

# Определение числа копий эндогенных ретровирусов типа А у домашних свиней и диких кабанов

Р.Б. Айтназаров<sup>1, 2</sup>, Н.С. Юдин<sup>1, 2, 3</sup> , Р.С. Кирилчук<sup>2</sup>, Н.Н. Кочнев<sup>4</sup>, С.П. Князев<sup>4</sup>, М.И. Воевода<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Новосибирск, Россия

<sup>4</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный аграрный университет», Новосибирск, Россия

Современная трансплантология испытывает острейший недостаток в донорских органах. Для решения проблемы был предложен подход, основанный на использовании органов и тканей животных для пересадки человеку (ксенотрансплантация). Однако широкому развитию этого направления препятствует риск передачи человеку зоонозных инфекционных заболеваний. По экономическим и этическим критериям, а также благодаря сходству по анатомическим и физиологическим параметрам, свинья является наиболее оптимальным источником органов для ксенотрансплантации. В геноме свиньи содержатся эндогенные ретровирусы (PERV) типа А которые могут инфицировать клеточные линии человека *in vitro*. Специально для биомедицинских целей, в том числе ксенотрансплантации, в Институте цитологии и генетики СО РАН была выведена селекционная группа сибирских миниатюрных свиней. Цель работы заключалась в анализе числа копий PERV А у сибирских миниатюрных свиней, пород-основателей ландрас и крупная белая, а также диких кабанов. Число копий PERV определяли методом абсолютного количественного анализа с использованием красителя SYBR Green. В качестве стандарта использовали образец с известным числом копий, который получали методом конечных разведений. Число копий PERV А в калибровочных образцах ДНК сибирских миниатюрных свиней составило 2.4, 3.6 и 4.9 копии PERV А на клетку, что хорошо совпадает с данными других авторов. Медиана числа копий PERV А на клетку составила 4.5 у сибирских миниатюрных свиней, 1.3 у ландрасов, 1.0 у представителей крупной белой породы и 0.8 у диких кабанов. Достоверные различия в числе копий ретровируса обнаружены между миниатюрными свиньями и дикими кабанями. Таким образом, геном сибирских миниатюрных свиней содержит значительное число копий потенциально патогенных для человека ретровирусов PERV типа А. Для ксенотрансплантации необходимо отбирать животных с наименьшим числом ретровирусов в геноме. Метод количественного определения числа копий PERV А с использованием красителя SYBR Green позволяет выявить таких животных и проводить селекцию сибирских миниатюрных свиней на уменьшение этого показателя.

Ключевые слова: свинья; сибирская миниатюрная свинья; крупная белая порода; порода ландрас; дикий кабан; свиной эндогенный ретровирус; ДНК; ген *envA*; число копий; ксенотрансплантация.

## Determination of the copy numbers of type A porcine endogenous retroviruses in domestic pigs and wild boars

R.B. Aitnazarov<sup>1, 2</sup>, N.S. Yudin<sup>1, 2, 3</sup> , R.S. Kiril'chuk<sup>2</sup>, N.N. Kochnev<sup>4</sup>, S.P. Knyazev<sup>4</sup>, M.I. Voevoda<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> Research Institute of Internal and Preventive Medicine SB RAMS, Novosibirsk, Russia

<sup>4</sup> Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

Modern transplantology is in need of transplants. To solve this problem, the use of animal organs and tissues for grafting to humans (xenografts) has been proposed. However, the progress in this direction is hampered by the risk of zoonotic infection of recipients. With regard to economic and ethical criteria and to the anatomical and physiological similarity to humans, the pig is the best source of xenografts. The pig genome harbors type A porcine endogenous retroviruses (PERV), which can infect human cell lines *in vitro*. A population of Siberian minipigs was raised at the Institute of Cytology and Genetics just for xenografting. The goal of the present study is to analyze the copy numbers of PERV A in Siberian minipigs, their founder breeds Landrace and Large White, and wild boars. The copy numbers of PERVs have been determined by absolute measurement with SYBR Green dye. End-point dilutions of a sample with a known copy number have been used for reference. The PERV A copy numbers in standard samples of Siberian minipig DNA are 2.4, 3.6, and 4.9 per cell, which is consistent with data obtained by other scientists. Minipigs and wild boars show a significant difference in retrovirus copy numbers. Thus, the Siberian minipig genome has a considerable number of type A PERVs, conceivably pathogenic to humans. It is necessary to select animals with minimum PERV numbers in the genome for xenografting. The method

of PERV A quantitation with SYBR Green allows detection of such animals and selection of Siberian minipigs for reduction of this index.

