

Untersuchungen zur Infektiosität von porcinen endogenen Retroviren (PERV)

Dem Fachbereich Biologie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Monica Winkler
geboren am 28.10.1962
in Lemgo

Referent: Prof. Dr. D. Bitter-Suermann

Korreferent: PD Dr. U. Martin

Tag der Promotion: 07.02.2003

Datum der Veröffentlichung: 2003

So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muß sie für fertig erklären,
wenn man nach Zeit und Umständen
das möglichste getan hat

J.W. Goethe, Italienische Reise

16.3.1787

Zusammenfassung

Schlüsselwörter: Xenotransplantation, Retrovirus, PERV

Die Verwendung porciner Transplantate könnte das Problem des zunehmenden Mangels an menschlichen Spenderorganen lösen helfen. Vor der klinischen Einführung der Xenotransplantation müssen jedoch noch große Hürden überwunden werden. Dies betrifft zum einen das immer noch weitgehend ungelöste Problem der vehementen Abstoßungsreaktionen und zum anderen Infektionsrisiken durch Mikroorganismen und insbesondere durch porcine endogene Retroviren (PERV). Entscheidend sowohl für die heftigen Abstoßungsreaktionen als auch für das potentielle PERV-Infektionsrisiko ist der Einfluss von Galaktose α -1,3 Galaktose- (Gal α -1,3 Gal) Epitopen, welche auf porcinen Zellen, und damit auch auf daraus freigesetzten Retroviren, exprimiert werden. „Natürliche“ präformierte und induzierte Antikörper in humanem Serum binden vornehmlich an diese Struktur und führen damit über den klassischen Komplementweg zur Transplantatabstoßung und auch zur sicheren Eliminierung freigesetzter Retroviren. Verschiedene Strategien zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen inhibieren jedoch diesen Mechanismus und könnten damit auch PERV *in vivo* Infektionen ermöglichen.

In vorliegender Arbeit wurden zwei Themenbereiche bearbeitet:

1) In einem neuartigen humanisierten Schwein-auf-Javaneraffen Xenotransplantationsmodell wurde die potentielle PERV-Übertragung *in vivo* über molekularbiologische und immunologische Methoden untersucht. Im Gegensatz zu bisherigen retrospektiven Studien an Patienten und Infektionsstudien in Kleintieren oder Primaten, erlaubt dieses Modell die Untersuchung, ob es unter Bedingungen der klinischen Übertragung porciner Organe zu einer PERV-Transmission auf humane Zellen und Gewebe kommt. Die Analysen ergaben keinerlei Hinweis auf eine PERV-Infektion der Spendertiere oder des co-transplantierten humanen Gewebes.

2) Für die Inaktivierung der porcinen α -1,3 Galaktosyltransferase (α -1,3 GT) im Schwein sowie in der porcinen Endothelzelllinie PEDNSV wurde der „Gene targeting“-Vektor pMW8Neo hergestellt. Nach Transfektion von pMW8Neo in PEDNSV ließen sich 34 neomycinresistente Klone isolieren, darunter vermutlich auch Klone, bei denen ein Allel der α -1,3 GT über homologe Rekombination mit dem verwendeten Vektor inaktiviert wurde.

Der Vektor pMW8Neo wird derzeit zur Inaktivierung der porcinen α -1,3 GT für die Herstellung eines α -1,3 GT-Knock Out Schweins verwendet. Bei den isolierten neomycinresistenten PEDNSV-Klonen soll nachfolgend über Southern-Blot endgültig geklärt werden, in welchen Klonen ein Allel der α -1,3 GT inaktiviert wurde. Nach Deletion des zweiten Allels soll die resultierende Gal α -1,3 Gal-negative Zelllinie für die Identifizierung Gal α -1,3 Gal-unabhängiger xenoreaktiver Epitope genutzt werden. Außerdem kann mit einer solchen Linie untersucht werden, ob PERV-Partikel, welche von einem Gal α -1,3 Gal-defizienten Schwein freigesetzt werden, resistent gegen Viriolyse in humanem Serum sind. Obwohl unsere Infektionsstudien zeigen, daß das PERV-Infektionsrisiko nach Xenotransplantation grundsätzlich niedriger als befürchtet zu sein scheint, könnte die Verwendung Gal α -1,3 Gal defizienter Schweineorgane zu einer Infektion von Transplantatempfängern führen.

Abstract

Keywords: Xenotransplantation, Retrovirus, PERV

The usage of porcine transplants could help to solve the current shortage of human organs in transplantation medicine. However, major hurdles still have to be overcome before xenotransplantation becomes a clinical reality. Among these are problems of later xenograft rejection as well as the risk of infection of the recipient with porcine microorganism especially porcine endogenous retroviruses (PERV). The Gal α -1,3 Gal Epitope, is expressed on all porcine cells and therefore also on released endogenous retroviruses. This carbohydrate structure is responsible (as it is the major target antigen) for the pathophysiology of xenograft rejection as well as (since PERVs are neutralized by anti-Gal antibodies) for the effective elimination of PERVs.

This graduation focused on two topics:

1) In a newly developed model of humanised pig-to-Cynomolgus Xenotransplantation potential *in vivo* PERV-transmission was investigated by using molecular biology and immunological methods. In contrast to previous retrospective studies on patients or to conventional infections studies in small animals or primates this model allows the investigation of a PERV transmission to human cells and tissue under the setting of a clinical pig to human xenotransplantation. The tests performed in this model yielded no evidence of PERV infection of the recipient animals or of the cotransplanted human tissue.

2) For inactivating the gene of porcine α -1,3 Galactosyltransferase (α -1,3 GT) in a pig as well as in the porcine endothelial cell line PEDNSV the gene targeting vector pMW8Neo was generated. After transfection of PEDNSV with pMW8Neo 34 neomycinresistant clones were isolated, presumably in some of these clones one allele of α -1,3 GT had been inactivated by homologous recombination using the vector. The construct pMW8Neo is used at present for inactivating the porcine α -1,3 GT for production of a α -1,3 GT knock out pigs.

Following establishment of a α -1,3 GT knock out cell line it would also be possible to investigate whether PERV virions released by this cell line are more resistant towards serum mediated lysis if compared to their wild type counterparts. Despite the results of our studies showing that PERV infection in the pig to humanized monkey model seems to be unlikely, the use of α -1,3 GT knock out porcine cells or organs for xenotransplantation could – on a theoretical basis – increase the risk for PERV infection of the recipient.

Inhaltsverzeichnis

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
2	VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN	VIII
3	EINLEITUNG	1
3.1	Xenotransplantation	1
3.1.1	Abstoßungsreaktionen porciner Xenotransplantate	2
3.1.1.1	Die hyperakute Abstoßung	2
3.1.1.2	Die akut vaskuläre Abstoßung	4
3.1.1.3	Die zelluläre Abstoßung	4
3.1.2	Bedeutung der porcinen α -1,3 Galaktosyltransferase für die Xenotransplantation	5
3.1.3	Strategien zur Überwindung von Abstoßungsreaktionen	7
3.2	Knock out der porcinen α -1,3 Galaktosyltransferase	9
3.2.1	Inaktivierung zellulärer Gene über homologe Rekombination	9
3.2.2	Voraussetzung zur Inaktivierung der α -1,3 Gal GT im Schwein	10
3.3	Infektionsgefahr im Rahmen der Xenotransplantation	11
3.3.1	Nicht virale Erreger und exogene Viren	11
3.3.2	Porcine endogene Retroviren	11
3.3.2.1	Retroviren	11
3.3.2.1.1	Die Struktur retroviraler Partikel	12
3.3.2.1.2	Der retrovirale Infektionszyklus	13
3.3.2.2	Die Charakterisierung porciner endogener Retroviren	14
3.3.2.3	Wirtsspezifität der porcinen endogenen Retroviren	15
3.3.2.4	Pathogenität der porcinen endogenen Retroviren	16
3.3.2.5	Faktoren, welche das Infektionspotential von PERV im Rahmen einer Xenotransplantation beeinflussen	17
3.3.2.6	In vivo Infektionsstudien im Kleintiermodell	18
3.3.2.7	Retrospektiv durchgeführte Studien an Patienten	19
3.3.2.8	In vivo Infektionsstudien im Primatenmodell	20
3.3.2.9	Entwicklung eines „Drei-Spezies“ in vivo Infektionsmodells	21
3.4	Zielsetzung	22
4	MATERIAL	23
4.1	Geräte	23
4.2	Verbrauchsmaterial	24
4.3	Chemikalien	25
4.4	Enzyme und Enzymkits	27
4.5	Antikörper und Lektine	28
4.6	Oligonukleotide	28
4.7	Vektoren	31
4.7.1	pBluescript SK(-)	31
4.7.2	pCRII-TOPO	31
4.7.3	pCR-XL-TOPO	31
4.7.4	pcDNA3.1/ZeoZin	32
4.7.5	pBeloBAC 11	32
4.7.6	pSVKeoX1	32
4.7.7	pCITE-2a(+)	33

4.8	Bakterienkulturen	33
4.8.1	Bakterienstämme	33
4.8.2	Nährmedien	34
4.9	Zellkulturen	34
4.9.1	Zelllinien	34
4.9.2	primäre Zellen	35
4.9.3	Medien	35
4.10	Puffer und Lösungen	35
5	METHODEN	37
5.1	Tierexperimentelle Methoden	37
5.1.1	Tiermodell	37
5.1.2	Operative Technik	38
5.1.3	Entnahme und Vorbereitung der Proben	38
5.1.4	Zellisolierung aus dem Interponat	38
5.2	Molekularbiologische Methoden	39
5.2.1	Phenol-Chloroform-Extraktion	39
5.2.2	Präzipitation von Nukleinsäuren	39
5.2.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	40
5.2.4	Isolierung von genomischer DNA	40
5.2.4.1	Präparation genomischer DNA im großen Maßstab	40
5.2.4.2	Präparation genomischer DNA mit Hilfe des QIAamp DNA Blood Mini Kits	41
5.2.5	Präparation von Plasmiden	41
5.2.5.1	„Quick-Check“-Methode	42
5.2.5.2	Plasmid-Mini-Präparation	42
5.2.5.3	Plasmid-Midi-Präparation	42
5.2.6	Präparation von BACs	43
5.2.6.1	BAC-Mini-Präparation	43
5.2.6.2	BAC-Midi-Präparation	44
5.2.7	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	44
5.2.8	Agarose-Gelelektrophorese	45
5.2.9	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	46
5.2.9.1	QIAEX-Gelextraktionskit	46
5.2.9.2	QIAquick-Gelextraktionskit	47
5.2.9.3	Aufreinigung mit S.N.A.P.TM-Säulen	47
5.2.10	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	48
5.2.10.1	RedTaqTM Polymerase	48
5.2.10.2	MasterAmp TM Tfl DNA Polymerase	49
5.2.10.3	Polymerasen mit Korrekturaktivität	49
5.2.10.4	Expand Long Template PCR System	50
5.2.11	Ligation	51
5.2.12	TOPO TA Klonierung	52
5.2.12.1	Eigenschaften	52
5.2.12.2	Durchführung	53
5.2.13	Transformation von Bakterien mit Plasmiden	53
5.2.13.1	chemische Transformation	54
5.2.13.2	Elektroporation	54
5.2.14	RNA-Arbeiten	55
5.2.14.1	Präparation von Gesamt-RNA	55
5.2.14.2	Aufreinigung viraler RNA aus Plasma	55
5.2.14.3	Elektrophorese von RNA in denaturierenden Agarosegelen	56
5.2.14.4	Reverse Transkription von Gesamt-RNA	56
5.2.14.5	Reverse Transkription viraler RNA aus Plasma	57

5.3	Zell- und immunbiologische Methoden	57
5.3.1	Transfektion	57
5.3.2	Pseudotypisierungsversuch mit β -Galaktosidase	58
5.3.3	Durchflußzytometrische Untersuchungen	58
5.3.4	Immunhistochemie	59
5.3.5	Bestimmung retroviraler Aktivität mit dem RT-Assay	60
5.3.6	Southern-Transfer	61
6	ERGEBNISSE	62
6.1	Knock out der porcinen α -1,3 Galaktosyltransferase	62
6.1.1	Zur Klonierung und Charakterisierung verwendete Primer der porcinen α -1,3 Galaktosyltransferase	62
6.1.2	Konzept zur Generierung eines α -1,3 Gal GT knock out Vektors	62
6.1.2.1	Charakterisierung von BAC-Klonen für die anschließende Klonierung α -1,3 Gal GT-homologer Sequenzen	63
6.1.2.2	Klonierung der homologen Bereiche der α -1,3 Gal GT	64
6.1.2.3	Subklonierung des Zeozinresistenzgens in pSVKeoXI	65
6.1.2.4	Generierung des Vektors pCRXL mit beiden homologen Bereichen	66
6.1.2.5	Subklonieren der IRES-Sequenz mit vorgeschalteten Stopkodons	66
6.1.2.6	Klonieren der Antibiotikakassetten in pCRXL (mit Intron4 und 3'UTR)	68
6.1.2.7	Der α -1,3 Gal GT knock out Vektor pMW8 Neo	69
6.1.2.7.1	Charakterisierung mit Hilfe der PCR	69
6.1.2.7.2	Restriktionskartierung	70
6.1.2.8	Ansätze zur Herstellung eines KO-Vektors mit Zeozinresistenz	71
6.1.2.8.1	Alternative Strategie zur Herstellung des Zeozinkonstruktes	72
6.1.3	Charakterisierung der porcinen Endothelzelllinie PED2*3	73
6.1.4	Inaktivierung des α -1,3 Gal GT-Gens in der porcinen Endothelzelllinie PEDNSV	75
6.1.4.1	Etablierung der Transferrinfektion	75
6.1.4.1.1	Nachweis der Expression von Transferrinrezeptoren auf PEDNSV	75
6.1.4.1.2	Optimierung der Transferrinfektion	76
6.1.5	Transferrinfektion der PEDNSV mit pMW8 Neo	77
6.1.5.1	Charakterisierung der isolierten G418-resistenten Klone	78
6.1.5.1.1	Durchflußzytometrische Analyse der G418-resistenten Klone mit IB4	79
6.2	Untersuchungen zum Infektionsrisiko porciner endogener Retroviren	80
6.2.1	Permissivität primärer humaner Zellen	80
6.2.1.1	Nachweis von PERV-Rezeptoren über Pseudotypisierungsexperimente	80
6.2.2	Vorstellung des „Drei-Spezies-Infektionsmodells“	81
6.2.3	Überlebenszeiten und Untersuchungsplan der Empfängertiere	82
6.2.3.1	Kontrolle der Integrität der explantierten Implantate	83
6.2.3.2	Durchflußzytometrische Charakterisierung der aus humanen Interponaten isolierten Zellen	85
6.2.3.2.1	Die Verwendung von Lektinen	85
6.2.3.2.1.1	Das Griffonia simplicifolia I Isolektin (IB4)	85
6.2.3.2.1.2	Das Ulex Europaeus Agglutinin 1 (UEA-1)	86
6.2.3.2.2	Der Endothelzellmarker CD31	87
6.2.3.2.3	Die Verwendung anderer Marker	88
6.2.3.3	Detektion einer potentiellen PERV-Infektion im Interponat oder daraus isolierter Zellen	89
6.2.3.3.1	Nachweis von Proviren über PCR	89
6.2.3.3.2	Nachweis von RT-Aktivität in Zellkulturüberständen	90
6.2.3.4	Nachweis potentieller PERV-Infektionen des Empfängertiers	90
6.2.3.4.1	Untersuchung von Lymphozyten des peripheren Bluts mit PERV-spezifischer PCR	90
6.2.3.4.2	Untersuchung von Serumproben auf PERV-Partikel mittels RT-PCR	90
6.2.3.4.3	Nachweis von RT-Aktivität im Serum der Empfängertiere	91
6.2.3.4.4	Nachweis einer PERV-spezifischen Immunantwort	91

7	DISKUSSION	92
7.1	Knock out der porcinen α -1,3 Galaktosyltransferase	92
7.1.1	Herstellung des α -1,3 Gal GT „Gene targeting“-Vektors	92
7.1.1.1	Der α -1,3 Gal GT knock out Vektor pMW8 Neo	95
7.1.1.2	Ansätze zur Herstellung eines KO-Vektors mit Zeozinresistenz	96
7.1.1.2.1	Alternative Strategie zur Herstellung des Zeozinvektors	99
7.1.2	Inaktivierung des α -1,3 Gal GT Gens in der porcinen Endothelzelllinie PEDNSV	100
7.1.3	Charakterisierung der durch Transferrinfektion gewonnenen G418-resistente Klone	101
7.2	Untersuchungen zum Infektionsrisiko porciner endogener Retroviren	103
7.2.1	Permissivität primärer humaner Zellen	104
7.2.2	Vorstellung des „Drei-Spezies-Infektionsmodells“	105
7.2.3	Überlebenszeiten und Untersuchungsplan der Empfängertiere	106
7.2.4	Charakterisierung explantierter Interponate und daraus isolierter Zellen	107
7.2.4.1	Immunhistologische Charakterisierung der Interponate	107
7.2.4.2	Durchflusszytometrische Charakterisierung der aus humanen Interponaten isolierter Zellen	108
7.2.4.2.1	Die Verwendung von Lektinen	108
7.2.4.2.2	Der Endothelzellmarker CD31	110
7.2.4.2.3	Die Verwendung anderer Marker	111
7.2.4.3	Detektion potentieller PERV-Infektionen im Interponat oder daraus isolierten Zellen	111
7.2.4.4	Nachweis einer potentiellen systemischen PERV-Infektion des Empfängertiers	112
7.2.5	Zusammenfassende Wertung der Ergebnisse der PERV-Infektionsstudien	112
8	LITERATURVERZEICHNIS	114
9	VERZEICHNIS EIGENER PUBLIKATIONEN	126
10	LEBENS LAUF	128

1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
aq.dest	deionisiertes destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
AVR	akut vaskuläre Abstoßung
AWA	Altweltaffen
BAC	bacterial artificial chromosom
BMV	Brome Mosaic Virus
β-Gal	β-Galactosidase
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA-Kopie von mRNA
CDP- <i>Star</i>	2-Chlor-5-(4-Methoxy Spiro{1,2-Dioxetan-3,2`-(5`-Chlor)Tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}]Decan}-4-yl)-1-Phenylphosphat, Dinatriumsalz
Chr	Chromosom
CTP	Cytidin-5`-triphosphat
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreithol
E	Extinktion
EC	Endothelzellen
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>env</i>	“Envelope”; Genregion, welche für Hüllproteine kodiert
et al.	„et alii“, und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Ex	Exon
f	femto
Fa	Firma
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FUT	Fukosyltransferase

g	Gramm
Gal	Galaktose
α -1,3 GT	α -1,3 Galaktosyltransferase
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GFP	“Green Fluorescent Protein”, Grünes Fluoreszenzprotein
Glc	Glukose
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
GT	Glykosyltransferasen
h	Stunde
HAR	hyperakute Abstoßung
HCl	Salzsäure
hu	human
Ig	Immunglobulin
IB4	<i>Griffonia simplicifolia</i> 1 Isolectin B4
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
ko	Knock out
l	Liter
LB	Luria/Bertani (Medium)
LD	“Long distance”, Darstellung langer Fragmente in der PCR
Lsg	Lösung
LTR	Long Terminal Repeat
M	Molar, mol/l
mA	Milliampere
mAb	monoklonaler Antikörper
MAC	zellzerstörender Komplex nach Komplementaktivierung
MCS	multiple Klonierungsstelle
min	Minute(n)
Minipräp	Plasmidminipräparation
mRNA	messenger RNA
MOPS	3-N-Morpholinpropansulfonsäure
μ	mikro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})
NeuNAc	N-Acetylneuraminat (Sialinsäure)
NWA	Neuweltaffen
OD	optische Dichte
Oligo	Oligomeres Desoxyribonukleotid
ON	über Nacht
ori	„Origin of replication“, Replikationsstart
p	pico (10^{-12})
PAEC	porcine Endothelzellen aus der Aorta
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEDNSV	porcine Aortenendothelzelllinie

PERV	porcine endogene Retroviren
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
RAS	reverse anti sense
RCA	Komplementregulatorproteine
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rT	reverse Transkription
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Temp	Temperatur
T _m	DNA-Schmelztemperatur
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
U	Unit (µmol/min)
u.a.	unter anderem
UEA-1	<i>Ulex Europaeus</i> Agglutinin I
UTR	nicht translatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumenanteile
v/v	Volumen pro Volumen bei Prozentangaben
w/v	Masse pro Volumen bei Prozentangaben
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-Indoyl-β-D-Galactosid

2 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1:	Darstellung der Warteliste für Nierentransplantationen.....	1
Abbildung 2:	Darstellung des α -1,3 Gal Epitops.....	6
Abbildung 3:	Darstellung eines retroviralen Partikels.....	12
Abbildung 4:	Retroviraler Replikationszyklus.....	14
Abbildung 5:	Freisetzung von PERV-Partikel.....	15
Abbildung 6:	Organisation eines PERV.....	16
Abbildung 7:	Virolyse von PERV-Partikeln.....	17
Abbildung 8:	Genomische Organisation der porcinen α -1,3 Gal GT mit Primern....	62
Abbildung 9:	Vektoren mit den beiden homologen Sequenzen.....	64
Abbildung 10:	Restriktionskartierung des Intron4.....	65
Abbildung 11:	Subklonierungsvektoren.....	67
Abbildung 12:	Subklonierungsvektoren.....	66
Abbildung 13:	Subklonierungsvektoren.....	67
Abbildung 14:	Klonierung der IRES-Sequenz.....	67
Abbildung 15:	Schematische Darstellung des zu generierenden Vektors.....	68
Abbildung 16:	PCR zur Charakterisierung des Vektors pMW8 Neo.....	69
Abbildung 17:	Restriktionskartierung des Vektors pMW8 Neo.....	70
Abbildung 18:	schematische Darstellung zur Restriktionskartierung.....	70
Abbildung 19:	Durchflusszytometrische Messung mit IB4.....	74
Abbildung 20:	RT-PCR von PEDNSV.....	75
Abbildung 21:	mögliche Integration von pMW8Neo ins Genom von PEDNSV.....	78
Abbildung 22:	Durchflusszytometrische Analyse G418-resistenter Klone mit IB4....	79
Abbildung 23:	Pseudotypisierungsexperiment mit HUVEC.....	81
Abbildung 24:	Modellvorstellung „Drei-Spezies-Infektionsmodell“.....	82
Abbildung 25:	Kontrollfärbungen humaner Vene mit CD31.....	84
Abbildung 26:	Anfärbung von Javaneraffenvene und Interponats mit CD31.....	84
Abbildung 27:	Isolierte Fibroblasten und Endothelzellen vom Javaneraffen.....	85
Abbildung 28:	Durchflusszytometrische Analyse mit UEA-1.....	86
Abbildung 29:	Durchflusszytometrische Analyse mit CD31, Klon WM59.....	87
Abbildung 30:	Durchflusszytometrische Analyse mit CD31, Klon JC70/A.....	87
Abbildung 31:	Kloniertes Intron4 mit EcoRV-Schnittstellen.....	95

Tabelle 1:	Genomische Organisation der porcinen α -1,3 Gal GT.....	6
Tabelle 2:	Charakterisierung der BAC-Klone.....	64
Tabelle 3:	Charakterisierung des Vektors pMW8 Neo.....	69
Tabelle 4:	Auswertung der Restriktionskartierung.....	71
Tabelle 5:	mögliche Integration von pMW8Neo ins Genom von PEDNSV .	78
Tabelle 6:	PCR-Ergebnisse der G418-resistenten Klone.....	79
Tabelle 7:	Überlebenszeiten der transplantierten Tiere.....	82
Tabelle 8:	Probenentnahmeplan und geplante Untersuchungen.....	83
Tabelle 9:	Ergebnisse aus den Untersuchungen der transplantierten Tiere....	89
Tabelle 10:	Klone zur Klonierung des KO-Vektors mit Zeozinresistenz.....	97

3 Einleitung

3.1 Xenotransplantation

Die großen technischen Fortschritte auf dem Gebiet der Organtransplantation sowohl der chirurgischen Techniken als auch der immunsuppressiven Therapie, die heute das Überleben vieler Kranken gewährleisten, haben zu einem Missverhältnis zwischen der Verfügbarkeit von Spenderorganen und erkrankten potentiellen Organempfängern geführt. Trotz einer jährlich um 15% steigenden Nachfrage nach Spenderorganen ist die Bereitschaft zur Organspende sogar leicht gesunken. Zurzeit besteht weltweit ein Mangel von ca. 150 000 Organen, alleine in Deutschland warten fast 14.000 Patienten auf ein Spenderorgan. (Deutsche Stiftung Organtransplantation, Oktober 2001).

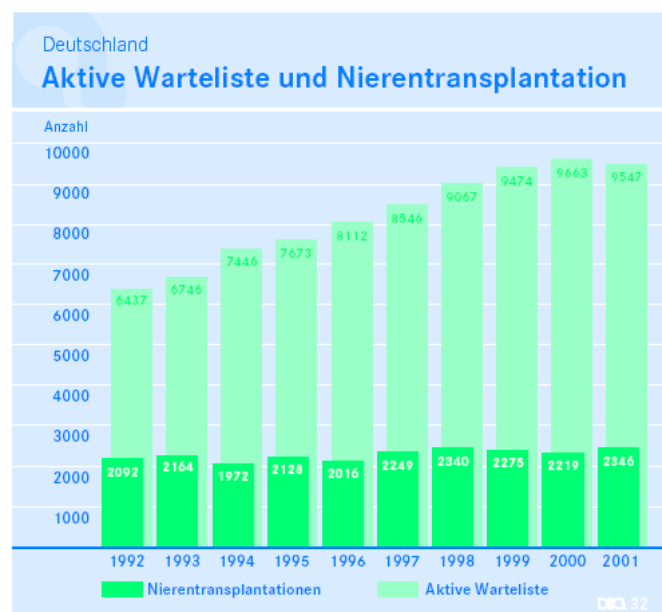


Abbildung 1: Die Anzahl der durchgeführten Nieren-Transplantationen stagniert seit 5 Jahren. Die Zahl der neu angemeldeten Patienten auf der Warteliste hingegen steigt bis auf das Jahr 2001 stetig an.

Eine Möglichkeit zur Behebung der immer größer werdenden Diskrepanz zwischen Nachfrage und Verfügbarkeit geeigneter Organe könnte die Xenotransplantation darstellen. Dabei ist der Begriff der Xenotransplantation definiert als die Verpflanzung von Geweben, Organen oder Zellen zwischen phylogenetisch unterschiedlichen Spezies. International wird derzeit das Schwein als Xenotransplantatspender favorisiert. Die Gründe hierfür liegen in einer dem Menschen vergleichbaren Physiologie und Organgröße, geringen Kosten für Zucht und Haltung, einer hohen Reproduktionsrate und nicht zuletzt ethischen Erwägungen, die Primaten als Organspender weitgehend ausschließen (1, 2).

Geschichtlich gesehen ist die Xenotransplantation der Alлотransplantation voran gegangen. Bereits 1905 transplantierte Princeteau einem kranken Kind Segmente einer Kaninchenniere. Zwischen 1919 und 1940 verpflanzte Boranoff Hoden von Pavianen und Menschenaffen in mehr als 2000 impotente Männer. Hardy unternahm 1964 den Versuch, einem erwachsenen Patienten ein Schimpansenherz zu übertragen (3). 1966 transplantierte Keith Reemtsma in insgesamt sechs Patienten Schimpansennieren (4) und noch im selben Jahr Thomas Starzl sechs Nieren von Pavianen (5). Sechs Jahre später folgte der Versuch Barnards, zwei Patienten je ein Schimpansen- und ein Pavianherz (6, 7) zu übertragen. Erst L. Bailey nutzte die Erfahrung, dass neugeborene Spender und Empfänger auf Grund noch nicht ausgeprägter Immunkompetenz eine günstigere Ausgangssituation besitzen. Er transplantierte 1984 ein weltbekannt gewordenes Baby namens „Fae“ mit einem jugendlichen Pavianherzen. Es starb nach 20 Tagen an Multiorganversagen (8).

Seit 1990 wurden auch porcine Zellen und Gewebe in den Menschen transplantiert. Diabetes-Patienten erhielten Inselzellen (9-15), Parkinson-Patienten neuronale Zellen (16, 17) und Brandverletzte porcine Haut (18). Als erstes vaskularisiertes Organ wurde 1994 von Makowa (19) eine porcine Leber auf eine junge Frau übertragen. Diese starb innerhalb von 24 Stunden an den Folgen einer hyperakuten Abstoßung.

3.1.1 Abstoßungsreaktionen porciner Xenotransplantate

Die immunologischen Einflüsse auf das Transplantat sind wesentlich von der phylogenetischen Distanz zwischen Spender und Empfänger abhängig. Je weiter Empfänger und Spender entwicklungsgeschichtlich voneinander entfernt sind, desto größer ist die Zahl der Antigene, gegen die sich das Empfängerimmunsystem richten wird. Kombinationen von Empfänger und Spender, in denen eine hyperakute Abstoßung (HAR) auftritt, werden definitionsgemäß als diskordante Xenotransplantation (20) bezeichnet. Bei den so genannten konkordanten Xenotransplantationen wird per definitionem keine HAR beobachtet (21, 22).

3.1.1.1 Die hyperakute Abstoßung

Die in Minuten bis Stunden auftretende HAR mit fulminanter Destruktion des Xenotransplantats stellte bis vor kurzem in der diskordanten Kombination Schwein auf Mensch das größte Problem dar. Diese Reaktion bei HAR wird durch die Bindung präformierter, xenoreaktiver natürlicher (XNA) Antikörper des Transplantatempfängers an Antigene des Xenotransplantats vermittelt. (23-28).

1% aller zirkulierender Antikörper (AK) und 70-95% aller XNA sind dabei gegen das Epitop Galaktose α -1,3-Galaktose (29-37) gerichtet.

Im humanen Serum sind neben den Gal α -1,3 Gal spezifischen XNA auch andere, gegen bisher weitgehend unbekannte Zelloberflächenstrukturen porciner Zellen gerichtete Antikörper, vorhanden (38-43). Als Epitope kommen dabei vor allem andere Glykolipide und Glykoproteine sowie bisher nicht identifizierte porcine Proteine in Frage. Studien von Bouhours und Hallberg legen nahe, dass humane natürliche anti Gal- α 1,3 Gal AK an Gal- α 1,3-Lewis^x Strukturen auf porcinen Nieren (44) und Aorten (45, 46) binden. Eine weitere Zuckerstruktur, gegen die vereinzelt in humanen Seren spezifische AK nachgewiesen werden konnten (40, 43) ist das Haganutzju-Deicher-Antigen. Dieses Antigen enthält Glykolyneuraminsäure, welche bei Menschen, im Gegensatz zu den meisten anderen Säugetieren, nicht vorkommt.

Die Bindung solcher xenogenen AK führt zur Anlagerung des sich im Blut befindlichen Komplementproteins C1q und zur Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg. Bei der Transplantation porciner Zellen und Organe in den Menschen, bzw. experimentell in subhumane Primaten, scheint der Einfluss von porcinen Zelloberflächenmolekülen, welche physiologischerweise eine Komplementaktivierung inhibieren können (sog. *Regulators of Complement Activation RCA*), nicht ausreichend zu sein. Entgegen früherer Literaturhinweise sind RCA's jedoch kaum speziesspezifisch (47-51).

Nachfolgend kommt es zur Aktivierung der Komplementkomponente C3, deren Spaltung letztlich in der Synthese des terminalen Membran-Attack-Komplexes (MAC) (52) auf den Zielzellen resultiert. Dieser besteht aus den Komplementkomponenten C5b-9 und kann in hohen Konzentrationen zur direkten Lyse der Zellen, und insbesondere im Falle eines vaskularisierten Organs, zur Zerstörung der Endothelschicht führen.

Daneben kommt es zu einer Induktion apoptotischer Prozesse (30, 53), zur Aktivierung der Gerinnungskaskade (54-56) und zur Erhöhung der Thrombogenizität des Endothels durch Abspaltung membran-gebundenen Heparansulfats. Gleichzeitig kommt es zur Einwanderung von Leukozyten des Empfängers in das transplantierte Gewebe. Die Gefäße thrombosieren (57) und das Organ wird als Konsequenz daraus abgestoßen.

Der alternative Weg der menschlichen Komplementaktivierung scheint, zumindest im Falle eines porcinen Organs, eine wesentlich geringere Rolle im Vergleich zum klassischen Weg zu spielen (23, 58). Auch eine direkte, komplementunabhängige Aktivierung des Endothels durch natürliche Antikörper wird diskutiert (59-61). Diese führt wohl ebenfalls zu einer erhöhten Thrombogenizität des Endothels.

3.1.1.2 Die akut vaskuläre Abstoßung

Nach Überwindung der hyperakuten Abstoßung kommt es trotz weiterentwickelter immunsuppressiver Therapie und Verwendung transgener Organe im Transplantat des Empfängers in der Regel zu einer zweiten, im Vergleich zur HAR, verzögerten Abstoßungsreaktion (AVR) (62). Im tierexperimentellen Modell „Schwein auf Primat“ tritt eine AVR abhängig vom Modell nach etwa 4-8 Tagen auf. Es ist von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt worden (62), dass für die Auslösung einer AVR in erster Linie die durch die Transplantation induzierte (sekundäre) Antikörperantwort des Empfängers gegen vor allem Gal α -1,3 Gal Strukturen verantwortlich ist. Histopathologische Kennzeichen der AVR sind Endothelzellschäden, Schwellung, Ischämie und diffuse Thrombose. Manchmal kann ein Infiltrat aus Makrophagen und neutrophilen Granulozyten beobachtet werden (63).

3.1.1.3 Die zelluläre Abstoßung

Xenotransplantate, welche nicht der Zerstörung durch HAR oder AVR zum Opfer gefallen sind, werden innerhalb weniger Wochen zum Angriffsziel von zellulären und chronischen Abstoßungsreaktionen (64). Hier scheinen vor allem natürliche Killerzellen und T-Lymphozyten beteiligt zu sein (65, 66). Die chronische Abstoßung eines Xenotransplantats scheint sich von der eines Allotransplantats zu unterscheiden (67, 68). Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass bei der Transplantation „Schwein auf Primat“ bisher nur relativ wenige Empfängertiere Überlebenszeiten von mehr als 2 Wochen erreicht haben und somit auch nur sehr vereinzelt Daten zu möglichen chronischen Transplantatschädigungen vorliegen.

3.1.2 Bedeutung der porcinen α -1,3 Galaktosyltransferase für die Xenotransplantation

(69-71)

Der Großteil der präformierten xenogenen Antikörper, verantwortlich für die HAR, und induzierter anti-porciner Antikörper, verantwortlich für die AVR, sind gegen das Galaktose α -1,3 Galaktoseepitop gerichtet. Dieser Zuckerrest wird in Neuweltaffen (NWA) und niederen Säugetieren, aufgrund eines Gendefektes im verantwortlichen Enzym Galaktose α -1,3 Galaktosyltransferase (α -1,3 GT), nicht jedoch im Menschen und Altweltaffen (AWA), exprimiert. Die Familie der Catarrhina (AWA) schließt Menschenaffen, Gibbons, Meerkatzen wie Paviane und Makakken, und die Schlankaffen ein. Die Platyrrhina (NWA) umfassen Krallenaffen, Springtamarine und Kapuzineraffen.

Die Bildung von Antikörpern gegen Gal α -1,3 Gal stellen eine Reaktion des Immunsystems auf den Kontakt mit Gal α -1,3 Gal tragenden Mikroorganismen und insbesondere auf die Kolonisation des Dickdarmes mit Gal α -1,3 Gal positiven gastrointestinalen Keime wie Salmonellen, Klebsiellen, *E.coli* und Clostridien im Neugeborenenalter dar (72, 73).

Die Zelloberflächen der AWA sowie des Menschen, tragen statt Gal α -1,3 Gal Strukturen sonst kryptische ABH-Blutgruppenantigene (73-75). Diese Spezies besitzen zwei, sich auf den Chromosomen 9 bzw. 12 befindende, α -1,3 GT-Pseudogene (75-77). Die Tatsache, dass das auf Chromosom 9 befindliche Pseudogen in einem Cluster mit den AB0-Blutgruppentransferasen lokalisiert ist, könnte auf eine evolutionäre Verwandtschaft hindeuten.

Die Inaktivierung des Gens erfolgte vermutlich vor ca. 17-25 Millionen Jahren. Entsprechende Kalkulationen wurden anhand von Sequenzvergleichen eines bestimmten Bereiches des α -1,3 GT-Gens innerhalb verschiedener NWA, AWA und dem Menschen nach Vergleichen mit dem η -Globin Pseudogen vorgenommen (77). Da viele pathogene Mikroorganismen, wie bereits erwähnt, ebenfalls α -1,3 Gal Epitope exprimieren, stellte die Inaktivierung der α -1,3 GT und die damit verbundene Bildung von anti- α 1,3 Gal Antikörpern wahrscheinlich einen Selektionsvorteil dar.

Die α -1,3 GT gehört zur Familie der Glykosyltransferasen. Diese transferieren im allgemeinen Zuckerreste von einem aktivierten Donorsubstrat auf eine wachsende Carbohydratgruppe und sind meist im Golgiapparat lokalisiert.

Die biochemische Reaktion der Galaktose α -1,3 Galaktosyltransferase wurde erstmals von Basu 1973 (78) beschrieben. An das Substrat N-Acetyllactosamin wird unter Beteiligung von Manganionen eine aktivierte Galaktose transferiert.

Es entsteht dabei das „Gal α -1,3-Gal Epitop“:

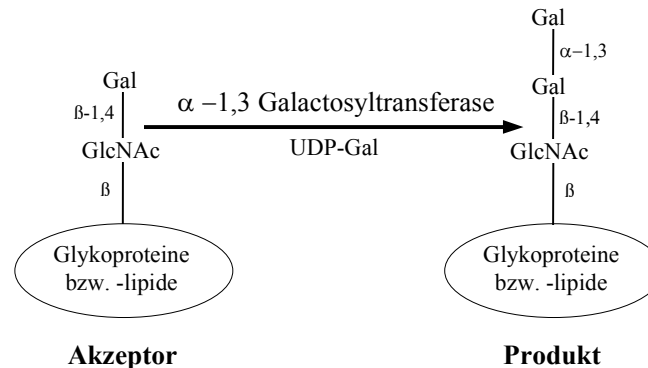


Abbildung 2: Darstellung des Gal α -1,3 Gal Epitops

Die erste Darstellung einer GT (bovine α -1,3 GT) gelang 1985 Blanken (79). Er verwendete dazu den Detergenzextrakt eines Kalbsthymus und reinigte ihn über Affinitäts-Chromatographie auf. Nach darauf folgender SDS-Gelelektrophorese zeigten sich zwei Proteine mit 40KD und 42 KD.

Kloniert wurden bisher die α -1,3 GT der Maus (80, 81), des Rindes (82), eines NWA (83) und des Schweins (84-88). Verfügbar sind ebenfalls die Nukleotidsequenzen der α -1,3 GT von Fledermaus, Nerz, Hund, Schaf und des Delfins (89).

Die Homologie der Aminosäuren aller bisher klonierter GT ist mit mindestens 80% sehr hoch. Die höchste Identität befindet sich dabei im Bereich des Carboxy-Endes (katalytische Domäne), die geringste Homologie innerhalb der Stammregion.

Exon	Exonlänge (bp)	kodierte AS	Introngröße (kb)	GenBank (AccessionNr.)
0				
1	554		> 10	AF221510
2	81		0,427	AF221511
3	112		15	AF221511
4	89	38	6,3	AF221512
5	36	12	1,9	AF221513
6	63	21	0,549	AF221514
7	105	35	6,7	AF221515
8	138	46	6,2	AF221516
9	2586	230		AF221517

Tabelle 1 Darstellung der genomischen Organisation der porcinen α -1,3 GT-Gens (nach Koike 2000 und Mercier 2002)

Das Gen der porcinen α -1,3 GT liegt auf Chromosom 1 (88) und umfasst mit vier nicht kodierenden Exons am 5'-Ende sowie sechs kodierenden Exons einen Bereich von mehr als 52kb (90, 91). Der ORF besteht aus 1116bp und wird aus sechs Exons gebildet. Das Startkodon befindet sich in Exon 4 und das Stopkodon in Exon 9. Vier gewebespezifisch regulierte Spleißvarianten sind beschrieben (90, 92, 93).

Die genomische Organisation des α -1,3 GT Gens wurde erstmals von Katayama (93) dargestellt, zwei weitere Arbeiten zur genaueren Charakterisierung folgten (90, 91).

Kürzlich wurden aus einer genomischen Library, erstellt aus PK15-Zellen, die Promotorbereiche, welche in den Exons 0 bis 3 lokalisiert sind, subkloniert (91). Der Nachweis erfolgte über Messung der transkriptionellen Aktivität resultierend aus Transfektionen der einzelnen Splicevarianten in Verbindung mit einem Luciferasegen in COS-Zellen und porcinen Endothelzellen. Auch in diesem regulierenden Genabschnitt wurden vier funktionierende Splicevarianten gefunden.

Das von der α -1,3 GT synthetisierte α -Gal Epitop kann mit dem Isolektin BS-IB4 spezifisch detektiert werden (*Griffonia simplicifolia*). Diese Untereinheit B des Lektin I reagiert nur mit terminaler, nicht reduzierter α -gebundener Galaktose, zeigt allerdings auch Kreuzreaktionen mit dem Blutgruppenantigen B (94-96).

3.1.3 Strategien zur Überwindung von Abstoßungsreaktionen

Die Verwendung transgener Spendertiere mit Expression humaner RCA wie CD55 (*Decay Accelerating Factors*, hDAF), CD46 (*membrane cofactor protein*, hMCP) oder CD59 (*membrane inhibitor of reactive lysis*, hMIRL) unter gleichzeitiger Verbesserung der angewandten Immunsuppressivprotokolle machte es erstmals möglich, die HAR zu überwinden und darauf folgende immunologische Prozesse wie die komplementunabhängige AVR und zelluläre Xenotransplantatabstoßungsreaktion zu untersuchen.

Die genannten RCA können an verschiedenen Punkten innerhalb der Komplementkaskade ansetzen und letztlich die Bildung des zellzerstörenden MAC unterbinden. Transgene Schweine, die CD55, CD46 oder CD59 exprimieren, sind generiert worden (97-102). Die Versuche zeigen recht viel versprechende Ergebnisse. Ein Überleben von bis zu 99 Tagen wurde bei der diskordanten Transplantation DAF-transgener Schweineherzen in Pavianen, diese waren allerdings schwerst immunsupprimiert, erreicht (103). Kürzlich sind auch Schweine, die mehrere Transgene besitzen, generiert worden (104, 105). Erste vorgestellte Ergebnisse zeigten eine nur geringfügige Verbesserung der Abstoßungsreaktionen.

Neben der Verwendung transgener Tiere sind andere Strategien wie Konkurrenz des Gal-Epitops, Reduktion der Synthese oder Depletion oder Neutralisierung der natürlichen AK denkbar.

Bisher kamen folgende Ansätze zur Anwendung:

1. Depletion der natürlichen Antikörper

Zu den ersten Bemühungen, natürliche anti-porcine Antikörper zu eliminieren, gehörten *ex-vivo*-Perfusionen von Empfängerblut oder -plasma durch ein porcines Organ wie Leber oder Niere (106, 107).

1995 gelang die Eliminierung der natürlichen präformierten AK aus dem Serum bzw. Plasma des Empfängers mit Hilfe einer XNA-bindenden Affinitätsäule. Diese Säule enthält polyklonale, an Sepharose konjugierte, anti-humane IgG (108, 109). Ein anderer Ansatz neutralisiert durch die Gabe löslicher α -Gal Zucker wie Melibiose, Arabino-Galaktose (110), Dextransulfat (111) bzw. α -Gal Ricin (112) die im Empfänger vorhandenen XNA. Die dabei einzusetzende Konzentration ist allerdings so hoch, dass es meist zu toxischen Begleiterscheinungen kommt (110, 113). Seit neuerer Zeit kann das α -Galaktoseanalogon GAS 914 ohne die bisher erwähnten Nebenwirkungen erfolgreich im Primatenmodell eingesetzt (114) werden.

2. Expression von α -1,2 Fukosyltransferase oder α -2,3 Sialyltransferase

Die Enzyme α -1,2 FUT oder α -2,3 SIAT konkurrieren mit der α -1,3 GT um dasselbe Substrat und bewirken dadurch eine verringerte Expression der α -Gal Epitope. Mehrere Arbeitsgruppen bestätigten diese Erwartungen (105, 115-117). Da die Expression der α -Gal Epitope nicht vollständig unterbunden werden kann, kommt es dennoch zu starken immunologischen Reaktionen. Zudem zeigten sich zusätzlich Veränderungen im Glykosylierungsmuster der Zellen (118).

3. Expression von α -Galaktosidase

Terminale α -gebundene Galaktosereste an Carbohydraten werden durch die Expression von α -Galaktosidase entfernt. Die Expression des Enzyms bewirkt eine starke Reduktion der α -Gal Epitope und daraus resultierend eine Verringerung der Sensibilität gegenüber humanem Serum (119, 120).

Zusammenfassend sind die genannten Ansätze nicht ausreichend, eine HAR, geschweige denn eine AVR, zu verhindern.

Ein effektiverer Weg zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen ist sicher die Inaktivierung des α -1,3 Gal GT Gens im porcinen Spenderorganismus.

3.2 Knock out der porcinen α -1,3 Galaktosyltransferase

Die Inaktivierung des α -1,3 GT-Gens im Schwein wird von Experten einhellig als nächster wichtiger Schritt zur Überwindung der akut vaskulären Abstoßung angesehen.

Zu Beginn der hier vorgelegten Arbeit war die Generierung eines Gal-Knock out (KO)-Schweines nicht in Sicht. Eine Herstellung von KO-Tieren über embryonale Stammzellen (ES), wie in der Maus üblich, ist bis heute, bedingt durch fehlende porcine ES-Zelllinien, nicht möglich.

Vor einigen Jahren jedoch wurde der Kerntransfer, eine von ES-Zellen unabhängige, Methode zur Herstellung genetisch modifizierter Tiere, etabliert. Die mit dieser Technologie damals unter Verwendung embryonaler Zellen als Kernspender zuerst klonierten Tiere waren Schafe (121). 1997 demonstrierte die Arbeitsgruppe von Ian Wilmut den ersten Kerntransfer von adulten Zellen aus Eutergewebe in Schafen (122, 123). Der Kerntransfer unter Verwendung differenzierter somatischer Zellen ist mittlerweile auch für die Spezies Maus (124), Ziege (125), Rind (126-129), Zebrafisch (130) und Katze (131) etabliert. Die Geburt der ersten geklonten Schweine erfolgte im Jahr 2000 (132-134).

3.2.1 Inaktivierung zellulärer Gene über homologe Rekombination

(135, 136)

Säugerzellen besitzen die Fähigkeit unter der Beteiligung der zellulären Proteine recA, B und C identische DNA-Bereiche zwischen homologen Chromosomen wechselseitig auszutauschen. Dies wird als homologe Rekombination bezeichnet und dient in erster Linie der Neukombination des Erbgutes während der Meiose. Homologe Rekombination findet aber nicht nur zwischen Chromosomenpaaren statt, sondern kann auch zwischen einem Chromosom und einem rekombinanten DNA-Molekül (Vektor), welches künstlich in die Zelle eingebracht wurde, stattfinden. Voraussetzung ist lediglich, dass der Vektor und das Chromosom homologe DNA-Regionen enthalten. Dieser Mechanismus kann für die gezielte Geninaktivierung in Säugerzellen eingesetzt werden.

Um ein Gen über homologe Rekombination zu inaktivieren, muss zuerst ein geeigneter Knock-out-Vektor hergestellt werden. Ein von uns gewähltes Replacement-Konstrukt enthält üblicherweise folgende Bestandteile:

- 1) Zwei benachbarte Sequenz-Bereiche des zu inaktivierenden Zielgens
- 2) Die Sequenz-Bereiche sind durch ein positiv selektierbares Gen getrennt. Typischerweise ist dies ein Gen, dessen Produkt, eine bakterielle Phosphotransferase, Resistenz gegen Aminoglykosid-Antibiotika (Neomycin, G418, u.a.) verleiht.

Eine weitere Entwicklung sind sogenannte Promotortrap-Targetingvektoren (137-139). Diese werden so konzipiert, dass ausschließlich die Transkriptionsmaschinerie des endogenen Targetgens benutzt wird. Nur bei korrekter Rekombination im richtigen Leserahmen hinter den Promotor des zu inaktivierenden Zielgens oder bei zufällig geeigneter Integration hinter einen anderen zellulären Promotor wird das Resistenzgen des Vektors abgelesen und eine positive Selektion ermöglicht. Die Rate der falsch positiven, zufällig integrierten, Klone reduziert sich damit erheblich (140, 141).

Nach Linearisierung des Promotortrap-Vektors wird dieser mit einer geeigneten Methode wie der Elektroporation oder Transferrinfektion in die Zielzellen eingebracht. In einem sehr geringen Anteil der transfizierten Zellen kommt es durch homologe Rekombination zu einem wechselseitigen Austausch der Genbereiche des Vektors und des chromosomalen Genortes. Analog dazu werden dabei nicht nur zwei Vektor-Genfragmente, sondern auch das dazwischen liegende Selektionsgen in das Chromosom eingeführt. Dies führt zu einer Zerstörung des Leserahmens, bzw. zur Deletion essentieller Bereiche des Gens und damit zu dessen Inaktivierung.

