

4 ERGEBNISSE

4.1 Evaluierung des Risikos der PERV-Übertragung bei der Xenotransplantation

4.1.1 PERV-Provirusintegration in Schweinen verschiedener Rassen sowie transgenen und multitransgenen Schweinen

Aufgrund hoher Sequenzhomologien der PERV-Subtypen besteht 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., 2003). Um das Risiko einer solchen Rekombination hinsichtlich der Xenotransplantation zu minimieren, ist die Auswahl PERV-C-negativer Schweine von bedeutendem Interesse.

Zur Einschätzung der PERV-C-Verteilung in den Schweinebeständen der Kooperationspartner der DFG-Transregioforscherguppe „Xenotransplantation“ (Prof. Dr. Niemann, Institut für Tierzucht, Mariensee und Prof. Dr. Wolf, Institut für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, Ludwig-Maximilian-Universität, München) wurden Schweine verschiedener Rassen sowie zahlreiche transgene, für die Xenotransplantation relevante, Schweine verschiedener Kreuzungen hinsichtlich ihres PERV-Provirusintegrationsstatus untersucht. Hierfür standen Primer zur Verfügung, die die Unterscheidung der PERV-Subtypen A, B und C ermöglichten. Die benötigte DNA der Tiere wurde aus Ohrbiopsien, Vollblut oder isolierten PBMCs gewonnen und mittels PCR analysiert.

Die Proviren PERV-A und -B konnten erwartungsgemäß im Genom aller untersuchten Schweine nachgewiesen werden. Von den 184 analysierten Schweinen wurden 5 Tiere PERV-C-negativ getestet (Tabellen 4.1, 4.2).

Tabelle 4.1: PERV-C-Status der getesteten Schweine verschiedener Rassen

Rasse	Bezugsquelle	Zahl getesteter Tiere, $\Sigma = 81$	Zahl PERV-C-negativer Tiere
Deutsche Landrasse (DL)	Prof. Dr. Wolf, München	19	1
Duroc	Prof. Dr. Wolf, München	12	0
DL x Duroc bzw. Duroc x DL	Prof. Dr. Wolf, München	22	0
Schwäbisch-Hällisch	Prof. Dr. Wolf, München	10	0
Wildschweine	Dr. Jansen, RKI	18	0

Diese wurden zur Verifizierung des Ergebnisses mit Hilfe eines weiteren Primer-Sets sowie der *real-time* PCR analysiert. Hierfür wurde ein Duplex-Assay entwickelt, der es ermöglicht, den Anteil des PERV-Subtyps C an der gesamten Provirusintegration zu ermitteln. Auch mit dieser Nachweismethode wurden keine PERV-C-Sequenzen detektiert. Eines der PERV-C-negativen Tiere gehörte der „Deutschen Landrasse“ (DL) an, die anderen vier Tiere stammten aus Kreuzungen, die bis zu 50% DL enthielten.

Tabelle 4.2: PERV-C-Status der getesteten transgenen Schweine

*Im Gegensatz zu den anderen hDAF-transgenen Tieren wurden diese Tiere nicht mittels Mikroinjektion sondern mit Hilfe lentiviraler Vektoren generiert.

Transgene	Zahl getesteter Tiere, $\Sigma = 103$	Zahl PERV-C- negativer Tiere
GFP	1	0
TRAIL	13	0
HLA E	11	0
hDAF	22	1
Lenti-DAF*	5	2
TRAIL / HLA E	9	0
TRAIL / hDAF	22	1
HLA E / hDAF	6	0
TRAIL / HLA E / hDAF	6	0
hCD55, hCD59	1	0
hCD59, TRAIL	2	0
α -MHC	2	0

4.1.2 Etablierung eines *one-step RT real-time PCR-assays* zur relativen Quantifizierung von PERV-mRNA

Zur Quantifizierung von PERV-mRNA wurde ein *one-step RT real-time PCR-assay*, der die cDNA-Synthese und die anschließende Amplifikation in einem Schritt vereint, basierend auf dem SUPERSRIPT™ III PLATINUM® ONE-STEP QRT-PCR KIT etabliert.

Primer und Sonde für die PERV *one-step RT real-time PCR* wurden von Uwe Fiebig übernommen (FIEBIG, 2007). Sie binden im *pol*-Gen und ermöglichen somit die Detektion viraler Vollängen-RNA. Die empfohlenen Konzentrationen von 10 μ M für die jeweiligen Primer und die Sonde erwiesen sich als optimal.

Zur Bestimmung der Effizienz der Reaktion mit den verwendeten Primern wurde eine Standardgerade erstellt. Für genaue und reproduzierbare Resultate sollte die Effizienz annähernd 100% betragen. Aus den C_T -Werten bei definierten Verdünnungen des *templates* lässt sich eine Standardgerade errechnen, über deren Steigung sich die Effizienz der Reaktion bestimmen lässt. Die Darstellung der Geraden zeigt die Verschiebung des C_T -Wertes um ungefähr einen Zyklus bei der Verdünnung der *template* RNA (PK-15-RNA) um 50%. Dies spiegelt die Verdopplung der *template* Menge während eines Zyklus wieder (Abb. 4.1). Die Effizienz errechnet sich aus der Steigung der Standardgeraden (102,0%). Das Bestimmtheitsmaß RSq (*R square*) gibt das Quadrat des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten an, ein dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei intervallskalierten Merkmalen. Er kann lediglich Werte zwischen -1 und 1 annehmen, bei einem Wert von +1 (bzw. -1) besteht ein vollständig positiver (bzw. negativer) linearer Zusammenhang. Wenn der Korrelationskoeffizient den Wert 0 aufweist, hängen die beiden Merkmale nicht linear voneinander ab. Liegt das Bestimmtheitsmaß nahe dem Idealwert 1, wie in diesem Fall bei 0,985, ist die ermittelte Standardgerade verlässlich. Die Effizienz der Reaktion wurde mit Hilfe der Standardkurven-Berechnung der MX4000 *software* bestimmt.

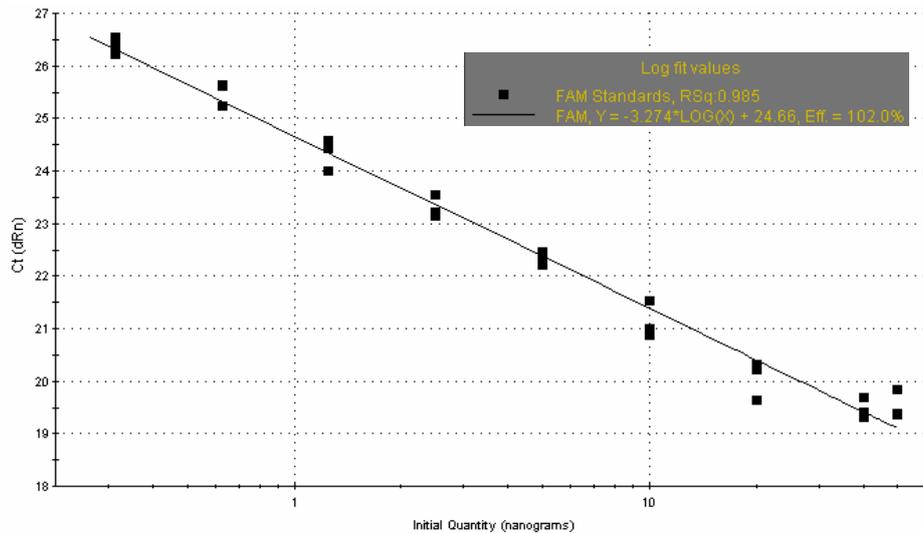


Abbildung 4.1: Bestimmung der Effizienz der *one-step* RT *real-time* PCR

Standardgerade der PK-15-RNA-Ausverdünnung, dargestellt sind die CT-Werte in Abhängigkeit der eingesetzten *template* Menge. RSq: Bestimmtheitsmaß

Davon ausgehend, dass die Effizienz, mit der die einzelnen Reaktionen in den zu untersuchenden Proben ablaufen, immer gleich ist, lässt sich die PERV-Expression relativ zu einem Kalibrator (z.B. RNA einer Zelllinie oder von unbehandelten Zellen) mit einer Modifizierung der $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ -Methode (LIVAK UND SCHMITTGEN, 2001) bestimmen. Die Normalisierung der PERV-Expression erfolgte auf die Menge der eingesetzten Gesamt-RNA oder auf die Expression unterschiedlicher porziner *house keeping* Gene. Hierfür wurden die von Duvigneau et al konzipierten Primer und Sonden für die porzinen Gene GAPDH, Cyclophilin und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) verwendet (DUVIGNEAU et al., 2005) und auf die *one-step* RT *real-time* PCR angepasst. Keines der verwendeten Gene eignete sich uneingeschränkt für die Normalisierung, da die 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 (5.1.2). Die Art der Normalisierung wurde für 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.

4.1.3 PERV-Expression in Schweinen verschiedener Rassen sowie transgenen und multitransgenen Schweinen

Wie bereits beschrieben, variiert die Expression von PERV-mRNA zwischen verschiedenen Schweinestämmen (TACKE et al., 2000b, TACKE et al., 2003). Diese Tatsache bildet die Grundlage für eine weitere Strategie zur Minimierung des PERV-Übertragungsrisikos hinsichtlich der Xenotransplantation: die Auswahl von Schweinerassen, die wenig PERV exprimieren und freisetzen.

Zur Einschätzung der PERV-Expression in den Schweinebeständen des DFG-Transregioprojekts „Xenotransplantation“ wurden Schweine verschiedener Rassen sowie

zahlreich generierte transgene, für die Xenotransplantation relevante, Schweine verschiedener Kreuzungen hinsichtlich ihrer PERV-Expression untersucht.

Die hierfür benötigte RNA der Tiere wurde aus Vollblut oder isolierten PBMCs gewonnen und mit Hilfe der in Kapitel 3.1.2 beschriebenen *one-step RT real-time PCR* analysiert. Abbildung 4.2 zeigt die relative PERV-Expression in Würfen der Rassen Duroc (Du), Deutsche Landrasse (DL) und Schwäbisch-Hällisch (SH) sowie im Wurf einer Kreuzung der Rassen Duroc und Deutsche Landrasse (Du x DL).

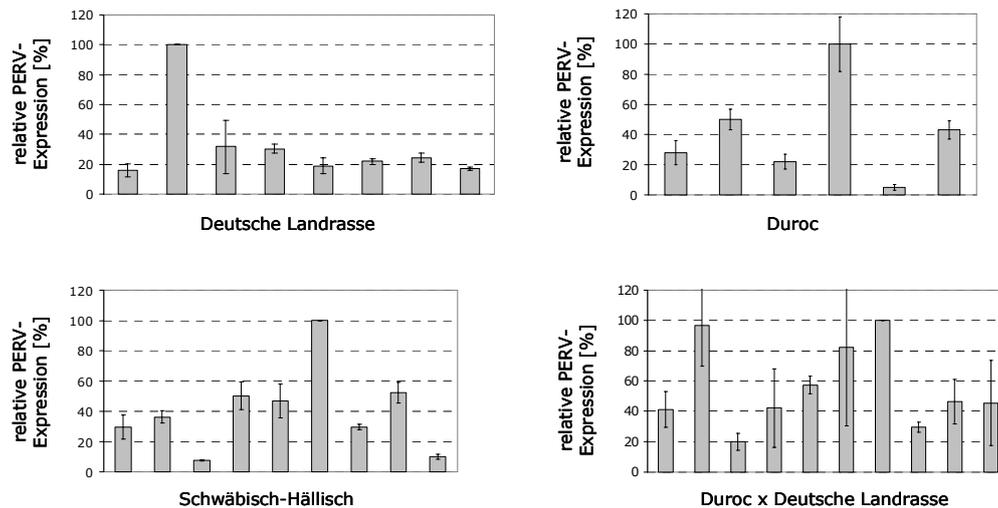


Abbildung 4.2: Relative PERV-Expression in PBMCs unterschiedlicher Schweinerassen innerhalb eines Wurfes

Die Daten wurden mittels *one-step RT real-time PCR* erhoben. Die jeweils höchste PERV-Expression innerhalb eines Wurfes wurde gleich 100% gesetzt und die PERV-Expressionen der anderen Tiere des Wurfes darauf bezogen. Normalisiert wurden die Daten auf die eingesetzte Menge Gesamt-RNA.

Die jeweils höchste PERV-Expression wurde gleich 100% gesetzt und die PERV-Expressionen der anderen Tiere des Wurfes darauf bezogen. Normalisiert wurden die Daten auf die eingesetzte Menge Gesamt-RNA. In allen Würfen konnte eine variable PERV-Expression ermittelt werden (Abb. 4.2).

In Tabelle 4.3 sind die relativen PERV-Expressionen der PBMCs der untersuchten Tiere in Bezug auf die Zelllinien PK-15 und 293/5° sowie deren Geschwisterverhältnisse dargestellt. Im Vergleich zu diesen Zelllinien lag die PERV-Expression der untersuchten Schweinerassen unter 2% (PK-15) bzw. 1% (293/5°). Zwischen den getesteten Schweinerassen bzw. Kreuzungen war kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der PERV-Expression zu beobachten.

Auch die untersuchten transgenen Tiere der Kreuzungen Deutsches Edelschwein (DE) x Minipig (MP) x Duroc (Du) zeigten eine variable PERV-Expression innerhalb der Würfe. Im Vergleich zu den Zelllinien PK-15 und 293/5° lag die PERV-Expression der untersuchten transgenen Schweine unter 7% (PK-15) bzw. 2% (293/5°). Die PERV-Expression in den PBMCs der Tiere dieser transgenen Kreuzung ist im Vergleich zu den bereits beschriebenen Tieren der Rassen Du, DL, Du x DL und SH leicht erhöht (Tab. 4.3). Nicht transgene Tiere der Rassen DE und MP standen leider nicht zur Verfügung.

Tabelle 4.3: Relative PERV-Expression in den PBMCs der getesteten Schweine

Die Daten wurden mittels *one-step* RT *real-time* PCR erhoben. Die PERV-Expression der Zelllinien PK-15 bzw. 293/5° wurden gleich 100% gesetzt und die PERV-Expressionen der Tiere des jeweiligen Wurfes darauf bezogen (% von PK-15, % von 293/5°). Zusammengehörende Würfe sind durch Striche voneinander abgegrenzt. Stabw: Standardabweichung)

Tier	Rasse / Kreuzung	Transgene	% von PK-15	Stabw.	% von 293/5°	Stabw.
X42	Du x DL	-	0,23	0,06	0,04	0,002
X43	Du x DL	-	0,53	0,15	0,09	0,005
X44	Du x DL	-	0,14	0,04	0,02	0,002
X46	Du x DL	-	0,21	0,06	0,03	0,002
X47	Du x DL	-	0,28	0,08	0,04	0,003
X48	Du x DL	-	0,30	0,09	0,05	0,01
X49	Du x DL	-	0,47	0,13	0,07	0,01
X50	Du x DL	-	0,16	0,04	0,03	0,002
X51	Du x DL	-	0,22	0,07	0,04	0,01
X53	Du x DL	-	0,23	0,06	0,04	0,002
Y54	DL	-	0,17	0,05	0,03	0,002
Y55	DL	-	1,21	0,33	0,19	0,01
Y56	DL	-	0,38	0,10	0,06	0,004
Y58	DL	-	0,39	0,10	0,07	0,004
Y59	DL	-	0,26	0,07	0,04	0,002
Y60	DL	-	0,26	0,07	0,05	0,004
Y61	DL	-	0,31	0,08	0,05	0,002
Y62	DL	-	0,21	0,03	0,03	0,002
Z65	SH	-	0,69	0,19	0,11	0,01
Z66	SH	-	0,70	0,19	0,12	0,01
Z67	SH	-	0,16	0,04	0,02	0,001
Z68	SH	-	1,00	0,31	0,16	0,03
Z69	SH	-	1,07	0,30	0,17	0,01
Z70	SH	-	2,09	0,57	0,33	0,02
Z71	SH	-	0,62	0,17	0,10	0,01
Z72	SH	-	0,98	0,27	0,16	0,01
Z73	SH	-	0,22	0,06	0,04	0,002
9426	MP x Du x DL	TRAIL, hDAF	6,07	1,67	0,97	0,06
9427	MP x Du x DL	HLAE	1,49	0,46	0,24	0,04
9432	MP x Du x DL	HLAE	5,12	1,39	0,82	0,04
9493	DE x MPx Du x DL	-	1,64	0,45	0,26	0,02
9496	DE x MPx Du x DL	TRAIL, hDAF	1,98	0,62	0,32	0,05
9501	DE x MPx Du x DL	hDAF	1,43	0,39	0,35	0,07
9502	DE x MPx Du x DL	TRAIL, hDAF	1,20	0,34	0,38	0,02
9504	DE x MPx Du x DL	hDAF	0,64	0,21	0,17	0,01
9506	DE x MPx Du x DL	hDAF	1,36	0,37	0,47	0,06
9507	DE x MP x Du	hDAF	1,69	0,46	0,27	0,01
9508	DE x MP x Du	hDAF	1,84	0,53	0,29	0,03
9509	DE x MP x Du	hDAF	1,42	0,40	0,23	0,02
9511	DE x MP x Du	TRAIL, hDAF	2,95	0,81	0,47	0,03
9513	DE x MP x Du	TRAIL, hDAF	6,94	1,88	1,11	0,06
9515	DE x MP x Du	hDAF	0,93	0,30	0,15	0,03
9517	DE x MP x Du	hDAF	1,32	0,37	0,21	0,02
9518	DE x MP x Du	hDAF	0,63	0,19	0,10	0,01
9519	DE x MP x Du	hDAF	2,69	0,73	0,43	0,02
9520	DE x MP x Du	HLAE, hDAF	1,53	0,41	0,24	0,01
9521	DE x MP x Du	HLAE, hDAF	1,16	0,32	0,18	0,01
9523	DE x MP x Du	hDAF	4,02	1,09	0,64	0,03
9524	DE x MP x Du	HLAE, hDAF	2,14	0,58	0,34	0,02
9525	DE x MP x Du	hDAF	3,33	0,97	0,53	0,06
9526	DE x MP x Du	hDAF	3,40	0,92	0,54	0,03
9527	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE, hDAF	2,20	0,60	0,35	0,02

Tier	Rasse / Kreuzung	Transgene	% von PK-15	Stabw.	% von 293/5°	Stabw.
9528	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE, hDAF	2,25	0,62	0,36	0,02
9529	DE x MP x Du	HLAE, hDAF	1,23	0,33	0,20	0,01
9530	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE, hDAF	1,50	0,41	0,24	0,01
9075	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE	3,54	1,12	0,56	0,09
9077	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE	6,0	1,63	0,96	0,05
9228	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE	8,19	2,82	1,30	0,28
9232	DE x MP x Du	TRAIL	0,74	0,21	0,12	0,01
9482	DE x MP x Du	TRAIL, hDAF	4,54	1,71	0,72	0,19
9582	MP x Du x DL	HLAE, CD46	2,67	0,83	0,43	0,07

4.1.4 PERV-Expression in unterschiedlichen Organen eines Tieres

Die PERV-Expression variiert 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). Bei diesen Untersuchungen konnte bei Miniaturschweinen sowie *Large White* Schweinen jeweils im Pankreas die geringste PERV-Expression und in Thymus, Lunge und Niere die höchste PERV-Expression detektiert werden.

Zur Einschätzung der PERV-Expression in unterschiedlichen porcinen Organen wurden drei transgene Schweine der Rassen Deutsche Landrasse (DL) und DL x Minipig sowie fünf nicht transgene Schweine der Rassen DL hinsichtlich ihrer PERV-Expression untersucht. Die hierfür benötigte RNA wurde anhand einer kombinierten Methode mit Hilfe von TRI REAGENT und des RNEASY MINI KITS (3.2.7) aus den zur Verfügung stehenden Organen gewonnen und mit Hilfe der in Kapitel 3.1.2 beschriebenen *one-step RT real-time* PCR analysiert. Die Integrität der isolierten RNA wurde zuvor mit Hilfe einer *one-step* RT-PCR unter Verwendung GAPDH-spezifischer Primer überprüft.

Bei den transgenen Tieren # 366 (hCD55, hCD59, DL), #374 (hCD59, TRAIL, DL x Minipig) und #375 (hCD59, TRAIL, DL x Minipig) konnte jeweils in der Lunge die höchste PERV-Expression bestimmt werden (Abb. 4.3).

