

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta



## Bakalářská práce

Martina Černá

### **Prasečí endogenní retroviry z pohledu xenotransplantací**

Katedry fyziologie živočichů a vývojové biologie

Školitel : Krylov Vladimír, Ing.RNDr., Ph.D.

Praha 2007

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury.

3.5.2007

Martina Černá  
*Martina Černá*

Na tomto místě bych chtěla především poděkovat svému školiteli Vladimíru Krylovi , pod jehož vedením tato práce vznikla.

# 1. Obsah

<b>1. Obsah</b> .....	<b>4</b>
<b>2. Seznam používaných zkratk</b> .....	<b>5</b>
<b>3. Abstrakt</b> .....	<b>6</b>
<b>4. Co je xenotransplantace ?</b> .....	<b>7</b>
4.1 Historické milníky xenotransplantací .....	7
<b>5. Experimentální modely pro xenotransplantace</b> .....	<b>10</b>
5.1 Malé modely zvířat .....	10
5.2 Velké modely zvířat .....	10
<b>6. Orgány</b> .....	<b>12</b>
<b>7. Virové retrotransposony</b> .....	<b>13</b>
7.1 Struktura virového retrotransposonu .....	13
<b>8. Endogenní retroviry</b> .....	<b>16</b>
8.1 Klasifikace ERV .....	18
8.2 HERV .....	20
8.3 PERV .....	21
8.4 Evoluce .....	23
8.5 Přeskok ERV mezi druhy .....	24
8.5.1 Přenos PERV do tkání primátů .....	25
8.5.2 Přenos PERV do lidských tkání .....	26
<b>9. Závěr</b> .....	<b>27</b>
<b>10. Seznam citací</b> .....	<b>28</b>

## 2. Seznam používaných zkratek

CA	kapsida
ERVs	endogenous retroviruses sequences
Env	envelope /obálka/
Gag	group specific antigen
hDAF (CD55)	human decay-accelerating factor
RNasa H	H enzym ribonukleázy
LTR	long terminal repeats /dlouhé terminální repetice /
LTRs	long terminal repetition sequences
MA	matrix
NHP	non-human primates
NC	nucleokapsida
PBMC	peripheral blood mononuclear cells /směs monocytu a lymfocytu, krevní leukocyty s odstraněnými granulocyty /
Pol	polymeráza
PCR	polymerase chain reaction
PERV	Porcine Endogenous RetroViruses
PBS	primer binding site
PBSes	primer binding site sequences
Prt ,pro,PR	proteáza
RT	reverzní transkriptáza

### 3. Abstrakt

Xenotransplantace je přenos buněk, tkání či orgánů mezi živočišnými druhy. Byla navrhnutá jako možný zdroj náhradních orgánů (alografů), který je ovšem vystaven vážným problémům. Mezi ně patří etika a biologické překážky. Hlavními biologickými problémy jsou akutní odhojování a možnost mezidruhového přenosu patogenů, jako jsou endogenní retroviry (PERV). Kromě toho je zde možnost rozšíření infekce z příjemce xenogenní tkáně na širší populaci. Během laboratorních výzkumů na co-kulturách (prasečí buňky s PERV a lidské buňky) byla zjištěna infekce lidských buněk PERV. Tímto bylo v laboratorních podmínkách dokázáno, že může docházet k mezidruhovému přenosu. Jinými testy, tentokrát přímo na pacientech, kterým byla prasečí tkáň transplantována, byla infekce PERV do okolních buněk vyvrácena.

Xenotransplantation is the transfer of cells, tissues, or organs between species. Problems joined with this phenomenon can be divided to ethical and biological ones. The most important biological obstructions are the acute rejection and interspecific transfer of pathogens, such as endogenous retroviruses. In addition, there is a possibility that these infections could spread from the xenograft recipient to the general population. According to the laboratory research, when porcine tissue cells were cultivated together with human ones, it was discovered the infection of human cells by porcine endogenous retroviruses (PERV). This way was proved in laboratory conditions, with conclusion that there is a possibility of interspecific transfer. However by additional research, this time directly on patients with transplanted porcine tissue, PERV infection to surrounding cells was refuted.

## 4. Co je xenotransplantace ?

Xenos je řecky cizí. Xenotransplantací rozumíme použití orgánových struktur (např. tkání či celých orgánů) v rámci odlišných živočišných druhů. Mezi nejdiskutovanější téma patří užití prasečích orgánů pro lidské potřeby. Mimo etických otázek jsou zde i závažné biologické překážky.

V dnešní době se stále zvyšuje poptávka po náhradních orgánech, proto se je snažíme nahradit uměle vyrobenými, nebo hledáme jiné alternativní metody, jako je xenotransplantace. V počátcích lidé uvažovali nad transplantací orgánů z lidoopů (podle vnějších znaků, nám nejpodobnějších).

### 4.1 Historické milníky xenotransplantací

První záznam o xenotransplantaci (sloučení člověka se zvířecím orgánem) je možné datovat již do 12st.př.n.l. Kdy bůh Shiva a bohyně Párvatí čekali dítě, které se narodilo když byl Shiva na lovu. Když se Shiva vrátil, domníval se, že dítě není jeho a proto mu useknul hlavu. Shiva chtěl tento omyl napravit a užil k tomu hlavu prvního zvířete, které šlo kolem, slona. První zdokumentovaný případ byla xenotransfúze provedená Jeanem-Baptistou Denisem 15.června (1667) a Paulem Emmerezem na 15-ti letém chlapci. Trpěl těžkou zimnicí a byla mu podána jehněčí krev. Oba prohlašovali, že ošetření bylo účinné (Farr, 1980). Další pokusy byly prováděny při výměně lidské lebeční kosti za kost psi (Haeseker, 1991).

Konečně v roce 1816 John Henry Leacock povoláním lékař provedl mezidruhovú transfúze a došel k závěru, že by měli být jak dárci, tak příjemci stejného druhu (Leacock, 1817; Schmidt and Leacock, 2002; Schmidt, 2004). Nicméně to další experimentování s mezidruhovými přenosy tkání nezastavilo. V roce 1893, dřívější objevitel insulínu Watson Williams transplantoval tři části ovčího pankreatu dítěti s diabetem. Záhy zaznamenal snížení glukosy, ale pacient po třech dnech zemřel (Williams, 1894). Dne 12.června 1920, chirurg Serge Voronoff, ruského původu, poprvé v historii medicíny transplantoval kousek lidoopích testes (varlat) do lidského scrota (šourek) (Augier et al., 1996; Real, 1997). Do roku 1930 Voronoff provedl 500 transplantací. On sám je pojmenoval jako homografts (stejně štěpy) nebo jinak, transplantací sesterských druhů (Voronoff, 1924). Brzy začal s přenosem primátích vaječníku ženám v menopauze. Do doby své smrti (1951) provedl transplantaci lidoopí tkáně zhruba

dvěma tisícům lidí (Champsaur, 1929). Harold Neuhof (1923) transplantoval jehněčí ledvinu pacientovi, který byl otráven rtutí. Pacient žil ještě devět dní po operaci. Od roku 1923 do roku 1963 vývoj na poli xenotransplantací značně stagnuje. Tento nezájem je do značné míry způsoben neschopností potlačit reakci imunitního systému na danou tkáň. Mathieu Jaboulay se na základě experimentů s tzv. heterografty snažil objevit podmínky, které podporují vznik krevních sraženin (Bhandari and Tewari, 1997). V roce 1961 Peter Gorer poprvé navrhnul název pro mezidruhovou transplantaci - xenotransplantace (Gorer et al., 1961). V nastávajících letech se čím dál tím častěji objevují po celém světě transplantace pavíáních či šimpanzích ledvin, s menší či větší úspěšností, která se pohybuje v řádu dní. Dne 5.listopadu 1963, Keith Reemtsma provedla první xenotransplantaci s užitím imunosupresiv (actinomycin C, azathioprin, prednison) a s ozářením. Pacientovi byla voperována ledvina makaka rhea. Pacient zemřel až po 63 dnech na šok spojený se zápallem plic. O necelý rok později 13.ledna 1964, Reemtsma transplantovala šimpanzí ledvinu 23leté ženě. Zemřela o devět měsíců později na akutní elektrolytickou nerovnováhu. Tato pacientka žila nejdéle ze všech doposavad provedených operací (Reemtsma, 1965). V roce 1966, Robert Perper a John Najarian zjistili, že k hyperakutní rejekci dochází tím rychleji čím dále jsou od sebe dárce a příjemce orgánu v zoologické klasifikaci (Perper and Najarian, 1966). Austin a Robert Ersek použili v roce 1983 prasečí kůži na místo popálené (Ersek and Denton, 1983).

Nejznámější transplantace byla provedena 26.října 1984, Leopardem Baileym. Voperoval srdce (osmiměsíčního) pavíána dvanácti denní holčičce, jménem Baby Fae (Bailey, 1984; Bailey, 1985). Po dvaceti dnech zemřela na rejekci orgánu. Tato operace pozvedla naděje lidí v budoucnost xenotransplantací.

V roce 1992 se na trh dostává imunosupresivum FK506 neboli tacrolimus (Warty et al., 1988). Dne 28.června 1992, Thomas Starzl implantoval nemocnému pacientovi hepatitidou C pavíání játra. Pacient přežil sedmdesát dní (Starzl et al., 1993). Dne 23.prosince 1992 v Cambridge, David White vyšlechtil a přivedl na svět první humanizované prase (Cozzi and White, 1995). Transgenní prase neslo hDAF neboli CD55. V roce 1995, Nextran získal transgenní prase nesoucí další regulátor lidského komplementu, DAF a CD59 (Byrne et al., 1996).