3.2.2 Voraussetzung zur Inaktivierung der α -1,3 Gal GT im Schwein

Folgendes muss für die Inaktivierung der porcinen α -1,3 GT im Schwein gegeben sein:

1. Die für die Herstellung des Promotortrap-Vektors benötigten homologen Bereiche der α -1,3 GT müssen mit Hilfe publizierter Sequenzinformationen verfügbar sein.
2. Eine geeignete und effiziente Methode zum „Gene targeting“ und damit der Inaktivierung der α -1,3 Gal GT in primären porcinen Zellen oder Zelllinien.
3. Die Kerntransfertechnik, wie in Kap. 1.2 beschrieben, muss zur Generierung der Gal KO-Schweine etabliert sein.

3.3 Infektionsgefahr im Rahmen der Xenotransplantation

Neben den vehementen Abstoßungsreaktionen besteht ein weiteres Problem der Xenotransplantation in der Gefahr der Übertragung speziesfremder Mikroorganismen und Viren auf den Menschen. Mit dem Transplantat könnten Krankheitserreger, die sonst nur im Schwein vorkommen, auf den (immunsupprimierten) Empfänger übertragen werden.

3.3.1 Nicht virale Erreger und exogene Viren

Die Mehrzahl aller im Schwein vorkommenden Mikroorganismen, darunter eukaryotische Parasiten und Bakterien, lässt sich über Zucht und Haltung unter SPF-Bedingungen relativ sicher eliminieren. Problematischer erscheinen zum einen bisher unbekannte oder schlecht charakterisierte Mikroorganismen und zum anderen viele virale Erreger. Während für eine Reihe von im Schwein vorkommenden Viren, darunter Influenzaviren, Paramyxoviren, Circoviren und Picornaviren wie das porcine Encephalomyokarditis Virus (142) wahrscheinlich relativ einfach erregerfreie Schweine herzustellen sind, stellen vor allem persistierende Viren ein großes Problem dar. Unter den im Schwein vorkommenden persistierenden Erregern erscheinen porcine Herpesviren und Retroviren für die Xenotransplantation relevant. Herpesviren, insbesondere die porcinen γ -Herpesviren (143-145), sind in der Schweinepopulation weit verbreitet, können jedoch vermutlich über geeignete Zucht- und Haltungsbedingungen eliminiert werden (143). Das infektiologisch größte Problem für die Xenotransplantation stellen wohl porcine endogene Retroviren dar.

3.3.2 Porcine endogene Retroviren

3.3.2.1 Retroviren

Retroviren sind eine im Tierreich weit verbreitete Virusgruppe. Ein Hauptcharakteristikum des retroviralen Lebenszyklus ist die reverse Transkription der RNA in DNA und die Integration der cDNA als Provirus in das Genom der Wirtszelle.

Man unterscheidet zwei Arten von Retroviren. Exogene Retroviren, wie z.B. das humane Immundefizienzvirus (HIV), befinden sich nicht in Zellen der Keimbahn. Diese Proviren befinden sich anschließend nur im Genom der infizierten Zellen. Befällt jedoch ein exogener Retrovirus Zellen der Keimbahn, führt die Integration des Virus und die nachfolgenden Zellteilungen dazu, dass das Provirus in jeder Zelle des Organismus vorhanden ist. Es wird dann an die Nachfahren wie ein normales Gen weitervererbt. Diese Viren werden als endogene Retroviren bezeichnet.

Retroviren wurden erstmals 1911 von Peyton Rous beschrieben. Er bewies die Übertragbarkeit einer Tumorerkrankung in vorher gesunde Hühner durch die Injektion filtrierter Extrakte aus Geflügelsarkomen. 1970 entdeckten schließlich Howard Temin sowie David Baltimore in Retroviren die bereits erwähnte reverse Transkriptase, ein bis dahin unbekanntes Enzym (146, 147).

3.3.2.1.1 Die Struktur retroviraler Partikel

Retroviren haben einen Durchmesser von 80-120nm und enthalten ein diploides, einzelsträngiges RNA-Genom von jeweils 8-10kb. Die RNA-Einzelstränge (148, 149) sind an ein Nukleoprotein gebunden und gemeinsam mit viruskodierten Replikationsenzymen (reverse Transkriptase, Protease und Integrase) in ein ikosaedrisches Kapsid (Nukleoid) eingeschlossen. Dieses Nukleoid ist von einer aus der Zellmembran der Wirtszelle stammenden Membranhülle (150) umgeben.

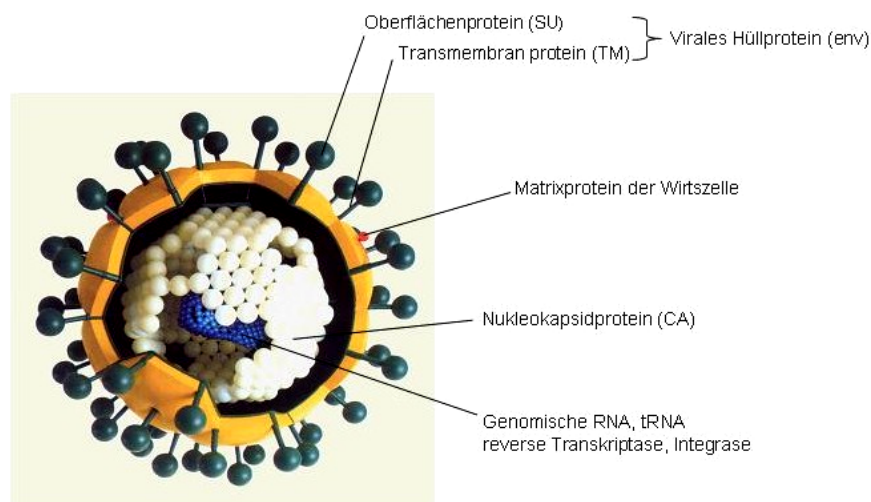


Abbildung 3: Darstellung eines retroviralen Partikels

Nach Integration des Virus in das Genom der Wirtszelle beginnt die Synthese der retroviralen RNA am 3'-Ende an einer artspezifischen Sequenz. Diese U5U3-Sequenzen, auch als LTRs („long terminal repeats“) bezeichnet, schließen die drei proteinkodierenden Gene **gag**, **pol** und **env** ein.

Das **gag**-Gen (gruppenspezifisches Antigen) enthält die genetische Information für die Kapsidproteine. Es wird gemeinsam mit dem **pol**-Gen aus der vollständigen viralen mRNA in ein Vorläuferpolyprotein translatiert. Das **gag**-Vorläuferprotein wird während der Reifung der Virionen von der viruseigenen Protease in funktionale Proteine gespalten.

Dabei handelt es sich um das Matrixprotein (p15), welches mit der Virushülle in Verbindung steht, dem Kapsidprotein (p27 bei PERV), das die innere Kernstruktur der Virionen bildet und dem Nukleoprotein (p10), das sich ans virale RNA-Genom anlagert.

Aus dem **pro/pol**-Polyprotein (Protease/Polymerase) gehen die viruseigenen Enzyme hervor. Dabei handelt es sich um eine für die Spaltung der Vorläuferproteine verantwortlichen Protease. Desweiteren um eine Integrase, deren Funktion in der Integration des Provirus in das Wirtsgenom liegt, und um die reverse Transkriptase. Dieses Enzym katalysiert mit Hilfe einer als Primer fungierenden, zellulären tRNA die Umschreibung der genomischen RNA in eine doppelsträngige DNA.

Das **env**-Gen (envelope) bildet das Hüllprotein mit Oberflächen- (SU, gp70) und Transmembran- (TM, p15E) Anteilen (151). Das Transmembran-protein vermittelt die Fusion der Virusmembran mit der Membran der Wirtszelle. Die Wirtsspezifität der Retroviren wird über Interaktionen des Oberflächenproteins mit dem Rezeptor auf der Wirtszelle vermittelt (152, 153).

3.3.2.1.2 Der retrovirale Infektionszyklus

Nach der spezifischen Interaktion der viralen Hüllproteine mit Rezeptoren der Wirtszelle wird das retrovirale Kapsid entweder durch Fusion der Hüllmembran mit der Cytoplasmamembran der Zielzelle (amphotrope Retroviren) oder durch Endozytose (ekotrope Retroviren) (154, 155) aufgenommen und anschließend ins Cytoplasma entlassen. Einer der beiden (identischen) RNA-Genomstränge wird dann revers in doppelsträngige DNA transkribiert und in den Zellkern transportiert. Spezifische Anheftstellen (att) innerhalb der LTRs werden erkannt, deren letzten beiden Nukleotide durch virale Integrase abgespalten und an komplementäre Stellen in die Chromosomen des Wirtsgenoms integriert. Über einen starken viruseigenen Promotor, welcher sich in der Nähe der 5'-LTR befindet, wird die Transkription des Provirus gesteuert und virale mRNA und genomische RNA gebildet. Nach Translation der mRNA kommt es zur Verpackung der genomischen RNA in das reifende Nukleokapsid. Das *env*-Vorläuferprotein enthält ein Signalpeptid, das dem Transport ins endoplasmatische Reticulum dient. Nach Abspaltung des Signalpeptids und Prozessierung erfolgt der Export zur Zellmembran, in der die Hüllproteine über eine carboxyterminale hydrophobe Sequenz verankert werden.

Nach Interaktion der *env*-Proteine mit Proteinen des Nukleokapsids kommt es zur Abschnürung kompletter Virus-Partikel (156).

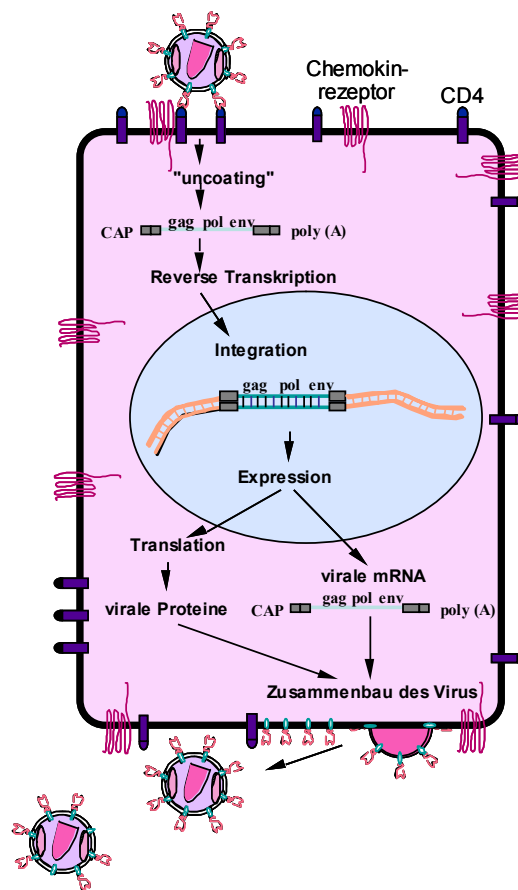


Abbildung 4: Retroviraler Replikationszyklus (Quelle: A. Boller, Paul-Ehrlich-Institut Langen)

3.3.2.2 Die Charakterisierung porciner endogener Retroviren

Retroviren werden nach morphologischen Kriterien in Viren vom Typ A, B, C und D sowie den komplexeren Lentiviren eingeteilt (157). Bei den derzeit charakterisierten porcinen endogenen Retroviren (PERV) handelt es sich um Typ-C- (153, 159, 160) und Ty-B-Retroviren (161, 162).

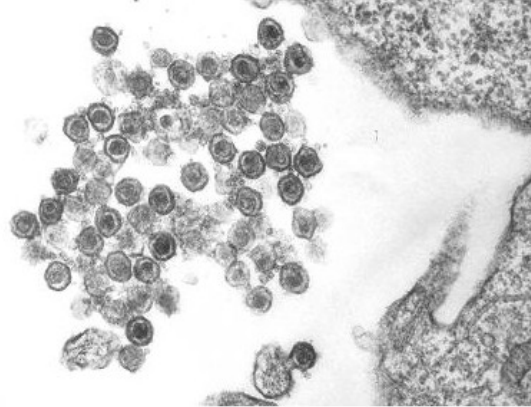
Breese beschrieb bereits 1970 (163) die Freisetzung von Typ-C ähnlichen retroviralen Partikeln aus zwei porcinen Nierenzelllinien. 1975 stellt erstmals Lieber (164) die biologischen und immunologischen Eigenschaften des porcinen C-Typ Virus dar.

PERV-Partikel befinden sich als provirale DNA in 30- bis 50facher Kopienzahl in der Erbsubstanz aller bisher getesteten Schweinerassen (159, 160, 165-170).

Sequenzanalysen von PERV zeigen eine enge Verwandtschaft zu den Mausleukämieviren, den Katzenleukämieviren, dem Leukämievirus des Gibbonaffen und dem endogenen Retrovirus der Paviane (160, 166, 171).

Der Großteil der proviralen Sequenzen im Schwein ist inkomplett, doch zumindest einige der Proviren werden aus Nieren-, Milz-, Haut-, Lungen-, Leber- und Pankreasgewebe sowie aus primären porcinen Aortaendothelzellen (PAEC) und aus PBL in mRNA transkribiert (160, 166, 167, 172).

Infektiöse PERV-Partikel werden von porcinen Zelllinien (163, 164), aus porcinen Tumoren (173), porcinen Endothelzellen der Aorta (167) und porcinen PBMC (174, 175) freigesetzt. Auch eine Evidenz für das Vorhandensein von PERV-Partikeln im porcinem Serum ist gegeben (176, 177).



**Abbildung 5: Aus der porcinen Zelllinie PK-15 freigesetzte PERV-Partikel
(Quelle: Paul-Ehrlich-Institut Langen)**

3.3.2.3 Wirtsspezifität der porcinen endogenen Retroviren

Drei Subtypen, PERV-A, -B und -C, sind inzwischen gut charakterisiert. Die porcine Nierenzelllinie PK-15 (158, 171, 178) und primäre Endothelzellen verschiedener Schweinerassen (167) produzieren die beiden Subtypen PERV-A und -B.

Beide sind als sogenannte xenotrope Viren in der Lage, Zellen verschiedener Spezies *in vitro* zu infizieren. Dies wurde auch für humane Zellen wie primäre Endothelzellen (167, 171, 174, 179, 180) gezeigt.

PERV-C werden von mitogenstimulierten Lymphozyten der Yucatan-Schweine und von Miniaturschweinen produziert (174). Dabei unterschieden sich die einzelnen Mischschweine in ihrer Fähigkeit, PERVs zu produzieren, erheblich. PERV-C ist ekotrop und infiziert *in vitro* ausschließlich porcine Zellen (160, 174).

Die PERV-Subtypen unterscheiden sich vornehmlich in den *env*-Genen. Diese kodieren für die Hüllproteine und determinieren damit das Wirtsspektrum (153, 171, 181). Während die Sequenzen für Gag- und Pro/Pol-Proteine Übereinstimmungen von über 94% aufweisen, differieren die Env-Proteine um bis zu 30%. Diese Befunde deuten darauf hin, dass zumindest drei verschiedene Rezeptoren von PERV zum Eintritt in die Zielzelle verwendet werden. Diese scheinen sich ferner von den von anderen C-Typetroviren benutzten Rezeptoren zu unterscheiden (179).

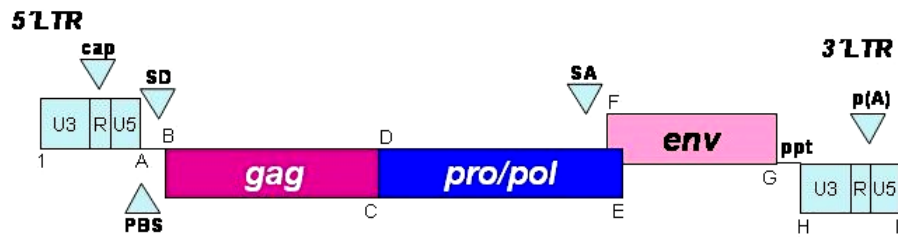


Abbildung 6: Organisation eines PERV nach M.Niebert 2002.

Die Gene und die ORFs sind als Boxen dargestellt.

Abkürzungen: Cap-Transkriptionsstart; PBS- Primerbindungsstelle; PPT- Polypurinbereich; p(A)-poly(A) Adenylierungsstelle. Die LTRs bestehen aus sich wiederholenden Regionen U3 und U5 und besondere Regionen am 3'- bzw. 5'-Ende. SD und SA kennzeichnen die Lage der Splice Donor- und Splice Akzeptorstellen.

3.3.2.4 Pathogenität der porcinen endogenen Retroviren

PERV gehören wie verwandte Leukämie- oder Sarcoma-Viren von Maus, Katze und Affen zur Klasse der einfachen C-Typ-Retroviren (s.Kap 1.3.3.2). Diese stellen für einen gesunden Organismus keine akuten Pathogene dar (182), rufen jedoch z.T. in immungeschwächten nichthumanen Primaten Neoplasien hervor (183-185).

Die Integration der retroviralen RNA in das Genom der Wirtszelle kann verschiedene pathogene Folgen haben. Sie kann eine Aktivierung von zellulären Onkogenen oder eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen hervorrufen, die dann, wie in verschiedenen Tiermodellen gezeigt, zur Tumorentstehung führen (186). Die Insertion der proviralen DNA kann möglicherweise auch andere zelluläre Gene schädigen (187). Da im menschlichen Genom humane endogene Retroviren vorhanden sind, die mit den C-Typ Retroviren anderer Säuger einschließlich PERV verwandt sind (188), ist eine Rekombination dieser Viren und die Entstehung neuer Viren mit veränderten pathogenen Eigenschaften theoretisch möglich.

Es wurden bereits mehrere Übertragungen von Retroviren über Speziesgrenzen hinweg gezeigt. Die wohl bekanntesten Beispiele sind HIV-1 und HIV-2. HIV-1 resultiert mit hoher Wahrscheinlichkeit aus der Übertragung von SIV (*simian immunodeficiency virus*) des Schimpansen auf den Menschen (189, 190). Für die simianen T-Zell-Leukämieviren (STLV) wurden ebenfalls mehrere unabhängige Übertragungen von Schimpansen auf den Menschen und möglicherweise auch auf andere Affen beschrieben (191-193). Auch für endogene Retroviren wurde diese Speziesüberschreitung gezeigt. Von der Maus *Mus caroli* wurde ein endogenes Mausvirus auf Gibbonaffen übertragen (194, 195). Im neuen Wirt ruft dieses als nunmehr exogenes Virus myeloische Leukämien und Lymphome hervor (196).

Hinzu kommt, dass Retroviren möglicherweise immunsuppressiv wirken (180, 197) können. Es wurde gezeigt, dass Retroviren, die *in vivo* Immundefizienzen hervorrufen, auch *in vitro* verschiedene Immunreaktionen wie bspw. die Proliferation humaner Lymphozyten inhibieren (180, 198).

Verglichen mit anderen humantropen Retroviren sind Titer und Infektiosität von PERV niedrig. Nicht zu unterschätzen ist allerdings die Tatsache, dass PERV ein ausgesprochen hohes Adaptionpotential aufweisen. Einige Passagen in humanen Zellen führen zu stark erhöhter Expression und Infektiosität solcher humanisierter PERVs (181, 199).

3.3.2.5 Faktoren, welche das Infektionspotential von PERV im Rahmen einer Xenotransplantation beeinflussen

Genau wie für aus Gal α -1,3 Gal-exprimierenden Zellen freigesetzten HIV und murinen Retroviren beschrieben (200-204), tragen wahrscheinlich auch PERV-Partikel Gal α -1,3 Galepitope auf ihrer Hüllmembran und sind deshalb in humanem Serum sensitiv für eine Antikörpervermittelte Virolyse über den klassischen Komplementweg.

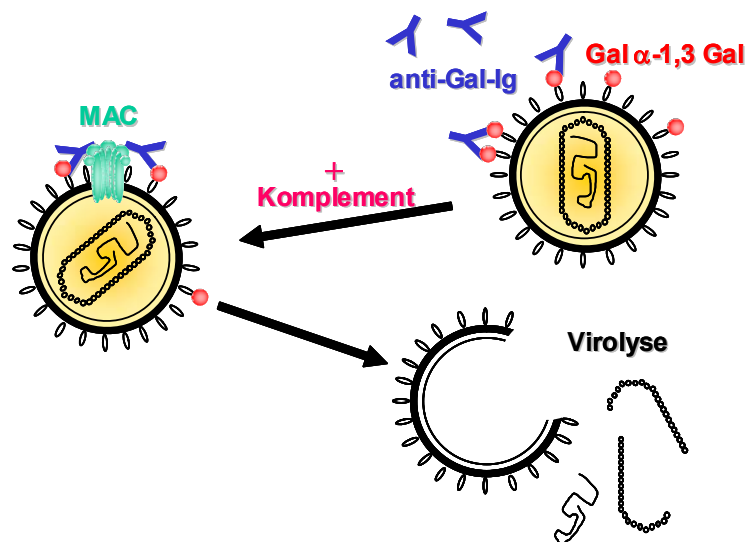


Abbildung7: Komplement-vermittelte Virolyse von PERV-Partikeln nach Bindung von anti Gal- α 1.3 Galantikörpern in humanem Serum (Quelle: Ulrich Martin)

Diese effektive Lyse der PERV-Partikel würde durch die Verwendung der für eine erfolgreiche Xenotransplantation erforderlichen Gal KO-Schweine, die im Jahre 2002 (205, 206) geschaffen wurden, unterbleiben. Die aus ihren Organen freigesetzten PERV-Partikel exprimieren kein Gal-Epitop mehr und sind somit zumindest im geringeren Umfang Ziel für antiporcine Antikörper.

Neben der medikamentösen Unterdrückung der humoralen und zellspezifischen Abwehr des Empfängers stellt die Verwendung transgener Spendertiere mit Expression von RCA ein zusätzliches Problem dar. Die potentielle Infektionsgefahr wird durch das Einbringen eines humanen Komplementregulators wie CD46, CD55 oder CD59 gesteigert, weil selbiger nach Aussprossung des Virus aus einer infizierten Zelle auch auf der Virusmembran exprimiert ist. Diese freigesetzten Viren sind mit einer „Tarnkappe“ versehen und somit wahrscheinlich geschützt vor komplementvermittelter Lyse des Wirtsorganismus (207-209) sind. Takefman (210) zeigte kürzlich, dass aus einer für CD59 transgene porcinen Zelllinie freigesetzte Viren CD59 in ihre Hülle inkorporiert hatten und sich weitestgehend als serumresistent erwiesen.

Weiterhin muss beachtet werden, dass einige der zur Generierung der transgenen Tiere verwendeten Komplementregulatorproteine von verschiedenen Viren als Rezeptoren verwendet werden. CD46 (211, 212) ist bspw. der Rezeptor für das Masernvirus. CD46-transgene Schweine könnten von einem Menschen mit dem Masernvirus infiziert werden und diese Infektion an den Organempfänger weitergeben. CD55 (DAF) stellt für Picornaviren Echo und Coxsackie B den Rezeptor dar (213) (214). Coxsackie-Viren rufen eine Myokarditis hervor und könnten sowohl eine Gefahr für das xenotransplantierte porcine Herz als auch für das humane Herz immunsupprimierter Rezipienten, die andere Transplantate erhalten haben, darstellen.

3.3.2.6 *In vivo Infektionsstudien im Kleintiermodell*

In verschiedenen Studien wurde nachgewiesen, dass Zellen mehrerer Kleintierspezies, darunter Maus, Ratte, Katze und Nerz *in vitro* suszeptibel für PERV-Infektionen sind (174, 179, 215, 216). Erste *in vivo* PERV-Infektionsstudien unter Verwendung von Ratten und Meerschweinchen, mit CyA oder Cobra Venom Faktor behandelt und, zum Vergleich, nicht immunsupprimiert, führten nicht zur Infektion der Versuchstiere (217).

Bei der Auswertung dieser Modelle müssen zwei Punkte beachtet werden. Eine Übertragbarkeit der Immunsuppressionsprotokolle, wie sie in präklinischen Primatenmodellen angewandt werden, ist nicht gegeben. Zum anderen verfügen die Kleintierinfektionsmodelle nicht über die wohl wichtigste humane Barriere gegenüber PERV-Infektion, die Gal α -1,3 Galaktoseantikörper.

Van der Laan (218) und Deng (219) berichteten 2001 über eine PERV-Infektion in verschiedenen Geweben von SCID-Mäusen nach Transplantation porciner Inselzellen.

Diese Ergebnisse waren hinsichtlich der zum einen fehlenden zellulären und humoralen Immunkompetenz der SCID-Mäuse und einer gezeigten Übertragung *in vitro* von PERV auf murine Zellen (179) nicht unerwartet. Ein weiterer Punkt betrifft die Tatsache, dass SCID-Mäuse genauso wie Nude-Mäuse (220) murine Leukämieviren (MLV) freisetzen, so dass eine MLV-Infektion der transplantierten porcinen Zellen mit nachfolgender Freisetzung von MLV-PERV-Pseudotypen denkbar ist. Bei gleichzeitiger Infektion einer Zelle mit zwei verschiedenen behüllten Viren kann eine phänotypisch gemischte neue Virusgeneration produziert werden. Solche Pseudotyp-Viren enthalten die genetische Information und die inneren Strukturproteine von einem Virus, besitzen jedoch in der Hülle Proteine von einem anderen oder von beiden Viren. Daher haben Pseudotypviren das Infektionsspektrum des anderen oder beider parentaler Viren. Dieser alternative Übertragungsweg für PERV könnte zu falsch positiven Ergebnissen geführt haben.

3.3.2.7 Retrospektiv durchgeführte Studien an Patienten

Obwohl *in vitro*-Daten auf ein Infektionsrisiko durch Retroviren bei xenogener Transplantation hindeuten könnten, gibt es hierfür bisher *in vivo* keine positiven Befunde.

In einer 1999 veröffentlichten Studie von Novartis (221) wurden 160 Patienten untersucht, die unter verschiedenen Behandlungsregimes bis zu 460 Tage mit lebenden Schweinezellen in Kontakt gekommen waren. Es ließen sich keine PERV-Sequenzen in den zur Kontrolle entnommenen Gewebe- und Blutproben nachweisen. Bei einer Reihe von russischen Patienten, die für 50-60min eine extrakorporale Milzperfusion erhalten hatten, wurden chimäre porcine Zellen oder auch nur porcine DNA über einen Zeitraum von 8,5 Jahren nachgewiesen. Studien einzelner Patienten aus diesem Kollektiv waren bereits zuvor mit denselben Ergebnissen publiziert worden (15, 222, 223).

In einer weiteren Studie wurden Patienten mit Parkinson-Krankheit (PD) und Huntington-Krankheit (HD) nach Implantation von fetalen porcinen Neuronen untersucht (16, 224). Hierbei zeigten sich die untersuchten PBMC von insgesamt elf PD-Patienten und zwölf HD-Patienten über einem Zeitraum von 6 bis 24 Monaten negativ für PERV.

Zwei Patienten mit fulminantem Leberversagen, die 6,5 bzw. 10 Stunden *ex vivo* an hCD55/hCD59 transgene Schweinelebern angeschlossen waren und anschließend eine Lebertransplantation erhielten, zeigten im Zeitraum von 6 bis 24 Monaten nach der Perfusion ebenfalls keine Evidenz für eine PERV-Infektion (225).

Auch fünf mit einem mit porcinen Hepatozyten gefüllten Bioreaktor behandelte Patienten waren in den durchgeführten Tests negativ für PERV (226).

Die Untersuchungen wurden in allen Studien mittels PCR und immunologischen Methoden durchgeführt. Eine Vielzahl weiterer diagnostischer Tests wurde spezifisch für die Detektion von PERV entwickelt(227-233).

Obwohl diese Ergebnisse vielversprechend sind, muss betont werden, dass das untersuchte Patientenkollektiv kaum die Umstände einer heutigen klinischen Xenotransplantation widerspiegelt. Alle bisherigen retrospektiven Studien wiesen diesbezüglich folgende Mängel auf:

1. Keinem der Patienten wurde ein komplettes Schweineorgan transplantiert
2. Weniger als 10% der untersuchten Patienten erhielten eine Immunsuppression
3. Es wurden keine Zellen oder Gewebe von Schweinen, die auf ihrer Oberfläche humane Komplementregulatoren tragen oder Gal-KO sind, verwendet
4. In den meisten Fällen war der Kontakt zu porcinem Material sehr kurz
5. Eine potentielle Reduktion natürlicher XNA durch Immunadsorption (Säule oder Organperfusion), die ein Überleben von PERV-Partikeln im Serum erleichtern würden, wurde nur in zwei Patienten nach extrakorporaler Nierenperfusion untersucht.

Evident ist auch, dass es in nicht immunsupprimierten Personen, auch wenn diese Kontakt zu Schweinen oder Schweineblut hatten wie bspw. Schlachtern, zu keiner nachweisbaren PERV-Infektion kommt. Bei Untersuchung entsprechender Personen und in der normalen Bevölkerung wurden bis jetzt keine PERV-Sequenzen nachgewiesen.

Zur Klärung sind also weitere *in vivo* Infektionsstudien in geeigneten Modellen notwendig, um umfangreichere Aussagen bezüglich der Infektiosität von PERV unter den Bedingungen klinischer Xenotransplantationen treffen zu können.

3.3.2.8 In vivo Infektionsstudien im Primatenmodell

Im Gegensatz zu Kleintiermodellen sind Primatenmodelle sehr gut in der Lage, die Bedingungen einer klinischen Xenotransplantation widerzuspiegeln. Zum einen besitzen sie ein dem Menschen vergleichbares Immunsystem und zum anderen exprimieren sie ebenfalls anti α -Gal-Antikörper.

Entgegen ersten Publikationen konnte u.a. auch in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Zellen von Schimpansen, Gorillas, Pavianen und Javaneraffen neben zwei B-lymphozytären Pavianzelllinien mit PERV infizierbar sind (216, 234).

Bis zu diesem Zeitpunkt wurden mehrere *in vivo* Xenotransplantationsstudien mit subhumanen Primaten z.T. unter Verwendung transgener porciner Spenderorgane durchgeführt. Die untersuchten Tiere zeigten sich alle negativ hinsichtlich einer PERV-Infektion (216, 235-237).

In vivo allerdings konnte selbst bei Verwendung hoher Virusdosen, verschiedener Immunsuppressiva und humanadaptierter hochtitriger Viren eine Übertragung auf Nerze, Ratten, Rhesusaffen, Schweinsaffen und Paviane nicht nachgewiesen werden (216, 238, 239). Für die Gewinnung humanadaptierter Viren wurden von porcinen Zellen freigesetzte PERV-Partikel wiederholt auf humane Zellen passagiert. Das noch vorhandene α -Galepitop in der Hüllmembran der freigesetzten PERV geht dabei durch die Passagen verloren. Die dann exprimierten PERV-Partikel sind besser vor dem Immunsystem des Empfängers geschützt (s. Kap.3.1.3). Damit wurde die Situation, die bei einer Xenotransplantation eintreffen würde, partiell simuliert. Die humanadaptierten Viren sind durch höhere Titer und genetische Veränderungen in den LTRs charakterisiert (199, 238).

Die Eignung der subhumanen Primatenmodelle zur Fragestellung einer möglichen PERV-Infektion wird noch immer kontrovers diskutiert. Es scheint zumindest recht wahrscheinlich, dass die Zellen der meisten Primaten weniger suszeptibel sind als humane Zellen.

3.3.2.9 Entwicklung eines „Drei-Spezies“ *in vivo* Infektionsmodells

Für die Übertragbarkeit der klinischen Behandlungsprotokolle vor und während der Xenotransplantation und das Vorhandensein der α Gal Antikörper in den Empfänger-tieren sind Primatenmodelle bestens geeignet. Humane Endothelzellen sind im Gegensatz zu Primatenzellen sehr suszeptibel für PERV. In dem von uns entwickelten „humanisiertem Drei-Spezies-Xenotransplanationsmodell“ werden die genannten Vorteile miteinander kombiniert.

Zum Studium der Übertragbarkeit von PERV wurden nicht modifizierte und hCD59 transgene porcine Nieren in immunsupprimierte Javaneraffen transplantiert. Die *Vena renalis* des Empfängers wurde dabei durch ein humanes Veneninterponat, welches aus humaner *Vena saphena* generiert wurde, ersetzt. Bedingt durch den natürlichen Blutfluss kommen aus dem porcinen Organ freigesetzte Viren unmittelbar danach in direkten Kontakt zu humanen Endothelzellen.

Diese kleiden von innen das Interponat aus. Endothelzellen tragen PERV-spezifische Rezeptoren und sind, wie bereits gezeigt, sehr suszeptibel für PERV-Infektionen (240).

3.4 Zielsetzung

Folgende Aufgabenstellungen sollten im Rahmen dieser Promotion bearbeitet werden:

1. Herstellung von Gene-targeting Konstrukten zur Inaktivierung des porcinen Galaktose α -1,3 Galaktosyltransferasegens.
 - a) Der KO-Vektor soll in einer PERV-freisetzenden porcinen Endothelzelllinie angewendet werden. Diese soll später zur Untersuchung benutzt werden, ob Gal α -1,3 Gal negative PERV-Partikel in Tiermodellen zu *in vivo* Infektionen führen. Darüber hinaus soll die generierte Zelllinie dazu dienen, im Rahmen einer Expressionsklonierung Gal α -1,3 Gal-unabhängige xenoreaktive Epitope zu identifizieren.
 - b) In Kooperation mit der FAL Mariensee soll mit dem Vektor ein Gal α -1,3 Gal "Knock out" Schwein hergestellt werden.
2. Analyse einer potentiellen PERV-Übertragung in einem humanisierten *in vivo* PERV-Infektionsmodells. In ein in Hannover bereits etabliertes Primatenmodell zur diskordanten Xenotransplantation erfolgte die zusätzliche Transplantation eines humanen Venensegments. So wurde die in solchen Tiermodellen gegebene gute klinische Übertragbarkeit der angewendeten Immunsuppressionsprotokolle mit der hohen Suszeptibilität humaner Endothelzellen für PERV kombiniert.

4 Material

4.1 Geräte

Bilddokumentationssystem:

E.A.S.Y 429 K (Herolab, Wiesloch)

Brutschrank:

Modell BB 6220 (Hereaus, Osterode)

Modell 3032 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)

Durchflußzytometer:

FACScan™ (Becton Dickinson, Heidelberg)

Elektrophoresekammern:

Horizontalgelkammern Sub-Cell GT und Mini-Sub (Bio-Rad, München)

Elektroporationsgerät:

Gene PulserII und Gene Controler (Bio-Rad, München)

Film-Kassetten:

X-OMAT mit Verstärkerfolie (Kodak, Rochester, USA)

Heizblock:

Thermomixer 5437 (Eppendorf, Hamburg)

Hybridisierungsöfen:

(Saur, Reutlingen)

Mikroskope:

BX 40 (Olympus, Japan)

CK 40 (Olympus, Japan)

Eclipse TE 300 (Nikon, Düsseldorf)

Mikrowelle:

MW 4270 E (HTS, Mettmann)

PCR-Thermocycler:

TRIO und UNO II Thermoblock (Biometra, Göttingen)

iCyclerQ™ (Bio-Rad, München)

pH-Meter:

pH 538 (WTW, Weilheim)

Photometer:

Bio Photometer (Eppendorf, Hamburg)

Spannungsgerät:

PAC 300 (Bio-Rad, München)

Spezielle Software für EDV:

CELLQuest™	(Becton Dickinson, Heidelberg)
WinMDI 2.1.3 (Copyright J. Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, USA)	

Sterilbank:

Hera Safe HS18	(Hereaus, Osterode)
----------------	---------------------

Thermomixer:

MS1 Minishaker	(Ika-Works, USA)
----------------	------------------

UV-Crosslinker:

UV-Stratalinker™	(Stratagene, La Jolla, USA)
------------------	-----------------------------

UV-Tisch:

Transilluminator TI1	(Biometra, Göttingen)
----------------------	-----------------------

Wasserbad:

Modell 1083	(Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)
-------------	--

Zentrifugen:

Avanti J-25	(Beckman, Glenrothes, UK)
BIOfuge fresco	(Hereaus, Osterode)
Megafuge 1.0R	(Hereaus, Osterode)
PICO Fuge	(Stratagene, La Jolla, USA)

4.2 Verbrauchsmaterial

Filme:

Hyperfilm™	(Amersham, Braunschweig)
------------	--------------------------

Filterpapier:

Whatman, 3MM CHR	(Whatman Inter Ltd., Maidstone, USA)
Cloning Discs	(Sigma, Deisenhofen)

Küvetten:

3ml Acryl-Küvetten	(Sarstedt, Nümbrecht)
Quarküvetten	(Hellma, LAT, Garbsen)
Elektroporationsküvetten, d=1mm	(Bio-Rad, München)

Membranfilter:

Nylonmembran Hybond.N ⁺	(Amersham, Freiburg)
------------------------------------	----------------------

Reaktionsgefäße:

0,5ml Polycarbonatröhrchen	(Becton Dickinson, New Jersey)
0,65ml und 1,7ml Safe Seal Tubes	(Roth, Karlsruhe)
0,5ml und 1,5ml	(Sarstedt, Nürnberg)
1,8ml Einfrierröhrchen	(Nunc, Dänemark)

15ml und 50ml Falcons	(Greiner, Frickenhausen)
15ml Polystyrolröhrchen für Zellkultur	(Becton Dickinson, New Jersey)
Mikrotiterplatten, Polystyrol, Rundboden	(Greiner, Frickenhausen)

Säulen und Aufreinigungskits:

EndoFree™ Plasmid Midi Kit	(Qiagen, Hilden)
Midi Plasmid Kit	(Qiagen, Hilden)
Large-Construct Kit	(Qiagen, Hilden)
Oligotex mRNA Mini Kit	(Qiagen, Hilden)
QIAamp ^R DNA Blood Mini Kit	(Qiagen, Hilden)
QIAamp ^R Viral RNA Kit	(Qiagen, Hilden)
QIAEX II Gel Extraktion Kit	(Qiagen, Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	(Qiagen, Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	(Qiagen, Hilden)
S.N.A.P.™ MiniPrep Kit	(Invitrogen, Groningen, Niederlande)

Sterilfilter:

Minisart NML, 0,45 und 0,22µm	(Sartorius, Göttingen)
-------------------------------	------------------------

Zellkulturflaschen für adhärente Zellen:

25cm ² Polystyrol	(Greiner, Frickenhausen)
75cm ² Polystyrol, 250ml	(Corning Costar, Niederlande)
175cm ² Polystyrol, 650ml	(Corning Costar, Niederlande)

4.3 Chemikalien

Agarose ultraPure	(Life Technologies, Eggenstein)
Ampicillin	(Invitrogen, Leek, Niederlande)
Blocking Reagent	(Roche, Mannheim)
BMV-RNA (520µg/ml)	(Promega, Madison, USA)
Bovines Serumalbumin, Fraktion V	(Boehringer, Mannheim)
Bromphenolblau	(Serva, Heidelberg)
CDP-Star™	(Boehringer, Mannheim)
Chloroform	(Merck, Darmstadt)
Desoxynukleotide ultra pure	(Amersham, Freiburg)
Diaminobenzidin	(DAKO A/S, Glostrup, Dänemark))
Diethylpyrocarbonat	(Sigma, Deisenhofen)
Dimethylformamid	(Roth, Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid	(Merck, Darmstadt)

DNA-Marker:

DIG-markierter Marker II	(Roche, Mannheim)
1 KB-Ladder	(Life Technologies, Eggenstein)
pBS DNA-Marker, mit Hpa II verdaut	(Natutec, Frankfurt)
Smart SF Ladder	(Eurogentec, Heidelberg)
dNTP	(Amersham Pharm. biotech, Freiburg)
DTT	(Roche, Mannheim)
Ethanol	(Baker, Deventer)
Ethidiumbromid (10mg/ml)	(Sigma, Deisenhofen)
Fötale Kälberserum	(Life Technologies, Eggenstein)
Formalin	(Merck, Darmstadt)
Formamid	(Sigma, Deisenhofen)
Gelatine	(Sigma, Deisenhofen)
L-Glutamin	(Biochrom/Seromed, Berlin)
Glutaraldehyd (25%ige Lsg.)	(Merck, Darmstadt)
Glycerin	(Sigma, Deisenhofen)
Glykogenlösung 20mg/ml	(Boehringer Mannheim)
Guanidiniumisothiocyanat	(Life Technologies, Eggenstein)
Härris-Hämatoxylin	(Merck, Darmstadt)
Harnstoff	(Life Technologies, Eggenstein)
Heparin	(Seromed/Biochrom, Berlin)
Holo-Transferrin	(Sigma, Deisenhofen)
Hypoxanthin	(Sigma, Deisenhofen)
Isoamylalkohol	(Sigma, Deisenhofen)
Isopropanol	(Sigma, Deisenhofen)
Kaliumhexacyanoferrat III	(Sigma, Deisenhofen)
Kaliumhexacyanoferrat II-trihydrat	(Sigma, Deisenhofen)
Kanamycin	(Sigma, Deisenhofen)
Lipofectamin/Lipofectin	(Life Technologies, Eggenstein)
Maleinsäure	(Sigma, Deisenhofen)
MOPS	(Sigma, Deisenhofen)
N-Lauroyl-Sarcosine	(Sigma, Deisenhofen)
Non essential Amino Acids 100x	(PAA Laboratories, Cölbe)
Penicillin (10000U/ml)/ Streptomycin (10000µg/ml)	(Biochrom/Seromed, Berlin)
Phenol	(Sigma, Deisenhofen)

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	(Roth, Karlsruhe)
Poly A (10mg/ml)	(Roche, Mannheim)
Procipitate TM	(LigoChem, Fairfield NJ, USA)
RNA-Marker: 0,24-0,95 kb-Ladder	(Life Technologies, Eggenstein)
Streptavidin-Phycoerythrin	(Vector Lab., Burlingame, USA)
Tergitol (NP40)	(Sigma, Deisenhofen)
Tetrazyklin	(Calbiochem, Schwalbach)
Tissue TEK medium	(O.C.T.comp., Sakura, Netherlands)
TRI Reagent LS	(Molecula Research, Cincinnati, USA)
TRizol Reagent	(Life Technologies, Eggenstein)
Trypanblau	(Serva, Heidelberg)
X-Gal	(Roth, Karlsruhe)
Zeozin TM	(Invitrogen, Leek, Niederlande)

Alle anderen Chemikalien wurden in p.A. Qualität von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

4.4 Enzyme und Enzymkits

Calf Intestinal Phosphatase (CIP)	(New England BioLabs, Frankfurt)
Collagenase A aus <i>Clostridium histolyticum</i>	(Roche, Mannheim)
DIG-Oligo Labeling Kit	(Roche, Mannheim)
DNA Polymerase I, (Klenow)	(New England BioLabs, Frankfurt)
DNase I, RNase-frei	(Promega, Madison, USA)
Mung Bean Nuklease	(New England BioLabs, Frankfurt)
Proteinase K	(Merck, Darmstadt)
Restriktionsendonukleasen	(New England BioLabs, Frankfurt))
Reverse Transkriptase, AMV	(Promega, Madison, USA)
Reverse Transkriptase, M-MLV	(Promega, Madison, USA)
Ribonuklease H	(Promega, Madison, USA)
RNase Block Ribonuklease Inhibitor	(Stratagene, Heidelberg)
RNase, DNase-frei	(Qiagen, Hilden)
S1 Nuclease	(MBI Fermentas, Heidelberg)
Streptavidin-Peroxidase	(DAKO A/S, Glostrup, Dänemark)
Taq-Polymerasen:	
Expand Long Template PCR System	(Roche, Mannheim)
MasterAmp TM Tfl DNA Polymerase	(BiozymEpicentre, Hess. Oldendorf)
ProofStart TM DNA Polymerase	(Qiagen, Hilden)

Pwo High fidelity DNA Polymerase	(Eurogentec, Alameda, USA)
RedTaq™ Polymerase	(Sigma, Deisenhofen)
T4 DNA-Ligase	(MBI Fermentas, Heidelberg)
TOPO TA Cloning Kit	(Invitrogen, Leek, Niederlande)
Trypsin/EDTA-Lsg	(PAA Laboratories, Linz, Austria)

4.5 Antikörper und Lektine

Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments	(Roche, Mannheim)
Goat anti-mouse IgG, FITC-konjugiert	(Becton Dickinson, San Jose, USA)
Horse anti-mouse IgG (H+L), biotinyliert	(Vector Lab., Burlingame, USA)
Mouse anti-human CD31, Klon WM-59	(Pharmingen, San Diego, USA)
Mouse anti-human CD31, Klon WM59, FITC-konjugiert	(Pharmingen, S. Diego, USA)
Mouse anti-human CD31, Klon JC/70A	(DAKO A/S, Glostrup, Dänemark)
Mouse anti-human CD49e, Klon IIA1	(Pharmingen, San Diego, USA)
Mouse anti-human CD90, Klon 5E10	(Pharmingen, San Diego, USA)
Mouse anti-human HLA-A, B, C; Klon G46-2.6	(Pharmingen, San Diego, USA)
Mouse IgG1	(DAKO A/S, Glostrup, Dänemark)

Griffonia simplicifolia 1 Isolectin B4, biotinyliert (Vector Lab., Burlingame, USA)

Ulex Europaeus Agglutinin I, FITC-konjugiert (Vector Lab., Burlingame, USA)

4.6 Oligonukleotide

Bis auf die extra beschriebenen Ausnahmen wurden alle für die Konstruktion der Primer benötigten Sequenzen aus der Pubmed-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) bezogen und bei MWG Biotech synthetisiert und aufgereinigt.

Housekeepinggene:

XE 12 GAPDH, sense-Primer, Pos. 540-557	GC CAA GGT CAT CCA TGA
XE 13 GAPDH, RAS-Primer, Pos. 893-876	CA GTG TAG CCC AGG ATG
# 3 β -Aktin, sense-Primer	GACGAGGCC AGAGCAAGAG
# 4 β -Aktin, RAS-Primer	ATCTCCTTCT GCATCCTGTC

Promotoren:

SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
M13 Reverse Primer	CAG GAA ACA GCT ATG AC
M13 Forward (-20) Primer	GTA AAA CGA CGG CCAG

Transferrinrezeptoren:

Tfr 5 Rezeptor, Exon 4, Sense-Primer, GGCTATTGTAAAGGGGTAGA
 Tfr 6 Rezeptor, Exon 4, RAS-Primer, GGTGCTGGTGAAGTCTGTG

Primer für Klonierungen:

XE 128 3 Stoppcodons (je frame eines), dann Sequenz CITE aus pCITE-2a(+)
 GTAGCTGACTAATTCCGGTATTTTCCAC
 XE 137 Sequenzierprimer (sense) in pCITE-2a(+), Pos.: 293-312
 CCAGTGCCACGTTGTGAGTT
 XE 151 CITE-Region aus pCITE-2a(+) liegender RAS-Primer, Pos.: 498- 478
 GGGGACGTGGTTTTCTTTG
 XE 138 Zeomycinresistenz aus pCDNA3.1/Zeo, RAS-Primer, Pos.: 2602-2581
 CTTTCATAGAAGGCGGCGGT
 XE 132 Neomycinresistenzgen, sense-Primer, aus pEGFP-C1, Pos: 3469-3489
 CCATCACGAGATTTTCGATTC
 XE 139 Neomycinresistenzgen, RAS-Primer, aus pSV KeoX1, Pos.: 1503-1480
 GAAATCTCGTGATGGCAGGTT
 XE 158 sense-Primer, pSVKeo (Pos. 1585-1606), pMW8Neo (Pos. 1572-1593)
 GATCTCATGCTGGAGTTCTTCG

Primer spezifisch für die porcine α 1,3-Galaktosyltransferase (AF221512.1):

XE 62 sense-Primer, Exon 2: -26 bis -10 CAGCTTCTGCCGATCAG
 S 16 sense-Primer, Exon 4: -9 bis 11 GAGAAAATAATGAATGTCAA
 XE 81 sense-Primer, Exon 4: 22-45 GTTCTGTCAATGCTGCTTGTCTCA
 XE 157 RAS-Primer, Intron 4 AACTCTCTGGAATGCTTTCTTACG
 XE 123 sense-Primer, Intron 4 ACTATGCCACAGCAGGAACTC
 XE 124 sense-Primer, Exon 5: 89-112 GTTCTTTGTTCTGGATATACCAG
 XE 82 RAS-Primer, Exon 5: 114-89 GACTGGTATATCCAGAACAAGAAC
 XE 30 RAS-Primer, Exon 7: 193 bis 176 TGGTAACTGGAGTCCCA
 S15 RAS-Primer, Exon 9: 1095-1115 AGTCAGATGTTATTTCTAAC
 XE 83 sense-Primer, 3'UTR: 1342-1360 GTGCCAGCAGTTTTCTGA
 XE 136 RAS-Primer, 3'UTR: 1454 bis 1333 GTRACTTACTGTGTTGGTATTTT
 XE 71 sense-Primer, 3'UTR: 2520-2548 TGCCTGACTTGATGTTCA
 XE 152 sense-Primer, 3'UTR: 2631-265 CTCTATAACGCAAGTTTATGGAATC
 XE 72 RAS-Primer, 3'UTR: 2943-2924 AATAAGATCTTGAATTTGTCC
 XE 153 RAS-Primer, 3'UTR: 3456-3432 CTTGACTTAGATCTGATCCATAC

- XE 154 RAS-Primer, 3'UTR: 3659-3636 GGCAGTTAGTTACTTCAGTGCATC
XE 155 RAS-Primer, 3'UTR: 3686-3664 GCCTTATTCTACTAGTTCTTCCC

PERV-spezifische Primer:

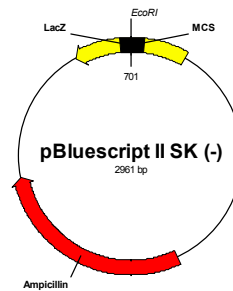
- XE 1 PERV-Protease, Sense-Primer, Pos.: 2277-2303
GCTACAACCA TTAGGAAAAC TAAAAG
- XE 2 PERV-Protease, RAS-Primer, Pos.: 2579-2603
AACCAGGACT GTATATCTTG ATCAG
- XE 119 PERV-Protease, sense-Primer, Pos.: 2234-2258
CAACCAGTTGAGTTCCTGGTGATA
- XE 120 PERV-Protease , RAS-Primer, , Pos: 2722-2699
GTACTGTCTGACTGATACTGGTGT
- XE 42 porciner mitochondrialer Sense-Primer nach W. Heneine
TCACCCATCA TAGAAGAACT CCTACA
- XE 43 porciner mitochondrialer RAS-Primer nach W. Heneine
TTTTACGGTT AAGGCTGGGT TATTAATT

Primer für den RT-Assay

- XE 9 BMV-RNA, sense-Primer, Pos.3080-3104,
GTGGTTGACACGCAGACCTCTTAC
- XE 10 BMV-RNA, RAS-Primer, Pos. 3219-3195,
TCAACTGTACGGCACCCGCATTC
- XE 11 BMV-RNA, RAS-Primer, Pos. 3247-3224
GGTCTCTTTT AGAGATTTAC AGTG
- XE 14 BMV-RNA, sense-Primer, Pos. 3104-3130
CAAGAGTGTC TAGGCGCCTT TGAGAGT

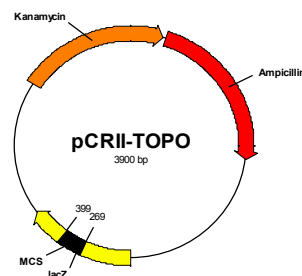
4.7 Vektoren

4.7.1 pBluescript SK(-)



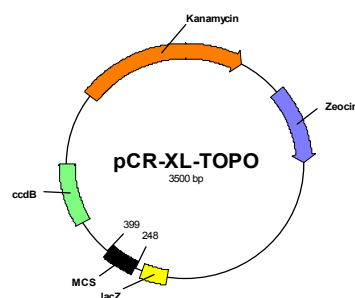
Der pBluescript II SK- (Stratagene, Heidelberg) wurde zur Subklonierung der 3'UTR aus der porcinen α -1,3 Gal GT für die Generierung von pMW8Neo verwendet.