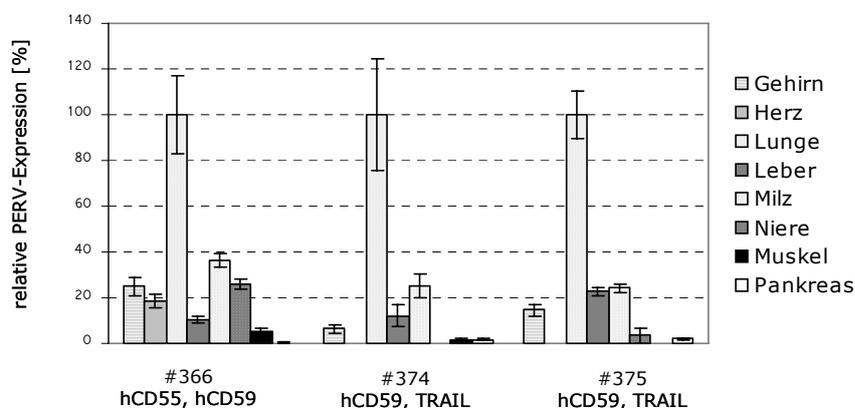


Abbildung 4.3: Relative PERV-Expression in unterschiedlichen Organen transgener Tiere

Die Daten wurden mittels *one-step RT real-time* PCR erhoben. Die höchste PERV-Expression des jeweiligen Organs eines Tieres (Lunge) wurde gleich 100% gesetzt und die PERV-Expressionen der anderen Organe des Tieres darauf bezogen. Normalisiert wurden die Daten auf die eingesetzte Menge Gesamt-RNA.

Die Expression in der Lunge des jeweiligen Tieres wurde gleich 100% gesetzt und die PERV-Expressionen der anderen Organe des Tieres darauf bezogen. Bei den nicht transgenen DL Tieren (1 bis 5) wurde die jeweils höchste PERV-Expression in der Milz (gleich 100%) festgestellt und die Expressionen der anderen Organe darauf bezogen (Abb. 4.4). Keines der zur Verfügung stehenden *house keeping* Gene eignete sich uneingeschränkt für die Normalisierung. Die Expressionslevel der Gene GAPDH und Cyclophilin wichen stark von denen der PERV-Expression ab (5.1.2). Das Gen HPRT eignete sich in dieser Hinsicht. Jedoch variierten die Expressionslevel aller drei Referenzgene in verschiedenen Geweben (5.1.2). Die Normalisierung erfolgte daher auf die eingesetzte Menge Gesamt-RNA. Durch Normalisierung auf die verwendeten Referenzgene HPRT, GAPDH und Cyclophilin konnte die jeweils höchsten PERV-Expression in der Lunge bzw. in der Milz jedoch bestätigt werden.

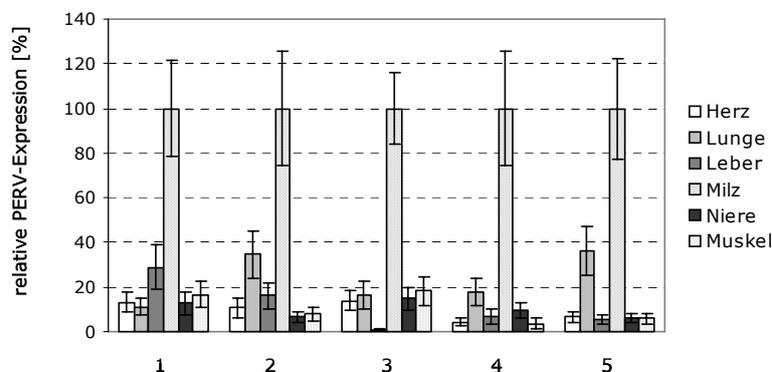


Abbildung 4.4 Relative PERV-Expression in unterschiedlichen Organen Deutscher Landrasse Schweinen

Die Daten wurden mittels *one-step RT real-time PCR* erhoben. Die höchste PERV-Expression des jeweiligen Organs eines Tieres (Milz) wurde gleich 100% gesetzt und die PERV-Expressionen der anderen Organe des Tieres darauf bezogen. Normalisiert wurden die Daten auf die eingesetzte Menge Gesamt-RNA.

4.1.5 Simulation einer Immunantwort porziner Zellen *in vitro*

Porzine endogene Retroviren werden von primären porzinen Zellen freigesetzt (MARTIN et al., 1998a, TACKE et al., 2003, WILSON et al., 1998) und sind in der Lage, humane Zellen *in vitro* zu infizieren (MARTIN et al., 2000, SPECKE et al., 2001 a, b, c). Ob in transplantierten porzinen Zellen, Geweben oder Organen PERVs exprimiert und Partikel gebildet werden, die humane Zellen *in vivo* infizieren können, ist weiterhin unklar. Da bei der Xenotransplantation porziner Organe stets PBMCs mitübertragen werden, die durch das fremde Milieu einer Aktivierung unterlaufen könnten, wurde die PERV-Expression stimulierter und nicht-stimulierter porziner PBMCs miteinander verglichen. Zur Simulation einer Immunantwort, der Antigen-induzierten Aktivierung der PBMCs, wie sie bei einer Xenotransplantation wahrscheinlich ist, wurden die PBMCs mit dem T-Zell-Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert (TACKE et al., 2000b, TACKE et al., 2003). Hierfür wurden die PBMCs der in Tabelle 4.4 aufgeführten transgenen Schweine aus Heparin-Blut isoliert und in einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro 24er *well* mit 80 $\mu\text{g/ml}$ PHA für 5 Tage inkubiert (siehe 3.4.5). Zur Kontrolle wurden die PBMCs jeweils ohne Zugabe von PHA inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Abnahme des Zellkulturüberstandes zur Bestimmung

der Aktivität Reverser Transkriptase (siehe 3.3.10) sowie die Lyse der Zellen zur RNA-Isolierung (siehe 3.2.7). Die RNA der PBMCs wurde mit Hilfe der unter Kapitel 3.2.15 beschriebenen *one-step RT real-time* PCR analysiert. Hierbei wurde die relative PERV-Expression der PHA-stimulierten sowie der nicht-stimulierten PBMCs bestimmt und auf die gleich 100% gesetzte Expression von PK-15-Zellen bezogen. Die Bestimmung der Reversen Transkriptase-Aktivität im Überstand der PBMC-Kulturen erfolgte mit Hilfe des C-TYPE RT ACTIVITY ASSAY (Cavidi, 3.3.10). In Tabelle 4.4 ist die PERV-Expression in PHA-stimulierten PBMCs im Vergleich zur Expression in nicht-stimulierten PBMCs sowie zur Expression in den Zelllinien PK-15 und 293/5° aufgeführt. Nach Normalisierung auf die Gesamt-RNA-Menge sowie auf unterschiedliche *house keeping* Gene konnte in den meisten Fällen ein Anstieg der PERV-Expression in den PBMCs nach PHA-Stimulation im Vergleich zu den nicht stimulierten PBMCs beobachtet werden.

Tabelle 4.4: Vergleich der relativen PERV-Expression PHA-stimulierter und nicht stimulierter PBMCs transgener Schweine

Die mittels *one-step RT real-time* PCR bestimmten Werte wurden auf die gleich 100% gesetzte Expression der Zelllinien PK-15 (% von PK-15) bzw. 293/5° (% von 293/5°) bezogen und auf die eingesetzte Menge Gesamt-RNA normalisiert. Zusammengehörende Würfe sind durch Striche voneinander abgegrenzt.

Tier	Rasse / Kreuzung	Transgene	% von PK-15	Stabw.	% von 293/5°	Stabw.	RT [mU/ml]	Stabw.
9426	MP x Du x DL	TRAIL, hDAF	4,79	1,3	0,76	0,04	0	0
9426 PHA	MP x Du x DL	TRAIL, hDAF	6,07	1,67	0,97	0,06	1,72	0,11
9427	MP x Du x DL	HLAE	1,49	0,46	0,24	0,04	0	0
9427 PHA	MP x Du x DL	HLAE	2,19	0,72	0,35	0,07	0	0
9432	MP x Du x DL	HLAE	3,91	1,10	0,62	0,06	0	0
9432 PHA	MP x Du x DL	HLAE	5,12	1,39	0,82	0,04	2,76	0,16
9507	DE x MP x Du	hDAF	1,69	0,46	0,27	0,01	0	0
9507 PHA	DE x MP x Du	hDAF	6,45	1,85	1,03	0,11	0	0
9508	DE x MP x Du	hDAF	1,84	0,53	0,29	0,03	0	0
9508 PHA	DE x MP x Du	hDAF	7,69	2,40	1,23	0,20	0	0
9509	DE x MP x Du	hDAF	1,42	0,40	0,23	0,02	0	0
9509 PHA	DE x MP x Du	hDAF	2,53	0,89	0,40	0,09	0	0
9511	DE x MP x Du	TRAIL, hDAF	2,95	0,81	0,47	0,03	0	0
9511 PHA	DE x MP x Du	TRAIL, hDAF	6,09	2,16	0,97	0,22	0	0
9513	DE x MP x Du	TRAIL, hDAF	6,94	1,88	1,11	0,06	0	0
9513 PHA	DE x MP x Du	TRAIL, hDAF	7,68	2,61	1,22	0,25	0	0
9515	DE x MP x Du	hDAF	0,93	0,30	0,15	0,03	0	0
9515 PHA	DE x MP x Du	hDAF	1,24	0,36	0,20	0,02	0	0
9517	DE x MP x Du	TRAIL, hDAF	1,32	0,37	0,21	0,02	0	0
9517 PHA	DE x MP x Du	TRAIL, hDAF	8,79	2,96	1,40	0,28	0	0
9518	DE x MP x Du	hDAF	0,63	0,19	0,10	0,01	0	0
9518 PHA	DE x MP x Du	hDAF	1,77	0,51	0,28	0,03	0	0
9519	DE x MP x Du	hDAF	2,69	0,73	0,43	0,02	0	0
9519 PHA	DE x MP x Du	hDAF	15,02	4,53	2,39	0,33	0	0
9520	DE x MP x Du	HLAE, hDAF	1,53	0,41	0,24	0,01	0	0
9520 PHA	DE x MP x Du	HLAE, hDAF	8,61	2,34	1,37	0,08	0	0
9521	DE x MP x Du	HLAE, hDAF	1,16	0,32	0,18	0,01	0	0
9521 PHA	DE x MP x Du	HLAE, hDAF	2,77	0,76	0,44	0,03	0	0
9523	DE x MP x Du	hDAF	4,02	1,09	0,64	0,03	0	0
9523 PHA	DE x MP x Du	hDAF	2,75	0,75	0,44	0,02	0	0
9524	DE x MP x Du	HLAE, hDAF	2,14	0,58	0,34	0,02	0	0
9524 PHA	DE x MP x Du	HLAE, hDAF	12,13	3,29	1,93	0,10	0	0
9525	DE x MP x Du	hDAF	3,33	0,97	0,53	0,06	0	0
9525 PHA	DE x MP x Du	hDAF	7,04	1,91	1,12	0,06	0	0

Tier	Rasse / Kreuzung	Transgene	% von PK-15	Stabw.	% von 293/5°	Stabw.	RT [mU/ml]	Stabw.
9526	DE x MP x Du	hDAF	3,40	0,92	0,54	0,03	0	0
9526 PHA	DE x MP x Du	hDAF	5,03	1,38	0,80	0,05	0	0
9527	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE, hDAF	2,20	0,60	0,35	0,02	0	0
9527 PHA	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE, hDAF	3,02	0,83	0,48	0,03	0	0
9528	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE, hDAF	2,25	0,62	0,36	0,02	0	0
9528 PHA	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE, hDAF	3,44	0,93	0,55	0,03	0	0
9529	DE x MP x Du	HLAE, hDAF	1,23	0,33	0,20	0,01	0	0
9529 PHA	DE x MP x Du	HLAE, hDAF	2,55	0,69	0,41	0,02	0	0
9530	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE, hDAF	1,50	0,41	0,24	0,01	0	0
9530 PHA	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE, hDAF	5,23	1,47	0,83	0,07	0	0
9075	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE	3,54	1,12	0,56	0,09	0	0
9075 PHA	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE	37,20	10,96	5,93	0,73	0	0
9077	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE	6,0	1,63	0,96	0,05	0	0
9077 PHA	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE	13,23	3,86	2,11	0,24	0	0
9228	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE	8,19	2,82	1,30	0,28	0	0
9228 PHA	DE x MP x Du	TRAIL, HLAE	43,90	12,02	6,99	0,44	0	0
9232	DE x MP x Du	TRAIL	0,74	0,21	0,12	0,01	0	0
9232 PHA	DE x MP x Du	TRAIL,	39,45	10,94	6,29	0,48	0	0
9482	DE x MP x Du	TRAIL, hDAF	4,54	1,71	0,72	0,19	0	0
9482 PHA	DE x MP x Du	TRAIL, hDAF	4,54	1,71	2,92	0,41	0	0
9582	MP x Du x DL	HLAE, CD46	2,67	0,83	0,43	0,07	n.t.	n.t.
9582 PHA	MP x Du x DL	HLAE, CD46	11,09	3,22	1,77	0,20	n.t.	n.t.
PK-15	-	-	100	8,41	16,58	4,33	12,89	0,20
293/5°	-	-	628,95	32,74	100	7,23	26,12	0,21

Mit zwei Ausnahmen (9426 PHA und 9432 PHA) konnte im Überstand der PBMCs keine Reverse Transkriptase-Aktivität detektiert werden. Trotz der stark erhöhten PERV-Expression in den PHA-stimulierten PBMCs der Tiere 9075 und 9232 wurde keine RT-Aktivität im Zellkulturüberstand gemessen. Im Gegensatz dazu wurden in den Überständen der Zelllinien PK-15 und 293/5° Reverse Transkriptase-Aktivitäten von 12,89 bzw. 26,12 mU/ml bestimmt.

4.1.6 Untersuchungen zur PERV-Übertragung nach Transplantation porziner Inselzellen auf Cynomolgus-Affen

Zahlreiche humane Zelllinien und primäre Zellen (WILSON et al., 2000, SPECKE et al., 2001a) sowie Zellen von Nerz, Katze und nicht-humaner Primaten wie Gorilla, Pavian und Rhesusaffen (BLUSCH et al., 2000, SPECKE et al., 2001a, SPECKE et al., 2002a, WILSON et al., 2000) sind *in vitro* mit PERV infizierbar. Aufgrund der phylogenetischen Nähe nicht-humaner Primaten zum Menschen stellen diese ein gutes Modell für die Untersuchung der Übertragung porziner Mikroorganismen im Zuge einer Xenotransplantation dar.

In Kooperation mit der Firma Living Cell Technologies Ltd in Auckland, Neuseeland wurde in einer prospektiven Studie die *in vivo* Übertragung porziner endogener Retroviren und anderer porziner Viren nach Transplantation porziner Inselzellen auf Cynomolgus-Affen untersucht.

Ein potentieller Einsatz einer solchen Inselzell-Xenotransplantation wäre die Behandlung von an Diabetes mellitus erkrankten Patienten, um das fehlende Insulin durch porcines Insulin zu ersetzen.

Tabelle 4.5: Befunde der serologischen Analysen der transplantierten Cynomolgus-Affen

Die Seren der transplantierten Cynomolgus-Affen wurden mittels ELISA und Western-Blot-Analyse hinsichtlich PERV-spezifischer Antikörper getestet. Hierfür wurden die rekombinanten Proteine p15E, p27Gag und p52 sowie pelletierte PERV-Partikel verwendet.

Tier	Serum	Western-Blot-Analyse				ELISA	
		p15E	p27Gag	p52	pellet. PERV	p15E	p27Gag
5-1129	prä TX	-	-	-	-	-	-
	1 Monat post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post 2. TX	-	-	-	-	-	-
6-1130	prä TX	-	-	-	-	-	-
	1 Monat post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post 2. TX	-	-	-	-	-	-
9-1001	prä TX	-	-	-	-	-	-
	1 Monat post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post 2. TX	-	-	-	-	-	-
12-0996	prä TX	-	-	-	-	-	-
	1 Monat post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post 2. TX	-	-	-	-	-	-
16-1052	prä TX	-	-	-	-	-	-
	1 Monat post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post 2. TX	-	-	-	-	-	-
17-MP087	prä TX	-	-	-	-	-	-
	1 Monat post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post 2. TX	-	-	-	-	-	-
	6 Monate post 2. TX	-	-	-	-	-	-
18-MP018	prä TX	-	-	-	-	-	-
	1 Monat post TX	-	-	-	-	-	-
20-201	prä TX	-	-	-	-	-	-
	1 Monat post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post TX	-	-	-	-	-	-
	3 Monate post 2. TX	-	-	-	-	-	-

Bei acht männlichen Cynomolgus-Affen wurde durch Applikation einer Einzeldosis Streptozotocin (125 mg/kg) Diabetes induziert. Drei Wochen nach dieser Diabetes-Induktion erfolgte die Transplantation der Affen mit Alginat-verkapselten porcinen Inselzellen (10000 Inselzellequivalente pro kg) ohne Immunsuppression. Die Inselzellen wurden von fünf bis sieben Tagen alten Ferkeln gewonnen (ELLIOTT et al., 2005).

Die Verkapselung der Inselzellen erlaubt die Passage kleiner Moleküle wie Insulin und Glukose, nicht jedoch den Eintritt von zytotoxischen T-Zellen und Antikörpern, sowie die Freisetzung porciner Mikroorganismen. Somit sollten durch die Verkapselung zum einen die Inselzellen vor dem Immunsystem des Rezipienten geschützt und zum anderen die Freisetzung porciner Mikroorganismen verhindert werden. Blutabnahmen erfolgten vor der Transplantation und einen Monat, drei sowie sechs Monate nach der Transplantation. Sieben Tiere überlebten mehr als 3 Monate und der Insulin-Bedarf war bei diesen Tieren 30% geringer als bei einer Kontrollgruppe. Die Seren der transplantierten Tiere wurden sowohl mit Hilfe des ELISAs als auch mittels der Western-Blot-Analyse hinsichtlich PERV-spezifischer Antikörper untersucht. Für diese Analysen wurden die rekombinanten

Proteine p15E (FIEBIG et al., 2003), p27Gag (IRGANG et al., 2003) und p52 (siehe 4.2.3.2) sowie pelletierte PERV-Partikel aus dem Überstand PERV-infizierter 293-Zellen (293/5°) verwendet. In Tabelle 4.5 sind eine Übersicht der getesteten Tiere sowie die Befunde der serologischen Untersuchungen aufgeführt.

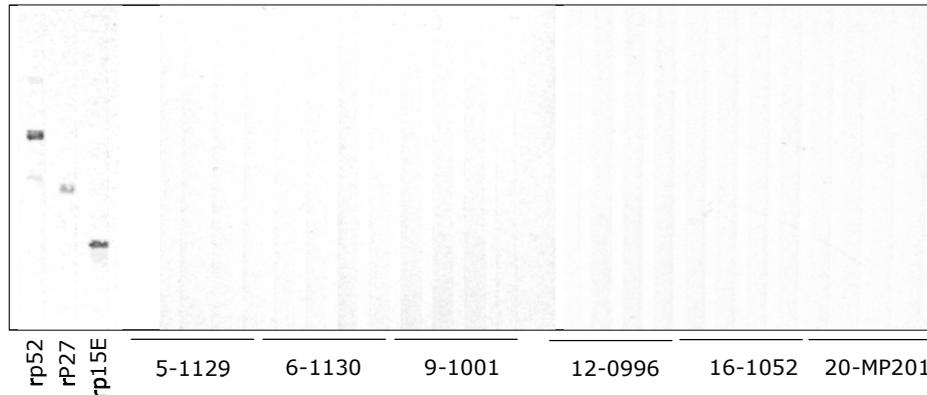


Abbildung 4.5: Serologische Analyse der untersuchten Cynomolgus-Affen hinsichtlich PERV-spezifischer Antikörper

Die Seren der transplantierten Cynomolgus-Affen wurden mittels Western-Blot-Analyse hinsichtlich spezifischer Antikörper gegen die rekombinanten PERV-Proteine rp52, rp27 Gag und rp15E getestet. Die Auftragung der Seren der jeweiligen Tiere entspricht der in Tabelle 4.5.