Key words: pig; Siberian mini pig; Large White breed; Landras breed; wild boar; porcine endogenous retrovirus; DNA; *envA* gene; copy number; xenotransplantation.

#### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Айтназаров Р.Б., Юдин Н.С., Кирильчук Р.С., Кочнев Н.Н., Князев С.П., Воевода М.И. Определение числа копий эндогенных ретровирусов типа А у домашних свиней и диких кабанов. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(6):756-761. DOI 10.18699/VJ16.192

#### HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Aitnazarov R.B., Yudin N.S., Kiril'chuk R.S., Kochnev N.N., Knyazev S.P., Voevoda M.I. Determination of the copy numbers of type A porcine endogenous retroviruses in domestic pigs and wild boars. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(6):756-761. DOI 10.18699/VJ16.192

Одна из важнейших проблем современной трансплантологии – недостаток донорских органов. Решить эту проблему можно за счет использования для пересадки человеку органов животных (ксенотрансплантация). Свинья считается наиболее вероятным донором органов для ксенотрансплантации в силу анатомического и физиологического сходства с человеком, а также по этическим и экономическим причинам (Ekser et al., 2015). Основным препятствием для широкого внедрения ксенотрансплантации остается риск зоонозных инфекционных заболеваний, передающихся человеку от животных. Существенно снизить риск передачи инфекции при ксенотрансплантации можно путем выращивания свиней в специфических, свободных от патогенов условиях (Shimatsu et al., 2013). Однако при этом сохраняется опасность передачи человеку свинных эндогенных ретровирусов (Porcine Endogenous RetroVirus – PERV). PERV является РНК-содержащим ретровирусом, но в его цикле репликации также используется ДНК. Поэтому PERV способны встраиваться в геном клеток в качестве провирусов и не могут быть удалены путем выращивания свиней в свободных от патогенов условиях (Yudin et al., 2011). По предварительным оценкам, геном свиньи может содержать от 6 до 10 способных к репликации провирусов, от 30 до 50 полноразмерных копий PERV и от 100 до 200 локусов, содержащих их частичную последовательность (Niebert, Tonjes, 2005). Существует риск развития инфекции PERV у реципиентов ксенотрансплантатов, распространения PERV от инфицированных пациентов к тесно контактирующему с ними медперсоналу и далее на общую популяцию (Denner, 2016).

Выделяют три типа ретровирусов PERV – А, В и С, которые сходны друг с другом по последовательностям ДНК генов *gag* (group-specific-antigens) и *pol* (polymerase), но существенно различаются по последовательности рецептор-связывающего домена гена *env* (envelope), кодирующего белок оболочки вируса (Le Tissier et al., 1997; Akiyoshi et al., 1998). PERV А и В, помимо клеточных линий свиньи, могут инфицировать некоторые линии клеток человека *in vitro*, а PERV С может реплицироваться только в клетках свиньи (Kimsa et al., 2014). Исследования больных, которых лечили с использованием живых тканей или органов свиньи, до сих пор не выявили развития инфекции PERV у человека *in vivo* (Godehardt et al., 2015). Однако не ясно, являются эти данные результатом реального отсут-

ствия продукции вируса клетками свиньи или результатом эффективной инактивации высвобождаемых вирусных частиц иммунной системой. Поэтому потенциальная опасность переноса PERV при ксенотрансплантации по-прежнему сохраняется.

Несколько пород лабораторных мини-свиней были выведены за рубежом специально для нужд ксенотрансплантации (Morozov et al., 2015). Селекционная группа сибирских миниатюрных свиней была создана в Институте цитологии и генетики (ИЦиГ) СО РАН путем скрещивания свиней вьетнамской черной и пятнистой пород, свиней пород ландрас и крупной белой, а также диких кабанов европейского и среднеазиатского подвидов (Тихонов, 2010). В геноме большинства сибирских миниатюрных свиней присутствуют ретровирусы PERV всех трех типов (Айтназаров и др., 2014б). Обогащенность геномов миниатюрных свиней ретровирусами, вероятно, обусловлена их внесением от пород-основателей. Известно, что дикий кабан имеет наименьшее число копий PERV всех типов в геноме по сравнению со свиньями домашних пород, в том числе крупной белой (Mang et al., 2001). Повышение этого показателя у домашних свиней, несомненно, связано с увеличением риска зоонозной инфекции. Однако число копий PERV в геноме сибирских миниатюрных свиней неизвестно.

