degradiert (pol2), führt somit auch zur Degradierung der *gag*-mRNA. Karlas et al. konnten zeigen, dass die gespleißte *env*-mRNA hingegen nicht durch die Expression der pol2-shRNA beeinflusst wird (KARLAS et al., 2004).

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnte für die porzinen Fibroblasten auch nach Verwendung großer Gesamtproteinmengen (80 µg) kein Gag-Protein in den nicht-transduzierten Kontrollzellen detektiert werden, was darauf hindeutet, dass die PERV-Expression in diesen Zellen unter der Nachweisgrenze liegt. Dies wird durch die Tatsache bestätigt, dass die PERV-Expression in den porzinen Fibroblasten im Vergleich zu der in PK15-Zellen nur 0,2% betrug (4.2.1.5). In allen getesteten Fibroblastenkulturen konnten jedoch sowohl mRNAs der PERV-Subtypen A, B und C sowie gespleißte *env*-mRNA detektiert werden (Abb. 4.19). Die Präsenz gespleißter *env*-mRNA weist auf die Möglichkeit der Env-Protein-Translation und der Viruspartikel-Bildung hin. In den Überständen der porzinen Fibroblasten P1 F10 konnte jedoch keine RT-Aktivität detektiert werden, was ebenfalls den geringen PERV-Expressionslevel bestätigt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die PERV-Expression in primären porzinen Zellen (Fibroblasten, PBMCs) sowie in einer porzinen Zelllinie (PK-15) mittels RNA-Interferenz unter der Verwendung lentiviraler Vektoren drastisch reduziert werden. Somit sind die Voraussetzungen für die Generierung shRNA-transgener Schweine mit stark verminderter PERV-Expression erfüllt. Über die PERV-Expression in verschiedenen Geweben und Organen normaler und transgener Schweine ist nicht viel bekannt (4.1.4, AKIYOSHI et al., 1998). Diese Daten deuten jedoch darauf hin, dass die PERV-Expression in verschiedenen Zelltypen inklusive Lymphozyten, die eine Bedeutung bei der Verwendung von Zellen und Organen bei der Xenotransplantation haben, gehemmt werden kann.

5.2.2 Hemmung der PERV-Expression in shRNA-transgenen Schweinen

Da porzine endogene Retroviren mit mehr als 50 Kopien im porzinen Genom integriert sind (BOSCH et al., 2000, HERRING et al., 2001b), ist ein konventioneller Gen-*knockout* schwierig. Die RNA-Interferenz bietet hierfür eine erfolgsversprechende Alternative. Diese Methode wurde bereits *in vitro* zur Hemmung zahlreicher Viren wie des Humanen Immundefizienzvirus HIV-1 (COBURN UND CULLEN, 2002, JACQUE et al., 2002, BANERJEA et al., 2003, CHRISTENSEN et al., 2007), des Hepatitis B Virus (HBV) (RADHAKRISHNAN et al., 2004, KAYHAN et al., 2007), des Coxsackie Virus B3 (FECHNER et al., 2007) sowie des West Nil Virus (KACHKO et al., 2006) genutzt. Des Weiteren wurde die RNA-Interferenz beispielsweise zur Hemmung der HBV-Expression bei Mäusen *in vivo* angewendet. So konnte eine langfristige Hemmung der HBV-Expression durch Applikation der shRNAs mittels adeno-assoziierten Vektoren erreicht werden (CHEN et al., 2007). In transgenen Mäusen führte die shRNA-Expression zur Hemmung des für eine N-Glykosylase kodierenden *Neil1* Gens in allen getesteten Organen (CARMELL et al., 2003).

Mit der erfolgreichen Hemmung der PERV-Expression in primären porzinen Zellen (4.2.1, DIECKHOFF et al., 2007a) war die Basis zur Herstellung solcher shRNA-transgenen Schweine geschaffen. In Kooperation mit Prof. Niemann (Institut für Tierzucht, Mariensee) konnten im Rahmen dieser Arbeit, basierend auf den bereits beschriebenen, mit den lentiviralen Partikeln pLVTHM-pol2 transduzierten Fibroblasten P1 F10 shRNA-transgene Schweine generiert werden, die eine erheblich verminderte PERV-Expression *in vivo* aufweisen (4.2.2, Abb. 4.27).

Die nach der üblichen Tragzeit von 116 Tagen geborenen sieben Ferkel wiesen keine sichtbaren Anomalien auf. Eines starb direkt nach der Geburt, vier weitere aufgrund einer nicht-behandelbaren Agalaktie der Muttersau. Da die Tiere vollständig entwickelt waren und normale Geburtsgewichte von ca. 1.3 kg aufwiesen und aufgrund der Sequenzspezifität des Mechanismus der RNA-Interferenz ist die Wahrscheinlichkeit einer Hemmung lebenswichtiger zellulärer Proteine in den transgenen Ferkeln sehr gering. Ein Restrisiko bleibt jedoch bestehen, da solche *off-target* Effekte, die neben dem Zielgen zusätzlich noch andere Gene beeinflussen, schon beobachtet wurden (JACKSON et al., 2003, JACKSON et al., 2004, PERSENGIEV et al., 2004, SCACHERI et al., 2004).