In keinem der untersuchten Seren konnten PERV-spezifische Antikörper detektiert werden. Abbildung 4.5 zeigt eine exemplarische Western-Blot-Analyse der Seren der Tiere 5-1129, 6-1130, 9-1001, 12-0996, 16-1052 und 20-MP201 hinsichtlich einer Bindung an die rekombinanten PERV-Proteine rp52, rp27Gag und rp15E.

4.1.7 PERV-Expression in Melanomen der Münchner Miniatur Schweine Troll

Porzine endogene Retroviren zeigen große Homologien zu den murinen und felines Leukämieviren (MLV, FeLV), welche in der Lage sind Tumore (z.B Lymphosarkome und Leukämien) und Immundefizienzen zu induzieren (1.2.5). Sowohl die Expression von PERV als auch deren biologische Rolle in normalen Schweinen sowie in porzinen Tumoren ist bisher nicht umfassend untersucht. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass ein humanes endogenes Retrovirus (HERV-K) vom Typ der β -Retroviren in humanen Melanomen stark exprimiert wird. Hinsichtlich der Xenotransplantation ist es daher interessant, die PERV-Expression und eine eventuelle Bedeutung dieser Viren bei der Tumorentstehung zu untersuchen. Schweine der Rasse Münchner Miniatur Schwein (MMS) Troll weisen eine hohe Disposition zur Ausbildung angeborener sowie postnatal spontan auftretender melanozytischer Läsionen (Abb. 4.6), wie invasiven kutanen Melanomen, auf. In Tabelle 4.6 sind die untersuchten MMS und deren Phänotyp hinsichtlich Melanom- und Metastasenbildung aufgeführt.

Tabelle 4.6: Phänotypen der untersuchten MMS Troll hinsichtlich Melanom- und Metastasenausbildung

Alle MMS Troll zeigten ein oder mehrere Melanome, sowie z.T. Metastasen in verschiedenen Organen.

MMS	Haut	regionale Lymphknoten	Milz	Metastasen in weiteren Organen
#371	Melanom (1) multiple Nevi	Metastase	Metastasen	Lunge, Herz, Darm, Leber, Niere
#372	Melanome (3) multiple Nevi	Metastase	Metastasen	Zunge, Lunge, Herz, Magen, Darm, Leber, Niere
#472	Melanome (5) multiple Nevi	Metastase	Metastasen	Lunge, Magen, Darm, Leber, Niere
#499	Melanom (1) multiple Nevi	Metastase	unauffällig	keine

4.1.7.1 Morphologie sowie histologische und immunhistochemische Charakterisierung der Melanome

Die untersuchten MMS Troll exprimierten einzelne oder multiple maligne, häufig eiternde, Melanome (Abb. 4.6 A). Melanomatöse Läsionen wurden des Weiteren in regionalen Lymphknoten und in einer Vielzahl innerer Organe, wie z.B. in der Lunge, der Leber und der Milz gefunden (Abb. 4.6 B, C, Tabelle 4.6).

Histologische Untersuchungen mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin-Färbung zeigten, dass die Haut-Tumore aus stark pigmentierten Melanomzellen bestanden, die bereits in die Dermis und subkutanes Gewebe eingedrungen waren.

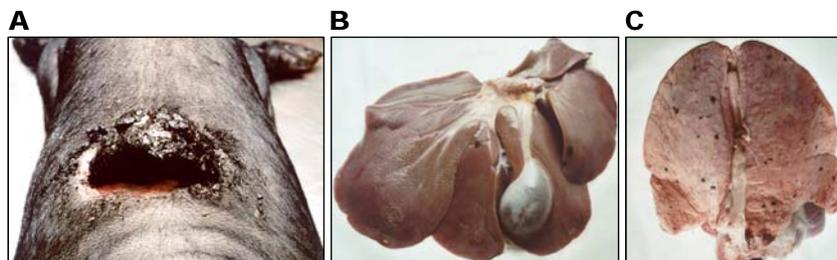


Abbildung 4.6: Melanome und Metastasen der MMS Troll

A: Kutaner Melanom auf dem Rücken B: Melanommetastasen in der Leber und C: in der Lunge (DIECKHOFF et al., 2007b)

Mittels Immunhistochemie konnten Pigment-beladene Makrophagen beobachtet werden. Die regionalen Lymphknoten wiesen eine starke Infiltration von Melanomzellen auf, die in der Zerstörung der Gewebestruktur resultierte (Abb. 4.7 A, B). Mit Hilfe der Immunhistochemie konnte für Zellen beider Melanome sowie der Metastasen eine starke Reaktivität mit dem monoklonalen Antikörper HMB-45 gezeigt werden (Abb. 4.7 C, D). Dieser färbt ein zytoplasmatisch lokalisiertes Antigen (gp100) in Melanozyten und melanozytären Tumoren an. Das Antigen repräsentiert eine Komponente der melanosomalen Oxidoreduktasen und ist somit Melanosomen-spezifisch. HMB-45 lässt sich in ca. 85% der malignen Melanome nachweisen.

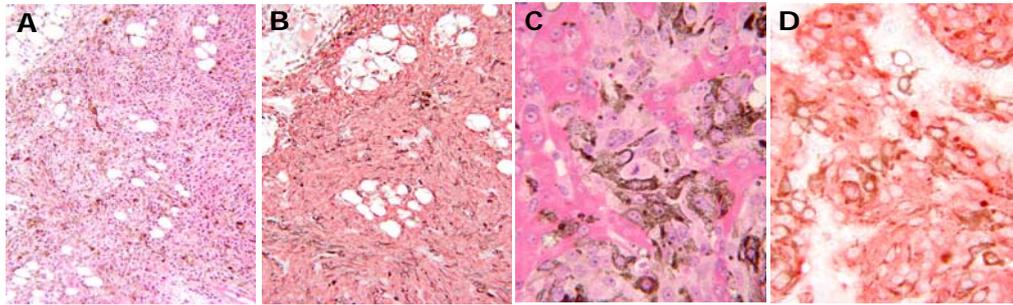


Abbildung 4.7: Histologische (A, B) und immunhistochemische Analyse eines kutanen Melanoms (A, C) und einer Lymphknotenmetastase (B, D)

A: Kutanes Melanom: Invasion von subkutanem adipösem Gewebe (Paraffinschnitt, Hämatoxylin- und Eosin-Färbung nach Bleichen). **B:** Melanommetastase in einem regionalen Lymphknoten: Tumorzellen haben das lymphatische Gewebe großflächig ersetzt (Kunststoffschnitt, Hämatoxylin- und Eosin-Färbung). **C:** Invasives kutanes Melanom: Die Melanomzellen wurden mit Hilfe des Antikörpers HMB45 angefärbt (rot), verstreute, pigment-beladene Makrophagen (braun) (Paraffinschnitt, indirekte Immun-Alkalische Phosphatase Immunhistochemie).

D: Melanommetastase in einem regionalen Lymphknoten: Die Melanomzellen wurden immunhistochemisch mit HMB45 angefärbt (Paraffinschnitt, indirekte Alkalische Phosphatase Immunhistochemie). (DIECKHOFF et al., 2007b)

4.1.7.2 Melanom-Marker

Zahlreiche Melanom-Marker wurden getestet, um zu verifizieren, dass das hinsichtlich der PERV-Expression zu untersuchende Gewebe tatsächlich Tumormaterial enthält. Da bislang keine Marker für porcine Melanome beschrieben sind, wurden drei humane Melanommarker verwendet: MIA (*melanoma inhibitory activity*), MART-1 (*melanoma antigen recognized by T-cells*) und gp100 (*recognized by cytotoxic T lymphocytes*) (PEREZ et al., 2000). Weil die Sequenzen von porcinem MIA, MART-1 und gp100 in der NCBI-Datenbank nicht erhältlich waren, wurden die von Perez et al. publizierten, für humanes MIA, MART-1 und gp100 spezifischen Primer auf porciner DNA getestet. Sie zeigten jedoch kein Amplifikat im porcinen System und konnten somit nicht verwendet werden.

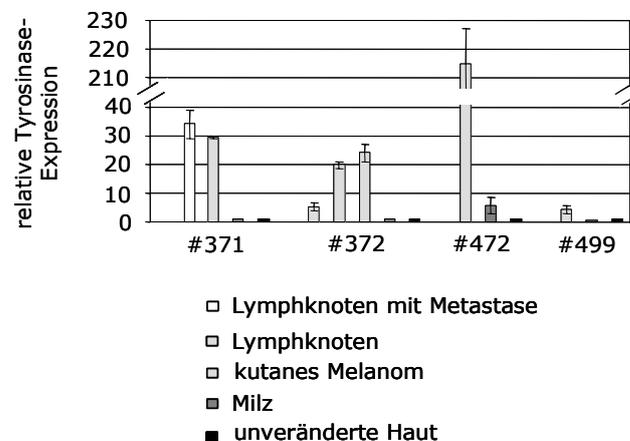


Abbildung 4.8: Expression porciner Tyrosinase in Melanomen, Lymphknoten mit Metastase und unverändertem Gewebe von vier verschiedenen MMS

Die Daten wurden mittels SYBR GREEN RT *real-time* PCR erhoben. Die jeweilige Expression in

normaler Haut wurde gleich 1 gesetzt und die Expression der anderen Gewebe darauf bezogen (DIECKHOFF et al., 2007b).

Da die porcine Sequenz für einen weiteren beschriebenen Melanommarker, die Tyrosinase, bereits beschrieben wurde (Acc. No. NM_001025212), wurden basierend auf dieser Sequenz spezifische Primer für das Tyrosinase-Gen konzipiert und in eine *one-step* RT-PCR eingesetzt. Die Größe des Amplifikats betrug 177 bp.

Anschließend wurde die Tyrosinase-Expression in den unterschiedlichen porcinen Geweben mit Hilfe der SYBR Green *real-time* PCR analysiert. In den kutanen Melanomen konnte eine höhere Tyrosinase-Expression nachgewiesen werden als in den unveränderten Haut-Proben, sowie in Lymphknoten- und Milzproben, bis zu 215-fach erhöht (Abb. 4.8).

4.1.7.3 PERV-Provirusintegration im Genom der MMS Troll

Der PERV-Subtyp C ist nicht im Genom aller Schweine vorhanden (1.2.6), daher wurden zunächst alle verwendeten Schweine hinsichtlich der PERV-Provirusintegration innerhalb ihres Genoms untersucht. Mittels PCR und der Verwendung *gag*-, *pol* und *env*-spezifischer Primer konnten Proviren aller drei Subtypen (PERV-A, -B, C) im Genom der verwendeten MMS Troll #007, #371, #372, #472 und #499 detektiert werden. Abbildung 4.9 A zeigt die nach der Auftrennung im Agarosegel erhaltenen Amplifikate exemplarisch für Tier #007. Des Weiteren konnte in der Milz der Tiere #371 und #372, jedoch nicht in anderen Organen, die Präsenz zweier verschiedener PERV-A/C-rekombinanten Proviren festgestellt werden (Abb. 4.9 B, C).

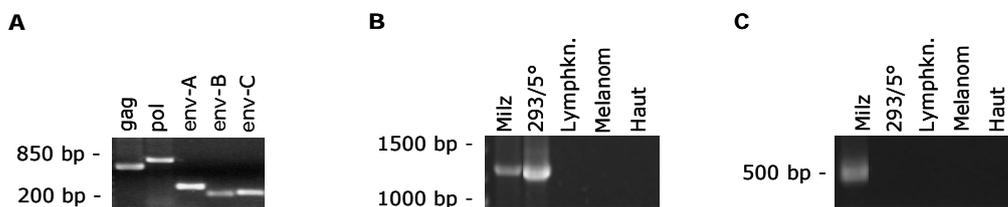


Abbildung 4.9: PERV-Provirusintegration und PERV-A/C-Rekombination

A: Detektion von PERV-A, -B und -C-Providiren im Genom des Tieres #007 mittels PCR und spezifischen Primern für *gag*, *pol*, *env-A*, *env-B*, und *env-C*. **B, C:** Detektion der Präsenz zweier verschiedener PERV-A/C-rekombinanten Proviren in der Milz des Tieres #371 sowie in PERV/5°-infizierten 293-Zellen unter Verwendung der Primer VRBF und TMR (B) und VRBF und PERV *env-C* rev (C) (DIECKHOFF et al., 2007b).

Die Freisetzung solcher PERV-A/C-Rekombinanten wurde bereits bei porcinen Mitogen-stimulierten PBMCs beobachtet (WILSON et al., 1998, WILSON et al., 2000). Kürzlich wurden in genomischer porciner DNA PERV-A/C rekombinante Proviren als Folge einer Autoinfektion nach exogener viraler Rekombination beschrieben (MARTIN et al., 2006). Mit dem von Martin et al. publizierten Primer-Set VRBF und TMR konnte das PERV/5°-Provirus in den mit diesem infizierten 293/5°-Zellen nachgewiesen werden. In keinem der untersuchten Gewebe der Tiere #007, #472 und #499 konnte die PERV-A/C-Rekombinante detektiert werden.

4.1.7.4 PERV-Expression in porzinen Melanomen

Da bislang unklar ist, ob porzine endogene Retroviren in Melanomen stärker exprimiert werden als in normalem Gewebe, wurden sowohl Melanome als auch nicht verändertes Gewebe der MMS Troll hinsichtlich deren PERV-Expression mit Hilfe einer *one-step* RT-PCR untersucht. In allen analysierten kutanen Melanomen, Lymphknoten mit Metastasen, Milzen mit und ohne Metastasen sowie unveränderten Hautbiopsien der MMS Troll Tiere konnte sowohl virale Vollängen-RNA (Volllänge, *gag*, *pol*, Abb. 4.10), als auch *gag*- und *pol*-RNA sowie *env*-RNA aller PERV-Subtypen detektiert werden. Abbildung 4.10 zeigt die nach der Auftrennung im Agarosegel erhaltenen Amplifikate exemplarisch für das Melanom des Tieres #372. Des Weiteren wurde in allen untersuchten Geweben gespleißte *env*-mRNA nachgewiesen. Die Präsenz gespleißter *env*-mRNA erlaubt theoretisch die Translation des Env-Proteins.

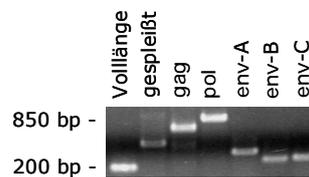


Abbildung 4.10: PERV-Expression im Melanom des Tieres #372

Detektion von PERV-mRNA mittels *one-step* RT-PCR und spezifischen Primern für Vollängen-RNA, gespleißte *env*-mRNA, sowie *gag*-, *pol* und die *env*-mRNA der PERV-Subtypen A, B, und C. (DIECKHOFF et al., 2007b)

Um die PERV-Expression quantitativ zu untersuchen, wurde eine *one-step* RT *real-time* PCR verwendet. Diese PCR (4.1.2) bedient sich *gag*-spezifischer Primer und erlaubt somit die Quantifizierung der Expression viraler Vollängen-mRNA. Im Vergleich zur Expression in unveränderter Haut war die PERV-Expression in den kutanen Melanomen in den meisten Fällen erhöht (Abb. 4.11). Unabhängig von der Art der Normalisierung, auf Gesamt-RNA oder auf die Expression der *house keeping* Gene porcines GAPDH und porcines Cyclophilin ergaben sich ähnliche Expressionsmuster.

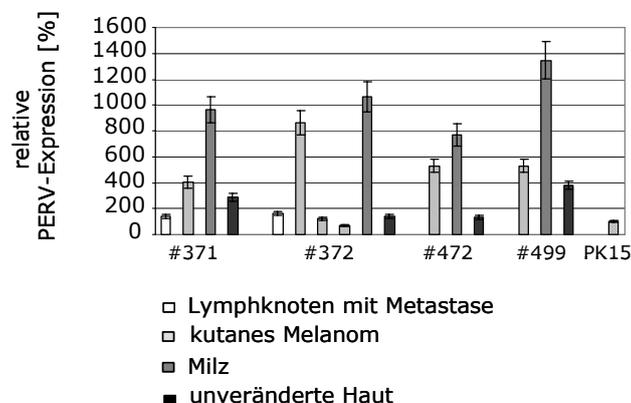


Abbildung 4.11: PERV-Expression in Melanomen und unveränderten Geweben von vier verschiedenen MMS Troll

Die mittels *one-step* RT *real-time* PCR bestimmte PERV-Expression in den Geweben der Tiere

#371, #372, #472, #499 wurde auf die gleich 100% gesetzte Expression der Zelllinie PK-15 bezogen. Die Daten wurden auf die Expression des house keeping Gens GAPDH normalisiert. Im Fall des Tieres #372 wurden drei verschiedene Melanome untersucht (DIECKHOFF et al., 2007b).

4.1.7.5 PERV-Expression in Lungenmetastasen-abgeleiteten Melanomzellen

Die kultivierten, von Lungenmetastasen abgeleiteten Melanomzellen wurden mit den gleichen, bereits beschriebenen PCR-Methoden hinsichtlich ihrer PERV-Expression untersucht. Auch hier konnten virale Vollängen-RNA sowie gespleißte *env*-mRNA, eine Voraussetzung für die Bildung viraler Partikel, nachgewiesen werden.

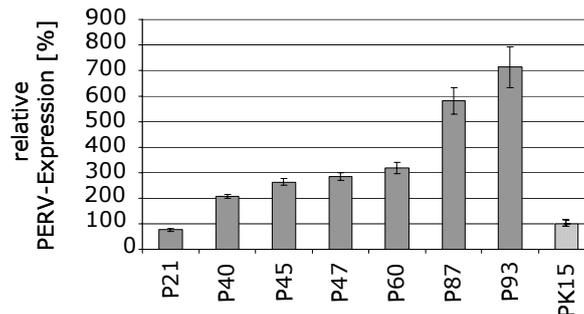


Abbildung 4.12: PERV-Expression in Melanomzellen unterschiedlicher Passagen

Die mittels *one-step RT real-time PCR* bestimmten Werte wurden auf die GAPDH-Expression normalisiert und in Relation zur PERV-Expression der Zelllinie PK-15 (gleich 100%) gesetzt (DIECKHOFF et al., 2007b).

Interessanterweise stieg die PERV-Expression mit der Zahl der Passagen der Melanomzellen *in vitro* (Abb 4.12). Während die PERV-Expression in Passage 21 weniger als 80% der Expression in PK-15-Zellen betrug, konnte in Passage 87 eine 7-fach höhere PERV-Expression als in PK-15-Zellen gezeigt werden. Auch hier ergaben sich unabhängig von der Art der Normalisierung, auf Gesamt-RNA oder auf die Expression der *house keeping* Gene porcines GAPDH und porcines Cyclophilin ähnliche Expressionsmuster. Da bereits beschrieben wurde, dass sich die Länge der viralen LTRs sowie der Virustiter während der Passagierung von PERV in humanen Zellen erhöht (DENNER et al., 2003a), wurde die Länge der viralen LTRs in den Melanomzellen verschiedener Passagen untersucht. Es konnten jedoch keine Veränderungen in deren Länge beobachtet werden (Abb. 4.13). Die Länge der LTR entsprach der des Isolates PERV/3°, die nur eine 37 bp Wiederholung mit einer Kernfaktor Y (NF-Y)-Bindungsstelle besitzt (DENNER et al., 2003a).

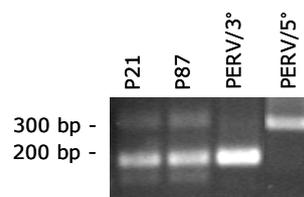


Abbildung 4.13: Unveränderte LTR-Länge während der Passagierung der Lungenmetastasen-abgeleiteten Melanomzellkultur

Die PCR erfolgte mit DNA aus Zellen der 21. und 87. Passage (P). Plasmide, die die LTR von PERV/3° bzw. PERV/5° beinhalten, wurden als Kontrollen eingesetzt (DIECKHOFF et al., 2007b).

4.1.7.6 PERV-Proteinexpression in primären Tumoren und Melanomzellkulturen

Um zu analysieren, ob die erhöhte Expression von PERV-mRNA mit einer gesteigerten Expression viraler Proteine einhergeht, wurden Proteinpräparationen von Melanomen und Lungen-Metastasen abgeleiteten Melanomzellkulturen mit Hilfe der Western-Blot-Analyse und p15E- und Gag-spezifischen Antikörpern (FIEBIG et al., 2003, IRGANG et al., 2003) untersucht.