Целью работы было определение числа копий тропного к клеткам человека ретровируса PERV типа А у сибирских миниатюрных свиней, используемых для ксенотрансплантации, а также у представителей некоторых пород-основателей.

## Материалы и методы

**Животные.** Образцы крови сибирских миниатюрных свиней ( $n = 10$ ) были взяты в Центре коллективного пользования «Генофонды пушных и сельскохозяйственных животных» ИЦиГ СО РАН. Образцы крови свиней пород крупная белая ( $n = 6$ ) и ландрас ( $n = 3$ ) собраны в хозяйствах Новосибирской области. Образцы крови центральноевропейского кабана *Sus scrofa scrofa* ( $n = 3$ ) получены из Воронежского биосферного заповедника, а среднеазиатского кабана ( $n = 1$ ) *Sus scrofa nigripes* – в Чуйской долине (Киргизия). При анализе образцы дикого кабана объединяли в одну группу. ДНК выделяли методом протеолитической обработки с последующей экстракцией фенолом.

**Определение числа копий PERV А.** Стандартные образцы для количественного анализа числа копий PERV были получены методом конечных разведений (Sedlak, Jerome, 2013). Для этого проводили амплификацию фрагмента гена *envA* в серии последовательных десятикратных или двукратных разведений исходного образца ДНК. Условия амплификации фрагмента гена *envA* ретровирусов PERV размером 356 п. н. были описаны нами ранее (Никитин и др., 2008). Число копий PERV А в стандартных образцах определяли на основании распределения Пуассона по формуле  $C = -\ln(1 - p)$ , где  $C$  – среднее число копий,  $p$  – доля реплицированных образцов, в которых прошла амплификация. Результат подтверждали в двух независимых экспериментах.

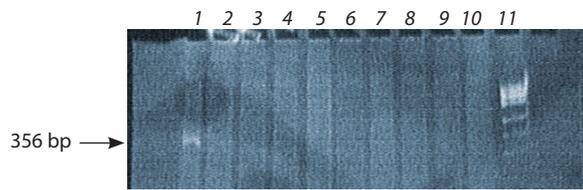
Далее определение числа копий PERV осуществляли методом абсолютного количественного анализа по графику стандартов с различным числом копий PERV А на приборе Rotor-Gene Q (Qiagen, Нидерланды). Амплификацию выполняли с использованием набора реагентов для проведения ПЦР в реальном времени в присутствии красителя SYBR Green I (Синтол, Россия) по протоколу фирмы-изготовителя. Для каждого образца ДНК ПЦР проводили не менее трех раз. Данные обрабатывали с помощью программы Rotor-Gene 6000 Series software версия 1.8.17.5. При вычислениях принимали, что клетка свиньи содержит то же количество геномной ДНК, что и клетка человека (6 пг ДНК на клетку).

**Статистический анализ.** Для определения нормальности распределения использовали критерий Колмогорова–Смирнова. В сравниваемых группах вычисляли медиану, 25- и 75%-й квартили количества копий PERV на клетку. Поскольку исследованный признак не подчинялся нормальному распределению, для сравнения показателей между группами применяли непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, а попарные сравнения проводили путем апостериорного анализа средних рангов для всех групп. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принимали равным 0.05. Обработку результатов проводили с помощью пакета STATISTICA версии 8.0.