In allen Ferkeln konnte sowohl der Nachweis der Transgenintegration und der shRNA-Expression erbracht werden (Abb. 4.25, 4.26). Der Nachweis eines inhibitorischen Effekts der pol2-shRNA auf die PERV-Expression *in vivo* erfordert einen geeigneten Bezug. Zur Erzeugung einer geeigneten Kontrolle wurden daher mit Hilfe des Nukleustransfers Schweine generiert, deren Genom dem der Ursprungszellen P1 F10 entspricht. Somit

konnten Organe von fünf Tieren mit derselben genetischen Ausstattung erhalten werden und als Kontrolle eingesetzt werden. Da bereits beschrieben wurde, dass die PERV-Expression in Schweinen unterschiedlicher Rassen (4.1.3) und sogar in Tieren eines Wurfes derselben Rasse (4.1.3) sowie gewebsspezifisch variiert (4.1.4), schied ein Tier der gleichen Rasse (Deutsche Landrasse) als Bezugskontrolle aus. Aufgrund der gewebsspezifischen PERV-Expression konnten auch die Ursprungszellen nicht als Referenz herangezogen werden.

Eine weitere Frage, die für den Nachweis eines inhibitorischen Effekts der pol2-shRNA auf die PERV-Expression *in vivo* geklärt werden musste, ist die nach der geeigneten Normalisierung der Expressionsdaten. In Kapitel 5.1.2 wurde bereits näher auf die Eignung und Verwendung der *house keeping* Gene GAPDH, HPRT und Cyclophilin eingegangen. Zur Normalisierung in diesem Fall war keines der beschriebenen *house keeping* Gene optimal geeignet (Tab. 5.1). Jedoch aufgrund der ähnlichen Expressionsniveaus von HPRT und PERV wurde HPRT neben der Normalisierung auf eingesetzte Mengen Gesamt-RNA als Referenzgen verwendet.

Somit konnte in allen getesteten Organen der transgenen Ferkel 6 und 7 eine Hemmung der PERV-Expression von bis zu 95% nachgewiesen werden (Abb. 4.27, normalisiert auf Gesamt-RNA). Die auf die HPRT-Expressionen aber auch auf die GAPDH sowie Cyclophilin-Expressionen normalisierten Daten ergaben ein tendenziell ähnliches Expressions- bzw. Hemmungsmuster. Mit Ausnahme der Nieren waren zwischen den beiden shRNA-transgenen Tieren keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Hemmung der PERV-Expression zu beobachten. Drastische Unterschiede hinsichtlich der Vektorintegration der einzelnen Zellen der ursprünglichen Fibroblastenkultur sind daher unwahrscheinlich. Die Integration des lentiviralen Vektors in das Genom der diesen Versuchen zu Grunde liegenden Fibroblasten erfolgte rein zufällig. Aufgrund der Sortierung der transduzierten Fibroblasten über die Expression des Reportergens *gfp* wurde eine annähernd 100%ig transduzierte Fibroblastenkultur erreicht, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass jede Zelle zumindest ein Vektorintegrat enthält. Über die exakte Zahl der Vektorintegrationen kann hierbei jedoch keine Aussage getroffen werden. Es ist somit durchaus möglich, dass eine Zelle nur ein Integrat beinhaltet, während eine andere mehrere Integrate enthält. Um bei weiteren Versuchen eine einheitliche Vektorintegration in der Fibroblastenkultur zu garantieren, empfiehlt sich eine Einzelzellklonierung.

Aufgrund der bereits beschriebenen Verluste der transgenen Ferkel durch die Agalaktie der Muttersau, waren in der vorliegenden Untersuchung keine Langzeitbeobachtungen des inhibitorischen Effekts sowie weiterführende Kreuzungsexperimente möglich. Diese ersten Ergebnisse zeigen jedoch einen hemmenden Effekt von bis zu 95% in allen getesteten Organen der untersuchten Tiere. Für zukünftige Erzeugungen transgener Schweine wäre die Verwendung eines lentiviralen Vektorsystems mit Antibiotika-induzierbarer Expression der shRNA denkbar (SZULC et al., 2006). Das von Szulc et al. entwickelte System, das die vielversprechende Repressionsaktivität der KRAB (*Krüppel-associated box*), die in vielen Transkriptionsregulatoren von Vertebraten gefunden wurde, und den Tetracyclin-Repressor (*tetR*) von *E. coli* miteinander verbindet (SZULC et al., 2006), wurde bereits *in vitro* und auch *in vivo* erfolgreich eingesetzt. Eine solche

konditionelle, durch die Applikation von Doxycyclin induzierte, shRNA-Expression würde die Untersuchung des inhibitorischen Effekts innerhalb eines Tieres ermöglichen. Weiterhin wäre zu überlegen, ob die Hemmung der PERV-Expression durch die Verwendung von mehreren shRNAs, die gegen unterschiedliche Ziele der viralen RNA gerichtet sind, gesteigert werden kann (siehe 5.2.1).

Die im Rahmen dieser Arbeit verfolgte Strategie resultierte in shRNA-transgenen Schweinen, die eine verminderte PERV-Expression um bis zu 95% zeigten und eröffnet damit die Möglichkeit der Generierung mikrobiologisch sicherer Xenotransplantate.

