

1. Einleitung

In den letzten Jahrzehnten des 20. Jahrhunderts wurden aufgrund intensiver Forschungsarbeiten große Fortschritte in der Transplantationsmedizin erreicht. Hierzu mussten nicht nur immunologische, sondern auch anatomische, physiologische, ethische und rechtliche Probleme gelöst werden. Dennoch besteht in der heutigen Zeit in der Transplantationsmedizin ein immenser Bedarf an Spenderorganen: Fast ein Viertel der Patienten, die für eine Transplantation vorgemerkt sind, versterben, bevor ein für sie geeignetes Spenderorgan zur Verfügung steht (Abb. 1.1).

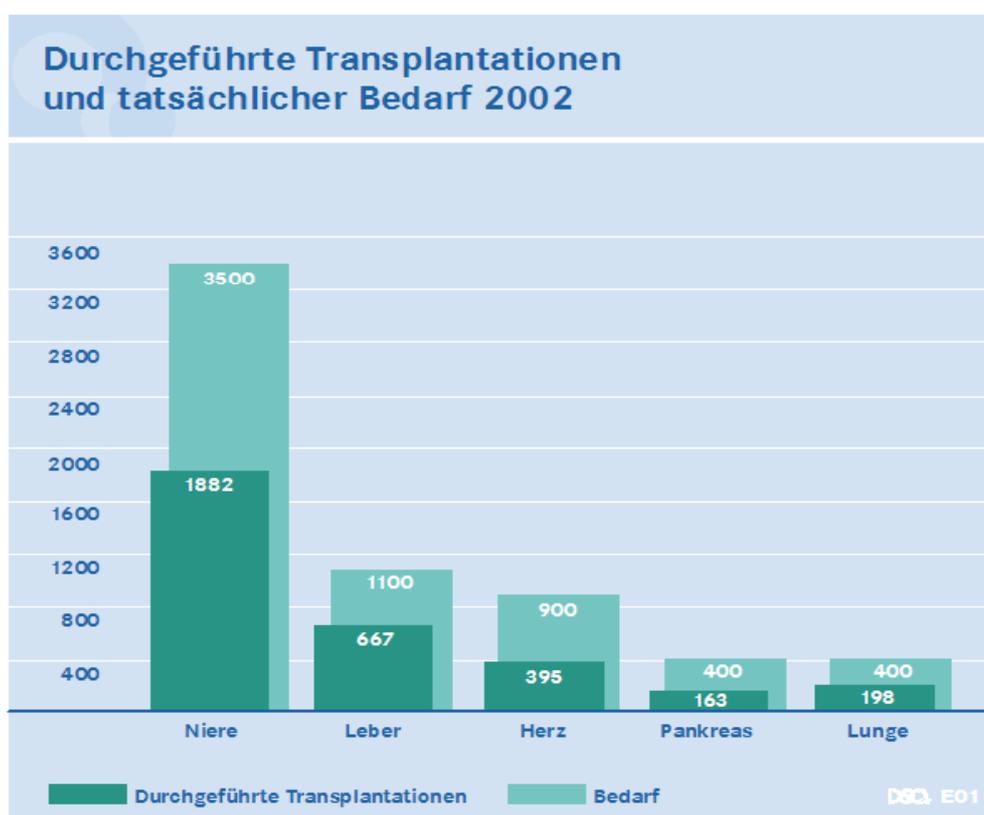


Abb. 1.1: Darstellung der durchgeführten Transplantationen in Deutschland im Vergleich zum tatsächlichen Organbedarf. Die Daten wurden von der Deutschen Stiftung Organtransplantation erhalten und beziehen sich auf das Jahr 2002.

Deshalb ist es notwendig, alternative Methoden zur herkömmlichen Allotransplantation zu erarbeiten. Neben der Entwicklung künstlicher Organe und dem „Tissue-Engineering“, der Anzucht von Geweben und Organen auf einer artifiziellen Matrix, wird auch die

Xenotransplantation (XT) als mögliche Alternative angesehen, um einen akuten Organmangel zu überbrücken. Unter Xenotransplantation versteht man die Übertragung von artfremden Zellen, Geweben und Organen auf den Menschen. Für diese Technik gilt das Schwein als potenzieller Spenderorganismus: Die Größe und Physiologie der porzinen Organe entspricht denen des Menschen, außerdem lassen sich Schweine kostengünstig halten, haben eine hohe Wurfzahl und eine kurze Reproduktionszeit.

Die Verwendung artfremder Organe birgt jedoch neben der akuten und der chronischen Abstoßungsreaktion auch die Gefahr der Übertragung von Mikroorganismen wie Bakterien, Viren und Pilzen auf den Organempfänger. Die Tatsache, dass eine Vaskularisierung der transplantierten Gewebe und die Ausbildung direkter Zell-Zell Kontakte unter Umgehung der mukosalen Barrieren erfolgt, trägt deutlich zur Erhöhung des Risikos einer Übertragung infektiöser Organismen bei. Hinzu kommt, dass die Patienten immunsupprimiert werden, um eine Abstoßung des transplantierten Organs zu unterdrücken. Dies kann eine Infektion begünstigen, die unter normalen Bedingungen vom Immunsystem abgewehrt werden könnte. Damit besteht die Gefahr der Entstehung von Zoonosen durch den Wirtswechsel von porzinen Pathogenen auf den Menschen und darüber hinaus durch neue Erreger, die aus Rekombinationsereignissen z.B. zwischen porzinen und humanen Viren hervorgehen könnten. Ein solches Ereignis könnte gravierende epidemiologische Folgen für die Menschheit haben. Die Gefahr wird deutlich, wenn man die Entstehung von HIV/AIDS als Beispiel betrachtet: Durch Übertragung des in Primaten apathogenen *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV) auf den Menschen sind mittlerweile weltweit etwa 32 Millionen Menschen mit HIV infiziert.

Zum besseren Verständnis werden im Folgenden die Daten der beteiligten wissenschaftlichen Disziplinen dargestellt, die die Grundlage für die Durchführung dieser Arbeit darstellten.

1.1 Xenotransplantation

Der Begriff Xenotransplantation beschreibt die Transplantation von Organen oder Geweben einer Spezies auf eine andere Spezies. Xenotransplantationen wurden bereits im 17. und 18. Jahrhundert in Form von Bluttransfusionen vom Tier auf den Menschen durchgeführt. Im 19. Jahrhundert wurde erstmals Haut, vornehmlich vom Frosch, auf den Menschen transplantiert. Erste Xenotransplantationen von soliden Organen nahm man Anfang des 20. Jahrhundert vor; die Transplantation eines Teils einer Kaninchenniere in die Niere eines urämischen Kindes durch Princeteau 1905 (Princeteau, 1905) in Frankreich führte jedoch nicht zum erhofften Erfolg, da es an Wissen um immunologische Abstoßungsreaktionen mangelte. So scheiterte auch die Transplantation einer Rhesusaffen-Niere auf eine Patientin durch Unger 1909 (Unger, 1910) aufgrund von vor allem hyperakuten Abstoßungsreaktionen. Erste Erfolge in der Transplantationsmedizin konnten in den 60er Jahren durch die Entwicklung von Immunsuppressiva wie den Thiopurinen erreicht werden. Als ein bahnbrechendes Ereignis in der Xenotransplantation galt die Übertragung einer Schimpansen-Niere in die Oberschenkelbeuge eines Patienten (Reemtsma, 1969; Reemtsma, 1964a; Reemtsma, 1964b). Zur Immunsuppression wurde der Rezipient vor und nach der Transplantation mit Azathiopurin, Actinomycin-C und Kortikosteroiden behandelt und konnte so neun Monate überleben.

