

**Xenotransplantation und porcine endogene
Retroviren (PERV): Evaluierung des Risikos und
Prävention der Virusübertragung**

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

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Britta Alexandra Dieckhoff

Berlin, Juli 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Kurth
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 01.10.2007

INHALTSVERZEICHNIS

	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	vi
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	ix
	TABELLENVERZEICHNIS	xi
1	EINLEITUNG	1
1.1	Xenotransplantation	1
1.1.1	Allotransplantation	1
1.1.2	Alternativen zur Allotransplantation	2
1.1.3	Das Schwein als favorisierte Organquelle für die Xenotransplantation	3
1.1.4	Potentielle Übertragung von porcinen Mikroorganismen	5
1.2	Retroviren	6
1.2.1	Taxonomie der Retroviren	7
1.2.2	Virusgenom	8
1.2.3	Aufbau der Retroviren	9
1.2.4	Das pathogene Potential von Retroviren	10
1.2.5	Porzine endogene Retroviren (PERV)	11
1.2.6	Hüllproteine von PERV und KoRV	14
1.3	RNA-Interferenz	15
1.3.1	Mechanismus der RNA-Interferenz	15
1.3.2	RNA-Interferenz in Säugetieren	16
1.4	Impfstoffe	16
1.4.1	Das Koala Retrovirus (KoRV) als potentielles Modellsystem für Impfstoffversuche in Ratten	17
1.4.2	Impfstoff gegen das virale Hüllprotein am Beispiel von FeLV	17
1.5	Zielsetzung der Arbeit	18
2	MATERIAL	20
2.1	Bakterienstämme	20
2.2	Enzyme	20
2.3	Oligonukleotide	20
2.4	Plasmide	23
2.5	Plasmidkonstrukte	23
2.6	Antikörper	24
2.7	DNA- und Protein-Längenstandards	25
2.8	Eukaryontische Zellen	25
2.9	Versuchstiere	25
2.10	Hersteller	26
3	METHODEN	27
3.1	Mikrobiologische Methoden	27
3.1.1	Stammhaltung von Bakterien	27

3.1.2	Kultivierung von Bakterien	27
3.1.3	Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen	27
3.1.4	Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation durch Hitzeschock	27
3.2	Molekularbiologische Methoden	28
3.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA	28
3.2.2	Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen und Gewebe	28
3.2.3	Isolierung genomischer DNA aus Ohrbiopsien	28
3.2.4	Phenol/Chloroform-Extraktion	29
3.2.5	Ethanolfällung von DNA-Lösungen	29
3.2.6	Isopropanolfällung von DNA-Lösungen	29
3.2.7	Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen und Gewebe	30
3.2.8	Isolierung von miRNAs (microRNA) aus eukaryontischen Zellen	30
3.2.9	Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen	30
3.2.10	cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase	31
3.2.11	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	31
3.2.12	<i>one-step</i> Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)	32
3.2.13	<i>real-time</i> PCR	33
3.2.14	SYBR GREEN <i>real-time</i> PCR	34
3.2.15	<i>one-step</i> RT (Reverse Transkriptase) <i>real-time</i> PCR	34
3.2.16	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	35
3.2.17	Ligation von DNA-Fragmenten mit der T4 DNA-Ligase	36
3.2.18	Agarosegelelektrophorese	36
3.2.19	Gelextraktion linearer DNA-Fragmente	36
3.2.20	DNA-Sequenzierung	36
3.2.21	Konstruktion und Markierung kleiner RNA-Sonden	37
3.2.22	Kalkulation der theoretischen spezifischen Aktivität der RNA-Sonde	38
3.2.23	Detektion von siRNAs	38
3.2.24	Präzipitation von DNA an Goldpartikel	38
3.3	Proteinchemische Arbeiten	39
3.3.1	Isolierung von Gesamtprotein aus eukaryontischen Zellen und Geweben	39
3.3.2	Bestimmung des Proteingehaltes	39
3.3.3	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	40
3.3.3.1	IPTG-induzierte Expression	40
3.3.3.2	Aufschluss der Bakterien	40
3.3.3.3	Affinitätschromatografische Aufreinigung rekombinanter Proteine	40
3.3.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	41
3.3.5	Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	41
3.3.6	Detektion von Glykoproteinen	42
3.3.7	Western-Blot-Analyse	42
3.3.8	Kolonie-Blot	43
3.3.9	ELISA (<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>)	43
3.3.10	Nachweis der Aktivität Reverser Transkriptase (RT)	44
3.4	Zellbiologische Methoden	44