5.2.3 Induktion neutralisierender Antikörper gegen PERV und KoRV

Im Gegensatz zur Humanmedizin sind γ -Retroviren in der Veterinärmedizin als Pathogene weit verbreitet (z.B. FeLV, MuLV, KoRV). Kürzlich wurde die *in vivo* Transspezies-Übertragung des sowohl exogen als auch endogen vorkommenden Koala Retrovirus auf Wistar-Ratten beschrieben, die eine humorale Immunantwort auslöste und zur Induktion eines Tumors führte (FIEBIG et al., 2006). Die durch eine KoRV-Infektion hervorgerufene Symptomatik in Koalas geht mit Leukämien, Tumoren sowie Immunsuppression einher und führt bei 15% der freilebenden Koalas zum Tode (MCKEE, 2005).

Sequenzvergleiche zeigen sehr hohe Homologien zu dem exogenen Gibbon-Affen-Leukämie Virus (GaLV), so dass für die Entstehung des KoRV eine erst kürzlich (in den letzten 200 Jahren) erfolgte Transspeziesübertragung angenommen wird. Hierbei werden als mögliche Überträger Nagetiere vermutet, da Gibbon-Affen und Koalas geographisch nicht in Kontakt stehen. GaLV-verwandte Sequenzen konnten demnach auch in verschiedenen asiatischen Maus- und Rattenarten detektiert werden (MARTIN et al., 1999b).

Auf einigen Inseln Australiens haben sich seit Beginn des 20. Jahrhunderts isolierte Koala-Populationen etabliert, die keine KoRV-Infektion aufweisen (TARLINGTON et al., 2006). Daher wird eine erst kürzlich, vor ca. 100 Jahren erfolgte Endogenisierung des KoRV in das Genom der Koalas vermutet (TARLINGTON et al., 2006).

Der in Abbildung 5.1 dargestellte phylogenetische Stammbaum (MARTIN et al., 1999b), der basierend auf Sequenzvergleichen einer 280 Aminosäure langen Region einer retroviralen Protease erstellt wurde, zeigt die phylogenetische Verwandtschaft des Koala Retrovirus mit den porzinen endogenen Retroviren. Die Tatsache, dass ein Endogenisierungsereignis eines phylogenetisch mit PERV eng verwandten γ -Retroviren erst vor ca. 100 Jahren stattgefunden hat (TARLINGTON et al., 2006) und die Transspeziesübertragung dieses Virus auf Ratten zur Induktion von Tumoren führt (FIEBIG et al., 2006), fordert zusätzliche Sicherheitsvorkehrungen hinsichtlich der PERV-Übertragung bei der Xenotransplantation.

Bisher konnte zwar weder in Transplantations- und Infektionsstudien mit Kleintieren und nicht-humanen Primaten noch in ersten klinischen Xenotransplantationen eine Nachweis einer PERV-Übertragung erbracht werden (4.2), humane Zellen lassen sich jedoch *in vitro* infizieren (PATIENCE et al., 1997, WILSON et al., 1998, SPECKE et al., 2001b).

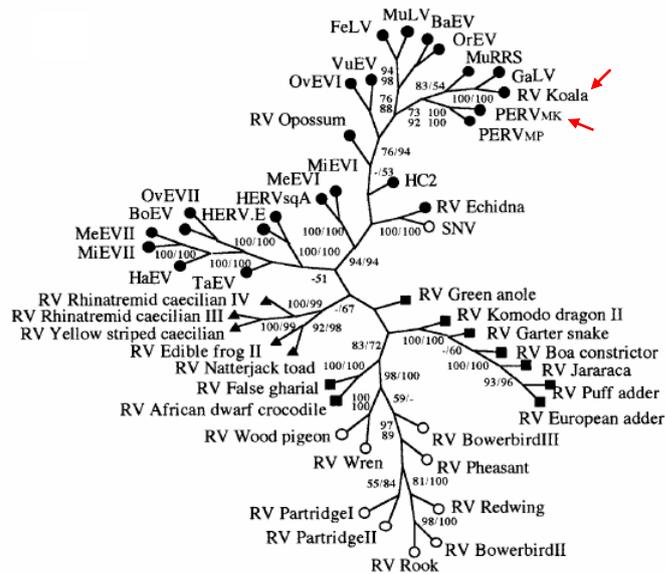


Abbildung 5.1: Phylogenetischer Stammbaum einiger Retroviren

Der Stammbaum wurde basierend auf Sequenzvergleichen einer 280 Aminosäuren langen Region einer retroviralen Protease erstellt. Die roten Pfeile zeigen die phylogenetische Verwandtschaft von KoRV und PERV (MARTIN et al., 1999b)

Ausgehend von dieser Tatsache und in Anbetracht der besonderen Situation während einer Xenotransplantation (Exposition porziner Organe im immunsupprimierten Organismus über mehrere Jahre), kann somit die Möglichkeit einer Adaptation an den Menschen mit daraus folgendem pathogenen Verlauf nicht sicher ausgeschlossen werden. Auch die Erfahrungen mit anderen tierischen Viren, wie z.B. SIV/HIV, welche Epidemieartig die Spezies Mensch infiziert haben (GAO et al., 1999), sollten im Fall der Xenotransplantation begründete Vorsicht walten lassen.