Weitere Xenotransplantationen wurden in den folgenden 2 Jahrzehnten durchgeführt; es kam zur Verpflanzung von Nieren, Herzen (Barnard, 1977; Cooley, 1968; Hardy, 1964) und Lebern (Starzl, 1964). Zudem wurden im gleichen Zeitraum die Cyclosporine im Bodenpilz *Tolypocladium inflatum Gams* (1970) entdeckt. Cyclosporin A kam 1982 als das bis dahin potenteste Immunsuppressivum auf den Markt. In den folgenden Jahren konnten sprunghafte Erfolge in der Transplantationsmedizin vermerkt werden; das Wissen um die immunologischen Abstoßungen wuchs. Dennoch scheiterte die Transplantation eines 7 Monate alten juvenilen Pavian-Herzens auf das neugeborene Baby Fae (Bailey, 1985), das 21 Tage nach der Operation mit schlagendem Herzen an Multiorganversagen starb. Letzte Xenotransplantationen wurden 1992 mit der Transplantation eines Schweineherzens und 1994 mit der Verpflanzung einer Schweineleber (Makowka, 1995) durchgeführt. Jedoch starben beide Rezipienten innerhalb von 24 Stunden an den Folgen einer hyperakuten Abstoßung.

In der Xenotransplantation muss unterschieden werden zwischen der Transplantation von

Zellen und der Transplantation solider Organe. Im Gegensatz zur Übertragung ganzer Organe ist Xenotransplantation von Zellverbänden weitaus erfolgreicher. So konnte die Verwendung porziner Zellen des ventralen Mesencephalon für die Behandlung des Morbus Parkinson und der Huntigton'schen Krankheit über 12 Monate zu einer deutlichen Verbesserung der klinischen Symptome beitragen (Fink et al., 2000).

Zur Xenotransplantation sind darüber hinaus auch extrakorporale Nieren- und Leberperfusionen in nicht-humanen Organen und im bioartifiziellen Leberunterstützungssystem zu zählen. In letzteren befinden sich Kulturen metabolisch aktiver Schweineleberzellen, die in der Lage sind, vorübergehend die Rolle einer „Ersatzleber“ zu übernehmen. In diesem extrakorporalen Zirkulationssystem werden Plasma und Blutzellen des Patienten getrennt; das Plasma wird zu dem Bioreaktor geleitet, der die Leberfunktionen übernimmt. Anschließend werden Plasma und Blutzellen wieder vereint und dem Patienten zugeführt. Der technologische Vorsprung dieses Bioreaktors (Abb. 1.2) beruht insbesondere auf der Organisation des Milieus der Schweinehepatozyten in einer dreidimensionalen Struktur. Dieser Aufbau, der die Struktur der Zirkulationskreisläufe im Lebergewebe nachahmt, erlaubt den Zellen, mehrere Wochen zu überleben, und optimiert gleichzeitig ihre morphologischen und funktionellen Parameter (Nährstoffzufuhr, Ausscheidung der Giftstoffe, effiziente Oxygenation).

Diese Systeme wurden bereits mit Erfolg für die Überbrückung von lebensbedrohlichen Situationen bei Patienten mit akutem Nieren- oder Leberversagen eingesetzt (Patience et al., 1998; Pitkin und Mullon, 1999).

Des Weiteren wurden verkapselte Zellverbände erfolgreich bei der Therapie von diabetischen Mäusen eingesetzt (Wang et al., 2003). Der Vorteil gegenüber der Übertragung solider Organe besteht darin, dass einzelne Zellen bzw. Zellverbände verkapselt werden können und somit dem Immunsystem nicht zugänglich sind. Darüber hinaus wird mit dieser Technik auch das Risiko einer Übertragung von Mikroorganismen minimiert.