4.7.2 pCRII-TOPO



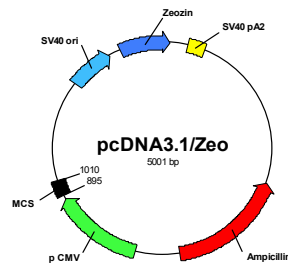
Der pCRII-TOPO war Bestandteil des TOPO TA Klonierungskits (Invitrogen, NV Leek, Niederlande) und wurde zum Klonieren von PCR-Produkten bis zu einer Größe von 3500bp verwendet.

4.7.3 pCR-XL-TOPO



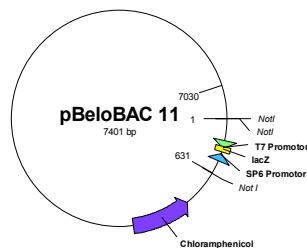
Der pCR-XL-TOPO war Bestandteil eines TOPO TA Klonierungskits (Invitrogen, NV Leek, Niederlande) und wurde zur Klonierung von PCR-Fragmenten ab einer Größe von 3500bp verwendet.

4.7.4 pcDNA3.1/Zeo



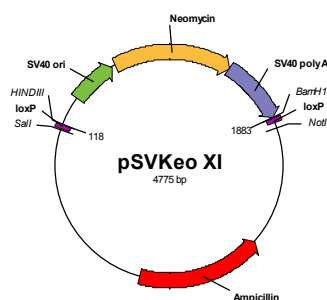
Der pcDNA3.1/Zeo (Invitrogen, NV Leek, Niederlande) diente als Quelle für das bei der Klonierung verwendete Zeozinresistenzgen in pMW8Neo.

4.7.5 pBeloBAC 11



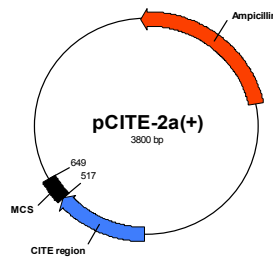
In pBeloBAC 11 (California Institute of Technology, Pasadena, USA) befinden sich die sechs, von Dr. Rogel-Gailliard zur Verfügung gestellten, verschiedenen BAC-Klone.

4.7.6 pSVKeoX1



Aus pSVKeo X1 (freundlicherweise von Dr. Frank Stewart, EMBL Heidelberg zur Verfügung gestellt) wurden die lox-sites und das Neomycinresistenzgen subkloniert.

4.7.7 pCITE-2a(+)



Aus dem pCITE-2a(+) (Novagen, Darmstadt) wurde die CITE-Region für Generierung des pMW8Neo isoliert.

Folgende Plasmide wurden zusätzlich verwendet:

pEGFP-C1	(Clontech, Palo Alto, USA)
phrGFP-1	(Stratagene, Heidelberg)
pSV- β -Galactosidase	(Promega, Madison, USA)

4.8 Bakterienkulturen

4.8.1 Bakterienstämme

E. coli DH10B (Life Technologies, Eggenstein)

Genotyp: F⁻, *mcrA* D (*mrr-hdsRMS-mcrBC*) *f80dlacZDM15* *DlacX74deoR*
recA1 endA1, *araD139*, D(*ara,leu*)7697*galU galK1-rpsL*, *nupG*

E. coli DH5 α (Life Technologies, Eggenstein)

Genotyp: F⁻, Φ 80*dlacZ* Δ M15, Δ (*lacZY-A-arg-F*)U169, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*,
(*r_K*,*m_K*⁺), *supE44*, λ ⁻, *thi-1*, *gyrA*, *relA1*.

E. coli TOP 10 (Invitrogen, Leek, Niederlande):

Genotyp: F⁻, *mcrA* Δ , (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), Φ 80*lacZ* Δ M15, Δ *lacX74* *recA1*,
deoR *araD139* Δ (*araleu*) 7697 *galU galK rpsL* (Str^R), *endA1* *nupG*

6 verschiedene BAC-Klone (in DH10B) wurden uns freundlicherweise von Herrn Rogel-Gailliard (267) zur Verfügung gestellt.

4.8.2 Nährmedien

Die LB-Medien wurden von Fa Diffco (Detroit, USA) bezogen und das SOC-Medium war Bestandteil des TOPO-TA Kits der Fa. Invitrogen (Leek, Niederlande).

LB-Medium: 10g Bacto-Trypton, 5g Bacto-Hefeextrakt, 10g NaCl
mit aq.dest ad 1l, pH 7,5, autoklavieren

LB-Agar: 10g Bacto-Trypton, 5g Bacto-Hefeextrakt, 10g NaCl
15g Bacto-Agar
mit aq.dest ad 1l, pH 7,2, autoklavieren

SOB-Medium: 20g Bacto-Trypton, 5g Bacto-Hefeextrakt, 5g NaCl
1,5g KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄
mit aq.dest ad 1l, pH 6,9, autoklavieren

SOC-Medium: SOB-Medium mit 20mM Glukose

Bei Zugabe von Antibiotika wurde folgende Konzentration eingesetzt:

Ampicillin: 80µg/ml, Stammlsg. 50mg/ml in H₂O, Aufbewahrung bei -20°C

Chloramphenicol: 50µg/ml, Stammlsg. 34mg/ml in EtOH, Aufbewahrung bei -20°C

G418: 0,2-1mg/ml, Stammlsg. 50mg/ml in PBS, Aufbewahrung bei -20°C

Kanamycin: 30µg/ml, Stammlsg. 50mg/ml in H₂O, Aufbewahrung -20°C

Tetracyclin: 12,5µg/ml, Stammlsg. 20mg/ml in EtOH, Aufbewahrung bei -20°C

4.9 Zellkulturen

4.9.1 Zelllinien

C42: Eine B-Lymphozytäre Zelllinie vom Pavian (*Papio hamadrias*)

HEK 293: Mit T-Antigen immortalisierte humane embryonale Nierenepithelzelllinie

HMC30: Eine humane Mastzelllinie

PEDNSV 1.1: Mit SV40 T-Antigen immortalisierte porcine Aortenendothelzelllinie

Diese wurde uns freundlicherweise von D. Sachs, Harvard University in Boston zur Verfügung gestellt.

PED2*3 Ein G418-resistenter Klon nach Transfektion von PEDSV.15 mit dem α-1,3 GT-Vektor pGALLAWAY; ein weiterer Klon PED2*3.51 wurde uns von Prof. Seebach im September 2002 zur Verfügung gestellt

PK-15: Eine epitheliale porcine Nierenzelllinie

4.9.2 primäre Zellen

HUVEC:	humane Endothelzellen; isoliert aus der Umbellikalvene
HVEC:	humane Endothelzellen; isoliert aus der Vena saphena
CyVec:	Endothelzellen von Cynomolgusaffen; isoliert aus Vena saphena
hFibro:	humane Fibroblasten; isoliert aus Vena saphena

4.9.3 Medien

DMEM/NUT.Mix F-12	(Life Technologies, Eggenstein)
Dulbeccos modifiziertes EAGLE Medium	(Life Technologies, Eggenstein)
EGM-2 with Endothelial Cell supplements	(Cell Systems, St.Katharinen),
Endothelial Cell Growth Medium with SupplementPack	(PromoCell, Heidelberg)
RPMI 1640 Medium	(Life Technologies, Eggenstein)
Opti-MEM 1 , serumfreies Medium	(Life Technologies, Eggenstein)

Alle verwendeten Medien wurden mit 10% FCS (Life Technologies, Eggenstein) und zur Verhinderung bakterieller Kontaminationen mit 100µg/ml Streptomycin und 100U/ml Penicillin supplementiert.

Die Zellen wurden bei 37°C in feuchter Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert.

4.10 Puffer und Lösungen

Die nachfolgenden Puffer und Lösungen wurden häufiger verwendet und werden in ihrer Zusammensetzung an den entsprechenden Stellen des Methodenteils nicht mehr beschrieben.

Extraktionspuffer:	1% SDS; 15mM EDTA pH7.5; 0.1M Tris-pH7.5
Quickie-Puffer:	40% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau
10xDNA-Beladungspuffer:	0,1M EDTA, 2% SDS, 60% Glycerin, Bromphenolblau
2xRNA-Beladungspuffer:	50% Formamid, 20% Glycerin, 2,2M Formaldehyd 10mM EDTA pH8,0, 0,2% Bromphenolblau, 50µg/ml EtBr
T/E-Puffer:	10mM Tris-HCl, pH 8,0, 1mM EDTA, pH 8,0
Glutaraldehyd-Lsg:	0,25% (v/v) Glutaraldehyd in PBS verdünnen
X-Gal-Stammlsg:	40mg/ml in Dimethylformamid
X-Gal-Lsg:	0,2% X-Gal-Stammlsg, 2mM MgCl ₂ , 5mMK ₄ Fe(CN) ₆ , 5mM K ₃ Fe(CN) ₆ in PBS

Gelelektrophorese:

25xTAE für DNA-Gele: 1M Tris-Acetat pH 8,1, 25mM EDTA pH 8,0

10xLaufpuffer für denaturierende RNA-Gel: 0,4M MOPS pH 7,0, 0,1M Natriumacetat, 0,01M EDTA pH 8,0 Verdünnung auf 1x und Zugabe von 1,8ml 37%igem Formaldehyd (Endkonz. 2,2M) je 100ml

Immunhistochemie:

Waschpuffer: 0,1M Tris, 0,15M NaCl, 2mM CaCl₂, 0,1%BSA

Färbepuffer: Waschpuffer mit 1% BSA

Southern Blot:

Fragmentierungspuffer: 0,5M HCl

Denaturierungspuffer: 0,5M NaOH, 1,5M NaCl

Neutralisierungspuffer: 0,5M Tris, 3M NaCl, pH 7,5

20xSSC: 3M NaCl, 0,3M Natriumcitrat, pH 7,0

Hybridisierungslsg: 1% Blockierungsreagenz, 0,1% N-Laurylsarcosine, 0,02% SDS in 5xSSC, pH 7,0, 1mg/10ml poly A

Maleinsäurepuffer P1: 0,1M Maleinsäure, 0,15M NaCl, pH 7,5

Detektionspuffer P3: 0,1M Tris, 0,1M NaCl, pH 9,5

Blocking Reagent: 10%ig in Maleinsäurepuffer

Blocking-Puffer: Blocking-Reagent 1:10 in Maleinsäurepuffer

5 Methoden

5.1 Tierexperimentelle Methoden

5.1.1 Tiermodell

Die medikamentöse Behandlung und die Versorgung der Tiere sowie die Transplantation und Gewebeentnahmen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Michael Winkler (Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie der medizinischen Hochschule Hannover) durchgeführt.

Als Empfängertiere wurden sechs 4.5-5 Jahre alte Cynomolgus-Affen (*Macaca fascicularis*, Javaneraffen), die zwischen 3.3-4.7 kg wogen, verwendet. Die Primaten wurden ausschließlich zu Tierversuchs-Zwecken gezüchtet und nach Quarantänisierung und infektiologischer Kontrolle auf Erkrankungen wie Hepatitis, Macaque Herpes B- (Cercopithecine Herpes Virus Typ 1), Ebola-, Marburg-, Simian T-Zell Leukämie- (STLV), Simian Retro- D (SRV) und Simian Immunodeficiency Virus (SIV) über das Deutsche Primatenzentrum Göttingen in das Tierlaboratorium der MHH überstellt.

Alle operativen Eingriffe an den Tieren und deren postoperative Betreuung wurden in Übereinstimmung mit den gültigen Tierschutzbestimmungen und nach Genehmigung der Versuche durch die Bezirksregierung Hannover (Tierversuchsantragsnummer 604-I-42502-97/971) durchgeführt.

Die Empfängertiere wurden mit einer Kombinationstherapie bestehend aus Cyclophosphamid, Cyclosporin A, geringe Dosen an Steroiden, Mycophenolsäure und C1-Inhibitor (241) immunsupprimiert.

Drei unmodifizierte bzw. huCD59 transgene Landrasse-Schweine („Large White“) wurden als Spendertiere verwendet. Die Schweine waren 8 bis 18 Wochen alt und wogen zwischen 18 und 23 kg. Die unmodifizierten Schweine erhielten wir vom Schweinezuchtverband Weser-Ems, Oldenburg aus Deutschland. Die transgenen Tiere wurden mittels Mikroinjektion eines für das humane Komplementregulatorprotein CD59 kodierenden Minigenkonstruktes gewonnen (102) und vom FAL Mariensee in Deutschland zur Verfügung gestellt.

5.1.2 Operative Technik

Jeweils drei nicht modifizierte wie auch huCD59 transgene porcine Nieren wurden in sechs Javaneraffen transplantiert. Eine sogenannte "life supporting" Situation wurde unter Ligatur der nativen Empfänger-Ureteren erstellt. (242, 243). Dieses Modell gewährleistet eine sichere Beurteilung der Transplantatfunktion. Die *vena renalis* der porcinen Spenderniere wurde durch ein Interponat, welches aus einer humanen *vena saphena* gebildet wurde, ersetzt und mit der *vena cava* des Empfängers verbunden. Nach Abstoßung des Organs oder Tod des Empfängertieres wurden die humanen Interponate explantiert, zwei Stückchen direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren, aus dem Rest die Endothelzellen isoliert (s. Absatz 5.1.4.) und auf eine potentielle PERV-Infektion hin untersucht.

5.1.3 Entnahme und Vorbereitung der Proben

Den Empfängertieren wurden einen Tag vor der Operation und dann im wöchentlichen Abstand Blutproben zur Gewinnung von Serum, Plasma und peripheren Blutleukozyten (PBLs) entnommen.

Die Javaneraffen-PBLs wurden durch Zentrifugation von EDTA-Blut bei 3400xg für 10min bei 4°C gewonnen. Das Plasma wurde abgenommen und die Erythrozyten durch hypotone Lyse mit 10fachem Volumen von 0,2%NaCl für 1 Minute und anschließendem Einstellen auf physiologische Bedingungen mit Zugabe desselben Volumens an 1,6% NaCl eliminiert. Nach dem Waschen der Zellen bei 450xg für 5min wurden 1×10^6 PBLs in 100µl 200µg/ml Proteinase K-Lsg. für 5h bei 56°C gefolgt von einer 10minütigen Inaktivierung bei 95°C lysiert.

Zum Erhalt des Serums wurde das Vollblut für 10min bei 600xg zentrifugiert.

Serum, PBLs und Plasmaproben wurden bis zum Gebrauch bei -70°C gelagert.

5.1.4 Zellisolierung aus dem Interponat

Endothelzellen der explantierten Interponate und Kontrollvenen der Empfänger und der humanen Spender wurden durch Inkubation der inneren Oberfläche der Venen mit 0,1% Kollagenase Typ A in PBS für 10 bis 30 Minuten bei 37°C aus dem Zellverband gelöst. In vorher mit 0,1%iger Gelatine (in aq.dest) beschichtete 6-Lochplatten wurden die abgelösten Zellen in Endothelzellmedium überführt. Die Zellen wurden dann über 10 Passagen gehalten und zusammen mit den Zellkulturüberständen der jeweiligen Passagen verschiedenen Tests unterzogen.

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

(244)

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient der Entfernung von störenden Proteinen aus Nukleinsäurelösungen. Bei dieser Methode wurde der Reaktionsansatz mit einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, vermischt und zur Phasentrennung 5min bei 15000xg zentrifugiert. Die Proteine werden dabei denaturiert und reichern sich in der Phenolphase, insbesondere an der Grenze zwischen Phenolphase und wässriger Phase an. Die wässrige, nukleinsäurehaltige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt, zur Entfernung von Phenolresten mit einem Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) reextrahiert und erneut zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde nochmals vorsichtig abgenommen und einer Ethanol-fällung unterzogen.

5.2.2 Präzipitation von Nukleinsäuren

(245)

Die Ethanol-fällung ist ein Verfahren zur Aufreinigung von Nukleinsäuren. Sie wurde zur Entfernung von Phenolresten nach Phenol-Chloroform-Extraktion, zum Entsalzen von Ligationsansätzen vor der Elektroporation, zum Umpuffern und zur Konzentrierung von DNA und RNA eingesetzt. Standardmäßig wurden Natriumacetat-fällungen durchgeführt:

Die sich in wässriger Lösung befindliche DNA (oder RNA) wurde mit 1/10 des Gesamt-Volumens mit Natriumacetat (3M, pH5,2) und dem 2,5fachen Volumen eiskalten 96%igen EtOH versetzt und 30min bei -80°C präzipitiert. Bei sehr kleinen Nukleinsäurefragmenten (unter 100bp) bzw. Mengen im ng-Bereich wurde als Trägersubstanz 1µl Glykogenlösung (20mg/ml) zugefügt. Anschließend wurde 30min bei 4°C und 15000xg sedimentiert, das Pellet mit demselben Volumen eiskaltem 70%igen EtOH gewaschen (15min, 4°C, 15000xg) und an der Luft getrocknet. Danach erfolgte die Aufnahme der Probe in entsprechend gewünschtem Puffer bzw. Wasser.

Alternativ dazu lassen sich Isopropanol-fällungen durchführen:

2-Propanol-fällungen werden prinzipiell wie Ethanol-fällungen, allerdings bei RT, durchgeführt. Der Vorteil ist das geringe Fällungsvolumen, da hier nur das 0,8fache Probenvolumen an 2-Propanol zugegeben wird. Der Nachteil ist das schlechtere Trocknen der Proben wegen des höheren Siedepunktes des Isopropanols.

5.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

(246)

DNA und RNA absorbieren aufgrund der Eigenschaften der enthaltenen Purin- und Pyrimidinbasen im ultravioletten Bereich zwischen 250nm und 270nm. Diese Tatsache kann für die Quantifizierung von Nukleinsäuren genutzt werden. Im Bereich eines neutralen pH-Wertes stellen sich die Extinktionskoeffizienten ϵ und Absorptionsmaxima der Basen folgendermaßen dar:

Adenin	15.158 M ⁻¹ x cm ⁻¹	(259nm)
Cytosin	7.345 M ⁻¹ x cm ⁻¹	(271nm)
Guanin	11.615 M ⁻¹ x cm ⁻¹	(253nm)
Thymin	8.500 M ⁻¹ x cm ⁻¹	(260nm)
Uracil	10.100 M ⁻¹ x cm ⁻¹	(260nm)

Die Konzentration von Nukleinsäuremolekülen kann nach folgender Formel bestimmt werden:

$$c = E_{260} \times (dx\epsilon)^{-1}$$

wobei c = Konzentration der Nukleinsäurelösung
d = Schichtdicke der Küvette (1cm)
 ϵ = Extinktionskoeffizient der Nukleinsäure

Ausgehend von einem gleichen prozentualen Anteil der betreffenden Basen in natürlichen Nukleinsäuren unter Beachtung des „Hyperchromen Effektes“ ergeben sich für eine $E_{260} = 1$ folgende Nukleinsäurekonzentrationen:

doppelsträngige DNA	50µg/ml
einzelsträngige DNA	40µg/ml
RNA	40µg/ml

Um den Grad der Verunreinigungen (Proteine/Phenol) festzustellen, wurde zusätzlich die Extinktion bei 280nm gemessen und der Quotient aus E_{260} und E_{280} gebildet. Dieser Wert sollte für saubere DNA zwischen 1,8 und 1,9 sowie für RNA zwischen 1,9 und 2,0 liegen.

5.2.4 Isolierung von genomischer DNA

5.2.4.1 Präparation genomischer DNA im großen Maßstab

Zellen bzw. unter flüssigem N₂ zerkleinertes Gewebe wurden in 10ml Extraktionslsg. mit Proteinase K in einer Endkonzentration von 100µg/ml resuspendiert. Nach einer Inkubation von 1h bei 37°C wurde zur Denaturierung der Proteine dasselbe Volumen Phenol hinzu gegeben und für 1h bei RT „über Kopf“ geschwenkt. Es erfolgte die Zugabe von 1/10 Vol 3M Natriumacetat, pH5.2 und 1Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) und weiteres Schwenken für 20min bei RT.

Die Phasen wurden durch Zentrifugation für 10min bei 600xg getrennt und mit demselben Volumen Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1) unter Schütteln für weitere 20min bei RT reextrahiert. Dieser Vorgang wurde noch 2x wiederholt.

Es erfolgte eine weitere Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1). Durch das Chloroform wird in der wässrigen Phase befindliches Phenol wieder herausextrahiert. Nach erneuter Zentrifugation und Überführen des Überstandes in ein neues Röhrchen wurde die genomische DNA mit dem doppelten Vol. 96%igem Ethanol gefällt. Die ausfallende DNA wurde dabei auf eine Glaskapillare aufgewickelt, vorsichtig in 96%igem Ethanol gewaschen, an der Luft für ca. 15min getrocknet und dann ON bei RT in 10ml TE-Puffer gelöst.

Die Lösung wurde durch 2x24h Dialyse in je 2l TE-Puffer bei 4°C entsalzt.

Es erfolgte die Konzentrationsbestimmung über Extinktionsmessung und Bestimmung der Reinheit über die Ratio $E_{260}:E_{280}$.

5.2.4.2 Präparation genomischer DNA mit Hilfe des QIAamp DNA Blood Mini Kits

Diese Methode wurde zur Überprüfung der G418-resistenten Klone der Zelllinie PEDNSV nach Transfektion mit pMW8Neo eingesetzt.

Maximal 5×10^6 Zellen wurden in 1,5ml Eppis für 5min bei 300xg zentrifugiert, die Pellets in 200µl PBS resuspendiert und mit 20µl Protease versetzt. Die Zellen wurden mit 200µl AL lysiert und bei 56°C für 10min inkubiert. Nach der Zugabe von 200µl 96% Ethanol und dem Auftrag auf die Säule erfolgte die Zentrifugation bei 6000xg für 1min. Anschließend wurde die Säule 2x mit je 500µl AW1 gewaschen und bei 20000xg für 3min zentrifugiert. Die DNA wurde mit 200µl AE eluiert und Reinheit bzw. Konzentration mittels photometrischer Messung bestimmt.

5.2.5 Präparation von Plasmiden

Die Aufreinigung von Plasmiden erfolgte über alkalische Lyse in Anlehnung an die Methode von Birnboim HC und Doly (247). Dabei wurden die plasmidhaltigen Bakterien über alkalische Lyse aufgeschlossen. Durch anschließende Fällungen, Zentrifugationsschritte, Säulenaufreinigungen oder Phenol-Chloroform-Extraktionen sowie RNase-Behandlung wurden denaturierte Proteine, RNA und ein Großteil der chromosomalen DNA entfernt, bevor die Plasmid-DNA in mehr oder weniger reiner Form vorlag.

5.2.5.1 „Quick-Check“-Methode

(248)

Die „Quick-Check“-Methode wurde aufgrund ihrer Einfachheit zur Vorabanalyse von Plasmidklonen eingesetzt. 100µl einer Bakterienkultur wurden dabei mit 50µl Phenol/Chloroform/Isoamlyalkohol (25:24:1) und 10µl Quicky-Puffer versetzt und für 30sec gevortext. Nach Zentrifugation für 3min bei 15000xg wurden 15µl des Überstandes gegen ein Kontrollplasmid auf einem 0,7%igem Agarosegel aufgetrennt. Die Plasmide zeigten sich als schwache Banden zwischen der oberen Bande der bakteriellen genomischen DNA und den unteren Banden der bakteriellen rRNA.

5.2.5.2 Plasmid-Mini-Präparation

(249)

Diese schnelle Methode der Aufreinigung liefert noch relativ stark verunreinigte Plasmid-DNA, die jedoch einen Restriktionsverdau oder die Durchführung einer PCR zur ersten Kontrolle nach einer Klonierung erlaubt.

Die Minipräparationen wurde mit den Puffern des Plasmid>Midi<Kits von Qiagen folgendermaßen durchgeführt: Es wurden jeweils 2ml LB-Medium (mit entsprechenden Antibiotika) mit dem zu untersuchenden Bakterienklon angeimpft und ON bei 37°C und 170rpm inkubiert. Anschließend wurden 1,5ml der Kultur für 5min bei 15000xg und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 275µl P1 resuspendiert und zur Lyse der Bakterien mit 275µl P2 versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5min bei RT erfolgte die Zugabe von 275µl P3 und, zur Abtrennung von Protein-SDS-Komplexen, aggregierter chromosomaler DNA und hochmolekularer RNA, die Zentrifugation von 15min bei 15000xg und 4°C. Aus dem Überstand wurde die DNA mit EtOH gefällt, das Pellet getrocknet und in jeweils 30µl 10mM Tris-HCl, pH7,5 aufgenommen.

5.2.5.3 Plasmid-Midi-Präparation

Die Isolierung größerer und sauberer Mengen Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Qiagen>plasmid<kits (Qiagen, Hilden). Die Präparation wurde laut Qiagen-Protokoll wie folgt durchgeführt:

100ml LB mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit 1ml einer Vorkultur angeimpft und bei 37°C und 180rpm im Brutschrank ON inkubiert. Die Suspension wurde für 15min bei 4°C und 6000xg zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 4ml P1 resuspendiert, zur Lyse mit 4ml P2 versetzt und 5min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte zur Neutralisierung der Lösung und zur Renaturierung der Plasmide die Zugabe von 4ml eiskaltem P3.

Nach einer Inkubation für 15min auf Eis wurde für 30min bei 4°C und 20000xg zentrifugiert. Der Plasmid-haltige Überstand wurde auf eine mit 4ml Puffer äquilibrierte Qiagen-tip 100 Säule aufgetragen, die Säule 2x mit je 10ml QC gewaschen und abschließend mit 5ml QF eluiert.

Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol und einer Zentrifugation für 30min bei 4°C und 15000xg gefällt. Das Pellet wurde mit 1ml 70%igem Alkohol gewaschen und erneut unter o.g. Bedingungen für 10min zentrifugiert. Das Pellet wurde an der Luft für ca. 30min getrocknet, in 200µl 10mM Tris-HCl, pH7,5 aufgenommen und die Konzentration sowie die Ratio ($E_{260} : E_{280}$) photometrisch bestimmt.

Bestandteile des Kits :

- P1: 50mM Tris-HCl, pH8,0; 10mM EDTA; 100µg/ml RNase A
- P2: 1% SDS; 0,2M NaOH
- P3: 3,0M Kaliumacetat pH5,5
- QBT: 750mM NaCl; 50mM MOPS pH7,0; 15% (v/v) Isopropanol
0,15% (v/v) Triton-X-100
- QC: 1M NaCl; 50mM MOPS, pH7,0; 15% (v/v) Isopropanol
- QF: 1,25M NaCl; 50mM Tris-HCl, pH8,5 ; 15% (v/v) Isopropanol

5.2.6 Präparation von BACs

5.2.6.1 BAC-Mini-Präparation

(250)

4ml einer Übernachtskultur des zu isolierenden BAC-Klons wurden für 5min bei 15000xg und RT pelletiert. Anschließend wurde das Pellet für 5min auf Eis inkubiert, in 100µl eisgekühlter Lösung I resuspendiert und die *E.coli* mit 200µl frisch angesetzter Lösung II lysiert. Es erfolgte die Zugabe von 150µl eisgekühlter 7,5M NH_4 -acetat-Lsg. und, nach 5min bei RT, 100µl ProcipitateTM. Nach einer Inkubation von 5min bei RT erfolgte eine Zentrifugation von 5min bei 15000xg und 4°C. Auf den Überstand wurden 0,7xVol kaltes Isopropanol gegeben, für 30min auf Eis inkubiert und anschließend 20min mit 1900xg bei 4°C zentrifugiert. Nach Waschen des Pellets mit 500µl 70% Ethanol wurde erneut zentrifugiert, die DNA getrocknet und in 30µl 1mM Tris-HCl, pH8,0 aufgenommen.

Lösung I: 50mM Glukose, 25mM Tris, 10mM EDTA, pH8,0
RNase A 14U/ml und RNase T1 100U/ml

Lösung II: 1% SDS, 0,2N NaOH

5.2.6.2 BAC-Midi-Präparation

Für die Gewinnung größerer und sauberer BAC-Mengen wurde der Qiagen>large-Construct<Kit mit einem etwas modifiziertem Protokoll verwendet.

500ml Bakteriensuspension in LB-Medium mit Chloramphenicol wurden bei 6000xg für 15min und 4°C sedimentiert, das Pellet in 20ml P1 resuspendiert, mit 20ml frisch angesetzter P2 lysiert und mit 20ml eisgekühlter P3 neutralisiert. Nach einer Inkubation von 10min auf Eis wurde bei 4°C für 30min bei 40000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde nach einer Filtration durch einen feuchten Faltenfilter mit dem 0,6fachen Vol Isopropanol versetzt und sofort für 30min bei 20000xg und 4°C gefällt. Die präzipitierte DNA wurde mit 70%igem EtOH bei RT gewaschen und nach kurzem Trocknen in 9,5ml Puffer EX wieder gelöst. Nach Zugabe von 200µl ATP-abhängiger Exonuklease und 300µl 0,1M ATP folgte eine Inkubation von 1h bei 37°C. Ein Qiagen-tip 500 wurde mit 10ml QS äquilibriert, die Probe auf die Säule aufgetragen, diese 2x mit je 30ml QC gewaschen und die DNA mit 15ml 65°C warmen QF eluiert. Die DNA wurde mit 10,5ml Isopropanol bei RT gefällt, und sofort bei 4°C für 30min und 20000xg zentrifugiert. Nach dem Waschen mit 5ml 70%igem Ethanol bei RT und Trocknen des Pellets bei RT für ca. 30min wurde dieses in 300µl 10mM Tris, pH8,5 aufgenommen und die Konzentration und Reinheit per Extinktionsbestimmung ermittelt.

zusätzlich vorhandene Puffer zum Plasmid>Midi<Kit:

Exonuclease Solvent:	20mM KCl; 20mM Kaliumphosphat
EX:	50mM Tris; 10mM MgCl ₂ ; pH8,5
QS:	1,5M NaCl; 0,1M MOPS; pH7,0, 15% Isopropanol

5.2.7 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind eine Klasse von bakteriellen Enzymen, die in beiden Strängen eines DNA-Moleküls innerhalb spezifischer Basensequenzen („Palindrome“) Phosphodiester-Bindungen spalten. Die biologische Funktion dieser Enzyme ist die Spaltung von fremder, in eine Bakterienzelle meist durch Virusinfektion eingedrungener, doppelsträngiger DNA.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden in Konzentrationen von 3-20U / µg der zu schneidenden DNA in den vom Hersteller jeweils empfohlenen Puffer und den entsprechenden Reaktionsbedingungen verwendet.

Auf Einhaltung definierter Pufferbedingungen wurde geachtet, da erhöhte Glycerinkonzentrationen (>5%; aus Enzymstock) sowie suboptimale Pufferbedingungen bei manchen Restriktionsendonukleasen zu unspezifischen Schnittaktivitäten („Star-Aktivität“) führen können. (251)

Die Inkubationsdauer bei den entsprechenden Temperaturen betrug je nach Fragestellung und Enzym zwischen 1-16h und wurde entweder durch Hitzeinaktivierung (20min 65°C oder 30min 85°C), Phenol-Chloroform Extraktion oder durch Zugabe von 10x DNA-Beladungspuffer beendet.

5.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten zu deren Analyse, Quantifizierung oder Aufreinigung wurde über die Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

Das Wanderungsverhalten der positiv geladenen Nukleinsäuren innerhalb eines Spannungsfeldes ist dabei von mehreren Faktoren wie dem Trennverhalten des Agarosegels, der Fragmentgröße und der Konformation (geschnittene, ungeschnittene sowie „supercoiled“ Plasmide) der Nukleinsäure abhängig. (252)

Die aufgetrennten Fragmente können durch Versetzen des Gels und des Puffers mit dem nukleinsäureinterkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (EtBr) und Bestrahlung mit UV-Licht von 254nm sichtbar gemacht werden. Eine semiquantitative Konzentrations- und Längenbestimmung erfolgte mit Hilfe kommerzieller Standards. Die verwendeten Agarosekonzentrationen richteten sich dabei nach der Größe der aufzutrennenden Nukleinsäurefragmente:

>12 – 1,5kb:	0,7 %
10 - 0,5kb:	1 %
3 - 0,2kb:	1,5 %
<0,5kb:	2%

Üblicherweise wurde ein Gelvolumen von 100ml zubereitet. Die entsprechenden Agarosemengen wurden in 1xTAE durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 60°C wurden 0,5µg/ml EtBr hinzugegeben und das Gel in eine Horizontalkammer gegossen. Als Laufpuffer diente ebenfalls 1xTAE mit EtBr (0,5µg/ml).

Die in 10xDNA-Beladungspuffer aufgenommenen Proben wurden in die Taschen pipettiert, bei ca. 5V/cm aufgetrennt und mit dem Herolab-Photosystem dokumentiert.

Verwendete Molekulargewichtsmarker:

„1kb DNA-Ladder“ (Life Technologies, Eggenstein) - Fragmentgrößen in kb:

12,216 / 11,198 / 10,180 / 9,162 / 8,144 / 7,126 / 6,108 / 5,090 / 4,072 / 3,054 /
2,036 / 1,636 / 1,018 / 0,506 / 0,396 / 0,344 / 0,298 / 0,201 / 0,154 / 0,134 /
0,075

pBS mit HpaII geschnitten (NatuTec, Frankfurt) - Fragmentgrößen in kb:

0,712 / 0,481 / 0,404 / 0,363 / 0,242 / 0,190 / 0,147 / 0,118 / 0,110 / 0,067 /
0,057 / 0,034 / 0,026

zur Quantifizierung wurde die Smart Ladder SF (Eurogentec, Heidelberg) benutzt

Fragmentgrößen in kb und Konzentration (ng/Bande bei 5µl):

1,000 (100) / 0,800 (80) / 0,700 / 0,600 (60) / 0,500 / 0,400 (40) / 0,300 / (
0,200 (20) / 0,100

RNA-Ladder (Life Technologies, Eggenstein) - Fragmentgrößen in kb:

9,49 / 7,46 / 4,4 / 2,37 / 1,35 / 0,24

5.2.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

(253)

Drei verschiedene Kits wurden je nach Größe und Beschaffenheit der aufzureinigenden DNA- bzw. PCR-Fragmente verwendet. Dabei wurde das QIAEX-Kit und die S.N.A.P.-Säulen für die Fragmente ab 10kb eingesetzt. Das Aufreinigungsprinzip beruht bei allen auf der Bindung der DNA an beschichtete Glaspartikel nach Verflüssigung der Agarose.

5.2.9.1 QIAEX-Gelextraktionskit

Die zuvor unter UV-Licht identifizierte DNA-Bande wurde aus dem Gel herausgeschnitten. Pro 100mg Gel wurden 300µl QX1 und 10µl QIAEXII zugegeben und für 10min bei 50°C inkubiert. Nach Verflüssigung der Agarose wurde die nun an QIAEXII gebundene DNA 30sec bei 10000xg und RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die DNA wurde zur Entfernung von Agaroseresten und EtBr mit 500µl QX1 gewaschen (Zentrifugation wie oben) und anschließend zur Entfernung des Natriumperchlorats aus Puffer QX1 2x mit 500µl PE gewaschen.

Die an QIAEX gebundene DNA wurde erneut zentrifugiert und das Pellet ca. 10min an der Luft getrocknet. Zur Elution der DNA wurde das Pellet mit 20µl aq.dest resuspendiert und 10min bei RT inkubiert. Danach wurde die Suspension erneut abzentrifugiert, der DNA-haltige Überstand gewonnen und mittels Agarosegelelektrophorese auf seine Reinheit und Konzentration überprüft.

5.2.9.2 *QIAquick-Gelextraktionskit*

Dieses Kit wurde zur Extraktion von DNA der Größe 70bp bis 10kb verwendet.

Nach Ausschneiden des Fragments aus dem Agarosegel wurde dieses mit dem 3fachen Vol. QG versetzt und für 10min bei 56°C inkubiert. Nach Verflüssigung der Agarose wurde 1fach Gelvolumen an Isopropanol (nur bei bis 4kb Größe des zu isolierenden Fragmentes) hinzugegeben, die Probe auf eine Säule aufgetragen und für 1min bei 8000xg zentrifugiert. Es folgte der Auftrag von 0,5ml QG und nach erneuter Zentrifugation von 750µl PE. Nach einer weiteren Zentrifugation von 10000xg für 1min wurde die DNA mit 30µl Puffer EB eluiert.

Bestandteile des Kits:

PE: 10mM Tris-HCl pH 7,5; 100mM NaCl; 70% (v/v) EtOH; 1mM EDTA

EB: 10mM Tris-HCl; pH 8,5

5.2.9.3 *Aufreinigung mit S.N.A.P.TM-Säulen*

Die Säulen sind Bestandteile des TOPO[®] XL PCR - Klonierungskits der Firma Invitrogen.

Die zu isolierende Probe wurde dabei nicht mit EtBr, sondern mit Kristallviolett versetzt. Nach Herausschneiden des Fragmentes aus dem Agarosegels unter normalem Licht wurde eine 2,5fache Menge an Natriumjodidlsg hinzugeben und für 2min bei 45°C inkubiert. Nach einer Zugabe von 1,5fach Vol. Bindungspuffer wurde die Probe auf die Säule aufgetragen und für 30sec bei 2500xg zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch 2x wiederholt. Anschließend wurde die Säule 2x mit jeweils 400µl Wasch-Lsg. gespült. Nach einer Zentrifugation von 1min bei 11000xg zum Trocknen der Säule wurde die DNA mit 40µl TE eluiert und auf dem Gel bzw. photometrisch überprüft.

Bestandteile des Kits:

6x Loading-Buffer: 20mM EDTA; 30% Glycerin; 100µg/ml Kristallviolett

Natriumjodidlsg.: 6,6M Natriumjodid; 16mM Natriumsulfit

Bindungspuffer: 7M Guanidinium-HCl

Wasch-Lsg. 0,1M NaCl, 75% EtOH

5.2.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

(254)

Die PCR ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung spezifischer Sequenzen aus einem komplexen Gemisch von Nukleinsäuren. Mit Hilfe zweier synthetischer Oligonukleotid-Primer, die die terminalen Bereiche der zu amplifizierenden Sequenz komplementär flankieren, und der thermostabilen Polymerasen wird in einer sich wiederholenden dreiteiligen Reaktion aus

1. Hitze-Denaturierung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge
2. Anlagerung (Annealing) der Oligonukleotidprimer
3. Synthese der neuen Stränge mit Polymerase (Elongation)

eine exponentielle selektive Amplifikation erreicht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit 5 verschiedenen Polymerasen gearbeitet. Daraus ergeben sich verschiedene Anwendungen und z.T. auch unterschiedliche Protokolle die im Folgenden kurz erläutert werden.

5.2.10.1 RedTaqTM Polymerase

Mit dieser Taq-Polymerase wurden die meisten Versuche wie die Analyse von klonierten Sequenzen, Amplifikationen von Fragmenten bis ca. 3kb aus genomischer DNA und sämtliche PCRs zur Untersuchung einer möglichen PERV-Infektionen durchgeführt.

Diese wurden nach folgendem Schema in 0,5ml Eppendorfgefäßen angesetzt:

- ca. 3ng Plasmid-DNA bzw. 1µg genomische DNA bzw. 3,5µl Zellysate oder
- 1µl einer bakteriellen ON-Kultur nach 10min Denaturierung bei 95°C
- 2,5µl 10xPuffer (0,1M Tris-HCl, pH 8,3; 0,5MKCl; 11mM MgCl₂,
0,1% Gelatine)
- 1µl dNTPs (je 2mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- je 1µl 10µM Primer A und B
- 1,25U Taq-Polymerase ad 25µl mit aq.dest

Es erfolgte ggf. eine Zugabe von MgCl₂ bis zu einer Konzentration von max. 4,5mM.

Das PCR-Programm (TRIO/UNO-Thermoblock):

- Vorzyklus 1min 94°C
- Hauptzyklus 45sec 94°C
- 45sec 45-65°C (je nach T_M der Primer)
- 45-120sec 72°C (nach Länge des zu generierenden Fragmentes)
- Endzyklus 5min 72°C, dann bei 4°C halten

Der Hauptzyklus wurde 30-35x wiederholt.

5.2.10.2 *MasterAmpTMTfl DNA Polymerase*

Mit dieser DNA-Polymerase wurde vor allem die Analyse der G418-resistenten Klone nach der Transfektion von PEDNSV mit pMW8Neo durchgeführt.

Diese aus dem Bakterium *Thermus flavus* isolierte Polymerase zeichnet sich durch ein höheres Temperaturoptimum (70-74°C) aus und erlaubt dadurch eine längere Denaturierungszeit und eine höhere Elongationstemperatur. Das kann vor allem bei komplexer eukaryoter DNA die PCR-Ergebnisse verbessern.

Die durchgeführten PCRs wurden in dünnwandigen 0,25µl Eppendorfgefäßen folgendermaßen angesetzt:

- 0,2-1µg genomische DNA
- 1,25µl 20xPuffer (0,4M (NH₄)₂SO₄; 1,0M Tris-HCl; pH 9,0)
- 1,5µl 25mM MgCl₂
- 5µl 10x PCR Enhancer
- 1µl dNTPs (je 2mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- je 1µl 10µM Primer A und B
- 0,5U Tfl DNA-Polymerase ad 25µl mit aq.dest

PCR-Programm (I-Cycler):

- Vorzyklus 2min 94°C
- Hauptzyklus 30sec 94°C
- 30sec 55°C bis 60°C
- 120-150sec 74°C
- Endzyklus 10min 74°C, dann bei 4°C halten

Der Hauptzyklus wurde 35x wiederholt.

5.2.10.3 *Polymerasen mit Korrekturaktivität*

Verwendet wurden die *Pwo* DNA-Polymerase der Firma Epicentre und die *Pwo* High fidelity DNA-Polymerase von Firma Qiagen.

Beide Polymerasen wurden aus dem Bakterium *Pyrococcus woesei* gewonnen, besitzen eine deutlich höhere Temperaturstabilität als die Taq-Polymerase und zusätzlich eine 3`-5` Exonuklease-Aktivität, die eine Korrektur synthetisierter Fragmente („proofreading“) erlaubt. Die daraus resultierenden Amplifikate besitzen daher auch keinen Basenüberhang sondern „glatte“ Enden. Wurde nach Amplifikation eine TA-Klonierung durchgeführt, wurden nach Beendigung der PCR 0,5U Taq-Polymerase dem PCR-Ansatz für 15min bei 72°C hinzugefügt.

Ansatz mit Pwo DNA-Polymerase (Epicentre):

2-20ng Template DNA

2,5µl 10xPuffer (0,1M Tris-HCl; 50mM (NH₄)₂SO₄; 0,25M KCl; pH8,8)

1,5µl 25mM MgSO₄

1µl dNTPs (je 2mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

je 1µl 10µM Primer A und B

1,25U Pwo Polymerase ad 25µl mit aq.dest

Das Programm ist vergleichbar mit dem der RedTaq Polymerase.

Die Pwo High fidelity DNA-Polymerase von Firma Qiagen ist erst seit September 2001 auf dem Markt und erlaubt durch die Verwendung einer rekombinanten, original aus *Pyrococcus* Stämmen isolierten, in *E.coli* klonierten DNA-Polymerase einen Hotstart (5min bei 95°C) und wurde gegen Ende dieser Arbeit ausschließlich benutzt.

Pwo High fidelity DNA-Polymerase (Qiagen):

0,2-1µg genomische DNA bzw. 5ng Plasmid-DNA

2,5µl 10xPuffer (Tris,KCl, (NH₄)₂SO₄, 15mMMgSO₄, BSA, TritonX-100 (pH8,7)

0,5µl 25mM MgSO₄

5µl Q-Solution

1µl dNTPs (je 2mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

je 1µl 10µM Primer A und B

2,5-5 U ProofStart Polymerase ad 25µl mit aq.dest

PCR-Programm (TRIO/UNO Thermoblock):

Vorzyklus „Hotstart“ 5min30sec 94°C

Hauptzyklus 60sec 94°C

60sec 50-60°C

60-90sec 72°C

Endzyklus 10min 72°C, dann bei 4°C halten

Der Hauptzyklus wurde 35x wiederholt.

5.2.10.4 Expand Long Template PCR System

Dieses System basiert auf einem Enzymgemisch aus thermostabiler *Taq* und *Pwo* DNA Polymerase und erlaubt dadurch die Amplifikation und gleichzeitige Korrektur längerer Fragmente

Verwendet wurde dieses System vor allem zur Klonierung des 6,5kb großen Intron 4 der α -1,3 GT und zur Kontrolle bzw. Kartierung größerer (ab3kb) Introns und Exons der α -1,3 GT.

Die PCRs wurden in dünnwandigen 0,25µl Eppendorfgefäßen folgendermaßen angesetzt:

0,5-2µg genomische DNA
 5µl 10x Puffer
 1,75-2,25 mM MgCl₂
 1,75-2,5µl dNTPs (je 2mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
 je 1,5µl 10µM Primer A und B
 3U Enzym Mix ad 50µl mit aq.dest

PCR-Programm (I-Cycler):

Vorzyklus 1min 94°C
 Hauptzyklus 30sec 94°C
 30sec 50-60°C
 3min 68°C
 Endzyklus 10min 68°C, dann bei 4°C halten

Der Hauptzyklus wurde 35x wiederholt.

5.2.11 Ligation

Bei einer Ligation werden die Enden zweier Nukleinsäure-Moleküle mit Hilfe einer Ligase miteinander verknüpft. DNA-Ligasen katalysieren die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen einer freien 5'-Phosphat-Gruppe und einer, im selben Strang einer doppelsträngiger DNA gegenüberliegenden, freien 3'-Hydroxyl-Gruppe.

Innerhalb der Molekularbiologie wird die DNA-Ligase verwendet um zuvor durch Restriktionsendonukleasen erzeugte kohäsive, komplementäre („sticky-ends“) oder stumpf abgeschnittene („blunt-ends“) Enden miteinander zu verknüpfen.

Wenn ein nur mit einer Restriktionsendonuklease geschnittener Vektor mit einem DNA-Fragment ligiert werden soll, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass ein großer Teil der Vektormoleküle intern religiert wird. Um diese Selbstligation zu verhindern, wurde der Vektor mittels alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) am 5'-Ende dephosphoryliert. Für eine Ligation von zwei Doppelsträngenden muss zumindest eines der beiden 5'-Enden phosphoryliert sein.

Für eine CIP-Behandlung wurden direkt im Anschluss des Restriktionsverdau CIP in einem Verhältnis von ca. 1µg DNA und 4U hinzugegeben und 1h bei 37°C inkubiert, das Enzym anschließend über Phenolisierung inaktiviert und die DNA ethanolisch präzipitiert.