Před deseti lety, Clive Patience (z Immerge BioTherapeutics) a Robin Weiss ukázali schopnost prasečích endogenních retrovirů, PERV infikovat lidské buňky *in vitro*. V experimentu použil buněčnou kulturu lidských a prasečích buněk (Patience et al., 1997).



Naproti tomu v roce 1999, Khazal Paradis z Imutranu, dokázal nepřítomnost infekce PERV na 160 osobách žijících s prasečí tkání (Paradis et al., 1999). V roce 2000, Maarten-Paul van de Kerkhove a Daniel Salomon dokázali schopnost produkce PERV v prasečích pankreatických ostrůvcích. Také dokázali transkripční aktivitu PERV a následně infekci v již transplantované prasečí tkáni (Van der Laan et al., 2000).

Říjnem 2001 započala éra tzv. knock-outových prasat. V laboratoři BioTherapeutics byli vytvořeny prasata s knock-outovaným genem pro enzym alfa 1,3-galaktosyl transferázu. Dne 25.června 2002, PPL Therapeutics oznámilo narození čtyř klonů dvojitě knock-outovaných prasat, s celkovou ztrátou genu pro enzym alfa 1,3-galaktosyl transferázu (Dai et al., 2002; Phelps et al., 2003).

## **5. Experimentální modely pro xenotransplantace**

### **5.1 Malé modely zvířat**

Xenotransplantace orgánů byla nejprve studována na modelech malých zvířat a na modelu prasete a modelu NHP.

Základním modelem bylo křeččí či myší srdce transplantované do potkana. Z větší části bylo odhojení křeččího srdce a potkana stejné jako odhojení myšího srdce. Potkan nemá dostačující schopnost k formování xenoreaktivních protilátek proti myšimu či křeččímu štěpu, tudíž je rejekce závislá na syntéze protilátek z transplantátu. Společně s příjemcovým komplementem vedou k rejekci orgánu (Soares et al., 1992).

Taktéž je transplantace myšího a křeččího srdce do potkana dobrým modelem pro pozorování akutní vaskulární rejekce (Hasan et al., 1992).

### **5.2 Velké modely zvířat**

Mezi velké modely počítáme transgenní prasata exprimující hDAF (Cozzi et al., 2000; Vial, 2000) a v některých případech nesoucí lidské geny inhibující komplementovou kaskádu. V dalších postupech transplantace se využívá imunosuprese. Ve většině případech prase-donor, primát-recipient dojde k hyperakutní rejekci dříve než se začne exprimovat hDAF (McCurry et al., 1995; Cooper et al., 1997). Dokonce když se rejekci vyhneme, transgenní orgány exprimující hDAF napodobují akutní vaskulární rejekci. Rejekci můžeme taktéž zpozdit (McCurry et al., 1995; Bhatti, 1999; Cozzi et al., 2000). Transgenní prasečí srdce se podařilo udržet v těle až 99 dní, ale pouze jako neživotaschopný orgán (heterotopický transplantát) (Bhatti et al., 1999). Když byl orgán umístěn na své místo, kde měl být plně funkční nejdelší doba jeho udržení byla u srdečního transplantátu 1 měsíc (Vial et al., 2000), u ledvinového 78 dní (Cozzi et al., 2000). Ostatní orgány jsou odhojeny ještě v kratší době.

Vědci navrhují dvě různá řešení, která by prodloužila dobu přežití prasečího orgánu v primátech. První stojí na jiné kombinaci imunosupresiv, druhé na genové změně prasat. Ta by měla vést k dodatečné produkci faktorů inhibujících faktory vedoucí k akutní vaskulární rejekci.

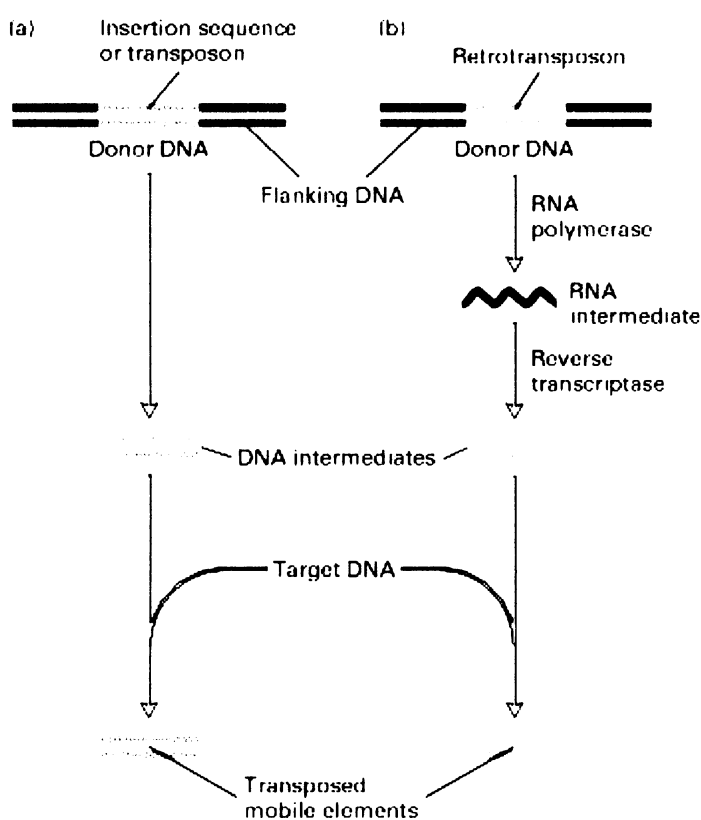
Dalšími modely jsou non-human primates (NHP). Další podrobnosti o možném přenosu viz. níže.

## 6. Orgány

Lidem se nabízí řada živočichů podobného vzrůstu pro transplantaci. Problémem je, že člověk chodí po dvou (bipedalismus) a zvířata po čtyřech (kvadrupedalismus). Orgán živočicha chodícího po dvou je jinak přizpůsoben zátěži než tentýž orgán u živočicha chodícího po čtyřech. Tyto orgány se liší umístěním v těle, silou stěny orgánu. Jako příklad můžeme uvést životaschopnost klokaní a prasečí chlopně v člověku. Klokan se pohybuje podobně jako člověk a jeho chlopeň je vystavena podobné zátěži. Naproti tomu, prasečí chlopeň je dimenzována na mnohem nižší zátěž. Po transplantaci u ní dochází k vyššímu namáhání, nedostatečnému prokrvení a ukládání vápenatých solí. Prasečí chlopeň se tedy „opotřebí“ mnohem rychleji než klokaní. Taktéž se zde projevuje jiné anatomické uspořádání cév zásobujících plíce krví u člověka a prasete. To může komplikovat chirurgické postupy při xenotransplantaci. Dále se liší rychlostí růstu. Např. srdce kojence může být nahrazeno srdcem mláděte paviána, ale nikoliv selete. Později musí být vyjmuto jelikož roste nestejně rychle jako zbytek orgánů. Proto se nabízí otázka zda budeme schopni zařídit plně fyziologickou funkci orgánu.

## 7. Virové retrotransposony

Virové a neviróvé retrotransposony spadají do kategorie pohyblivých DNA elementů, které se přemísťují jako RNA intermediát využívající RT (reverzní transkriptázu). Obr.1. názorně ukazuje způsob integrace transposonu a retrotransposonu. Donorová DNA obsahuje sekvenci retrotransposonu, která je RNA polymerasou následně transkribována. Po přepsání reverzní transkriptázou vzniká dsDNA intermediát, který je integrován do cílové dsDNA (Lodsih and Zipursky, 2000).



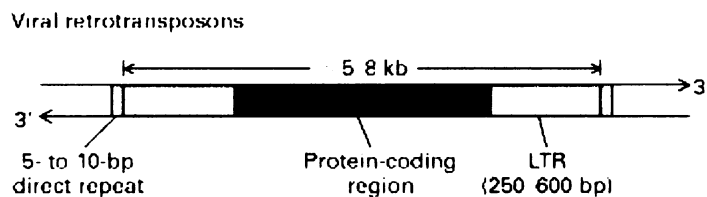
**Obr. 1.** Klasifikace mobilních elementů na dvě velké třídy. (a) Inerční sekvence a transposony (oranžově), přímé přepsání na dsDNA intermediát. (b) Retrotransposony (zeleně) jsou nejprve přepsány na molekulu RNA, poté pomocí RT na ds DNA. Obě dsDNA jsou poté zaintegrovány do cílové sekvence dsDNA. Převzato z Lodsih and Zipursky (2000).

### 7.1 Struktura virového retrotransposonu

Základní struktura virového retrotransposonu v eukaryotických organismech je znázorněna na Obr. 2. Na obou koncích 5' i 3' jsou přímé repetice, které jsou typické pro tyto elementy. Po obou stranách sekvencí kódujících proteiny jsou identické sekvence, LTRs (dlouhé

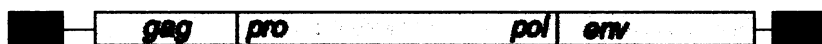
terminální repetitivní sekvence) jejichž délka je 250 – 600bp. LTRs jsou důležité pro integraci retrovirové DNA a jsou rozhodujícím faktorem pro vznik životního cyklu retroviru (Lodsih and Zipursky, 2000). LTRs jsou rozděleny na tři elementy: U3, R, U5. U3 oblast je odvozena z unikátní sekvence na 3'konci RNA, R domény obsahují repetitivní sekvence na obou koncích RNA a U5 oblast obsahuje unikátní sekvence na 5'konci RNA. LTRs jsou důležité pro přepis RT, díky níž enzym „skáče“ z jednoho konce templátu na druhý (Coffin et al., 1997).