3.4.1	Kultivierung eukaryontischer Zellen	44
3.4.2	Kryokonservierung eukaryontischer Zellen	45
3.4.3	Bestimmung der Vitalität und der Zellzahl mit Trypanblau	45
3.4.4	Isolierung porciner PBMC (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)	46
3.4.5	Mitogen-Stimulation porciner PBMCs	46
3.4.6	Transfektion eukaryontischer Zellen mit Plasmid-DNA	46
3.4.7	Herstellung lentiviraler Partikel	47
3.4.8	Bestimmung des Titers lentiviraler Vektoren	48
3.4.9	Fluoreszenzmikroskopie	48
3.4.10	Durchflusszytometrie	49
3.4.11	Erzeugung transgener Schweine	50
3.5	Immunologische Methoden	50
3.5.1	Immunisierung mit rekombinanten Proteinen	50
3.5.2	DNA-Vakzinierung	50
3.5.2	Neutralisationstest	51
4	ERGEBNISSE	53
4.1	Evaluierung des Risikos der PERV-Übertragung bei der Xenotransplantation	53
4.1.1	PERV-Provirusintegration in Schweinen verschiedener Rassen sowie transgenen und multitransgenen Schweinen	53
4.1.2	Etablierung eines <i>one-step</i> RT <i>real-time</i> PCR-assays zur relativen Quantifizierung von PERV-mRNA	54
4.1.3	PERV-Expression in Schweinen verschiedener Rassen sowie transgenen und multitransgenen Schweinen	55
4.1.4	PERV-Expression in unterschiedlichen Organen eines Tieres	58
4.1.5	Simulation einer Immunantwort porciner Zellen <i>in vitro</i>	59
4.1.6	Untersuchungen zur PERV-Übertragung nach Transplantation porciner Inselzellen auf Cynomolgus-Affen	61
4.1.7	PERV-Expression in Melanomen der Münchner Miniatur Schweine Troll	63
4.1.7.1	Morphologie sowie histologische und immunhistochemische Charakterisierung der Melanome	64
4.1.7.2	Melanom-Marker	65
4.1.7.3	PERV-Provirusintegration im Genom der MMS Troll	66
4.1.7.4	PERV-Expression in porcinen Melanomen	66
4.1.7.5	PERV-Expression in Lungenmetastasen-abgeleiteten Melanomzellen	68
4.1.7.6	PERV-Proteinexpression in primären Tumoren und Melanomzellkulturen	69
4.1.7.7	Freisetzung viraler Partikel aus Melanomzellen	70
4.2	Prävention der PERV-Übertragung bei der Xenotransplantation	72
4.2.1	Hemmung der PERV-Expression in primären porcinen Zellen mittels RNA-Interferenz und lentiviralen Vektoren	72
4.2.1.1	Lentivirale Expressionsvektoren	72
4.2.1.2	PERV-Provirusintegration und -Expression in porcinen Fibroblasten SE105, SE101 und PFF P1 F10	73