Die Ligation wurde mit T4 DNA-Ligase nach folgendem Schema durchgeführt:

20-500ng (je nach Vektorgröße) CIP-behandelte Vektor-DNA

2-20fache Konzentration des Vektors an Insert-DNA

2µl 10xLigasepuffer (0,4M Tris-HCl, 0,1M MgCl₂, 0,1M DTT, 5mM ATP, pH7,8)

2µl PEG 4000

1U T4 DNA-Ligase ad 20µl mit aq.dest

Der Ligationsansatz wurde entweder für 1h bei RT oder ON bei 16°C inkubiert.

In den letzten 6 Monaten wurde ein Cycle-Ligationsprogramm im Labor eingeführt (255).

Die Durchführung einer Ligation mit diesem PCR-Programm erbrachte eine wesentliche Steigerung der Transformationsraten.

Step	Temperatur	Zeit	Zyklen
0	37°C	20min	
1	10°C	1min	
2	22°C	30sec	Verknüpfung zu Step 1, 30x wdh.
3	4°C	30sec	
4	30°C	30sec	Verknüpfung zu Step 0, 10x wdh.
5	37°C	1h	
6	65°C	15min	
7	4°C	halten	

5.2.12 TOPO TA Klonierung

Neben der „normalen“ Klonierung über Restriktionsschnittstellen wurden die TOPO™ TA Klonierungskits (Vektor pCRII für Fragmente bis 3kb, Vektor pCRXL für größere Fragmente) der Fa. Invitrogen verwendet.

5.2.12.1 Eigenschaften

Wichtige Eigenschaften der verwendeten Vektoren sind:

1) Überhängende Thymidine ermöglichen „TA-Kloning“

Die Vektoren sind linearisiert und besitzen an beiden 3'-Enden ein einzelnes überstehendes Thymidin. Da fast jede Taq-Polymerase eine unabhängige terminale Transferaseaktivität besitzt und an das 3'-Ende eines entstandenen PCR-Fragments ein einzelnes überstehendes Adenosin hängt, wird über die komplementären Enden von Vektor und PCR-Fragment eine Klonierung möglich.

2) Topoisomerase I ist kovalent im Bereich der Klonierungsstelle an Vektor gebunden

Die Topoisomerasen werden für die DNA-Replikation benötigt. Man kann sie als „reversible Nukleasen“ ansehen, die kovalent an eine Phosphatgruppe in der DNA binden und auf diese Weise eine Phosphodiesterbindung in der DNA-Kette spalten.

Diese Spaltung ist reversibel, weil die Energie der aufgeschnittenen Phosphodiesterbindung in der kovalenten Bindung zwischen Topoisomerase und DNA gespeichert bleibt. Daher kann der DNA-Strang schnell und ohne zusätzliche Energiezufuhr wieder geschlossen werden.

Dieses wird bei dem Verfahren der TOPO Klonierung genutzt und macht daher den Einsatz von Ligase überflüssig.

3) Ein *lacZ*-Gen erlaubt „Blau-Weiß-Screening“

Das in *E.coli* vom *lacZ*-Gen des *lac*-Operons kodierte Enzym β -Galactosidase spielt in der Gentechnologie eine wichtige Rolle.

X-Gal bildet nach Hydrolyse durch β -Galaktosidase einen schwer löslichen blauen Indigofarbstoff. Wird die für das α -Peptid kodierende DNA-Region des Klonierungsvektors durch den Einbau von Fremd-DNA unterbrochen, geht in der Regel die Fähigkeit zur Komplementation, und damit zur Bildung von enzymatisch aktiver β -Galaktosidase, verloren. Bakterienkolonien mit einem solchen Plasmid wachsen daher in ihrer ursprünglichen Farbe („weiß“). Wird keine DNA aufgenommen, wird das Gen für die β -Galaktosidase ordnungsgemäß abgelesen und die Bakterienkolonien werden blau gefärbt.

5.2.12.2 *Durchführung*

Die „Ligationsreaktion“ wurde folgendermaßen pipettiert: 2-4 μ l der aufgereinigten PCR-Produkte wurden mit aq.dest auf 5 μ l aufgefüllt, 1 μ l des entsprechenden Vektors gemischt und für 5-30min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde in der Regel mit 2 μ l des Ansatzes eine Elektroporation durchgeführt.

5.2.13 Transformation von Bakterien mit Plasmiden

Um Vektorkonstrukte zu amplifizieren, wurden verschiedene (zum jeweiligen Vektor passende) Bakterienstämme mittels chemischer Transformation mit CaCl_2 oder Elektroporation transformiert. Die Elektroporation hat gegenüber der CaCl_2 -Methode den Vorteil einer höheren Transformationseffizienz, die chemische Transformation hingegen ist weniger aufwendig in der Durchführung.

Für beide Methoden muss die Kompetenz der *E.coli* erst durch eine besondere Behandlung, die die Integrität der Zellwand beeinflusst, induziert werden.

5.2.13.1 chemische Transformation

Herstellung von kompetenten Bakterien:

100ml LB-Medium wurden mit ca. 1ml einer ON-Kultur des jeweiligen Bakterienstammes angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,5-0,6 inkubiert. Die Bakterien wurden bei 5000xg für 10min bei 4°C abzentrifugiert und in 50ml eiskalter 100mM MgCl₂-Lsg resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation von 3500xg für 20min bei 4°C wurde das Pellet in 50mM CaCl₂ aufgenommen, nochmals zentrifugiert, in 5ml 50mM CaCl₂ resuspendiert und für 20min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 500µl Glycerin wurden die Bakterien a´ 200µl aliquotiert, sofort in flüssigen N₂ überführt und bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit ca. 25ng Plasmid-DNA gemischt und 30min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 42°C für 30sec wurde der Transformationsansatz für 10min auf Eis gestellt, 250µl SOC hinzugegeben und für 45min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Ausplattiert wurden jeweils 50µl und 200µl auf LB-Platten mit geeignetem Antibiotikum.

5.2.13.2 Elektroporation

(256)

Herstellung von kompetenten Bakterien:

200ml LB-Medium wurden mit ca. 3ml einer O/N-Kultur des jeweiligen Bakterienstammes angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,6-0,7 inkubiert. Die Bakterien wurden nach einer einstündigen Inkubation auf Eis bei 5000xg und 4°C für 10min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200ml eiskalter 10%iger Glycerinlösung resuspendiert, für 20min bei 3500xg zentrifugiert und der Vorgang nochmals wiederholt. Nach Aufnahme des Pellet in 500µl 10%iger Glycerinlösung wurden die Bakterien a´ 50µl aliquotiert, sofort in flüssigen N₂ überführt und dann bei -80°C gelagert.

Für die Elektroporation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit der vorbereiteten DNA (2µl des gefällten Ligationsansatzes oder 5-10ng Plasmid-DNA) vermischt und 2min auf Eis inkubiert. Nach Überführung in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette erfolgte die Elektroporation im GenePulserII unter folgenden Bedingungen: Widerstand R=400Ω, Kondensatorkapazität C=25µF und Ausgangs-

spannung $U=2,5\text{kV/cm}$. Die elektroporierten Zellen wurden sofort in $250\mu\text{l}$ SOC-Medium überführt und bei 37°C und 200rpm für 45min inkubiert, bevor sie auf LB-Agar mit den geeigneten Antibiotikum, bzw. auch X-Gal ($40\mu\text{l}$ von 40mg/ml), ausplattiert wurden.

5.2.14 RNA-Arbeiten

5.2.14.1 *Präparation von Gesamt-RNA*

(257)

Die Präparation von Gesamt-RNA erfolgte unter Verwendung von Trizol-Reagenz nach Herstellerprotokoll.

Das Medium wurde aus der mit Zellen konfluent bewachsenen Zellkulturflasche abgenommen, mit 4ml Trizol versetzt und zur vollständigen Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe 5min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von $0,4\text{ml}$ BCP (1-Brom-3-chlorpropan) und 2minütiger Inkubation bei RT erfolgte zur Phasentrennung eine Zentrifugation für 15min bei 12000xg und 4°C . Die obere RNA-haltige, wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 2ml Isopropanol für $5\text{--}10\text{min}$ bei RT gefällt und für 8min bei 12000xg und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1ml 70% igem EtOH gewaschen, an der Luft für ca. 15min getrocknet und in $50\mu\text{l}$ DEPC- H_2O aufgenommen. Die Konzentration, Reinheit und evtl. Degradationen wurden über Extinktionsmessung bei 260nm und 280nm auf einem denaturierenden Gel kontrolliert.

5.2.14.2 *Aufreinigung viraler RNA aus Plasma*

Diese Methode wurde von Rosemarie Burian im Rahmen ihrer medizinischen Promotion durchgeführt und wird aus diesem Grunde nur kurz erläutert.

Zur Aufreinigung wurde der QIAamp Viral RNA Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerprotokoll.

$140\mu\text{l}$ Plasma wurden mit $560\mu\text{l}$ AVL-Puffer lysiert, 10min bei RT inkubiert, mit $560\mu\text{l}$ EtOH ($96\% \text{ v/v}$) versetzt und $630\mu\text{l}$ des Ansatzes je Säule aufgetragen. Nach einer Zentrifugation von 1min bei 10000xg und RT wurde mit $350\mu\text{l}$ AW1 gewaschen und ein DNase-Verdau mit $10\mu\text{l}$ DNase Stock und $50\mu\text{l}$ RDD-Puffer angesetzt und für 15min bei RT inkubiert. Die Säule wurde zuerst mit $350\mu\text{l}$ AW1 und anschließend mit $500\mu\text{l}$ AW2 Puffer gewaschen und schließlich mit $60\mu\text{l}$ Elutionspuffer bei 80°C eluiert.

5.2.14.3 Elektrophorese von RNA in denaturierenden Agarosegelen

Für 100ml eines 1%igen Gels wurden 1,0g Agarose in 88ml DEPC-H₂O in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlung auf ca. 60°C erfolgten die Zugabe von 10ml 10xLaufpuffer und 1,8ml 37%igem Formaldehyd und das Gel wurde gegossen.

Die RNA-Proben wurden 1:1 mit Beladungspuffer gemischt, 10min auf 65°C erhitzt, anschließend auf Eis gestellt und zusammen mit einer RNA-Ladder (ca. 3µg) auf das Gel aufgetragen. Für die Elektrophorese wurde eine Spannung von 3-4 V/cm Gellänge angelegt. Nach ca. 1h Elektrophorese wurde das Gel auf dem UV-Tisch dokumentiert.

5.2.14.4 Reverse Transkription von Gesamt-RNA

Um eventuelle Probleme durch kontaminierende genomische DNA zu vermeiden, wurde die RNA anschließend für 15min bei 37°C mit DNase behandelt:

11µg Gesamt-RNA (bestimmt nach Extinktionsmessung)

1,5µl 1M Tris-HCl, pH7,5

40U RNAsinI

0,6µl 0,5M MgCl₂ I

0,6µl 0,05M DTT

10U RNase-freie DNase ad 30µl mit DEPC-H₂O

Um die DNase anschließend zu inaktivieren, wurde eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)-Extraktion und eine Reextraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) mit denselben Volumina vorgenommen. Nach einer Alkohol-fällung und anschließender Wäsche wurde das Pellet ca. 15min an der Luft getrocknet und in 10µl DEPC-H₂O aufgenommen.

Zum Annealing des Primers wurden 2µg DNase-behandelte Gesamt-RNA mit Random Hexamer Primer (200ng/ml,) versetzt, mit DEPC-H₂O auf 7µl aufgefüllt und für 10min bei 70°C zur Auftrennung der Sekundärstrukturen der RNA inkubiert.

Anschließend wurde folgendes hinzu pipettiert:

5µl 5xFirst Strand Buffer

1,25µl 10mM dNTP-Mix

40U RNasin

200U MMLV-RT ad 20µl mit DEPC-H₂O

Nach einer 60minütigen Inkubation bei 37°C wurde die reverse Transkriptase für 10min bei 95°C inaktiviert. Jeweils 1µl wurden anschließend für die PCRs eingesetzt.

5.2.14.5 Reverse Transkription viraler RNA aus Plasma

Da es sich bei der mit dem „QIAamp Viral Mini Kit“ aufgereinigten RNA aus dem Überstand um äußerst geringe Mengen handelt, wurde die cDNA-Synthese mit der AMV-RT durchgeführt.

5µl Gesamt-RNA wurden mit 2µl Random Hexamer Primer (200ng/ml,) versetzt und für 10min bei 70°C zur Auftrennung der Sekundärstrukturen der RNA inkubiert.

Anschließend wurde folgendes hinzu pipettiert:

4µl 5xFirst Strand Buffer	
2µl 10mM dNTP	
2µl 0,1M DTT (10mM)	
20U RNasin	
1U AMV-RT	ad 20µl mit aq.dest

Der Ansatz wurde für 1h bei 42°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte anschließend bei 95°C für 5min. Jeweils 0,5µl der cDNA wurden für die sich anschließende PCR eingesetzt.

5.3 Zell- und immunbiologische Methoden

5.3.1 Transfektion

Die Transfektion ist die Einschleusung von DNA in eukaryote Zellen. Wird diese nicht ins Empfänger-genom eingebaut oder kann sich extrachromosomal nicht vermehren und gehen die eingeschleusten Gene im Laufe weiterer Zellteilungen wieder verloren, spricht man von transienter Transfektion. Bei der stabilen Transfektion hingegen integrieren sich die eingebrachten Fremdgene in das Genom der Wirtszelle.

Es gibt eine Vielzahl von verschiedenen Transfektionsmethoden, die sich nach dem Mechanismus der DNA-Aufnahme in die Zelle einteilen lässt:

- durch mechanische Kräfte (Mikroinjektion, Beschuss)
- durch Diffusion nach Zerstörung der Integrität der Zellmembran (Elektroporation)
- durch virale Aufnahmemechanismen (Virensystem)
- durch Fusion mit Wirtszelle (Lipofektion, Liposomenfusion, Protoplastenfusion)
- durch unspezifische Endo- bzw. Phagozytose (DEAE-Dextran, CaPO₄,)
- durch Rezeptor-gekoppelte Endozytose (Transferrin, RGD-Proteine)

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Transferrinfektionen (258, 259) durchgeführt.

Am Tage zuvor wurden $1-3 \times 10^5$ Zellen/Loch in 6-Loch-Mikrotiterplatten ausgesät, am folgenden Tag 2x mit PBS gewaschen und für 2h mit 800µl Opti-MEM äquilibriert. Währenddessen wurden 1-1,5µg DNA, 30µg bovines Holo-Transferrin und 3µl Lipofectin bzw. 5µl Lipofectamin in 200µl Opti-MEM gemischt und für 30min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der 2h wurde der Transfektionsansatz in die entsprechenden Löcher hinzugegeben, für 4-5h im Brutschrank bei 37°C belassen und anschließend durch 2ml entsprechendem Zellkulturmedium ersetzt. Eine Beurteilung der Transferrinfektion war in der Regel nach 2 Tagen möglich.

5.3.2 Pseudotypisierungsversuch mit β -Galaktosidase

(179, 240)

Zur Fragestellung ob Zellen spezifische PERV-Rezeptoren tragen, wurden Versuche mit PERV *env* A und B Hüllprotein tragenden LacZ pseudotypisierten Viren, die uns freundlicherweise von Dr.Y. Takeuchi (Institute for Cancer Research, London) zur Verfügung gestellt wurden, durchgeführt.

Virushaltiger Überstand wurde auf die Zielzellen gegeben, für 6h bei 37°C inkubiert und für zwei weitere Tage mit entsprechendem Kulturmedium belassen. Nach Ablauf der Zeit erfolgte der β -Galaktosidase-Assay.

Zellen, die durch pseudotypisierte Viren infiziert worden waren, exprimierten β -Galaktosidase und konnten durch Umsetzung des Substrates X-Gal blau gefärbt werden.

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit 0,25%igem Glutaraldehyd für 15min bei RT fixiert und nach weiterem Waschen mit PBS für mindestens 2h mit X-Gal-Lsg versetzt.

Der Assay wurde auch zum Optimieren der Transferrinfektionen verwendet.

5.3.3 Durchflußzytometrische Untersuchungen

Durchflußzytometrische Analysen wurden vor allem zur Charakterisierung der isolierten Endothelzellen aus den PERV *in vivo* Infektionsstudien verwendet.

Nach dem Ablösen der Zellen mit Trypsin/EDTA wurden diese für 7min bei 1500rpm (Heraeus Sepatech, Biofuge RF) und 4°C abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und mit PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) auf die Zellzahl von $2 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt. Je 50µl Zellsuspension wurden in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit 50µl Antikörperverdünnung (CD31, Klon WM-59-1:30 in PBS; CD31, Klon JC/70A-1:60 in PBS; CD49e-1:30 in PBS; CD90-1:60 in PBS; anti human HLA-A,B,C-1:30 in PBS) bzw. Lektinverdünnung (IB4, biotinyliert-20µg/ml in PBS) gemischt und für 1h bei 4°C

inkubiert. Nach Zentrifugation im Plattenrotor für 2min bei 2000rpm und 4°C wurden die Zellen dreimal mit 150µl kaltem PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen.

Die Zellsedimente wurden dann in 50µl der

1. Detektionsantikörper (Goat anti-mouse IgG, FITC-konjugiert-1:10 in PBS) bzw.
2. Nachweissubstanz für Biotin (Streptavidin-Phycoerythrin-20µg/ml in PBS) bzw.
3. direkt markierten Antikörper (CD31-FITC, KlonWM59-FITC 1:15 in PBS) bzw.
4. des direkt markierten Lektins (UEA-FITC-1:50 in PBS)

aufgenommen und für 30min lichtgeschützt bei 4°C inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit 150µl PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) wurden die Zellen in 300µl PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) aufgenommen, im Durchflußzytometer FACScan™ (Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert und mit Hilfe der CELLQuest™-Software (Becton Dickinson, Heidelberg) oder WinMDI-Software ausgewertet.

5.3.4 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Untersuchungen zur Charakterisierung der explantierten Interponate wurden von Rosemarie Burian im Rahmen ihrer medizinischen Promotion durchgeführt.

Die gefrorenen Venenstückchen oder Cytospots (ca. 2×10^5 Zellen auf einen Objektträger mit 200rpm zentrifugiert) wurden in TissueTek Medium eingedeckt, mit dem Kryostaten geschnitten und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert. Die Schnitte wurden für 8min in Aceton/Methanol (Verhältnis 1:1) bei -20°C fixiert, in Waschpuffer gespült und zur Blockierung der endogenen Peroxidasen mit 0,3%iger H_2O_2 -Lsg für 20min bei RT behandelt. Nach erneutem Spülen folgte zur Blockierung unspezifischer Bindungen eine Inkubation mit Pferde-Normalserum (1:10 in Waschpuffer) für 15min. Die Primärantikörper (CD31, Klone WM59 und JC70/A - 1:150 in Färbepuffer) wurden für 1h aufgetragen und nach 3xmaligem Spülen in Waschpuffer folgte die Markierung mit biotinyliertem Sekundärantikörper (horse anti-mouse IgG - 1:100 in Färbepuffer) bzw. der Auftrag von UEA-FITC (1:20 in Färbepuffer) oder IB4 biotinyliert (1:200 in Färbepuffer) für 30min in einer feuchten Kammer bei RT. Nach Entwicklung mit Streptavidin-Peroxidase (30min bei RT) und Diaminobenzidin (7min bei RT) und Gegenfärben mit Härris-Hämatoxylin wurden die Proben in Eukitt eingebettet und mikroskopiert.

5.3.5 Bestimmung retroviraler Aktivität mit dem RT-Assay

Reverse Transkriptasen sind Bestandteile aller Retroviren. Die Bestimmung der RT-Aktivität stellt eine Möglichkeit dar, eine Freisetzung von Retroviren nachzuweisen (167). Viren werden mit dem Detergenz NP40 aufgeschlossen, die reverse Transkriptase wird freigesetzt und kann im darauf folgenden Test eine zugefügte BMV-RNA transkribieren. Die entstehende cDNA wird dann mit Hilfe einer BMV-spezifischen PCR nachgewiesen.

Die meisten dieser Untersuchungen wurden von Rosemarie Burian durchgeführt.

5ml eines mindestens 5 Tage alten Zellkulturüberstandes wurden bei 25000xg für 45min und 4°C ohne Bremse zentrifugiert. Die pelletierten Viren wurden in 35µl 1%igem NP40 aufgeschlossen und einer cDNA-Synthese unterzogen:

8,82µl DEPC-H₂O

5µl 5xAMV-Puffer

0,57µl 0,1M DTT

0,42µl 10mM dNTPs (je 2mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

0,25µl RNasin (40U/µl)

4,5µl Primer 0,1µM XE11

0,44µl BMV-RNA (0,4µg)

Pro Ansatz wurden 5µl der entsprechenden NP40-Lysate verwendet. Nach einer einstündigen Inkubation bei 42°C und 5minütiger Denaturierung bei 95°C wurde mit 2U DNase-freier RNase ein Verdau für 30min bei 37°C durchgeführt. Im Anschluss an die cDNA-Synthese folgte der PCR-Schritt zur Amplifikation der BMV-spezifischen cDNA. Dazu wurden dem Ansatz folgende Komponenten hinzugefügt:

11,18µl aq.dest

0,32µl 0,3M KCl

1µl 10mM dNTPs (je 2mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

5µl 10µM Primer XE9 und XE10

2,5µl RedTaq™-Polymerase

Anschließend wurden die Proben auf einem 2%igen Agarosegel analysiert und zur Spezifitätskontrolle einem Southern Blot unterzogen.

5.3.6 Southern-Transfer

Beim Southern-Transfer wird DNA nach elektrophoretischer Auftrennung aus der Gelmatrix auf eine Nylonmembran übertragen und immobilisiert.

In dieser Arbeit diente der Southern Blot als zusätzliche Spezifitätskontrolle zum Nachweis reverser Transkriptasen.

Da der Southern-Transfer als Fortsetzung des RT-Assays im Rahmen der Dissertation von Rosemarie Burian durchgeführt wurde, wird er nur kurz beschrieben. Nach der Gelelektrophorese wurden die PCR-Fragmente des 2%igen Agarosegels durch Diffusionsblotting in 10xSSC für ca. 16-24h bei RT über Kapillarkräfte auf eine Nylonmembran übertragen. Anschließend wurde nach Denaturieren, Neutralisieren und Nachpuffern die Membran 2x mit UV-Licht von $0,06\text{J}/\text{cm}^2$ kreuzvernetzt und somit die sich darauf befindenden Fragmente immobilisiert. Die Membran wurde in eine Hybridisierungsröhre überführt und bei 50°C für 30min mit 10ml Hybridisierungslsg. prähybridisiert. Anschließend wurde die DIG-markierte Sonde ($0,1\mu\text{M}$ XE14) zugegeben und für 18-24h bei 50°C hybridisiert. Nach einer Posthybridisierung für 30min bei 62°C in 2xSSC wurde für 30min in Puffer 2 (Blocking Reagenz 1:10 in Maleinsäure-Puffer) abgesättigt.

Es folgte eine Inkubation von 30min bei RT mit einem anti-DIG-alkalischen Phosphatase-Antikörpers (1:10000 in Puffer 2). Nach zweimaligem Waschen mit DIG-Waschpuffer (Maleinsäurepuffer + 0,3% Tween) wurde die Membran für 2min in Detektionspuffer äquilibriert und anschließend für 5min in einer Plastiktüte mit 7ml CDP-Star geknetet. Nach Abnahme des CDP-Stars und weiteren 10min im Brutschrank wurde ein Röntgenfilm für ca. 10-45 min mit der Membran belichtet.

6 Ergebnisse

6.1 Knock out der porcinen α -1,3 Galaktosyltransferase

6.1.1 Zur Klonierung und Charakterisierung verwendete Primer der porcinen α -1,3 Galaktosyltransferase

Im Verlauf der Promotionszeit wurde eine Vielzahl von Primern, spezifisch für die porcine α -1,3 Gal GT, konstruiert. Die meisten sind in folgender Grafik dargestellt:

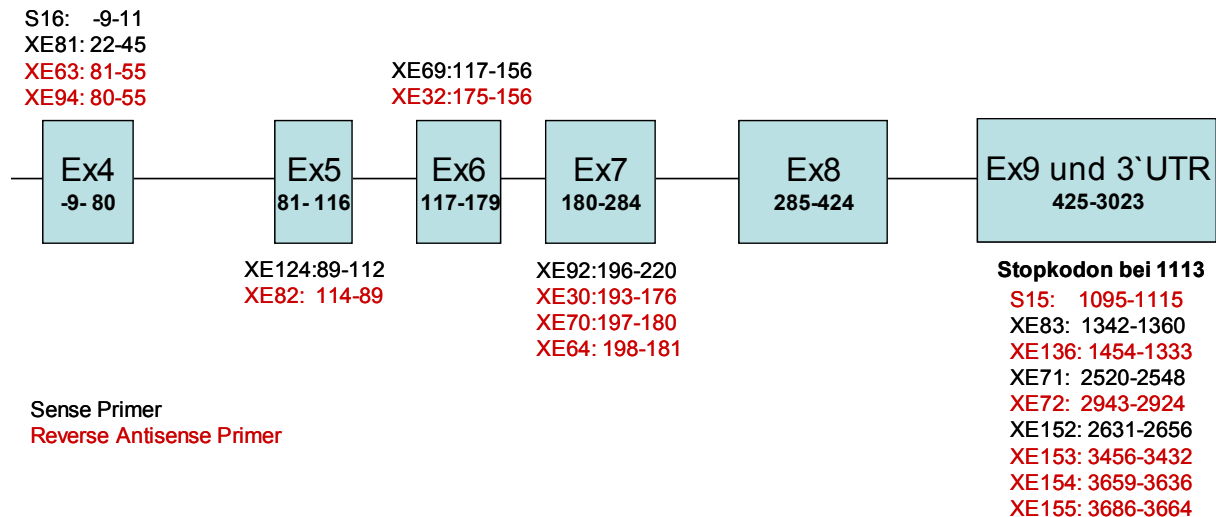


Abbildung 8: Darstellung der für die porcine α -1,3 Gal GT kodierenden Bereiche mit Primern

6.1.2 Konzept zur Generierung eines α -1,3 Gal GT knock out Vektors

Zwei „Promotortrap“-Vektoren (s.Kap. 3.2.1), welche sich lediglich bezüglich der eingesetzten Antibiotikaresistenz unterscheiden, sollten zur Inaktivierung des α -1,3 Gal GT Gens hergestellt werden. Dabei sollen durch homologe Rekombination die Exons5-9 (bis 3'UTR), und damit alle katalytischen Bereiche, eliminiert werden.

Folgende Elemente sollten im Vektor enthalten sein:

- 1) Zwei homologe Bereiche des porcinen α -1,3 Gal GT Gens. Zum einen das Intron4 mit 6500bp und zum anderen die 3'UTR mit 1600bp des Exon9
- 2) LoxP-Sequenzen auf beiden Seiten der Antibiotikakassette
 Das Cre-lox-Rekombinationssystem (260-263) stammt ursprünglich aus dem Bakteriophagen P1. Die Expression des Enzyms Cre-Rekombinase in der Zelle bewirkt eine Excision von zwischen zwei loxP Sequenzen befindlichen Genbereichen. Die Einführung der loxP-Bereiche soll in dem zu generierenden Vektor eine Option zur Eliminierung der Antibiotikaresistenz ermöglichen.
- 3) IRES-Sequenz (264-266) mit drei, jeweils unterschiedlichen Leserahmen entsprechenden, vorgeschalteten Stopkodons. Durch diese Stopkodons wird

die Translation der zu inaktivierenden α -1,3 Gal GT, oder eines anderen Transkripts, gestoppt. IRES sind interne Ribosomenbindungsstellen („*internal ribosome entry sites*“) und ermöglichen eine von der 5'-Cap-Struktur und dem Cap-Bindungskomplex unabhängige Translation eukaryotischer mRNA. Diese Sequenzen wurden bisher im Genom der Picornaviren und des Hepatitis-C-Virus identifiziert. Die Translation der Virus-RNA geht von diesen Stellen aus. Die IRES-Sequenz erlaubt die Translation zweier offener Leserahmen von einer mRNA aus und dient, da sich kein Promotor in dem zu generierenden Vektor befindet, der Translation der eingefügten Antibiotikaresistenz.

- 4) Gene für bakterielle Phosphotransferasen, die eine Antibiotikaresistenz (Neomycin bzw. Zeozin) vermitteln

6.1.2.1 Charakterisierung von BAC-Klonen für die anschließende Klonierung α -1,3 Gal GT-homologer Sequenzen

Aus der von Rogel-Gaillard (267) vorgestellten porcinen genomischen „Bacterial Artificial Chromosome“ (BAC)-Bibliothek wurden uns sechs verschiedene Klone zur Verfügung gestellt. Diese Klone wurden vorab mit zwei spezifischen Primerpaaren (Exon4 und Exon9) getestet und enthalten entsprechende Genbereiche der porcinen α -1,3 Gal GT. Aus den BACs sollten die für den Gal knock out Vektor benötigten beiden homologen Bereiche gewonnen werden.

Ein Problem zu Beginn war die Aufreinigung der BACs aus den Bakterienkulturen. Die BAC-Klone mit einer Größe von ca. 200kb waren nur schwer von der genomischen Bakterien-DNA zu trennen. Bei der herkömmlichen Aufreinigung nach Birnboin ging der Großteil der BACs nach der Ausfällung mit Kaliumacetat verloren. Es bedurfte einiger Versuche unter Anwendung und Austestung unterschiedlicher Protokolle, bis sich die BACs in ausreichender Qualität darstellen ließen und vor allem auch eine Amplifikation größerer Fragmente in der Long Distance-PCR (LD-PCR) zufrieden stellende Ergebnisse erbrachte.

Mit der aufgereinigten BAC-DNA wurden PCRs zur Kontrolle auf Vollständigkeit des α -1,3 Gal GT Gens durchgeführt. Diese sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Klon	Exon 4 (S16 / XE63)	Exon 6/7 (XE69 / 70)	Exon 9 (XE83 / 72)
181 E9	∅	+	+
339 C11	+	+	+
544 G1	+	+	+
651 H6	+	+	+
754 D6	+	+	+
836 A5	+	+	∅

Tabelle 2: Charakterisierung der BAC-Klone in der PCR aus Vollständigkeit des Gens α -1,3 Gal GT

Die vier BAC-Klone 339, 544, 651 und 754 zeigten sich als geeignet zur Amplifikation der gewünschten homologen Bereiche.

6.1.2.2 Klonierung der homologen Bereiche der α -1,3 Gal GT

Als homologe Bereiche zur Generierung des knock out Vektors wurden zum einen das Intron 4 mit ca. 6500bp und zum anderen die 3'UTR mit 1600bp aus dem Gen der porcinen α -1,3 Gal GT ausgewählt.

Die 3'UTR wurde aus dem BAC651 nach PCR mit den Primern XE83 und XE72 mit Pwo-Polymerase, anschließendem A-Tailing mit RedTaq-Polymerase und TOPO TA Klonierung in den Vektor pCRII gewonnen.

Für das Intron 4, ebenfalls aus BAC 651, wurde eine LD-PCR mit dem Expand Long Template System und den Primern XE81 und XE82 durchgeführt. Nach Auftrag auf einem Agarosegel folgte die Aufreinigung und Klonierung mit den im TOPO TA XL Klonierungskit enthaltenen S.N.A.P.-Säulen in pCRXL.

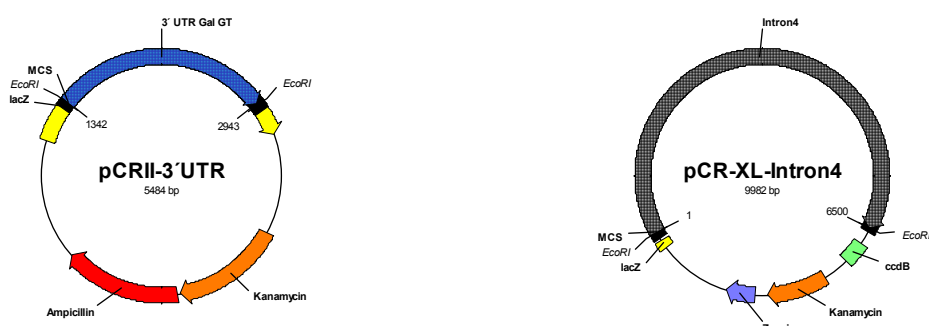


Abbildung 9: Darstellung der beiden Vektoren mit den homologen Bereiche der porcinen α -1,3 Gal GT

Mit beiden Klonen wurde eine Restriktionskartierung durchgeführt. Da der entsprechende Bereich der 3'UTR bereits publiziert ist, war ein Vergleich gut möglich. Die klonierte Sequenz der 3'-UTR erwies sich in den untersuchten Bereichen als korrekt. Im Falle des Intron 4, welches bisher nicht publiziert ist, ergab sich folgende recht grobe Kartierung:

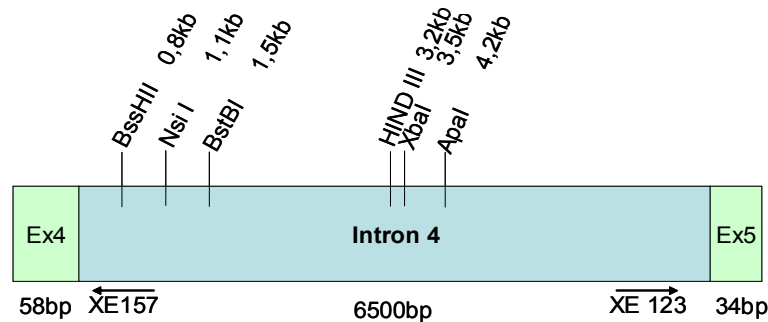


Abbildung 10: Restriktionskartierung des in pCRXL klonierten Intron 4
Schnittstellen von ApaI, MluI, NotI, SacI, SacII, SalI, StuI und XhoI waren nicht detektierbar. XE157/XE123 stellen Primer dar, die nach Sequenzierung der 3' und 5'-Enden generiert wurden

6.1.2.3 Subklonierung des Zeozinresistenzgens in pSVKeoXI

Da beide Allele der porcinen Endothelzelllinie PEDNSV eliminiert werden sollten, war es geplant, zwei KO-Vektoren mit zwei verschiedenen Antibiotikaresistenzgenen zu verwenden. Beide Resistenzgene sollten in dem endgültigen Konstrukt von loxP-sites flankiert werden. Als Basis für die Selektionskassette wurde der Vektor pSVKeoXI verwendet. Dieser enthält neben einer Neomycinresistenz unter Kontrolle des SV40 Promotors zwei loxP-sites. Für die Herstellung einer Zeozinkassette wurde die Neomycinresistenz in pSVKeoXI entfernt. Das Zeozinresistenzgen wurde anschließend aus dem Vektor pcDNA3.1/Zeo über einen BpmI/StuI-Partialverdau in pSVKeoXI kloniert. Die korrekte Position des Zeozingens im Vektor pSVKeo Zeozin wurde mit einer Sequenzierung des entsprechenden Bereiches überprüft.

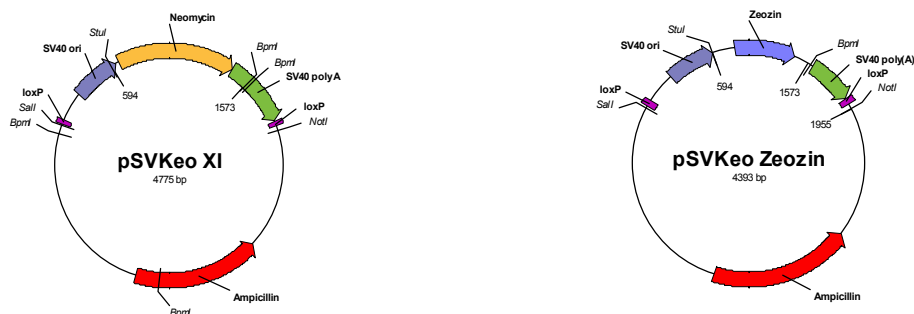


Abbildung 11: Darstellung der beiden Ausgangsvektoren zur weiteren Subklonierung der erforderlichen Antibiotikaresistenzgene

6.1.2.4 Generierung des Vektors pCRXL mit beiden homologen Bereichen

Für weitere Klonierungsschritte wurde ein Vektor, in dem sich beide homologen Bereiche des α -1,3 Gal GT Gens befinden, generiert. Die 3'UTR wurde mit EcoRI aus dem Vektor pCRII herausgeschnitten und in den mit EcoRI linearisierten Vektor pBluescript SK(-) subkloniert. Über einen Restriktionsverdau mit NotI und XhoI wurde die 3'-UTR gerichtet in den pCRXL, in dem sich bereits das Intron 4 befand, eingefügt.

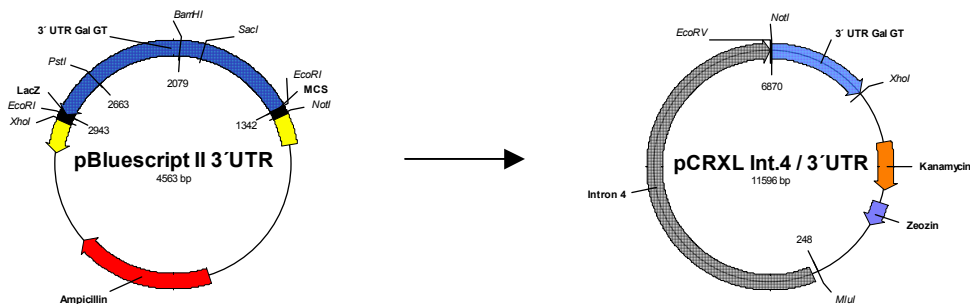


Abbildung 12: Subklonierung der 3'UTR aus pBluescript SK(-) in pCRXL mit Intron 4 über NotI/XhoI

6.1.2.5 Subklonieren der IRES-Sequenz mit vorgeschalteten Stopkodons

Die sich im Vektor pSVKeoXI befindlichen Antibiotikaresistenzgene wurden mit Hilfe einer PCR in den die IRES-Sequenz enthaltenden Vektor pCITE-2a(+) überführt.

Aus pSVKeoXI (für Neomycinresistenz) und pSVKeo Zeozin (für Zeozinresistenz) wurde zur Amplifikation des Antibiotikaresistenzgens mit SV40 poly(A)-Stelle und 3'-terminaler loxP-site eine PCR mit folgenden Primern durchgeführt.

Die Sense-Primer besitzen am 5'-Ende eine zusätzliche EcoRI und NdeI-Erkennungssequenz. In der NdeI-Erkennungssequenz befindet sich das Startkodon zur Translation des entsprechenden Antibiotikaresistenzgens. Der RAS-Primer ist hinter der 3'-terminalen loxP-site und der NotI-Erkennungssequenz in pSVKeo (Position 2018-1993) positioniert. Die mit Hilfe der PCR generierten Produkte wurden anschließend nach einem NdeI/NotI-Verdau in den Vektor pCITE-2a(+) kloniert.

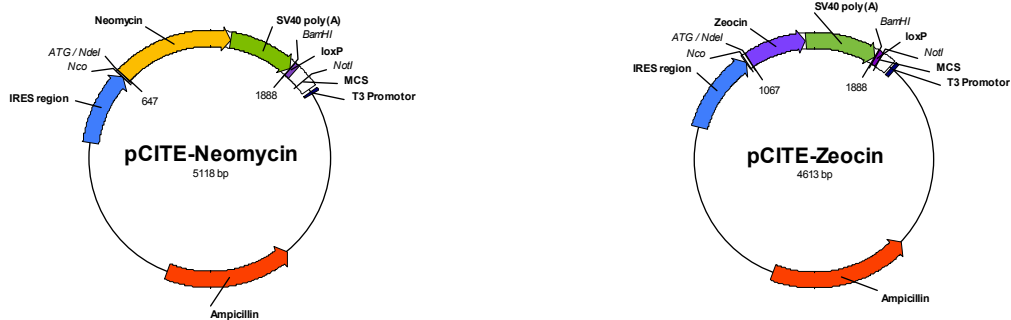


Abbildung 13: Darstellung der Subklonierungsvektoren pCITE-2a (+) mit Antibiotikaresistenzen

Zur Klonierung der 5'-terminalen loxP-site wurde die bereits fast vollständig vorhandene Kasette aus den Vektoren pCITE-Neomycin bzw. pCITE-Zeocin in einer PCR amplifiziert und in den Vektor pSVKeoXI kloniert.

Der verwendete Sense-Primer beinhaltet das Startkodon des IRES-Bereiches aus pCITE-2a(+). Vor diese Sequenz wurden drei Stopkodons, je Leseraster eines, geschaltet. Der RAS-Primer stellt den T3-Promotor mit einer BamHI Erkennungssequenz dar.

Das mit diesen Primern generierte PCR-Produkt wurde mit BamHI verdaut und in den Vektor pSVKeoXI (HINDIII geschnitten, Enden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt und ebenfalls mit BamHI geschnitten) kloniert.

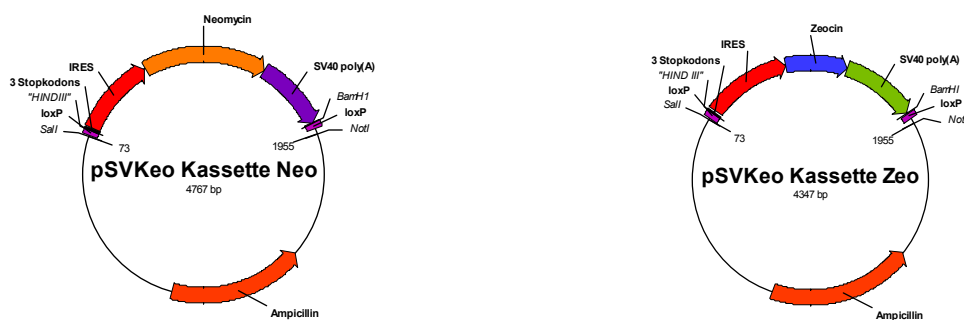


Abbildung 14: Klonierung der IRES-Sequenz mit eingefügten Stopkodons in pSVKeoXI

6.1.2.6 Klonieren der Antibiotikakassetten in pCRXL (mit Intron4 und 3'UTR)

Die generierten pSVKeo-Neo bzw. Zeo Kassetten-Vektoren wurden mit Sall linearisiert und die entstandene Restriktionsschnittstelle geglättet. Durch einen Verdau mit NotI wurden die entsprechenden Antibiotikakassetten herausgeschnitten und auf einem Agarosegegel aufgereinigt. Diese Fragmente wurden in den mit EcoRV und NotI geöffneten Vektor pCRXL (mit Intron4 und der 3'UTR) kloniert.

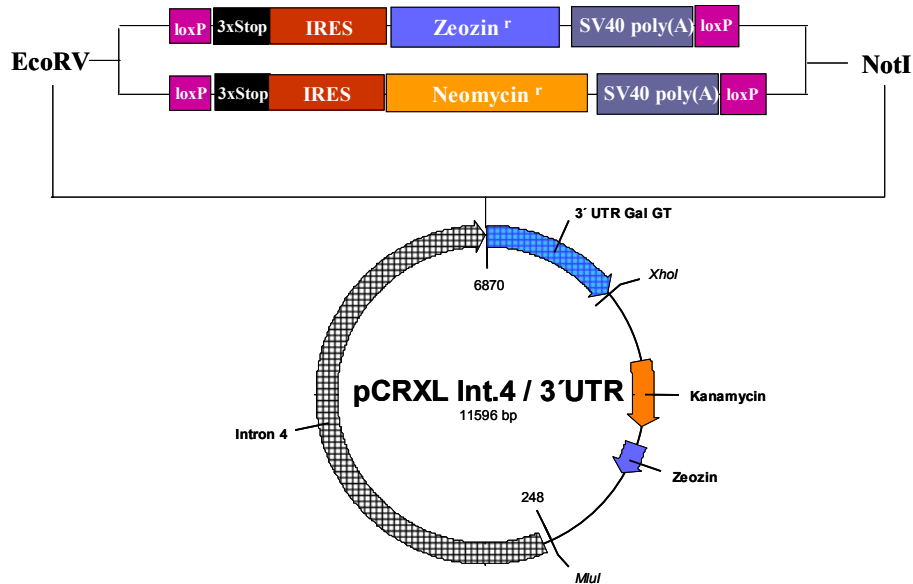


Abbildung 15: Schematische Darstellung der zu generierenden knock out Vektoren

Die Generierung des ersten kompletten Neomycin α -1,3 Gal KO Konstruktes gelang relativ schnell. Es zeigten sich allerdings in der PCR, vor allem bei Verwendung des Primers XE124, unklare Ergebnisse. Eine Sequenzierung zur Kontrolle der Klonierungsstellen ergab, im Vergleich zu Sequenzen eines BACs, ein Fehlen von 189 Basen im Intron4 am 3'-Ende. Dieser Verlust ließ sich durch das Vorhandensein einer vorher nicht identifizierten EcoRV-Schnittstelle in der Position 186 im Intron4 erklären. Da EcoRV als Klonierungsenzym diente, ist der Befund nicht weiter erstaunlich. In diesem fehlenden Basenabschnitt liegen leider die Spleißstellen zur Excision des Intron4, so dass neue Vektoren generiert werden mussten.

Bedingt durch die Größe, und vor allem der größtenteils unbekanntem Sequenz, war die Verwendung anderer Restriktionsenzyme als EcoRV und NotI nicht möglich.

Mit Hilfe eines durchgeführten Partialverdau mit EcoRV gelang später die Herstellung des der Gal KO-Vektors mit Neomycinresistenz, im weiteren pMW8 Neo genannt.

6.1.2.7 Der α -1,3 Gal GT knock out Vektor pMW8 Neo

Der generierte Klon wurde mit Hilfe unterschiedlicher Methoden hinsichtlich seiner Korrektheit überprüft.

Zum einen wurde der Neomycinkassettenbereich, zwischen Primer XE124 am 3'Ende des Intron4 und Primer XE136 in der 3'UTR, auf beiden Strängen komplett sequenziert. Das Ergebnis entsprach den erwarteten oder bereits publizierten Sequenzen.

6.1.2.7.1 Charakterisierung mit Hilfe der PCR

Der Vektor wurde über verschiedene PCRs mit α -1,3 Gal GT-spezifischen Primern und Primern, welche sich in der eingebrachten Kassette befinden, charakterisiert.

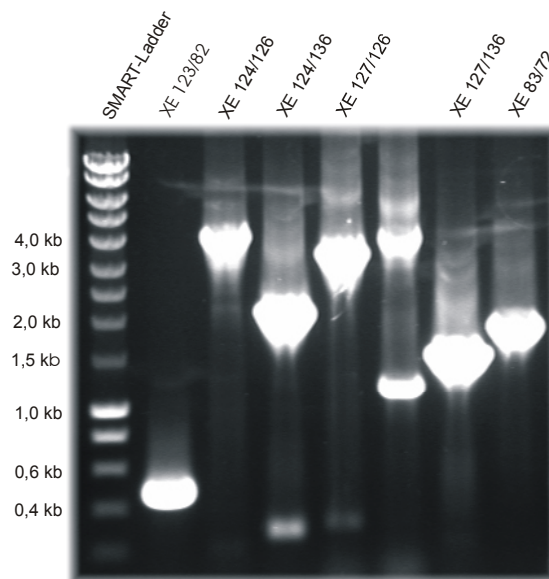


Abbildung 16: Dargestellt ist eine PCR mit verschiedenen Primerkombinationen zur Charakterisierung des Vektors pMW8Neo

Aufgeführt sind die Größen und die Aussagen bezüglich der gewählten Primerkombinationen:

Primer	Größe	Position
XE123 / XE82	510 bp	Zwischen 3'Ende von Intron 4 und Exon5
XE123 / XE 72	4000bp	Komplette Neomycinkassette und 3'-UTR
XE124 / XE136	2200bp	komplette Neomycin-Kassette, Spleißbereich
XE124 / XE136	3500bp	Komplette Neomycinkassette und 3'UTR, Spleißbereich
XE127/ XE136	1400bp	Zwischen Neomycinkassette und 3'UTR
XE83 / XE72	1700bp	Komplette 3'UTR

Tabelle 3: Dargestellt sind die im oberen Gelbild verwendeten Primerkombinationen, ihre Positionen und die zu erwartenden Fragmentgrößen

Der Klon wurde mit fünf weiteren Primerkombinationen unterschiedlicher Bereiche getestet und zeigte in allen Fällen das theoretisch erwartete Amplifikat.

6.1.2.7.2 Restriktionskartierung

Mit einer Vielzahl verschiedener Restriktionsenzyme wurde eine Kartierung des Vektors pMW8Neo durchgeführt. Eine Auswahl davon ist im folgenden Bild gezeigt.

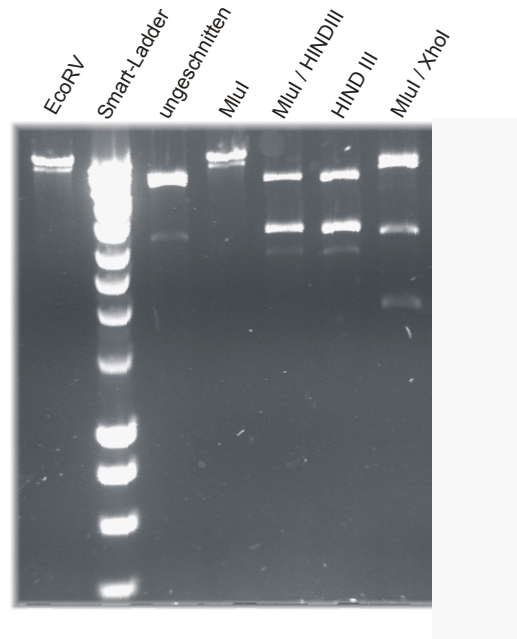


Abbildung 17: Restriktionskartierung des Vektors pMW8Neo –ein Bild mit geringerer Belichtung zur Ablesung der SMART-Ladder im oberen Bereich ist nicht gezeigt

In folgender Grafik sind die Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme verzeichnet.