## Результаты

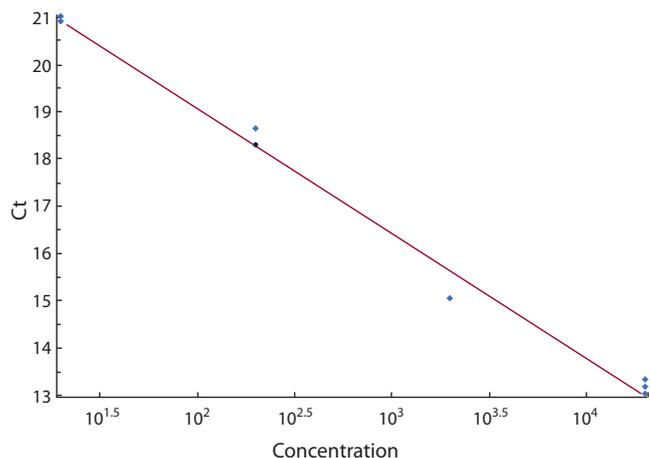
Методом конечных разведений было определено число копий PERV А в трех образцах ДНК сибирских миниатюрных свиней, которые в дальнейшем использовали для построения калибровочного графика. Исходная концентрация ДНК в образцах варьировала от 1376 до 1972 нг/мкл. При разведении около  $1:40 \times 10^{-6}$  наблюдали стохастическую амплификацию реплицированных образцов (рис. 1). Расчеты показали, что образцы ДНК трех мини-свиней содержали 2.4, 3.6 и 4.9 копии PERV А на клетку.

Был разработан метод количественной ПЦР в реальном времени для определения числа копий гена *envA* с использованием в качестве калибровки образцов, в которых число копий определялось методом конечных разведений. Исследования показали, что детекция целевой последовательности ДНК была линейной (средний коэффициент регрессии  $R^2 = 0.99$ ) в диапазоне от 20 копий до 20 тыс. копий на пробу, что показывает высокую чувствительность метода (рис. 2).



**Fig. 1.** Determination of the copy number of the *envA* gene by the end-point dilution method in a miniature pig DNA sample.

Lanes 1–9 are amplified products from nine replicate dilutions  $1:40 \times 10^{-6}$  of the same DNA sample; lane 10, negative control (water); lane 11, DNA ladder from 100 to 1000 bp, at 100-bp increments.



**Fig. 2.** Typical calibration curve for the *envA* gene.

A standard miniature pig DNA sample was diluted to four concentrations: 20000, 2000, 200, and 20 copies. Real-time PCR was run individually, and the corresponding Ct values were measured. The calibration curve for *envA* was constructed by plotting the Ct values (Y-axis) on the scale of logarithmic copy numbers in standard samples (X-axis).

С помощью метода количественной ПЦР в реальном времени было проведено сравнение числа копий гена *envA* ретровируса PERV в образцах ДНК крови у домашних свиней и диких кабанов (см. таблицу). Оказалось, что число копий на клетку у представителей этих групп достоверно различается ( $H = 7.88$ ;  $p < 0.05$ ). При попарном сравнении выявлены достоверные различия в числе копий ретровируса между миниатюрными свиньями и дикими кабанками ( $p < 0.05$ ).

## Обсуждение

Острый дефицит тканей и органов в трансплантологии привел к внедрению ксенотрансплантации органов от свиньи к человеку. Однако широкое развитие этого метода сдерживается возможностью передачи человеку патогенов свиньи, в особенности PERV. Передача PERV человеку может быть отправной точкой пандемии, угрожающей здоровью не только реципиентов, но и всего общества в целом. Многие клетки человека экспрессируют рецепторы, специфичные для PERV типов А и В, в то время как рецепторы, специфичные для PERV С, на них в боль-

Copy numbers of PERV A per cell in the genomic DNA of domestic pigs and wild boars

<i>Sus scrofa</i> varieties	Number of animals	Median	25 <sup>th</sup> –75 <sup>th</sup> percentiles	min–max
Siberian miniature pig	10	4.5	2.2–9.2	0.6–58.9
Large White breed	6	1.0	0.2–12.0	0.2–28.1
Landrace breed	3	1.3	1.2–1.6	1.2–1.6
Wild boar	4	0.8	0.4–1.1	0.1–1.2*

\*  $p < 0.05$  as compared to miniature pigs.

шинстве случаев не обнаружены (Marsucci et al., 2009; Nakaya et al., 2011). Соответственно, политропные вирусы PERV A и PERV B способны инфицировать клетки человека, а экотропный вирус PERV C инфицирует только клетки свиньи. Показано, что рекомбинанты PERV A/C также способны инфицировать клетки человека, причем их провирусы могут интегрироваться *de novo* в геномы соматических (но не герминативных) клеток (Denner, 2008; Karlas et al., 2010).