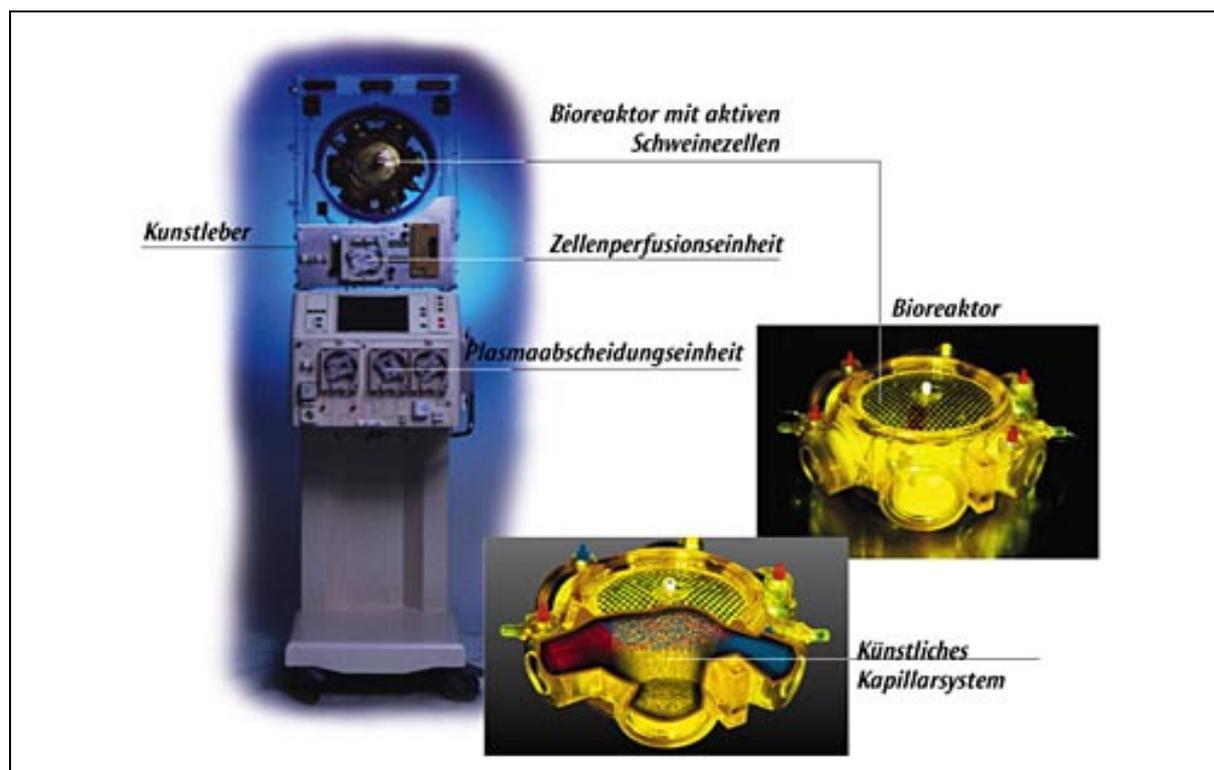


Abb. 1.2: Darstellung eines Bioreaktors. Bei einer Perfusion des Bioreaktors werden Plasma und Blutzellen in der Plasmaabscheidungseinheit getrennt. Das Plasma wird dann in den Bioreaktor geleitet, der mit aktiven Schweinezellen ausgekleidet ist. Nach der „Entgiftung“ des Plasmas im Bioreaktor werden Blutzellen und Plasma wieder vereint und dem Patienten wieder zugeführt. Die Daten wurden dem FTE Info "Magazin für die europäische Forschung" entnommen.

1.1.1 Spendertiere für die Xenotransplantation

Als Spendertiere für die Xenotransplantation wurden zunächst Primaten in Betracht gezogen und eingesetzt. Insbesondere nicht-humane Primaten der Altwelt (z.B. Menschenaffen und Paviane) zeigen in Bezug auf den Menschen eine hohe Kompatibilität in der Anatomie und Physiologie ihrer Organe und auch ihrer Blutgruppen. In heutiger Zeit wird von nicht-humanen Primaten als potenziellen Organspendern abgesehen. Zum einen ist das Verwenden von gefährdeten Tierarten in der Xenotransplantation ethisch kaum vertretbar und zum anderen ist durch die lange Gestationszeit und geringe Nachkommenschaft der Primaten (Fishman, 1994; Fishman, 1997) eine ausreichende Anzahl an Spendertieren nicht gewährleistet. Zudem sind die Haltungskosten sehr hoch. Ein weiterer Grund, der gegen die Verwendung von Primaten spricht, ist das hohe Risiko der Übertragung von Infektionen (Xenozoonosen), insbesondere viraler Infektionen (Advisory Group on the Ethics of Xenotransplantation, 1996; Novak, 1999). Es muss davon ausgegangen werden, dass sich aufgrund der phylogenetischen Nähe von Menschen und Primaten, Primatenerreger im Menschen gut vermehren können. So konnten Übertragungen von Viren wie dem *Simian Foamy Virus*

(SFV), dem endogenen Retrovirus der Paviane (BaEV) und dem Pavian Cytomegalievirus (BCMV) bei ersten klinischen Xenotransplantationen von Pavian-Lebern auf den Mensch beobachtet werden (Allan et al., 1998b; Michaels et al., 2001). Ein solcher Wirtswechsel könnte unkontrollierbare Auswirkungen für den Rezipienten und seine Umgebung haben. Am Beispiel des SIV werden die Auswirkungen einer Xenozoonose deutlich: einer inzwischen allgemein anerkannten Theorie zufolge hat der Wirtswechsel des im natürlichen Wirtes (Affe) apathogenen SIV auf den Menschen die HIV Pandemie beim Menschen ausgelöst (Gao et al., 1999).

Schweine stellen als Spenderorganismen eine Alternative zu Primaten dar, denn es gibt viele anatomische und physiologische Übereinstimmungen (Hannon et al., 1990; Sachs, 1994). Daneben bestehen jedoch auch funktionelle und biochemische Diskrepanzen zwischen dem Mensch und dem Schwein (Hammer, 1998): So könnte beispielsweise die horizontale Lage der Organe im Schwein, im Menschen in die vertikale Lage gebracht, zu Funktionsbeeinträchtigungen führen. Des Weiteren beträgt die Körperkerntemperatur im Schwein 39°C, während sie im Menschen bei 37°C liegt; dies könnte ebenso wie der unterschiedliche pH-Wert zu Funktionsstörungen in metabolischen Prozessen führen. Darüber hinaus ist der durchschnittliche Cholesterin-Wert im Schwein deutlich niedriger als im Menschen; ein transplantiertes Schweineherz könnte im Menschen also eher zu arteriosklerotischen Veränderungen neigen.

Als ein weiteres Problem wird die hormonelle Regulation angesehen. Das humane Parathormon ist beispielsweise mit der porzinen Niere inkompatibel, so dass es zu einer vermehrten Ausscheidung von Phosphor kommt. Dieses resultiert in einer Hypophosphatämie im Serum und kann für den Menschen lebensbedrohlich werden. Es ist noch nicht geklärt, ob das humane Wachstumshormon das Wachstum eines porzinen transplantierten Organs beeinflussen würde. So könnte sich das Wachstum eines transplantierten Organs im Rezipienten anders entwickeln als im Spender; als mögliche Folge könnte z.B. ein nicht ausreichendes Wachstum eines porzinen Organs in einem Kind auftreten. Auch ein zu schnelles Wachstum des transplantierten Organs ist denkbar (Hammer, 1998). Der physiologische Aspekt bleibt daher bis zur klinischen Realisierung von Xenotransplantationen solider Organe Gegenstand intensiver Forschung.

1.1.2 Immunologische Barrieren in der Xenotransplantation

Die Immunologie bei einer Xenotransplantation war in den letzten Jahren der Fokus intensiver Forschung. Das Immunsystem ist die wichtigste Schutzbarriere des Organismus gegenüber Mikroorganismen und Fremdsubstanzen. Auf Einbringen von körperfremden Transplantaten reagiert das Immunsystem aufgrund einer Gewebsunverträglichkeit (Histoinkompatibilität) mit einer immunologischen Abstoßungsreaktion gegen das Transplantat. Man unterscheidet dabei vier Arten der immunologischen Abstoßungsreaktion: Die hyperakute vaskuläre Abstoßung (HAR), die akut vaskuläre Abstoßung, die akute T-Zell-vermittelte Abstoßung und die chronische Transplantat-Abstoßung. Dabei bezeichnet man Xenotransplantationen als diskordant, wenn eine hyperakute vaskuläre Abstoßung erfolgt. Konkordant sind demgegenüber Xenotransplantationen, bei denen die Abstoßung erst verzögert nach 24 Stunden erfolgt (Calne, 1970).