4.2.1.3	Transduktion porziner Fibroblasten und PK-15-Zellen mit lentiviralen Partikeln	74
4.2.1.4	pol2-shRNA-vermittelte Hemmung der PERV-Expression in primären porzinen Zellen sowie PK-15- Zellen	75
4.2.1.5	Hemmung der PERV-Expression auf Proteinebene	76
4.2.1.6	Reduzierte RT-Aktivität in den Überständen transduzierter Zellen	77
4.2.2	Generierung shRNA-transgener Schweine mittels Nukleus-Transfer	78
4.2.2.	Expression der pol2-shRNA <i>in vivo</i>	79
4.2.2.2	pol2-shRNA-vermittelte Hemmung der PERV-Expression <i>in vivo</i>	80
4.2.3	Induktion neutralisierender Antikörper gegen PERV- und KoRV-Hüllproteine	81
4.2.3.1	Immunisierung mit rekombinanten PERV-gp70-Proteinfragmenten	81
4.2.3.2	Immunisierung mit rekombinatem PERV- bzw. KoRV-rp52	85
4.2.3.3	DNA-Vakzinierung mit gp70 und gp85 von PERV und KoRV	95
5	DISKUSSION	98
5.1	Evaluierung des PERV-Übertragungsrisikos bei der Xenotransplantation	99
5.1.1	PERV-C-Provirusintegration in Schweinen verschiedener Rassen sowie transgenen und multitransgenen Schweinen	99
5.1.2	Normalisierung und relative Quantifizierung von PERV-mRNA	101
5.1.3	Variable PERV-Expression in Schweinen verschiedener Rassen sowie transgenen und multitransgenen Schweinen	103
5.1.4	Variable PERV-Expression in unterschiedlichen Organen eines Tieres	104
5.1.5	Keine PERV-Freisetzung nach Simulation einer Immunantwort porziner Zellen <i>in vitro</i>	105
5.1.6	Keine PERV-Übertragung nach Transplantation porziner Inselzellen auf Cynomolgus-Affen	107
5.1.7	Erhöhte PERV-Expression in Melanomen der Münchner Miniatur Schweine Troll	108
5.2	Prävention der PERV-Übertragung bei der Xenotransplantation	111
5.2.1	RNA-Interferenz-vermittelte PERV-Expression in porzinen Zellen	111
5.2.2	Hemmung der PERV-Expression in shRNA-transgenen Schweinen	114
5.2.3	Induktion neutralisierender Antikörper gegen PERV und KoRV	116
5.2.3.1	Induktion bindender und neutralisierender Antikörper gegen PERV-gp70-Proteinfragmente	118
5.2.3.2	Induktion bindender und neutralisierender Antikörper gegen PERV- und KoRV-gp70 auf Basis des rekombinanten p52	121
5.2.3.3	DNA-Vakzinierung mit gp70 und gp85 von PERV und KoRV	123
6	ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	125
6.1	Zusammenfassung	125
6.2	Summary	126

LITERATURVERZEICHNIS	I
ANHANG	a
VERWENDETE PLASMIDE	a
PUBLIKATIONEN	f
ABSTRACTS	f
LEBENS LAUF	g
DANKSAGUNG	h

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Die in dieser Arbeit verwendeten ein- und dreibuchstabigen Abkürzungen sowie alle physikalischen Größen entsprechen der Konvention der „International Union for Biochemistry (LIÉBECQ, 1978). Grundsätzlich werden die international üblichen chemischen Symbole und Abkürzungen der SI-Einheiten (Systeme International d'Unites) benutzt.

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Accnr.	<i>Accession number</i>
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
anti-	Antikörper gegen
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
BCA	<i>bicinchonic acid</i>
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaare (engl.: <i>base pairs</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i>)
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	circa
CBP	Calmodulin Bindeprotein
Ci	Curie (1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Zerfälle pro Sekunde)
cpm	Zerfälle pro Minute (engl.: <i>counts per minute</i>)
CT	<i>threshold cycle</i>
CTP	Cytosin-5´-triphosphat
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosin-5´-triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5´-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-5´-triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-5´-triphosphat
ds	doppelsträngig
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immuntest (engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	Fötales Rinderserum
FCS	fötale Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
xg	Erdbeschleunigungskonstante $9,8 \text{ m/s}^2$
G	Guanin
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GP	Glykoprotein
h	Stunde

HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HERV	Humanes endogenes Retrovirus
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
IPTG	Isopropyl- β -thiogalaktosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
Lsg.	Lösung
LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	Molarität
ml	Milliliter
mA	Milliampere
MCS	multiple Klonierungsstelle (engl.: <i>multiple cloning site</i>)
min	Minute
mol	$6,3 \times 10^{23}$ Teilchen
mRNA	Boten-RNA (engl.: <i>messenger RNA</i>)
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NEAA	nicht essentielle Aminosäuren
ng	Nanogramm
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (engl.: <i>open reading frame</i>)
ori	Replikationsursprung (engl.: <i>origin of replication</i>)
p	pico
P	Protein
³² P	Radioisotop 32 des Phosphors
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PHA	Phytohämagglutin
POD	Peroxidase
Pol	Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute (engl.: <i>rotation per minute</i>)
RT	Reverse Transkriptase oder Raumtemperatur
SA	Spleißakzeptor
SD	Spleißdonor
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodiumdodecylsulfat</i>)
sek	Sekunden
spez. Akt.	spezifische Aktivität
ssDNA	einzelsträngige DNA (engl.: <i>single stranded DNA</i>)
suppl.	supplementiert
SV40	Affenvirus 40 (engl.: <i>simian virus 40</i>)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylendiamin
Tris	Trishydromethylaminomethan
tRNA	Transfer-RNA (engl.: <i>transfer RNA</i>)
U	Einheit (engl.: <i>unit</i>)
UE	Untereinheiten
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett

V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht (engl.: <i>weight</i>) pro Volumen
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-indolyl-D-Galaktosid
μ	micro

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1	Genomorganisation der Retroviren	9
Abb. 1.2	Schematische Darstellung der Morphologie eines γ -Retrovirus	10
Abb. 1.3	Schematische Darstellung des PERV-Hüllproteins	14
Abb. 4.1	Bestimmung der Effizienz der <i>one-step</i> RT <i>real-time</i> PCR	55
Abb. 4.2	Relative PERV-Expression in PBMCs unterschiedlicher Schweinerassen innerhalb eines Wurfes	56
Abb. 4.3	Relative PERV-Expression in unterschiedlichen Organen transgener Tiere	58
Abb. 4.4	Relative PERV-Expression in unterschiedlichen Organen Deutscher Landrasse Schweinen	59
Abb. 4.5	Serologische Analyse der untersuchten Cynomolgus-Affen hinsichtlich PERV-spezifischer Antikörper	63
Abb. 4.6	Melanome und Metastasen der MMS Troll	64
Abb. 4.7	Histologische und immunhistochemische Analyse eines kutanen Melanoms und einer Lymphknotenmetastase	65
Abb. 4.8	Expression porciner Tyrosinase in Melanomen, Lymphknoten mit Metastase und unverändertem Gewebe von vier verschiedenen MMS	65
Abb. 4.9	PERV-Provirusintegration und PERV-A/C-Rekombination	66
Abb. 4.10	PERV-Expression im Melanom des Tieres #372	67
Abb. 4.11	PERV-Expression in Melanomen und unveränderten Geweben von vier verschiedenen MMS Troll	67
Abb. 4.12	PERV-Expression in Melanomzellen unterschiedlicher Passagen	68
Abb. 4.13	Unveränderte LTR-Länge während der Passagierung der Lungenmetastasen-abgeleiteten Melanomzellkultur	68
Abb. 4.14	Nachweis der Expression des p15E-Proteins	69
Abb. 4.15	Detektion des viralen p15E-Proteins in Lungenmetastasen abgeleiteten Melanomzellen der 87. Passage	70
Abb. 4.16	PERV-Partikel-Freisetzung aus den Lungenmetastasen-abgeleiteten Melanomzellen	70
Abb. 4.17	Detektion von PERV-Partikeln in Lungenmetastasen abgeleiteten Melanomzellen der 93. Passage	71
Abb. 4.18	Schematische Darstellung der lentiviralen Vektoren RRL-pGK-GFP und pLVTHM	73
Abb. 4.19	PERV-Provirusintegration und -Expression in fötalen porzinen Fibroblasten und PK-15-Zellen	74
Abb. 4.20	pLVTHM-pol2-transduzierte und nicht-transduzierte porcine Fibroblasten	75
Abb. 4.21	Hemmung der PERV-Expression in porcinen fötalen Fibroblasten	76
Abb. 4.22	Hemmung der PERV-Expression in PK-15-Zellen	76
Abb. 4.23	Expression des viralen p27Gag in transduzierten PK-15-Zellen	77
Abb. 4.24	RT-Aktivität in den Überständen von PK-15-Zellen	78
Abb. 4.25	Nachweis der Transgen-Integration im Genom pol2- transgenen Ferkel 6 und 7	79
Abb. 4.26	Nachweis pol2-shRNA-Expression <i>in vivo</i> in unterschiedlichen Organen der pol2-shRNA-transgenen Ferkel 6 und 7	79
Abb. 4.27	Hemmung der PERV-Expression unterschiedlichen Organen der pol2-shRNA-transgenen Ferkel 6 und 7	80
Abb. 4.28	PERV-gp70-Detektion mit den Seren der mit gp70-Fragmenten immunisierten Ratten	82
Abb. 4.29	Neutralisierende Effekte der Immunsere der Rattegruppen 142, 143, 149 und 150	83
Abb. 4.30	PERV-gp70-Detektion mit den Seren der mit den gp70-Fragmenten sowie rp52 immunisierten Ziegen	84
Abb. 4.31:	Neutralisierende Effekte des Serums der mit PERV-gp70-Proteinfragmenten immunisierten Ziege 52	85