Velikost těchto tří elementů je značně rozdílná pro různé retroviry. U3 obvykle dosahuje od několika set až do tisíce nukleotidů. R dosahuje od 12 až více než 100 nukleotidů, U5 od 100 nukleotidů. U3 zahrnuje mnoho kontrolních oblastí transkripce proviru, který zahrnuje vlastní promotor a mnoho enhancerových sekvencí. Nezměněná enhancerová sekvence hraje důležitou roli pro rozpoznání tkáně ve které se následně virus pomnoží a tedy i patogeneze. Avšak i malé změny v sekvenci U3 mohou změnit patogenní virus v nepatogenní a naopak.



**Obr. 2.** *Obecná struktura eukaryotického virového retrotransposonu. Zleva: přímá repetice (světle modrá barva), tato část obsahuje promotor pro hostitelskou RNA polymerasu II. (světle zelená), kódující region pro proteiny (RT, IN, Gag), je až 80% retrotransposonu (tmavě zelená), LTRs (světle zelená), přímá repetice (světle modrá). Převzato z Lodsih and Zipursky (2000).*

Geny kódované retroviry jsou podle konvencí značeny třípísmenovými názvy, malým písmem a kurzívou (Baltimore, 1975). Produkty každého genu jsou psány stejným jménem jako je jméno genu, ale první písmeno je v názvu velké. Proteiny vytvořené proteolytickými úpravami primárních produktů translace mají dvoupísmenné názvy, pokud je jejich funkce známa, nebo jsou označeny písmenem „p“, následovaným číselnou hodnotou velikosti polypeptidu, pokud jejich funkce dosud nebyla určena (Leis et. al., 1988). Tato nomenklatura byla vystředána novější, kde jsou všechny proteiny označeny podle jejich molekulové hmotnosti a předponami „p“ (protein), „pp“ (phosphoprotein), „gp“ (glykoprotein) a „Pr“ (prekursor) (August et al., 1974). Geny kódující proteiny jsou vyznačeny v Tab 1.



**Obr. 3.** *Struktura retrotransposonu : LTR ,gag, pro, pol, env, LTR. Převzato z Bromham (2002).*

**Tab. 1.** *Vlastnosti genů retrovirových skupin. Převzato z Coffin et al (1997)*

	<b>Geny</b>	<b>Vlastnosti / funkce proteinu</b>	<b>Kódující proteiny</b>
<b>Společné</b>	gag	Prekurzor vnitřních strukturních proteinů	MA (matrix), CA( capsid), NC (nukleokapsid)
	pro	<i>Protéaza (PR)</i>	<i>PR</i>
	pol	Prekurzor reverzní transkriptázy (RT) ,prekurzor integrázy (IN)	RT,DNA pol, Rnasa H, IN
	env	Prekurzor obalu glykoproteinů precursor	(SU) - surface (povrch): glykoprotein, (TM) transmembránový protein
<b>Některé</b>	dut	Deoxyduridin trifosfatásu (dUTP nebo DU)	DU

## 8. Endogenní retroviry

Mezi čtyřicátými a padesátými lety dvacátého století Barbara McClintock objevila transposibilní elementy „skákající geny“, znázorněné na Obr. 2. a Obr. 3.. Samotný objev ERV proběhl až v šedesátých letech devatenáctého století Howardem M. Teminem (1975). Jako první vyslovil hypotézu o provirech (ačkoli objev reverzní transkriptázy přišel později). V roce 1964, byl název endogenní retroviry (ERV) přijat (McClintock, 1984). Endogenní retroviry mohou pocházet z integrovaných exogenních retrovirů, které jsou „uvězněny“ v genomu díky své mutaci v esenciálních genech (Coffin et al., 1997). Jsou v genomu uloženy jako nekódující DNA (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001).

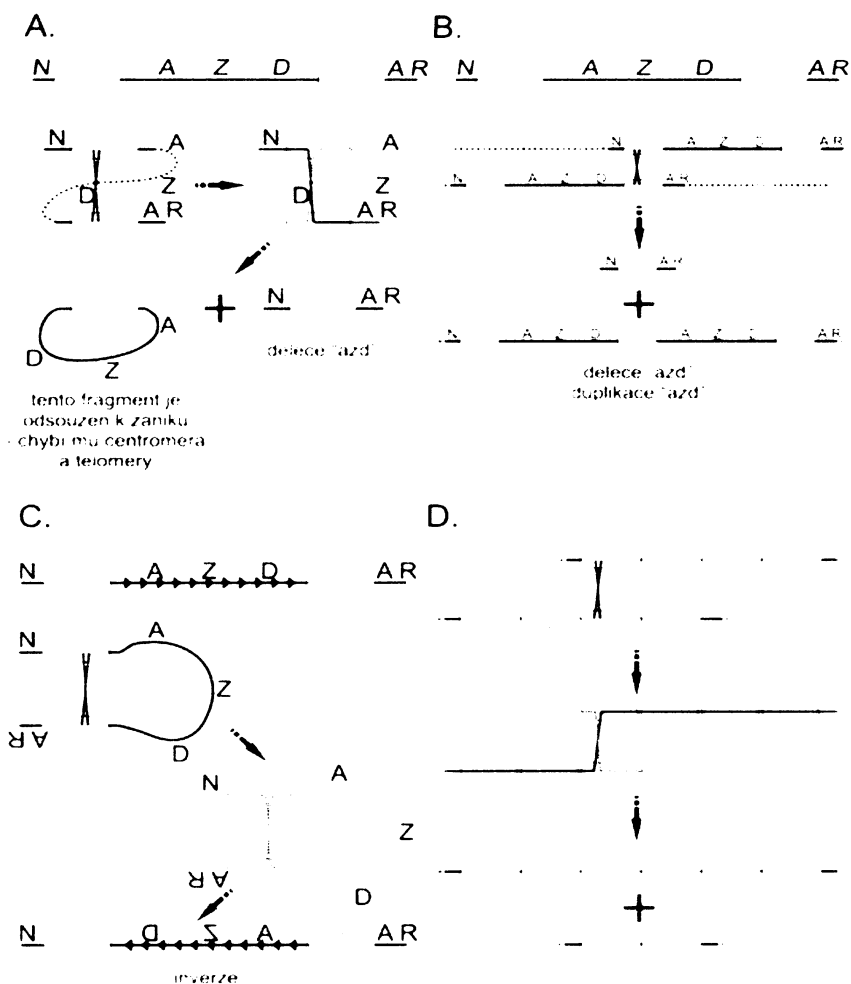
Většina eukaryotických genomů obsahuje až 50 % retrovirových genů a jim příbuzných endogenních retrovirových sekvencí (Jern et al., 2005). Jejich schopnost horizontálního přenosu je vázána na hostitelský genom. Zatímco jsou exogenní retroviry infekční, obsahují-li replikační cyklus, vyžadující integraci provirové DNA do hostitelské buněčné DNA, ERV jsou přenášeny podle klasického Mendelovského příkladu, přes germinální linii, jako provirová DNA (Coffin et al., 1997; Wilkinson et al., 1994). ERV jsou aktivní u mnoha savců, včetně šimpanze. Pokud je ERV schopen replikace může být příčinou možného onemocnění, nebo naopak chránit hostitele před napadením exogenními viry (Barbulescu et al., 1999). Exprese ERV v hostitelském organismu má vliv na možný výsledek infekce v obou směrech, pozitivní (prospěšný), negativní (škodlivý) (Coffin et al., 1997). Toto zahrnuje obstarání si genů, pomocí rekombinace s exogenními viry, interferenci a spojení s výstavbou virionové kapsidy, blokování buněčných receptorů pro vstup viru a modulaci imunitní odpovědi na exogenní virus.

V lidském genomu jsou zabudovány jako fosilie endogenních retrovirů (mutované a neschopné transpozice), které zaplňují asi 8 % genomu (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001). Transposibilní elementy, jako je LINE, Alu a retroelementy a DNA transposony tvoří až 40% lidského genomu (Kazazian, 2000; Griffiths, 2001). ERV představují obrovskou zásobu virových genů, které mohou být aktivovány mutací způsobenou ozářením či chemikálií, nebo rekombinací s exogenními retroviry (Perl and Banki, 1993)

Endogenní retroviry, také nazývány LTR retrotransposony, jsou strukturně podobné provirům skutečných retrovirů. Obsahují LTRs a také geny *Gag*, *Pol*, *Env* a *Pr*t. Intaktní endogenní retroviry jsou dlouhé 7-9 kb (Jern et al., 2005). Mnoho z nich je zkrácených, zejména



na 5' konci. Často také můžeme najít pouze samostatné LTR, jako výsledek integrace retroviru a následné intrachromozomální rekombinace mezi oběma LTR nebo nerovnoměrné rekombinace dvou homologních chromozomů vedoucí k delecí kódující části retroviru na Obr. 4.