Eine Strategie zur Eingrenzung des Risikos einer PERV-Übertragung auf den Menschen stellt die Entwicklung eines Impfstoffes dar. Für den Einsatz eines solchen Impfstoffes wären zwei Möglichkeiten denkbar: Die präventive Vakzinierung zukünftiger Transplantatempfänger sowie die Eingrenzung einer potentiellen Pandemie, sollte es trotz aller Vorsichtsmaßnahmen zu einer PERV-Übertragung auf den Menschen kommen.

Das feline Leukämievirus ist bisher das einzige Retrovirus, gegen welches kommerzielle Impfstoffe erhältlich sind. Sie basieren auf inaktivierten Viruspartikeln, viralen gp70-Proteinen (z.B. Leucocell 2, Pfizer Inc., USA) oder aus rekombinantem p45 (Leucogen, Virbac AG, Schweiz; unglykosyliertes Oberflächenprotein des FeLV-A, exprimiert in *E.coli*).

Virale Transmembran- und Oberflächenhüllproteine sind entscheidend an der Infektion der Zielzelle beteiligt, da über sie der Kontakt und die Fusion des Virus mit der Zellmembran erfolgt. Neben unterschiedlichen von der Wirtszellmembran abgeleiteten Proteinen, sind sie die einzigen viralen Proteine, die auf der Oberfläche der Retroviren präsentiert werden und stellen somit die bevorzugte Zielstruktur für die Induktion neutralisierender Antikörper dar. Hinsichtlich der Entwicklung eines Impfstoffkandidaten gegen PERV wurde im Rahmen dieser Arbeit daher das virale Hüllprotein gp70 als

Zielstruktur zur Antikörperinduktion gewählt. Hierfür wurden drei unterschiedliche Ansätze verfolgt:

- die Generierung und Immunisierung mit gp70-Proteinfragmenten
 - die Herstellung und Immunisierung des rekombinanten Oberflächenhüllproteins
 - die Konstruktion eines auf den Sequenzen gp70 und gp85 basierenden DNA-Impfstoffs
- Durch die Immunisierung sollte des Weiteren die Generierung eines Kontrollserums gegen das PERV-gp70-Protein für immunologische Nachweissysteme einer PERV-Infektion erzielt werden.

Die Erprobung eines Impfstoffkandidaten erfordert ein Tiermodell, in dem die Tiere nach der Immunisierung mit dem entsprechenden Pathogen infiziert werden können, um somit die protektive Wirkung des Impfstoffs zu testen. Bisher konnte für PERV allerdings kein Kleintiermodell etabliert werden. Kürzlich wurde jedoch die Generierung transgener Mäuse, die den HuPAR-2-Rezeptor für PERV-A tragen und produktiv mit PERV-A infizierbar waren, beschrieben (MARTINA et al., 2006). Im Rahmen dieser Arbeit war der Erhalt dieser Tiere leider nicht möglich. Da Wistar-Ratten produktiv mit KoRV infizierbar sind (FIEBIG et al., 2006), stellen diese somit ein Tiermodell zur Erprobung von Impfstoffansätzen gegen ein phylogenetisch eng mit PERV verwandtes Virus dar. Aus diesem Grund wurde die Herstellung der gp70-Proteine von PERV und KoRV parallel angestrebt.

5.2.3.1 Induktion bindender und neutralisierender Antikörper gegen PERV-gp70-Proteinfragmente

Ein Ansatz zur Induktion neutralisierender Antikörper gegen das PERV-gp70 basierte auf der Teilung der gp70-Sequenz in Untereinheiten. Neben der Induktion von Antikörpern, sollte die Immunisierung mit den Proteinfragmenten hauptsächlich den Vergleich unterschiedlicher Bereiche des viralen gp70, hinsichtlich Immunogenität und Potential, neutralisierende Antikörper zu induzieren, ermöglichen.

Induktion bindender Antikörper gegen PERV-gp70-Proteinfragmente

Mit Ausnahme des Fragmentes 2 konnte durch die Immunisierung mit allen Fragmenten die Induktion bindender Antikörper erreicht und rekombinantes sowie virales gp70 detektiert werden (Abb. 4.28). Damit wurde ein Ziel der Arbeiten, die Generierung eines weiteren Antigens sowie eines Kontrollserums gegen das PERV-gp70-Protein für immunologische Nachweissysteme einer PERV-Infektion, erreicht.

Unklar ist, inwieweit sich das zur Immunisierung eingesetzte rekombinante Konstrukt als Antigen in einem solchen Nachweissystem eignet, da nach dem derzeitigen Stand der Arbeiten nicht vorausgesagt werden kann, ob die während einer möglichen PERV-Infektion (bisher stehen keine Seren infizierter Individuen zur Verfügung) gebildeten gp70-spezifischen Antikörper das rekombinante Konstrukt binden können. Da zum Nachweis von Infektionen eng verwandter Viren (FeLV) und anderer Retroviren bereits ähnliche Antigene erfolgreich eingesetzt werden, ist dies jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit zu erwarten. Vorrangiges Ziel der Arbeiten war jedoch die Induktion neutralisierender Antikörper gegen das gp70-Protein von PERV und KoRV, daher wurden hierzu keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

Die Proteinfragmente lagen fusioniert mit dem 26 kDa großem GST (Gluthathion-S-Transferase)-*tag* vor. Leider war es nicht möglich, das GST-*tag* von dem rekombinaten Protein zu trennen, da diese nach der Aufreinigung in unlöslicher Form vorlag. Mit einer Größe von 11 bis 17 kDa sind die Proteinfragmente somit kleiner als die Gluthathion-S-Transferase. Mit Seren der Tiere, die mit dem GST-Proteinfragment-2 immunisiert wurden, konnte das immunisierte Antigen, jedoch nicht das virale gp70 detektiert werden. Der Grund dafür könnte die Maskierung des Fragments durch GST sein, das gegenüber dem Proteinfragment eine Immundominanz ausbildet, oder eine fehlende Immunogenität des Fragmentes.