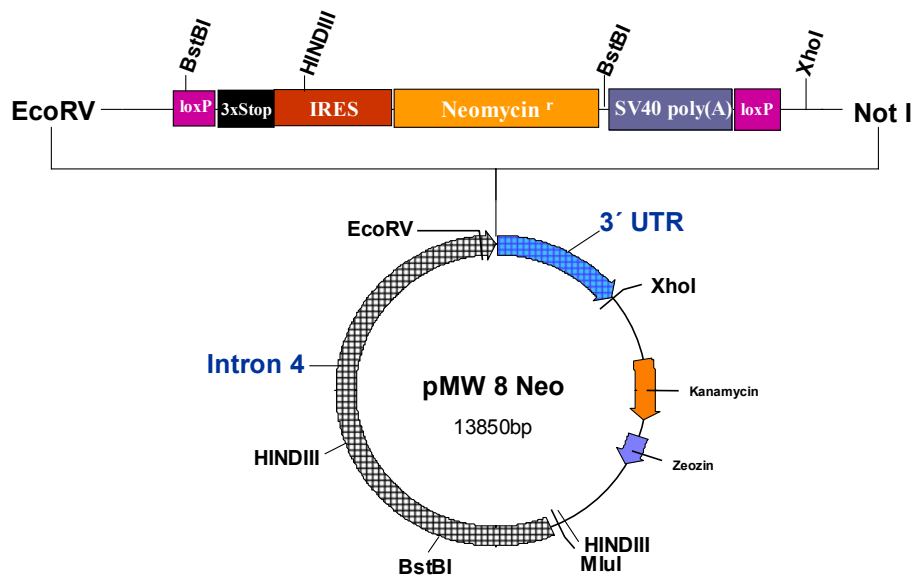


Abbildung 18: schematische Darstellung der hier verwendeten Restriktionsenzyme

Die theoretisch erwarteten Fragmente wurden mit den Ergebnissen der Restriktionsverdau verglichen. Die Auswertung ist in folgender Tabelle gezeigt.

	EcoRV	MluI	MluI/HINDIII	HINDIII	MluI/XhoI
erwartete Fragmente (kb)	0,2 / 13,6	linearisiert	3,2 / 3,6 / 7	3,2 / 3,6 / 7	1,9 / 3,5 / 8,4
tatsächliche Fragmente (kb)	linearisiert	linearisiert	3,2 / 3,6 / \approx 7	3,2 / 3,6 / \approx 7	1,9 / 3,5 / \approx 8,5

Tabelle 4: Auswertung der Restriktionskartierung

Zur Kontrolle wurden noch weitere Restriktionsverdau durchgeführt.

Zusammenfassend wurde die korrekte Lage aller im Vektor gewünschten Kompartimente bestätigt.

6.1.2.8 Ansätze zur Herstellung eines KO-Vektors mit Zeozinresistenz

Die Bemühungen zur Generierung des Gal KO-Vektors mit einer Zeozinresistenz erwiesen sich als ausgesprochen zeitaufwändig.

Eine Vielzahl von Modifikationen des Klonierungsprotokolls, die im Folgenden aufgelistet sind, wurde getestet.

Zur Linearisierung des **Vektor**:

- Verschiedene Enzymkonzentrationen von NotI und EcoRV
- Die Reihenfolge der im angesetzten Verdau verwendeten Restriktionsenzyme wurde variiert
- Gleichzeitige Verwendung beider Restriktionsenzyme
- Zeit des Restriktionsverdaus
- Dephosphorylierung des Vektors nach Restriktionsverdau

Zur Isolierung der **Zeozinkassette** aus pSVKeo Zeozin:

- Verschiedene Enzymkonzentrationen von Sall und NotI
- Die Zeiten des Restriktionsverdaus wurden variiert
- Unterschiedliche Enzyme zur Glättung der Sall-Schnittstelle wurden verwendet (Klenow-Polymerase, Mung Bean-Nuklease, S1-Nuclease)
- Dephosphorylieren des Fragments nach der Aufreinigung
- Zeitpunkt der Agarosegelaufreinigung wurde gewechselt

Für die Generierung des Gal KO-Vektors mit Zeozinresistenz waren sämtliche Subklonierungsvektoren vorhanden. Lediglich der letzte Klonierungsschritt mit Einbringen der Zeozinkassette aus dem Vektor pSVKeoXI in den geöffneten pCRXL mit beiden homologen Sequenzen wollte nicht gelingen.

In den meisten Fällen handelte es sich, bedingt um einen unvollständigen Sall-Verdau, um religierte Vektorklone bzw. um, im Vergleich zum gewünschten Klon, zu kleine Plasmide. Ca. 5% der Klone enthielten zwar ein großes Insert mit dem gewünschten Intron 4, doch bedingt durch den vollständigen Verdau mit EcoRV, fehlten die 189 Basen am 3'-Ende.

6.1.2.8.1 Alternative Strategie zur Herstellung des Zeozinkonstruktes

Aufgrund der Probleme bei der Generierung des entsprechenden Zeozinklons, wurde zeitgleich als Alternative zur bisher gewählten Klonierungsstrategie eine abgewandelte „TA-Klonierung“ durchgeführt.

Das Prinzip dieser sehr effizienten Methode zur Klonierung von PCR-Produkten wurde im Methodenteil (Kap. 5.2.12) bereits näher erläutert. In einer PCR wird durch eine DNA-Polymerase, die keine Korrekturfähigkeit besitzen darf, an das entstandene PCR-Fragment ein in der Mehrheit 3'-überhängendes Adenin synthetisiert. In einen, mit einem 3'- überhängenden Thymidin versehenen, linearisierten Vektor kann dieses Fragment ohne weitere Modifikation direkt ligiert werden. Ein solcher Klonierungsvektor befindet sich in allen kommerziell erhältlichen TA-Klonierungskits.

Für die Anwendung bei der Umklonierung der Selektionskassette musste erst der Vektor pCRXL mit beiden homologen Bereichen linearisiert und mit überhängenden Thymidinresten versehen werden:

- 1) Der Vektor pCRXL (mit Intron4 und 3'UTR) wurde mit NotI linearisiert, mit der Klenow-Polymerase geglättet und in einer, nur mit Thymidin als angebotenes dNTP, PCR-Reaktion am 3'Ende mit Thymidin versehen. Das zu klonierende Insert wurde aus pSVKeoXI mit Sall und NotI herausgeschnitten und mit einer Taq-Polymerase bei einer Inkubation von 30min bei 72°C mit Adenin gelabelt. Im Anschluss erfolgten eine normale Ligation mit Hilfe einer T4-Ligase und die Elektroporation in kompetente *E.colis*. In zwei Ansätzen wurden damit 350 Klone gewonnen. Eine Analyse ergab jedoch nur Klone mit einem zu kleinen Insert bzw. religierten Vektor.
- 2) Bei der zweiten Methode wurde das Prinzip der Herstellung der TA-Vektoren der Fa. Invitrogen angewendet (267-269). Dazu wurden die 3'-überhängenden Thymidinreste mittels des Restriktionsenzym XcmI generiert. In diesem Fall wurde jedoch, anders als üblich, nicht der Vektor, sondern das Insert mit überhängenden Thymidinresten versehen.

Zur Amplifikation der zu klonierenden Inserts aus pSVKeoXI wurden zwei Primer konstruiert, die an ihren 5'-Enden die Restriktionsschnittstelle für das Enzym XcmI enthalten und an ihren 3'-Enden jeweils 20bp homologe Bereiche der entsprechenden pSVKeoXI-Sequenz. Nach vollendeter PCR wurde das aufgereinigte Fragment mit XcmI und, zur Eliminierung der in der PCR eingesetzten Ausgangsvektoren, DpnI verdaut. Der Vektor pCRXL (mit Intron4 und 3'UTR) wurde mit NotI linearisiert und durch eine PCR mit 3'-überhängenden Adenin versehen. Im Anschluss erfolgte eine normale Ligation mit T4-Ligase. Auch die mit dieser Methode generierten 120 Plasmidklone waren zu klein.

6.1.3 Charakterisierung der porcinen Endothelzelllinie PED2*3

Zu Beginn der Promotionsarbeit Mitte 1999 erhielten wir von Fa. Biotransplant, Boston, USA, die porcine Endothelzelllinie (immortalisiert mit SV40 T-Antigen) PEDNSV15 und einen mit dem Vektor pGALLAWAY stabil rekombinierten Klon PED 2*3. Diese sind G418-resistent, außerdem wurde über pGALLAWAY ein Allel der α -1,3 Gal GT inaktiviert. Das zweite Allel sollte nach Aussage von Dr. Bob Hawley aus unbekanntem Gründen nur eine abgeschwächte Galaktosyltransferaseexpression vermitteln.

Die Zelllinie PED2*3 sollte die Grundlage für die Herstellung einer komplett Gal-defizienten Endothelzelllinie bilden. Dazu sollte auch das zweite Allel mit einem eigenen, zu generierenden, α -1,3 Gal GT knock out Vektor eliminiert werden. Diese generierte Zelllinie sollte dann die Basis für die geplante Expressionsklonierung α -1,3 Gal-unabhängiger xenoreaktiver Epitope bilden. Desweiteren sollte mit Hilfe dieser Zelllinie die potentielle *in vivo* Infektiosität Gal-negativer PERVs untersucht werden.

Zur Charakterisierung wurden die aus Boston erhaltenen PED2*3-Zellen mit dem α -1,3 Gal spezifischen Lektin IB4 durchflusszytometrisch untersucht. Zur Kontrolle auf Spezifität des Lektins wurde ein Galaktosidase-Verdau der PED-Zellen vor der Bindung desselbigen durchgeführt.

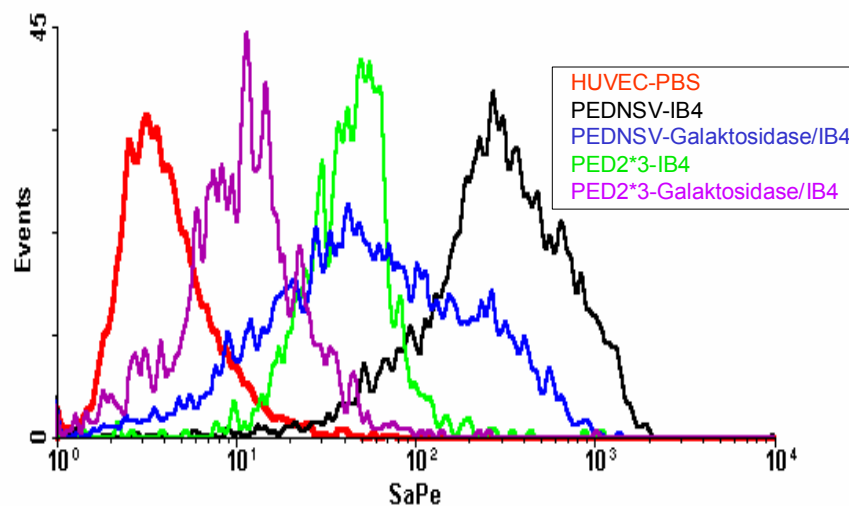


Abbildung 19: Durchflusszytometrische Bestimmung der Gal α -1,3 Galexpression mit dem Lektin IB4 und Galaktosidase-Verdau zur Kontrolle der Spezifität von IB4 auf PEDNSV und PED2*3

Die Expression des Galepitops bei PED2*3 lag noch immer bei ca. 20% im Vergleich zu der Ausgangszelllinie PEDNSV oder primären porcinen Endothelzellen. Dieses Ergebnis entsprach den Angaben aus Boston.

Der vorher durchgeführte Galaktosidaseverdau der PEDNSV zeigte in der anschließenden Färbung mit IB4 eine im ähnlichen Maße reduzierte Fluoreszenz. Der Galaktosidase-Verdau der PED2*3 führte zu einer weiteren drastisch reduzierten Galexpression im Vergleich zur unbehandelten PEDNSV (ca. 5-10%).

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie konnten auch über Bindung von humanem Serum im Westernblot und immunhistologisch bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Leider zeigte sich im Verlauf der ersten drei Wochen ein extrem problematisches Kulturverhalten der PED2*3. Je länger die Zellen sich in Kultur befanden, umso größer wurde die Rate der absterbenden Zellen. An das Procedere einer Transfektion mit anschließender Selektion war mit diesen Zellen deshalb nicht zu denken, so dass weitere Arbeiten mit den Wildtypzellen PEDNSV stattfinden mussten.

6.1.4 Inaktivierung des α -1,3 Gal GT-Gens in der porcinen Endothelzelle PEDNSV

6.1.4.1 Etablierung der Transferrinfektion

Porcine Endothelzellen lassen sich mit herkömmlichen Methoden ausgesprochen schlecht transfizieren (Aussagen anderer Arbeitsgruppen im Vorfeld der Planungen). Auch die Liposomen-vermittelte Transfektion sollte nur sehr mäßige Raten transfizierter Zellen ergeben. Für das Vorhaben der homologen Rekombination, auch hinsichtlich der Größe des Vektors, ist eine möglichst effiziente Methode zur Aufnahme der DNA in die Zelle entscheidend. Es wurde eine Kombination einer über Transferrin-Rezeptoren vermittelten Endozytose mit Lipofectin, einer relativ neuen Methode, getestet.

Zu Transfektion der PEDNSV wurde die DNA zum Vergleich mit Lipofectamin bzw. Lipofectin und Holo-Transferrin komplexiert. Über die auf vielen verschiedenen Zelltypen exprimierten Transferrinrezeptoren wird mittels Endozytose der DNA-Komplex in die Zelle aufgenommen. Die Art der Komplexbildung ist noch immer ungeklärt. Diese Lipofektion über Transferrinrezeptor-vermittelte Aufnahme in die Zielzellen wird als Transferrinfektion bezeichnet (258, 259, 270-276).

6.1.4.1.1 Nachweis der Expression von Transferrinrezeptoren auf PEDNSV

In einer ersten Kontrolle wurden die PEDNSV auf die Expression von Transferrinrezeptoren hin untersucht. Mit Primern des Exon4 aus dem porcinen Transferrinrezeptor (277) wurde eine RT-PCR mit poly(A)⁺ von PEDNSV durchgeführt:

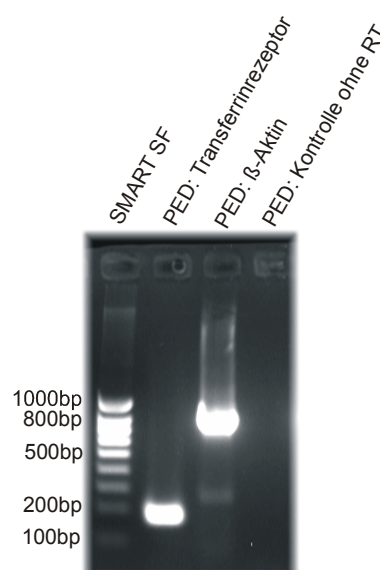


Abbildung 20: Dargestellt ist eine RT-PCR der PEDNSV mit β -Aktinprimern als Positivkontrolle und den Transferrinrezeptorprimern

Deutlich erkennbar sind zum einen das Amplifikat mit der Größe von 780bp bei Verwendung der β -Aktinprimer als Positivkontrolle und zum anderen das 186bp große Amplifikat der Transferrinrezeptorprimer. Die PEDNSV exprimieren demnach porcine Transferrinrezeptoren, eine wichtige Grundvoraussetzung für eine effiziente Transferrinfektion.

6.1.4.1.2 Optimierung der Transferrinfektion

Für die Optimierung der Transferrinfektion wurden die Zellen HUVEC, PEDNSV und HEK293 verwendet. Die drei Plasmide pSV β Gal, pEGFPC1 und phrGFP dienen zur Beurteilung der Transfektionsrate.

Folgende Faktoren wie die zur Transferrinfektion eingesetzten Zellen in verschiedenen Zellzahlen, Lipofectamin versus Lipofectin, Einfluss der Expression des Markerproteins auf Zellviabilität und die Frage einer möglichen Induktion von Transferrinrezeptorexpression durch Desferroxaminemesylat (DFO) wurden untersucht.

Ergebnis für **HUVEC**: einzusetzende Zellzahl bei 6-well-Platten $1-2 \times 10^5$ / well

Lipofectamin ist toxischer als Lipofectin

Transfektionsrate bei Verwendung von Lipofectamin/Lipofectin mit ca. 25% positiven Zellen ähnlich

Mit pSV β Gal nur max. 1% positive Zellen

Mit pEGFP zelltoxische Effekte sichtbar

Induktion mit DFO bewirkt eine längere Expression von EGFP und hrGFP

Ergebnis für **HEK293**: einzusetzende Zellzahl $2-3 \times 10^5$ / well

Lipofectamin ist geringfügig toxischer als Lipofectin

Transfektionsrate ist bei Verwendung von Lipofectamin mit ca. 40% positiven Zellen höher

Mit pSV β Gal max. 15% positive Zellen

Mit pEGFP ca. 10% höhere Transfektionsrate als mit phrGFP

Induktion von DFO bewirkt längere Expression von EGFP und hrGFP

Ergebnis für **PEDNSV**: einzusetzende Zellzahl $1-2 \times 10^5$ / well

Lipofectamin ist geringfügig toxischer als Lipofectin

Transfektionsrate ist bei Verwendung von Lipofectamin/Lipofectin mit ca. 40% positiven Zellen ähnlich

Mit pSV β Gal 25% positive Zellen

Mit pEGFP kaum Zelltoxizität, und bessere Expression

Induktion mit DFO bewirkt mit ca. 50% positiven Zellen eine höhere Transfektionsrate

Die mit dieser Methode erreichten Transfektionsraten der PEDNSV erschienen für die Durchführung des Versuches zur Inaktivierung der α -1,3 Gal GT ausreichend.

Zur Gewinnung stabiler Zellklone müssen die Zellen 4-5h nach der Transfektion für einen Zeitraum von mindestens 2 Wochen je nach in die Zellen einzubringender Resistenz mit dem entsprechenden Antibiotikum selektiert werden. Dabei ist diese einzusetzende Konzentration für jede Zelllinie oder primäre Zellen einzeln auszutesten. Im Fall von pMW8Neo wurde der Einsatz des Antibiotikums G418 geplant. In fünf unabhängig voneinander durchgeführten Verdünnungsreihen wurde die für PEDNSV letale Konzentration mit $0,8 \mu\text{g/ml}$ G418 ermittelt.

6.1.5 Transferrinfektion der PEDNSV mit pMW8 Neo

Mit dem optimierten Protokoll wurden sechs Transfektionen von im Schnitt 8×10^6 PEDNSV unter Verwendung von Lipofectin und teilweise mit Induktion durch DFO durchgeführt.

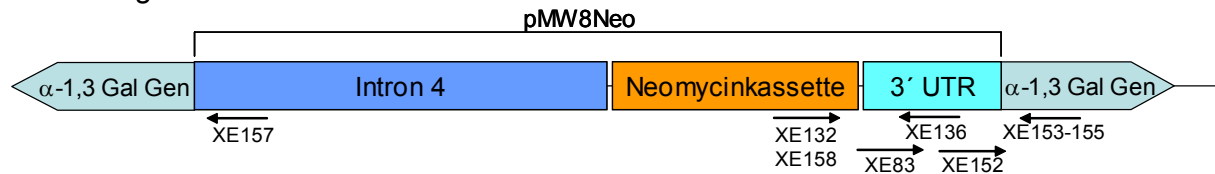
Aus allen Transferrinfektionen wurden insgesamt 78 G418-resistente Klone isoliert.

Von diesen ließen sich 34 als stabile, G418-resistente Zelllinien gewinnen. Die restlichen Zellklone überlebten entweder das Procedere der Zellisolierung aus den Transfektionswells nicht oder erwiesen sich über einen längeren Zeitraum gesehen als nicht stabil G418-resistent

6.1.5.1 Charakterisierung der isolierten G418-resistenten Klone

Unter Verwendung unterschiedlicher Primerkombinationen wurden aus isolierter genomischer DNA der stabil transfizierten Klone PCRs durchgeführt. So sollte geklärt werden, ob das Konstrukt in den einzelnen Klonen jeweils homolog rekombiniert oder zufällig integriert, vorliegt.

Homologe Rekombination



Zufällige Integration

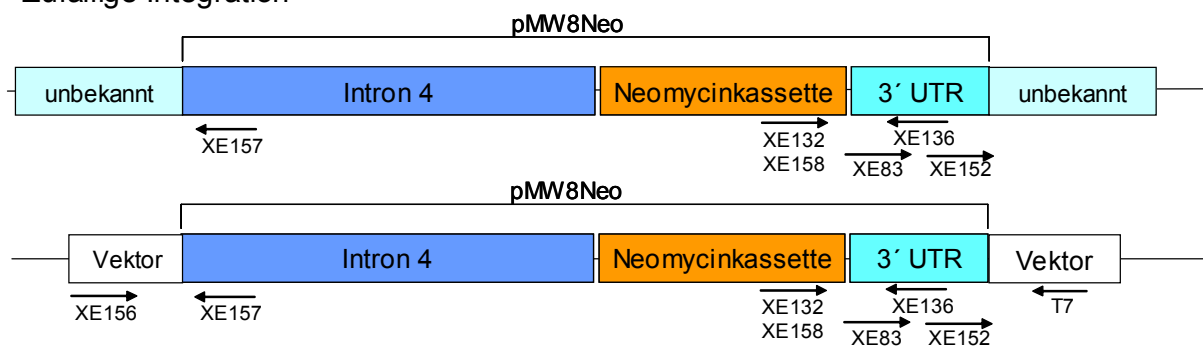


Abbildung 21: Darstellung sämtlicher Möglichkeiten der Integration von pMW8Neo ins Genom PEDNSV. Ebenfalls gezeigt sind die Positionen der eingesetzten Primer, die Pfeile deuten dabei die Orientierung der Primer an.

Folgende Primerkombinationen wurden zur Charakterisierung der Klone verwendet:

Primer	Größe	Aussage
A1 XE132 / XE136	574bp	positiv bei pMW8Neo-Sequenz
A2 XE158 / XE136	570bp	positiv bei pMW8Neo-Sequenz
B XE152 / XE154	1030bp	Positivkontrolle: α -1,3 Gal GT Gen
C1 XE132 / XE153-155	ca. 3kb	positiv, wenn pMW8Neo korrekt homolog rekombiniert ist
C2 XE158 / XE153-155	ca. 3kb	positiv, wenn pMW8Neo korrekt homolog rekombiniert ist
D XE156 / XE157	254bp	positiv, wenn das Konstrukt zufällig incl. Vektorsequenzen integriert ist
E XE 83 / T7	2kb	positiv, wenn das Konstrukt zufällig incl. Vektorsequenzen integriert ist

Tabelle 5: Primerkombinationen und deren Aussagen hinsichtlich einer Integration von pMW8Neo ins Genom von PEDNSV

Alle G418-resistenten Klone ließen sich mittels PCR-Reaktionen untersuchen. In der nächsten Tabelle sind die Ergebnisse mit Angabe der verwendeten Primerpaare (A1-E) und entsprechender Schlussfolgerungen dargestellt:

Vektor - A1/A2	Gal-Gen - B	Homolog rekombiniert C1/C2	Falsch integriert Am 5'Ende - D	Falsch integriert Am 3'Ende - E	Anzahl Klone
positiv	positiv	∅	∅	positiv	11
positiv	positiv	∅	positiv	∅	2
positiv	positiv	∅	positiv	positiv	8
∅	positiv	∅	∅	∅	5
positiv	positiv	∅	∅	∅	8

Tabelle 6: Dargestellt sind die PCR-Ergebnisse der G418-resistenten Klone
Zu beachten ist, das für die Primerkombinationen C1/C2 keine Positivkontrolle vorhanden ist und daher keine Aussage bezüglich der Funktionsfähigkeit der Primer getroffen werden kann

6.1.5.1.1 Durchflusszytometrische Analyse der G418-resistenten Klone mit IB4

Es besteht die Möglichkeit, dass Klone, in denen das Konstrukt homolog rekombiniert ist, bei dem also ein Allel der α -1,3 Gal GT inaktiviert wurde, einen messbar niedrigeren Level an Gal α -1,3 Gal Epitopen aufweisen. Um solche Klone identifizieren zu können, wurden vier der acht Klone (Nr. 2,5,11 und 20), trotz negativer PCR C1/C2, mit IB4 durchflusszytometrisch analysiert.

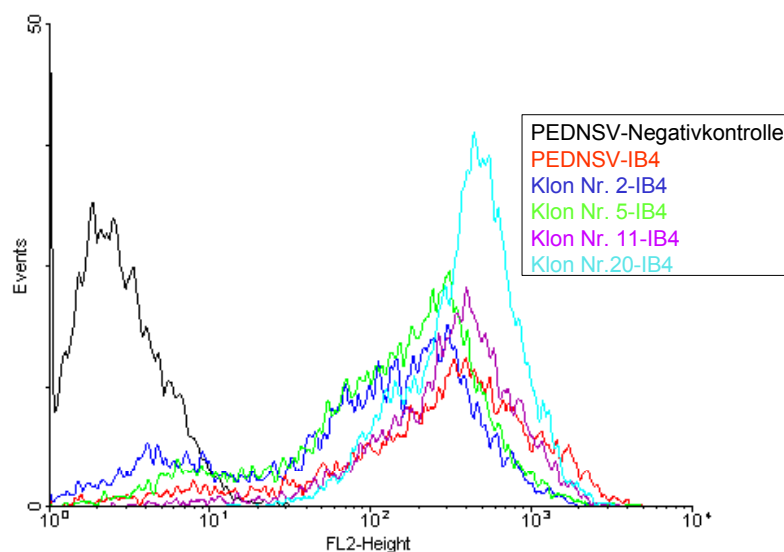


Abbildung 22: Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse von vier G418-resistenten Klone (2, 5, 11 +20) mit dem α -Gal-spezifischen Lektin IB4

Bei den bisher getesteten vier Klonen ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Galepitopen zwischen der Ausgangszelllinie PEDNSV und den G418-resistenten Klonen feststellen.

6.2 Untersuchungen zum Infektionsrisiko porciner endogener Retroviren

Das zweite große Teilgebiet umfasst die Analyse einer möglichen PERV-Infektion in einem „Drei-Spezies-Infektionsmodell“.

6.2.1 Permissivität primärer humaner Zellen

Eine Voraussetzung zur Durchführung des bereits erwähnten experimentellen *in vivo* Ansatzes war die Infizierbarkeit primärer humaner Endothelzellen mit PERV. Unsere Arbeitsgruppe konnte über *in vitro* Infektionsexperimente mit replikationskompetenten Viren nachweisen, dass PERV auf humane Fibroblasten, Mesangium- und Endothelzellen übertragen werden kann. Für Mesangium- und Endothelzellen konnte eine produktive Infektion gezeigt werden. Unterstützt werden konnten diese Daten durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Pseudotypisierungsexperimente zum Nachweis des PERV-Rezeptors auf verschiedenen Zellen (167, 240).

6.2.1.1 Nachweis von PERV-Rezeptoren über Pseudotypisierungsexperimente

Die von uns verwendete Verpackungszelllinie TelB6 (179) exprimiert stabil zwei Konstrukte, beide basierend auf MLV-Genomen. Konstrukt 1 ist ein bis auf die LTRs und intakte Verpackungssignale deletiertes MLV-Genom und enthält zusätzlich einen β -Galaktosidaseleserahmen mit vorgeschaltetem „nuclear location signal“ als Markergen. Konstrukt 2 ist ein MLV-Genom, in dem Verpackungssignale und *env*-Gen deletiert wurden. Zusätzlich wurde jeweils ein drittes Konstrukt transfiziert, in dem Verpackungssignale und alle MLV-Gene deletiert worden waren, welches jeweils den PERV *env* A, B oder C-Leserahmen enthält. Exprimieren die Wirtszellen die entsprechenden PERV-Rezeptor, so werden sie durch die Ablesung des Galaktosidasegens und Umsetzung des Substrates IPTG blau gefärbt und lassen sich im Mikroskop detektieren.

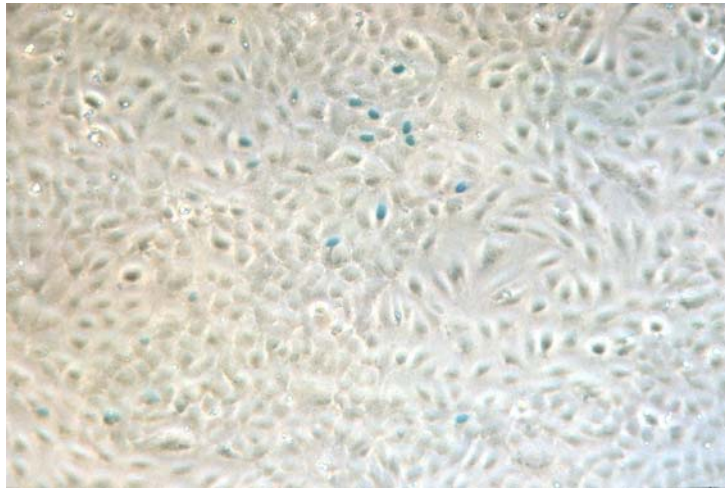


Abbildung 23: Pseudotypisierungsexperiment mit primären humanen Endothelzellen (HUVEC)
 Die PERV-Rezeptor exprimierenden Zellen sind bedingt durch Umsetzung des Substrates X-Gal blau gefärbt

Die durchgeführten Infektionsexperimente zeigten eine PERV-Transmission auf humanen Endothelzellen, isoliert aus Umbilikal- oder Beinvenen, auf vaskuläre Fibroblasten, HEK293 und auf Mesangiumzellen. Auf Endothelzellen des Javaneraffen, C42 des Pavians und humanen Lymphozyten auch nach Aktivierung mit PHA, ließen sich keine Rezeptoren für PERV nachweisen. Mit Hilfe der pseudotypisierten Viren konnten Rezeptoren für PERV-A und PERV-B auf Endothelzellen detektiert werden.

6.2.2 Vorstellung des „Drei-Spezies-Infektionsmodells“

Primatenmodelle können sehr gut die Bedingungen einer klinischen Xenotransplantation widerspiegeln. In unserem Modell treten PERV-Partikel, welche potentiell aus dem porcinen Transplantat freigesetzt werden, in engen Kontakt zu humanen Endothelzellen. Diese sind, wie bereits gezeigt, hoch permissiv für PERV.

Nicht transgene wie auch hCD59 transgene porcine Nieren wurden in Javaneraffen transplantiert. Eine „life supporting“ Situation wurde durch das Ligieren des empfängereigenen Ureters erreicht. Gleichzeitig wurde die porcine *Vena renalis* durch ein Interponat, welches aus humaner *Vena saphena* generiert wurde, ersetzt und an die *Vena cava* des Affen anastomosiert. Die Tiere wurden mit einer Kombinationstherapie aus konditionierter Cyclophosphamidgabe, Cyclosporin, niedrigen Dosen Steroiden, Mycophenolsäure und zum Teil C1-Inhibitor immunsupprimiert.

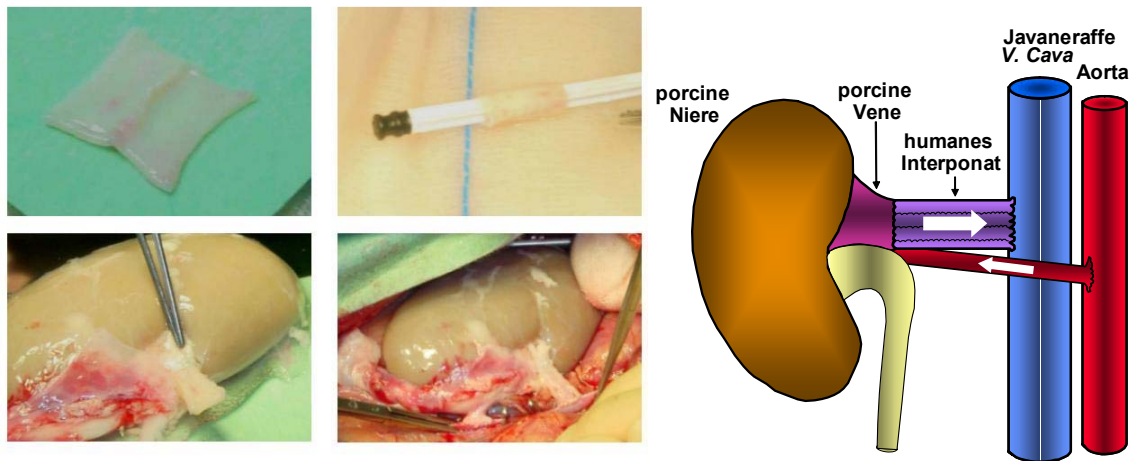


Abbildung 24: Auf der linken Seite ist die Konstruktion und Transplantation des humanen Interponats dargestellt. Die beiden humanen Vena saphena-Segmente wurden zusammen gefügt und distal an die porcine Niere anastomosiert. Auf der rechten Seite ist ein topographisches Schema des humanen und porcinen Transplantats in situ gezeigt. Die Pfeile symbolisieren die Richtung des Blutflusses.

6.2.3 Überlebenszeiten und Untersuchungsplan der Empfängertiere

	Tier 192	Tier 57B	Tier 075	Tier 679	Tier 813	Tier 673
transplantierte, porcine Niere	nicht transgen	nicht transgen	nicht transgen	hCD59	hCD59	hCD59
Überlebenszeit	6 Tage	13 Tage	14 Tage	19 Tage	2 Tage	3 Tage

Tabelle 7: Xenotransplantate und Überlebenszeiten der Javaneraffen

Nach Abstoßung der porcinen Niere oder Tod des Empfängertieres wurden die humanen Interponate entfernt, Proben davon eingefroren und die Zellen daraus isoliert. Zusätzlich wurden Blut-, Serum- und Gewebeproben der transplantierten Tiere auf eine PERV-spezifische Immunantwort und Indikationen für eine PERV-Transmission untersucht.

Die immunhistochemischen Untersuchungen, der Nachweis von Proviren mittels PERV-spezifischer PCR (aus den isolierten Zellen, dem Interponat und den PBLs) und die RT-PCR aus den Seren der Empfängertiere wurden von Rosemarie Burian im Rahmen ihrer medizinischen Promotion unter meiner direkten Betreuung durchgeführt.

In folgender Tabelle sind die Probenentnahmen und die dazugehörigen Untersuchungen dargestellt:

	PCR	RT-PCR	RT-Assay	FACS-Analyse	Immunhistochemie	Western-blot
Explantat: isolierte Zellen nach 2,4,6+8 Passage	X			X		
Explantat: direkt lysiert	X					
Explantat: direkt geschnitten					X	
Kontrolle: transplantierte humane Vene	X				X	
Zellkulturüberstände der isolierten Zellen			X			
Empfängertier: Plasma von Tag-1, dann wöchentlich		X				X
Empfängertier: PBL von Tag-1, dann wöchentlich	X					
Empfängertier: Serum von Tag-1, dann wöchentlich			X			

Tabelle 8 Probenentnahmeplan mit den dazugehörigen Untersuchungen

6.2.3.1 Kontrolle der Integrität der explantierten Implantate

Um die Integrität der Interponate, vor allem der Endothelzellschicht, zu überprüfen, wurden kleine Stücke der direkt nach der Explantation entnommenen Implantate geschnitten und immunhistochemisch untersucht. Bei Tier 075 war dies leider nicht mehr möglich. Als Endothelzellmarker wurde der Antikörper CD31 (Klone WM59 und JC70A) und als Marker für porcine Zellen das Lektin IB4 verwendet. Javaneraffenvene und porcine bzw. humane Vene wurden als Kontrollen ebenfalls geschnitten und gefärbt.

Die IB4-Färbung ergab, außer bei Verwendung der porcinen Vene, durchweg negative Ergebnisse und ist deshalb hier nicht dargestellt.

Eine Färbung mit dem Klon WM59 des Antikörpers CD31 zeigte eine Kreuzreaktivität mit Endothelzellen (EC) der Javaneraffenvene. Eine Unterscheidung zwischen humanen und Javaneraffen EC ließ sich hiermit nicht ermöglichen.

Der andere Klon, JC70A, hingegen ergab keine Kreuzreaktivität. Die EC des Javaneraffen färbten sich, im Gegensatz zu humanen EC, nicht an.

Dieses ist auf den folgenden Bildern dargestellt:

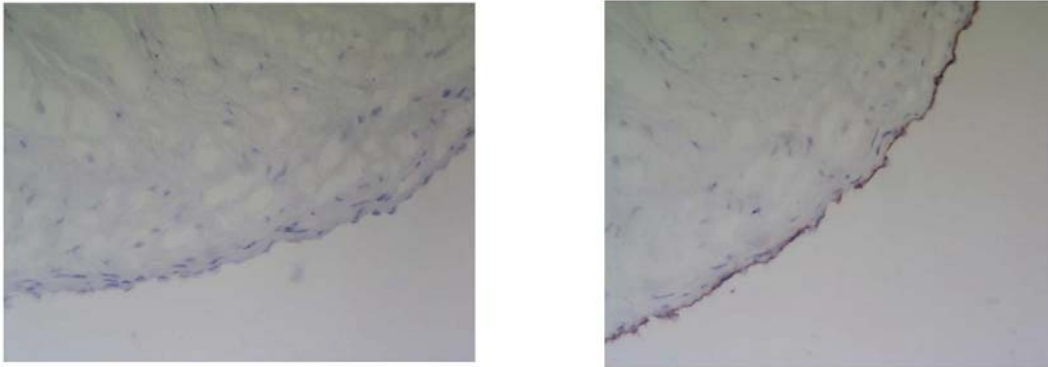
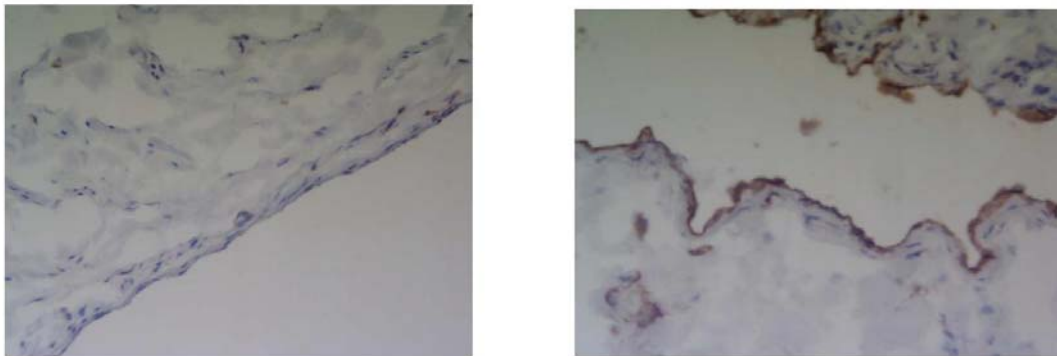


Abbildung 25: humane Vene: auf der linken Seite ist die Negativkontrolle ohne Antikörper gezeigt; auf der rechten Seite ist die Anfärbung mit CD31 (Klon JC70A)



**Abbildung 26: linke Seite: Anfärbung mit CD31 (KlonJC70A) der Javaneraffenvene
rechte Seite: Färbung eines Interponats (6 Tage in situ, Tier 192) mit CD31 (Klon JC70A)**

Durch die Verwendung des Klons JC70A (CD31) konnte zum Zeitpunkt der Entnahme bei allen transplantierten Tieren (außer Tier 075) eine intakte, humane Endothelzellschicht auf dem Interponat nachgewiesen werden.

6.2.3.2 Durchflusszytometrische Charakterisierung der aus humanen Interponaten isolierten Zellen

Nach dem Tod der Tiere wurden die Interponate explantiert und die Zellen daraus isoliert. Dieses gelang bei allen Tieren. Neben humanen EC und Fibroblasten und porcinen EC wurden auch Fibroblasten und EC vom Javaneraffen für Kontrollen gewonnen.

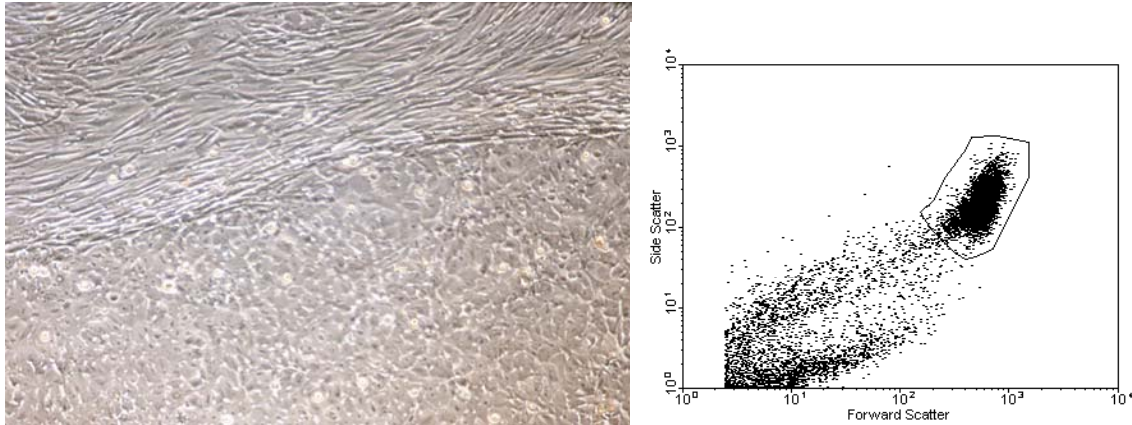


Abbildung 27: Links: Isolierte Fibroblasten (oben) und Endothelzellen (unten) vom Javaneraffen rechts: Eine typische Darstellung des zur Analyse eingestellten Gates von HUVEC bei der durchflusszytometrischen Analyse

Auf die Charakterisierung hinsichtlich des Zelltyps und der Spezies der isolierten Zellen wurde viel Zeit verwendet. Da sich dies im Laufe einzelner Zell-Passagen ändern kann, wurden die 2., 4., 6. und 8. Passagen der Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

Eine Vielzahl verschiedener, anti-humaner, Antikörper stand zur Verfügung und wurde mit den verschiedenen Zellen unterschiedlicher Spezies getestet. Neben Antikörpern wurden auch Lektine zur Klassifizierung mit herangezogen.

6.2.3.2.1 Die Verwendung von Lektinen

Mit den beiden Lektinen IB4 und UEA-1 wurden mehrere durchflusszytometrische Analysen durchgeführt.

6.2.3.2.1.1 Das *Griffonia simplicifolia* I Isolektin (IB4)

Zum Nachweis von porcinen Zellen wurde IB4, welches spezifisch an das α -1,3 Galepitop bindet, verwendet.

Im ersten Tier (192) ließen sich über alle Passagen hinweg zwischen 1,5-3,5% IB4-positive Zellen darstellen. Das zweite Tier (75B) zeigte bei Analyse mit IB4 in der 2.Passage 13% positive Zellen, bei der 5.Passage noch 0,7% und in der 7.Passage negative Ergebnisse. Das letzte Tier (075) der letzten Serie war von vorneherein negativ.

Die Aussagekraft dieser Messungen im Vergleich zu der einer porcin-spezifischen PCR wurde später als gering eingestuft, so dass bei den letzten drei Tieren diese Messungen nicht mehr durchgeführt wurden.

6.2.3.2.1.2 Das *Ulex Europaeus Agglutinin 1 (UEA-1)*

Das größte Problem bei Charakterisierung der isolierten Zellen zeigte sich bei der Diskriminierung humaner Zellen von möglicherweise vorhandenen Javaneraffenzellen. Als mögliche Methode wurde das Lektin *Ulex Europaeus I (UEA-1)* getestet. UEA-1 wurde zur Blutgruppendiagnostik herangezogen und erkennt als Epitop α -fukosylierte Glykoproteine und Glykolipide wie die H-Substanz (Blutgruppe 0) (278). Desweiteren wird UEA-1 zur Aufreinigungen humaner EC aus humanem Gewebe verwendet (279, 280). Andere Literaturhinweise waren ausgesprochen heterogen hinsichtlich ihrer Aussage bezüglich der Spezifität des Lektins.

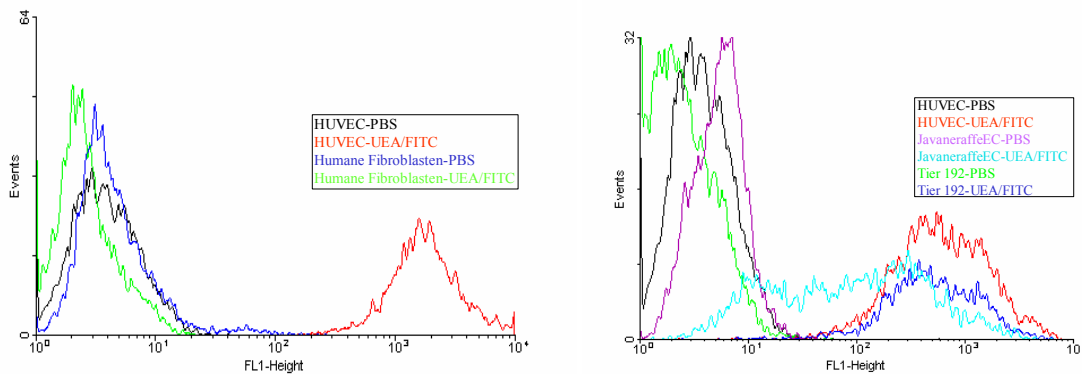


Abbildung 28: Färbung mit UEA-1; Rechts: Eignung von UEA-1 zur Differenzierung zwischen humanen EC und Fibroblasten; Links: Dargestellt die Färbung von Javaneraffen EC und isolierten Zellen eines Interponats (Tier 192, 8. Passage)

Die Färbungen mit UEA-1 waren sehr zuverlässig in der Differenzierung zwischen humaner EC und Fibroblasten. Die Fibroblasten zeigten sich immer negativ, die EC hoch positiv. Dieser Befund war unabhängig von der Blutgruppe (nicht gezeigt). Diese Unterscheidung konnte mit Javaneraffenzellen nicht so deutlich gezeigt werden. Die Färbungen von EC der Javaneraffen zeigten sich im Vergleich zu denen der humanen EC als nicht zuverlässig und deutlich weniger positiv. Die isolierten Zellen aus den Interponaten (Tiere 192, 075, 57B) reagierten recht ähnlich auf eine Markierung mit UEA-1. Die Zellen der 8. Passage des Tieres 192 sind exemplarisch gezeigt. Aufgrund der Unzuverlässigkeiten in der Färbung wurden die Analysen mit UEA-1 nach den ersten drei Tieren eingestellt. Immunhistochemische Untersuchungen mit UEA-1 waren ebenfalls nicht erfolgversprechend. Viele Kreuzreaktivitäten, schon mit der Matrix, waren erkennbar.

6.2.3.2.2 Der Endothelzellmarker CD31

Zur Abtrennung der humanen von denen der Javaneraffen EC wurde der EC Marker CD31 herangezogen. Dieser bindet sehr spezifisch an das 130KD große Glykoprotein gpIIa', auch bekannt als „platelet endothelial adhesion molecule“ (PECAM-1).

Mehrere verschiedene anti-humane CD31-Klone sind bekannt. Der Klon WM59 ist im Allgemeinen für seine Kreuzreaktivität mit Primatenzellen bekannt (281). Dieses wurde in den durchgeführten Untersuchungen auch bestätigt.

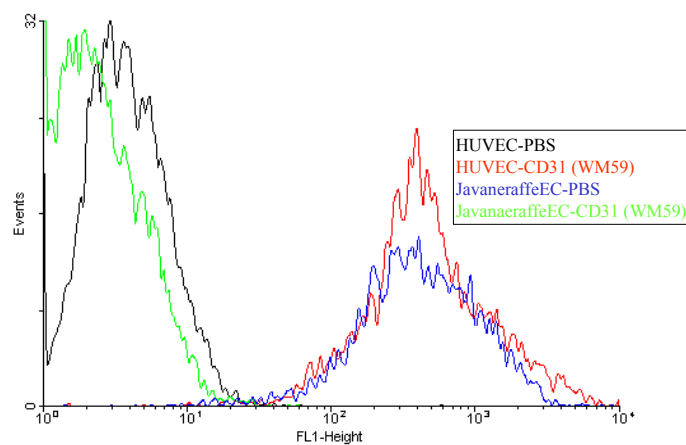


Abbildung 29: Dargestellt ist die Anfärbung von humanen EC und Javaneraffen EC mit dem Klon WM59

Der zweite Klon JC70A wurde in einer Publikation als im FACS nicht kreuzreagierend mit Primatenzellen beschrieben (282). Die durchflusszytometrische Analyse auf Javaneraffen EC, im Vergleich zu humanen EC, zeigte leider ein anderes Bild:

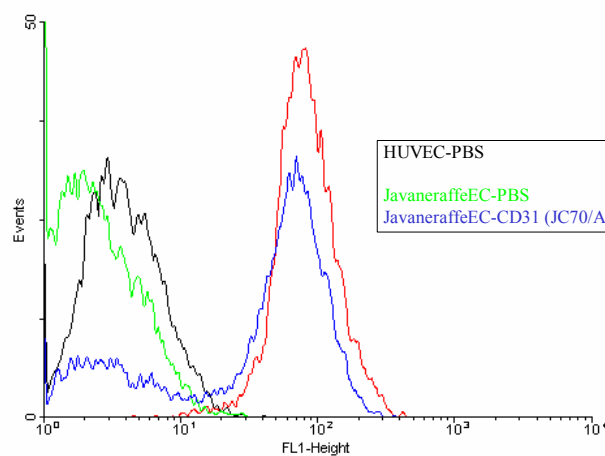


Abbildung 30: Gezeigt ist die durchflusszytometrische Messung von humanen EC und Javaneraffen EC mit dem Klon JC70/A

Die Färbungen mit JC70/A waren im Vergleich mit denen des Klons WM59 im Allgemeinen schwächer. Dennoch ist eindeutig, auch über mehrere Messungen hinweg, dass der Klon JC70/A in durchflusszytometrischen Analysen kreuzreagierend mit Javaneraffen EC und somit zur benötigten Fragestellung nicht geeignet war.