Die Nachweisgrenzen von p15E und Gag lagen bei 50 bzw. 100 ng. Virales p15E-Protein konnte z.B. in Melanomproben des Tieres #372 nachgewiesen werden, nicht jedoch in Proben unveränderter Haut desselben Tieres (Abb. 4.14). Von 10 untersuchten Melanomen, 4 unveränderten Hautproben, drei Milzproben und einem Lymphknoten mit Metastase, konnten in drei der Melanomproben, jedoch in keiner der Hautproben virales p15E-Protein detektiert werden.

In allen untersuchten Passagen der Lungen-Metastasen abgeleiteten Melanomzellkultur wurde das virale p15E nachgewiesen, die stärkste Protein-Expression war in Passage 88 zu beobachten (Abb. 4.14) und korrelierte somit mit der PERV-RNA-Expression (Abb. 4.12). Auch geringe Mengen Gag-Vorläufer-Protein konnten in primären Tumoren sowie in den Zellkulturen gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

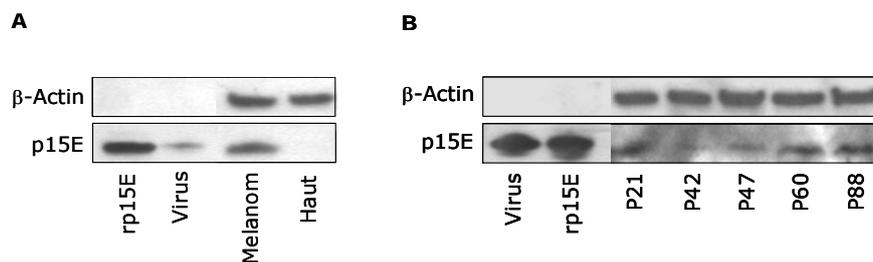


Abbildung 4.14: Nachweis der Expression des p15E-Proteins

A: in primärem Melanom und unveränderter Haut des Tieres #372. **B:** und in Zellen verschiedener Passagen (P) der Lungenmetastasen-abgeleiteten Melanomzellen (B) mittels Western-Blot-Analyse und einem p15E-spezifischen Antiserum (Ziegenserum 16). Sedimentierte PERV-Partikel (Virus) und rekombinates p15E (rp15E) wurden als Kontrollen verwendet. Die Gelbeladung mit äquivalenten Proteinmengen wurde durch die Verwendung von Antikörpern gegen β -Actin verifiziert (DIECKHOFF et al., 2007b).

Die Expression des p15E-Proteins in der Lungen-Metastasen abgeleiteten Melanomzellkultur wurde durch Immunfluoreszenz bestätigt (Abb. 4.15). Bei der Analyse nicht-permeabilisierter Melanomzellen konnte die Expression des viralen p15E sowohl auf der Zelloberfläche als auch im Zytoplasma detektiert werden (Abb. 4.15 A). In permeabilisierten Zellen wurde das p15E vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 4.15 B, C). Als Kontrolle wurden PK-15-Zellen mitgeführt. Übereinstimmend mit den PERV-RNA-Expressionsdaten war die p15E-Proteinexpression in der untersuchten Passage 83 der Melanomzellen weitaus höher als in den PK-15-Zellen (Abb. 4.15 D). Als Negativ-Kontrolle mitgeführte 293-Zellen zeigten keine p15E-Expression (Daten nicht gezeigt).

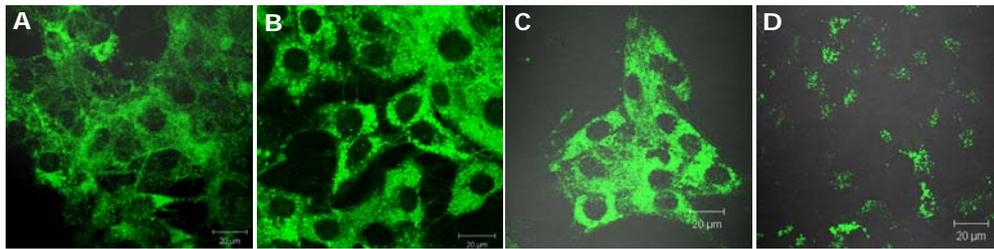


Abbildung 4.15: Detektion des viralen p15E-Proteins in Lungenmetastasen abgeleiteten Melanomzellen der 87. Passage

Die Immunfluoreszenz-Markierung erfolgte mit einem für p15E spezifischen Antiserum (Ziege 16, FIEBIG et al., 2003). **A:** Nicht-permeabilisierte Zellen. **B, C:** permeabilisierte Zellen, unterschiedliche Vergrößerungen. **D:** Permeabilisierte PK-15-Zellen als Kontrolle. Der Balken in den rechten unteren Bildrändern entspricht einer Größe von 20 µm (DIECKHOFF et al., 2007b).

4.1.7.7 Freisetzung viraler Partikel aus Melanomzellen

Um zu untersuchen, ob die Lungenmetastasen-abgeleiteten Melanomzellen Viruspartikel freisetzen, wurde die RT-Aktivität in deren Kulturüberständen gemessen. Übereinstimmend mit dem Anstieg der Menge viraler Vollängen-RNA und viralen Proteins, stieg auch die Menge der freigesetzten RT-Aktivität während der Passagierung der Zellen an (Abb. 4.16 A).

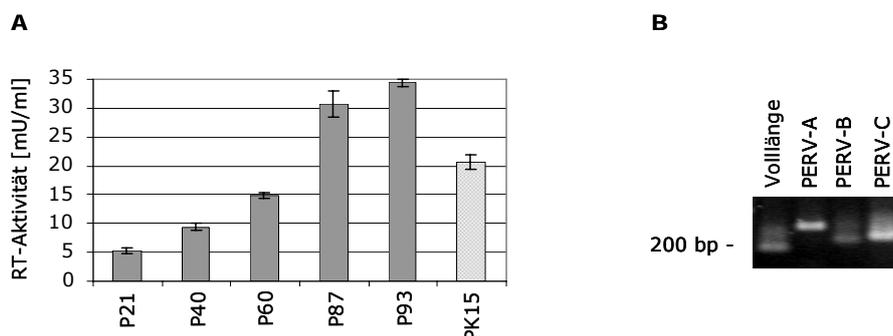


Abbildung 4.16: PERV-Partikel-Freisetzung aus den Lungenmetastasen-abgeleiteten Melanomzellen

A: RT-Aktivität im Überstand von Melanomzellen verschiedener Passagen, gemessen mit Hilfe des C-TYPE RT ACTIVITY ASSAYS. **B:** Detektion der Subtypen PERV-A, -B, und -C in pelletierten Viruspartikeln aus Überständen der Melanomzellen in Passage 95. (DIECKHOFF et al., 2007b)

Im Überstand der 93. Passage der Melanomzellkulturen wurde eine höhere RT-Aktivität detektiert als im Überstand der porzinen PK15-Zellen.

Um zu analysieren, welche PERV-Subtypen von den Melanomzellen freigesetzt werden, wurden Viruspartikel im Überstand der Passage 95 durch Ultrazentrifugation pelletiert und die RNA-Genome mittels *one-Step* RT-PCR analysiert. Alle drei PERV-Subtypen A, B und C konnten nachgewiesen werden (Abb. 4.16 B).

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurden in Präparationen der Melanomzellen der Passage 93 intakte PERV-Partikel beobachtet (Abb. 4.17). Um festzustellen, ob diese Viruspartikel infektiös sind, wurde ein Infektionsversuch durchgeführt. Humane 293-Zellen wurden mit dem Überstand der Melanomzellen aus Passage 87, welche eine hohe PERV-Expression zeigten (Abb. 4.12), inkubiert.

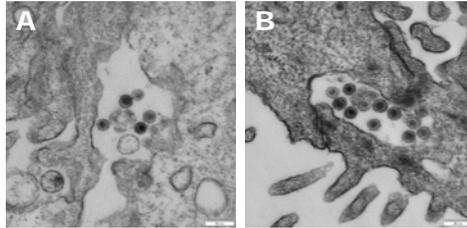


Abbildung 4.17: Detektion von PERV-Partikeln in Lungenmetastasen abgeleiteten Melanomzellen der 93. Passage

Transmissions-Elektronen-mikroskopische Darstellung zweier Präparationen (A, B) der Lungenmetastasen-abgeleiteten Melanomzellen (Passage 93). (DIECKHOFF et al., 2007b)

Nach 42 Tagen Inkubation konnte jedoch keine PERV-Provirusintegration in den 293-Zellen gezeigt werden. Im Gegensatz wiesen die Kontrollzellen, 293-Zellen, die parallel mit dem Überstand PERV/5^o-produzierender 293-Zellen inkubiert wurden, nach der gleichen Zeit eine PERV-Infektion auf.

4.2 Prävention der PERV-Übertragung bei der Xenotransplantation

Bislang konnte weder in Transplantations- und Infektionsstudien mit Kleintieren und nicht-humanen Primaten noch in ersten klinischen Xenotransplantationen ein Nachweis einer PERV-Übertragung erbracht werden (LOSS et al., 2001, WINKLER et al., 2005, SPECKE et al., 2001a, HENEINE et al., 1998, GARKAVENKO et al., 2004, IRGANG et al., 2003, XU et al., 2003, PARADIS et al., 1999, TACKE et al., 2001). Trotz der zusätzlichen Sicherheitsvorkehrungen, wie die Auswahl von Schweinen, die den PERV-Subtyp C nicht enthalten, eine geringe PERV-Expression aufweisen und keine PERV-Partikel freisetzen, kann eine PERV-Übertragung auf den Menschen nach einer Xenotransplantation nicht ausgeschlossen werden. Humane Zellen lassen sich *in vitro* infizieren und der Transplantatempfänger steht zum Schutz des Transplantats zudem unter einer starken Immunsuppression.

Aufgrund dieser Tatsachen gilt es Strategien zu entwickeln, um eine potentielle PERV-Übertragung zu verhindern. Vielversprechende Strategien sind hierbei die Hemmung der PERV-Expression durch RNA-Interferenz und die Entwicklung eines Impfstoffes.

4.2.1 Hemmung der PERV-Expression in primären porzinen Zellen mittels RNA-Interferenz und lentiviralen Vektoren

In einer früheren Publikation der Arbeitsgruppe (KARLAS et al., 2004) wurden bereits zahlreiche synthetische siRNAs, die Komplementarität zu verschiedenen Bereichen der PERV-Sequenz aufwiesen, konzipiert und hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die PERV-Expression in infizierten humanen 293-Zellen zu inhibieren, getestet. Die effizienteste siRNA entsprach einer hochkonservierten Sequenz im viralen *pol*-Gen (*pol2*). Da die Unterscheidung der PERV-Subtypen ausschließlich auf Unterschieden im *env*-Gen beruhen, ist die Ziel-Sequenz in allen funktionellen PERV-Subtypen identisch und die siRNA somit in der Lage, die Expression aller drei Subtypen zu hemmen. Durch die Insertion der *pol2*-siRNA in den Expressionvektor pSuper konnte eine permanente Expression der entsprechenden *pol*-spezifischen shRNA und eine effiziente Hemmung der PERV-Expression in 293-Zellen erreicht werden.

Hinsichtlich des Ziels, shRNA-transgene Schweine mit stark verminderter PERV-Expression zu erzeugen, wurde zunächst eine Hemmung der PERV-Expression in primären porzinen Zellen angestrebt. Da sich primäre Zellen nur schwer und mit schlechter Effizienz mit Expressionsvektoren wie pSuper transfizieren lassen, wurden diese Versuche mit Hilfe lentiviraler Vektoren unternommen.

4.2.1.1 Lentivirale Expressionsvektoren

Zwei verschiedenen lentivirale Vektoren RRL-pGK-GFP (FOLLENZI et al., 2000) und pLVTHM (WIZNEROWICZ et al., 2003), welche die Expression der entsprechenden shRNAs ermöglichten, wurden verwendet (Abb. 4.18). Die Vektoren unterscheiden sich in den Promotoren, welche die Expression des GFP-Reporter-Gens induzieren sowie in der Anordnung der shRNA- und GFP-Expressionskassetten.

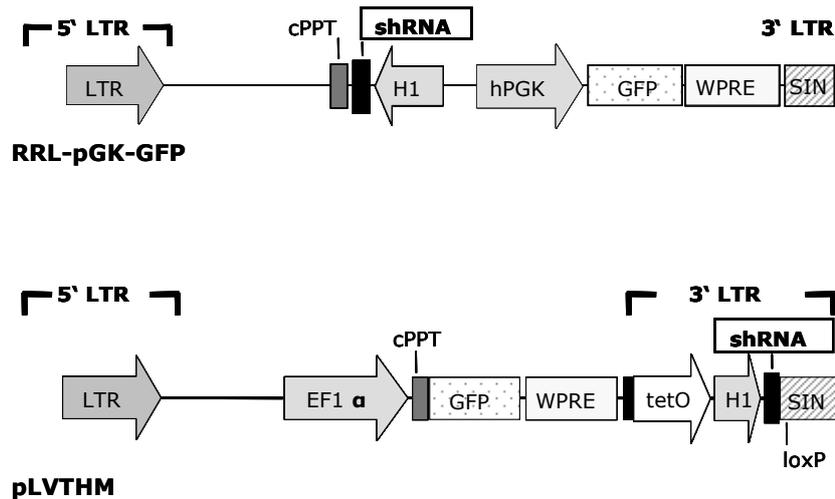


Abbildung 4.18: Schematische Darstellung der lentiviralen Vektoren RRL-pGK-GFP und pLVTHM

LTR: *long terminal repeat*. H1: Polymerase III H1-RNA Gen Promotor. shRNA: *short hairpin RNA*. SIN: selbst-inaktivierendes Element. cPPT: zentraler Polypurintrakt. GFP: *green fluorescent protein*. WPRE: post-transkriptionelles Element des Woodchuck Hepatitis B Virus. EF-1 α : Elongationsfaktor-1 α Promotor. tetO: Tetracyclin Operator. hPGK: Phosphoglycerat Kinase Promotor. loxP: Rekombinationsstelle der Cre-Rekombinase für den Bakteriophagen P1

Der Vektor pLVTHM bedient sich eines EF1-alpha-Promotors, während der Vektor RRL-pGK-GFP einen PGK-Promotor verwendet. Die shRNA-Expressionkassette des Vektors pLVTHM ist in den 3' LTR lokalisiert. Des Weiteren wurde der Vektor pLVTHM als *double-copy* Vektor konzipiert. Während der reversen Transkription wird die U3-Region der 5' LTR mittels ihres 3'-Homologs als *template* synthetisiert, was in einer Verdopplung der shRNA-Expressionkassette im integrierten Vektors resultiert.

Mit Hilfe der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *ClaI* bzw. *EcoRI* und *HindIII* wurde die pol2-shRNA-Kassette des Vektors pSuper-pol2 in die lentiviralen Vektoren pLVTHM und RRL-pGK-GFP inseriert. Die entstandenen Vektoren tragen im Folgenden die Bezeichnungen pLVTHM-pol2 und RRL-pGK-GFP-pol2.

Lentivirale Partikel wurden durch Ko-Transfektion der Verpackungszelllinie 293T mit dem Hüllplasmid pCL-VSV-G, dem Verpackungsplasmid psPAX2 und dem Transfervektor pLVTHM-pol2 bzw. der Kontrolle pLVTHM generiert und mittels Ultrazentrifugation konzentriert. Die Titration der konzentrierten lentiviralen Partikel erfolgte auf HeLa-Zellen. Für die lentiviralen Vektoren pLVTHM und pLVTHM-pol2 konnten die folgenden Titer ermittelt werden: $1,73 \times 10^8$ IU/ml und $1,78 \times 10^7$ IU/ml.

Die Herstellung der auf dem Vektor RRL-pGK-GFP basierenden lentiviralen Partikel erfolgte durch Andreas Hofmann (Kooperation DFG-Projekt) wie bereits beschrieben (HOFMANN et al., 2003, PFEIFER et al., 2002). Die Titer betragen $2,10 \times 10^{10}$ IU/ml (RRL-pGK-GFP) und $2,25 \times 10^{10}$ IU/ml (RRL-pGK-GFP-pol2).

4.2.1.2 PERV-Provirusintegration und -Expression in porzinen Fibroblasten SE101, SE105 und PFF P1 F10

Die verwendeten porzinen Fibroblastenkulturen wurden aus verschiedenen Deutsche Landrasse-Foeten (Tag 25 p.c.) isoliert (Kooperation DFG-Projekt, Prof. Niemann,

Mariensee). Um zunächst den Status der PERV-Provirusintegration sowie die PERV-Expression der porzinen Fibroblasten, SE101, SE105 und PFF P1 F10 zu untersuchen, wurde die DNA dieser Zellen in eine PCR eingesetzt. Mit Hilfe *env*-spezifischer Primer konnten alle drei PERV-Subtypen A, B und C im Genom der porz. Fibroblasten detektiert werden (Abb. 4.19). Die DNA der PERV-C-negativen PK15-Zellen wurde als Negativkontrolle mitgeführt.

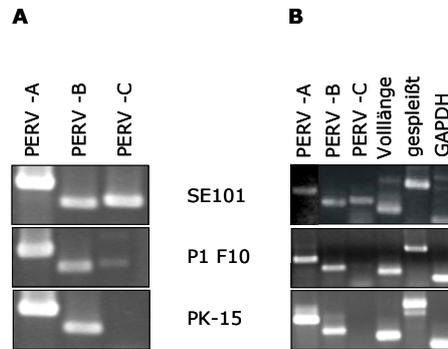


Abbildung 4.19: PERV-Provirusintegration und -Expression in fötalen porzinen Fibroblasten und PK-15-Zellen

A: Detektion von PERV-Proviren im Genom zweier unabhängiger primären Fibroblastenkulturen (SE101, P1 F10) und PK-15-Zellen mittels PCR. **B:** Detektion der PERV-Expression in fötalen Fibroblasten (SE101, P1 F10) und in PK-15-Zellen mittels *one-step* RT-PCR. Zusätzlich zu spezifischen Primern für *env*-A, -B und -C wurden Primer verwendet, die virale Vollängen-RNA sowie gespleißte *env*-mRNA detektieren. Die Integrität der RNA wurde durch die Amplifikation des *house keeping* Gens GAPDH verifiziert (DIECKHOFF et al., 2007a).

Zur Analyse der PERV-Expression in den porzinen fötalen Fibroblasten wurde Gesamt-RNA isoliert und für eine *one-step* RT PCR mit den bereits beschriebenen Primern, sowie Primern, die es erlauben virale Vollängen-RNA von gespleißter *env*-mRNA zu diskriminieren, verwendet. Die Integrität der RNA wurde durch die Amplifikation des *house keeping* Gens GAPDH bestimmt.

In allen getesteten Fibroblastenkulturen konnten sowohl mRNAs der PERV-Subtypen A, B und C sowie gespleißte *env*-mRNA detektiert werden (Abb. 4.19). Auch hier wurde die RNA von PERV-C-negativen PK-15-Zellen mitgeführt. Die Präsenz gespleißter *env*-mRNA weist auf die Möglichkeit der Env-Protein-Translation und der Viruspartikelbildung hin.

4.2.1.3 Transduktion porziner Fibroblasten und PK-15-Zellen mit lentiviralen Partikeln

Für die Transduktion mit den unter 4.2.1.1 beschriebenen lentiviralen Partikeln wurden die porzinen Fibroblasten SE 101, SE 105 und P1 F10 sowie PK-15-Zellen (1×10^5 pro 6er *well*) ausplattiert und in Anwesenheit von 6 mg/ml Polybren und konzentrierten lentiviralen Partikeln (MOI: 2,5) fünf Tage inkubiert.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie konnten für die porzinen Fibroblasten über die Detektion des Reportergens GFP Transduktionseffizienzen von 20% bestimmt werden. Da dieser Prozentsatz transduzierter Zellen zu gering ist, um eine effektive Hemmung der PERV-Expression nachzuweisen, wurden die transduzierten Fibroblasten durch Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung angereichert. Auf diese Weise

konnten somit nahezu 100% transduzierte Fibroblasten erreicht werden (Abb. 4.20). Bei den PK-15-Zellen ließen sich höhere Transduktionseffizienzen von etwa 80% erreichen. Durch erneute Transduktion mit den lentiviralen Partikeln konnten diese auf über 95% gesteigert werden.