Als Antigen wurden in der durchgeführten Western-Blot-Analyse pelletierte Viruspartikel verwendet. Die Seren wurden somit hinsichtlich ihrer Bindung gegen glykosiliertes Protein untersucht. Da die rekombinant in Bakterien hergestellten Proteine nicht glykosiliert waren, besteht die Möglichkeit, dass Epitope, deren Bindungstellen von Glykosilierungen maskiert sind, nicht detektiert werden konnten.

Mit den Seren der Rattengruppen, die mit den Proteinfragmenten immunisiert wurden, sowie eines Tieres der Rattengruppe 214 konnten in der Western-Blot-Analyse starke Signale auf der Höhe des viralen p15E detektiert werden (4.28). Die Sequenzen der gp70-Fragmente zeigten jedoch keinerlei Homologie zur Sequenz des p15E. In einer weiteren Western-Blot-Analyse (Daten nicht gezeigt) mit rekombinantem p15E konnte eine spezifische Bindung des p15E bestätigt werden. Aufgrund eines parallel laufenden KoRV-Infektionsversuchs bestand die Vermutung, dass sich die Ratten mit KoRV infiziert haben könnten. Die Sequenzen des PERV-p15E und KoRV-p15E zeigen eine hohe Homologie von 87% und das für PERV-p15E gefundene Epitop E2 (FEGWFN, FIEBIG et al., 2003) ist mit Ausnahme der ersten Aminosäure identisch zu dem des KoRV-p15E (YEGWFN). Des Weiteren ist das Epitop des mAk 7C4 von Chiang et al. (CHIANG et al., 2007), welches mit der immunsuppressiven Domäne überlappt, in beiden Viren bis auf einen Aminosäureaustausch identisch.

Basierend auf diesen Beobachtungen wurde die Auswertbarkeit der durchgeführten Neutralisationstests überprüft. Da die Rattenserum nicht kreuzneutralisierend auf eine *in vitro*-KoRV-Infektion wirkten, ist eine KoRV-Infektion unwahrscheinlich. Eine potentielle Aktivierung eines endogenen Ratten Retrovirus könnte eine Erklärung der spezifischen p15E-Banden darstellen. In einem späteren Neutralisationstest konnte zudem gezeigt werden, dass Antikörper gegen das KoRV-rp52 keine neutralisierende Wirkung auf eine PERV-Infektion haben. Bei zwei von vier getesteten Ratten der Gruppe 211 (immunisiert mit KoRV-rp52 + p15E) konnten jedoch geringe kreuzneutralisierende Effekte (40% und 60%) nachgewiesen werden. Das gp70-Proteinfragment 2 induzierte keine bindenden Antikörper und konnte somit als zusätzliche Negativkontrolle dienen. Des Weiteren bestätigten die stark neutralisierenden Seren der mit PERV-rp52 bzw. den PERV-gp70-Proteinfragmenten immunisierten Ziegen (52 und 62), die definitiv keine KoRV-Infektion aufwiesen, das Potential der verwendeten Antigene zur Induktion neutralisierender Antikörper. Zusammengefasst war es somit möglich die Neutralisationstests auszuwerten und die Unterschiede der Gruppen zu analysieren, um damit zumindest Tendenzen in den einzelnen Immunantworten festzustellen.

Identifikation neutralisierender Bereiche in der PERV-Env-Sequenz

Die Seren des Proteinfragments 1 wurden aufgrund zytotoxischer Effekte nicht in die Auswertung des Neutralisationsassays mit einbezogen. Neutralisierende Antikörper sind vermutlich vor allem gegen die exponierten Bereiche des gp70 gerichtet, z.B. gegen die Rezeptorbindestellen. Die Rezeptorbindedomäne befindet sich im N-terminalen Bereich des gp70 (Abb. 1.3) und besteht aus dem konservierten PHQ-Motiv sowie den variablen Regionen A (VRA) und B (VRB). Im Anschluss folgt eine prolinreiche Region (PRR). Die Subtypen PERV-A, -B und -C unterscheiden sich maßgeblich in diesen drei Regionen (WATANABE et al., 2005). Die Sequenz des PERV-gp70-Fragment 1 reicht bis in die ersten Aminosäuren der VRA-Region und beinhaltet das für die Infektion wichtige PHQ-Motiv. Dieses Motiv ist bei PERV degeneriert, kann jedoch mit Peptiden transaktiviert werden und eine rezeptorunabhängige Infektion vermitteln (LAVILLETTE UND KABAT, 2004). Basierend auf diesen Tatsachen besitzt das Fragment 1 ein hohes Potential zur Induktion neutralisierender Antikörper.