Im Folgenden werden zum besseren Verständnis die 4 Phasen der Transplantatabstoßung näher erläutert:

1. Die hyperakute vaskuläre Abstoßung (HAR)

Die erste Barriere bei Xenotransplantationen ist die HAR; sie resultiert in einer Transplantatabstoßung innerhalb von Minuten oder Stunden. Dieser Prozess wird induziert durch ein diskordantes Antigen, das Gal α 1-3Gal-Molekül, welches auf der Oberfläche des Gefäßendothels des porzinen Spenderorgans exprimiert wird. Der xenoreaktive α -Gal Antikörper des Rezipienten bindet an dieses Molekül und bewirkt eine Aktivierung der Komplementkaskade. Alle plazentalen Säugetiere, mit Ausnahme des Menschen und der Alt-Welt-Affen, exprimieren ein funktionales α -Galactosyltransferase (α GT) Gen auf vielen Geweben, einschließlich des vaskulären Endothels, und tragen somit die Gal α 1-3Gal Epitope (Oriol et al., 1993). Während Spezies, die ein funktionales α GT exprimieren, keine Antikörper bilden, die an das Gal Epitop binden, entwickeln Menschen und Alt-Welt-Affen α GT Antikörper. Dies wiederum bewirkt die Aktivierung der Komplementkaskade und führt zur Schädigung des Endothels und anschließender Thrombenbildung; Gefäße können so verlegt werden und eine ausreichende Sauerstoffversorgung des umliegenden Gewebes wird nicht mehr gewährleistet. Nekrosen und anschließendes Organversagen sind die Folge. Die hyperakute vaskuläre

Abstoßung ist mittlerweile von allen bei der Xenotransplantation auftretenden Abstoßungsreaktionen, die am besten regulierbare bzw. inhibierbare Reaktion.

Medikamentöse Modalitäten, die gegen eine HAR schützen sollen, umfassen die Verringerung bzw. Inhibition der α -Gal Antikörper des Menschen (Cooper, 1988; Kaplon et al., 1995; Pierson et al., 1994). Eine andere Möglichkeit ist der Einsatz von Organen transgener Schweine; so war es möglich, Gene, die humane Komplementsystem-Regulatorproteine kodieren wie z.B. hDAF (decay accelerating factor, CD55) (Schmoeckel et al., 1997), MCP (Membran-Cofaktor-Protein, CD46) oder Protectin (CD59) (Byrne et al., 1997), in das porcine Genom einzufügen, so dass durch deren Expression die Zerstörung des fremden Gewebes nicht mehr möglich sein sollte. Weiterhin ist es gelungen, zumindest eines der zwei für die Expression der Gal α 1-3Gal kodierenden Gene aus dem Genom von Schweinen zu eliminieren (Dai et al., 2002; Lai et al., 2002).

2. Die akut vaskuläre Abstoßung

Die akut vaskuläre Abstoßung entwickelt sich innerhalb von Tagen oder Wochen nach Überwindung der hyperakuten vaskulären Abstoßung und stellt zur Zeit die schwierigste zu überwindende immunologische Barriere für eine erfolgreiche Xenotransplantation dar. Der genaue Mechanismus dieser Form der Abstoßung ist noch nicht geklärt; es wird angenommen, dass bei der akut vaskulären Abstoßung im Gegensatz zur HAR nicht die Komplement-Aktivierung die entscheidende Rolle spielt (Knosalla und Cooper, 2002).

Das Vorhandensein eines transplantierten Schweineorgans führt zu einer T-Zell-abhängigen induzierten (humoralen) Immunantwort (Buhler et al., 2000). Dies bewirkt einen 100- bis 300-fachen Anstieg an α -Gal Antikörpern und darüber hinaus die Entwicklung von Antikörpern gegen andere Schweineantigene (Buhler et al., 2001). Die Präsenz von Antikörpern aktiviert das vaskuläre Endothel, erhöht die Expression verschiedener Gewebefaktoren und Adhäsionsmoleküle und induziert so einen prokoagulierenden Zustand. Für die Zellbeschädigung wird die „Antikörper-abhängige zellmedierte Zytotoxizität“ im Beisein einer Antikörper-stimulierenden Zellinfiltration, verantwortlich gemacht. Man nimmt an, dass diese induzierte Immunantwort eine wichtige Rolle zur Induktion der akuten vaskulären Immunantwort spielt. Die Maßnahmen, die eine hyperakute Abstoßung verhindern, greifen hier nicht.

3. Die akute T-Zell-vermittelte Abstoßung

Wenn die zwei ersteren Abstoßungsreaktionen überwunden werden könnten, müsste davon ausgegangen werden, dass eine akute T-Zell-vermittelte Abstoßung, ähnlich der nach Allotransplantationen beobachteten Abstoßungsreaktionen, erfolgt. Man vermutet, dass die Intensität einer akuten T-Zell-vermittelten Abstoßung nach Xenotransplantation mindestens die gleiche Stärke wie die nach einer Allotransplantation aufweisen dürfte. Es ist unklar, ob die zur Zeit verfügbaren Immunsuppressiva diese Abstoßung unterdrücken können (Cooper et al., 2000).

4. Die chronische Transplantat-Abstoßung

Die chronische Transplantat-Abstoßung ist selbst in der Allotransplantation noch sehr wenig verstanden. Sie entwickelt sich binnen Monaten bzw. Jahren. In der Xenotransplantation gibt es noch kein Model für ein Langzeitüberleben eines Schweineorgans im humanen Rezipienten. Man vermutet aber, dass sich die chronische Abstoßung nach der Transplantation eines Schweineorganes in den Menschen durch Transplantat-Vaskulopathie eher schneller entwickeln wird als bei der Allotransplantation (Knosalla und Cooper, 2002). Erfahrungen aus der Allotransplantation zeigten, dass die Prozesse bei der chronischen Abstoßung besonders problematisch sind, da sie gegenüber den bei der akuten Abstoßung wirksamen Immunsuppressiva resistent sind.

1.1.3 Das Infektionsrisiko in der Xenotransplantation (XT)

Ein großes Problem im Zusammenhang mit der Xenotransplantation stellt das Risiko einer Übertragung von Mikroorganismen auf den Rezipienten dar. Diese sogenannte Xenozoonose könnte nicht nur eine Gefahr für den Patienten, sondern auch für seine Umgebung bzw. für die gesamte Gesellschaft darstellen. Deshalb repräsentiert die Gefahr einer Xenozoonose einen intensiv diskutierten Aspekt der Xenotransplantation. Dabei muss berücksichtigt werden, dass bei einer Xenotransplantation natürliche Barrieren wie die Haut und die Mukosa umgangen werden und potenziell erregerbehaftete Organe in den humanen Rezipienten implantiert werden. So kommen Mikroorganismen ohne Umwege in Kontakt mit Blut und anderen Körperflüssigkeiten. Erschwerend kommt hinzu, dass der Rezipient immunsupprimiert ist und sich Infektionen leichter etablieren können.