6.2.3.2.3 Die Verwendung anderer Marker

Neben den bereits erwähnten Markern wurden noch andere zur Analyse mit herangezogen.

- 1) **CD90**: Erkennt ein 25-35KD großes Epitop u.a. auf Fibroblasten und reagierte nicht mit Fibroblasten von Javaneraffen.
- 2) **CD49e**: Erkennt das $\alpha 5$ Integrin des Fibronectinrezeptors VLA-5 und reagierte positiv mit Fibroblasten und EC von Mensch und Javaneraffe.
- 3) **Anti HLA,B,C**: Erkennt ein monomorphes Epitop auf dem MHC Klasse I Komplex und reagierte ebenfalls positiv mit EC und Fibroblasten von Mensch und Javaneraffe.

Die Marker CD49e und HLA,B,C wurden als Positivkontrollen für isolierte Zellen verwendet. Der Marker CD90 wurde zur Bestimmung des Anteils von kontaminierenden Fibroblasten verwendet. Die isolierten Zellen (Tiere 192, 75B und 075) enthielten zwischen 2-8% kontaminierende Fibroblasten.

6.2.3.3 Detektion einer potentiellen PERV-Infektion im Interponat oder daraus isolierter Zellen

In nachstehender Tabelle sind die Ergebnisse aus den Untersuchungen dargestellt. Die einzelnen Ergebnisse werden in folgenden Abschnitten einzeln behandelt.

Tier	192	57B	075	679	513	673
PCR:						
PBL (Empfängertier)	negativ	Tag1 neg. Tag6 pos.	Tag1/13neg. Tag6 pos.	Tag6/13 neg. Tag19 pos	negativ	negativ
Interponat	positiv	positiv	n.d.	positiv	positiv	positiv
Isolierte Zellen (aus Interponat)	positiv	>5.Pas. negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
RT-PCR:						
Plasma	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
RT-Assay:						
Zellkulturüberstand	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
Serum	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
Westernblot:						
Plasma	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ

Tabelle 9: Auflistung der Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen, Details sind in den entsprechenden Kapiteln erläutert

6.2.3.3.1 Nachweis von Proviren über PCR

Die Aufarbeitung der Gewebeproben bzw. der isolierten Zellen erfolgte dabei über den enzymatischen Verdau mit Proteinase K. Für den Nachweis von PERV-Transmission wurden äußerst sensitive PERV *pol* Primer verwendet. Um falsch positive Signale aufgrund kontaminierender porciner DNA weitestgehend auszuschließen, wurden noch etwas sensitivere mitochondriale schweinespezifische Primer parallel verwendet. Proben, die sich in der porcine- und PERV-spezifischen PCR positiv zeigten, wurden mit einem anderen PERV-Primerpaar untersucht. Falsch positive Ergebnisse aufgrund kontaminierender XE1/2 PCR-Produkte können dadurch ausgeschlossen werden. Kontaminationen, welche durch porcines Gewebe bzw. DNA verursacht worden sind, ließen sich so nicht nachweisen.

Aus diesem Grund wurden alle, in der Tabelle als „positiv“ in der PCR vermerkten Proben, in einer quantitativen „real time“ PCR von unserem Kooperationspartner Dr. Patience untersucht. Diese PCR ist spezifisch für PERV *pol* und porcinen „swine leucocyte antigen“ (SLA). Durch einen quantitativen Vergleich zwischen PERV- und porcinspezifischer Amplifikaten lassen sich Aussagen bezüglich einer Infektion mit PERV oder einer Kontamination mit porcinen Zellen oder DNA treffen. Aus den Amplifikaten beider Primerkombinationen (PERV*pol*/SLA) zueinander lässt sich ein Verhältnis („Ratio“) bestimmen.

Zur Verdeutlichung dient folgende Grafik:

Porcine Zellen- beinhalten PERV: Ratio $\frac{\text{PERV } pol \text{ Kopien}}{\text{centromere Kopien}}$	=	Nicht infizierte humane Zellen- kontaminiert mit porcinen Zellen: Ratio $\frac{\text{PERV } pol \text{ Kopien}}{\text{centromere Kopien}}$	<	PERV-infizierte humane Zellen- kontaminiert mit porcinen Zellen: Ratio $\frac{\text{PERV } pol \text{ Kopien}}{\text{centromere Kopien}}$
---	---	--	---	---

Im Falle unserer untersuchten Proben ergaben sich keine Hinweise auf Infektionen.

6.2.3.3.2 Nachweis von RT-Aktivität in Zellkulturüberständen

Als ein weiterer Indikator für retrovirale Freisetzung in Zellkulturüberständen wurde ein retrovirale Reverse-Transkriptase (RT)-Assay (modifiziert nach Silver) verwendet. Mit diesem Test wird eine möglicherweise durch PERV freigesetzte RT-Aktivität bestimmt.

Zellkulturüberstände von allen isolierten Zellen in den Passagen 2-4 wurden untersucht. In allen Proben ließ sich keine RT-Aktivität zeigen.

6.2.3.4 Nachweis potentieller PERV-Infektionen des Empfängertiers

6.2.3.4.1 Untersuchung von Lymphozyten des peripheren Bluts mit PERV-spezifischer PCR

PBLs, von den Empfängertieren an verschiedenen Tagen entnommen, wurden lysiert und den bereits beschriebenen verschiedenen PCR-Methoden unterzogen. Positive Proben wurden auch in diesem Fall und zur endgültigen Klärung von Dr. Patience in der „real time“ PCR untersucht. Auch hier ergab sich keine Evidenz für eine PERV-Infektion.

6.2.3.4.2 Untersuchung von Serumproben auf PERV-Partikel mittels RT-PCR

Die Isolierung vorhandener viraler RNA aus dem Serum erfolgte in der Regel über Bindung an Siliciagel-Matrices. Eine PERV-spezifische RT-PCR wurde angewendet, um virale mRNA-Expression in Zellen, vor allem aber, um genomische RNA, verpackt in freigesetzte Virus-Partikel, nachzuweisen.

Zur Quantifizierung der entstehenden Produkte wurde ein interner Standard mit künstlich modifizierten PERV-Sequenzen parallel mit revers transkribiert.

Die untersuchten Plasmaproben zeigten sich alle negativ hinsichtlich einer PERV-mRNA Freisetzung.

6.2.3.4.3 Nachweis von RT-Aktivität im Serum der Empfängertiere

Mit einem kommerziell erhältlichen, für die Detektion einer RT hoch sensitiven Test (Cavidi Tech, Uppsala, Schweden) wurden Serumproben der Empfängertiere untersucht. Dieser Test wurde von unserem Kooperationspartner Dr. Denner am Robert-Koch-Institut in Berlin durchgeführt.

In keiner der untersuchten Serum-Proben zeigten sich Reverse Transkriptase-Aktivitäten.

6.2.3.4.4 Nachweis einer PERV-spezifischen Immunantwort

Reproduktive virale Infektionen ziehen in der Regel eine spezifische Immunantwort nach sich. Um eine produktive PERV-Infektion der Empfängertiere auszuschließen, wurden Seren der Tiere auf anti-PERV Antikörper untersucht.

Aufgereinigte, hochtitrige und auf humane 293-Zellen adaptierte PERVs wurden auf einem denaturierendem Tricin-Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach einem Westernblot mit dem Plasma der Empfängertiere inkubiert.

Diese Untersuchungen wurden ebenfalls im Robert-Koch-Institut von unserem Kooperationspartner Dr. Denner durchgeführt.

In allen getesteten Plasmaproben ließen sich keine PERV-spezifischen Antikörper nachgeweisen.

7 Diskussion

7.1 Knock out der porcinen α -1,3 Galaktosyltransferase

Immunologische Abstoßungsreaktionen sind, neben infektiologischen Risiken insbesondere durch PERV, die Hauptprobleme bei der diskordanten Schwein auf Mensch Xenotransplantation. Mit Hilfe molekularbiologischer und genetischer Methoden wurden transgene Spendertiere, welche humane Komplementregulatorproteine wie bspw. DAF oder CD59 exprimieren, generiert. Bei Verwendung solcher Spendertiere konnte erstmals die hyperakute Abstoßung (HAR) überwunden und die darauf folgende akut vaskuläre Abstoßung (AVR) untersucht werden. Der Grossteil der natürlichen und induzierten Antikörper sind dabei gegen Gal α -1,3 Gal Strukturen auf porcinen Organen gerichtet. Das α -Galepitop wird durch das Enzym Galaktose α -1,3 Galaktosyltransferase synthetisiert. Eine Inaktivierung des entsprechenden Gens im Schwein wird international als der nächste nötige Schritt zur dauerhaften Überwindung der Abstoßungsreaktionen angesehen.

Ein großer Teilbereich der hier vorliegenden Arbeit betraf die Konstruktion eines α -1,3 Gal GT knock out Vektors. Mit diesem sollte zum einen eine porcine Gal KO Endothelzelllinie erzeugt und zum anderen in Zusammenarbeit mit der FAL in Mariensee ein Gal KO-Schwein hergestellt werden. Diese herzustellende porcine Gal KO-Endothelzelllinie sollte einerseits die Charakterisierung Gal-unabhängiger xenoreaktiver Epitope innerhalb eines Expressionsklonierungsprojektes ermöglichen. Darüber hinaus würde diese Zelllinie die Untersuchungen erlauben, ob aus einem Gal KO-Schwein freigesetzte PERVs ein verändertes Infektionsverhalten aufweisen.

7.1.1 Herstellung des α -1,3 Gal GT „Gene targeting“-Vektors

Zur Inaktivierung eines Gens über homologe Rekombination können zwei verschiedene Arten von Vektoren verwendet werden. Bei Insertionskonstrukten wird die gesamte Vektorsequenz in das gewünschte Gen integriert, die normale Genstruktur wird dabei durch das Einfügen der neuen Sequenzen zerstört. Replacementkonstrukte hingegen enthalten zwei flankierende homologe Sequenzen, zwischen denen sich die in das Gen einzubringenden Vektorbereiche, wie bspw. eine Antibiotikaresistenz, befinden. Durch ein doppeltes Cross-over in den beiden homologen Regionen mit dem Zielgenom wird die Originalsequenz durch entsprechende Vektorsequenzen ersetzt.

Bei der Verwendung von Insertionskonstrukten besteht die Gefahr, dass die zur Inaktivierung des Gens eingefügten Vektorsequenzen durch Spleißvorgänge wieder eliminiert werden, was zu einer Reaktivierung des Gens führen kann. Aus diesem Grund hatten wir uns entschieden, alle katalytisch aktiven Bereiche des Gens durch homologe Rekombination mit einem Replacementvektor zu entfernen.

Homologe Rekombinationen sind in somatischen Zellen oder Zelllinien sehr seltene Ereignisse. Die Wahrscheinlichkeit, dass Gene-targeting“-Konstrukte homolog rekombinieren ist deshalb deutlich geringer als die Wahrscheinlichkeit, dass sie zufällig integrieren. Bei klassischen „Gene targeting“-Vektoren, bei denen das Selektionsgen in der Regel unter Kontrolle eines ubiquitären Promotors exprimiert wird, wird der Anteil zufällig integrierter Klone durch Verwendung eines Negativselektionsmarkers außerhalb der homologen Bereiche um maximal Faktor 10 verringert.

Durch die Verwendung von promotorlosen Vektoren, sog. „Promotor trap“-Vektoren“, wird die Rate dieser zufälligen Integrationen, und damit der falsch positiven Klone, dagegen um den Faktor 100-500 verringert (137, 283). „Promotor trap“-Vektoren (s. Kap.3.2.1) besitzen keinen eigenen Promotor. Die Ablesung des Antibiotikaresistenzgens kann nur nach Integration hinter einen sich in 5'-Richtung der Integrationsstelle befindlichen Promotor geschehen. Der zu generierende Vektor ist dabei so konzipiert, dass im Falle einer homologen Rekombination des Konstrukts der endogene Promotor der α -1,3 Gal GT die Expression des Selektionsgens steuert.

Die homologe Rekombination sollte über zwei, sich im Vektor befindliche homologe Bereiche, das Intron4 und die 3'UTR des α -1,3 Gal GT Gens, vermittelt werden. Die Promotorbereiche der α -1,3 Gal GT befinden sich in Exon1-3 (91), das Startkodon in Exon4. Das Gen würde durch cross-over über den gesamten kodierenden Bereich, bis auf 22bp nach dem Startkodon, eliminiert werden.

Anfangs war die Verwendung des Intron3, also vor dem Startkodon gelegen, geplant. Die genomische Organisation der α 1,3 Gal GT im gesamten Bereich der 3'-UTR war jedoch zu Beginn der Arbeit nicht bekannt. In einer 1998 erschienenen Arbeit von Katayama (93) wurden erstmals 216bp des Intron3 am 5'- Ende vorgestellt. Mit Hilfe von nach Restriktionsendonukleasenverdau gewonnene Fragmenten (nach Kartierung und Southern Blots mit Sonden des Exon5) aus den zur Verfügung stehenden BAC-Klonen und Sequenzinformationen der Publikation wurde mehrfach versucht, Bereiche des Intron3 zu klonieren (Daten nicht gezeigt).

Dieses gelang jedoch leider nicht. Mittlerweile ist bekannt, dass das Intron3 eine Größe von 15kb hat (90) und demnach für eine Klonierung in einen Gene targeting Vektor wohl zu groß gewesen wäre.

Da die benötigten Sequenzinformationen zur Klonierung des Intron4 (Exon4 und Exon5) publiziert waren, wurde das komplette Intron4 in einer Long Distance PCR amplifiziert und in einen TA-Vektor kloniert. Mit zunehmender Größe der homologen Bereiche des Vektors steigen die Frequenzen von Rekombinationsereignissen an (284, 285). Laut Literatur sollten diese in einem „Gene targeting“-Vektor eine Länge von 5-10kb an einem Ende und 0,5-3kb am anderen Ende aufweisen. Das Intron4 mit einer Länge von 6,5kb erschien daher geeignet für den knock out Vektor.

Die Klonierung der 3'UTR erfolgte ebenfalls in einen TA-Vektor. Für die Translation des in den Vektor eingebrachten Antibiotikaresistenzgens war die Einfügung einer IRES-Sequenz nötig. Diese Sequenz erlaubt die parallele Translation zweier offener Leserahmen. Als zusätzliche Sicherheit zur Inaktivierung der α -1,3 Gal GT wurden drei Stopkodons, je Leserahmen eines, vor die IRES-Sequenz kloniert.

Dieser Bereich aus homologen Sequenzen, Stopkodons, IRES-Sequenz und Antibiotikaresistenzgen („Kassette“) sollte auf beiden Seiten von loxP-sites flankiert werden. Diese sollten dazu dienen, um im weiteren Verlauf die Option zu besitzen, die im porcinen Genom integrierte Kassette wieder herauszuschneiden und somit die Antibiotikaresistenz zu eliminieren.

Da davon auszugehen ist, dass die Inaktivierung des Gens nur eines Allels für die komplette Eliminierung der Galepitope nicht ausreichend sein würde, sollten zwei identische Vektoren mit allerdings verschiedenen Antibiotikaresistenzgenen (Neomycin und Zeozin) ausgestattet werden.

Um zu überprüfen, ob die Sequenzen der porcinen BAC-Klone mit den publizierten Sequenzen des α -1,3 Gal GT-Gens übereinstimmen, bzw. um festzustellen, wie groß hier die Variationen sind, sollten diese mit Primern aus der 3'UTR sequenziert werden. Sequenzierungen von BAC-Klonen, stellten zum damaligen Zeitpunkt, bedingt durch deren Größe von ca.200kb, selbst für Firmen, die Sequenzierungen kommerziell anbieten, ein Problem dar. Nach der Etablierung einer modifizierten Aufreinigungsmethode unter Verwendung von ProcipitateTM (250) gelang deren Sequenzierung in guter Qualität. Das 6,5kb große Intron4 ließ sich erstmals in der LD-PCR mit nach dieser Methode aufgereinigten BACs darstellen.

Die sequenzierten Klone (339, 544 und 754) zeigten im Vergleich zu den publizierten Sequenzen Homologien zwischen 85-98%. Diese Werte waren erwartungsgemäß und können z.T. auf Sequenzierungsartefakte zurückgeführt werden. Eine weitere Begründung ist, dass zur Generierung der publizierten Sequenz und der BAC-Library unterschiedliche, also nicht isogene, DNA zugrunde lagen, genannt werden. Da es sich bei dem sequenzierten Bereich um die nicht kodierende 3'UTR handelt, ist nicht zu erwarten, dass die Sequenz innerhalb einer Spezies besonders hoch konserviert ist.

Die Verwendung isogener DNA zur Generierung von KO Vektoren scheint nach neueren Literaturhinweisen keinen oder kaum Einfluss auf den Erfolg einer homologen Rekombination zu besitzen (137, 283, 286).

7.1.1.1 Der α -1,3 Gal GT knock out Vektor pMW8 Neo

Nach Generierung sämtlicher Subklonierungsvektoren gelang auch der letzte Schritt, das Einbringen der Antibiotikaresistenzkassette in den mit NotI und EcoRV geöffneten Vektor pCRXL (mit Intron4 und 3'UTRs). Ein erster Gal KO-Vektor mit Neomycinresistenz wurde recht kloniert, zeigte allerdings bei Kontrollen in der PCR, gerade bei Verwendung des Primers XE124, unklare Ergebnisse. Dieser stellt den zu XE82 reversen Primer dar und befindet sich im Exon5. Nach einer Sequenzierung des entsprechenden Klonierungsbereichs wurde eine bisher übersehene zusätzliche Restriktionsschnittstelle von EcoRV 175bp entfernt vom 3'-Ende des Intron4 detektiert.

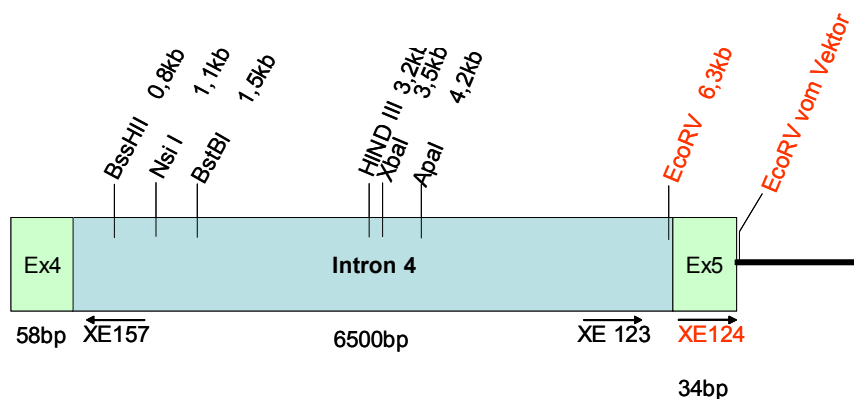


Abbildung 31: Darstellung des klonierten Intron4 mit flankierenden Exon-Bereichen. In rot dargestellt die detektierte Klonierungsstelle für EcoRV und der zur Charakterisierung verwendete Primer XE124

Wegen seiner Größe von 189bp im Vergleich zu 11,6kb des Vektors war das Fragment bei vorherigen analytischen Verdauen nicht sichtbar. Da die fehlenden Basen die 5'-Spleißstelle des Exon5 enthalten, welche zur posttranskriptionalen Eliminierung von Intron4 benötigt wird, mussten neue Gal KO-Vektoren generiert werden. Der Ausgangsvektor pCRXL (mit Intron4 und 3'-UTR) wurde jetzt über einen Partialverdau mit EcoRV und NotI geöffnet. Dabei sollen über einen nur unvollständigen EcoRV-Verdau auch Vektorklone erstellt werden, bei denen das 189bp Fragment noch enthalten ist. Eine vor der Klonierung stattfindende Selektion auf genau diese benötigten Vektorklone ließ sich nicht bewerkstelligen. Die Anzahl der zu testenden Klone erhöhte sich damit beträchtlich.

Der dann auf diesem Wege generierte Vektor pMW8Neo wurde mit Hilfe unterschiedlicher Methoden detailliert überprüft. Entscheidend waren vor allem die PCRs mit dem Primer XE124. Primerkombinationen mit diesem Primer ergeben nur dann Amplifikate bei Vorhandensein des vollständigem Intron4 und zeigen damit auch die Existenz der 3'Spleißstelle im Exon5. Alle verwendeten Primerkombinationen zeigten die erwarteten Amplifikate. Die Sequenzierung beider Allele der 1,9kb großen Kasette, wie auch die Vielzahl durchgeführter Restriktionsverdau, ergaben die für eine korrekte Klonierung erwarteten Ergebnisse.

Der Gal KO-Vektor wurde sodann Prof. Niemann vom FAL Mariensee zur Verfügung gestellt. Dieser wird zurzeit noch für die Generierung von Gal α -1,3 Gal GT defizienten porcinen Fibroblasten verwendet. Mit diesen soll im folgenden mit Hilfe der Kerntransfertechnik ein Gal KO Schwein hergestellt werde.

7.1.1.2 Ansätze zur Herstellung eines KO-Vektors mit Zeozinresistenz

Die Generierung sämtlicher Subklonierungsvektoren war erfolgreich. Nur der letzte Klonierungsschritt, das Einbringen der Antibiotikakasette in den durch Partialverdau mit EcoRV und NotI geöffneten Vektor pCRXL (mit Intron4 und 3'UTR) analog zu pMW8Neo gelang nicht. Eine Vielzahl verschiedener Modifikationen des vorher erfolgreich angewendeten Klonierungsprotokolls wurde getestet.

1) Linearisierung des Vektors:

Unterschiedlichste Variationen hinsichtlich der verwendeten Enzymmenge von NotI/EcoRV, der Reihenfolge bzw. Zeit der Restriktionsverdau und anschließendem Dephosphorylieren des Vektors wurden vorgenommen.

2) Zur Isolierung der Zeozinkassette aus pSVKeo Zeozin

Es wurden ebenfalls unterschiedliche Konzentrationen der zur Excision verwendeten Restriktionsenzyme Sall/NotI verwendet. Zur Klonierung in die im Vektor vorhandene EcoRV-Schnittstelle war die Generierung glatter Enden des Fragments nötig. Dieses wurde mit Hilfe verschiedener Enzyme wie der Klenow-Polymerase, Mung Bean-Polymerase und der S1-Nuklease bewerkstelligt und getestet.

32 verschiedene Klonierungsansätze mit anschließender Analyse vieler gewonnener Klone wurden durchgeführt. In folgender Tabelle sind die Analysen der untersuchten Klone zusammengefasst:

Größe des Plasmids	Prozentuale Zusammensetzung	Aussage
2-3kb	ca. 60,0 %	Kontamination/Rekombinationsereignisse
4,5kb	ca. 38,0 %	Vektor pSVKeo mit Zeozin Ursprungsvektor)
12kb	ca. 2,0%	Religierter Vektor pCRXL (Intron4 + 3'UTR)
14kb	ca. 1,0%	Gewünschter Vektor

Tabelle 10: Analyse der untersuchten Klone zur Klonierung des Gal KO-Vektors mit Zeozinresistenz

Die Dephosphorylierungsreaktion mit alkalischer Phosphatase hat in der Regel zufriedenstellend funktioniert, dieses ist erkennbar an nur ca. 2% religierten pCRXL (mit Intron4 und 3'UTR)-Vektoren.

Der Anteil von fast 40% pSVKeo mit Zeozin ist sicher als zu hoch anzusehen. Begründen lässt sich das Ergebnis durch die Verwendung des Restriktionsenzym Sall. Sall schneidet „supercoiled“ Plasmid-DNA sehr schlecht (meine und die Erfahrung anderer Arbeitsgruppen). Um doch DNA/Plasmide vollständig zu verdauen, müssen größere Enzymmengen eingesetzt werden. Dann wiederum besitzt Sall eine „Staraktivität“, d.h. auch nicht genau der Erkennungssequenz entsprechende DNA-Bereiche werden geschnitten (287). Dies wiederum könnte eine mögliche Erklärung für den häufigen Nachweis der vielen 2-3kb kleinen Plasmide in den untersuchten Klone darstellen. Eine Umkehrung der Reihenfolge der einzusetzenden Restriktionsenzyme, wie beim Öffnen des Vektors möglich, ließ sich hier, bedingt durch die Klonierungsstrategie über NotI und einer geglätteten Restriktionsschnittstelle nicht durchführen.

Ebenfalls suboptimal ist sicherlich die sich nach Sall-Verdau anschließende Glättung der Schnittstelle verlaufen. Das „Blunden“ mit der S1-Nuklease wurden, bedingt durch einen doch nicht unerheblichen Abdau des Plasmids, nach kurzer Zeit wieder eingestellt.

Mehrere direkte Vergleiche zwischen Klenow-Polymerase, welche als Teil der DNA Polymerase I freie Enden auffüllt, und der Mung Bean Nuklease, welche Einzelstrang-DNA/RNA entfernt, wurden durchgeführt. Bei Verwendung der Klenow-Polymerase fand sich im Schnitt die vierfache Menge an resistenten Bakterienklonen, so dass die letzten 5 Klonierungen nur noch mit Klenow-Polymerase durchgeführt wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Großteil der analysierten Bakterienklone, welche den Ursprungsvektor pSVKeo mit Zeozin enthielten, wahrscheinlich durch Religation von, nur mit NotI verdauten, Vektoren entstanden ist.

Es wurden immerhin 24 Bakterienklone mit der erwarteten Plasmidgröße von 14kb gefunden. Leider befand sich in keinem der Klone das 189bp-Fragments des Intron4/Exon5. Das ist zurückzuführen auf einen vollständigen Verdau des Vektors mit EcoRV. Es scheint eine Präferenz für die EcoRV Schnittstelle im Intron4 im Vergleich zu der EcoRV-Schnittstelle des Vektors zu geben.

Ein Ansatz zur Reduktion von falsch positiven Bakterienklonen wäre die Eliminierung der religierten pCRXL- bzw. pSVKeo-Vektoren gewesen. Dieses lässt sich durch den Verdau des Ansatzes nach erfolgter Ligation mit einem, nur in den religierten Vektoren schneidenden, Restriktionsenzym ermöglichen. Meistens handelt es sich um eines der zur Klonierung verwendeten Enzyme. Einen entsprechenden Restriktionsverdau habe ich häufig mit guten Erfolgen bei anderen Klonierungen durchführen können. Leider ließ sich bei diesen Ansätzen kein entsprechendes Restriktionsenzym finden. Die NotI-Erkennungssequenz befindet sich erfolgter Ligation auch wieder im fertigen Vektor und Sall schneidet leider auch im Intron4.

Der Misserfolg der Subklonierung von der Zeozinkassette in pCRXL (mit Intron4 und 3'UTR) scheint in der Zeozinkassette bzw. deren Sequenz, begründet zu sein. Die im letzten Absatz erläuterten Erklärungsversuche treffen auf die Klonierung der Neomycinresistenz im selben Maße zu. Demnach ist dieser Klonierungsansatz mit Generierung des pMW8Neo relativ schnell gelungen.

7.1.1.2.1 Alternative Strategie zur Herstellung des Zeozinvektors

Als sich abzeichnete, dass die Klonierung des Gal KO-Vektors mit Zeozinresistenz nicht ohne weiteres gelingen würde, wurde nach Alternativen für den geplanten Klonierungsweg gesucht. Zwei Ansätze waren der „TA-Klonierung“ nachempfunden.

- 1) Der pCRXL-Vektor wurde nach NotI-Verdau und Glätten der Schnittstellen mit Klenow-Polymerase durch Taq-Polymerase mit 3'überhängenden Thymidinen versehen. Das Insert wurde über Sall/NotI aus dem Vektor herausgeschnitten, durch Taq-Polymerase mit Adenin versehen und mit dem Vektor ligiert. Nach der Elektroporation waren viele Klone vorhanden. Doch diese waren mit 2-3kb viel zu klein oder stellten sich als religierten pSVKeo-Klone heraus. Im Grunde bestätigten sich damit die Probleme des vorher durchgeführten Klonierungsansatzes. Da, bis auf Verwendung der Taq-Polymerase zur Generierung eines Thymidin/Adenin-Überhangs, dieselben Methoden verwendet worden waren, und vor allem ebenfalls ein Sall-Verdau durchgeführt wurde, war das Ergebnis nicht erstaunlich.
- 2) Bei der zweiten Alternativstrategie wurde das Insert durch PCR-Mutagenese mit Schnittstellen für das Restriktionsenzym XcmI versehen, aus dem Gel aufgereinigt und mit XcmI verdaut. Der Vektor pCRXL (Intron4 und 3'UTR) wurde mit NotI geschnitten und durch Taq-Polymerase mit einem Adenin versehen. Es erfolgte dann eine normale Ligation mit T4-Ligase. Die mit der Methode generierten Klone enthielten nur Plasmide einer Größe zwischen 3-5kb. Um religierte Vektoren handelte es sich hier nicht. Der in der PCR eingesetzte Ausgangsvektor wurde durch Verdau mit dem Restriktionsenzym DpnI eliminiert. DpnI hat mit 4 Basen eine sehr kurze Erkennungssequenz, schneidet allerdings nur methylierte DNA. PCR-Amplifikate besitzen im Gegensatz zu den aus normalen *E.colis* gewonnenen Plasmiden, keine Methylierung.

Auf die genaue Analyse der gefundenen Klone ließ sich keine weitere Zeit verwenden, so dass nicht geklärt ist, um welche Art von Plasmiden es sich dabei handelte.

Die Bemühungen, einen Gal KO-Vektor mit Zeozinresistenz zu gewinnen, wurden nach einiger Zeit eingestellt.

7.1.2 Inaktivierung des α -1,3 Gal GT Gens in der porcinen Endothelzelllinie

PEDNSV

Aufgrund des schlechten Zellkulturverhaltens der PED2*3 musste eine Inaktivierung der α -1,3 Gal GT im Wildtyp PEDNSV durchgeführt werden. Dieses bedeutete aber, dass für die Herstellung einer Gal α 1,3-Gal defizienten Zelllinie nacheinander beide Allele inaktiviert werden müssen.

Nach Transfektion mit dem Gal KO-Konstrukt sollte ein stabiler, auf einem Allel deletierter, Klon gewonnen werden. Bei diesem sollte anschließend eine transiente Transfektion mit einem mit CMV-Promotor und einem Gen für Cre-Rekombinase versehenen Vektor (wurde uns freundlicherweise von Prof. Niemann zur Verfügung gestellt) stattfinden. Durch transiente Expression des Enzyms Cre-Rekombinase würde im Zellgenom die Neomycinkassette eliminiert werden. Nach Isolierung eines neuen stabilen Klons würde dieser in einer zweiten Transferrinfektion mit demselben Gal KO-Konstrukt erneut transfiziert werden.

Um die Effizienz des „Gene targetings“ in PEDNSV auf ein akzeptables Maß zu erhöhen, musste zuerst eine effiziente Methode zur Transfektion von PEDNSV-Zellen etabliert werden. Porcine Endothelzellen sind bekanntermaßen extrem schwierig zu transfizieren sind, daher war dies von besonderer Bedeutung.

In zwei von der Arbeitsgruppe von Prof. Lechler (274, 275) vorgestellten Arbeiten wurden mit Hilfe der Transferrinfektion (258, 259, 270) humane, Kaninchen-Endothelzellen und vor allem porcine Endothelzellen mit guten Erfolgen transfiziert.

Bei dieser Methode handelt es sich um eine Transferrinrezeptor-vermittelte Endozytose mit kationischen Liposomen (Lipofektion).

Eine Voraussetzung zur Erprobung dieser Methode ist die Existenz von Transferrinrezeptoren auf der porcinen Endothelzelllinie PEDNSV. Diese konnte über RT-PCR nachgewiesen werden (s. Kap.6.1.4.1.1).

Ein Transfektionsprotokoll unter Verwendung von Lipofectin, einem relativ neuen Transfektionsreagenz speziell für Endothelzellen, dem Vektor pMW8Neo und Holo-Transferrin wurde etabliert. Mit einem Maximum von ca.40% transfizierter PEDNSV-Zellen wurden gute Voraussetzungen für die geplante Transfektion mit pMW8Neo geschaffen. Für die Selektion resistenter Klone wurde eine Konzentration von 0,8 μ g/ml G418 als optimal ermittelt.

7.1.3 Charakterisierung der durch Transferrinfektion gewonnenen G418-resistente Klone

Aus den Transferrinfektionen unter Verwendung des mit MluI linearisierten pMW8Neo resultierten insgesamt 78 G418-resistente Klone. Von diesen ließen sich 34 als stabile, G418-resistente, Zelllinien isolieren.

Gründe für die Reduktion der primär vorhandenen Zellklone waren einerseits Verluste beim ersten Transfer zur Isolierung mit den „Cloning Discs“ in neue 24 well Platten. Zusätzlich stellten sich andere Klone im Laufe der ersten Wochen als nicht stabil G418-resistent heraus.

Aus den 34 stabil transfizierten Klonen wurde die genomische DNA isoliert und mit unterschiedlichen Primerkombinationen in der PCR untersucht. Auf diese Weise sollte geklärt werden, ob das Gal KO-Konstrukt in den Klonen jeweils homolog rekombiniert ist oder zufällig ins Genom integriert wurde. Für diesen Nachweis wurden insgesamt 7 Kombinationen mit mindestens ebenso vielen einzelnen PCR-Reaktionen durchgeführt.

Über die Ergebnisse der PCR aus den verwendeten Primerkombinationen lassen sich folgende Aussagen treffen:

- A1/A2) Ein Teil der Vektorsequenz aus der Kasette befindet sich in der Zielzelle
(Primer binden zwischen Neomycinresistenzgen und poly(A) site)
- B) Stellt die Positivkontrolle für die Integrität der genomischen DNA dar
(Primer spezifisch für die 3'UTR der porcinen α -1,3 Gal GT)
- C1/C2) Das Konstrukt ist homolog integriert
(Insgesamt 6 Kombinationen aus je einem Primer, der in pMW8Neo greift, und einem Primer spezifisch für den 3'UTR-Bereichs des α -1,3 Gal GT-Gens hinter der im Vektor enthaltenen Sequenz)
- D/E) Zufällige Integration des Gal KO-Konstrukts in die Zielzelle hat stattgefunden
(Die Primer amplifizieren Bereiche aus dem Vektor, die bei einer homologen Rekombination nicht mehr vorhanden sein sollten)

Bei allen Klonen führte mindestens eine der durchgeführten PCR's zum erwarteten Fragment, d.h. die genomische DNA von allen Klonen war intakt.

Die Verwendung der Primerkombinationen D/E zeigte, dass mindestens 21 der 34 Klone zufällig ins Genom integriert worden waren. In den betreffenden Klonen ließen sich noch die 3'- bzw. 5'- flankierenden Vektorsequenzen darstellen.

Fünf der verbleibenden 13 Klone waren nur für das Gal-Gen positiv, d.h. die eingesetzte DNA war in Ordnung, zeigten jedoch bei Verwendung der Primer A1/A2 kein Amplifikat, d.h. Vektorsequenzen waren nicht nachweisbar. Die Primer 132/158 binden beide, nur durch 160bp getrennt, zwischen Neomycinresistenzgen und poly(A)site. Möglicherweise ist ein Strangabbruch hinter der Neomycinresistenz erfolgt. Zur Transkription der Antibiotikaresistenz könnte eine andere, sich zufällig im Gen befindliche, poly(A) site verwendet worden sein. Zur genaueren Klärung hätten noch andere Primer verwendet werden müssen. Eine andere Möglichkeit ist auch eine inkomplette homologe Rekombination, bei der eine Seite des Vektors zufällig integriert ist. Bei den betreffenden Klonen könnte es sich auch um nicht transfizierte Klone mit einer eigenen, erhöhten Neomycinresistenz handeln.

Acht Klone zeigten mit Verwendung der Vektorprimer und der Kontrollprimer für das Gal-Gen die erwarteten Amplifikate. Leider zeigten sich bei den Primerpaaren C1/C2 keine Amplifikate. Es muss allerdings betont werden, dass für diese Primerkombination keine Positivkontrolle existiert. Die Primer XE132/XE158 entsprechen Vektorsequenzen. Die Primer XE153-155 sind spezifisch für einen Bereich der 3'UTR, der nicht mehr in pMW8Neo vertreten ist. Alle Primer wurden natürlich einzeln mit anderen geeigneten Primern getestet, doch in Kombination miteinander war dies bedingt durch eine nicht vorhandene Kontroll-DNA nicht möglich. Es ist also denkbar, dass sich aus den isolierten Klonen mit den verwendeten Primern aus unbekanntem Gründen keine Amplifikate in der PCR darstellen lassen.

Mit vier der acht Klone wurde eine FACS-Analyse mit dem Gal-spezifischen Lektin IB4 auf Expression von Gal-Epitopen durchgeführt. Da es denkbar ist, dass bei diesen Klonen ein Allel inaktiviert wurde, wäre eine theoretische Reduktion von maximal 50% der Gal-Epitope denkbar, allerdings auf Grund zellulärer Kompensationsmechanismen nicht unbedingt zu erwarten.

Bei dieser ersten Analyse ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Gal-Expression zeigen.

In letzter Zeit gelang die Generierung Gal α -1,3 Gal GT-defizienter Schafe und Schweine (205, 206). Allen vorangegangen war eine Elektroporation von Fibroblasten mit Promotor trap-Vektoren, die Selektion G418-resistenter Zellen mit der eingesetzten Konzentrationen von 0,1, 0,25 und 0,4 μ g/ml und dem anschließenden Kerntransfer. Bei den Schafen wurden für die homologe Rekombination Exon4/Intron4-Sequenzen verwendet, für die porcinen Fibroblasten Bereiche des Exon9.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der von uns gewählte Ansatz zur Inaktivierung des porcinen Gal α -1,3 Gal GT-Gens mit dem generierten „Promotor trap“-Vektor pMW8Neo als erfolgsversprechend betrachtet werden kann. Als homologe Bereiche zur Inaktivierung der Gal α -1,3 Gal GT wurden ebenfalls das Intron4, mit flankierenden Exon4 und Exon5 Sequenzen, und die 3'UTR aus Exon9 verwendet.

7.2 Untersuchungen zum Infektionsrisiko porciner endogener Retroviren

Die potentielle Übertragung von Krankheitserregern über Speziesgrenzen hinweg stellt eines der Hauptprobleme für die Einführung der klinischen Xenotransplantation dar. In diesem Zusammenhang sind insbesondere die nicht durch konventionelle Zuchtverfahren eliminierbaren porcinen endogenen Retroviren zu nennen. Deren Freisetzung aus porcinen Zelllinien und primären Zellen wurde von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt (Übersicht: (288)). Der *in vitro* Nachweis einer produktiven PERV-Infektion humaner Endothelzellen, welche einen Hauptkontakt eines Xenotransplantatempfängers zu freigesetztem PERVs bilden werden, weist auf ein ernstzunehmendes Infektionsrisiko nach einer Xenotransplantation hin.

In immuninkompetenten SCID-Mäusen wurde auch *in vivo* eine Transmission von PERV beschrieben (218), diese Daten sind allerdings recht umstritten. In einer Vielzahl anderer Kleintiermodelle, z.T. sogar mit zusätzlicher Immunsuppression, ließ sich dagegen keine Übertragung nachweisen. Auch retrospektiv durchgeführte Untersuchungen an Patienten, welche porcine Zellen bzw. porcines Gewebe erhalten hatten (221), oder *in vivo* Infektionsexperimente an Primaten ergaben bisher keine Evidenz für eine PERV-Infektion. Wegen der oben geschilderten relativ geringen Suszeptibilität von Primaten-EC gegen PERV war bisher ein geeignetes präklinisches Modell zur PERV-Infektion nicht verfügbar.

Um die immunologischen Fragestellungen einer Xenotransplantation lösen zu können, erscheint der Einsatz von Schweinen, transgen für humane Komplementregulatorproteine, unerlässlich. Große Hoffnungen beruhen auch auf den kürzlich generierten α -1,3 Gal GT KO-Schweinen (205, 206). Bei Verwendung von Spenderorganen dieser Schweine dürfte eine HAR mit hoher Wahrscheinlichkeit von vorneherein ausgeschlossen sein und auch die Behandlung nachfolgender Abstoßungsreaktionen erscheint in erkennbare Nähe gerückt.

PERVs, als im Genom des Schweins mehr oder weniger fest verankerte Viren exprimieren bei der Freisetzung aus porcinen Organen vermutlich ebenfalls α -Gal Epitope und werden daher wahrscheinlich durch in humanem Serum vorhandene α -Gal-Antikörper sicher eliminiert. Bei Verwendung transgener Tiere, und vor allem der α -1,3 Gal KO-Schweine, ist auf für daraus freigesetzte PERVs eine modifizierte Oberflächenstruktur zu erwarten. Dieses könnte eine verringerte lytische Aktivität des humanen Serums gegen Retroviren bewirken und somit ein größeres Infektionsrisiko in einer Xenotransplantation darstellen (210). Auch zur Unterscheidung daran gekoppelter Fragestellungen würde sich ein praeklinisches Grosstiermodell, in welchem tatsächlich transgene porcine Spenderorgane eingesetzt werden können (im Kleintiermodell nicht möglich) anbieten.

7.2.1 Permissivität primärer humaner Zellen

Die Übertragbarkeit von PERV auf humane Endothelzellen, Fibroblasten und auf Mesangiumzellen, wie auch die produktive Infektion humaner Endothel- und Mesangiumzellen wurde durch Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gezeigt. Nachgewiesen wurde ebenfalls die Existenz von Rezeptoren für PERV-A und PERV-B auf humanen Endothelzellen. (240)

Insbesondere die produktive Infektion humaner Endothelzellen, welche sich nach unseren Daten hochsuszeptibel für PERV-Infektionen zeigen, spricht für ein signifikantes Infektionsrisiko, da neben Leukozyten insbesondere dieser Zelltyp mit aus dem Transplantat stammenden porcinen Zellen und Viren in Berührung kommen würde.

7.2.2 Vorstellung des „Drei-Spezies-Infektionsmodells“

Im Gegensatz zu Kleintiermodellen lässt sich der Einfluss aller Faktoren, welche eine potentielle PERV-Transmission auf Xenotransplantationspatienten erleichtern könnten, in subhumanen Primatenmodellen deutlich besser untersuchen. Alle klinisch relevanten Immunsuppressionsprotokolle, einschließlich Immunabsorption und Komplementinhibierung über lösliche Faktoren, oder der Einsatz transgener Organe können in Primaten (nicht aber in Kleintiermodellen) angewandt werden. Altweltaffen (AWA), wie bspw. Javaneraffen, haben ein dem Menschen sehr ähnliches Immunsystem. Hervorzuheben ist besonders, dass AWA, genau wie der Mensch im Gegensatz zu allen anderen Säugetieren anti-Gal-Antikörper exprimieren.

Endothelzellen (EC) von Primaten, und vor allem von Javaneraffen, scheinen allerdings wesentlich weniger sensitiv für eine PERV-Transmission als humane EC zu sein. Selbst bei Verwendung hoher Virusdosen, verschiedener Immunsuppressiva und humanadaptierter hoch-titriger Viren ließen sich *in vivo* Rhesusaffen, Schweinsaffen und Paviane nicht infizieren (216, 217, 238). Auch Pavian-Endothelzellen konnten *in vitro* nicht infiziert werden (unveröffentlichte Daten der eigenen Arbeitsgruppe)

Mit der Co-Transplantation eines humanen Venensegments, welches mit, für PERV hoch suszeptiblen Endothelzellen ausgekleidet ist, lässt sich in unserem „Drei-Spezies-Infektionsmodell“ eine xenotransplantationsrelevante Situation herstellen. In Javaneraffen wurden aus humaner *V.saphena* generierte Interponate zwischen eine porcine Niere und der *V.cava* des Empfängertiers anastomosiert. Aus der porcinen Niere freiwerdende PERVs geraten unmittelbar in Kontakt mit humanen EC. In fast allen Gefäßabschnitten des Interponates liegt eine laminare Strömung vor; die Flüssigkeiten bewegen sich dabei in zylindrischen Schichten, in denen sich alle Teilchen parallel zur Gefäßachse bewegen. Die einzelnen molekularen Flüssigkeitsschichten verschieben sich teleskopartig gegeneinander, wobei die unmittelbar an der Gefäßwand anliegende Schicht aufgrund der Adhäsion ruht, während sich die zweite gegenüber der ersten, die dritte gegenüber der zweiten usw. verschiebt, so dass ein parabolisches Geschwindigkeitsprofil mit einem Maximum im Axialstrom entsteht („Hagen-Poiseuilleschen Gesetz“). Eine Bindung der PERV-Partikel an ihre, auf den humanen EC befindlichen, Rezeptoren sollte daher möglich sein.

7.2.3 Überlebenszeiten und Untersuchungsplan der Empfängertiere

Eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung experimenteller Infektionsstudien und für eine Kontrolle von Xenotransplantatempfängern sind geeignete diagnostische Tests. Während der letzten Jahre sind durch eine Reihe von Arbeitsgruppen alle notwendigen diagnostischen Methoden zur PERV-Analytik entwickelt und evaluiert worden. Sämtliche Aspekte einer PERV-Transmission, -Replikation und -Expression sowie eine mögliche spezifische Immunantwort können mit folgenden hier angewendeten Methoden erfasst werden:

- 1) Detektion proviraler PERV DNA-Sequenzen und Ausschluss falsch positiver Resultate durch porcinen Mikrochimärismus im Interponat, in aus dem Interponat isolierten Zellen und in PBL des Empfängertieres
- 2) Nachweis von PERV mRNA im Plasma des Empfängertieres
- 3) Erfassung einer Virämie über Messung freigesetzter Reverse Transkriptase Aktivität im Serum des Empfängertiers und im Zellkulturüberstand aus dem Interponat isolierter Zellen
- 4) Detektion einer spezifischen anti-PERV Immunantwort im Plasma des Empfängertier

Die PBLs, Serum- und Plasmaproben der Empfängertiere wurden, beginnend mit einem Tag vor der Xenotransplantation, im wöchentlichen Abstand oder unmittelbar vor Tod der Empfängertiere entnommen.

Die hier untersuchten Empfängertiere überlebten 2 bis 19 Tage mit intakten, Urinproduzierenden Xenotransplantaten. Ähnliche Zeiträume wären für erste klinische Xenotransplantationen, bei denen vermutlich Patienten mit akutem Organversagen bis zum Erhalt eines humanen Transplantats überbrückt würden (sog. Bridging-Transplantation) zu erwarten. In unserem Modell befanden sich die humanen Interponate für bis zu 19 Tage in engem Kontakt zur porcinen Niere im immunsupprimiertem Empfängertier. Die Verwendung hCD59 transgener Nieren und die Gabe von löslichem C1-Inhibitor verringern eine komplementvermittelte Lyse der aus der porcinen Niere freigesetzten Viren und sollten so theoretisch die Überlebenswahrscheinlichkeit von PERV-Partikeln erhöhen.

7.2.4 Charakterisierung explantierter Interponate und daraus isolierter Zellen

7.2.4.1 Immunhistologische Charakterisierung der Interponate

Entscheidend für die Aussagefähigkeit unseres Modells ist die Integrität einer intakten humanen Endothelzellschicht im explantierten Interponat. Schäden an Endothelien eines Gefäßes, oder auch eines Organs, werden normalerweise durch zirkulierende Endothelzellen oder Endothelzellvorläuferzellen im peripheren Blut wieder hergestellt (289, 290). In unserem Modell würden dazu humane Endothelzellen durch Zellen aus dem porcinen Transplantat oder durch Endothelzellen des Javaneraffen ausgetauscht. Endothelzellen von Javaneraffen sind nach jetzigen Erkenntnissen bei weitem nicht so sensitiv für eine PERV-Transmission wie humane EC.

Aus diesem Grunde waren die immunhistologischen Untersuchungen des explantierten Interponats und die Charakterisierung der EC-Schicht von großer Bedeutung. Zwei verschiedene Antikörperklone spezifisch für den humanen Endothelzellmarker CD31 wurden in der Immunhistochemie verwendet. Zum einen war dies der Klon WM59. Dieser zeigte eine positive Färbung mit der humanen Kontrollvene, aber auch mit der Vene des Javaneraffen. Diese Kreuzreaktivität des Klons wurde bereits in der Literatur beschrieben (281). Klon JC/70A hingegen zeigte bei positiver Anfärbung der inneren EC-Schicht humaner Kontrollvenen keine Färbung der Javaneraffenvene. Damit war dieser Klon bestens geeignet, eine Diskriminierung zwischen humanen und Zellen des Empfängertiers vorzunehmen.