Wie bereits beschrieben, konnten durch die Immunisierung mit Fragment 2 keine bindenden Antikörper und somit erwartungsgemäß auch keine neutralisierenden Antikörper induziert werden. Die Sequenz des gp70-Fragments 2 beginnt mit der VRA und endet im hinteren Drittel der VRB. Zwischen den zwei variablen Regionen befindet sich bei dem Subtyp PERV-A, im Vergleich zu den Subtypen PERV-B und -C, ein Aminosäureaustausch von Valin zu Isoleucin, welcher u.a. für die hohe Infektivität der PERV-A/C Rekombinante, mit der im Rahmen dieser Untersuchung gearbeitet wurde, verantwortlich ist (HARRISON et al., 2004). Eine erneute Expression und Immunisierung des Proteinfragments mit einem anderen Fusions-*tag* (z.B. Calmodulin-Binde-Protein) könnte zu einer Induktion von Antikörpern führen.

Mit den Seren der mit Fragment 3 immunisierten Ratten konnte keine signifikante Neutralisation erreicht werden. Die Sequenz des Fragments 3 beginnt innerhalb der VRB und reicht bis in die PRR hinein. Die PRR ist ein weiterer Grund für die hohe Infektiosität der PERV-A/C und könnte für die Rezeptorbindung von Bedeutung sein, da eine kompetitive Hemmung der Infektion mit dem N-terminalen SU-Bereich (incl. PHQ, VRA und VRB) alleine nicht erreicht werden konnte (WATANABE et al., 2005).

Das Fragment 4 beginnt in der PRR und endet in der relativ konservierten C-terminalen Region des gp70. Die Sequenz des von Wang et al. beschriebenen rekombinanten Env-Proteins beginnt in diesem Bereich (WANG et al., 2004). Interessanterweise gibt es ein FeLV-Peptid, das ebenso wie Leucogen (p45) eine schützende Immunantwort (über nABs) auslöst und Katzen vor einer Infektion mit FeLV schützen konnte (WEIJER et al., 1993). Nach einem Vergleich der Peptid-Sequenz mit der PERV-gp70-Sequenz konnte ein großer homologer Bereich von AS 260–332 identifiziert werden. Dies entspricht nahezu der Sequenz des Fragmentes 4 bis zum Beginn des Proteins von Wang et al. (270–333). Fragment 4 könnte somit eine bedeutende Rolle bei der Induktion neutralisierender Antikörper spielen. Eine Expression von Fragment 4 ist daher sehr interessant. Möglicherweise könnte der Export des Proteinfragments in das Periplasma von *E. coli* durch ein Signalpeptid eine Expression ermöglichen und so den proteolytischen Abbau oder eine potenzielle Zytotoxizität verhindern.

Das Fragment 5 repräsentiert das C-terminale Ende der SU von PERV. Interessanterweise konnten Chiang et al. (CHIANG et al., 2007) durch Immunisierung mit dem Protein von Wang et al. (WANG et al., 2004) zwei neutralisierende monoklonale Antikörper herstellen, von denen der eine, wie bereits beschrieben, in der p15E-Region und der zweite (8E10) am C-terminalen Ende der Sequenz des hier verwendeten gp70-Fragments 5 bindet. Nur mit einem Serum der vier mit dem PERV-gp70-Fragment 5 immunisierten Ratten konnte ein neutralisierender Effekt detektiert werden. Die Induktion von neutralisierenden Antikörpern gegen das Epitop von 8E10 scheint dementsprechend nicht die Regel zu sein.

Ein signifikanter neutralisierender Effekt konnte nur durch die Immunisierung mit dem Proteinfragment 123 erreicht werden (mit Ausnahme Ratte 150.3, Abb. 4.29). Dieses Kombinationsfragment beinhaltet alle bekannten Regionen die für die Rezeptorbindung erforderlich sind.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Ziege 52 mit den gp70-Fragmenten 123 und 5 immunisiert. Hierdurch wurden signifikante neutralisierende Antikörper induziert, welche die PERV-Infektion der 293-Zellen bis zu einer Verdünnung von 1:40 zu nahezu 100% neutralisierten (Abb. 4.31).

Durch Immunisierung mit dem Kombinationsfragment 123 bzw. mit der, mit Ausnahme des Fragments 4, kompletten gp70-Sequenz konnten in zwei Spezies (Wistar-Ratte, Ziege) Seren mit erheblich höheren neutralisierenden Effekten induziert werden als mit den Einzelfragmenten. Daher wurde in den weiteren Versuchen die Generierung des gesamten gp70-Proteins angestrebt, um somit zusätzlich Antikörper gegen eventuelle Konformationsepitope zu induzieren.

5.2.3.2 Induktion bindender und neutralisierender Antikörper gegen PERV- und KoRV-gp70 auf Basis des rekombinanten p52

Bei dem phylogenetisch eng mit PERV und KoRV verwandten FeLV war es bereits gelungen, das Hüllprotein, einschließlich der ersten 34 AS der Transmembranproteins p15E, rekombinant herzustellen und als protektiven Impfstoff zu verwenden (MARCIANI et al., 1991). Auf Basis dieser Sequenz des unglykosilierten Proteins (p45) erfolgte die Konzeption, Klonierung und Expression der Hüllproteine von PERV und KoRV. Durch Immunisierung von Ratten und Ziegen mit den PERV- und KoRV-rp52-Proteinen konnten in allen Seren bindende Antikörper gegen die viralen gp70-Proteine sowie hohe Titer an neutralisierenden Antikörpern (90 bis 100%) induziert werden (Abb. 4.37 A, 4.33, 4.38, 4.34).