Im Folgenden wird auf die Gefahr eingegangen, die von Viren ausgeht, da diese ein Reservoir

an potenziell nicht-therapierbaren Pathogenen darstellen. Pilzkrankungen oder bakterielle Infektionen mit z.B. *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis*, *Mycobacterium avium*, *Leptospira interrogans* oder *Brucella suis* lassen sich durch Antimykotika- bzw. Antibiotikagabe und durch eine kontrollierte Spezifisch-Pathogen-Freie Haltung (SPF) eliminieren. Auch die Infektion durch viele bekannte Viren kann durch Erregerdiagnostik und SPF-Haltung ausgeschlossen werden. Jedoch geht eine große Gefahr von unbekanntem Viren, ins Genom integrierten Viren und von extrem weit verbreiteten Viren des Schweins aus. Gleichfalls sind die Patienten durch persistierende Infektionen von humanen Viren gefährdet. Beispiele für persistierende Viren sind das humane Cytomegalievirus (CMV) und das Epstein-Barr Virus (EBV). Diese Infektionen bleiben solange inapparent, bis das Immunsystem z.B. im Zusammenhang mit einer Transplantation supprimiert wird. Es kommt zu einer heftigen Rekurrenz in deren Verlauf die Viren die Expression des MHC-II-Komplexes herunterregulieren und zudem die Lymphozyten-Adhäsion beeinflussen. HIV ist ebenfalls ein bekanntes Beispiel eines persistierenden Virus, die HIV-Infektion ist durch einen progressiven Verlauf und einer extremen Antigenvariation charakterisiert. Eine transplantationsbedingte Immunsuppression kann die Pathogenität und die Replikation dieser Viren demzufolge drastisch beeinflussen (Fishman, 1997; Hüsing et al., 1998).

Das porcine endogene Retrovirus (PERV) des Schweins stellt ein weiteres, möglicherweise großes mikrobiologisches Risiko für die Xenotransplantation dar (Patience et al., 1997). Die PERV liegen als ein integraler Bestandteil des porcinen Genoms in jeder Zelle der Spendertiere vor. Eine Eliminierung der PERV durch Züchtung von transgenen Tieren und Kreuzung von Rassen mit niedriger Kopiezahl an PERV-Integraten wird daher entsprechend langwierig sein. Zudem konnte gezeigt werden, dass einige Vertreter in der Lage sind, humane Zellen *in vitro* zu infizieren und in ihnen zu replizieren. Bei der Untersuchung von Probenmaterial, das von Patienten gewonnen wurde, die Kontakt zu porcinem Gewebe hatten oder haben (Xenotransplantate), konnte bislang keine produktive Infektion mit PERV eindeutig nachgewiesen werden (Heneine et al., 1998; Patience et al., 1998) Retroviren sind außerdem bekannt für ihre Fähigkeit, den Wirt zu wechseln. Als Beispiel sei hier nochmals SIV genannt, das von infizierten Affen auf den Menschen wechselte, sich als HIV an den Menschen adaptierte und die AIDS-Pandemie verursachte (Gao et al., 1999).

Auch porcine Herpesviren müssen im Rahmen einer Risikoabschätzung in Bezug auf die XT beurteilt werden. Es handelt sich um persistierende Viren, die eine latente Infektion

etablieren. Humane Herpesviren können wie bereits erwähnt in der Allotransplantation problematisch sein. Latente Herpesvirusinfektionen können nicht nur für lange Zeit unentdeckt bleiben, es besteht darüber hinaus bei reaktivierten Herpesviren die Gefahr, dass ihre Pathogenität nach einem „cross-species“ Transfer (z.B. im Falle einer Xenotransplantation) ansteigt und sie Ursache schwerer Erkrankungen werden können (Fields et al., 1996). Bisher waren α - und β -Herpesviren im Schwein bekannt (Fields et al., 1996); jüngst wurden auch drei verschiedene γ -Herpesviren identifiziert (Chmielewicz et al., 2003; Ehlers et al., 1999). Diese sind mit dem sogenannten *Post-Transplant Lymphoproliferative Disease* (PTLD) Krankheitsbild assoziiert: So wurde bei PLHV-infizierten Minischweinen häufig das Auftreten eines fatalen Lymphoms beobachtet (Huang et al., 2001). Die PTLD ähnelt der durch das Epstein-Barr Virus beim Menschen ausgelösten PTLD.

Weiterhin sind für eine Risikoabschätzung auch Viren relevant, die mit ihrem Wirt symbiotisch existieren, bei einem Wirtswechsel auf den Menschen jedoch fatale Erkrankungen hervorrufen. Als Beispiele können das Hantavirus Sin Nombre angeführt werden, das durch Nagetiere übertragen wird (Young et al., 1998) und das Nipahvirus des Schweins (Chua et al., 2000). Obwohl die Menschen, die sich mit diesen Viren infiziert hatten, nicht unter dem Einfluss einer Immunsuppression standen, waren die Viren in der Lage, nach dem Wirtswechsel eine Infektion zu etablieren und schwere Krankheitssymptome auszulösen.

Auch die Circoviren des Schweins könnten in Bezug auf die Xenotransplantation eine Gefahr für den Menschen darstellen. Von den porcinen Circoviren (PCV) sind zwei Genotypen bekannt: Während das *Porcine Circovirus* Typ 1 (PCV1) apathogen ist, verursacht das *Porcine Circovirus* Typ 2 (PCV2) das *Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome* (PMWS) in Jungtieren. Diese Erkrankung wurde erstmals 1991 in Kanada entdeckt (Nayar et al., 1997) und stellt für Schweineproduktionsbetriebe eine große wirtschaftliche Bedrohung dar. Bisher gibt es keine grundlegenden Untersuchungen darüber, ob die porcinen Circoviren für den Menschen pathogen sind. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit Studien zur Abschätzung des Risikopotenziales von porcinen Circoviren in der Xenotransplantation durchgeführt. Diese Arbeiten gliederten sich in zwei Bereiche: Zum einen sollte nach einem humanen Circovirus gesucht werden, das als potenzieller Reaktionspartner für eine Rekombination mit eingebrachten PCV gilt, zum anderen sollten Infektionsstudien mit PCV an humanen Zellen durchgeführt werden, um die Suszeptibilität dieser Zellen und die Effekte

einer möglichen Infektion zu überprüfen.

1.2 Circoviren

1.2.1 Taxonomie der Circoviren

Circoviren sind kleine isometrische, nicht von einer Membran umhüllte Viren mit einem Durchmesser von etwa 17 nm (Abb. 1.3). Das Genom besteht aus einem einzelsträngigen, zirkulär kovalent geschlossenen (+)-DNA-Strang mit einer Länge von 1759 Nukleotiden für PCV1 bzw. 1768 Nukleotiden für PCV2. Sie gelten als die kleinsten in eukaryotischen Zellen autonom replizierenden Viren.