**Obr. 4.** Repetice podněcují přestavby genomu

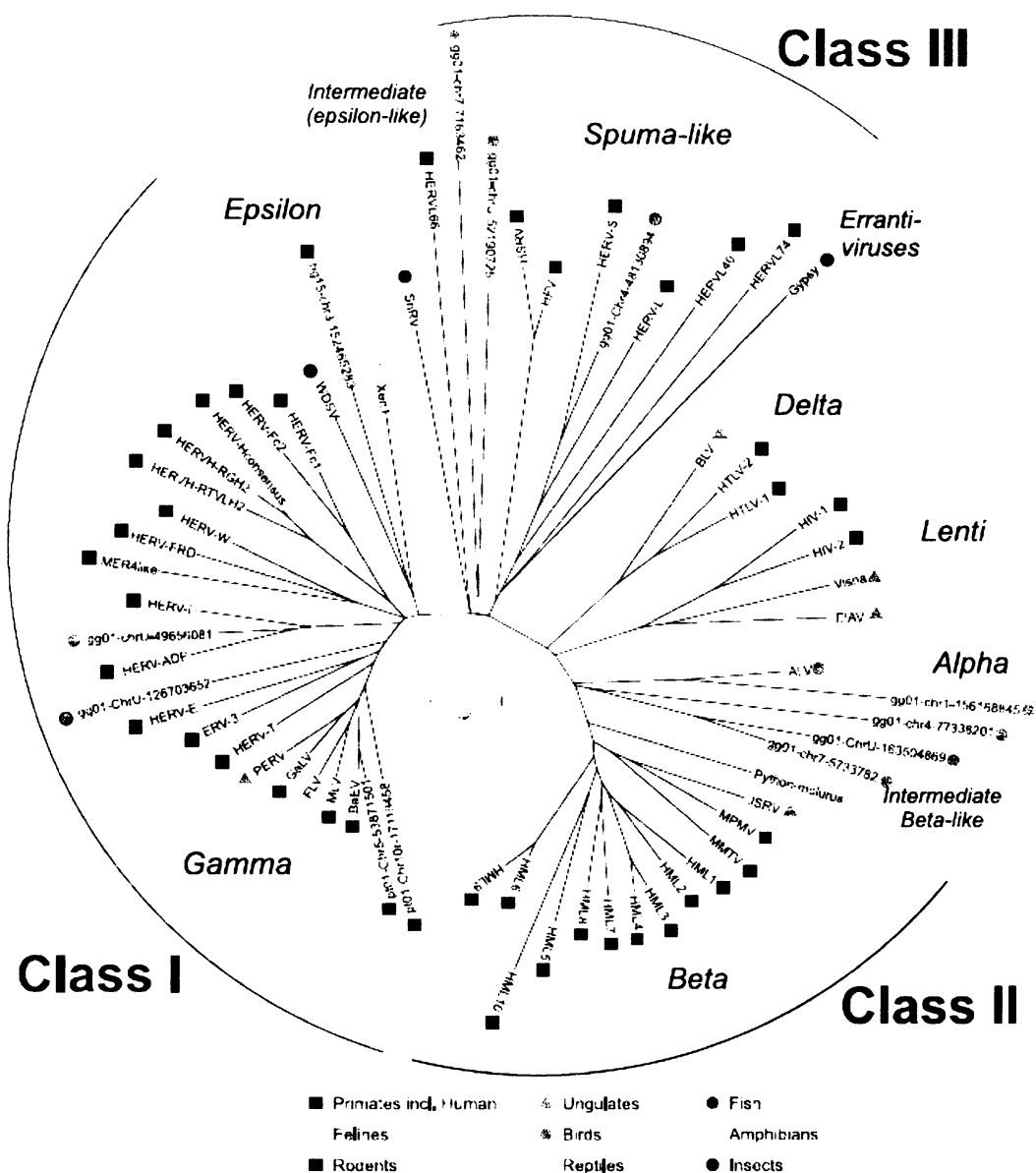
*A+B: oblast genomu obsahující přímé repetice (ve stejném směru, stejná sekvence je na stejném řetězci DNA). Tyto dvě repetice se mohou párovat a rekombinovat. Intrachromozomální rekombinace (A) vede k delecí. Hypotetický kruhový fragment je ztracen - nemá centromeru. Nerovnoměrný crossing-over s interchromozomální rekombinací (B) způsobuje delecí a duplikaci. C: Intrachromozomální rekombinace mezi dvěma invertovanými repeticemi (v opačném směru, stejná sekvence DNA je v opačných řetězcích DNA) vede k inverzi mezilehlé sekvence DNA. Funkční následky takových přestaveb mohou být různé, od nýmých změn až po letální. D: Polymorfismy v tandemových repeticích mohou vznikat mechanismem nerovnoměrného crossing-overu).*

## 8.1 Klasifikace ERV

Mnohé ERV v lidské DNA nekódují ani proteiny ani RNA. Tato nekódující DNA se skládá hlavně z repetitivních elementů. Některé patří mezi jednoduché repeticce, tvořené 2-5 nukleotidovými sekvencemi, tvořící tzv. mikrosatelit. Tento mikrosatelit nejspíše vznik při replikaci, kdy došlo k tzv. sklouznutí (slipping) po templátu (Stephan and Walsh, 2001). Ostatní repeticce vytváří spíše komplex, který jim napomáhá k vlastní replikaci a rozptýlení po celé délce genomu (Braam and Reznikof, 2001). Endogenní retroviry lze rozdělit do tří hlavních rodů a dále do sedmi tříd v Tab 2.

**Tab. 2.** *Klasifikace retrovirů. Převzato z Jern et al. (2005) a Weiss (2006)*

Rod	Třída	speciální vlastnosti	Genom
Alpha			jednoduchý
Beta	II.		jednoduchý
gamma	I.	transposibilní elementy užívají, transposasu	jednoduchý
Delta			složený
epsilon			jednoduchý
Lenti			složený
spuma-like	III.		složený



**Obr. 5.** *Fylogenetický strom retrovirů ukazuje jejich příbuznost na základě podobnosti Pol (proteinu). Třídy: I., II., III. Zahrnuje sedm retrovirových rodů: alpha-, gamma-, delta-, epsilon-, lenti-, a spuma-like retroviry. Poněkud volně definované ERV třídy jsou vyznačeny na periferii. Různé hostitelské druhy jsou označeny symbolem a taxonomickou jednotkou. Nové sekvence jsou pojmenovány podle jejich chromosomální pozice uvnitř příslušného genomu. (Např. hg15 a Human genom; gg01). Převzato z Jern et al. (2005).*

Taxonomie retrovirů je tradičně založena na pozorování jejich fenotypických vlastností. Klasifikace používající ERVs, trpí nedostatkem fenotypických informací, a proto je nutné provést analýzu nukleotidových sekvencí. Velice podobné sekvence pro Pol a RT má těchto sedm retrovirových rodů: alpha-, gamma-, delta-, epsilon-, lenti-, a spuma-like retroviry. Ačkoli ERVs nejsou ještě plně charakterizovány, jsou volně rozděleny na definované třídy. Byly vytvořeny na základě HERV sekvencí (Wilkinson, 1994; Lindeskog, 1999; Mager and

Medstrand, 2003). Po analýze RT oblasti byl rod gamma-retrovirů zařazen do třídy I., beta-retroviry do třídy II., spuma-retroviry a spuma-like retrovirů do třídy III. V případě lenti-retrovirů a delta-retrovirů nejsou známy endogenní analogy (Herniou et al., 1998).

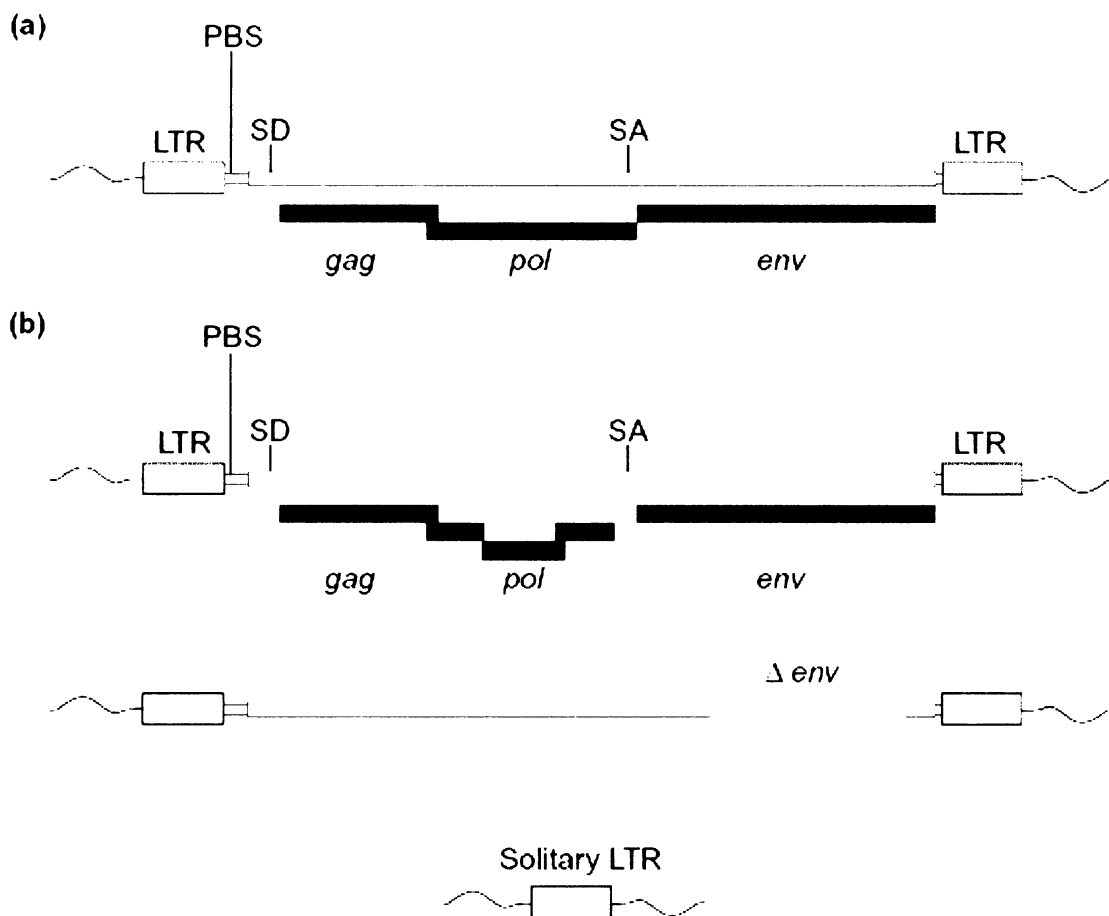
ERV klasifikace a seskupení je původně založena na podobnosti sekvencí mezi provirovou PBS a hostitelskou tRNA (Coffin et al., 1997). Tato klasifikace je zachovaná pro některé ERVs, HERV-E (Anderson et al., 2005) mnoho HERV-H (Jern et al., 2004). Avšak pro mnoho ostatních ERV skupin je tento systém nepoužitelný, proto existuje alternativní řazení podle PBSes (Tristam, 2000) (HERV-H/F, ERV3, ERV9/HERV-W) (Oja et al., 2005).