Эксперименты доказали, что PERV могут инфицировать некоторые линии клеток человека *in vitro* (Specke et al., 2001; Lee et al., 2008; Yu et al., 2009; Kimsa et al., 2014). Перенос эндогенных ретровирусов свиньи и, в некоторых случаях, даже их репликация были продемонстрированы на культурах первичных эндотелиальных клеток, гепатоцитов и мононуклеарных клеток периферической крови человека (Specke et al., 2001; Li et al., 2006; Frühauf et al., 2009). Эндотелиальные клетки представляют особый интерес, поскольку этот тип клеток является основным тканевым барьером для PERV.

В настоящее время риск распространения вызванной PERV инфекции среди населения носит гипотетический характер, поскольку все больные находятся под пристальным эпидемиологическим контролем. Но если ксенотрансплантация станет более рутинной процедурой, то ситуация может быстро измениться. Поэтому для того, чтобы исключить какой-либо риск инфекции PERV, желательно получить свиней, утративших все тропные к человеку PERV. Экспрессия РНК PERV найдена практически у всех изученных пород домашних свиней (Yudin et al., 2011). Однако полногеномное секвенирование ДНК может помочь характеризовать и отбирать животных-доноров с пониженной инфекционной способностью PERV. Поскольку большинство копий PERV, вероятно, являются дефектными и вклад в репликацию компетентных вирусов вносят только несколько полноразмерных копий, экспрессия РНК в целом не должна коррелировать с выработкой инфекционных вирионов. Как только эти критические локусы будут идентифицированы, может быть достигнут (путем селекции или нокаутных технологий) контроль за способными к репликации PERV. Так, недавно появилось сообщение об успешной инактивации всех 62 копий PERV в геноме линии эпителиальных клеток почки свиньи PK15 с помощью технологии CRISPR/Cas9 (Yang et al., 2015). Определение числа копий PERV в геноме – первый шаг на пути к созданию безвирусных свиней с помощью биотехнологических манипуляций.

Существует два подхода для количественного определения уровня ДНК- или РНК-мишеней в образце ткани – абсолютный и относительный (Ребриков и др., 2009). Абсолютный количественный анализ определяет точное число копий мишени, как правило, путем сравнения значения порогового цикла ПЦР-реакции *Ct* с калибровочной кривой. При относительном количественном анализе изменение в экспрессии мишени нормализуется относительно экспрессии контрольного референсного гена. В настоящее время для абсолютного количественного анализа ДНК или РНК используются два метода ПЦР в реальном времени: с интеркалирующим красителем SYBR Green или с TaqMan-зондами. Использование красителя SYBR Green по сравнению с зондами TaqMan позволяет более эффективно и с меньшими затратами проанализировать большое число генов-мишеней. Поэтому на основе именно этого подхода был разработан метод количественного определения числа копий PERV (Yu et al., 2007; Zhang et al., 2010), который использован в нашей работе.

Предварительно, в соответствии с рекомендациями авторов метода, нами были подготовлены три калибровочных образца ДНК, в которых методом конечных разведений определялось число копий PERV A (Sedlak, Jerome, 2013). Исходя из предположения, что клетка свиньи содержит такое же количество ДНК, что и клетка человека (Yu et al., 2007), для образцов получены значения 2.4, 3.6 и 4.9 копии PERV A на клетку. Эти значения хорошо согласуются с числом копий гена *envA* в мононуклеарных клетках периферической крови (Yu et al., 2007) и других тканях (Zhang et al., 2010) у миниатюрных свиней китайских пород.

Селекционная группа сибирских миниатюрных свиней была выведена специально для медико-биологических целей (Тихонов, 2010). С использованием пластинок роста тел позвонков новорожденных мини-свиней в Новосибирском НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Минздрава России разработан метод получения хондротрансплантатов для коррекции дистрофических и травматических изменений хрящевой ткани, а также процессов роста при идиопатическом сколиозе (Тихонов, 2010). Проводятся исследования по апробиации и производству биопротезов клапанов сердца, кровеносных сосудов и перикардального лоскута для интракардиальной хирургии и ангиопластики на основе материалов от мини-свиней (Тихонов, 2010).