Die Familie *Circoviridae* untergliedert sich in zwei Genera, dem Genus *Circovirus* und dem Genus *Gyrovirus*. Die *Porcinen Circoviren* Typ 1 und Typ 2 (PCV1 bzw. PCV2) werden ebenso wie die Circoviren der Taube (*Pigeon circovirus*, PiCV; (Mankertz et al., 2000)), der Gans (*Goose circovirus*, GCV; (Todd et al., 2001b)), des Kanarienvogels (*Canary circovirus*, CaCV; (Todd et al., 2001a)), der Ente (*Duck circovirus*, DuCV; (Hattermann et al., im Druck)) und das psittacine *Beak and feather disease virus* (BFDV; Ritchie et al. 1989) dem Genus *Circovirus* zugezählt, während das *Chicken anemia virus* (CAV; (Todd et al., 1990)) aufgrund seiner von den oben genannten Viren abweichenden Genomorganisation den alleinigen Vertreter des Genus *Gyrovirus* darstellt. Das Genom von CAV besteht ebenfalls aus einem einzelsträngigen zirkulär geschlossenen DNA-Molekül, jedoch sind nur geringfügige Ähnlichkeiten zur Genomstruktur der Circoviren vorhanden. Die Gene des CAV werden, wie bei den jüngst in Transfusionspatienten entdeckten ssDNA Viren *TT-Virus* (Nishizawa et al., 1997), *TTV-like Mini Virus* (Takahashi et al., 2000) und dem *SEN Virus* (Primi und Mantero, 2000), in eine Richtung polycistronisch abgelesen. Die Genome weisen demzufolge nicht die Circovirus-typische ambisense Struktur auf, obwohl einzelne Merkmale durchaus vorhanden sind, wie z.B. ein konserviertes Nonamer, das in allen Circo-, Nano- und Geminiviren gefunden wurde.

Mit Ausnahme des PCV1 sind alle bislang bekannten Circoviren Pathogene; die ausgelösten Krankheiten ziehen das lymphatische Gewebe in Mitleidenschaft und bewirken eine Immunsuppression nebst Wachstums- und Entwicklungsstörungen.

Verwandt mit den Circoviren sind die Nanoviren, die Pflanzen infizieren. Zur Familie der

Nanoviridae gehören das *Banana bunchy top virus* (BBTV; (Harding et al., 1991)), das *Subterranean clover stunt virus* (SCSV; (Chu et al., 1993)), das *Milk vetch dwarf virus* (MDV; (Sano et al., 1998)) und das *Faba bean necrotic yellows virus* (FBNYV; (Katul et al., 1998)). Neben den Nanoviren weisen auch die Geminiviren, welche ebenfalls Pflanzen befallen, hinsichtlich ihrer Genomstruktur und der an der Replikation beteiligten Komponenten, Ähnlichkeiten zu den *Circoviridae* auf. Die Geminiviren lassen sich in Bezug auf ihre Genomorganisation, des Wirtsspektrums und des Insekten-Vektors in vier Untergruppen unterteilen (van Regenmortel et al., 2000): *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* und *Topocuvirus*. Sowohl die Nanoviren als auch die Geminiviren besitzen einzelsträngige, zirkuläre DNA-Genome, auffallend ist die Segmentierung der Genome, die bei den Nanoviren auf bis zu 11 Komponenten verteilt ist.

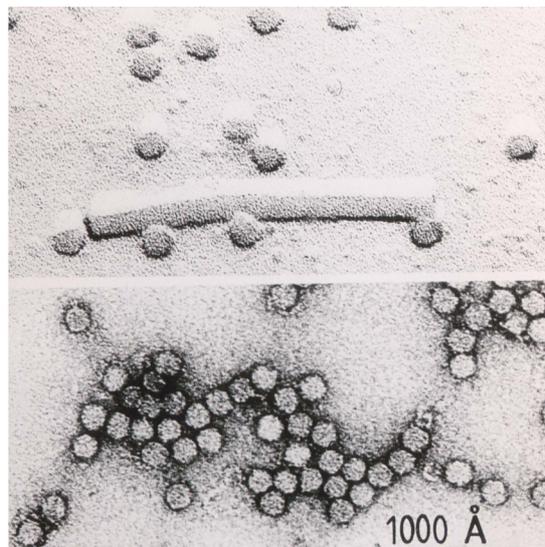


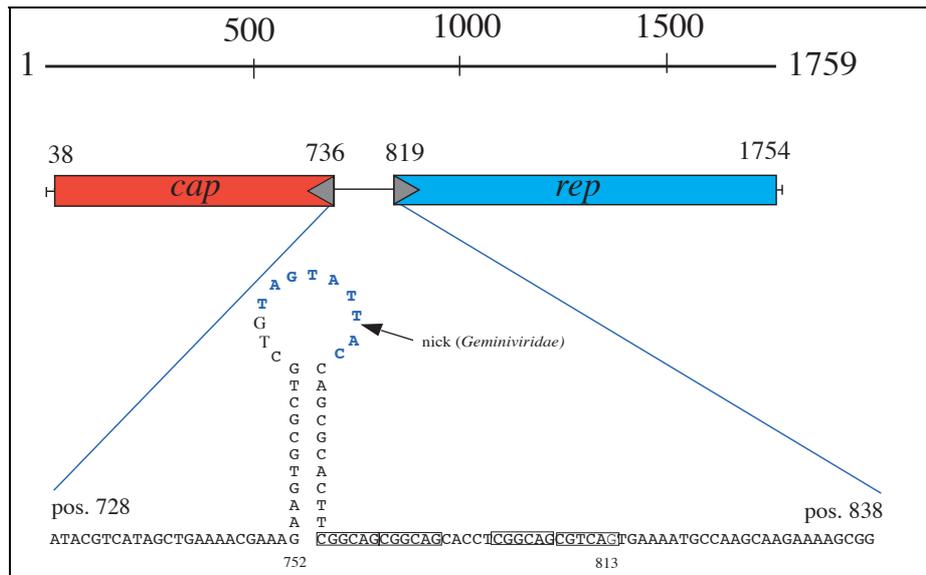
Abb. 1.3: Elektronenmikroskopische Darstellung der porzinen Circoviren mit dem Tabakmosaikvirus. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Gelderblom, Robert Koch Institut, Berlin.