## 8.2 HERV

Jako ostatní transposibilní elementy, uvažuje se i o HERVs, že hrají důležitou roli v evoluci savčích genomů. Byla provedena analýza HERVs a jejich integračních míst a zároveň byla sledována evoluční cesta těchto elementů uvnitř rodu primátů. Podle naměřené odlišnosti LTR sekvencí a stanovení tzv. molekulárních hodin byl odhadnut věk HERVs (Bock and Stoye, 2000; Tristem, 2000; Bromham et al., 2001). Tristem (2000) popsal 22 rodin HERV, pomocí molekulární fylogeneze a rozdělil je do monofyletických skupin podle charakteristického tRNA PBS. Jedna z rodin HERV-K, obsahuje lidské specifické proviry s prakticky nepoškozeným genomem (Barbulescu et al., 1999). Zahrnuje nejméně jeden HERV funkčně kompletní a schopný produkce virových partikulí (Barbulescu et al., 1999; Lander et al., 2001). Rod I. a rod III. HERVs jsou nejstaršími skupinami a jsou ve všech primátech rodech. Rod II. Představuje HERVs, které byly donedávna ještě aktivní. Mnoho z nich se nachází pouze genomu šimpanzů a lidí. Několik provirů z podskupiny HRV-K (HML-2) jsou lidsky specifické (Medstrand, Mager, 1998). Tyto viry byly nejspíše aktivní před 5-ti miliony lety.

**Tab. 3.** *Třídy HERV. Převzato z Griffiths (2001.)*

Třída	HERV
I. (gamma)	HERV-W, HERV-H
II. (beta)	HERV-K
III. (spuma-like)	HERV-L, HERV-S



**Obr. 6.** *Struktura retrovirových provirů*

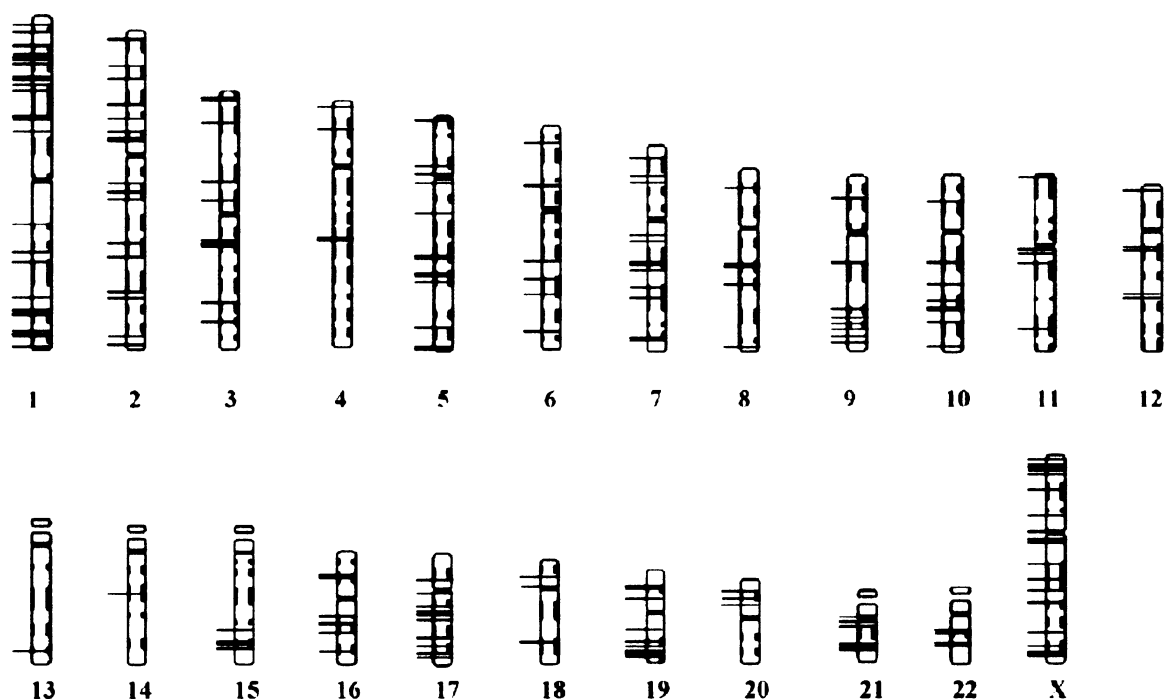
a) *Infekční retrovirus se třemi geny: gag, pol, env. LTRs, PBS, SD (splice donor), SA (splice akceptor).* b) *HERVs podobná struktura jako je na obr. a) s vyznačenými bodovými mutacemi (černé pruhy). Homologní rekombinací vzniklý samotný LTR. Ačkoli je téměř celá HERV sekvence defektní, LTRs mohou být stále aktivní. Transkripce HERVs je zvláště běžná v placentě a v případě zánětlivé nemoci a rakoviny. Převzato z Griffiths (2001).*

### 8.3 PERV

Prasečí endogenní retroviry spadají do rodu gamma-retrovirů. Všechny druhy prasat obsahují ve svém genomu PERV (Patience, Switzer et al., 2001). Podle jejich tropismu (Patience, Switzer et al., 2001; Takeuchi et al., 1998) jsou rozděleny na tři podskupiny: PERV-A a PERV-B, obě infikují lidské i prasečí buňky *in vitro* (Patience, Takeuchi, Weiss, 1997) a PERV-C infikující pouze prasečí buňky (Patience, Takeuchi, Weiss, 1997; Takeuchi et al., 1998). Vzhledem k PERV k blízkému vztahu s gamma-retroviry (např. virus myší leukémie - MLV, virus kočičí leukémie a gibbon ape leukemia virus (GALV)) (Patience, Takeuchi, Weiss, 1997).

V prasečích replikujících se buňkách je PERV-C schopen se rekombinovat se sekvencí pro env s PERV-A a produkovat A/C rekombinanty, které schopnější infikovat lidské buňky (Oldmixon et al., 2002; Ritzhaupt et al., 2002; Wilson et al., 1998; Wilson et al., 2000; Wood et al., 2004). Pravidelné pasážování PERV na lidských buňkách může navodit zvýšení PERV, jako očekávanou adaptaci spojenou s prodloužením LTR (Scheef et al., 2001). Podobná přizpůsobivost byla již dříve popsána na viru kočičí leukémie a MLV. Oba viry způsobují nádorové bujení (Thomas et al., 1990; Yoshimura, Wang and Cankovic, 1999). Maligní bujení je způsobeno integrací virů do blízkosti protoonkogenů a zahájení exprese. Nedávno byla provedena studie integrace retrovirové DNA do kompletní lidské DNA (Narezkina et al., 2004; Schroder et al., 2002; Wu, Li, Crise and Burgess, 2003), ale nebyla provedena celková analýza integrace PERV. Tyto studie popisují rozdíly integrace mezi retrovirem a jeho původním hostitelem a hostitelem jiného druhu. (Wu and Burgess, 2004).

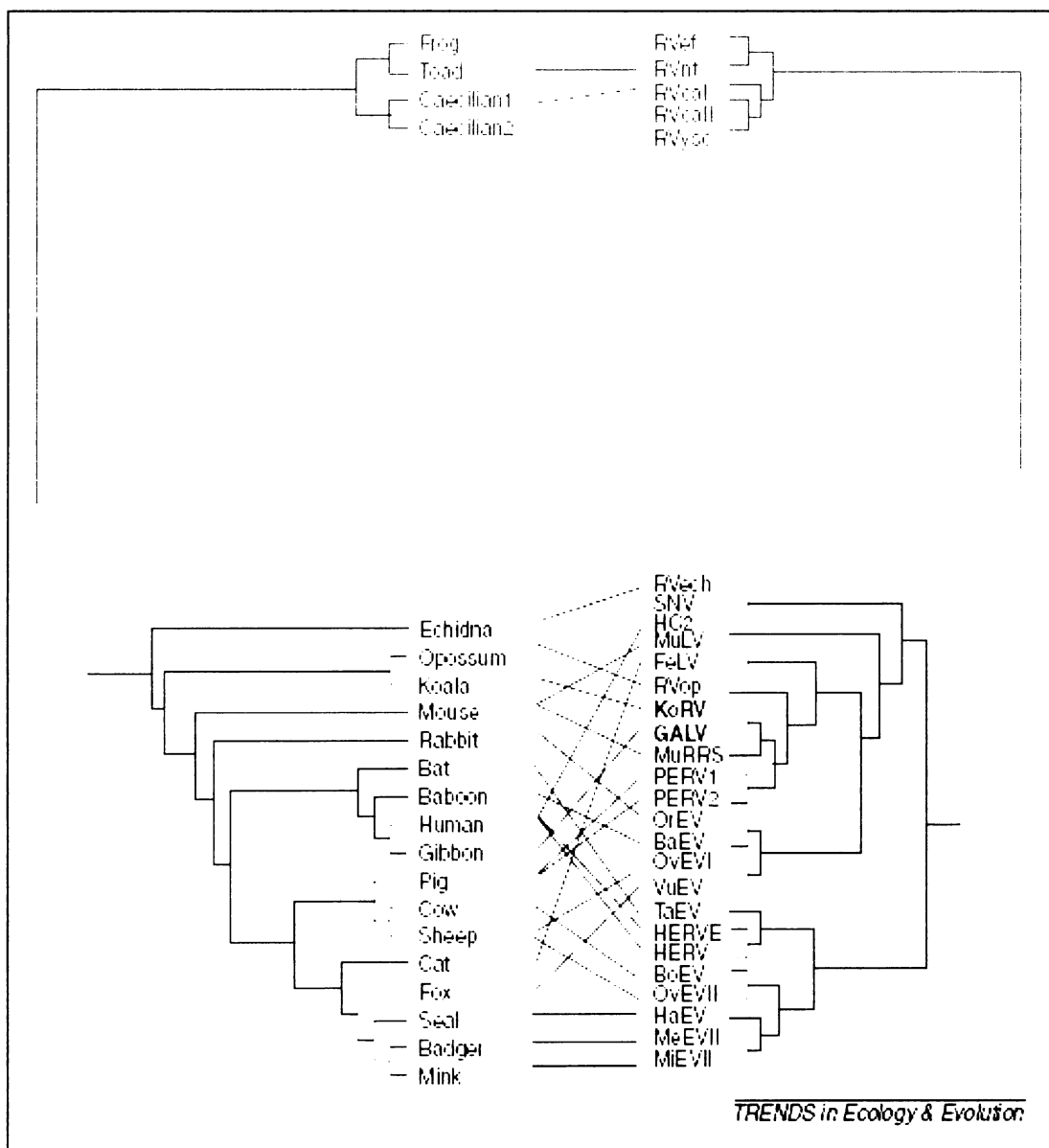
Byla vypracována tabulka inzercí PERV do lidského genomu na Obr. 7. Na základě pokusu na lidských (HEK- 293) buňkách, kde po 15ti dnech došlo k integraci PERV.