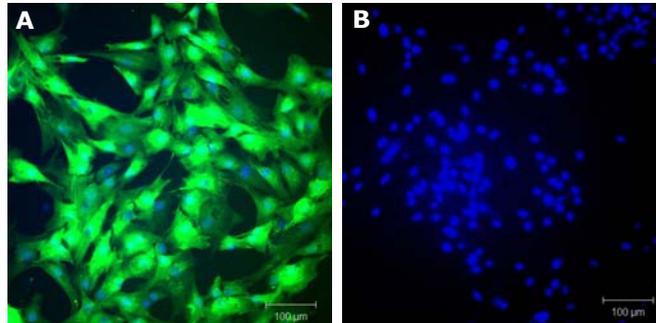


Abbildung 4.20: pLVTHM-pol2-transduzierte und nicht-transduzierte porzine Fibroblasten

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von pLVTHM-pol2-transduzierten (A) sowie nicht-transduzierten (B) porzinen Fibroblasten P1 F10 nach Anreicherung durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung. Überlagerung der Signale für GFP und DAPI. Der Balken in den rechten unteren Bildrändern entspricht 100 µm.

4.2.1.4 pol2-shRNA-vermittelte Hemmung der PERV-Expression in primären porzinen Zellen sowie PK-15-Zellen

Aus den transduzierten sowie nicht-transduzierten fötalen Fibroblasten und PK15-Zellen wurden Gesamt-RNA und Protein isoliert. Die Hemmung der PERV-Expression wurde quantitativ mit Hilfe der unter 4.1.2 beschriebenen *one-step* RT *real-time* PCR bestimmt. Für jede Reaktion wurden 50 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Der Level an viraler Vollängen-RNA wurde mit einer Modifizierung der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode (LIVAK UND SCHMITTGEN, 2001) relativ zur eingesetzten Menge Gesamt-RNA kalkuliert. Die PERV-Expression der pLVTHM-pol2- bzw. RRL-pGK-GFP-pol2-transduzierten Zellen wurde mit der PERV-Expression in den nicht-transduzierten sowie den pLVTHM- bzw. RRL-pGL-GFP-transduzierten Zellen verglichen. Auf diese Weise wurde eine pol2-shRNA-vermittelte Hemmung der PERV Vollängen-RNA-Expression von bis zu 94,8% ermittelt (Abb. 4.21). Die Inhibierung der PERV-Expression blieb bei 95% über Monate (171 Tage) stabil (Abb. 4.21).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die lentiviralen Vektoren pLVTHM-pol2 und RRL-pGK-GFP-pol2 in der Lage sind, die PERV-Expression in fötalen Fibroblasten zu hemmen, wurde deren Effekt in PK-15-Zellen untersucht. Mit Hilfe der bereits beschriebenen *one-step* RT *real-time* PCR (3.2.15, 4.1.2) konnte eine Hemmung der PERV-Expression von 65,8 bzw. 73,5% ermittelt werden (Abb. 4.22).

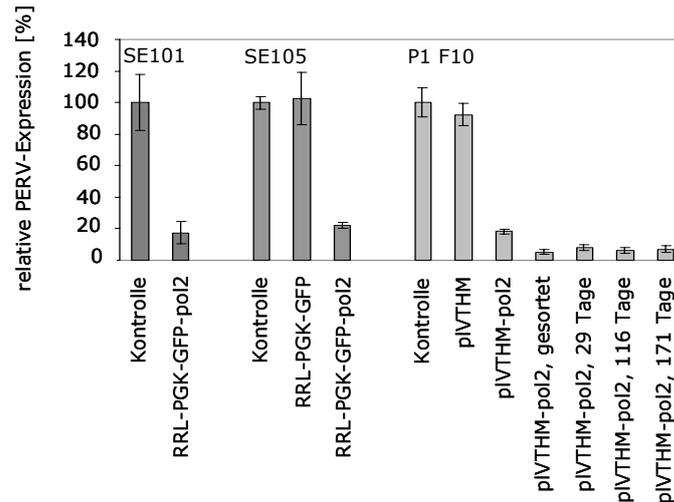


Abbildung 4.21: Hemmung der PERV-Expression in porzinen fötalen Fibroblasten

Die porzinen fötalen Fibroblasten wurden mit den lentiviralen Vektoren RRL-pGK-GFP-pol2 und pLVTHM-pol2 sowie den entsprechenden Leervektoren pLVTHM und RRL-PGK-GFP transduziert. Die PERV-Expression wurde mittels *one-step RT real-time* PCR an verschiedenen Zeitpunkten nach der Transduktion bestimmt und mit den Leervektorkontrollen sowie den nicht-transduzierten Fibroblasten (Kontrolle, gleich 100%) verglichen (DIECKHOFF et al., 2007a).

Die PERV-Expression wurde des Weiteren in PHA-stimulierten PBMCs reduziert. Diese Zellen lassen sich nur sehr schlecht transduzieren, was sich in einer sehr geringen Transduktionseffizienz widerspiegelt. Nach Anreicherung der GFP-positiven Zellen durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung wurde eine Inhibierung der PERV-Vollängen-mRNA-Expression von 75% beobachtet (Daten nicht gezeigt).

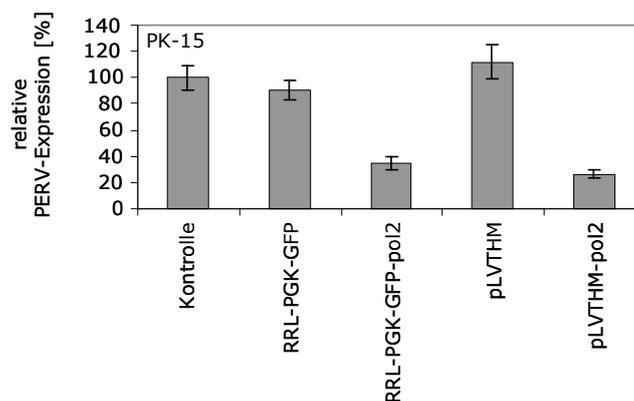


Abbildung 4.22: Hemmung der PERV-Expression in PK-15-Zellen

Die Zelllinie PK-15 wurde mit den lentiviralen Vektoren RRL-pGK-GFP-pol2 und pLVTHM-pol2 sowie den entsprechenden Leervektoren pLVTHM und RRL-PGK-GFP transduziert. Die PERV-Expression wurde mittels *one-step RT real-time* PCR bestimmt und mit den Leervektorkontrollen sowie den nicht-transduzierten PK-15-Zellen (Kontrolle, gleich 100%) verglichen (DIECKHOFF et al., 2007a).

4.2.1.5 Hemmung der PERV-Expression auf Proteinebene

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die lentiviralen Vektoren pLVTHM-pol2 und RRL-pGK-GFP-pol2 in der Lage sind, die Expression der PERV-Vollängen-RNA in

unterschiedlichen Zelltypen zu hemmen, wurde untersucht, ob die reduzierte Expression viraler mRNA auch zu einer reduzierten Expression viraler Proteine führt.

Protein-Präparationen der fötalen Fibroblasten und der PK-15-Zellen wurden mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse untersucht. Hierfür wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein der transduzierten sowie nicht-transduzierten PK-15-Zellen und ein anti-p27Gag-Ziegen Serum verwendet (IRGANG et al., 2003). Abbildung 4.23 zeigt eine reduzierte p27 Gag-Proteinexpression der mit pLVTHM-pol2- und RRL-PGK-GFP-pol2-transduzierten PK-15-Zellen. Die Beladung äquivalenter Proteinmengen wurde mit Antikörpern gegen β -Actin verifiziert.

Bei der Western-Blot-Analyse der porzinen Fibroblasten konnte auch nach Verwendung von 80 µg Gesamtprotein kein Gag-Protein in den Kontrollzellen detektiert werden, was deutlich macht, dass die PERV-Expression in diesen Zellen so gering ist, dass sie unter der Nachweisgrenze liegt. Dies wird durch die Tatsache bestätigt, dass die PERV-Expression den porzinen Fibroblasten im Vergleich zu der in PK-15-Zellen nur 0,2% beträgt.

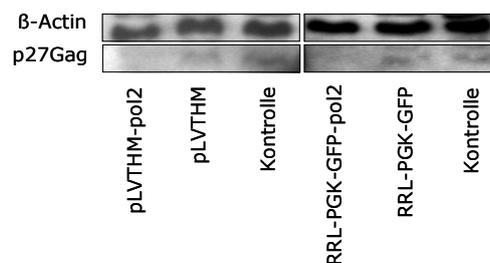


Abbildung 4.23: Expression des viralen p27Gag in transduzierten PK-15-Zellen

Die mit den lentiviralen Vektoren pLVTHM-pol2 und RRL-pGK-GFP-pol2 sowie den entsprechenden Leervektoren RRL-PGK-GFP und pLVTHM transduzierten PK-15-Zellen wurden mittels Western-Blot-Analyse und einem PERV-p27-Gag-spezifischen Antiserum hinsichtlich der p27-Gag-Proteinexpression untersucht und mit nicht-transduzierten PK-15-Zellen (Kontrolle) verglichen (DIECKHOFF et al., 2007a).

4.2.1.6 Reduzierte RT-Aktivität in den Überständen transduzierter Zellen

Um zu untersuchen, ob die mit den lentiviralen Vektoren pLVTHM-pol2- und RRL-PGK-GFP-pol2-transduzierten Zellen auch eine reduzierte virale RT-Aktivität freisetzen, wurden die Überstände der Kontrollzellen und der transduzierten Zellen (porzine Fibroblasten P1 F10, PK-15) in einen RT-Assay eingesetzt. Hierfür wurden die Zellen in einer Dichte von 5×10^4 Zellen pro 24er *well* ausgesät und der Überstand nach drei Tagen abgenommen. Die RT-Aktivität wurde mit Hilfe des CAVIDI C-TYPE RT ACTIVITY ASSAYS bestimmt.

In den Überständen der mit den lentiviralen Vektoren pLVTHM-pol2- und RRL-PGK-GFP-pol2-transduzierten PK-15-Zellen (4,74 mU/ml bzw. 5,78 mU/ml) konnten im Vergleich zu den Leervektorkontrollen (23,2 mU/ml bzw. 21,2 mU/ml) bzw. nicht-transduzierten PK-15-Zellen (23,4 mU/ml) reduzierte RT-Aktivitäten gezeigt werden (Abb. 4.24). In den Überständen der porzinen Fibroblasten P1 F10 konnte keine RT-Aktivität detektiert werden, was den geringen PERV-Expressionslevel bestätigt.

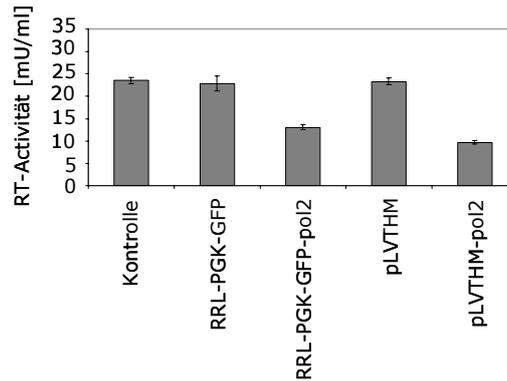


Abbildung 4.24: RT-Aktivität in den Überständen von PK-15-Zellen

In den Überständen der mit den lentiviralen Vektoren RRL-pGK-GFP-pol2 und pLVTHM-pol2, den entsprechenden Leervektoren RRL-PGK-GFP und pLVTHM transduzierten sowie nicht-transduzierten PK-15-Zellen wurde die RT-Aktivität [mU/ml] mit Hilfe des C-TYPE RT ACTIVITY ASSAYS die RT-Aktivität [mU/ml] bestimmt (DIECKHOFF et al., 2007a).

4.2.2 Generierung shRNA-transgener Schweine mittels Nukleus-Transfer

Eine viel versprechende Strategie der Prävention der PERV-Übertragung bei der Xenotransplantation beruht auf dem Einsatz shRNA-transgener Schweine mit verminderter PERV-Expression. Mit der erfolgreichen Hemmung der PERV-Expression in primären porzinen Zellen sowie in einer porzinen Zelllinie wurde die Basis zur Herstellung solcher shRNA-transgener Schweine geschaffen.

Die Generierung der pol2-shRNA-transgenen Schweine erfolgte nach der Methode des Nukleustransfers (HOLKER et al., 2003) am Institut für Tierzucht in Mariensee. Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung der Zellkerne dienten die bereits beschriebenen porzinen, mit dem lentiviralen Partikeln pLVTHM-pol2 transduzierten Fibroblasten P1 F10. Nach der für Schweine üblichen Tragzeit von 116 Tagen wurden sieben Ferkel geboren, von welchen eines direkt nach der Geburt starb. Aufgrund einer Agalaktie der Muttersau starben zwei Ferkel innerhalb der ersten Nacht. Sowohl die Ernährung der Ferkel mittels einer Sonde als auch die Behandlung der Muttersau mit Oxytocin (2 ml, 10 IE/ml, Pharma Partner, Hamburg), welches die Laktation verstärken sollte, schlugen fehl, so dass zwei weitere Ferkel starben. Eine Amme zur Ernährung der Ferkel stand nicht zur Verfügung.

Von sechs Tieren konnten Ohrbiopsien zur DNA-Isolierung und von zwei Tieren Gewebe der Organe Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, Pankreas und Muskel sowie Hautbiopsien zur RNA-Isolierung gewonnen werden.

Mit Hilfe zweier Primer-Sets (Abb. 4.25), die in verschiedenen Bereichen des Transgens hybridisieren, im *gfp*-Gen sowie innerhalb der shRNA-Expressionskassette, erfolgte der Nachweis der Transgen-Integration für alle sechs Ferkel.

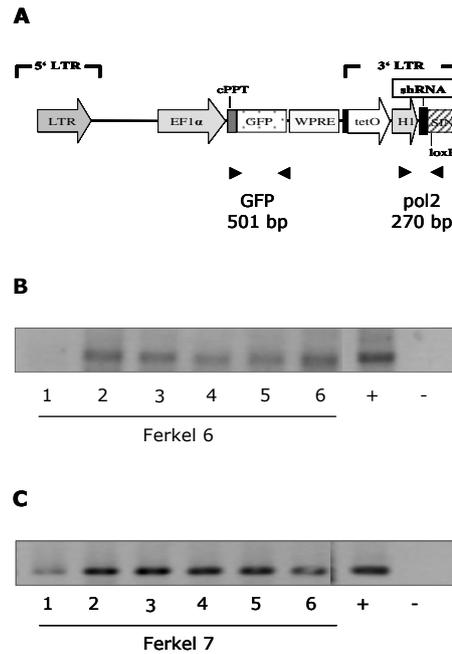


Abbildung 4.25: Nachweis der Transgen-Integration im Genom pol2-transgenen Ferkel 6 und 7

A: Schematische Darstellung der Positionen der zum Integrationsnachweis verwendeten Primer-Sets GFP und pol2 mit Amplifikatgrößen **B:** Integrationsnachweis mittels PCR unter Verwendung der pol2-Primer **C:** Integrationsnachweis mittels PCR unter Verwendung der GFP-Primer.

4.2.2.1 Expression der pol2-shRNA *in vivo*

Nachdem gezeigt wurde, dass die generierten Schweine tatsächlich transgen für die pol2-shRNA-Expressionskassette des Vektors pLVTHM waren, erfolgte der Nachweis der shRNA-Expression *in vivo*. Da die Größe der exprimierten siRNA 21 bp betrug, eine Molekülgröße, die bei herkömmlichen RNA-Isolierungsmethoden nicht erfasst wird, wurde ein Kit (MIRVANA MIRNA ISOLATION KIT) verwendet, das speziell die Aufreinigung von microRNAs (miRNAs, bis zu 200 nt) ermöglicht.

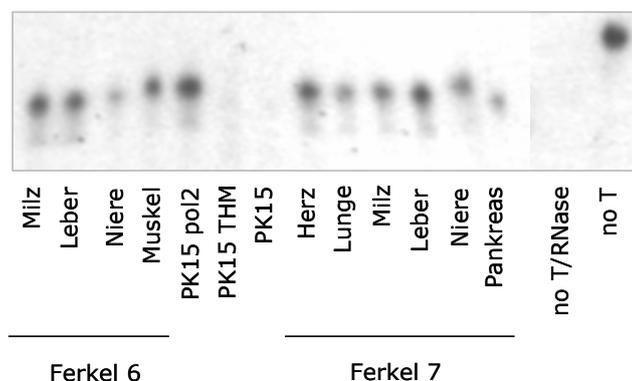


Abbildung 4.26: Nachweis pol2-shRNA-Expression *in vivo* in unterschiedlichen Organen der pol2-shRNA-transgenen Ferkel 6 und 7

Der Nachweis der shRNA-Expression wurde mit Hilfe des MIRVANA MIRNA DETECTION KITS erbracht. noT/RNase: Negativkontrolle ohne *target*-RNA und mit RNase-Behandlung. Die einzelsträngige Sonde wurde durch die RNase degradiert. No T: Negativkontrolle ohne *target*-RNA und ohne RNase-Behandlung. Die Volllängen-Sonde bleibt erhalten.

Der Nachweis der pol2-shRNA-Expression erfolgte mit Hilfe des MIRVANA MIRNA DETECTION KITS, einer Methode, die auf der herkömmlichen Northern-Blot-Analyse basiert. Die Hybridisierung der ^{32}P -markierten Sonde mit der Ziel-RNA geschieht nicht auf einer Membran, sondern in Lösung. Nach einer RNase-Behandlung, die zum Abbau nicht-hybridisierter RNA führt, erfolgt die Detektion über Polyacrylamidgelelektrophorese und Phosphoimaging. Auf diese Weise konnte die Expression der pol2-shRNA in allen untersuchten Organen der transgenen Ferkel 6 und 7 gezeigt werden (Abb. 4.26).

4.2.2.2 pol2-shRNA-vermittelte Hemmung der PERV-Expression *in vivo*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die pol2-shRNA *in vivo* in unterschiedlichen Organen der transgenen Ferkel 6 und 7 exprimiert wird, wurde sie hinsichtlich ihres inhibierenden Effekts untersucht. Hierfür wurde aus den entsprechenden Organen Gesamt-RNA isoliert und mit Hilfe der bereits beschriebenen *one-step RT real-time PCR* (3.1.2) analysiert.

Als Kontrolle diente Gesamt-RNA aus den jeweiligen Organen von Kontrollschweinen. Diese Kontrollschweine wurden mittels Nukleus-Transfer generiert und basieren auf dem Genom der nicht-transduzierten porzinen Fibroblasten P1 F10. Nach einer Tragzeit von 89 Tagen konnten Organe von fünf Tieren gewonnen werden. Die PERV-Expression in den jeweils gleichen Organen der Kontrolltiere wurden gemittelt, gleich 100% gesetzt und die PERV-Expression der Organe der pol2-shRNA-transgenen Tiere darauf bezogen. Die Normalisierung erfolgte sowohl auf die Menge der eingesetzten Gesamt-RNA als auch auf die Expression der *house keeping* Gene HPRT, GAPDH und Cyclophilin. Somit konnte in allen getesteten Organen der transgenen Ferkel 6 und 7 eine Hemmung der PERV-Expression von bis zu 94% nachgewiesen werden (Abb. 4.27). In Abbildung 4.27 ist die auf Gesamt-RNA normalisierte Hemmung der PERV-Expression dargestellt. Die auf die Expression der *house keeping* Gene HPRT, GAPDH sowie Cyclophilin normalisierten Daten ergaben ein ähnliches Expressions- bzw. Hemmungsmuster (Daten nicht gezeigt).

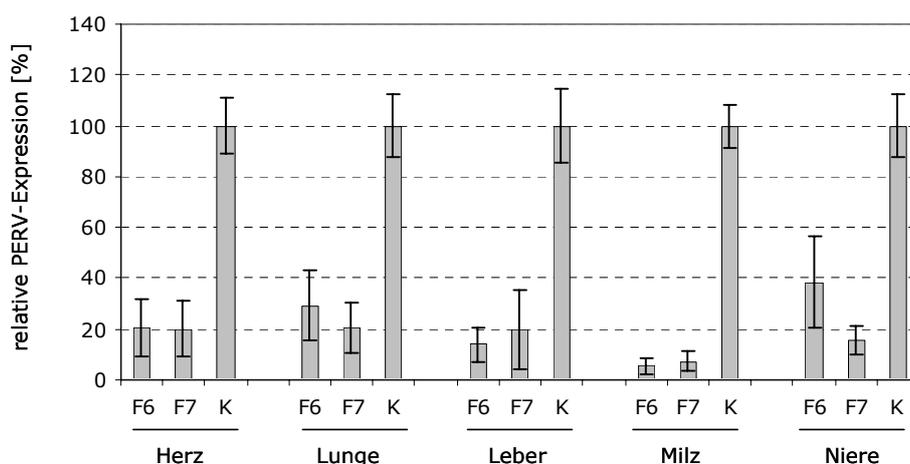


Abbildung 4.27: Hemmung der PERV-Expression unterschiedlichen Organen der pol2-shRNA-transgenen Ferkel 6 und 7

Die PERV-Expression in den jeweiligen Organen wurde mittels *one-step RT real-time PCR* bestimmt und auf die gleich 100% gesetzten, gemittelten Werte der jeweiligen Organe von fünf Kontrollschweinen bezogen. Normalisiert wurden die Daten auf die eingesetzte Menge Gesamt-RNA, sowie die Expression der *house keeping* Gene HPRT, GAPDH und Cyclophilin. Dargestellt sind die auf Gesamt-RNA normalisierten Daten.