Von Tier 075 war es leider nicht möglich, direkt einen Teil des Interponats für die Immunhistochemie zu verwenden. Die restlichen fünf Interponate der transplantierten Tiere wiesen eine deutliche Anfärbung der inneren Endothelzellschicht über die gesamte Fläche auf. Damit wurde eindeutig gezeigt, dass es sich bei den EC der Interponate auch nach Explantation um humane EC, welche permissiv für eine produktive PERV-Infektion sind, handelt.

7.2.4.2 Durchflusszytometrische Charakterisierung der aus humanen Interponaten isolierter Zellen

Um Aussagen hinsichtlich einer möglichen PERV-Infektion der transplantierten humanen EC zu treffen, wurden die Zellen der Interponate nach Tode des Empfängertiers isoliert und über einen Zeitraum von 10 Passagen kultiviert.

Wie die unter 1.2.3.1. vorgestellten immunhistochemischen Analysen dienten auch die durchflusszytometrischen Untersuchungen zur besseren Charakterisierung der isolierten Zellen. Es war zwar davon auszugehen, gerade nach den immunhistochemischen Befunden der Interponate, dass es sich um vornehmlich humane EC-Zellen handeln würde, aber diese Aussage sollte mit durchflusszytometrischen Analysen weiter unterstützt werden.

7.2.4.2.1 Die Verwendung von Lektinen

Um den Anteil von kontaminierenden porcinen Zellen zu detektieren, wurden die durchflusszytometrischen Untersuchungen mit dem α -Gal spezifischen Lektin IB4 durchgeführt. Bei Zellen der ersten zwei Tieren (192 und 57B) wurden ein Anteil von 0,7-13% porciner Zellen gemessen. Im Fall des von Tier 57B verlor sich dieser Anteil von porcinen Zellen im Laufe der 5.Passage. Zurückzuführen sind beide Kontaminationen wahrscheinlich auf eine chirurgisch ungenaue Entnahme der Interponate auf Seite der porcinen Niere.

Ein möglicher Ansatz zur Diskriminierung humaner EC gegenüber denen der Javaneraffen im FACS stellte die Verwendung des Lektins UEA-1 dar. UEA-1 bindet an α -fukosylierte Glykoproteine und Glykolipide und wurde aus diesem Grunde auch zur Blutgruppendiagnostik (anti-H, Blutgruppe 0) herangezogen.

Die bisher vorliegenden Veröffentlichungen zur Spezifität von UEA-1 sind allerdings ausgesprochen heterogen. In einer Publikation wurde beschrieben, dass EC aller Altweltaffen, außer einiger japanischer Affen, negativ mit UEA-1 reagieren (95). Eine andere Publikation beschreibt ähnliche Ergebnisse mit EC von zwei Makakken-Spezies und Pavianen (291). Daneben fanden sich jedoch andere Arbeiten, die für Paviane und Meerkatzen eine positive Färbung vaskulärer EC beschrieben (292, 293). Christenson berichtete sogar eine Aufreinigung von Rhesus-EC mittels UEA-1 (294). Humane EC wurden bei allen Autoren als eindeutig positiv für UEA-1 beschrieben.

UEA-1 bindet darüberhinaus auch an exokrine Epithelzellen sehr vieler verschiedener Spezies wie Maus, Hund, Schaf, Schwein, Pavianen und Mensch (292), was jedoch für unsere Fragestellung unproblematisch erschien.

Ausgehend von der unklaren Datenlage wurde die Bindung von UEA-1 an alle für unser Modell relevanten Zelltypen ausgetestet.

Eindeutig positiv zeigten sich bei unseren Analysen lediglich humane EC. Die isolierten Javaneraffen-EC hingegen wiesen in der durchflusszytometrischen Untersuchung eine geringe Verschiebung zu den nicht gefärbten Javaneraffen EC auf. Diese war zudem nicht immer deutlich erkennbar und oft sehr diffus. Die Analysen der ersten drei transplantierten Tiere (192, 075, 57B) mit UEA-1 zeigten eine eher den humanen EC ähnliche Anfärbung. Insgesamt betrachtet stellten sich die Analysen mit UEA-1 jedoch als zu unverlässlich heraus. Dies galt genauso für die immunhistochemischen Untersuchungen, welche deshalb bei den letzten drei Tieren nicht mehr durchgeführt wurden.

Eine mögliche Ursache für die unklare Anfärbung der Javaneraffen EC mit UEA-1 scheint in der Tatsache zu liegen, dass die Dichte der fukosylierten Proteine oder Lipide auf den entsprechenden Zellen geringer ist als auf humanen EC. Auch könnte sich die Konformation der fukosylierten Bereiche etwas anders als auf humanen EC darstellen und eine Bindung von UEA-1 erschweren.

Sehr geeignet hingegen zeigte sich UEA-1 zur Diskriminierung von humanen EC zu humanen Fibroblasten. Humane EC waren immer deutlich positiv, wohingegen Fibroblasten sich immer negativ darstellten. Das deckte sich auch mit den Aussagen mehrerer anderer Arbeitsgruppen (279, 280). Da aber bereits mit anti-humanem CD90 ein zuverlässiger Marker zur Verfügung stand, wurden die Bestimmungen zur Analyse vorhandener Fibroblasten mit diesem durchgeführt.

7.2.4.2.2 Der Endothelzellmarker CD31

Auch zur durchflusszytometrischen Analyse wurden beide, in der Immunhistologie bereits verwendeten Antikörperklone, die gegen humanes CD31 gerichtet sind, benutzt.

Der Klon WM59 zeigte sich, wie nach den Befunden aus der immunhistochemischen Untersuchung zu erwarten, als kreuzreagierend mit EC der Javaneraffen.

Klon JC70/A hingegen war in der Publikation von Carter (282) als mit Javaneraffen PBLs in der durchflusszytometrischen Analyse nicht kreuzreagierend beschrieben worden. Wie die durchgeführten FACS-Messungen eindeutig belegen, scheint dies für EC der Javaneraffen nicht zutreffend zu sein. Diese zeigten eine ebenso starke Färbung wie die humanen EC.

Dieser Befund unterscheidet sich interessanterweise von den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchungen. Eine mögliche Ursache für diesen Unterschied könnten Konformationsdifferenzen der jeweiligen Epitope darstellen. Antikörper und Lektine erkennen vor allem räumliche Strukturen auf ihren Zielzellen. Die Vorbereitungen der Gewebe oder Zellen für eine immunhistochemische Untersuchung unterschieden sich sehr von denen für eine durchflusszytometrischen Analyse. Für die Immunhistochemie werden die Zellen mit Hilfe wasserentziehender Chemikalien fixiert und befinden sich nicht mehr in ihrem nativen Zustand. Das hat unweigerlich eine Veränderung von Oberflächenstrukturen zur Folge.

Für die durchflusszytometrischen Analysen wird zur Ablösung adhärenter Zellen, wie es EC sind, das Enzym Trypsin verwendet. Trypsin spaltet dabei neben Alanin und Lysin, dies hat oftmals auch einen großen Einfluss auf die Proteine der Zelloberfläche. Im Falle der Messungen mit CD31 wurde dieser Effekt durch die Verwendung von „Cell Dissociation Solution“ (Fa. Sigma), welche ohne Enzymwirkung eine Ablösung der Zellen bewirkt, umgangen. Vergleichsanalysen zu Trypsin-behandelten Zellen zeigten jedoch in diesem Fall keinen Unterschied.

Hinsichtlich der von uns gewünschten Aussage zur Diskriminierung zwischen humanen und Javaneraffen EC im FACS waren beide Klone nicht zu gebrauchen. Andere Klone von anti-humanem CD31 als die von uns verwendeten, waren kommerziell nicht erhältlich.

7.2.4.2.3 Die Verwendung anderer Marker

Der anti-humane CD90 wurde als Marker für die Analyse von kontaminierenden Fibroblasten in den isolierten Zellen verwendet. Ein Anteil von 2-8% von Fibroblasten zeigt deutlich, dass sich in den aus den Interponaten isolierten Zellen in einem großen Maße EC befinden.

Zusammenfassend konnte auf der Basis der durchgeführten immunhistologischen und durchflusszytoetrischen Analysen konstatiert werden, dass sich im explantierten Interponat eine intakte humane EC-Schicht befand. Die daraus isolierten Zellen enthielten nur zu einem geringen Prozentsatz Fibroblasten und, bei zwei Tieren, kontaminierende porcine Zellen. Das Gros der isolierten Zellen bestand aus EC, dem für die Untersuchung einer möglichen PERV-Transmission relevanten Zelltyp.

7.2.4.3 Detektion potentieller PERV-Infektionen im Interponat oder daraus isolierten Zellen

Ein großes Problem bei der Analyse möglicher PERV Transmission über PCR ist die Tatsache, dass PERVs als endogene retrovirale Elemente natürliche Komponenten porciner DNA sind. Das bedeutet, dass chimäre porcine Zellen oder kontaminierende DNA zu falsch positiven Ergebnissen führen können. Diese Problem des „Mikrochimerismus“ konnte mit der Entwicklung hochsensitiver PCRs spezifisch für mitochondrielle Gene (228, 229) oder repetitiver Zentromer-Sequenzen (218, 221), sowie durch quantitativen Vergleich PERV- und porcinspezifischer Amplifikate unter Verwendung der „Real-Time“-PCR gelöst werden (218, 221). Die Sensitivität der von uns durchgeführten porcine-spezifischen PCR ist dabei mit der Detektion von einer porcinen Zelle, entsprechend etwa 20-50 PERV-Kopien, unter 1×10^7 humanen Zellen sehr hoch.

Die isolierten Zellen und das direkt lysierte Interponat aller sechs Empfängertiere wurden mit Hilfe der PERV *pol* und porcine-spezifischer PCR auf mögliche Proviren untersucht. In einigen Proben wurden porcine Sequenzen nachgewiesen. Ausschließlich Proben, welche auch in den porcine-spezifischen PCRs positiv waren, waren auch PERV positiv.

Sämtliche PERV-Signale in den betreffenden Proben beruhten jedoch auf der Amplifikation aus kontaminierender porciner DNA bzw. PCR-Produkten, nicht jedoch auf der Amplifikation aus infizierten humanen Zellen. Dieses wurde durch quantitative „Real time“-PCRs, durchgeführt von unserem Kooperationspartner Dr. Patience, belegt.

Nach diesen Ergebnissen war der Befund nicht weiter erstaunlich, dass RT-Aktivität im Zellkulturüberstand der isolierten Zellen nicht nachweisbar war.

7.2.4.4 Nachweis einer potentiellen systemischen PERV-Infektion des Empfängertiers

Die aus den Empfängertieren isolierten PBLs wurden ebenfalls mit der in Kap. 1.2.3.3 beschriebenen PCR untersucht. Positive Proben ließen sich ebenfalls auf eine Kontamination mit porciner DNA zurückführen. Diese Daten wurden belegt durch die Untersuchungen von Dr. Patience.

Alle entnommenen Plasmaproben der Empfängertiere wurden über semiquantitative RT-PCR auf PERV-RNA, als Marker für freigesetzte Virionen, untersucht. In keiner der Proben wurde PERV mRNA nachgewiesen. Diese Ergebnisse bestätigen die ebenfalls negativen Ergebnisse bei Verwendung des RT-Assays. Mit diesem ließ sich keine RT-Aktivität in den getesteten Serumproben nachweisen.

Darüber hinaus wurde ein Teil der gesammelten Seren über Western-Blot auf anti-PERV spezifische Antikörper und damit auf potentielle PERV-spezifische Immunantworten als Marker für eine produktive Infektion der Empfängertiere untersucht. Auch diese Untersuchungen lieferten keinen Hinweis auf eine PERV-Infektion.

7.2.5 Zusammenfassende Wertung der Ergebnisse der PERV-Infektionsstudien

Ziel unseres PERV *in vivo* Infektionsmodells war die Untersuchung, ob es unter den Bedingungen einer klinisch anwendbaren Xenotransplantation mit entsprechenden Immunsuppressionsprotokollen und Einsatz transgener Spenderorgane zu einer PERV-Transmission auf humane Endothelzellen kommen kann. Unter allen bisher publizierten Studien zur *in vivo* Untersuchung des Infektionsrisikos von PERVs nach Transplantation porciner Organe auf Primaten kommt dieses Modell einer potentiellen klinischen Xenotransplantationssituation am nächsten. Auch die Verwendung einer Vielzahl von Analysemethoden ergab keinen Hinweis für eine

PERV *in vivo* Transmission auf das humane Interponat, und damit auf PERV-suszeptible humane Endothelzellen, sowie auf das Empfängertier.

Unsere Ergebnisse zeigen – wenn auch mit der Einschränkung der relativ kurzen Expositionszeit von maximal 19 Tagen – dass das Infektionsrisiko durch PERV nach diskordanter Xenotransplantation (Schwein auf Primat) geringer als initial befürchtet zu sein scheint.

8 Literaturverzeichnis

1. Hammer, C., and E. Thein. 2002. Physiological aspects of xenotransplantation, 2001. *Xenotransplantation* 9, no. 5:303.
2. Lawson, J.H., and J.L. Platt. 1996. Molecular barriers to xenotransplantation. *Transplantation* 62, no. 3:303.
3. Hardy, J.D., and C.M. Chavez. 1968. The first heart transplant in man. Developmental animal investigations with analysis of the 1964 case in the light of current clinical experience. *Am J Cardiol* 22, no. 6:772.
4. Reemtsma, K. 1966. Renal Heterotransplantation. *Adv. Surg.* 2:285.
5. Giles, G.R., H.J. Boehmig, J. Lilly, H. Amemiya, H. Takagi, A.J. Coburg, W.E. Hathaway, C.B. Wilson, F.J. Dixon, and T.E. Starzl. 1970. Mechanism and modification of rejection of heterografts between divergent species. *Transplant Proc* 2, no. 4:522.
6. Barnard, C.N., A. Wolpowitz, and J.G. Losman. 1977. Heterotopic cardiac transplantation with a xenograft for assistance of the left heart in cardiogenic shock after cardiopulmonary bypass. *S Afr Med J* 52, no. 26:1035.
7. Barnard, C.N., J.G. Losman, C.A. Curcio, H.E. Sanchez, A. Wolpowitz, and M.S. Barnard. 1977. The advantage of heterotopic cardiac transplantation over orthotopic cardiac transplantation in the management of severe acute rejection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 74, no. 6:918.
8. Bailey, L.L., S.L. Nehlsen-Cannarella, W. Concepcion, and W.B. Jolley. 1985. Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate. *Jama* 254, no. 23:3321.
9. Andersson, A., C.G. Groth, O. Korsgren, A. Tibell, J. Tollemar, M. Kumagai, E. Moller, J. Bolinder, J. Ostman, A. Bjoersdorff, and et al. 1992. Transplantation of porcine fetal islet-like cell clusters to three diabetic patients. *Transplant Proc* 24, no. 2:677.
10. Groth, C.G., O. Korsgren, A. Tibell, J. Tollemar, E. Moller, J. Bolinder, J. Ostman, F.P. Reinholt, C. Hellerstrom, and A. Andersson. 1994. Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. *Lancet* 344, no. 8934:1402.
11. Groth, C.G., A. Andersson, O. Korsgren, A. Tibell, J. Tollemar, M. Kumagai-Braesch, E. Moller, J. Bolinder, J. Ostman, A. Bjoersdorff, and et al. 1993. Transplantation of porcine fetal islet-like cell clusters into eight diabetic patients. *Transplant Proc* 25, no. 1 Pt 2:970.
12. Tibell, A., C.G. Groth, E. Moller, O. Korsgren, A. Andersson, and C. Hellerstrom. 1994. Pig-to-human islet transplantation in eight patients. *Transplant Proc* 26, no. 2:762.
13. Galili, U., A. Tibell, B. Samuelsson, L. Rydberg, and C.G. Groth. 1995. Increased anti-Gal activity in diabetic patients transplanted with fetal porcine islet cell clusters. *Transplantation* 59, no. 11:1549.
14. Galili, U., A. Tibell, B. Samuelsson, L. Rydberg, and C.G. Groth. 1996. Increased anti-Gal activity in diabetic patients transplanted with porcine islet cells. *Transplant Proc* 28, no. 2:564.
15. Heneine, W., A. Tibell, W.M. Switzer, P. Sandstrom, G.V. Rosales, A. Mathews, O. Korsgren, L.E. Chapman, T.M. Folks, and C.G. Groth. 1998. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts. *Lancet* 352, no. 9129:695.
16. Fink, J.S., J.M. Schumacher, S.L. Ellias, E.P. Palmer, M. Saint-Hilaire, K. Shannon, R. Penn, P. Starr, C. VanHorne, H.S. Kott, P.K. Dempsey, A.J. Fischman, R. Raineri, C. Manhart, J. Dinsmore, and O. Isacson. 2000. Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell Transplant* 9, no. 2:273.
17. Jacoby, D.B., C. Lindberg, J. Ratliff, M. Wunderlich, J. Bousquet, K. Wetzel, L. Beaulieu, and J. Dinsmore. 1997. Fetal pig neural cells as a restorative therapy for neurodegenerative disease. *Artif Organs* 21, no. 11:1192.
18. Still, J., B. Craft-Coffman, E. Law, J. Colon-Santini, and J. Grant. 1998. Burns of children caused by electric stoves. *J Burn Care Rehabil* 19, no. 4:364.
19. Makowka, L., G.D. Wu, A. Hoffman, L. Podesta, L. Sher, P.J. Tusso, M. Breda, F.A. Chapman, C. Cosenza, C. Yasunaga, and et al. 1994. Immunohistopathologic lesions associated with the rejection of a pig-to-human liver xenograft. *Transplant Proc* 26, no. 3:1074.
20. Calne, R.Y. 1970. Organ transplantation between widely disparate species. *Transplant Proc* 2, no. 4:550.
21. Kemp, E. 1996. Xenotransplantation. *J Intern Med* 239, no. 4:287.
22. Jensen, J.E., P.B. Jensen, B. Nielsen, C. Koch, S. Larsen, T. Horn, and E. Kemp. 1996. Induced tolerance and flow cytometry analysis of lymphocyte phenotypes in concordant xenograft transplantation. *Transplant Proc* 28, no. 2:721.
23. Platt, J.L., G.M. Vercellotti, A.P. Dalmasso, A.J. Matas, R.M. Bolman, J.S. Najarian, and F.H. Bach. 1990. Transplantation of discordant xenografts: a review of progress. *Immunol Today* 11, no. 12:450.
24. Platt, J.L., and F.H. Bach. 1991. The barrier to xenotransplantation. *Transplantation* 52, no. 6:937.

25. Platt, J.L., B.J. Lindman, R.L. Geller, H.J. Noreen, J.L. Swanson, A.P. Dalmaso, and F.H. Bach. 1991. The role of natural antibodies in the activation of xenogenic endothelial cells. *Transplantation* 52, no. 6:1037.
26. Platt, J.L., R.J. Fischel, A.J. Matas, S.A. Reif, R.M. Bolman, and F.H. Bach. 1991. Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model. *Transplantation* 52, no. 2:214.
27. Galili, U., L. Wang, D.C. LaTemple, and M.Z. Radic. 1999. The natural anti-Gal antibody. *Subcell Biochem* 32:79.
28. Galili, U. 2001. The alpha-gal epitope (Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc-R) in xenotransplantation. *Biochimie* 83, no. 7:557.
29. Galili, U., B.A. Macher, J. Buehler, and S.B. Shohet. 1985. Human natural anti-alpha-galactosyl IgG. II. The specific recognition of alpha (1---3)-linked galactose residues. *J Exp Med* 162, no. 2:573.
30. Galili, U. 1991. The natural anti-Gal antibody: evolution and autoimmunity in man. *Immunol Ser* 55:355.
31. Galili, U. 2001. The nature of elicited xenoantibodies. *Transplant Proc* 33, no. 1-2:688.
32. Good, A.H., D.K. Cooper, A.J. Malcolm, R.M. Ippolito, E. Koren, F.A. Neethling, Y. Ye, N. Zuhdi, and L.R. Lamontagne. 1992. Identification of carbohydrate structures that bind human antiporcine antibodies: implications for discordant xenografting in humans. *Transplant Proc* 24, no. 2:559.
33. Cooper, D.K., A.H. Good, E. Koren, R. Oriol, A.J. Malcolm, R.M. Ippolito, F.A. Neethling, Y. Ye, E. Romano, and N. Zuhdi. 1993. Identification of alpha-galactosyl and other carbohydrate epitopes that are bound by human anti-pig antibodies: relevance to discordant xenografting in man. *Transpl Immunol* 1, no. 3:198.
34. Sandrin, M.S., H.A. Vaughan, P.L. Dabkowski, and I.F. McKenzie. 1993. Anti-pig IgM antibodies in human serum react predominantly with Gal(alpha 1-3)Gal epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, no. 23:11391.
35. Sandrin, M.S., and I.F. McKenzie. 1994. Gal alpha (1,3)Gal, the major xenoantigen(s) recognised in pigs by human natural antibodies. *Immunol Rev* 141:169.
36. Sandrin, M.S., H.A. Vaughan, P.L. Dabkowski, and I.F. McKenzie. 1994. Human naturally occurring antibodies to pig xenografts. *Transplant Proc* 26, no. 3:1392.
37. Parker, W., D. Bruno, Z.E. Holzknecht, and J.L. Platt. 1994. Characterization and affinity isolation of xenoreactive human natural antibodies. *J Immunol* 153, no. 8:3791.
38. Platt, J.L., M.A. Turman, H.J. Noreen, R.J. Fischel, R.M.d. Bolman, and F.H. Bach. 1990. An ELISA assay for xenoreactive natural antibodies. *Transplantation* 49, no. 5:1000.
39. Parker, W., D. Bruno, and J.L. Platt. 1995. Xenoreactive natural antibodies in the world of natural antibodies: typical or unique? *Transpl Immunol* 3, no. 3:181.
40. Bouhours, D., C. Pourcel, and J.E. Bouhours. 1996. Simultaneous expression by porcine aorta endothelial cells of glycosphingolipids bearing the major epitope for human xenoreactive antibodies (Gal alpha 1-3Gal), blood group H determinant and N-glycolylneuraminic acid. *Glycoconj J* 13, no. 6:947.
41. Cooper, D.K. 1998. Xenoantigens and xenoantibodies. *Xenotransplantation* 5, no. 1:6.
42. Zhu, A. 2000. Binding of human natural antibodies to nonalphaGal xenoantigens on porcine erythrocytes. *Transplantation* 69, no. 11:2422.
43. Zhu, A., and R. Hurst. 2002. Anti-N-glycolylneuraminic acid antibodies identified in healthy human serum. *Xenotransplantation* 9, no. 6:376.
44. Bouhours, D., J. Liaigre, J. Naulet, D. Maume, and J.F. Bouhours. 1997. A novel glycosphingolipid expressed in pig kidney: Gal alpha 1-3Lewis(x) hexaglycosylceramide. *Glycoconj J* 14, no. 1:29.
45. Hallberg, E.C., V. Stokan, T.D. Cairns, M.E. Breimer, and B.E. Samuelsson. 1998. Chemical and lectin-gold electron microscopical studies of the expression of the Galalpha1-determinant in the pig aorta. *Xenotransplantation* 5, no. 4:246.
46. Hallberg, E.C., J. Holgersson, and B.E. Samuelsson. 1998. Glycosphingolipid expression in pig aorta: identification of possible target antigens for human natural antibodies. *Glycobiology* 8, no. 7:637.
47. Hinchliffe, S.J., N.K. Rushmere, S.M. Hanna, and B.P. Morgan. 1998. Molecular cloning and functional characterization of the pig analogue of CD59: relevance to xenotransplantation. *J Immunol* 160, no. 8:3924.
48. Harris, C.L., O.B. Spiller, and B.P. Morgan. 2000. Human and rodent decay-accelerating factors (CD55) are not species restricted in their complement-inhibiting activities. *Immunology* 100, no. 4:462.
49. Fiscaro, N., A. Aminian, S.J. Hinchliffe, B.P. Morgan, M.J. Pearse, A.J. D'Apice, and P.J. Cowan. 2000. The pig analogue of CD59 protects transgenic mouse hearts from injury by human complement. *Transplantation* 70, no. 6:963.
50. Roos, A., A.J. Nauta, D. Broers, M.C. Faber-Krol, L.A. Trouw, J.W. Drijfhout, and M.R. Daha. 2001. Specific inhibition of the classical complement pathway by C1q-binding peptides. *J Immunol* 167, no. 12:7052.
51. Holgersson, J., C. Ehrnfelt, E. Hauzenberger, and L. Serrander. 2002. Leukocyte endothelial cell interactions in pig to human organ xenograft rejection. *Vet Immunol Immunopathol* 87, no. 3-4:407.

52. Podack, E.R. 1986. Molecular mechanisms of cytolysis by complement and by cytolytic lymphocytes. *J Cell Biochem* 30, no. 2:133.
53. Roos, A., and M.R. Daha. 2002. Antibody-mediated activation of the classical complement pathway in xenograft rejection. *Transpl Immunol* 9, no. 2-4:257.
54. Hunt BJ, R.R. 1993. The essential role of haemostasis in hyperacute rejection. *Xenotransplantation* 1:16.
55. Robson, S.C., V.K. Young, N.S. Cook, R. Metternich, W. Kasper-Konig, B.A. Lesnikoski, R.N. Pierson, 3rd, W.W. Hancock, D. Candinas, D.J. White, and F.H. Bach. 1996. Thrombin inhibition in an ex vivo model of porcine heart xenograft hyperacute rejection. *Transplantation* 61, no. 6:862.
56. Robson, S.C., D.K. Cooper, and A.J. d'Apice. 2000. Disordered regulation of coagulation and platelet activation in xenotransplantation. *Xenotransplantation* 7, no. 3:166.
57. Rose, A.G., D.K. Cooper, P.A. Human, H. Reichenspurner, and B. Reichart. 1991. Histopathology of hyperacute rejection of the heart: experimental and clinical observations in allografts and xenografts. *J Heart Lung Transplant* 10, no. 2:223.
58. Dalmaso, A.P., G.M. Vercellotti, R.J. Fischel, R.M. Bolman, F.H. Bach, and J.L. Platt. 1992. Mechanism of complement activation in the hyperacute rejection of porcine organs transplanted into primate recipients. *Am J Pathol* 140, no. 5:1157.
59. Palmetshofer, A., U. Galili, A.P. Dalmaso, S.C. Robson, and F.H. Bach. 1998. Alpha-galactosyl epitope-mediated activation of porcine aortic endothelial cells: type II activation. *Transplantation* 65, no. 7:971.
60. Palmetshofer, A., U. Galili, A.P. Dalmaso, S.C. Robson, and F.H. Bach. 1998. Alpha-galactosyl epitope-mediated activation of porcine aortic endothelial cells: type I activation. *Transplantation* 65, no. 6:844.
61. Palmetshofer, A., S.C. Robson, and F.H. Bach. 1998. Tyrosine phosphorylation following lectin mediated endothelial cell stimulation. *Xenotransplantation* 5, no. 1:61.
62. Platt, J.L., S.S. Lin, and C.G. McGregor. 1998. Acute vascular rejection. *Xenotransplantation* 5, no. 3:169.
63. Bach, F.H., H. Winkler, C. Ferran, W.W. Hancock, and S.C. Robson. 1996. Delayed xenograft rejection. *Immunol Today* 17, no. 8:379.
64. Seebach, J.D., C. Comrack, S. Germana, C. LeGuern, D.H. Sachs, and H. DerSimonian. 1997. HLA-Cw3 expression on porcine endothelial cells protects against xenogeneic cytotoxicity mediated by a subset of human NK cells. *J Immunol* 159, no. 7:3655.
65. Murray, A.G., P. Petzelbauer, C.C. Hughes, J. Costa, P. Askenase, and J.S. Pober. 1994. Human T-cell-mediated destruction of allogeneic dermal microvessels in a severe combined immunodeficient mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, no. 19:9146.
66. Warrens, A.N., A.R. Simon, P.R. Theodore, and M. Sykes. 1999. Human-porcine receptor-ligand compatibility within the immune system: relevance for xenotransplantation. *Xenotransplantation* 6, no. 2:75.
67. Goodman, D.J., M. Von Albertini, A. Willson, M.T. Millan, and F.H. Bach. 1996. Direct activation of porcine endothelial cells by human natural killer cells. *Transplantation* 61, no. 5:763.
68. Inverardi, L., B. Clissi, A.L. Stolzer, J.R. Bender, M.S. Sandrin, and R. Pardi. 1997. Human natural killer lymphocytes directly recognize evolutionarily conserved oligosaccharide ligands expressed by xenogeneic tissues. *Transplantation* 63, no. 9:1318.
69. Joziassse, D.H. 1992. Mammalian glycosyltransferases: genomic organization and protein structure. *Glycobiology* 2, no. 4:271.
70. Shur, B.D., S. Evans, and Q. Lu. 1998. Cell surface galactosyltransferase: current issues [In Process Citation]. *Glycoconj J* 15, no. 6:537.
71. Henion, T.R., and U. Galili. 1999. Structure function studies of a New World monkey alpha 1,3galactosyltransferase. Analysis of alternative splicing and expression in baculovirus system. *Subcell Biochem* 32:49.
72. Krivan, H.C., G.F. Clark, D.F. Smith, and T.D. Wilkins. 1986. Cell surface binding site for *Clostridium difficile* enterotoxin: evidence for a glycoconjugate containing the sequence Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc. *Infect Immun* 53, no. 3:573.
73. Galili, U., S.B. Shohet, E. Kobrin, C.L. Stults, and B.A. Macher. 1988. Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem* 263, no. 33:17755.
74. Galili, U., M.R. Clark, S.B. Shohet, J. Buehler, and B.A. Macher. 1987. Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal alpha 1----3Gal epitope in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, no. 5:1369.
75. Larsen, R.D., C.A. Rivera-Marrero, L.K. Ernst, R.D. Cummings, and J.B. Lowe. 1990. Frameshift and nonsense mutations in a human genomic sequence homologous to a murine UDP-Gal:beta-D-Gal(1,4)-D-GlcNAc alpha(1,3)- galactosyltransferase cDNA. *J Biol Chem* 265, no. 12:7055.

76. Joziasse, D.H., J.H. Shaper, E.W. Jabs, and N.L. Shaper. 1991. Characterization of an alpha 1----3-galactosyltransferase homologue on human chromosome 12 that is organized as a processed pseudogene. *J Biol Chem* 266, no. 11:6991.
77. Galili, U., and K. Swanson. 1991. Gene sequences suggest inactivation of alpha-1,3-galactosyltransferase in catarrhines after the divergence of apes from monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, no. 16:7401.
78. Basu, M., and S. Basu. 1973. Enzymatic synthesis of a blood group B-related pentaglycosylceramide by an alpha-galactosyltransferase from rabbit bone marrow. *J Biol Chem* 248, no. 5:1700.
79. Blanken, W.M., and D.H. Van den Eijnden. 1985. Biosynthesis of terminal Gal alpha 1----3Gal beta 1--4GlcNAc-R oligosaccharide sequences on glycoconjugates. Purification and acceptor specificity of a UDP-Gal:N-acetyllactosaminide alpha 1----3- galactosyltransferase from calf thymus. *J Biol Chem* 260, no. 24:12927.
80. Larsen, R.D., V.P. Rajan, M.M. Ruff, J. Kukowska-Latallo, R.D. Cummings, and J.B. Lowe. 1989. Isolation of a cDNA encoding a murine UDPgalactose:beta-D-galactosyl- 1,4-N-acetyl-D-glucosaminide alpha-1,3-galactosyltransferase: expression cloning by gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, no. 21:8227.
81. Joziasse, D.H., N.L. Shaper, D. Kim, D.H. Van den Eijnden, and J.H. Shaper. 1992. Murine alpha 1,3-galactosyltransferase. A single gene locus specifies four isoforms of the enzyme by alternative splicing. *J Biol Chem* 267, no. 8:5534.
82. Joziasse, D.H., J.H. Shaper, D.H. Van den Eijnden, A.J. Van Tunen, and N.L. Shaper. 1989. Bovine alpha 1----3-galactosyltransferase: isolation and characterization of a cDNA clone. Identification of homologous sequences in human genomic DNA. *J Biol Chem* 264, no. 24:14290.
83. Henion, T.R., B.A. Macher, F. Anaraki, and U. Galili. 1994. Defining the minimal size of catalytically active primate alpha 1,3 galactosyltransferase: structure-function studies on the recombinant truncated enzyme. *Glycobiology* 4, no. 2:193.
84. Dabkowski, P.L., H.A. Vaughan, I.F. McKenzie, and M.S. Sandrin. 1993. Characterisation of a cDNA clone encoding the pig alpha 1,3 galactosyltransferase: implications for xenotransplantation. *Transplant Proc* 25, no. 5:2921.
85. Dabkowski, P.L., H.A. Vaughan, I.F. McKenzie, and M.S. Sandrin. 1994. Isolation of a cDNA clone encoding the pig alpha 1,3 galactosyltransferase. *Transplant Proc* 26, no. 3:1335.
86. Sandrin, M.S., P.L. Dabkowski, M.M. Henning, E. Mouhtouris, and I.F.C. McKenzie. 1994. Characterization of cDNA clones for porcine alpha(1,3)galactosyl transferase: The enzyme generating the Gal alpha(1,3)Gal epitope. *Xenotransplantation* 1, no. 1:81.
87. Strahan, K.M., F. Gu, L. Andersson, and K. Gustafsson. 1995. Pig alpha 1, 3galactosyltransferase: sequence of a full-length cDNA clone, chromosomal localisation of the corresponding gene, and inhibition of expression in cultured pig endothelial cells. *Transplant Proc* 27, no. 1:245.
88. Strahan, K.M., F. Gu, A.F. Preece, I. Gustavsson, L. Andersson, and K. Gustafsson. 1995. cDna sequence and chromosome localization of pig alpha 1,3 galactosyltransferase. *Immunogenetics* 41, no. 2-3:101.
89. Shetterly, S., I. Tom, T.Y. Yen, R. Joshi, L. Lee, P.G. Wang, and B.A. Macher. 2001. Alpha 1,3 galactosyltransferase: new sequences and characterization of conserved cysteine residues. *Glycobiology* 11, no. 8:645.
90. Koike, C., R.P. Friday, I. Nakashima, P. Luppi, J.J. Fung, A.S. Rao, T.E. Starzl, and M. Trucco. 2000. Isolation of the regulatory regions and genomic organization of the porcine alpha1,3-galactosyltransferase gene. *Transplantation* 70, no. 9:1275.
91. Mercier, D., B. Charreau, A. Wierinckx, R. Keijser, L. Adriaensens, R. van den Berg, and D.H. Joziasse. 2002. Regulation of alpha1,3galactosyltransferase expression in pig endothelial cells. Implications for xenotransplantation. *Eur J Biochem* 269, no. 5:1464.
92. Vanhove, B., F. Goret, J.P. Soulillou, and C. Pourcel. 1997. Porcine alpha1,3-galactosyltransferase: tissue-specific and regulated expression of splicing isoforms. *Biochim Biophys Acta* 1356, no. 1:1.
93. Katayama, A., H. Ogawa, K. Kadomatsu, N. Kurosawa, T. Kobayashi, N. Kaneda, K. Uchimura, I. Yokoyama, T. Muramatsu, and H. Takagi. 1998. Porcine alpha-1,3-galactosyltransferase: full length cDNA cloning, genomic organization, and analysis of splicing variants. *Glycoconj J* 15, no. 6:583.
94. Ito, N., K. Nishi, S. Kawahara, Y. Okamura, T. Hirota, S. Rand, G. Fechner, and B. Brinkmann. 1990. Difference in the ability of blood group-specific lectins and monoclonal antibodies to recognize the ABH antigens in human tissues. *Histochem J* 22, no. 11:604.
95. Ito, N., K. Nishi, M. Nakajima, Y. Okamura, and T. Hirota. 1990. Relationship between lectin binding properties and the expression of blood group ABH antigens in vascular endothelia and red blood cells from 18 primate species. *Histochem J* 22, no. 2:113.
96. Kirkeby, S., and D. Moe. 2001. Binding of Griffonia simplicifolia 1 isolectin B4 (GS1 B4) to alpha-galactose antigens. *Immunol Cell Biol* 79, no. 2:121.
97. Cozzi, E., and D.J. White. 1995. The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nat Med* 1, no. 9:964.

98. Diamond, L.E., K.R. McCurry, M.J. Martin, S.B. McClellan, E.R. Oldham, J.L. Platt, and J.S. Logan. 1996. Characterization of transgenic pigs expressing functionally active human CD59 on cardiac endothelium. *Transplantation* 61, no. 8:1241.
99. White, D.J., and N. Yannoutsos. 1996. Production of pigs transgenic for human DAF to overcome complement-mediated hyperacute xenograft rejection in man. *Res Immunol* 147, no. 2:88.
100. Costa, C., L. Zhao, S. Decesare, and W.L. Fodor. 1999. Comparative analysis of three genetic modifications designed to inhibit human serum-mediated cytotoxicity. *Xenotransplantation* 6, no. 1:6.
101. Zhou, C.Y., E. McInnes, N. Parsons, G. Langford, R. Lancaster, A. Richards, G. Pino-Chavez, G. Dos Santos Cruz, L. Copeman, C. Carrington, and S. Thompson. 2002. Production and characterization of a pig line transgenic for human membrane cofactor protein. *Xenotransplantation* 9, no. 3:183.
102. Niemann, H., E. Verhoeven, K. Wonigeit, R. Lorenz, J. Hecker, R. Schwinzer, H. Hauser, W.A. Kues, R. Halter, E. Lemme, D. Herrmann, M. Winkler, D. Wirth, and D. Paul. 2001. Cytomegalovirus early promoter induced expression of hCD59 in porcine organs provides protection against hyperacute rejection. *Transplantation* 72, no. 12:1898.
103. Bhatti, F.N., M. Schmoekel, A. Zaidi, E. Cozzi, G. Chavez, M. Goddard, J.J. Dunning, J. Wallwork, and D.J. White. 1999. Three-month survival of HDAFF transgenic pig hearts transplanted into primates. *Transplant Proc* 31, no. 1-2:958.
104. Byrne, G., K. McCurry, M. Martin, J. Platt, and J. Logan. 1996. Development and analysis of transgenic pigs expressing the human complement regulatory protein CD59 and DAF. *Transplant Proc* 28, no. 2:759.
105. Costa, C., L. Zhao, W.V. Burton, C. Rosas, K.R. Bondioli, B.L. Williams, T.A. Hoagland, A.P. Dalmaso, and W.L. Fodor. 2002. Transgenic pigs designed to express human CD59 and H-transferase to avoid humoral xenograft rejection. *Xenotransplantation* 9, no. 1:45.
106. Breimer ME, B.S., Svalander CT... 1996. Extracorporeal ("ex vivo")connection of pig kidneys to humans. I.Clinical data and studies of platelet destruction. *Xenotransplantation* 3:328.
107. Rydberg L, B.S., Hallberg E... 1996. Extracorporeal("ex vivo")connection of pig kidneys to humans. II.The anti-pig antibody response. *Xenotransplantation* 3:340.
108. Kroshus, T.J., A.P. Dalmaso, J.R. Leventhal, R. John, A.J. Matas, and R.M. Bolman, 3rd. 1995. Antibody removal by column immunoabsorption prevents tissue injury in an ex vivo model of pig-to-human xenograft hyperacute rejection. *J Surg Res* 59, no. 1:43.
109. Kozlowski, T., F.L. Ierino, D. Lambripts, A. Foley, D. Andrews, M. Awwad, R. Monroy, A.B. Cosimi, D.K. Cooper, and D.H. Sachs. 1998. Depletion of anti-Gal(alpha)1-3Gal antibody in baboons by specific alpha-Gal immunoadfinity columns. *Xenotransplantation* 5, no. 2:122.
110. Simon, P.M., F.A. Neethling, S. Taniguchi, P.L. Goode, D. Zopf, W.W. Hancock, and D.K. Cooper. 1998. Intravenous infusion of Galalpha1-3Gal oligosaccharides in baboons delays hyperacute rejection of porcine heart xenografts. *Transplantation* 65, no. 3:346.
111. Fiorante, P., Y. Banz, P.J. Mohacsi, A. Kappeler, W.A. Willemin, P. Macchiarini, A. Roos, M.R. Daha, T. Schaffner, A. Haeberli, G.M. Mazmanian, and R. Rieben. 2001. Low molecular weight dextran sulfate prevents complement activation and delays hyperacute rejection in pig-to-human xenotransplantation models. *Xenotransplantation* 8, no. 1:24.
112. Tanemura, M., H. Ogawa, D.P. Yin, Z.C. Chen, V.J. DiSesa, and U. Galili. 2002. Elimination of anti-Gal B cells by alpha-Gal ricinI. *Transplantation* 73, no. 12:1859.
113. Romano E, N.F., Nilsson K, Cooper DKC. 1999. Intravenous synthetic alpha Gal saccarides delay hyperacute rejection following pig-to-baboon heart transplantation. *Xenotransplantation* 6, no. 1:36.
114. Ghanekar, A., Y. Luo, H. Yang, B. Garcia, P. Luke, S. Chakrabarti, G. Lajoie, M.J. Phillips, A. Katopodis, M.S. Cattral, W. Wall, A. Jevnikar, M. Bailey, G.A. Levy, D.R. Grant, and R. Zhong. 2001. The alpha-Gal analog GAS914 ameliorates delayed rejection of hDAF transgenic pig-to-baboon renal xenografts. *Transplant Proc* 33, no. 7-8:3853.
115. Tanemura, M., S. Miyagawa, S. Koyota, M. Koma, H. Matsuda, S. Tsuji, R. Shirakura, and N. Taniguchi. 1998. Reduction of the major swine xenoantigen, the alpha-galactosyl epitope by transfection of the alpha2,3-sialyltransferase gene. *J Biol Chem* 273, no. 26:16421.
116. Koike, C., A. Katayama, K. Kadomatsu, N. Hiraiwa, S. Hayashi, T. Kobayashi, S. Hayash, I. Yokoyama, and H. Takagi. 1997. Reduction of alpha-Gal epitopes in transgenic pig by introduction of human alpha 1-2 fucosyltransferase. *Transplant Proc* 29, no. 1-2:894.
117. Koike, C., S. Hayashi, I. Yokoyama, H. Yamakawa, M. Negita, and H. Takagi. 1996. Converting alpha-Gal epitope of pig into H antigen. *Transplant Proc* 28, no. 2:553.
118. Shinkel, T.A., C.G. Chen, E. Salvaris, T.R. Henion, H. Barlow, U. Galili, M.J. Pearse, and A.J. d'Apice. 1997. Changes in cell surface glycosylation in alpha1,3-galactosyltransferase knockout and alpha1,2-fucosyltransferase transgenic mice. *Transplantation* 64, no. 2:197.
119. Osman, N., I.F. McKenzie, K. Ostenried, Y.A. Ioannou, R.J. Desnick, and M.S. Sandrin. 1997. Combined transgenic expression of alpha-galactosidase and alpha1,2- fucosyltransferase leads to optimal reduction in the major xenoepitope Galalpha(1,3)Gal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, no. 26:14677.

120. Ishii, S., R. Kase, H. Sakuraba, C. Taya, H. Yonekawa, T. Okumiya, Y. Matsuda, K. Mannen, M. Takeshita, and Y. Suzuki. 1998. Alpha-galactosidase transgenic mouse: heterogeneous gene expression and posttranslational glycosylation in tissues [In Process Citation]. *Glycoconj J* 15, no. 6:591.
121. Willadsen, S.M. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320, no. 6057:63.
122. Campbell, K.H., J. McWhir, W.A. Ritchie, and I. Wilmut. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380, no. 6569:64.
123. Wilmut, I., A.E. Schnieke, J. McWhir, A.J. Kind, and K.H. Campbell. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, no. 6619:810.
124. Wakayama, T., D.G. Whittingham, and R. Yanagimachi. 1998. Production of normal offspring from mouse oocytes injected with spermatozoa cryopreserved with or without cryoprotection. *J Reprod Fertil* 112, no. 1:11.
125. Baguisi, A., E. Behboodi, D.T. Melican, J.S. Pollock, M.M. Destrempes, C. Cammuso, J.L. Williams, S.D. Nims, C.A. Porter, P. Midura, M.J. Palacios, S.L. Ayres, R.S. Denniston, M.L. Hayes, C.A. Ziomek, H.M. Meade, R.A. Godke, W.G. Gavin, E.W. Overstrom, and Y. Echelard. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol* 17, no. 5:456.
126. Cibelli, J.B., S.L. Stice, P.J. Golueke, J.J. Kane, J. Jerry, C. Blackwell, F.A. Ponce de Leon, and J.M. Robl. 1998. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat Biotechnol* 16, no. 7:642.
127. Cibelli, J.B., S.L. Stice, P.J. Golueke, J.J. Kane, J. Jerry, C. Blackwell, F.A. Ponce de Leon, and J.M. Robl. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280, no. 5367:1256.
128. Kato, Y., T. Tani, Y. Sotomaru, K. Kurokawa, J. Kato, H. Doguchi, H. Yasue, and Y. Tsunoda. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282, no. 5396:2095.
129. Wells, D.N., P.M. Misica, and H.R. Tervit. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod* 60, no. 4:996.
130. Lee, K.Y., H. Huang, B. Ju, Z. Yang, and S. Lin. 2002. Cloned zebrafish by nuclear transfer from long-term-cultured cells. *Nat Biotechnol* 20, no. 8:795.
131. Shin, T., D. Kraemer, J. Pryor, L. Liu, J. Rugila, L. Howe, S. Buck, K. Murphy, L. Lyons, and M. Westhusin. 2002. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 415, no. 6874:859.
132. Polejaeva, I.A., S.H. Chen, T.D. Vaught, R.L. Page, J. Mullins, S. Ball, Y. Dai, J. Boone, S. Walker, D.L. Ayares, A. Colman, and K.H. Campbell. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407, no. 6800:86.
133. Onishi, A., M. Iwamoto, T. Akita, S. Mikawa, K. Takeda, T. Awata, H. Hanada, and A.C. Perry. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 289, no. 5482:1188.
134. Betthausen, J., E. Forsberg, M. Augenstein, L. Childs, K. Eilertsen, J. Enos, T. Forsythe, P. Golueke, G. Jurgella, R. Koppang, T. Lesmeister, K. Mallon, G. Mell, P. Misica, M. Pace, M. Pfister-Genskow, N. Strelchenko, G. Voelker, S. Watt, S. Thompson, and M. Bishop. 2000. Production of cloned pigs from in vitro systems. *Nat Biotechnol* 18, no. 10:1055.
135. Mortensen, R.M. 1993. Double knockouts. Production of mutant cell lines in cardiovascular research. *Hypertension* 22, no. 4:646.
136. Knippers, R. 1997. Molekulare Genetik. Thieme-Verlag, Stuttgart.
137. Sedivy, J.M., and A. Dutriaux. 1999. Gene targeting and somatic cell genetics--a rebirth or a coming of age? *Trends Genet* 15, no. 3:88.
138. Sato, T.N. 1999. Gene trap, gene knockout, gene knock-in, and transgenics in vascular development. *Thromb Haemost* 82, no. 2:865.
139. Clark, A.J., S. Burl, C. Denning, and P. Dickinson. 2000. Gene targeting in livestock: a preview. *Transgenic Res* 9, no. 4-5:263.
140. Schwartzberg, P.L., E.J. Robertson, and S.P. Goff. 1990. Targeted gene disruption of the endogenous c-abl locus by homologous recombination with DNA encoding a selectable fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, no. 8:3210.
141. Jeannotte, L., J.C. Ruiz, and E.J. Robertson. 1991. Low level of Hox1.3 gene expression does not preclude the use of promoterless vectors to generate a targeted gene disruption. *Mol Cell Biol* 11, no. 11:5578.
142. Brewer, L.A., H.C. Lwamba, M.P. Murtaugh, A.C. Palmenberg, C. Brown, and M.K. Njenga. 2001. Porcine encephalomyocarditis virus persists in pig myocardium and infects human myocardial cells. *J Virol* 75, no. 23:11621.
143. Ehlers, B., S. Ulrich, and M. Goltz. 1999. Detection of two novel porcine herpesviruses with high similarity to gammaherpesviruses. *J Gen Virol* 80, no. Pt 4:971.
144. Tucker, A.W., D. Galbraith, P. McEwan, and D. Onions. 1999. Evaluation of porcine cytomegalovirus as a potential zoonotic agent in xenotransplantation. *Transplant Proc* 31, no. 1-2:915.
145. Mueller, N.J., R.N. Barth, S. Yamamoto, H. Kitamura, C. Patience, K. Yamada, D.K. Cooper, D.H. Sachs, A. Kaur, and J.A. Fishman. 2002. Activation of cytomegalovirus in pig-to-primate organ xenotransplantation. *J Virol* 76, no. 10:4734.
146. Baltimore, D. 1976. Viruses, polymerases, and cancer. *Science* 192, no. 4240:632.