**Obr. 7.** *Mapa PERV integračních míst na lidských chromosomech. Převzato z Moalic et al. (2006).*

## 8.4 Evoluce

Pro představu rizika přenosu prasečích retrovirů do lidské tkáně je dobré znát jejich evoluční vztahy na Obr. 8. (Martin et al., 1999). ERV mohou přeskakovat mezi druhy. Fylogeneze mezi mnohými ERVs, např. některé ERVs obojživelníků (modře), plazů (zeleně) a ptáků (žlutě) odpovídají fylogenezi hostitelů. Kdežto ERVs savců (červeně), kde byl fylogenetický strom vytvořen na základě Pol genu, nemá žádnou evoluční podobnost hostitelů a ERVs. Mezi těmito druhy dochází velice často v přenosu ERVs, tudíž i vzájemné fylogenetické vztahy jsou velice nejasné.



**Obr. 8.** Fylogeneze retrovirů a jejich hostitelských druhů. Převzato z Martin et al. (1999).

## 8.5 Přeskok ERV mezi druhy

Zda dochází k přeskoku mezi druhy je doposavad sporné. Provedené výzkumy popisují obě situace. Mimo výskytu dárcovských ERV v hostitelských tkáních a jejich aktivity je nutné stanovit podmínky za kterých by mohlo dojít ke vzniku exogenního viru (Patience et al., 2001). Předpokladem k zahájení aktivity transposibilních elementů v genomu je změna vnějších podmínek, která zapříčiní změny v regulaci genomu (Waugh O'Neill et al., 1998). Barbara McClintock, která byla první kdo se zajímal o transposibilní elementy, předpokládala, že transpozice může být spuštěna environmentálním stresem či hybridní dysgenezí (genetická inkompatibilita mezi rodičovskými genomy v hybridu) (McClintock, 1983). Stresem ovládaná transpozice může být považována, jako hostitelem zprostředkovaný mechanismus, který vede k novému vzniku genetických variant (znovuuspořádáním hostitelské DNA) a vede též ke změně zákonitostí v genové expresi (Palevitz, 2000). Tato hypotéza popisuje retroelementy jako symbiotickou část hostitelského genomu. Vznikající mutace během transpozice si dělá genom sám v rámci své „remodelace“ a reaguje tak rychle na změnu vnějšího prostředí (Hurst and Werren, 2001). Jiná teorie je představuje jako „sobecké“ (parazitické) elementy, nad kterými genom nemá prázdnou kontrolu. Jsou schopné se sami replikovat, expandovat na různá místa v genomu a tím narušovat jeho organizaci. Za předpokladu, že jsou to parazité by neměly přerušovat oblast genové exprese (aby tím svého hostitele nezabily), ale oni se vkládají. Některá pozorování předpokládají, že jsou retroelementy aktivně odstraňovány či potlačovány hostitelským genomem, spíše než by byly ponechány jako symbionti. Velký počet jednotlivých HERV LTRs je dokladem aktivního odstraňování HERV z lidského genomu (Benit et al., 1999).

Důležitou roli v regulaci aktivity a expresi transposonů hraje DNA methylace. Aktivita HERV je vždy podstatně vyšší v rakovinotvorných buňkách (kde jsou změny v methylaci a je tím pozměněna i struktura chromosomů) (Boeke and Stoye, 1997; Kidwell and Lisch, 2001). Pro ERV je snadnější infikovat buňky, jejichž struktura je narušená (stresem). Proto jsou spíše infikované buňky ve smíšených kulturách (prasečí buňky a lidské b. či NHP b.), než buňky v organismu (Mager, 1999). Ano, prasečí buňky v organismu produkují PERV a infikují okolní buňky, avšak nedochází k expresi PERV v nakažených buňkách. Na mnohých pokusech bylo dokázán přenos PERV do oslabeného organismu. Např. SCID myším (imunodeficientní) byla transplantována prasečí tkáň a došlo k infekci myších buněk. (Van der Laan et al., 2000).



## 8.5.1 Přenos PERV do tkání primátů

Počáteční výzkumy poukazyvaly na nevhodnost užití NHP, pro xenotransplantace tkání obsahující PERV. Předpokládala se neinfekčnost PERV do ostatních buněk. Tudíž nevhodné pro další pozorování (Patience et al., 1997; Wilson et al., 1998; Takeuchi et al., 1998; Martin et al., 1999). Nedávné studie však prokázaly infekci PERV do některých tkání NHP, jako jsou goril, šimpanzů, paviánů a makaků rheů (Specke et al., 2001; Blusch et al., 2000; Long et al., 1999).

Naproti již uvedené studii in vitro, nebyla prokázána žádná infekce PERV u patnácti paviánů, žijících dva roky s transplantovanými prasečími endoteliálními buňkami s cyklosporinem jako imunosupresivum (Martin et al., 1998). Na základě předpokladu přenosu PERV do jiných tkání byly provedeny různé transplantace orgánů či tkání. Tímto bylo zjištěno, že v průběhu přenosu prasečích endoteliálních buněk do paviána, nedošlo k přenosu PERV do jeho tkání (Martin et al., 1998). Další pokus byl proveden na patnácti paviánech, kterým byly transplantovány tkáně obsahující PERV a byly jim intravenózní infuzí podávány prasečí endoteliální buňky. Kontrola byla provedena metodou PCR po 12-15 měsících na kůži, plicní tkáni, lymfatických uzlinách a na periferních krevních lymfocytech. Veškeré výsledky byly negativní. V jednom případě bylo implantované srdce odhojeno již po čtyřicet minutách. Nebyla prokázána existence ani jedné prasečí buňky, které byly podávány pomocí infuze.

Další pokus byl proveden na jednadvaceti opicích Starého světa a na dvou opicích Nového světa, viz. Tab. 4., které byli vystaveny účinkům prasečích tkání s prokázanou existencí PERV. Pokus zahrnoval: šest paviánů (příjemci prasečích srdcí), šest makaků kápočných (*Macaca radiata*) (příjemci transgenní prasečí kůže), devět makaku rheů (*Macaca mulatta*) a dvě malpy kapucínské (*Cebus capucinus*) se zapouzdřenými ostrůvky buněk. Z šesti malp kapucínských a tří makaků rheů byly odebrány vzorky sleziny a lymfatické uzliny kvůli sérologickým zkouškám na protilátky proti PERV a následně byly potvrzeny pomocí Western blotu a pomocí PCR a RT PCR. PERV sekvencí v PBMCs (monocyty a lymfocyty v periferní krvi) a v plasmě. Výsledkem byla absence PERV RNA v plasmě a tím předpokládaná schopnost viru procházet krevním řečištěm vyloučena. Taktéž nebyla prokázána existence PERV sekvencí ve tkáních a v PBMC. Otázkou je zda nemůže dojít k pozdější infekci okolní tkáně (Switzer et al., 2001).

**Tab. 4.** *Taxonomie opic*

<p><b>opice Nového světa (<i>Platyrrhini</i>)</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• kosmanovití (<i>Callitrichidae</i>)</li><li>• malpovití (<i>Cebidae</i>)</li></ul> <p><b>opice Starého světa (<i>Catarrhini</i>)</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• nadčeleď: <i>Cercopithecoidea</i><ul style="list-style-type: none"><li>• kočkodanovití (<i>Cercopithecidae</i>)</li></ul></li><li>• nadčeleď: hominoidi (<i>Hominioidea</i>)<ul style="list-style-type: none"><li>• gibbonovití (<i>Hylobatidae</i>)</li><li>• lidé a lidoopi (<i>Hominidae</i>)</li></ul></li></ul>
---

### 8.5.2 Přenos PERV do lidských tkání

Dosavadní pokusy na NHP příjemcích prokázaly nepřenositelnost PERV RNA do tkání. Otázkou zůstává jak tomu bude v případě člověka jako příjemce prasečích orgánů. Jsou studie, které existenci PERV vyvrací a jiné ji naopak potvrzují.