4.2.3 Induktion neutralisierender Antikörper gegen PERV- und KoRV-Hüllproteine

Eine weitere Strategie der Prävention der PERV-Übertragung bei der Xenotransplantation basiert auf der Entwicklung eines Impfstoffes, mit dem der Xenotransplantatempfänger geimpft werden könnte oder der im Falle einer PERV-Übertragung zum Schutz einer Pandemie zum Einsatz kommen könnte.

Vakzinen gegen γ -Retroviren wie das Feline Leukämie Virus (FeLV) und das Murine Leukämie Virus (MuLV) wurden bereits beschrieben (PETERS et al., 1975, LEE et al., 1977, MARCIANI et al., 1991, SPARKES et al., 1997, SPARKES et al., 2003). Für porcine endogene Retroviren konnten bereits neutralisierende Antikörper gegen das virale p15E-Protein induziert werden (FIEBIG et al., 2003). Der auf dem viralen Hüllprotein gp70 basierende kommerziell erhältliche FeLV-Impfstoff Leucogen vermittelt einen hohen Schutz (ca. 80%) der Katzen vor der Ausbildung einer Leukose. Daher war das Ziel der vorliegenden Versuche die Induktion neutralisierender Antikörper gegen das retrovirale Hüllprotein gp70.

Hierfür wurden drei unterschiedliche Ansätze verfolgt: Die Generierung und Immunisierung von gp70-Proteinfragmenten, die Herstellung und Immunisierung von rekombinantem gp70 sowie die Konstruktion eines auf gp70 und gp85 basierenden DNA-Impfstoffs.

4.2.3.1 Immunisierung mit rekombinanten PERV-gp70-Proteinfragmenten

Da gegen FeLV bereits erfolgreiche *subunit*-Impfstoffe eingesetzt wurden (Sparkes et al., 1997), basierte ein Ansatz zur Induktion von Antikörpern gegen das PERV-gp70 auf der Unterteilung der gp70-Sequenz in Fragmente (*subunits*). Die Immunisierung mit den Proteinfragmenten sollte, neben der Induktion von Antikörpern, den Vergleich verschiedener Bereiche des gp70, hinsichtlich der Immunogenität und des Potentials, neutralisierende Antikörper hervorzurufen, ermöglichen.

Generierung, Expression und Immunisierung der Konstrukte

Auf Basis der *env*-Sequenz (Acc. no. AF_130444) wurden fünf überlappende Fragmente von jeweils 300 bp Länge ausgewählt, der Reihe nach mit 1-5 bezeichnet und in den Vektor pGEX-5X-1 kloniert. Die Fragmente 1, 2, 3 und 5 konnten erfolgreich exprimiert und aufgereinigt werden (3.3.3). Zusätzlich erfolgten Expression und Aufreinigung eines Kombinationskonstrukts, das die Fragmente 1, 2 und 3 umfasst. Trotz versuchter Expressionsoptimierung mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen, Expressionstemperaturen und Induktionszeiten konnte keine Überexpression des Fragmentes 4 erreicht werden. Der Vektor pGEX-5X-1 enthält zur Proteinaufreinigung die N-terminal mit dem Zielprotein fusionierte Gluthathion-S-Transferase sowie einen C-terminal gelegenen 6x-His-Tag. In der Western-Blot-Analyse konnte mit einem α -Penta-His-Antikörper (Qiagen) kein Signal für Fragment 4 detektiert werden. Mit einem α -GST-Antikörper (Sigma) konnte jedoch eine Bande auf der Höhe von 26 kDa nachgewiesen werden, die der Größe des N-terminalen GST-Tags entspräche.

Die Immunisierung der Ratten mit den Fragmenten 1, 2, 3, 5 und 123 erfolgte mit öligem Adjuvans intramuskulär in beide Hinterläufe sowie subkutan in die Nackenfalte (3.5.1). In

Tabelle 4.7 ist eine Übersicht der immunisierten Ratten aufgeführt. Drei Wochen nach der jeweiligen ersten Immunisierung erfolgte ein *boost* mit denselben Antigenen und weitere drei Wochen später eine Blutabnahme. Die daraus gewonnenen Seren wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Tabelle 4.7: Übersicht der mit PERV-gp70-Proteinfragmenten immunisierten Rattengruppen
Des Weiteren sind die genauen Nukleotidpositionen der Sequenzen aufgeführt.

Rattengruppe	Antigen	Nukleotidposition in der PERV env-Sequenz AF_130444
141	gp70 Fragment 1	1-300
142	gp70 Fragment 2	271-570
143	gp70 Fragment 3	541-840
149	gp70 Fragment 5	811-1110
150	gp70 Fragment 123	1-840

Induktion bindender Antikörper gegen die PERV-gp70-Proteinfragmente sowie virales gp70

Eine erste Analyse der Seren hinsichtlich einer humoralen Immunantwort erfolgte mit Hilfe der Western-Blot-Analyse unter Verwendung der rekombinanten Proteinfragmente 5 und 123. Alle Seren, mit Ausnahme derer der Rattengruppe 149 (immunisiert mit Fragment 5), zeigten ein starkes Signal auf der entsprechenden Höhe (37 bzw 59 kDa). Mit den Seren der Rattengruppe 149 wurde bei der gleichen Serumverdünnung ein deutlich schwächeres Signal beobachtet und mit dem Serum der Ratte 149.3 konnte kein Antigen detektiert werden. Die stärksten Signale zeigten die Seren der Rattengruppe 143 (immunisiert mit Fragment 3, Daten nicht gezeigt).

Die generierten Proteinfragmente besitzen jeweils zwei *tags*, wobei jedes für sich in der Lage ist, Antikörper zu induzieren. Ein eindeutiger Nachweis von gp70-spezifischen Antikörpern in den Seren der Tiere kann daher nur mit nicht fusioniertem gp70-Protein erbracht werden. Hierfür wurden mittels eines Saccharose-Gradienten aufgereinigte PERV-Partikel aus dem Überstand PERV-infizierter 293-Zellen verwendet.

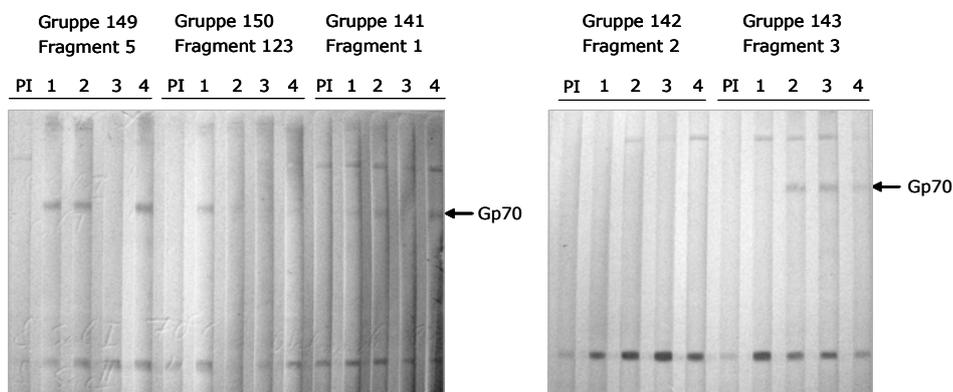


Abbildung 4.28: PERV-gp70-Detektion mit den Seren der mit gp70-Fragmenten immunisierten Ratten

Western-Blot-Analyse mit den Seren der Rattengruppen 141, 142, 143, 149 und 150 unter Verwendung pelletierter PERV-Partikel. Als Negativkontrolle diente jeweils das Präimmunserum (PI) der Ratte 1 der jeweiligen Gruppe. Die Detektion erfolgte mit Hilfe einer DAB-Färbung.

Mit allen Seren, außer denen der Rattengruppe 142 (immunisiert mit Fragment 2), konnte das virale gp70 in der Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden (Abb. 4.28). Jeweils eine von vier Ratten der jeweiligen Gruppe zeigte kein oder nur ein schwaches Signal auf der entsprechenden Höhe (Ratten: 149.3, 150.4, 141.3, 143.1).

Des Weiteren waren unerwartete Banden auf der Höhe von 15 kDa und oberhalb der 170 kDa-Bande zu erkennen (vgl. 5.2.3.1). Beide Signale konnten auch mit den Präimmunseren von Ratte 143.1 und 149.1 detektiert werden. Die stärksten Signale hinsichtlich der Bindung an virales gp70 konnten für die Seren der Ratten, die mit den Fragmente 3 bzw. 5 immunisiert wurden, nachgewiesen werden, Fragment 2 hingegen war nur wenig immunogen.

Induktion neutralisierender Antikörper gegen die PERV-gp70-Proteinfragmente

Die Unterteilung des viralen gp70 in Fragmente sollte die Lokalisation von Epitopen, die neutralisierende Antikörper induzieren können, ermöglichen. Mit Hilfe eines *real-time* PCR-basierten *in vitro* Neutralisationstests (3.5.2) wurde der Grad der PERV-Provirusintegration in Zellen, die mit den entsprechenden Seren und PERV-haltigem Überstand inkubiert wurden, bestimmt. Der neutralisierende Effekt ist dem Grad der Provirusintegration entgegengesetzt. Je weniger PERV-Provirus detektiert wird, desto stärker ist der neutralisierende Effekt des Serums. Für eine signifikante Neutralisation wurde ein Schwellenwert von 75% bestimmt, d.h. nur Seren, die eine Neutralisation von über 75% erzielen, werden als signifikant neutralisierend eingestuft.

Abbildung 4.29 zeigt die Neutralisationswerte der Seren. Für die Seren der Rattengruppe 141 (immunisiert mit Fragment 1) konnten keine verlässlichen Daten ermittelt werden; sie sind daher nicht aufgeführt. Die Seren der mit Fragment 2 immunisierten Ratten (Gruppe 142) zeigten keine signifikante Neutralisation (unter 30%). Mit den Seren von drei der vier Tiere, die mit Fragment 3 immunisiert wurden, konnte eine Neutralisation von ca. 70% erreicht werden. Von den vier Tieren, die Fragment 5 erhielten, konnte nur im Serum des Tieres 149.2 eine hohe Neutralisation (> 80%) nachgewiesen werden.

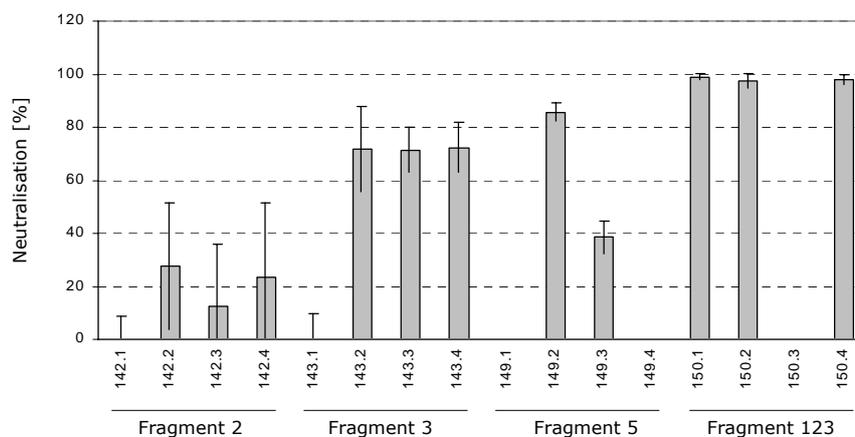


Abbildung 4.29: Neutralisierende Effekte der Immunseren der Rattengruppen 142, 143, 149 und 150

Mit Hilfe des unter 3.5.2 beschriebenen Neutralisationstests wurden die PERV-neutralisierenden Effekte [%] für die Seren der Rattengruppen 142, 143, 149 und 150 bestimmt. Seren, deren neutralisierender Effekt 75% übersteigt, werden als signifikant neutralisierend betrachtet.

Die stärkste neutralisierende Wirkung (97- 99%) wurde für die Seren der Rattengruppe 150, welche mit dem kombinierten Proteinfragment 123 immunisiert wurden, ermittelt. Die Daten des Neutralisationstests korrelieren zum Teil mit denen der Western-Blot-Analyse: Seren der Ratten, die kein gp70-Signal zeigten, vermittelten auch keine Neutralisation (Ratte 150.3, 143.1; nicht zutreffend für Gruppe 149).

Immunisierung der Ziege 52 mit den PERV-Gp70-Proteinfragmenten

Die Immunisierung der Proteinfragmente löste bei den Ratten eine humorale Immunantwort aus. Zur Gewinnung größerer Mengen Serum, die als Positivkontrolle für die Diagnostik verwendet werden können, wurde eine Ziege mit den Untereinheiten des gp70 immunisiert. Um möglichst die gesamte Länge des gp70 und somit alle Epitope abzudecken, wurden die Fragmente 123 und 5 verwendet. Die Immunisierung erfolgte auch hier mit öligem Adjuvans intramuskulär in beide Hinterläufe.

Induktion bindender und neutralisierender Antikörper gegen die PERV-gp70-Proteinfragmente in Ziege 52

Das drei Wochen nach dem *boost* aus dem Blut der Ziege 52 gewonnene Serum wurde zusammen mit den Seren der Ziegen 16 (FIEBIG et al., 2003) und 62 (vgl. 4.2.3.2) mittels Western-Blot-Analyse hinsichtlich bindender Antikörper gegen pelletierte PERV-Partikel getestet. Mit dem Serum der Ziege 52 konnte das virale gp70 (Abb. 4.30) detektiert und somit die Induktion bindender Antikörper bestätigt werden.

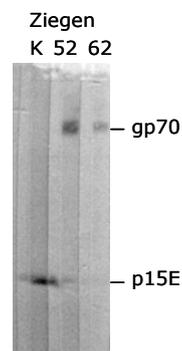


Abbildung 4.30: PERV-gp70-Detektion mit den Seren der mit den gp70-Fragmenten sowie rp52 immunisierten Ziegen

Western-Blot-Analyse mit den Seren der immunisierten Ziegen unter Verwendung pelletierter PERV-Partikel. K: Kontrolle (Ziege 16: α -PERV-p15E, FIEBIG et al., 2003), Ziege 52: α -PERV-gp70, α -KoRV-gp70

Mit den Seren der mit Fragment 5 bzw. 123 immunisierten Ratten konnten neutralisierende Effekte auf eine *in vitro*-PERV-Infektion nachgewiesen werden. Wie erwartet, zeigte auch das Serum der Ziege 52 eine starke Neutralisation. Durch Ausverdünnung des Serums konnte für die Neutralisation ein Titer von 40 bestimmt werden (Abb. 4.31), d.h. bis zu einer Verdünnung des Serums von 1:40 wurde ein starker neutralisierender Effekt beobachtet. Zur Bestimmung der Spezifität des neutralisierenden Effekts des Ziegenserums 52 wurde ein Antigen-Inhibitionsversuch durchgeführt. Hierfür wurde das Serum der Ziege 52 vor dem Neutralisationstest jeweils mit den Proteinfragmenten 1, 2, 3 und 5 vorinkubiert. Auf diese Weise sollten Antikörper

gegen das jeweilige Proteinfragment gehemmt werden, um somit zum einen eine Aussage über die Spezifität zu treffen, d.h. dass die neutralisierende Aktivität tatsächlich auf Antikörper zurückzuführen ist und nicht auf eventuelle Komplement- oder andere lösliche antivirale Faktoren. Zum anderen sollten die Bereiche des Antigens, die zur Induktion von neutralisierenden Antikörpern führten, festgestellt werden. Da die Proteine in unlöslicher Form vorlagen, führte die Inkubation der 293-Zellen mit dem Protein-Serum-Gemisch zu zytotoxischen Effekten, wodurch der Neutralisationstest nicht auswertbar war.

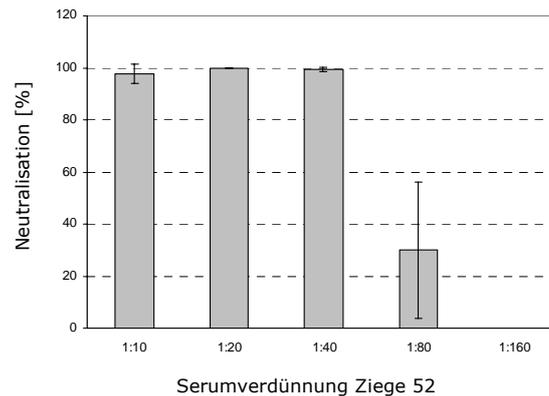


Abbildung 4.31: Neutralisierende Effekte des Serums der mit PERV-gp70-Proteinfragmenten immunisierten Ziege 52

Titration der Ziegenserums 52 im Neutralisationstest. Zur Bestimmung des Titers an neutralisierenden Antikörpern wurde das Serum mit einer Verdünnungsstufe von 2 ausverdünnt. Seren, deren neutralisierender Effekt 75% übersteigt, werden als signifikant neutralisierend betrachtet. Die dargestellten Neutralisationswerte wurden auf die Werte des Präimmuserums normalisiert.

4.2.3.2 Immunisierung mit rekombinantem PERV- bzw. KoRV-rp52

Das Koala Retrovirus ist phylogenetisch eng mit den porzinen endogenen Retroviren verwandt. Da KoRV im Gegensatz zu PERV in der Lage ist, Ratten *in vivo* zu infizieren, könnte dieses System, wie einleitend beschrieben, als Modell für einen Impfstoff gegen PERV dienen.

Die bisher generierten Proteinfragmente bieten hierfür einen vielversprechenden Ansatz. Dennoch ist es wünschenswert, mit Hilfe des gesamten gp70-Proteins alle Epitope, inklusive möglicher Konformationsepitope, abzudecken. Daher wurde die rekombinante Herstellung der gesamten gp70-Proteine von PERV und KoRV parallel angestrebt.

Konzeption der p52-Sequenz am Beispiel des FeLV-p45

Bei dem phylogenetisch eng mit PERV und KoRV verwandten FeLV war es gelungen das Hüllprotein, einschließlich der ersten 34 Aminosäuren des Transmembranproteins p15E, rekombinant herzustellen und als protektiven Impfstoff zu verwenden (MARCIANI et al., 1991). Die Sequenz dieses unglykosilierten Proteins (p45) diente als Vorlage für die Klonierung der Hüllproteine von PERV und KoRV in den Expressionsvektor pET-22b(+). Die Aminosäuresequenz des p45 (FeLV-A Glasgow strain: p08359) wurde ausgehend von Marciani et al. (MARCIANI et al., 1991) übernommen und mit den *env*-Sequenzen von

PERV und KoRV (AF_151794) abgeglichen. Für den N-Terminus konnte als letzte übereinstimmende Homologie das in den meisten γ -Retroviren hochkonservierte PHQ-Motiv (FeLV: Position 38, PERV: Acc. no. AF_130444, Position 52, KoRV: Acc. no. AF_151794, Position 42) identifiziert werden (LAVILLETTE UND KABAT, 2004). Für das in die p15E-Region hineinreichende C-terminale Ende wurden 25 Aminosäuren bestimmt. Diese enthalten das Fusionspeptid von p15E und enden, im Falle von PERV, in der Peripherie des Epitopes E1 (FIEBIG et al., 2003). Die gesamten Spannen der gewählten Sequenzen sind in Tabelle 4.8 aufgeführt.

Tabelle 4.8: Ermittelte Spannen der Sequenzen für rp52 von PERV und KoRV

Es sind jeweils die Positionen der ersten und letzten Aminosäure der Env-Sequenz sowie die sich daraus ergebenden Gesamtlängen der rekombinanten p52-Proteine aufgeführt. Die gesamte Env-Sequenz beträgt bei beiden Viren 659 AS. Die Vektorsequenzen setzen sich aus dem C-terminalen His-tag und der MCS zusammen.