С помощью метода количественного определения с использованием красителя SYBR Green нами определено

число копий PERV A в клетках крови у сибирских миниатюрных свиней, двух пород-основателей и диких кабанов. Оказалось, что у сибирских миниатюрных свиней число копий PERV A существенно выше, чем у дикого кабана. Аналогичная закономерность была найдена при анализе числа копий генов *pol* для других пород свиней (Mang et al., 2001). Авторы статьи выдвинули предположение, что инбридинг приводит к повышению числа копий PERV в геноме. Однако последующее изучение параметров генетического разнообразия по микросателлитным маркерам не подтвердило эту гипотезу (Quereda et al., 2012). Ранее нами было показано, что, наряду с «вертикальной» передачей вирусов PERV в ряду поколений, у свиней также возможен «горизонтальный» перенос вирусных частиц при тесном контакте между животными (Айтназаров и др., 2014а). Поскольку частота контактов между миниатюрными свиньями существенно выше, чем между дикими кабанями, обнаруженные нами различия могут быть связаны с «горизонтальным» путем передачи вирусной инфекции.

Медианы числа копий PERV A у свиней пород ландрас и крупная белая в нашем исследовании оказались существенно ниже, чем показатели, опубликованные другими авторами (Mang et al., 2001; Mazurek et al., 2013). Однако это несоответствие не вызывает удивления. Исследования свиней крупной белой породы показали, что хромосомное распределение и число копий PERV существенно различаются у разных особей (Bosch et al., 2000; Herring et al., 2001). Значительные внутривидовые различия были получены и для свиней других пород (Ma et al., 2010; Lee et al., 2011; Liu et al., 2011).

Полученный нами большой разброс числа копий вируса в пересчете на одну клетку может иметь два объяснения. С одной стороны, он может отражать низкую чувствительность использованного нами метода определения числа копий PERV A в области низких концентраций ДНК-мишени. В таком случае селекция свиней на снижение этого признака в популяции будет эффективной. С другой стороны, полученные значения могут быть связаны с индивидуальным разбросом среди животных по количеству копий PERV A, возникшим вследствие вариации процессов встройки/вырезания копий провируса в ходе онтогенеза. В этом случае селекция будет неэффективной и отбор целесообразно проводить исключительно на индивидуальном уровне, непосредственно перед трансплантацией, путем исследования различных органов на степень их пораженности ретровирусом. Поскольку другие авторы также наблюдали значительный разброс между животными по этому показателю (Mazurek et al., 2013), этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Таким образом, геном сибирских миниатюрных свиней содержит существенное число копий тропных к клеткам человека ретровирусов PERV типа А. Этот факт должен учитываться при использовании органов животных для ксенотрансплантации. Метод количественного определения числа копий PERV A с применением красителя SYBR Green позволяет выбрать для ксенотрансплантации животных с наименьшим количеством ретровирусов в геноме и может быть использован для селекции мини-свиней на снижение этого показателя.