Auch durch Immunisierung mit dem transmembranen Hüllprotein p15E der Viren PERV, FeLV und KoRV wurden bereits neutralisierende Antikörper induziert (FIEBIG et al., 2003, LANGHAMMER et al., 2005, LANGHAMMER et al., 2006a, FIEBIG et al., 2006). Nach Immunisierung mit FeLV-p15E zeigten z.B. drei von sechs Katzen über einen Zeitraum von 2 Jahren eine protektive Immunantwort. Die Kombination von p15E mit Leucogen (p45) könnte somit einen verbesserten Impfstoff darstellen (LANGHAMMER, 2006b). Für das murine Leukämie Virus (MuLV) konnte ebenso gezeigt werden, dass Immunisierungen mit den Proteine gp70 und p15E zusammen effektiver sind als mit dem gp70-Protein allein (SCHWARZ et al., 1984). Basierend auf diesen Beobachtungen erfolgte zusätzlich eine Immunisierung von Ratten mit den p15E-Proteinen von PERV- und KoRV

jeweils einzeln und in Kombination mit den rp52-Proteinen. Durch Immunisierung mit dem rekombinanten PERV-p15E-Protein konnte nur im Serum eines Tieres signifikant neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 4.33). Dies steht im Widerspruch zu Daten von Fiebig et al., die hohe Neutralisation durch Immunisierung mit PERV-p15E erreichten (FIEBIG et al., 2003, FIEBIG, 2007). Weiterhin muss in diesem Zusammenhang eine mögliche Beeinflussung des Ergebnisses durch ein endogenes Ratten Retrovirus bedacht werden (vgl. 5.2.3.1). Durch die Doppelimmunisierung (PERV-rp52 und -p15E) gelang die Induktion neutralisierender Antikörper in drei von vier Tieren nur bis zu einer Serumverdünnung von 1:40 (Abb. 4.35). Die Doppelimmunisierung konnte die durch PERV-rp52 induzierten neutralisierenden Effekte (über 90%, bis zu einer Serumverdünnung von 1:80) somit nicht steigern.

Mit dem rekombinanten KoRV-p15E-Protein konnte bei allen getesteten Tieren nur bei einer Serumverdünnung von 1:10 eine signifikante Neutralisation der KoRV-Infektion bestimmt werden (Abb. 4.37 C). Im Gegensatz dazu wurden durch die Doppelimmunisierung mit KoRV-rp52 und KoRV-15E wie bei der Einzelimmunisierung mit KoRV-rp52 in allen Tieren neutralisierende Antikörper induziert. Deren Aktivität war bis zu einer Serumverdünnung von 1:80 signifikant nachzuweisen jedoch geringfügig schwächer als die durch die Einzelimmunisierung induzierten neutralisierenden Antikörper (Abb. 4.37 B).

Vergleichend lässt sich feststellen, dass im Rahmen dieser Untersuchung durch die Einzelimmunisierung mit den rekombinanten p52-Proteinen bessere Resultate hinsichtlich neutralisierender Aktivitäten erreicht wurden und sich die Daten von Schwarz et al. und Langhammer et al. hinsichtlich einer gesteigerten Neutralisation durch Immunisierung beider Antigene (gp70 und p15E, SCHWARZ et al., 1984, LANGHAMMER et al., 2006b) somit nicht uneingeschränkt auf die neutralisierenden Effekte auf eine *in vitro* Infektion mit PERV und KoRV übertragen lassen. Da die Untersuchungen jedoch in unterschiedlichen Systemen (Katze ↔ Ratte, natürlicher Wirt ↔ nicht natürlicher Wirt, unterschiedliche Adjuvansien) durchgeführt wurden und zudem eine Aktivierung eines endogenen Rattenvirus in den Versuchstieren nicht auszuschließen ist, ist ein direkter Vergleich nicht möglich.

Präventive Vakzinierung zukünftiger Transplantatempfänger mit rp15E?

Die in diesem Projekt durchgeführten Arbeiten zur Induktion PERV-neutralisierender Antikörper zeigten, dass ein Impfschutz gegen PERV auf Basis des gp70-Proteins möglich ist. Ob jedoch die allgemeinen Anforderungen an einen effektiven Impfstoff, wie die Induktion eines nahezu 100%igen Schutzes der Impflinge vor der Infektion durch möglichst alle Varianten des Erregers, lebenslanger Schutz mit nur minimalen Nebenwirkungen, kostengünstig produzierbar sowie leicht zu transportieren, zu lagern und zu applizieren, erfüllt werden, ist noch unklar. Nach derzeitigem Stand der Experimente erfüllt das zur Immunisierung eingesetzte rp52-Konstrukt jedoch die grundlegende Anforderung:

Bei 100% der Versuchstiere konnten Seren mit neutralisierender Aktivität induziert werden. Dieser Versuch wurde jedoch in einem artifiziellem System durchgeführt. Da kein geeignetes Tiermodell zur Verfügung stand, kann mit den erfolgten Versuchen keine

Aussage getroffen werden, ob die induzierten Antikörper einen effektiven Schutz vor einer Infektion des Organismus bieten. Mit dem im Rahmen dieser Arbeit rekombinant hergestellten KoRV-gp70-Protein sowie dem von Fiebig et al. beschriebenen KoRV-p15E bietet sich jedoch die Möglichkeit, die protektive Wirkung der Antigene für ein mit PERV phylogenetisch eng verwandtes Virus in einem Infektionsversuch mit Wistar-Ratten zu testen.