V tomto pokusu byly odebrány vzorky ze stošedesáti pacientů, kteří žili s různými druhy prasečích tkání posledních dvanáct let. Po odebrání séra byla provedena podobná detekce ( RT-PCR, immunoblotem ) jako v předešlém případě (Switzer et al., 2001) a zároveň byly odebrány PBMCs stopadesátidevíti pacientům a pomocí PCR s použitím specifických PERV primerů nebyla v jejich DNA prokázána infekce. Nebyla potvrzena schopnost viru šířit se krevním řečištěm. Přítomnost dárcovských buněk byla pozorována u dvacetitří pacientů i po osmi a půl letech. Nebyl prokázán přenos PERV na lidi, žijící s prasečí tkání (Paradis et al., 1999).

## 9. Závěr

Xenotransplantace jsou možným zdrojem náhradních orgánů. Vyloučíme-li problémy etického charakteru a potíže s akutním odhojováním máme zde potenciálního strůjce nových mezidruhových virů. Podobným způsobem vzniknul i virus HIV (Salemi et al., 2001). Prasečí retroviry napadají především oslabené buňky (SCID myší buňky), ale již se v nich nereplikují. Tím by byli vyloučeni lidé mající problémy s imunitním systémem či lidé s rakovinou. Pokud dostal orgán zdravý člověk a poté se u něho zjistil např. virus HIV, nikdo nedokáže říci co to bude znamenat. Bohužel žádné výzkumy doposavad nedokáží vyloučit ani potvrdit možnou rekombinaci PERV s HERV a proto jsou xenotransplantace dále otazníkem.

## 10. Seznam citací

- Anderson A.C., Yun Z. , Sperber G.O, Larsson E., Blomberg J.** (2005) ERV3 and Related sequences in Humans: Structure and RNA Expression, *J. Virol.*, 79:9270-9284
- Augier F., Salf E., Nottet J.B.** (1996) Le Docteur Samuel Serge Voronoff (1866–1951) ou la quête de l'éternelle jeunesse (Doctor Samuel Serge Voronoff (1866–1951) or the quest for eternal youth), *Hist. Sci. Med.*, 30:163
- August J.T., Bolognesi D.P., Fleissner E., Gilden R.V, Nowinski R.C.**,(1974), A proposed nomenclature for the virion proteins of oncogenic RNA viruses, *Virology.*, Aug;60(2):595-600
- Bailey L.L., Nehlsen-Cannarella S.L.** (1986) Observations on cardiac xenotransplantation. *Transplant, Proc*, 18: 88
- Bailey L.L., Nehlsen-Cannarella S.L., Concepcion W et al.** (1985) Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate., *JAMA*, 254: 3321
- Baltimore**, (1975), Tumor viruses: 1974., *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 39 Pt 2:1187-200
- Barbulescu et. al.** (1999) Many human endogenous retroviruses K (HERV-K) proviruses are unique to humans
- Benit, L. et al.** (1999) ERV-L elements: a family of endogenous retrovirus –like element active throughout the evolution of mammals, *J. Virol.*, 73:3301-3308
- Bhandari M., Tewari A.**, (1997), Is transplantation only 100 years old? *Br J Urol*, 79: 495
- Bhatti F.N., Schmoeckel M., Zaidi A. et al.**, (1999), Three-month survival of hDAF transgenic pig hearts transplanted into primates, *Transplant Proc.*, 31: 958
- Blusch J.H., Patience C., Takeuchi Y., Templin C., Roos C., Von Der Helm K., Steinhoff G., Martin U.**, (2000), Infection of nonhuman primate cells by pig endogenous retroviruses, *J. Virol.*, 74:7687

- Bock M. and Stoye J.P.**, (2000), Endogenous retroviruses and the human germline, 10:651-655
- Boeke J.D. and Stoye J.P.**, (1997), Retrotransposons, endogenous retroviruses and the evolution of retroelements
- Braam, L.A.M. and Reznikof W.S.**, (2001), DNA transposition: classes and mechanisms, In Encyklopedia of Life Sciences, Macmillian
- Bromham L. et al.**, (2001), Discovery of novel murine type C retrovirus by datamining, J. Virol., 75:3053-3057
- Bromham L.**,(2002), Trends in ecology and evolution, The human zoo: endogenous retroviruses in the human genome, Vol. 17 No.2
- Byrne G., McCurry K., Martin M. et al.**, (1996), Development and analysis of transgenic pigs expressing the human complement regulatory protein CD59 and DAF. Transplant Proc, 28: 759
- Champsaur F. N.**, (1929), La guenon devenue femme: Nora, the female ape who became a woman, Paris: Ferenczi et fils
- Coffin J.M., Hughes S.H., Varmus H.E.**, (1997), Retroviruses
- Coffin J.M., Hughes S.H., Varmus H.E.**, (1997), Retrotransposons, endogenous retroviruses, and the evolution of retroelements. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. Retroviruses. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 343-435
- Coffin J.M., Hughes S.H., Varmus HE.**, (1997), Retroviruses of the National Center of Biotechnology information
- Cooper D.K.C., Kemp E., Platt J.L., White D.J.G.**, (1997), Xeno-transplantation. The Transplantation of Organs and Tissues Between Species. 2nd ed. Berlin:Springer-Verlag, 665-682
- Cozzi E., Bhatti F., Schmoeckel M. et al.**, (2000), Long-term survival of nonhuman primates receiving lifesupporting transgenic porcine kidney xenografts, Transplantation, 70: 15-21
- Cozzi E., White DJ.**, (1995), The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. Nat Med, 1: 964

**Dai Y., Vaught T.D., Boone J. et al., (2002), Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. Nat Biotechnol, 20: 251**

**Denis J.B., (1667), Lettre écrite à M. Montmor touchant une nouvelle manière de guérir plusieurs maladies par la transfusion du sang, confirmée par deux expériences faites sur des hommes Letter to Mr Montmor on a new method for treating several diseases through blood transfusion, as validated by two experiments on humans**

**Deschamps J.Y., Roux A.F., Saï P. and Gouin E., (2005), History of xenotransplantation, Xenotransplantation, Volume 12 Issue 2 Page 91**

**Ersek R.A., Denton D.R., (1983), Silver-impregnated porcine xenograft for damaged or missing skin. Contemp Surg, 23: 83**

**Farr A.D., (1980), The first human blood transfusion. Med Hist, 24: 143**

**Gorer P.A., Loutit J.F., Micklen H.S., (1961), Proposed revisions of transplants. Nature, 189: 1024**

**Griffiths D. J., (2001), Endogenous retroviruses in the human genome sequence, Genome Biol.**

**Haeseker B., (1991), Vanmeekeren and his account of the transplant of bone from a dog into the skull of a soldier, plastic and reconstructive surgery, 88(1):173-173**

**Hasan R.I.R., Van den Bogarde J., Forty J. et al., (1992), Prolonged Survival of Hamster to Rat Heart xenografts with Cyclophosphamide Therapy, Transplant Proceedings, 24: 517-518**

**Herniou E., Martin J., Miller K., Cook J., Wilkinson M., Tristem M., (1998), Retroviral diversity and distribution in vertebrates, J. Virol., 72:5955- 5966**

**Howard M. Temin, (1975), The DNA provirus hypothesis; The Establishment and Implications of RNA-directed DNA Synthesis**

**Hurst, G.D.D. and Werren, J.H., (2001), The role of selfish genetic elements in eukaryotic evolution, Nat. Rev. Genet., 2:597-606**

**Jern P., Sperber G.O., Blomberg J., (2004), Definition and variation of human endogenous retroviruses H, Virology, 327:93-110**

**Jern P., Sperber G.O. and Blomberg J.,** (2005), Use of endogenous retroviral sequences (ERVs) and structural markers for retroviral phylogenetic inference and taxonomy *Retrovirology*, 2:50

**Kazazian H.H.J.,** (2000), L1 retrotransposons shape the mammalian genome. *Science*, 289:1152-3

**Kidwell. M.G. and Lisch, D.R.,** (2001), Transposable elements, parasitic DNA and genome evolution, *Evolution*, 55:1-24

**Lander, E.S. et al.,** (2001), Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature*, 409:860-921

**Leacock J.H.,** (1817), On transfusion of blood in extreme cases of haemorrhage. *Med Chir J Rev*, 3: 276

**Leis J., Baltimore D., Bishop J.M., Coffin J., Fleissner E., Goff S.P., Oroszlan S., Robinson H., Skalka A.M., Temin H.M., et al.,**(1988), Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses., *J Virol.*, May;62(5):1808-9

**Lindeskog M.,** (1999), Transcription, splicing and genetic structure within the human endogenous retroviral HERV-H family, *Infectious diseases and Medical microbiology*, 142

**Lodsih and Zipursky,** (2000), *Molecular cell biology*

**Long Z., Lockey C., Gu M-L, Otto E., Cozzi E., Langford G.,**(1999), Is there cross-species transmission of porcine retroviruses in non-human primates transplanted with Transgenic pig organs?The 5th congress of the international xenotransplantation association, Nagoya

**Mager D.L., Medstrand P.,** (2003), Retroviral repeat sequences, In *Nature Encyklopedia of the human genome* edited by: Cooper D., Nature publishing group ,London, UK

**Mager D.L.,**(1999), Human endogenous retroviruses and pathogenicity: genomic considerations, *Trends Microbiol.*, 7:431

**Martin J. et al.,** (1999), Interclass transmission and phyletic host tracking in murine leukemia virus-related retroviruses, *J. Virol.*, 73:2442-2449