147. Temin, H.M. 1976. The DNA provirus hypothesis. *Science* 192, no. 4244:1075.
148. Prats, A.C., C. Roy, P.A. Wang, M. Erard, V. Housset, C. Gabus, C. Paoletti, and J.L. Darlix. 1990. cis elements and trans-acting factors involved in dimer formation of murine leukemia virus RNA. *J Virol* 64, no. 2:774.
149. Coffin, J.M. 1992. Retroviral DNA integration. *Dev Biol Stand* 76:141.
150. Cadd, T.L., U. Skoging, and P. Liljestrom. 1997. Budding of enveloped viruses from the plasma membrane. *Bioessays* 19, no. 11:993.
151. Hunter, E., and R. Swanstrom. 1990. Retrovirus envelope glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 157:187.
152. Januszeki, M.M., P.M. Cannon, D. Chen, Y. Rozenberg, and W.F. Anderson. 1997. Functional analysis of the cytoplasmic tail of Moloney murine leukemia virus envelope protein. *J Virol* 71, no. 5:3613.
153. Tonjes, R.R., F. Czauderna, and R. Kurth. 1999. Genome-wide screening, cloning, chromosomal assignment, and expression of full-length human endogenous retrovirus type K. *J Virol* 73, no. 11:9187.
154. Nussbaum, O., A. Roop, and W.F. Anderson. 1993. Sequences determining the pH dependence of viral entry are distinct from the host range-determining region of the murine ecotropic and amphotropic retrovirus envelope proteins. *J Virol* 67, no. 12:7402.
155. Morgan, R.A., O. Nussbaum, D.D. Muenchau, L. Shu, L. Couture, and W.F. Anderson. 1993. Analysis of the functional and host range-determining regions of the murine ecotropic and amphotropic retrovirus envelope proteins. *J Virol* 67, no. 8:4712.
156. Coffin, J.M. 1990. Molecular mechanisms of nucleic acid integration. *J Med Virol* 31, no. 1:43.
157. Gelderblom, H.R. 1991. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *Aids* 5, no. 6:617.
158. Armstrong, J.A., J.S. Porterfield, and A.T. De Madrid. 1971. C-type virus particles in pig kidney cell lines. *J Gen Virol* 10, no. 2:195.
159. Moennig, V., H. Frank, G. Hunsmann, P. Ohms, H. Schwarz, and W. Schafer. 1974. C-type particles produced by a permanent cell line from a leukemic pig. II. Physical, chemical, and serological characterization of the particles. *Virology* 57, no. 1:179.
160. Akiyoshi, D.E., M. Denaro, H. Zhu, J.L. Greenstein, P. Banerjee, and J.A. Fishman. 1998. Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine. *J Virol* 72, no. 5:4503.
161. Patience, C., W.M. Switzer, Y. Takeuchi, D.J. Griffiths, M.E. Goward, W. Heneine, J.P. Stoye, and R.A. Weiss. 2001. Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species. *J Virol* 75, no. 6:2771.
162. Ericsson, T., B. Oldmixon, J. Blomberg, M. Rosa, C. Patience, and G. Andersson. 2001. Identification of novel porcine endogenous betaretrovirus sequences in miniature swine. *J Virol* 75, no. 6:2765.
163. Breese, S.S., Jr. 1970. Virus-like particles occurring in cultures of stable pig kidney cell lines. Brief report. *Arch Gesamte Virusforsch* 30, no. 4:401.
164. Lieber, M.M., C.J. Sherr, R.E. Benveniste, and G.J. Todaro. 1975. Biologic and immunologic properties of porcine type C viruses. *Virology* 66, no. 2:616.
165. Suzuka, I., K. Sekiguchi, and M. Kodama. 1985. Some characteristics of a porcine retrovirus from a cell line derived from swine malignant lymphomas. *FEBS Lett* 183, no. 1:124.
166. Patience, C., Y. Takeuchi, and R.A. Weiss. 1997. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med* 3, no. 3:282.
167. Martin, U., V. Kiessig, J.H. Blusch, A. Haverich, K. von der Helm, T. Herden, and G. Steinhoff. 1998. Expression of pig endogenous retrovirus by primary porcine endothelial cells and infection of human cells. *Lancet* 352, no. 9129:692.
168. Bosch, S., C. Arnauld, and A. Jestin. 2000. Study of full-length porcine endogenous retrovirus genomes with envelope gene polymorphism in a specific-pathogen-free Large White swine herd. *J Virol* 74, no. 18:8575.
169. Herring, C., G. Quinn, R. Bower, N. Parsons, N.A. Logan, A. Brawley, K. Elsome, A. Whittam, X.M. Fernandez-Suarez, D. Cunningham, D. Onions, G. Langford, and L. Scobie. 2001. Mapping full-length porcine endogenous retroviruses in a large white pig. *J Virol* 75, no. 24:12252.
170. Lee, J.H., G.C. Webb, R.D. Allen, and C. Moran. 2002. Characterizing and mapping porcine endogenous retroviruses in Westran pigs. *J Virol* 76, no. 11:5548.
171. Le Tissier, P., J.P. Stoye, Y. Takeuchi, C. Patience, and R.A. Weiss. 1997. Two sets of human-tropic pig retrovirus. *Nature* 389, no. 6652:681.
172. Clemenceau, B., S. Lalain, L. Martignat, and P. Sai. 1999. Porcine endogenous retroviral mRNAs in pancreas and a panel of tissues from specific pathogen-free pigs. *Diabetes Metab* 25, no. 6:518.
173. Frazier, M.E. 1985. Evidence for retrovirus in miniature swine with radiation-induced leukemia or metaplasia. *Arch Virol* 83, no. 1-2:83.
174. Wilson, C.A., S. Wong, J. Muller, C.E. Davidson, T.M. Rose, and P. Burd. 1998. Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *J Virol* 72, no. 4:3082.

175. Tacke, S., V. Specke, O. Stephan, E. Seibold, K. Bodusch, and J. Denner. 2000. Porcine endogenous retroviruses: diagnostic assays and evidence for immunosuppressive properties. *Transplant Proc* 32, no. 5:1166.
176. Takefman, D.M., S. Wong, T. Maudru, K. Peden, and C.A. Wilson. 2001. Detection and characterization of porcine endogenous retrovirus in porcine plasma and porcine factor VIII. *J Virol* 75, no. 10:4551.
177. Langford, G.A., D. Galbraith, A.J. Whittam, P. McEwan, X.M. Fernandez-Suarez, J. Black, A. Shepherd, and D. Onions. 2001. In vivo analysis of porcine endogenous retrovirus expression in transgenic pigs. *Transplantation* 72, no. 12:1996.
178. Todaro, G.J., R.E. Benveniste, M.M. Lieber, and C.J. Sherr. 1974. Characterization of a type C virus released from the porcine cell line PK(15). *Virology* 58, no. 1:65.
179. Takeuchi, Y., C. Patience, S. Magre, R.A. Weiss, P.T. Banerjee, P. Le Tissier, and J.P. Stoye. 1998. Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus. *J Virol* 72, no. 12:9986.
180. Denner, J. 1998. Immunosuppression by retroviruses: implications for xenotransplantation. *Ann NY Acad Sci* 862:75.
181. Wilson, C.A., S. Wong, M. VanBrocklin, and M.J. Federspiel. 2000. Extended analysis of the in vitro tropism of porcine endogenous retrovirus. *J Virol* 74, no. 1:49.
182. Cornetta, K., R.C. Moen, K. Culver, R.A. Morgan, J.R. McLachlin, S. Sturm, J. Selegue, W. London, R.M. Blaese, and W.F. Anderson. 1990. Amphotropic murine leukemia retrovirus is not an acute pathogen for primates. *Hum Gene Ther* 1, no. 1:15.
183. Kawakami, T.G., G.V. Kollias, Jr., and C. Holmberg. 1980. Oncogenicity of gibbon type-C myelogenous leukemia virus. *Int J Cancer* 25, no. 5:641.
184. Delassus, S., P. Sonigo, and S. Wain-Hobson. 1989. Genetic organization of gibbon ape leukemia virus. *Virology* 173, no. 1:205.
185. Donahue, R.E., S.W. Kessler, D. Bodine, K. McDonagh, C. Dunbar, S. Goodman, B. Agricola, E. Byrne, M. Raffeld, R. Moen, and et al. 1992. Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J Exp Med* 176, no. 4:1125.
186. Fan, H. 1994. Retroviruses and their role in cancer. In *The retroviridae*, vol. 3. L. JA, editor. Plenum Press, New York. 313.
187. Barker, D.D., H. Wu, S. Hartung, M. Breindl, and R. Jaenisch. 1991. Retrovirus-induced insertional mutagenesis: mechanism of collagen mutation in Mov13 mice. *Mol Cell Biol* 11, no. 10:5154.
188. Wilkinson DA, M.D., Leong JAC. 1994. Endogenous human retroviruses. In *The retroviridae*, vol. 3. L. JA, editor. Plenum Press, New York. 465.
189. Gao, F., E. Bailes, D.L. Robertson, Y. Chen, C.M. Rodenburg, S.F. Michael, L.B. Cummins, L.O. Arthur, M. Peeters, G.M. Shaw, P.M. Sharp, and B.H. Hahn. 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. *Nature* 397, no. 6718:436.
190. Sharp, P.M., E. Bailes, D.L. Robertson, F. Gao, and B.H. Hahn. 1999. Origins and evolution of AIDS viruses. *Biol Bull* 196, no. 3:338.
191. Koralknik, I.J., E. Boeri, W.C. Saxinger, A.L. Monico, J. Fullen, A. Gessain, H.G. Guo, R.C. Gallo, P. Markham, V. Kalyanaraman, and et al. 1994. Phylogenetic associations of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic virus type I strains: evidence for interspecies transmission. *J Virol* 68, no. 4:2693.
192. Voevodin, A.F., B.K. Johnson, E.I. Samilchuk, G.A. Stone, R. Druilhet, W.J. Greer, and C.J. Gibbs, Jr. 1997. Phylogenetic analysis of simian T-lymphotropic virus Type I (STLV-I) in common chimpanzees (Pan troglodytes): evidence for interspecies transmission of the virus between chimpanzees and humans in Central Africa. *Virology* 238, no. 2:212.
193. Mahieux, R., C. Chappey, M.C. Georges-Courbot, G. Dubreuil, P. Mauclere, A. Georges, and A. Gessain. 1998. Simian T-cell lymphotropic virus type 1 from Mandrillus sphinx as a simian counterpart of human T-cell lymphotropic virus type 1 subtype D. *J Virol* 72, no. 12:10316.
194. Lieber, M.M., C.J. Sherr, G.J. Todaro, R.E. Benveniste, R. Callahan, and H.G. Coon. 1975. Isolation from the asian mouse *Mus caroli* of an endogenous type C virus related to infectious primate type C viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, no. 6:2315.
195. Todaro, G.J., M.M. Lieber, R.E. Benveniste, and C.J. Sherr. 1975. Infectious primate type C viruses: Three isolates belonging to a new subgroup from the brains of normal gibbons. *Virology* 67, no. 2:335.
196. Gelmann, E.P., C.D. Trainor, F. Wong-Staal, and M.S. Reitz. 1982. Molecular cloning of circular unintegrated DNA of two types of the SEATO strain of gibbon ape leukemia virus. *J Virol* 44, no. 1:269.
197. Denner, J. 1987. Immunosuppression by oncogenic retroviridae. In *Immune modulation by infectious agents*. Z. W, editor. Gustav Fischer Verlag, Jena. 140.
198. Tacke, S.J., R. Kurth, and J. Denner. 2000. Porcine endogenous retroviruses inhibit human immune cell function: risk for xenotransplantation? *Virology* 268, no. 1:87.

199. Niebert, M., C. Rogel-Gaillard, P. Chardon, and R.R. Tonjes. 2002. Characterization of chromosomally assigned replication-competent gamma porcine endogenous retroviruses derived from a large white pig and expression in human cells. *J Virol* 76, no. 6:2714.
200. Rother, R.P., W.L. Fodor, J.P. Springhorn, C.W. Birks, E. Setter, M.S. Sandrin, S.P. Squinto, and S.A. Rollins. 1995. A novel mechanism of retrovirus inactivation in human serum mediated by anti-alpha-galactosyl natural antibody. *J Exp Med* 182, no. 5:1345.
201. Rother, R.P., and U. Galili. 1999. alpha-Gal epitopes on viral glycoproteins. *Subcell Biochem* 32:143.
202. Takeuchi, Y., F.L. Cosset, P.J. Lachmann, H. Okada, R.A. Weiss, and M.K. Collins. 1994. Type C retrovirus inactivation by human complement is determined by both the viral genome and the producer cell. *J Virol* 68, no. 12:8001.
203. Takeuchi, Y., C.D. Porter, K.M. Strahan, A.F. Preece, K. Gustafsson, F.L. Cosset, R.A. Weiss, and M.K. Collins. 1996. Sensitization of cells and retroviruses to human serum by (alpha 1-3) galactosyltransferase. *Nature* 379, no. 6560:85.
204. Welsh, R.M., C.L. O'Donnell, D.J. Reed, and R.P. Rother. 1998. Evaluation of the Galalpha1-3Gal epitope as a host modification factor eliciting natural humoral immunity to enveloped viruses. *J Virol* 72, no. 6:4650.
205. Lai, L., D. Kolber-Simonds, K.W. Park, H.T. Cheong, J.L. Greenstein, G.S. Im, M. Samuel, A. Bonk, A. Rieke, B.N. Day, C.N. Murphy, D.B. Carter, R.J. Hawley, and R.S. Prather. 2002. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295, no. 5557:1089.
206. Dai, Y., T.D. Vaught, J. Boone, S.H. Chen, C.J. Phelps, S. Ball, J.A. Monahan, P.M. Jobst, K.J. McCreath, A.E. Lamborn, J.L. Cowell-Lucero, K.D. Wells, A. Colman, I.A. Polejaeva, and D.L. Ayares. 2002. Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol* 20, no. 3:251.
207. Weiss, R.A. 1998. Transgenic pigs and virus adaptation. *Nature* 391, no. 6665:327.
208. Brown, J., A.L. Matthews, P.A. Sandstrom, and L.E. Chapman. 1998. Xenotransplantation and the risk of retroviral zoonosis. *Trends Microbiol* 6, no. 10:411.
209. Patience, C., Y. Takeuchi, and R.A. Weiss. 1998. Zoonosis in xenotransplantation. *Curr Opin Immunol* 10, no. 5:539.
210. Takefman, D.M., G.T. Spear, M. Saifuddin, and C.A. Wilson. 2002. Human CD59 incorporation into porcine endogenous retrovirus particles: implications for the use of transgenic pigs for xenotransplantation. *J Virol* 76, no. 4:1999.
211. Dorig, R.E., A. Marcil, A. Chopra, and C.D. Richardson. 1993. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 75, no. 2:295.
212. Naniche, D., G. Varior-Krishnan, F. Cervoni, T.F. Wild, B. Rossi, C. Rabourdin-Combe, and D. Gerlier. 1993. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* 67, no. 10:6025.
213. Ward, T., P.A. Pipkin, N.A. Clarkson, D.M. Stone, P.D. Minor, and J.W. Almond. 1994. Decay-accelerating factor CD55 is identified as the receptor for echovirus 7 using CELICS, a rapid immunofocal cloning method. *Embo J* 13, no. 21:5070.
214. Bergelson, J.M., J.G. Mohanty, R.L. Crowell, N.F. St John, D.M. Lublin, and R.W. Finberg. 1995. Coxsackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay-accelerating factor (CD55). *J Virol* 69, no. 3:1903.
215. Patience, C., Y. Takeuchi, F.L. Cosset, and R.A. Weiss. 1998. Packaging of endogenous retroviral sequences in retroviral vectors produced by murine and human packaging cells. *J Virol* 72, no. 4:2671.
216. Specke, V., H.J. Schuurman, R. Plesker, C. Coulibaly, M. Ozel, G. Langford, R. Kurth, and J. Denner. 2002. Virus safety in xenotransplantation: first exploratory in vivo studies in small laboratory animals and non-human primates. *Transpl Immunol* 9, no. 2-4:281.
217. Specke, V., S.J. Tacke, K. Boller, J. Schwendemann, and J. Denner. 2001. Porcine endogenous retroviruses: in vitro host range and attempts to establish small animal models. *J Gen Virol* 82, no. Pt 4:837.
218. van der Laan, L.J., C. Lockey, B.C. Griffeth, F.S. Frasier, C.A. Wilson, D.E. Onions, B.J. Hering, Z. Long, E. Otto, B.E. Torbett, and D.R. Salomon. 2000. Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* 407, no. 6800:90.
219. Deng, Y.M., B.E. Tuch, and W.D. Rawlinson. 2000. Transmission of porcine endogenous retroviruses in severe combined immunodeficient mice xenotransplanted with fetal porcine pancreatic cells. *Transplantation* 70, no. 7:1010.
220. Tralka, T.S., C.L. Yee, A.B. Rabson, N.A. Wivel, K.J. Stromberg, A.S. Rabson, and J.C. Costa. 1983. Murine type C retroviruses and intracisternal A-particles in human tumors serially passaged in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 71, no. 3:591.
221. Paradis, K., G. Langford, Z. Long, W. Heneine, P. Sandstrom, W.M. Switzer, L.E. Chapman, C. Lockey, D. Onions, and E. Otto. 1999. Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. *Science* 285, no. 5431:1236.

222. Patience, C., G.S. Patton, Y. Takeuchi, R.A. Weiss, M.O. McClure, L. Rydberg, and M.E. Breimer. 1998. No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys. *Lancet* 352, no. 9129:699.
223. Pitkin, Z., and C. Mullan. 1999. Evidence of absence of porcine endogenous retrovirus (PERV) infection in patients treated with a bioartificial liver support system. *Artif Organs* 23, no. 9:829.
224. Cunningham, D.A., C. Herring, X.M. Fernandez-Suarez, A.J. Whittam, K. Paradis, and G.A. Langford. 2001. Analysis of patients treated with living pig tissue for evidence of infection by porcine endogenous retroviruses. *Trends Cardiovasc Med* 11, no. 5:190.
225. Levy, M.F., J. Crippin, S. Sutton, G. Netto, J. McCormack, T. Curiel, R.M. Goldstein, J.T. Newman, T.A. Gonwa, J. Bancheureau, L.E. Diamond, G. Byrne, J. Logan, and G.B. Klintmalm. 2000. Liver allotransplantation after extracorporeal hepatic support with transgenic (hCD55/hCD59) porcine livers: clinical results and lack of pig-to-human transmission of the porcine endogenous retrovirus. *Transplantation* 69, no. 2:272.
226. Kuddus, R., J.F. Patzer, 2nd, R. Lopez, G.V. Mazariegos, B. Meighen, D.J. Kramer, and A.S. Rao. 2002. Clinical and laboratory evaluation of the safety of a bioartificial liver assist device for potential transmission of porcine endogenous retrovirus. *Transplantation* 73, no. 3:420.
227. Matthews, A.L., J. Brown, W. Switzer, T.M. Folks, W. Heneine, and P.A. Sandstrom. 1999. Development and validation of a Western immunoblot assay for detection of antibodies to porcine endogenous retrovirus. *Transplantation* 67, no. 7:939.
228. Switzer, W.M., V. Shanmugam, L. Chapman, and W. Heneine. 1999. Polymerase chain reaction assays for the diagnosis of infection with the porcine endogenous retrovirus and the detection of pig cells in human and nonhuman recipients of pig xenografts. *Transplantation* 68, no. 2:183.
229. Blusch, J.H., C. Roos, and H. Nitschko. 2000. A polymerase chain reaction-based protocol for the detection of transmission of pig endogenous retroviruses in pig to human xenotransplantation. *Transplantation* 69, no. 10:2167.
230. Galbraith, D.N., H.T. Kelly, A. Dyke, G. Reid, C. Haworth, J. Beekman, A. Shepherd, and K.T. Smith. 2000. Design and validation of immunological tests for the detection of Porcine endogenous retrovirus in biological materials. *J Virol Methods* 90, no. 2:115.
231. Krach, U., N. Fischer, F. Czauderna, R. Kurth, and R.R. Tonjes. 2000. Generation and testing of a highly specific anti-serum directed against porcine endogenous retrovirus nucleocapsid. *Xenotransplantation* 7, no. 3:221.
232. Tacke, S.J., K. Bodusch, A. Berg, and J. Denner. 2001. Sensitive and specific immunological detection methods for porcine endogenous retroviruses applicable to experimental and clinical xenotransplantation. *Xenotransplantation* 8, no. 2:125.
233. Argaw, T., A. Ritzhaupt, and C. Wilson. 2002. Development of a real time quantitative PCR assay for detection of porcine endogenous retrovirus. *J Virol Methods* 106, no. 1:97.
234. Blusch, J.H., C. Patience, Y. Takeuchi, C. Templin, C. Roos, K. Von Der Helm, G. Steinhoff, and U. Martin. 2000. Infection of nonhuman primate cells by pig endogenous retrovirus. *J Virol* 74, no. 16:7687.
235. Switzer, W.M., R.E. Michler, V. Shanmugam, A. Matthews, A.I. Hussain, A. Wright, P. Sandstrom, L.E. Chapman, C. Weber, S. Safley, R.R. Denny, A. Navarro, V. Evans, A.J. Norin, P. Kwiatkowski, and W. Heneine. 2001. Lack of cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus infection to nonhuman primate recipients of porcine cells, tissues, or organs. *Transplantation* 71, no. 7:959.
236. Martin, U., G. Steinhoff, V. Kiessig, M. Chikobava, M. Anssar, T. Morschheuser, B. Lapin, and A. Haverich. 1998. Porcine endogenous retrovirus (PERV) was not transmitted from transplanted porcine endothelial cells to baboons in vivo. *Transpl Int* 11, no. 4:247.
237. Loss, M., H. Arends, M. Winkler, M. Przemek, G. Steinhoff, S. Rensing, F.J. Kaup, H.J. Hedrich, M.E. Winkler, and U. Martin. 2001. Analysis of potential porcine endogenous retrovirus (PERV) transmission in a whole-organ xenotransplantation model without interfering microchimerism. *Transpl Int* 14, no. 1:31.
238. Denner, J., V. Specke, J. Schwendemann, and S.J. Tacke. 2001. Porcine endogenous retroviruses (PERVs): adaptation to human cells and attempts to infect small animals and non-human primates. *Ann Transplant* 6, no. 3:25.
239. Specke, V., R. Plesker, C. Coulibaly, K. Boller, and J. Denner. 2002. Productive infection of a mink cell line with porcine endogenous retroviruses (PERVs) but lack of transmission to minks in vivo. *Arch Virol* 147, no. 2:305.
240. Martin, U., M.E. Winkler, M. Id, H. Radeke, L. Arseniev, Y. Takeuchi, A.R. Simon, C. Patience, A. Haverich, and G. Steinhoff. 2000. Productive infection of primary human endothelial cells by pig endogenous retrovirus (PERV). *Xenotransplantation* 7, no. 2:138.
241. Hecker, J.M., R. Lorenz, R. Appiah, B. Vangerow, M. Loss, R. Kunz, J. Schmidtko, M. Mengel, J. Klempnauer, S. Piepenbrock, G. Dickneite, H. Neidhardt, H. Ruckoldt, and M. Winkler. 2002. C1-inhibitor for prophylaxis of xenograft rejection after pig to cynomolgus monkey kidney transplantation. *Transplantation* 73, no. 5:688.

242. Loss, M., R. Kunz, M. Przemeck, J. Schmidtko, H. Arends, A. Jalali, R. Lorenz, S. Piepenbrock, J. Klempnauer, and M. Winkler. 2000. Influence of cold ischemia time, pretransplant anti-porcine antibodies, and donor/recipient size matching on hyperacute graft rejection after discordant porcine to cynomolgus kidney transplantation. *Transplantation* 69, no. 6:1155.
243. Loss, M., B. Vangerow, J. Schmidtko, R. Kunz, A. Jalali, H. Arends, M. Przemeck, H. Ruckholt, M. Leuwer, F.J. Kaup, S. Rensing, E. Cozzi, D.J. White, J. Klempnauer, and M. Winkler. 2000. Acute vascular rejection is associated with systemic complement activation in a pig-to-primate kidney xenograft model. *Xenotransplantation* 7, no. 3:186.
244. Wallace, D.M. 1987. Large- and small-scale phenol extractions. *Methods Enzymol* 152:33.
245. Wallace, D.M. 1987. Precipitation of nucleic acids. *Methods Enzymol* 152:41.
246. Berger, S.L. 1987. Quantifying ³²P-labeled and unlabeled nucleic acids. *Methods Enzymol* 152:49.
247. Birnboim, H.C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, no. 6:1513.
248. Akada, R. 1994. Quick-check method to test the size of Escherichia coli plasmids. *Biotechniques* 17, no. 1:58.
249. Good, L., and R.N. Nazar. 1997. Plasmid mini-preparations from culture streaks. *Biotechniques* 22, no. 3:404.
250. Kelley, J.M., C.E. Field, M.B. Craven, D. Bocskai, U.J. Kim, S.D. Rounsley, and M.D. Adams. 1999. High throughput direct end sequencing of BAC clones. *Nucleic Acids Res* 27, no. 6:1539.
251. Polisky, B., P. Greene, D.E. Garfin, B.J. McCarthy, H.M. Goodman, and H.W. Boyer. 1975. Specificity of substrate recognition by the EcoRI restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, no. 9:3310.
252. Helling, R.B., H.M. Goodman, and H.W. Boyer. 1974. Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol* 14, no. 5:1235.
253. Vogelstein, B., and D. Gillespie. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, no. 2:615.
254. Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, no. 4732:1350.
255. Lund, A.H., M. Duch, and F.S. Pedersen. 1996. Increased cloning efficiency by temperature-cycle ligation. *Nucleic Acids Res* 24, no. 4:800.
256. Calvin, N.M., and P.C. Hanawalt. 1988. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* 170, no. 6:2796.
257. Birnboim, H.C. 1988. Rapid extraction of high molecular weight RNA from cultured cells and granulocytes for Northern analysis. *Nucleic Acids Res* 16, no. 4:1487.
258. Wagner, E., M. Zenke, M. Cotten, H. Beug, and M.L. Birnstiel. 1990. Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, no. 9:3410.
259. Wagner, E., M. Cotten, R. Foisner, and M.L. Birnstiel. 1991. Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, no. 10:4255.
260. Sauer, B. 1993. Manipulation of transgenes by site-specific recombination: use of Cre recombinase. *Methods Enzymol* 225:890.
261. Sauer, B. 1998. Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* 14, no. 4:381.
262. Le, Y., and B. Sauer. 2000. Conditional gene knockout using cre recombinase. *Methods Mol Biol* 136:477.
263. Le, Y., and B. Sauer. 2001. Conditional gene knockout using Cre recombinase. *Mol Biotechnol* 17, no. 3:269.
264. Oh, S.K., and P. Sarnow. 1993. Gene regulation: translational initiation by internal ribosome binding. *Curr Opin Genet Dev* 3, no. 2:295.
265. Hellen, C.U., and P. Sarnow. 2001. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* 15, no. 13:1593.
266. Martinez-Salas, E., R. Ramos, E. Lafuente, and S. Lopez de Quinto. 2001. Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements. *J Gen Virol* 82, no. Pt 5:973.
267. Rogel-Gaillard, C., N. Bourgeaux, A. Billault, M. Vaiman, and P. Chardon. 1999. Construction of a swine BAC library: application to the characterization and mapping of porcine type C endoviral elements. *Cytogenet Cell Genet* 85, no. 3-4:205.
268. Schutte, B.C., K. Ranade, J. Pruessner, and N. Dracopoli. 1997. Optimized conditions for cloning PCR products into an XcmI T-vector. *Biotechniques* 22, no. 1:40.
269. Bielefeldt-Ohmann, H., and D.R. Fitzpatrick. 1997. High-efficiency T-vector cloning of PCR products by forced A tagging and post-ligation restriction enzyme digestion. *Biotechniques* 23, no. 5:822.
270. Cotten, M., F. Langle-Rouault, H. Kirlappos, E. Wagner, K. Mechtler, M. Zenke, H. Beug, and M.L. Birnstiel. 1990. Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells:

- stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, no. 11:4033.
271. Zatloukal, K., E. Wagner, M. Cotten, S. Phillips, C. Plank, P. Steinlein, D.T. Curiel, and M.L. Birnstiel. 1992. Transferrinfection: a highly efficient way to express gene constructs in eukaryotic cells. *Ann N Y Acad Sci* 660:136.
272. Cheng, P.W. 1996. Receptor ligand-facilitated gene transfer: enhancement of liposome-mediated gene transfer and expression by transferrin. *Hum Gene Ther* 7, no. 3:275.
273. Ogris, M., P. Steinlein, M. Kursa, K. Mechtler, R. Kircheis, and E. Wagner. 1998. The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther* 5, no. 10:1425.
274. Tan, P.H., W.J. King, D. Chen, H.M. Awad, M. Mackett, R.I. Lechler, D.F. Larkin, and A.J. George. 2001. Transferrin receptor-mediated gene transfer to the corneal endothelium. *Transplantation* 71, no. 4:552.
275. Dorling, A., W. Jordan, P. Brookes, A. Delikouras, and R.I. Lechler. 2001. "Accommodated" pig endothelial cells promote nitric oxide-dependent Th-2 cytokine responses from human T cells. *Transplantation* 72, no. 10:1597.
276. Joshee, N., D.R. Bastola, and P.W. Cheng. 2002. Transferrin-facilitated lipofection gene delivery strategy: characterization of the transfection complexes and intracellular trafficking. *Hum Gene Ther* 13, no. 16:1991.
277. Van Poucke, M., M. Yerle, C. Tuggle, F. Piumi, C. Genet, A. Van Zeveren, and L.J. Peelman. 2001. Integration of porcine chromosome 13 maps. *Cytogenet Cell Genet* 93, no. 3-4:297.
278. Pereira, M.E., E.C. Kisailus, F. Gruezo, and E.A. Kabat. 1978. Immunochemical studies on the combining site of the blood group H-specific lectin 1 from *Ulex europaeus* seeds. *Arch Biochem Biophys* 185, no. 1:108.
279. Holthofer, H., I. Virtanen, A.L. Kariniemi, M. Hormia, E. Linder, and A. Miettinen. 1982. *Ulex europaeus* I lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues. *Lab Invest* 47, no. 1:60.
280. Jackson, C.J., P.K. Garbett, B. Nissen, and L. Schrieber. 1990. Binding of human endothelium to *Ulex europaeus* I-coated Dynabeads: application to the isolation of microvascular endothelium. *J Cell Sci* 96, no. Pt 2:257.
281. Yoshino, N., Y. Ami, K. Terao, F. Tashiro, and M. Honda. 2000. Upgrading of flow cytometric analysis for absolute counts, cytokines and other antigenic molecules of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) by using anti-human cross-reactive antibodies. *Exp Anim* 49, no. 2:97.
282. Carter, A.S., L. Cerundolo, D.D. Koo, N.A. Rust, P.J. Morris, and S.V. Fuggle. 1999. Cross-species reactivity of a panel of antibodies with monkey and porcine tissue. *Xenotransplantation* 6, no. 2:123.
283. Sedivy, J.M., B. Vogelstein, H.L. Liber, E.A. Hendrickson, and A. Rosmarin. 1999. Gene Targeting in Human Cells Without Isogenic DNA. *Science* 283, no. 5398:9a.
284. Shulman, M.J., L. Nissen, and C. Collins. 1990. Homologous recombination in hybridoma cells: dependence on time and fragment length. *Mol Cell Biol* 10, no. 9:4466.
285. Deng, C., and M.R. Capecchi. 1992. Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol Cell Biol* 12, no. 8:3365.
286. Harrison, S.J., A. Guidolin, R. Faast, L.A. Crocker, C. Giannakis, A.J. D'Apice, M.B. Nottle, and I. Lyons. 2002. Efficient generation of alpha(1,3) galactosyltransferase knockout porcine fetal fibroblasts for nuclear transfer. *Transgenic Res* 11, no. 2:143.
287. Malyguine, E., P. Vannier, and P. Yot. 1980. Alteration of the specificity of restriction endonucleases in the presence of organic solvents. *Gene* 8, no. 2:163.
288. Blusch, J.H., C. Patience, and U. Martin. 2002. Pig endogenous retroviruses and xenotransplantation. *Xenotransplantation* 9, no. 4:242.
289. Rafii, S. 2000. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest* 105, no. 1:17.
290. Lagaaij, E.L., G.F. Cramer-Knijenburg, F.J. van Kemenade, L.A. van Es, J.A. Bruijn, and J.H. van Krieken. 2001. Endothelial cell chimerism after renal transplantation and vascular rejection. *Lancet* 357, no. 9249:33.
291. Roussel, F., and J. Dalion. 1988. Lectins as markers of endothelial cells: comparative study between human and animal cells. *Lab Anim* 22, no. 2:135.
292. Oriol, R., J.J. Candelier, S. Taniguchi, L. Balanzino, L. Peters, M. Niekrasz, C. Hammer, and D.K. Cooper. 1999. Major carbohydrate epitopes in tissues of domestic and African wild animals of potential interest for xenotransplantation research. *Xenotransplantation* 6, no. 2:79.
293. Socha, W.W., A. Blancher, and J. Moor-Jankowski. 1995. Red cell polymorphisms in nonhuman primates: a review. *J Med Primatol* 24, no. 4:282.
294. Christenson, L.K., and R.L. Stouffer. 1996. Isolation and culture of microvascular endothelial cells from the primate corpus luteum. *Biol Reprod* 55, no. 6:1397.

9 Verzeichnis eigener Publikationen

1. Edwards, U., T. Rogall, H. Blocker, **M. Emde**, and E.C. Bottger. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 17, no. 19:7843.
2. Kroll, B., **M. Emde**, A. Jeromin, L. Penner, G. Rechkemmer, T. Kretzschmar, A. Klos, J. Kohl, and W. Bautsch. 1991. Functional expression of a human C5a receptor clone in *Xenopus* oocytes requires additional RNA. *FEBS Lett* 291, no. 2:208.
3. Bautsch, W., **M. Emde**, T. Kretzschmar, J. Kohl, D. Suckau, and D. Bitter-Suermann. 1992. Human C5a anaphylatoxin: gene cloning and expression in *Escherichia coli*. *Immunobiology* 185, no. 1:41.
4. Bautsch, W., T. Kretzschmar, T. Stuhmer, A. Kola, **M. Emde**, J. Kohl, A. Klos, and D. Bitter-Suermann. 1992. A recombinant hybrid anaphylatoxin with dual C3a/C5a activity. *Biochem J* 288, no. Pt 1:261.
5. Federwisch, M., A. Wollmer, **M. Emde**, T. Stuhmer, T. Melcher, A. Klos, J. Kohl, and W. Bautsch. 1993. Tryptophan mutants of human C5a anaphylatoxin: a fluorescence anisotropy decay and energy transfer study. *Biophys Chem* 46, no. 3:237.
6. Bubeck, P., **M. Winkler**, and W. Bautsch. 1993. Rapid cloning by homologous recombination in vivo. *Nucleic Acids Res* 21, no. 15:3601.
7. Bubeck, P., J. Grotzinger, **M. Winkler**, J. Kohl, A. Wollmer, A. Klos, and W. Bautsch. 1994. Site-specific mutagenesis of residues in the human C5a anaphylatoxin which are involved in possible interaction with the C5a receptor. *Eur J Biochem* 219, no. 3:897.
8. Martin, U., **M.E. Winkler**, M. Id, H. Radecke, L. Arseniev, R. Groteluschen, A.R. Simon, and G. Steinhoff. 2000. Transmission of pig endogenous retrovirus to primary human cells. *Transplant Proc* 32, no. 5:1157.
9. Martin, U., **M.E. Winkler**, M. Id, H. Radecke, L. Arseniev, Y. Takeuchi, A.R. Simon, C. Patience, A. Haverich, and G. Steinhoff. 2000. Productive infection of primary human endothelial cells by pig endogenous retrovirus (PERV). *Xenotransplantation* 7, no. 2:138.
10. **Winkler, M.E.**, U. Martin, M. Loss, H. Arends, S. Rensing, F.J. Kaup, H.J. Hedrich, J. Klempnauer, and M. Winkler. 2000. Porcine endogenous retrovirus is not transmitted in a discordant porcine-to-cynomolgus xenokidney transplantation model with long-term survival of organ recipients. *Transplant Proc* 32, no. 5:1162.
11. Templin, C., C. Schroder, A.R. Simon, G. Laaff, J. Kohl, M. Chikobava, B. Lapin, **M.E. Winkler**, K. Wiebe, G. Steinhoff, and U. Martin. 2001. Long-term monitoring of xenotransplanted baboons: no evidence for pig endogenous retrovirus transmission. *Transplant Proc* 33, no. 1-2:692.
12. Loss, M., H. Arends, M. Winkler, M. Przemec, G. Steinhoff, S. Rensing, F.J. Kaup, H.J. Hedrich, **M.E. Winkler**, and U. Martin. 2001. Analysis of potential porcine endogenous retrovirus (PERV) transmission in a whole-organ xenotransplantation model without interfering microchimerism. *Transpl Int* 14, no. 1:31.
13. Templin, C., A.R. Simon, C. Schröder, **M.E. Winkler**, G. Laaf, M. Chikobava, V.Z. Agrba, B. Lapin, A. Haverich, and U. Martin. 2002. Analyse potentieller PERV-Infektionen in einem klinisch relevanten Schwein-auf-Pavian Zelltransplantationsmodell. *TxMed* in press.
14. **Winkler, M.E.**, M. Winkler, R. Burian, J. Hecker, M. Loss, M. Przemec, R. Lorenz, C. Patience, S. Sommer, J. Denner, and U. Martin. 2002. Analysis of pig-to-human PERV transmission in a triple-species kidney xenotransplantation model. *submitted*.
15. Templin, C., A.R. Simon, C. Schröder, G. Laaf, R. Tessmann, **M.E. Winkler**, S. Tacke, J. Denner, B. Lapin, G. Steinhoff, C. Patience, V.Z. Agrba, M. Chikobava, A. Haverich, and U. Martin. 2002. No evidence for PERV infection in a pig to baboon cell transplantation model. *manuscript in preparation*.

Abstracts

1. Martin, U., **M. Winkler**, M. Id, L. Arseniev, H. Radeke, Y. Takeuchi, A. Haverich, A.R. Simon, and G. Steinhoff. 1999. Productive Infection of Primary Human Endothelial Cells by Pig Endogenous Retrovirus (PERV). 30th Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Immunologie, Hannover, *Vortrag*.
2. Martin, U., **M. Winkler**, M. Id, L. Arseniev, H. Radeke, Y. Takeuchi, A. Haverich, A.R. Simon, and G. Steinhoff. 1999. Transmission of pig endogenous retrovirus (PERV) to primary human cells. The 5th Congress of the International Xenotransplantation Association, Nagoya, *Vortrag*.
3. Winkler, M., U. Martin, **M. Winkler**, H. Arends, and M. Loss. 1999. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in long term surviving cynomolgus recipients of porcine kidneys. The 5th Congress of the International Xenotransplantation Association, Nagoya, *Vortrag*.
4. Id, M., **M. Winkler**, L. Arseniev, H. Radeke, Y. Takeuchi, A. Haverich, A.R. Simon, G. Steinhoff, and U. Martin. 1999. Produktive PERV-Infektion humaner Endothelzellen. 3.Symposium Xenotransplantation, Schloß Rauischolzhausen, *Vortrag*.
5. Winkler, M., C. Templin, E. Vogelwedde, C. Schroeder, A.R. Simon, G. Laaf, H. Arends, M. Loss, J. Koehl, A. Haverich, G. Steinhoff, **M. Winkler**, and U. Martin. 1999. Untersuchung potentieller PERV-Transmission in subhumanen Primatenmodellen. 3.Symposium Xenotransplantation, Schloß Rauischolzhausen, *Vortrag*.
6. Templin, C., A.R. Simon, C. Schroeder, **M.E. Winkler**, J.H. Blusch, G. Laaf, S. Tacke, J. Koehl, J. Denner, A. Haverich, and U. Martin. 2000. PERV Infektionsstudien in subhumanen Primaten. 9.Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft, Regensburg, *Vortrag*.
7. **Winkler, M.E.**, C. Templin, A.R. Simon, C. Schroeder, J.H. Blusch, G. Laaf, S. Tacke, J. Koehl, J. Denner, and U. Martin. 2000. PERV Infektionsstudien in subhumanen Primaten. 4.Symposium Xenotransplantation, Schloß Rauischolzhausen, *Vortrag*.
8. Martin, U., C. Templin, A.R. Simon, J.H. Blusch, C. Schroeder, G. Laaf, S. Tacke, **M.E. Winkler**, Y. Takeuchi, J. Koehl, K. von der Helm, J. Denner, B. Lapin, A. Haverich, and G. Steinhoff. 2000. PERV infection studies in nonhuman primates. XVIII International Congress of the Transplantation Society, Rome, *Vortrag*.
9. Martin, U., **M.E. Winkler**, R. Burian, M. Loss, R. Appiah, J. Hecker, J. Denner, and M. Winkler. 2001. Untersuchung potentieller PERV-Transmission in einem humanisierten Schwein-auf-Javaner-Affen Nierentransplantationsmodell. 5. Symposium für innovativen Organersatz, Schloß Rauischolzhausen, *Vortrag*.
10. Martin, U., **M.E. Winkler**, K. Wiebe, R. Burian, M. Loss, R. Appiah, R. Lorenz, M. Przemeczek, S. Sommer, J. Denner, and M. Winkler. 2002. Analysis of pig-to-human PERV transmission in a triple-species kidney and lung xenotransplantation model. XIX International Congress of The Transplantation Society, Miami, *Vortrag*.

Poster

1. Martin, U., **M. Winkler**, M. Id, A. Haverich, L. Arseniev, H. Radeke, Y. Takeuchi, C. Patience, R.A. Weiss, and G. Steinhoff. 1999. Infection of Primary Human Cells by Pig Endogenous Retrovirus. 9th Congress of the European Society for Organ Transplantation, Oslo, *Poster*.
2. Martin, U., C. Templin, H. Arends, C. Schroeder, A.R. Simon, M. Loss, J. Koehl, G. Laaf, **M.E. Winkler**, G. Steinhoff, A. Haverich, and M. Winkler. 1999. Untersuchung potentieller PERV-Transmission in subhumanen Primatenmodellen. 8. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft, Dresden, *Poster*.
3. Martin, U., **M.E. Winkler**, M. Id, L. Arseniev, H. Radeke, Y. Takeuchi, A. Haverich, A.R. Simon, and G. Steinhoff. 1999. Produktive PERV-Infektion primärer humaner Zellen. 8. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft, Dresden, *Poster*.
4. Martin, U., **M.E. Winkler**, R. Burian, M. Loss, R. Appiah, J. Hecker, J. Denner, and M. Winkler. 2001. Analysis of potential PERV transmission to human endothelium in a pig-to-cynomolgus monkey kidney xenotransplantation model. 7th Basic Science Symposium of the Transplantation Society, Bern, *Poster*.
5. Martin, U., **M.E. Winkler**, R. Burian, M. Loss, R. Appiah, R. Lorenz, J. Denner, and M. Winkler. 2001. Analysis of potential PERV transmission to human endothelium in a pig-to-cynomolgus monkey kidney transplantation model. VI Congress of the International Xenotransplantation Society, Chicago, *Poster*.

10 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Monica Winkler, geb. Emde
 Geburtstag: 28. Oktober 1962 in Lemgo
 Anschrift: Papendieksfeld 19, 30966 Hemmingen, Tel.: 0511 / 429774
 Familienstand: seit 16.09.1992 verheiratet mit Prof. Dr. med. Michael Winkler
 Kinder: Alexander (30.01.1994) und Jonas (21.05.1996)
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1970 – 1973 Grundschule Garbsen
 1973 – 1979 Gymnasium Garbsen
 06/1979: Erweiterter Sekundarabschluß I
 1992 - 1993 Vorbereitung zur Immaturenprüfung in
 Abendschulkursen der VHS
 05/1993: Erwerb der Hochschulzugangsberechtigung ohne
 Hochschulreife (Note 1,3)

Ausbildung

1979 – 1981 Berufsfachschule für chemisch-technische Assistenten
 05/1981: Abschluß: chemisch-technische Assistentin

Berufstätigkeit

11/1981 – 06/1987 Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Prof Hedrich
 07/1987 - 03/1988 Institut für Pathologie der MHH, Prof. Georgii
 04/1988 - 01/1994 Institut für Mikrobiologie der MHH,
 Prof. Bitter-Suermann
 04/1988 - 09/1988 Arbeitsgruppe Prof Dr. Frosch
 10/1988 - 12/1990 Arbeitsgruppe Prof Dr. Böttger
 01/1991 - 01/1994 Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. Bautsch

Studium

10/1993- 07/1999 Universität Hannover,
 Diplomstudiengang Biologie
 03/1998: Diplomprüfung in den Fächern: Genetik,
 Mikrobiologie, Biochemie und Immunologie
 05/1998 – 07/1999: Diplomarbeit in den Leibniz-Forschungs-
 laboratorien der MHH bei Prof. Haverich, AG Prof. Steinhoff
 Thema: *Vorarbeiten für die Untersuchung xenoreaktiver Oberflächen-
 strukturen auf einer Galaktose α -1,3 Galaktose negativen
 porcinen Endothelzelllinien* (Note „sehr gut“)
 Abschluss des Studiums im Juli 1999 (Gesamtnote „sehr gut“)

Promotion

Seit September 1999 im Rahmen der Promotion beschäftigt in
 den Leibniz-Forschungslaboratorien der MHH bei Prof. Haverich,
 AG PD Dr.rer.nat Martin
 Thema: *Untersuchungen zur Infektiosität von porcinen
 endogenen Retroviren (PERV)*

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel, sowie die zu Hilfsleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hemmingen, im Dezember 2002

(Monica Winkler)

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Haverich, der mir die Anfertigung der vorliegenden Arbeit in den Leibniz-Laboratorien ermöglichte.

Herrn Prof. Dr. Bitter-Suermann danke ich herzlich für die Übernahme des Referats.

Herrn PD Dr. Ulrich Martin bin ich sehr dankbar für die engagierte und persönliche Betreuung. Er hatte immer ein offenes Ohr für Probleme und erstaunlicherweise fast immer eine Lösung parat. Für die gute Zusammenarbeit und alles, was ich bei und von ihm gelernt habe, DANKE Uli.

Mein besonderer Dank gilt Maimona Id, die mich in die ersten Zellkulturgeheimnisse und PERV-PCRs einweihte und mir den Start im LEBAO sehr einfach machte.

Herzlichen Dank an Sandra Menke für ihre Hilfsbereitschaft, ihre nette Art, die Gespräche beim Kännchen, das Bonbonglas, das letzte Bild! und das sie mich beim Aufräumen und Beseitigen natürlich wichtiger Dinge immer unterstützt hat - sehr zur Freude der anderen...

Bedanken möchte ich mich bei Ina Gruh, die gerade in den letzten Monaten meine Gespräche mit dem Rechner, den Programmen oder einfach mit mir selbst stoisch ertragen hat und gleichzeitig für ein ausgesprochen angenehmes Klima im Denkraum, nicht nur! dort, gesorgt hat.

Das galt/gilt gleichermaßen auch für Bettina Sohns. Danke auch für viele Gespräche und Tipps u.a. zum Thema „Wie werde ich Doktor?“

Ich habe mich in dem netten Klima der Arbeitsgruppe – und des LEBAOs - immer sehr wohl gefühlt. Dafür möchte ich ganz herzlich Sandra Menke, Ina Gruh, Bettina Sohns, Kristin Radke, Kristin Schwanke, Eva Brüning (die mich durch ihren Großversuch mit wichtigen Erkenntnissen versorgt hat), Kerstin Rasche, Janina Beilner, Ingrid Schmidt-Richter, Ingrid Meder, Tanja Herden, Carmen Puschmann und Astrid Oberbeck danken. Mein Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für die Hilfsbereitschaft und die nette Atmosphäre. Auch private Treffen, bspw. im Sausolitos beim Cocktail, haben viel zum Wohlfühlfaktor beigetragen.

Bei den „ehemaligen“ PERV-Forschern Heiko Arends, Elvira Vogelwedde und vor allem Christian Templin möchte ich für die Etablierungen einiger Methoden, die Rosemarie und ich praktischerweise einfach übernehmen konnten, und den auch damals tollen Laborzeiten bedanken.

Großer Dank gilt meinem Mann Michael als Verantwortlichen für die Cynoexperimente und seinen „Jungs“. Besonders erwähnen möchte ich dabei Jens Hecker und Ralf Lorenz.

Rosemarie Burian danke ich für die Durchführung vieler Experimente im „PERV-Bereich“.

Bedanken möchte ich mich bei Roland Rohde für bereitwillige Hilfe bei verschiedensten Rechner- und Technikproblemen. Dank an Ingrid Meder für die Einweisung am FACS-Gerät und die Bereitwilligkeit, ihre Zellkultursachen und Zellen jederzeit mit mir zu teilen.

Joachim Denner danke ich für die Durchführung der Westernblots und für die Bereitstellung verschiedener Darstellungen von PERV. Bei Wilfried Kues bedanke ich mich für manchen Tip.

Dank an meine Freundin Karin Battmer, die uns/mir immer hilfsbereit und großzügig mit vielen Dingen ausgeholfen hat - bis hin zu Bett und Wohnung!

Bedanken möchte ich mich vor allem bei Birgit Krauß-Opatz für ihre Freundschaft und dass sie für meine Probleme/Frustphasen/Glück/einfach so immer ein offenes Wort hatte/hat und diese in langen Nächten, meist im Mezzo bei „Tausendundeine Nacht“, mit mir diskutierte/belachte/aufbaute/zuhörte...

Tiefen Dank an meine Mutter und immer mehr auch Wolfgang, sie hat/haben mir jegliche Unterstützung und Hilfe zukommen lassen.

Dank nochmals an meinen Mann Michael für sein Verständnis, gerade in den letzten 4 Wochen, und seine Unterstützung in vielerlei Hinsicht.