Porzine endogene Retroviren sind, wie bereits beschrieben, ein integraler Bestandteil des Genoms aller porziner Zellen (LE TISSIER et al., 1997). Obwohl aus PBMCs zahlreich getesteter Schweine auch nach Stimulation der PBMCs mit einem T-Zellmitogen keine porzinen endogenen Retroviren freigesetzt wurden (4.1.5), könnte eine Immunisierung gegen porzine Proteine möglicherweise zu unerwünschten Abstoßungsreaktionen des Transplantats führen.

5.2.3.3 DNA-Vakzinierung mit gp70 und gp85 von PERV und KoRV

DNA-Impfstoffe bieten den Vorteil, neben der Induktion von Antikörpern auch das zelluläre Immunsystem zu aktivieren. Die Präsentation der Antigene als MHC I -Komplex auf der Zelloberfläche führt zur Induktion einer zytotoxischen T-Zell-Antwort (JECHLINGER, 2006). Weitere Vorteile der DNA-Vakzinen sind deren zeitsparende und kostengünstige Produktion, sowie eine möglichst native Form des Antigens im Vergleich zum natürlichen viralen Protein. Durch die Expression des Antigens in den Zellen des Impflings durchläuft dieses z.B. die gleiche Glykosylierung wie das natürliche virale Protein im Zuge eines Replikationszyklus. In der Veterinärmedizin sind bereits einige DNA-Vakzine zu gelassen, wie z.B. ein DNA-basierter Impfstoff gegen das West Nil Virus für Pferde (POWELL, 2004). Auch in der Humanmedizin befinden sich derzeit zahlreiche DNA-Impfstoffe, wie z.B. gegen Melanome, in klinischen Studien (clinicaltrials.org, MD Anderson Cancer Center, Universität Texas).

Zur Induktion einer Immunantwort gegen eine trimere Form der viralen Hüllproteine, wodurch auch etwaige Konformationsepitope erkannt werden könnten, erfolgte eine DNA-Vakzinierung mit den gp70- und gp85-Sequenzen beider Viren (PERV, KoRV). Die Trimerisierung der PERV- und KoRV-gp70- und gp85-Proteine sollte durch die C-terminale Fusion der Trimerisierungsdomäne des Fibritins erreicht werden (TAO et al., 1997, LETAROV et al., 1999, YANG et al., 2000b, YANG et al., 2002). Für Retroviren wie HIV-1 wurde gezeigt, dass durch Immunisierung mit Hüllproteinen, die als Trimer vorliegen, höhere neutralisierende Antikörpertiter erzielt werden können als mit Monomeren (GRUNDNER et al., 2005, BOWER et al., 2006, LI et al., 2006a).

Durch DNA-Vakzinierung der beschriebenen Konstrukte konnten zwar in den Seren aller getesteten Tiere bindende Antikörper gegen die rekombinanten Proteine (PERV-p15E und -gp70 bzw. KoRV-p15E und -gp70) detektiert werden, jedoch nur sehr geringe Titer. Erwartungsgemäß wurde in einem anschließenden Neutralisationstest auch bei der geringen Verdünnung der Seren von 1:10 keine signifikante Neutralisation nachgewiesen. In den Sequenzierungsergebnissen der hergestellten Konstrukte fanden sich einige Punktmutationen, die zu Aminosäureaustauschen führten (Tab. 4.10). Zwei der Aminosäureaustausche (KoRV: Position 408 und 459) wurden bereits bei der aus dem Koala Birubi isolierten KoRV-Sequenz beschrieben (FIEBIG et al., 2006). Aufgrund der beschriebenen Aminosäureaustausche besteht die Möglichkeit der strukturellen

Veränderung potentiell für die Induktion von Antikörpern relevanter Epitope. Solche Veränderungen könnten die Induktion geringerer Antikörpertiter zur Folge haben.

Da bei DNA-Immunisierungen gegen HIV-1 bereits hohe neutralisierende Aktivitäten für sezernierte trimere Env-Proteine induziert werden konnten (SRIVASTAVA et al., 2003), wurden die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte so konzipiert, dass die Präsentation der gp70- und gp85-Trimere nicht auf der Zelloberfläche erfolgt, sondern diese von der Zelle sezerniert werden. Ein Nachweis der Trimerisierung *in vitro* im Zellkulturüberstand von 293-Zellen, die mit den verwendeten Konstrukten transfiziert wurden, befindet sich derzeit in der Durchführung. Durch weitere Versuche mit Konstrukten, welche aufgrund einer Transmembrandomäne zur Präsentation der gebildeten Proteintrimere auf der Zelloberfläche führen, könnte eine mögliche ursächliche Wirkung auf die niedrigen Antikörpertiter durch die Sekretion der Proteintrimere analysiert werden. Die untersuchten Seren wurden zwei Wochen nach der dritten Immunisierung gewonnen. Möglicherweise könnten weitere Immunisierungen zu einem höheren Titer an Antikörpern führen.