Abb. 4.32:	Detektion der PERV-Proteine gp70 und p15E mit den Immunsereen der Rattengruppen 213, 214, 215 und der Ziege 62	89
Abb. 4.33:	Neutralisierende Effekte der Immunsereen der Rattengruppen 213 (p15E) und 214 (rp52)	90
Abb. 4.34:	Neutralisierende Effekte des Serums der mit PERV-rp52 immunisierten Ziege 62	91
Abb. 4.35:	Neutralisierende Effekte der Immunsereen der Rattengruppe 215 (rp52 & p15E)	91
Abb. 4.36:	Detektion der KoRV-Proteine Gp70 und p15E mit den Immunsereen der Rattengruppen 210 und Ziege 61	92
Abb. 4.37:	Neutralisierende Effekte der Immunsereen der Rattengruppen 210 (KoRV- rp52), 211 (KoRV-rp52 + p15E) und 212 (KoRV-p15E)	93
Abb. 4.38:	Neutralisierende Effekte des Serums der mit KoRV-rp52 immunisierten Ziege 61	94
Abb. 4.39:	Kreuzneutralisierende Effekte der Ziegensereen 52, 61 und 62	95
Abb. 5.1:	Phylogenetischer Stammbaum einiger Retroviren	117

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1.1	Charakteristische Vertreter der Retroviren	7
Tab. 2.1	Bakterienstämme	20
Tab. 2.2	Verwendete Enzyme	20
Tab. 2.3	Verwendete Oligonukleotide	21
Tab. 2.4	Verwendete Plasmide	23
Tab. 2.5	Generierte Plasmidkonstrukte	24
Tab. 2.6	Verwendete Antikörper und Antiseren	24
Tab. 2.7	Verwendete Längenstandards	25
Tab. 2.8	Verwendete Zelllinien und primäre Zellen	25
Tab. 2.9	Versuchstiere	26
Tab. 2.10	Hersteller	26
Tab. 3.1	Komponenten eines Standard-PCR-Ansatzes	31
Tab. 3.2	Komponenten eines <i>one-step</i> RT-PCR-Ansatzes	32
Tab. 3.3	Komponenten eines <i>real-time</i> PCR-Ansatzes	33
Tab. 3.4	Komponenten eines SYBR GREEN <i>real-time</i> PCR-Ansatzes	34
Tab. 3.5	Komponenten eines <i>one-step</i> RT <i>real-time</i> PCR-Ansatzes	34
Tab. 3.6	Komponenten und Temperaturbedingungen eines Sequenzierungsansatzes	37
Tab. 3.7	Konzipierung der pol2-shRNA-Sonde	37
Tab. 3.8	Komponenten eines Sammel- und Trenngels für die SDS-Acrylamidgelelektrophorese	41
Tab. 3.9	Supplemente der Medien DMEM und RPMI	45
Tab. 3.10	Plasmide für die Herstellung lentiviraler Partikel	48
Tab. 3.11	Appikationsschema für die Immunisierung von Ratten und Ziegen	50
Tab. 4.1	PERV-C-Status der getesteten Schweine verschiedener Rassen	53
Tab. 4.2	PERV-C-Status der getesteten transgenen Schweine	54
Tab. 4.3	Relative PERV-Expression in den PBMCs der getesteten Schweine	57
Tab. 4.4	Vergleich der relativen PERV-Expression PHA-stimulierter und nicht stimulierter PBMCs transgener Schweine	60
Tab. 4.5	Befunde der serologischen Analysen der transplantierten Cynomolgus-Affen	62
Tab. 4.6	Phänotypen der untersuchten MMS Troll hinsichtlich Melanom- und Metastasenausbildung	64
Tab. 4.7	Übersicht der mit PERV-gp70-Proteinfragmenten immunisierten Rattengruppen	82
Tab. 4.8	Ermittelte Spannen der Sequenzen für rp52 von PERV und KoRV	86
Tab. 4.9	Übersicht der mit PERV-rp52 und -p15E sowie KoRV-rp52 und -p15E immunisierten Rattengruppen und Ziegen	88
Tab. 4.10	Aminosäureaustausche in Folge von Punktmutationen in den gp70- und gp85-Sequenzen von PERV und KoRV	96
Tab. 4.11	Übersicht der DNA-Immunisierungen	97
Tab. 5.1	Vergleich der <i>house keeping</i> Gene HPRT, GAPDH und Cyclophilin	103