	AS Position N-Terminus	AS Position C-Terminus	Gesamtlänge	berechnetes Molekulargewicht	zzgl. Vektorsequenzen
PERV	49	487	439 AS	49,1 kDa	51,8 kDa
KoRV	41	41	448 AS	48,9 kDa	51,7 kDa

Die Molekulargewichte der daraus resultierenden Proteine (inklusive der Vektorsequenzen) wurden mit Hilfe der *software* LASERGENE theoretisch auf 52 kDa berechnet und die rekombinant hergestellten Proteine daher als rp52 bezeichnet.

Herstellung und Expression der rp52-Konstrukte

Bisher konnte PERV-gp70 nur in eukaryotischen Zellen exprimiert werden (WATANABE et al., 2005). Für KoRV-gp70 wurde bislang noch keine Expression beschrieben.

Da sich das PERV-gp70 in bisherigen Versuchen mit herkömmlichen Expressionsvektoren (pGEX-5x-1, pCAL-n) nicht exprimieren ließ, wurde der Expressionsvektor pET-22b(+) gewählt. Dieser steht unter einer relativ strengen Transkriptionskontrolle, erlaubt somit die Expression von zellschädigenden Proteinen, und besitzt zudem eine Signalsequenz (*pelB-leader sequence*), die das produzierte Protein in das Periplasma von *E. coli* dirigiert (Novagen, TB038 12/98). Das Milieu des Periplasmas ist im Gegensatz zum Lumen stärker reduzierend und kann somit zur korrekten Faltung und zur Löslichkeit des Proteins beitragen. Des Weiteren besitzt das Periplasma eine andere Proteinzusammensetzung als das Zytoplasma, was eine eventuelle Hydrolyse des rekombinant hergestellten Proteins verhindern kann. Nachteilig wirkt sich jedoch die häufig beobachtete reduzierte Expressionsrate aus.

Aufgrund dieser Tatsachen erfolgten parallel zwei Expressionsansätze: Zum einen die Expression der viralen Hüllproteine mit dem Lokalisierungssignal für das *E. coli*-Periplasma und zum anderen eine Expression ohne Lokalisierungssignal, was zum Verbleib der Proteine im Zytoplasma führt.

Für beide Ansätze wurden die in Tabelle 2.3 als PERV-gp70-pET[...] bzw. KoRV-gp70-pET[...] bezeichneten Primer für die p52-Sequenzen von PERV und KoRV ermittelt und an das Leseraster des pET-22b(+) angeglichen. Ausgehend von viraler RNA, wurden die Sequenzen mittels *one-step* RT-PCR kloniert. Es konnten drei von vier Plasmiden hergestellt werden: KoRV-p52-pET-22b(+)-pelB-Is, KoRV-p52-pET-22b(+) und PERV-

p52-pET-22b(+)-pelB-Is. Die Sequenzierung ergab für alle drei Plasmide ein vollständig erhaltenes Leseraster mit den folgenden Aminosäureaustauschen im Vergleich zur Datenbanksequenz (PERV-A/C: AF130444, KoRV: AF_151794):

In der PERV-*rp52*-Sequenz kam es an Position 209 zu einem Aminosäureaustausch von Serin zu Alanin. In der KoRV-*rp52*-Sequenz wurden die bereits im Koala Birubi beobachteten Abweichungen an Position 408 (Asparagin zu Histidin) und 459 (Serin zu Prolin) gefunden (FIEBIG et al., 2006).

Mit Hilfe eines Kolonieblots (3.3.8) unter Verwendung eines α -Penta-his-Antikörpers (Qiagen) wurden die Transformanten zunächst hinsichtlich ihres Potentials, das rekombinante rp52-Protein zu exprimieren, getestet. Hierbei konnte ausschließlich bei Klonen, welche mit den pET-22b(+)-Plasmiden inklusive der *pelB-leader sequence* transformiert wurden, sowohl mittels ECL-Detektion als auch mit DAB-Detektion ein deutliches Signal detektiert werden. Dem gegenüber wurde bei Klonen, die mit dem Vektor pET-22b(+) ohne Signalsequenz transformiert waren, kein Signal beobachtet. Da das His-tag C-terminal mit dem rekombinanten Protein fusioniert ist, wurden mit dem α -Penta-his-Antikörper nur vollständig translatierte Proteine detektiert. Mit diesem Vortest konnte somit eine Expression der Proteine mit dem Lokalisationssignal für das Periplasma nachgewiesen werden.

Überexpression und Reinigung der rp52-Proteine in *E.coli*

Expressionsversuche unter Standardbedingungen (1 mM IPTG, 37°C, 3 Stunden) führten nicht zur Überexpression der rp52-Proteine beider Viren. Mit Hilfe einer Expressionsoptimierung, im Zuge derer unterschiedliche IPTG-Konzentrationen, verschiedene Temperaturen sowie diverse Expressionszeiträume getestet wurden, konnten zwei Expressionsbedingungen mit ähnlich guten Ausbeuten ermittelt werden:

- 0,05 mM IPTG, 37°C, 3 Stunden
- 0,5 mM IPTG, 4°C, 24 bis 30 Stunden

Nach der Aufreinigung der Proteine mit Hilfe von Ni-NTA-Affinitätschromatografie-Säulen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte eine Dialyse gegen PBS, die zum Ausfallen der Proteine führte. Eine Dialyse über einen Harnstoffgradienten führte ebenfalls nicht zur Löslichkeit des Proteins. Die ausgefallenen Proteine konnten im Polyacrylamidgel sowie mittels der Western-Blot-Analyse auf einer Höhe von ca. 55 kDa detektiert werden.

Detektion von bakteriellen Glykosylierungen

Da das Signal der rekombinant hergestellten rp52-Proteine im Polyacrylamidgel höher lief als erwartet, wurde eine bakterielle Glykosylierung des Proteins vermutet. Mit Hilfe einer spezifischen Färbung von Glykoproteinen (siehe 3.3.6) im Polyacrylamidgel konnte jedoch keine Glykosylierung der rekombinanten p52-Proteine von PERV und KoRV festgestellt werden.

Immunisierung von Ratten sowie der Ziegen 61 und 62 mit rekombinantem PERV- bzw. KoRV-rp52

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, FIEBIG et al., 2006), die im Fall des FeLV in der Lage waren, drei von sechs Katzen über einen Zeitraum von 2 Jahren vor einem Ausbruch der Leukose zu schützen (LANGHAMMER, 2006). Wie bereits Stefan Langhammer beschrieben hat, könnte p15E in Kombination mit Leucogen (p45) einen verbesserten Impfstoff darstellen, der im optimalen Fall eine sterile Immunität vermittelt (LANGHAMMER, 2006).

Basierend auf diesen Ergebnissen erfolgte die Immunisierung von Ratten mit den rp52- und p15E-Proteinen beider Viren jeweils einzeln und in Kombination. Die rekombinanten p15E-Proteine bestanden jeweils nur aus der Ektodomäne des transmembranen Hüllproteins (FIEBIG et al., 2003). Tabelle 4.9 zeigt eine Übersicht über die erfolgten Immunisierungen. Die Gruppe 209 diente als Negativkontrolle und wurde ausschließlich mit Adjuvans immunisiert. Im Gegensatz zu dem bei der Doppelimmunisierung gegen FeLV benutzten Aluminiumhydroxid und Saponin erfolgte die Immunisierung mit öligen Adjuvans (Freund). Des Weiteren wurden die Ziegen 61 und 62 mit KoRV-rp52 bzw. PERV-rp52 immunisiert. Drei Wochen nach der jeweiligen ersten Immunisierung erfolgte ein *boost* mit denselben Antigenen und weitere drei Wochen später eine Blutabnahme. Die daraus gewonnenen Seren wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Tabelle 4.9: Übersicht der mit PERV-rp52 und -p15E sowie KoRV-rp52 und -p15E immunisierten Rattengruppen und Ziegen

Rattengruppen	Antigen
209	Adjuvans (Kontrollgruppe)
210	KoRV-rp52
211	KoRV-rp52 + p15E
212	KoRV-p15E
213	PERV-p15E
214	PERV-rp52
215	PERV-rp52 + p15E
Ziegen	Antigen
61	KoRV-rp52
62	PERV-rp52

Induktion bindender Antikörper gegen die rekombinanten PERV-Hüllproteine rp52 und p15E

Die gewonnenen Seren der Rattengruppen 213 (PERV-p15E), 214 (PERV-rp52) sowie 215 (PERV-p15E + rp52) und der Ziege 62 (PERV-rp52) wurden mit Hilfe der Western-Blot-Analyse hinsichtlich bindender Antikörper gegen die immunisierten rekombinanten Proteine untersucht. Mit allen Seren konnte das entsprechende Antigen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurde die Bindung der Seren gegen die viralen Hüllproteine (pelletiertes Virus) analysiert (Abb. 4.32).

Mit Ausnahme des Serums der Ratte 215.3, das nur p15E erkannte, konnte mit allen Seren die entsprechenden viralen Proteine detektiert werden. Mit dem Serum der Ratte 214.3 wurde das stärkste Signal gegen rp52 detektiert. Im Gegensatz zu den Seren der restlichen Tiere der Gruppe konnte zusätzlich ein unerwartetes Signal auf der Höhe von p15E beobachtet werden (vgl. 5.2.3.1).

Mit dem Ziegenserum 62 wurde das virale gp70 im Vergleich zum Serum der Ziege 52 (immunisiert mit den PERV gp70-Fragmenten) mit der gleichen Serumverdünnung (1:200) wesentlich schwächer detektiert (Abb. 4.32).

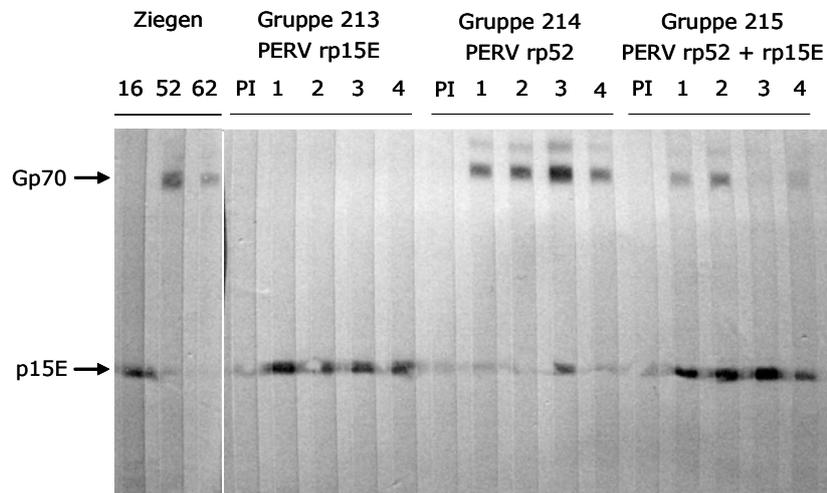


Abbildung 4.32: Detektion der PERV-Proteine gp70 und p15E mit den Immunsereen der Rattengruppen 213, 214, 215 und der Ziege 62

Western-Blot-Analyse mit den Seren der mit PERV-rp15E (213), rp52 (214) und rp52 + p15E (215) immunisierten Rattengruppen und der Ziege 62 (rp52) unter Verwendung pelletierter PERV-Partikel. Als Kontrollen wurden die Seren der Ziegen 16 (α -PERV-p15E) und 52 (α -PERV-gp70, Fragment 123 und 5) verwendet. Als Negativkontrolle diente jeweils das Präimmunserum (PI) von Ratte 1 der entsprechenden Gruppe.

Auswirkungen der Doppelimmunisierung mit den rekombinanten PERV-Hüllproteinen auf bindende Antikörper

Mit den Seren der mit beiden Proteinen (rp52 und p15E) immunisierten Ratten (Gruppe 215) wurde mit der gleichen Serumverdünnung eine schwächere Bindung des viralen gp70 detektiert, als mit den Seren der Rattengruppe 214, welche nur rp52 appliziert bekamen (Abb. 4.32). Das Serum der Ratte 215.4 zeigte hierbei nur eine sehr schwache Bindung des viralen gp70 und mit dem Serum der Ratte 215.3 war kein Signal zu detektieren. Hinsichtlich der Bindung an das virale p15E hingegen konnten mit den Seren der Rattengruppe 215 keine sichtbare Unterschiede im Vergleich zu den Seren der Einzelimmunisierung (Gruppe 213) festgestellt werden. Mit dem Serum des Tieres 215.3 wurde sogar das stärkste Signal gegen p15E detektiert (Abb. 4.32).

Induktion neutralisierender Antikörper gegen die PERV-Hüllproteine gp70 und p15E

Hinsichtlich neutralisierender Eigenschaften, also der Fähigkeit *in vitro* vor einer PERV-Infektion zu schützen, wurden die Seren im Neutralisationstest untersucht (Abb. 4.33). Ratte 213.2 wurde nicht mit aufgeführt, da von diesem Tier nicht genügend Serum vorhanden war. Nur bei einem Serum der drei mit p15E immunisierten Tieren (213.3) konnte eine deutliche Neutralisation (> 75%) bestimmt werden, jedoch nur bei einer Serumverdünnung von 1:10. Im Gegensatz dazu konnten durch die Immunisierung mit

rp52 (Gruppe 214) hohe neutralisierende Titer erhalten werden. Bei zwei von vier Tieren (214.1 und 214.3) zeigten die Seren bis zu einer Verdünnung von 1:160 eine neutralisierende Wirkung von 75 bis 82%. Ab einer Verdünnung von 1:320 konnte kein neutralisierender Effekt mehr detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

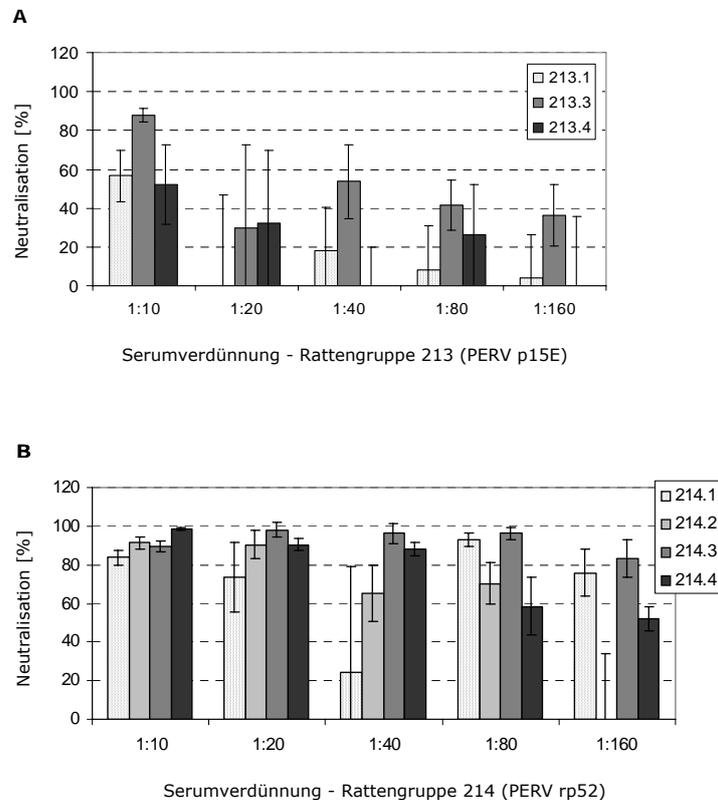


Abbildung 4.33: Neutralisierende Effekte der Immunsereen der Rattengruppen 213 (p15E) und 214 (rp52)

Titration der Rattensereen 213.1 bis 213.4 (A) und 214.1 bis 214.4 (B) im Neutralisationstest. Zur Bestimmung des Titters an neutralisierenden Antikörpern wurde das Serum mit einer Verdünnungsstufe von 2 ausverdünnt. Seren, deren neutralisierender Effekt 75% übersteigt, werden als signifikant neutralisierend betrachtet. Die dargestellten Neutralisationswerte wurden auf die Werte der Kontrollseren (Rattengruppe 209: Adjuvans) normalisiert.

Die Seren der anderen zwei Tiere dieser Gruppe wirkten bis zu einer Verdünnung von 1:40 (214.4) und 1:80 (214.2) neutralisierend. Die höchste Neutralisation konnte bei dem Serum der Ratte 214.3, das auch in der Western-Blot-Analyse ein sehr starkes Signal zeigte, beobachtet werden. Das Serum der Ziege 62 zeigte einen starken neutralisierenden Effekt (nahezu 100%) bei einer Serumverdünnung von 1:10, der bei der 1:20 Verdünnung jedoch mit 67% nicht mehr signifikant war und ab einer Verdünnung von 1:40 nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.34). Somit enthielt das Serum der Ziege 62 einen wesentlich niedrigeren Titer an neutralisierenden Antikörpern als das Serum der Ziege 52, welche mit den gp70-Proteinfragmenten immunisiert worden war (direkter Vergleich der Neutralisationswerte beider Ziegensereen, siehe Abb. 4.39 B). Diese Beobachtungen korrelieren mit dem Ergebnis der Western-Blot-Analyse, in welchem mit dem Ziegenserum 62 eine deutlich schwächere Bindung des gp70 zu erkennen war (Abb. 4.32).

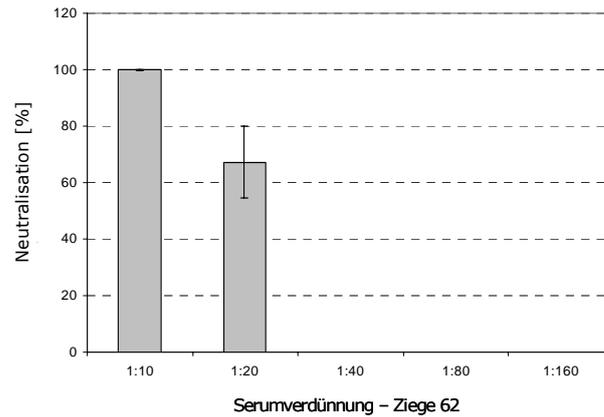


Abbildung 4.34: Neutralisierende Effekte des Serums der mit PERV-rp52 immunisierten Ziege 62

Titration des Ziegenserums 62 im Neutralisationstest. Zur Bestimmung des Titer an neutralisierenden Antikörpern wurde das Serum mit einer Verdünnungsstufe von 2 ausverdünnt. Seren, deren neutralisierender Effekt 75% übersteigt, werden als signifikant neutralisierend betrachtet. Die dargestellten Neutralisationswerte wurden auf die Werte des Präimmunserums normalisiert.

Auswirkungen der Doppelimmunisierung mit den rekombinanten PERV-Hüllproteinen auf neutralisierende Antikörper

Die neutralisierende Wirkung der Seren aus der Rattengruppe 215, die eine Doppelimmunisierung erhielt (Abb. 4.35), war wesentlich stärker als bei einer Einzelimmunisierung mit p15E. Im Vergleich mit der Gruppe 214, die rp52 alleine erhalten hatte, traten für die Neutralisation jedoch geringere Absolutwerte und auch geringere Titer neutralisierender Antikörper auf.

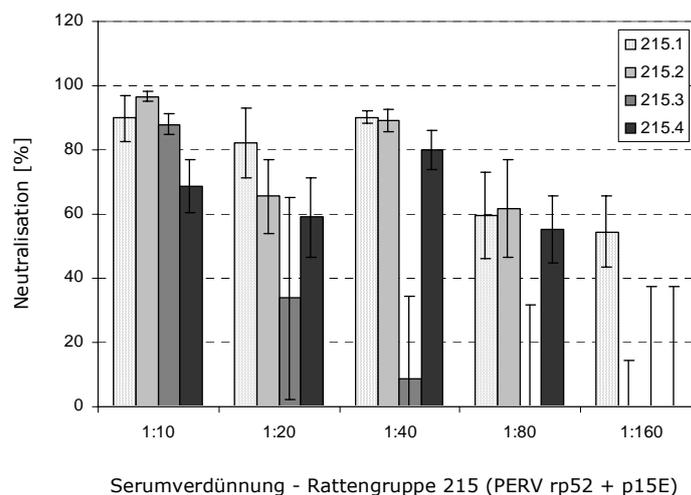


Abbildung 4.35: Neutralisierende Effekte der Immunseren der Rattengruppe 215 (rp52 & p15E)

Titration der Rattenserum 215.1 bis 215.4 im Neutralisationstest. Zur Bestimmung des Titer an neutralisierenden Antikörpern wurde das Serum mit einer Verdünnungsstufe von 2 ausverdünnt. Seren, deren neutralisierender Effekt 75% übersteigt, werden als signifikant neutralisierend betrachtet. Die dargestellten Neutralisationswerte wurden auf die Werte der Kontrollseren (Rattengruppe 209: Adjuvans) normalisiert.