**Martin U., Steinhoff G., Kiessig V., Chikobava M., Anssar M., Morschheuser T., Lapin B., Haverich A.,** (1998), Porcine endogenous retroviruses (PERV) was not transmitted from transplanted porcine endothelial cells to baboons in vivo, *Transplant Int.*, 11:247

**Martin U., Steinhoff G., Kiessig V., Chikobava M., Anssar M., Morschheuser T., Lapin B., Haverich A.,** (1999), Porcine endogenous retroviruses is transmitted neither in vivo nor in vitro from porcine endothelial cells to baboons, *Transplant proc.*, 31:913

**McClintock B.,** (1983), The significance of responses of the genome to challenge (Nobel Prize Lecture)

**McClintock B.,** (1984), The significance of responses of the genome to challenge, *Science*, 226:792-801

**McCurry K.R., Kooyman D.L., Alvarado C.G., et al.,** (1995), Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from tumoral injury, *Nature Med.*, 1: 423-7

**Medstrand P., Mager D.L.,** (1998), Human specific integrations of the HERV-K endogenous retroviruses family, *J. Virol.*, 72:9782-9787

**Moalic Y., Blanchard Y., Félix H. and Jestin A.,** (2006), Porcine endogenous retroviruses integration sites in human genome features in common with those of murine leukemia virus, *Journal of Virology*, 10980-10988

**Narezkina A., Taganov K.D., Litwin S., Stoyanova R., Hayashi J., Seeger C., Skalka A.M. and Katz R.A.,** (2004), Genome-wide analyses of avian sarcoma virus integration sites, *J. Virol.*, 78:11656-11663

**Oja M., Sperber G.O., Blomberg J., Kaski S.,** (2005), Self-organizing map-based discovery and visualization of human endogenous retroviral sequence groups

**Oldmixon B.A., Wood J.C., Ericsson T. A., Wilson C.A, White-Scharf M.E., Andersson G., Greenstein J.L., Schuurman H.J.and Patience C.,** (2002), Porcine endogenous retrovirus transmission characteristics of an inbred herd of miniature swine, *J. Virol.*, 76:3045-3048



**Palevitz B.A.**, (2000), Genetic parasites and whole lot more: transposable elements generates: DNA mutations, alter gene expression, and otherwise fuel genetic diversity, *The Scientist* , 14(20):13

**Paradis K., Langford G., Long Z. et al.**, (1999), Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. *Science*, 285: 1236

**Patience C. et al.**, (2001), Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species, *J. Virol.*, 75:2771-2775

**Patience C., Takeuch Y., Weiss R .A.**, (1997), Infection of human cells by an endogenous retroviruses of pigs, *Nat. Med*, 3:282

**Patience C., Switzer .W.M., Takeuchi Y., Griffiths D.J., Goward M.E., Heneine W., Stoye J.P. and Weiss R. A.**, (2001), Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species, *J. Virol.*, 75:2771-2775

**Perl A., Banki K.**, (1993), Human endogenous retroviral elements and autoimmunity: data and concepts, *Trends Microbiol*, 1:153-6

**Perper R.J., Najarian J.S.**, (1966), Experimental renal heterotransplantation: I. In widely divergent species, *Transplantation*, 4: 377

**Phelps C.J., Koike C., Vaught T.D. et al.**, (2003), Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs, *Science*, 299: 411

**Real J.** (1997), Serge Voronoff et Mathieu Jaboulay. Communauté européenne: Abbeville Press

**Reemtsma K.**, (1965), Heterograft versus xenograft (letter to the editor). *N Engl J Med*, 272: 380.

**Ritzhaupt A., Van der Laan L.J., Salomon D.R. and Wilson C.A.**, (2002), Porcine endogenous retrovirus infects but does not replicate in nonhuman primate primary cells and cell lines, *J. Virol.*, 76:11312-11320

**Salemi M., Strimmer K., Hall W.W., Duffy M., Delaporte E., Mboup S., Peeters M., Vandamme A.M., (2001),** Dating the common ancestor of SIVcpz and HIV-1 group M and the origin of HIV-1 subtypes using a new method to uncover clock-like molecular evolution

**Scheef G., Fischer N., Krach U. and Tonjes R.R., (2001),** The number of a U3 repeat box acting as an enhancer in long terminal repeats of polytropic replication-competent porcine endogenous retroviruses dynamically fluctuates during serial virus passages in human cells, *J. Virol.*, 75:6933-6940

**Schmidt P.J, Leacock A.G., (2002),** Forgotten transfusion history: John Leacock of Barbados, *BMJ*, 325: 1485

**Schmidt P.J., (2004),** Edinburgh and early transfusion in the New World. *Vox Sang*, 87(Suppl. 2): 81

**Schroder A.R., Shinn P., Chen H., Berry C., Ecker J.R. and Bushman F, (2002),** HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots, *Cell*, 110:521-529

**Soares M.P., Lin Y., Sato K., et al., (1999),** Pathogenesis of and potential therapies for delayed xenograft rejection, *Opin Organ Transplant*, 4: 80-8

**Specke V., Tacke S.J., Boller K., Schwendemann J., Denner J., (2001),** Porcine endogenous retroviruses in vitro host range and attempts to establish small animal models, *J. General Virol*, 82:837

**Starzl TE., Fung J., Tzakis A. et al., (1993),** Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet*, 341: 65

**Stephan W. and Walsh B., (2001),** Repetitive DNA: evolution, In *Encyclopedia of Life Sciences*, Macmillian

**Switzer WM., Michler RE., Shanmugam V., Matthews A., Hussain AI., Wright A., Sandstrom P., Chapman LE., Weber C., Safley S., Denny RR., Navarro A., Evans V., Norin AJ., Kwiatkowski P., Heneine W., (2001),** Lack of cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus infection to nonhuman primate recipients of porcine cells, tissues, or organs., *Transplantation*, Apr 15;71(7):959-65

**Takeuchi Y., Patience C., Magre S., Weiss R.A., Banerjee P.T., Le Tissier P. and. Stoye J.P.,** (1998), Host range and interference studies of three classes of pig retroviruses, *J. Virol.*, 72:9986-9991

**Takeuchi Y., Patience C., Magre S., Weiss R.A., Banerjee P.T., Le Tissier P., Stoye J.P.,** (1998), Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retroviruses, *J. Virol.*, 72:9986

**Thomas C. Y., Coppola M.A., Holland C.A. and Massey A.C.,** (1990), Oncogenicity and U3 region sequences of class II. recombinant MuLVs of CWD mice, *Virology*, 176:166-177

**Tristram M.,** (2000), Identification and characterization of novel human endogenous retrovirus families by phylogenetic screening of the human genome mapping project database, *J. Virol.*, 74:3715-3730

**Van der Laan L.J., Lockey C., Griffeth B.C., Frasier F.S., Wilson C.A., Onions D.E., Hering B.J., Long Z., Otto E., Torbett B.E., Salomon D.R.,** (2000), Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice, *Nature*, 7;407(6800):90-4.

**Venter, J.C. et al.,** (2001), The sequence of the human genome, *Science*, 1304-1351

**Vial C.M., Ostlie D.J., Bhatti F.N. et al.,** (2000), Life supporting function for over one month of a transgenic porcine heart in a baboon, *J. Heart. Lung Transplant*, 19: 224-9

**Voronoff S.,** (1924), Quarante-trois greffes du singe à l'homme (Forty-three ape-to-man transplantations), Gaston Doin éditeur

**Warty V., Diven W., Cadoff E. et al.,** (1988), FK506. A novel immunosuppressive agent. Characteristics of binding and uptake by human lymphocytes, *Transplantation*, 46: 453

**Waugh O'Neill R.J. et al.,** (1998), Undermethylation associated with retroelement activation and chromosome remodelling in an interspecific mammalian hybrid, *Nature*, 393:38-72

**Weiss R.A.,** (2006), The discovery of endogenous retroviruses, *Retrovirology*, 3:67

**Wilkinson D.A., Mager D.L., Leong J.C.,** (1994), Endogenous human retroviruses. In: Levy JA, editor, *The retroviridae*, New York: Plenum Press, 465-535.

**Williams P.W.**, (1894), Notes on diabetes treated with extract and by grafts of sheep's pancreas, *BMJ*, 2: 1303.

**Wilson C.A., Wong S., Muller J., Davidson C.E., Rose T.M. and Burd P.**, (1998), Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells, *J. Virol.*, 72:3082-3087

**Wilson C.A., Wong S., VanBrocklin M. and Federspiel M.J.**, (2000), Extended analysis of the in vitro tropism of porcine endogenous retrovirus, *J. Virol.*, 74:49-56

**Wilson C.A., Wong S., Muller J., Davidson C.E., Rose T.M., Burd P.**, (1998), Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells, *J. Virol.*, 72:3082

**Wood J.C., Quinn G., Suling K.M., Oldmixon B.A., Van Tine B.A., Cina R., Arn S., Huang C.A., Scobie L., Onions D.E, Sachs D.H., Schuurman H.J., Fishman J.A. and Patience C.**, (2004), Identification of exogenous forms of human-tropic porcine endogenous retrovirus in miniature Swine, *J. Virol.*, 78:2494-2501

**Wu X., and Burgess S.M.**, (2004), Integration target site selection for retroviruses and transposable elements, *Cell. Mol. Life Sci.*, 61:2588-2596

**Wu X., Li Y., Crise B. and Burgess S.M.**, (2003), Transcription start regions in the human genome are favoured targets for MLV integration, *Science*, 300:1749-1751

**Yoshimura F.K., Wang T. and Cankovic M.**, (1999), Sequences between the enhancer and promoter in the long terminal repeat affect murine leukemia virus pathogenicity and replication in the thymus, *J. Virol.*, 73:4890-4898