## Acknowledgments

This work was supported by the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Integrated Program II.2, project 0324-2015-0019.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Aitnazarov R.B., Nikitin S.V., Knyazev S.P., Yudin N.S. The saturation of genome of the pig by porcine endogenous retroviruses: the influence of heredity and environment. *Innovatsii i prodovolstvennaya bezopasnost = Innovations and food security*. 2014;2:41-49. (in Russian)
- Aitnazarov R.B., Yudin N.S., Nikitin S.V., Ermolayev V.I., Voevoda M.I. Identification of whole genomes of endogenous retroviruses in Siberian miniature pigs. *Rus. J. Genetics: Applied Research*. 2014;4(6):523-525. DOI 10.1134/S2079059714060021.
- Akiyoshi D.E., Denaro M., Zhu H., Greenstein J.L., Banerjee P., Fishman J.A. Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine. *J. Virology*. 1998;72(5):4503-4507.
- Bosch S., Arnauld C., Jestin A. Study of full-length porcine endogenous retrovirus genomes with envelope gene polymorphism in a specific-pathogen-free Large White swine herd. *J. Virology*. 2000;74(18): 8575-8581.
- Denner J. Recombinant porcine endogenous retroviruses (PERV-A/C): a new risk for xenotransplantation? *Archives Virology*. 2008;153(8): 1421-1426. DOI 10.1007/s00705-008-0141-7.
- Denner J. How active are porcine endogenous retroviruses (PERVs)? *Viruses*. 2016;8(8):E215. DOI 10.3390/v8080215.
- Ekser B., Cooper D.K., Tector A.J. The need for xenotransplantation as a source of organs and cells for clinical transplantation. *Intern. J. Surgery*. 2015;23:199-204. DOI 10.1016/j.ijssu.2015.06.066.
- Frühauf J.H., Mertsching H., Giri S., Frühauf N.R., Bader A. Porcine endogenous retrovirus released by a bioartificial liver infects primary human cells. *Liver International*. 2009;29(10):1553-1561. DOI 10.1111/j.1478-3231.2009.02087.x.
- Godehardt A.W., Rodrigues Costa M., Tönjes R.R. Review on porcine endogenous retrovirus detection assays—impact on quality and safety of xenotransplants. *Xenotransplantation*. 2015;22(2):95-101. DOI 10.1111/xen.12154.
- Herring C., Quinn G., Bower R., Parsons N., Logan N.A., Brawley A., Elsome K., Whittam A., Fernandez-Suarez X.M., Cunningham D., Onions D., Langford G., Scobie L. Mapping full-length porcine endogenous retroviruses in a large white pig. *J. Virology*. 2001;75(24): 12252-12265.
- Karlas A., Irgang M., Votteler J., Specke V., Ozel M., Kurth R., Denner J. Characterisation of a human cell-adapted porcine endogenous retrovirus PERV-A/C. *Ann. Transplantation*. 2010;15(2):45-54.
- Kimsa M.C., Strzalka-Mrozik B., Kimsa M.W., Gola J., Nicholson P., Lopata K., Mazurek U. Porcine endogenous retroviruses in xenotransplantation – molecular aspects. *Viruses*. 2014;6(5):2062-2083. DOI 10.3390/v6052062.
- Le Tissier P., Stoye J.P., Takeuchi Y., Patience C., Weiss R.A. Two sets of human-tropic pig retrovirus. *Nature*. 1997;389(6652):681-682.
- Lee D., Kim N.Y., Bae G.E., Lee H.J., Kwon M., Kim S.S., Lee H.T., Yang J.M., Kim Y.B. Transmissible infection of human 293T cells with porcine endogenous retroviruses subgroup A from NIH-miniature pig. *Transplantation Proceed*. 2008;40(10):3742-3745. DOI 10.1016/j.transproceed.2008.09.035.
- Lee D., Lee J., Yoon J.K., Kim N.Y., Kim G.W., Park C., Oh Y.K., Kim Y.B. Rapid determination of PERV copy number from porcine genomic DNA by real-time polymerase chain reaction. *Animal Biotechnol*. 2011;22(4):175-180. DOI 10.1080/10495398.2011.595294.
- Li Z., Ping Y., Shengfu L., Yangzhi Z., Jingqiu C., Youping L., Hong B. Variation of host cell tropism of porcine endogenous retroviruses expressed in chinese Banna minipig inbred. *Intervirology*. 2006;49(4): 185-191.