Das Serum der Ratte 215.3, das auch in der Western-Blot-Analyse keine sichtbare Bindung an gp70 zeigte, hatte nur bei einer Verdünnung von 1:10 eine neutralisierende Wirkung. Bei den Seren der anderen drei Tiere der Gruppe konnten bis zu einer Verdünnung von 1:40 relativ hohe Neutralisationen von $\geq 80\%$ gezeigt werden.

Induktion bindender Antikörper gegen die rekombinanten KoRV-Hüllproteine rp52 und p15E

Analog zu den Immunisierungsversuchen mit den PERV-Hüllproteinen wurden drei Rattengruppen sowie eine Ziege (61) mit den rekombinanten Hüllproteinen des Koala Retrovirus immunisiert. Die gewonnenen Seren der Rattengruppen 210 (KoRV-rp52), 211 (KoRV-rp52 + p15E) und 212 (KoRV-p15E) sowie der Ziege 61 (KoRV-rp52) wurden mit Hilfe der Western-Blot-Analyse hinsichtlich bindender Antikörper gegen die immunisierten rekombinanten Proteine untersucht. Mit allen Seren konnte das entsprechende Antigen detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren konnte unter Verwendung pelletierter KoRV-Partikel für alle Seren der Rattengruppe 210 (rp52) sowie für das Serum der Ziege 61 mittels Western-Blot-Analyse die Bindung an virales gp70 nachgewiesen werden (Abb. 4.36).

Für die Seren der Rattengruppen 211 (rp52 + p15E) und 212 (p15E) konnte auf Grund des Mangels von weiterem Viruslysate zunächst kein Bindungsnachweis an die viralen Proteine gp70 und p15E erbracht und somit auch kein Vergleich zwischen Einzel- und Kombinationsimmunisierung gezogen werden. In späteren Untersuchungen konnte die Bindung aufgrund der neutralisierenden Effekte dieser Seren jedoch bestätigt werden.

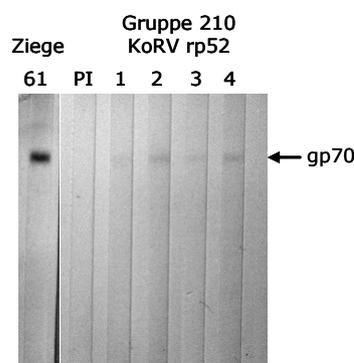


Abbildung 4.36: Detektion der KoRV-Proteine gp70 und p15E mit den Immunsereen der Rattengruppen 210 und Ziege 61

Western-Blot-Analyse mit den Seren der mit KoRV-rp52 immunisierten Ratten (210) unter Verwendung pelletierter KoRV-Partikel. Als Negativkontrolle diente das Präimmunserum (PI) von Ratte 210.1.

Induktion neutralisierender Antikörper gegen die KoRV-Hüllproteine gp70 und p15E

Mit Hilfe des bereits beschriebenen Neutralisationstests (3.5.2) wurden die Seren der Rattengruppen 210 (KoRV-rp52), 211 (KoRV-rp52 + p15E), 212 (KoRV-p15E) und das Serum der Ziege 61 (KoRV-rp52) hinsichtlich der Fähigkeit, *in vitro* vor einer KoRV-Infektion zu schützen, untersucht (Abb. 4.37). Durch die Immunisierung mit den KoRV-

Hüllproteinen rp52 und der Doppelimmunisierung mit KoRV-rp52 und -p15E konnten hohe Titer neutralisierender Antikörper erhalten werden (Abb. 4.37).

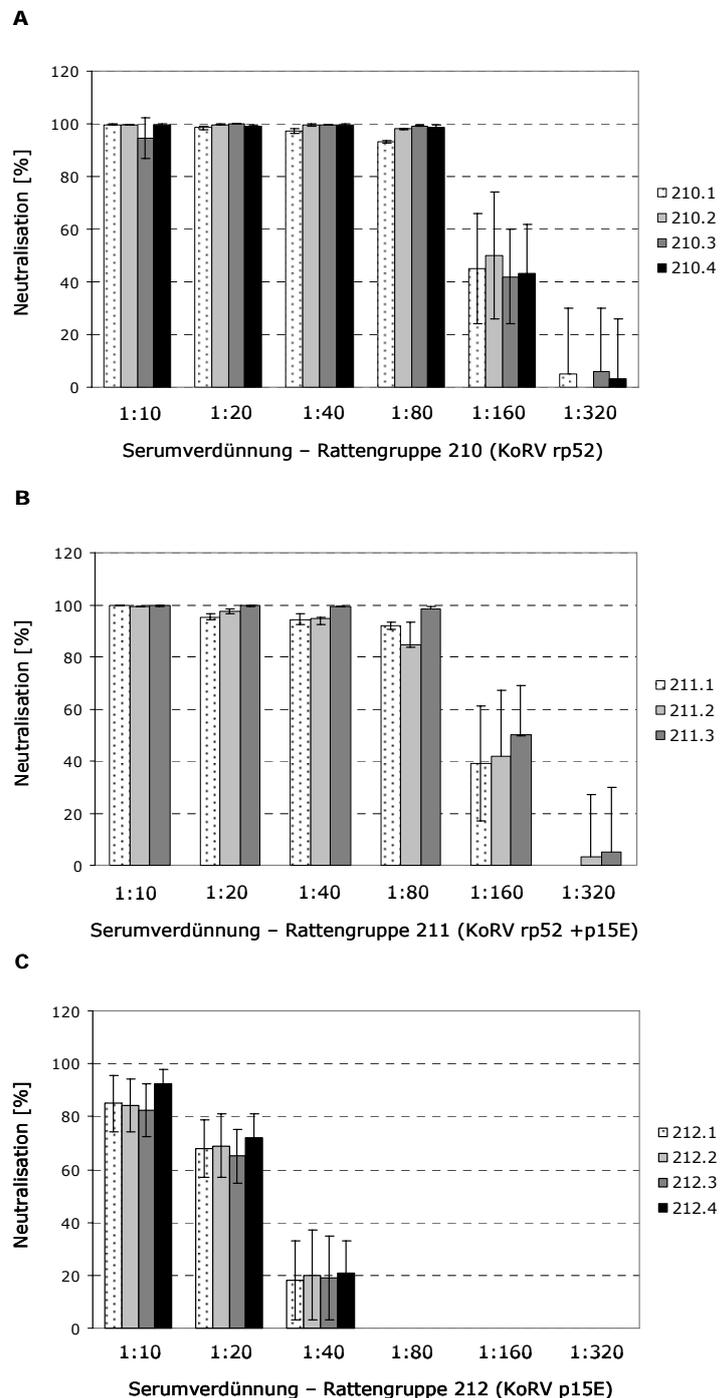


Abbildung 4.37: Neutralisierende Effekte der Immunsereen der Rattengruppen 210 (KoRV- rp52), 211 (KoRV-rp52 + p15E) und 212 (KoRV-p15E)

Titration der Rattenseren 210.1 bis 210.4 (A), 211.1 bis 211.3 (B) und 212.1 bis 212.4 (C) im Neutralisationstest. Zur Bestimmung des Titers an neutralisierenden Antikörpern wurde das Serum mit einer Verdünnungsstufe von 2 ausverdünn. Seren, deren neutralisierender Effekt 75% übersteigt, werden als signifikant neutralisierend betrachtet. Die dargestellten Neutralisationswerte wurden auf die Werte der Kontrollseren (Rattengruppe 209: Adjuvans) normalisiert.

Die Seren aller Tiere der Rattengruppe 210, die mit KoRV-rp52 immunisiert wurden, zeigten bis zu einer Verdünnung von 1:80 eine konstante Neutralisation von über 95% (Abb. 4.37 A). Erst ab einer Verdünnung von 1:160 halbierte sich dieser Effekt.

Auch die Seren der Ratten, denen die Kombination aus rp52 und p15E verabreicht wurde (Rattengruppe 211), neutralisierten bis zu einer Verdünnung von 1:80 konstant bei über 90% (Abb. 4.37 B). Durch die Doppelimmunisierung war somit kein abschwächender Effekt, wie er bei der Doppelimmunisierung der PERV-Hüllproteine zu beobachten war, zu erkennen. Bei der Serumverdünnung von 1:160 sank die neutralisierende Wirkung der Seren auf unter 50%. Das Tier 211.4 verstarb in Folge der Blutabnahme nach der ersten Immunisierung und konnte daher nicht in die Untersuchungen mit einbezogen werden.

Die Seren der Tiere der Rattengruppe 212, die mit KoRV-p15E immunisiert wurden, zeigten nur bei einer Verdünnung von 1:10 einen neutralisierenden Effekt von 80 bis 90% (Abb. 4.37 C). Bereits bei der nächsten Verdünnungsstufe (1:20) lag dieser Effekt unter 70% und war somit nicht mehr signifikant.

Mit dem Serum der mit KoRV-rp52 immunisierten Ziege 61 konnte eine starke Neutralisation von nahezu 100% bis zu einer Serumverdünnung von 1:80 nachgewiesen werden. Bei einer Verdünnungsstufe von 1:160 lag dieser Effekt nur noch bei ca. 35% (Abb. 4.38).

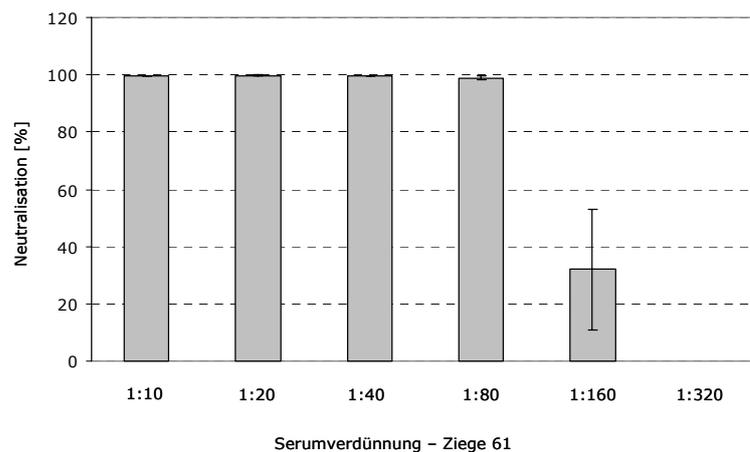


Abbildung 4.38: Neutralisierende Effekte des Serums der mit KoRV-rp52 immunisierten Ziege 61

Titration der Ziegenserums 61 im Neutralisationstest. Zur Bestimmung des Titers an neutralisierenden Antikörpern wurde das Serum mit einer Verdünnungsstufe von 2 ausverdünnt. Seren, deren neutralisierender Effekt 75% übersteigt, werden als signifikant neutralisierend betrachtet. Die dargestellten Neutralisationswerte wurden auf die Werte des Präimmunserums normalisiert.

Kreuzneutralisierende Effekte

Von dem Transmembranprotein p15E ist bereits bekannt, dass durch Immunisierung induzierte Antikörper gegen p15E aufgrund dessen hoher Konservierung, eine kreuzneutralisierende Wirkung auf andere Retroviren wie FeLV, PERV oder KoRV aufweisen können.

Daher wurden die Seren der mit den rekombinanten Proteinen PERV- und KoRV-p52- sowie den PERV-gp70-Proteinfragmenten immunisierten Ziegen 62, 61 und 52 im Neutralisationstest hinsichtlich kreuzneutralisierender Effekte auf das jeweils andere Virus (PERV und KoRV) analysiert.

Für die Seren der Ziegen 52 (immunisiert mit PERV-gp70-Fragmenten) und 61 (immunisiert mit KoRV-rp52) konnten keine Kreuzneutralisation von KoRV bzw. PERV festgestellt werden (Abb. 4.39 A,B). Das Serum der Ziege 62 (immunisiert mit PERV-rp52) zeigte bei einer Verdünnung von 1:10 einen kreuzneutralisierenden Effekt auf KoRV (80%). Dieser Effekt war bei jedoch bei einer Serumverdünnung von 1:20 bereits auf 24% gesunken und somit nicht mehr signifikant (Abb. 4.39 A).

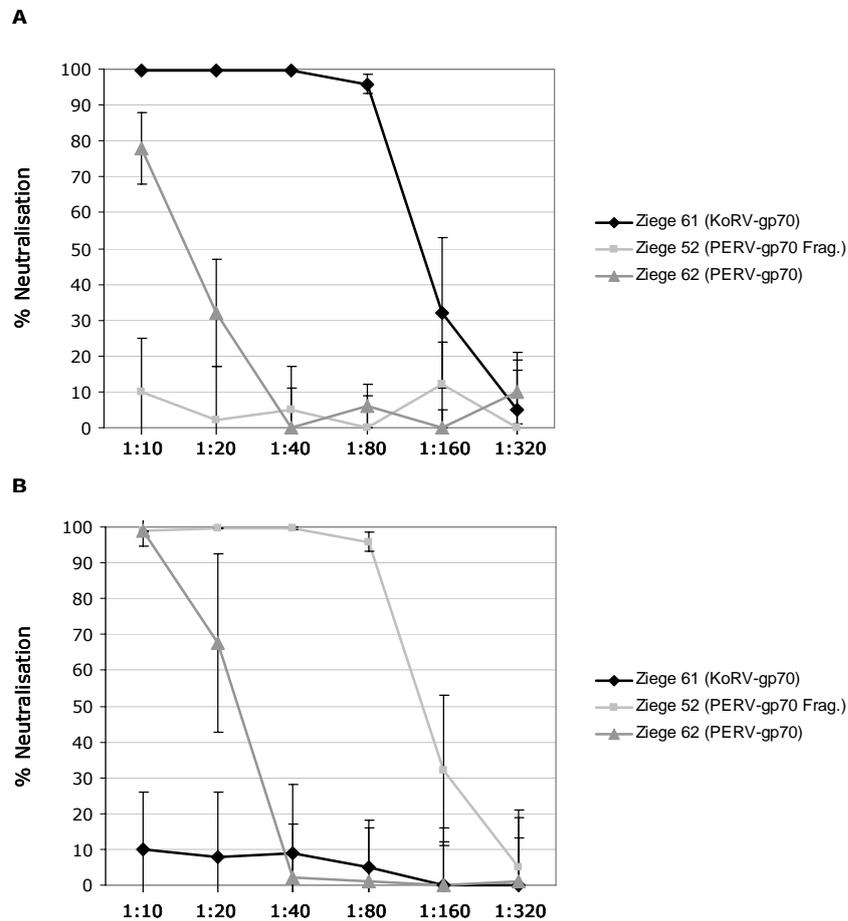


Abbildung 4.39: Kreuzneutralisierende Effekte der Ziegenserum 52, 61 und 62

A: Titration der Ziegenserum 61, 52 und 62 im KoRV-Neutralisationstest. **B:** Titration der Ziegenserum 61, 52 und 62 im PERV-Neutralisationstest. Zur Bestimmung des Titers an neutralisierenden Antikörpern wurde das Serum mit einer Verdünnungsstufe von 2 ausverdünnt. Seren, deren neutralisierender Effekt 75% übersteigt, werden als signifikant neutralisierend betrachtet.

4.2.3.3 DNA-Vakzinierung mit gp70- und gp85-Konstrukten von PERV und KoRV

Parallel zu der Immunisierung mit den rekombinanten Proteinen erfolgte eine DNA-Vakzinierung mit den gp70- und gp85-Sequenzen beider Viren (PERV und KoRV).

Da für Retroviren gezeigt werden konnte, dass das Hüllprotein in einer trimeren Struktur vorliegt, wurde versucht, diese Trimerisierung mit Hilfe einer Trimerisierungsdomäne zu erreichen. Hierfür wurde die Sequenz der Trimerisierungsdomäne des Fibrins, das Kragenprotein des Bakteriophagen T4 (TAO et al., 1997), an das C-terminale Ende der *env*-Sequenzen angefügt. Dieses sollte zu einer Stabilisierung der Trimer-Struktur der

exprimierten Proteine führen und zudem deren Löslichkeit erhöhen (YANG et al., 2002, BOWER et al., 2006). Ein weiteres Ziel ist der Erhalt von Konformationsepitopen, welche nur die Trimerstruktur beinhaltet.

Herstellung und Immunisierung der DNA-Konstrukte

Zur Herstellung der DNA-Konstrukte wurden die in Tabelle 2.3 aufgeführten Primer (Abkürzung „pD“ für pDisplay) konzipiert, die das komplette gp70 sowie das gp85 ohne die Transmembran- und zytoplasmatische Domäne von PERV und KoRV amplifizieren sollten und Schnittstellen für die Klonierung in den eukaryontischen Expressionsvektor pDisplay beinhalteten. N-terminal der pDisplay-MCS sitzt das Hämagglutinin-A-Epitop. Die C-terminale Transmembrandomäne wurde nicht benutzt, da das Protein zur Induktion einer humoralen Immunantwort sezerniert werden sollte. Auf der Basis von genomischer DNA PERV- bzw. KoRV-infizierter 293-Zellen wurden die gp70- und gp85-Sequenzen amplifiziert und in den Vektor pDisplay kloniert. Die Trimerisierungsdomäne des Fibrins wurde durch Hybridisierung der entsprechenden mit Schnittstellen versehenen Oligonukleotide (Tab. 2.3) generiert und C-terminal an die gp70- bzw. gp85-Konstrukte angefügt. Nachfolgend erfolgte die Endotoxin-freie Aufreinigung und Sequenzierung der Plasmide. In den Sequenzierungsergebnissen fanden sich für die Konstrukte die folgenden Punktmutationen, die zu den in Tabelle 4.10 aufgelisteten Aminosäureaustauschen führen.

Tabelle 4.10: Aminosäureaustausche in Folge von Punktmutationen in den gp70- und gp85-Sequenzen von PERV und KoRV

Konstrukt	AS-Position	AS-Austausch
pDisplay-PERV-gp70-Fib	232	Arginin → Glycin
	266	Glutamat → Lysin
pDisplay-PERV-gp85-Fib	232	Arginin → Glycin
	266	Glutamat → Lysin
	343	Glycin → Arginin
	509	Asparagin → Aspartat
	589	Glycin → Glutamat
pDisplay-KoRV-gp70-Fib	262	Glycin → Arginin
	408	Arginin → Histidin
pDisplay-KoRV-gp85-Fib	306	Leucin → Phenylalanin
	408	Arginin → Histidin
	459	Serin → Prolin

Die obigen Mutationen von KoRV an Position 408 und 459 sind die bekannten Aminosäureaustausche aus der vom Koala Birubi isolierten Sequenz. Der Austausch an AS-Position 459 (S → P) trat nur im Fall von KoRV gp85. Mit den Plasmiden erfolgte anschließend die DNA-Immunisierung der in Tab. 4.11 aufgeführten Rattengruppen 8 bis 12 mit Hilfe einer GENEGUN (BIORAD).

Tabelle 4.11: Übersicht der DNA-Immunisierungen

Rattengruppe	Antigen
8	pDisplay (Leervektorkontrolle)
9	pDisplay-KoRV-gp70-Fib
10	pDisplay-KoRV-gp85-Fib
11	pDisplay-PERV-gp70-Fib
12	pDisplay-PERV-gp85-Fib

Vier Wochen nach der initialen Immunisierung der Ratten, folgte eine zweite und weitere vier Wochen später eine dritte Immunisierung zur Steigerung der Antikörpertiter. Die Blutabnahmen erfolgten jeweils 2 Wochen nach der zweiten und der dritten Immunisierung.

Induktion bindender Antikörper gegen die PERV- und KoRV-Hüllproteine

Die zwei Wochen nach der dritten Immunisierung gewonnenen Seren wurden mit Hilfe der Western-Blot-Analyse hinsichtlich bindender Antikörper gegen die rekombinanten Hüllproteine rp52 und p15E beider Viren untersucht. Die rekombinanten Proteine konnten zwar mit allen Seren detektiert werden, jedoch nur in sehr schwachem Ausmaß (Daten nicht gezeigt).

Erwartungsgemäß konnte in einem anschließenden Neutralisationstest auch bei der geringen Verdünnung der Seren von 1:10 keine signifikante Neutralisation nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).