- Liu G., Li Z., Pan M., Ge M., Wang Y., Gao Y. Genetic prevalence of porcine endogenous retrovirus in chinese experimental miniature pigs. *Transplantation Proceed.* 2011;43(7):2762-2769. DOI 10.1016/j.transproceed.2011.06.061.
- Ma Y., Yang Y., Lv M., Yan Q., Zheng L., Ding F., Wu J., Tian K., Zhang J. Real-time quantitative polymerase chain reaction with SYBR green I detection for estimating copy numbers of porcine endogenous retrovirus from Chinese miniature pigs. *Transplantation Proceed.* 2010;42(5):1949-1952. DOI 10.1016/j.transproceed.2010.01.054.
- Mang R., Maas J., Chen X., Goudsmit J., van der Kuyl A.C. Identification of a novel type C porcine endogenous retrovirus: evidence that copy number of endogenous retroviruses increases during host inbreeding. *J. General Virology.* 2001;82(Pt. 8):1829-1834.
- Marcucci K.T., Argaw T., Wilson C.A., Salomon D.R. Identification of two distinct structural regions in a human porcine endogenous retrovirus receptor, HuPAR2, contributing to function for viral entry. *Retrovirology.* 2009;6(3):1-15. DOI 10.1186/1742-4690-6-3.
- Mazurek U., Kimsa M.C., Strzalka-Mrozik B., Kimsa M.W., Adamska J., Lipinski D., Zeyland J., Szalata M., Slomski R., Jura J., Smorag Z., Nowak R., Gola J. Quantitative analysis of porcine endogenous retroviruses in different organs of transgenic pigs generated for xenotransplantation. *Current Microbiology.* 2013;67(4):505-514. DOI 10.1007/s00284-013-0397-3.
- Morozov V.A., Morozov A.V., Rotem A., Barkai U., Bornstein S., Denner J. Extended microbiological characterization of Göttingen minipigs in the context of xenotransplantation: detection and vertical transmission of hepatitis E virus. *PLoS One.* 2015;10(10):e0139893. DOI 10.1371/journal.pone.0139893.
- Nakaya Y., Shojima T., Yasuda J., Imakawa K., Miyazawa T. Epigenetic regulation on the 5'-proximal CpG island of human porcine endogenous retrovirus subgroup A receptor 2/GPR172B. *Microbes Infect.* 2011;13(1):49-57. DOI 10.1016/j.micinf.2010.09.014.
- Niebert M., Tonjes R.R. Evolutionary spread and recombination of porcine endogenous retroviruses in suiformes. *J. Virology.* 2005;79(1):649-654.
- Nikitin S.V., Yudin N.S., Knyazev S.P., Aitnazarov R.B., Kobzev V.F., Bekenev V.A., Savvina M.A., Ermolaev V.I. Frequency of chromosomes carrying endogenous retroviruses in the populations of domestic pig and wild boar. *Genetika = Genetics (Moscow).* 2008;44(6):789-797. (in Russian)
- Quereda J.J., Herrero-Medrano J.M., Abellana J.M., García-Nicolás O., Martínez-Alarcón L., Pallarés F.J., Ramírez P., Muñoz A., Ramis G. Porcine endogenous retrovirus copy number in different pig breeds is not related to genetic diversity. *Zoonoses Public Health.* 2012; 59(6):401-407. DOI 10.1111/j.1863-2378.2012.01467.x.
- Rebrikov D.V., Samatov G.A., Trofimov D.Y., Semenov P.A., Savilova A.M., Kofiadi I.A., Abramov D.D. PTsR «v real'nom vremeni» [Real-time PCR]. Moscow, BINOM. *Laboratoriya znaniy Publ.*, 2009. (in Russian)
- Sedlak R.H., Jerome K.R. Viral diagnostics in the era of digital polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease.* 2013;75(1):1-4. DOI 10.1016/j.diagmicrobio.2012.10.009.
- Shimatsu Y., Yamada K., Horii W., Hirakata A., Sakamoto Y., Waki S., Sano J., Saitoh T., Sahara H., Shimizu A., Yazawa H., Sachs D.H., Nunoya T. Production of cloned NIBS (Nippon Institute for Biological Science) and  $\alpha$ -1, 3-galactosyltransferase knockout MGH miniature pigs by somatic cell nuclear transfer using the NIBS breed as surrogates. *Xenotransplantation.* 2013;20(3):157-164. DOI 10.1111/xen.12031.
- Specke V., Rubant S., Denner J. Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses. *Virology.* 2001;285(2):177-180.
- Tikhonov V.N. *Laboratornye mini-svin'i, genetika i mediko-biologicheskoe ispolzovanie* [Laboratory Mini-pigs: Genetics and Biomedical Use]. Novosibirsk, SB RAS Publ., 2010. (in Russian)
- Yang L., Güell M., Niu D., George H., Lesha E., Grishin D., Aach J., Shrock E., Xu W., Poci J., Cortazio R., Wilkinson R.A., Fishman J.A., Church G. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science.* 2015;350(6264):1101-1104. DOI 10.1126/science.aad1191.
- Yu P., Zhang L., Li S.F., Cheng J.Q., Lu Y.R., Zeng Y.Z., Li Y.P., Bu H. A rapid method for detection of the copy number of porcine endogenous in swine. *J. Rapid Methods Automation Microbiology.* 2007; 15:199-205.
- Yu P., Zhang P., Zhang L., Li S.F., Cheng J.Q., Lu Y.R., Li Y.P., Bu H. Studies on long-term infection of human cells with porcine endogenous retrovirus. *Acta Virologica.* 2009;53(3):169-174.
- Yudin N.S., Aitnazarov R.B., Ermolaev V.I. Porcine endogenous retroviruses: what are the risks of infection transmission in xenotransplantation? *Rus. J. Genet. Appl. Res.* 2011;1(6):532-539. DOI 10.1134/S207905971106013X.
- Zhang P., Yu P., Wang W., Zhang L., Li S., Bu H. An effective method for the quantitative detection of porcine endogenous retrovirus in pig tissues. *In Vitro Cellular & Develop. Biology – Animal.* 2010; 46(5):408-410. DOI 10.1007/s11626-009-9264-8.