1.2.2 Genomorganisation und Replikation von PCV1 und PCV2

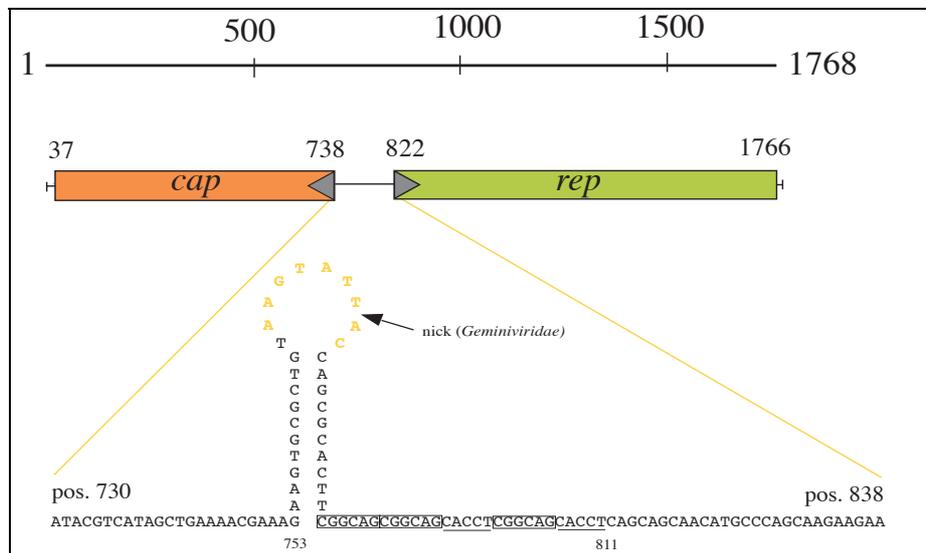
Bei der Analyse des Genoms von PCV1 und PCV2 mittels eines Sequenzverarbeitungsprogramms werden 2 Hauptleserahmen ersichtlich (Abb. 1.4 und 1.5). Das *cap*-Gen liegt auf dem Minusstrang und kodiert für das Hauptstrukturprotein des PCV, aus dem das Kapsid zusammengesetzt wird. Das *rep*-Gen ist der größte Leserahmen der PCV, es kodiert für die *in trans* agierenden Replikase-Proteine Rep und Rep' und liegt auf dem

viralen Plusstrang. Die Transkription der beiden Hauptleserahmen erfolgt bidirektional, demzufolge handelt es sich bei PCV1 und PCV2, wie auch bei den aviären Circoviren CaCV, GCV, PiCV, DuCV und BFDV um sogenannte „ambisense“ Viren.

Zwischen dem *cap* und dem *rep*-Gen befindet sich der Replikationsursprung für die Initiation der Replikation der viralen DNA.



A



B

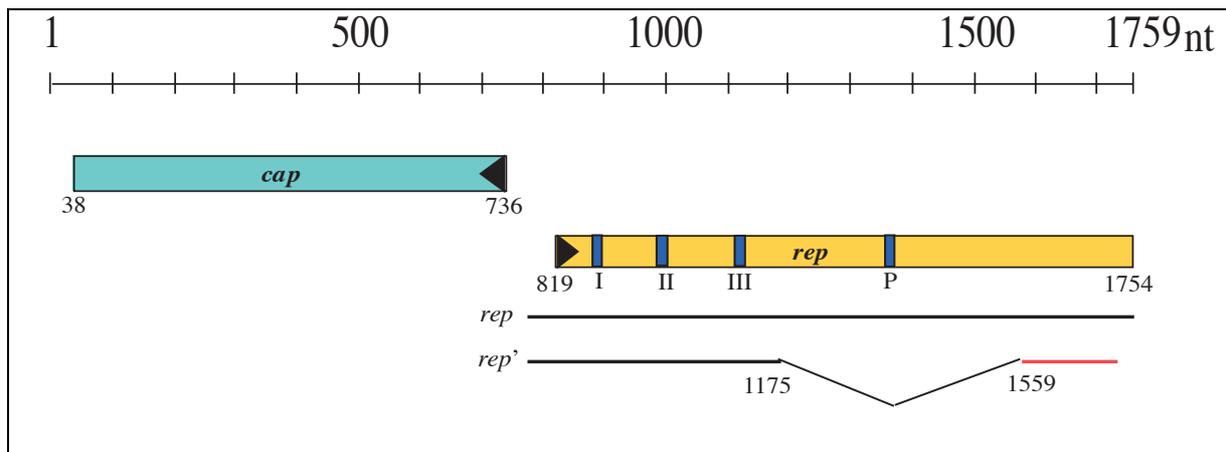
Abb. 1.4: Die Abb. 4 zeigt die Genomorganisationen von PCV1 (A) und PCV2 (B) mit vergrößerter Darstellung des Replikationsursprungs. Das konservierte Nonamer der Haarnadelstruktur ist blau (PCV1) bzw. gelb (PCV2) hervorgehoben. Die Hexamere, die als minimale Bindungsstelle für die *rep*-Genprodukte dienen, sind eingerahmt.

Im Folgenden wird auf die Molekularbiologie von PCV1 und PCV2 eingegangen:

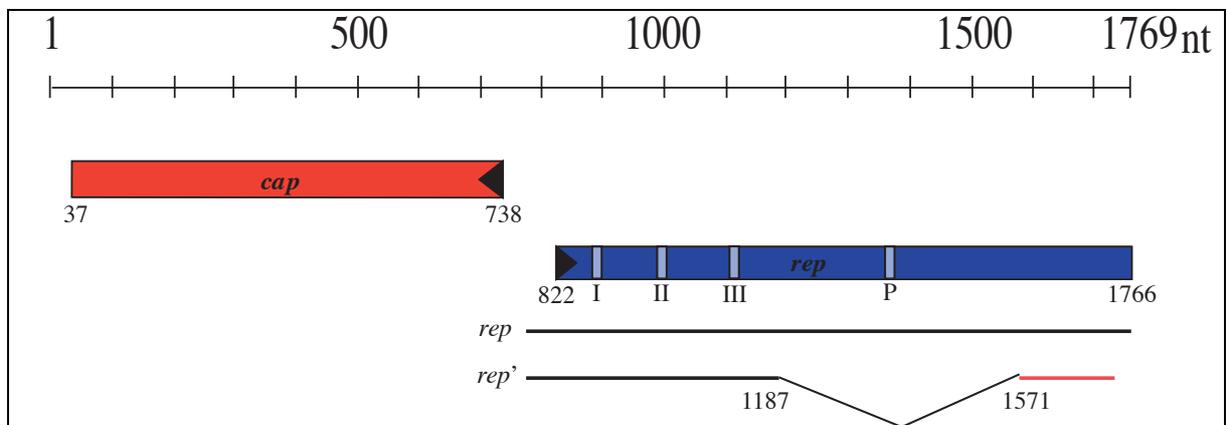
1.2.2.1 Das *rep*-Gen von PCV

Die Sequenz des *rep*-Gens aller Circoviren ist hoch konserviert: Durch Sequenzvergleiche konnten bei allen Circoviren neben einer dNTP-bindenden Domäne, die auch als P-Loop bezeichnet wird, die drei konservierten Motive I, II und III identifiziert werden. Diese sind charakteristisch für Replikasen, die im „Rolling-Circle“ Replikationsmechanismus die Initiation der DNA Replikation ausführen (Koonin und Ilyina, 1992; Koonin und Ilyina, 1993) (Abb. 1.5). Phylogenetische Analysen führten zur Hypothese, dass das *rep*-Gen der PCV aus einem Rekombinationsereignis zwischen dem *rep*-Gen eines Nanovirus und einem Gen für ein RNA-bindendes Proteins eines Picorna-ähnlichen Virus (Gibbs und Weiller, 1999) oder einer Helikase prokaryotischen Ursprungs (Nishigawa et al., 2001) hervorgegangen sein könnte. Der Transkriptionsstartpunkt konnte für das *rep*-Transkript von PCV1 bei 767 ± 10 festgelegt werden (Mankertz und Hillenbrand, 2001). Ausgehend vom *rep*-Transkript werden durch differenzielles Spleißen zwei Isoformen der Replikase gebildet; das Rep-Protein besitzt eine Größe von 312 Aminosäuren für PCV1 und 315 Aminosäuren für PCV2. Das Rep'-Protein ist kleiner, da ein 384 Nukleotide langes Intron zwischen den Positionen 1175 und 1559 (PCV1) bzw. 1187 und 1571 (PCV2) entfernt wird. Das Spleißen verursacht eine Verschiebung des Leserahmens. Dadurch unterscheiden sich die letzten 48 Aminosäuren (PCV1) bzw. die letzten 55 Aminosäuren im C-Terminus von Rep' von denen des Rep-Proteins (Abb. 1.5). Solche Spleißereignisse werden auch bei Replikasen anderer Viren mit einem kleinen Genom gefunden; z.B. für das Adeno-assoziierte Virus 2 (AAV2; (Redemann et al., 1989)) und für die zu den Geminiviren gehörenden Mastreviren (Horvath et al., 1998).

Für die Replikation beider Viren sind sowohl das Rep als auch das differenzielle Spleißprodukt Rep' von essenzieller Bedeutung (Mankertz und Hillenbrand, 2001; Mankertz et al., im Druck-b); wird nur eines der beiden Proteine exprimiert, kann keine Replikationsaktivität nachgewiesen werden. Sowohl für PCV1 als auch für PCV2 konnte die minimale Bindungsstelle am Replikationsursprung für die Replikasen Rep und Rep' auf den rechten Teil der Haarnadelstruktur und die Hexamere 1 und 2 festgelegt werden (Steinfeldt et al., 2001), (Müller et al., in Vorbereitung).



A



B

Abb. 1.5: Genomstruktur und Kartierung der *rep*-Gen Transkripte von PCV1 (A) und PCV2 (B). Die beiden Transkripte, *rep* und *rep'*, sowohl von PCV1 als auch von PCV2 sind als schwarze Balken dargestellt. Die gestrichelte Linie in *rep'* zeigt das deletierte Intron.

1.2.2.2 Das *cap*-Gen von PCV

Die Transkription des zweitgrößten Leserahmens von PCV erfolgt ausgehend vom viralen Negativstrang (Abb. 1.5). Das *cap*-Gen von PCV1 und PCV2 kodiert für das Strukturprotein Cap (234 Aminosäuren in PCV1 bzw. 236 in PCV2); das Molekulargewicht der Cap-Proteine beträgt in Westernblot Analysen allerdings 30 und 32 kDa, ist also höher als die theoretischen Werte. Bisher fiel im *cap*-Gen von PCV1 und PCV2 nur eine Glykosylierungsstelle auf (Hamel et al., 1998), dennoch kann davon ausgegangen werden, dass weitere posttranskriptionelle Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierung, Methylierung, Acetylierung und Hydroxylierung (Nawagitgul et al., 2000) erfolgen, was die Diskrepanz der theoretischen und beobachteten Molekulargewichte der beiden Proteine erklären könnte.

Der Promotor des *cap*-Gens (*P cap*) ist im Leserahmen des *rep*-Gens lokalisiert. Das *cap*-Transkript wird bei Pos. 1238 initiiert und unterliegt einem Spleiß-Prozess (Abb. 1.6), so dass in der prozessierten mRNA die Pos. 1120 direkt an die Pos. 737 unmittelbar vor dem Startcodon des *cap*-Leserahmens anknüpft (Mankertz et al., 1998). Die Ursache für die Evolution dieses Prozesses liegt vermutlich darin, dass durch diese Strategie ein alternatives Startcodon vermieden werden kann, das bei Ablesen zur Synthese eines ungeeigneten Proteins führen würde. Die Promotoraktivität von *P cap* ist nicht hoch und beträgt im Vergleich zum Promotor des *rep*-Gens weniger als 10 %. In Transkriptionsanalysen konnte für PCV1 gezeigt werden, dass das Transkript des *cap*-Gens im Verhältnis zu den anderen viralen Transkripten am häufigsten vorkommt (Mankertz et al., 1998). Vermutlich beruht dies auf einer positiven Regulation des *P cap* Promotors durch einen bislang unbekanntem Faktor oder auf einer großen Stabilität des *cap*-Transkriptes.

1.2.2.3 Der Replikationsursprung von PCV

Ausgangspunkt der viralen Replikation ist der intergenische Bereich zwischen den beiden Hauptleserahmen *rep* und *cap*, der sogenannte Replikationsursprung (Abb. 6). Bei PCV1 wurde dieser auf ein 111 bp großes Fragment eingegrenzt (Pos. 728-838), während sich der potenzielle Replikationsursprung von PCV2 von Position 730-838 erstreckt. Er ist bei beiden Viren durch mehrere Sequenzmotive charakterisiert:

Die Sequenz 5'-GAAGTGCGCGCTG-3' wird invers wiederholt, so dass sich eine Haarnadelstruktur ausbilden kann. An der Spitze dieses Elementes befindet sich ein neun Nukleotide umfassendes Motiv der Sequenz 5'-TAGTATTAC-3' (Mankertz et al., 1997). Die Haarnadelstruktur mit dem konservierten Nonamer tritt bei allen Circo-, Nano- und Gemini-viren, mit Ausnahme von CAV, auf; CAV enthält zwar die Nonamersequenz jedoch nicht die Haarnadelstruktur (Claessens et al., 1991).

Der Haarnadelstruktur auf der 3'-Seite anschließend, befinden sich vier Hexamere mit der Sequenz 5'-CGGCAG-3', wobei Hexamer 4 an Position 3 ein Nukleotidaustausch (Thymin statt Guanin) aufweist. Die Hexamere 1 und 2 sind von den Hexameren 3 und 4 durch die Pentamersequenz 5'-CACCT-3' getrennt (H1-H2-P1-H3-H4).

Der Replikationsursprung von PCV2 ist mit 79,5% Homologie dem von PCV1 sehr ähnlich. Allerdings zeigt die Nonamersequenz eine Abweichung im ersten Nukleotid (5'-AAGT-

ATTAC-3') und die Anordnung der der Haarnadelstruktur benachbarten Hexamere und Pentamere weicht ab: In PCV2 ist das vierte Hexamer (5'-CGGCAG-3') durch ein Pentamermotiv (5'-CACCT-3') ersetzt, es besteht also die Anordnung H1-H2-P1-H3-P2 (Abb. 1.6).

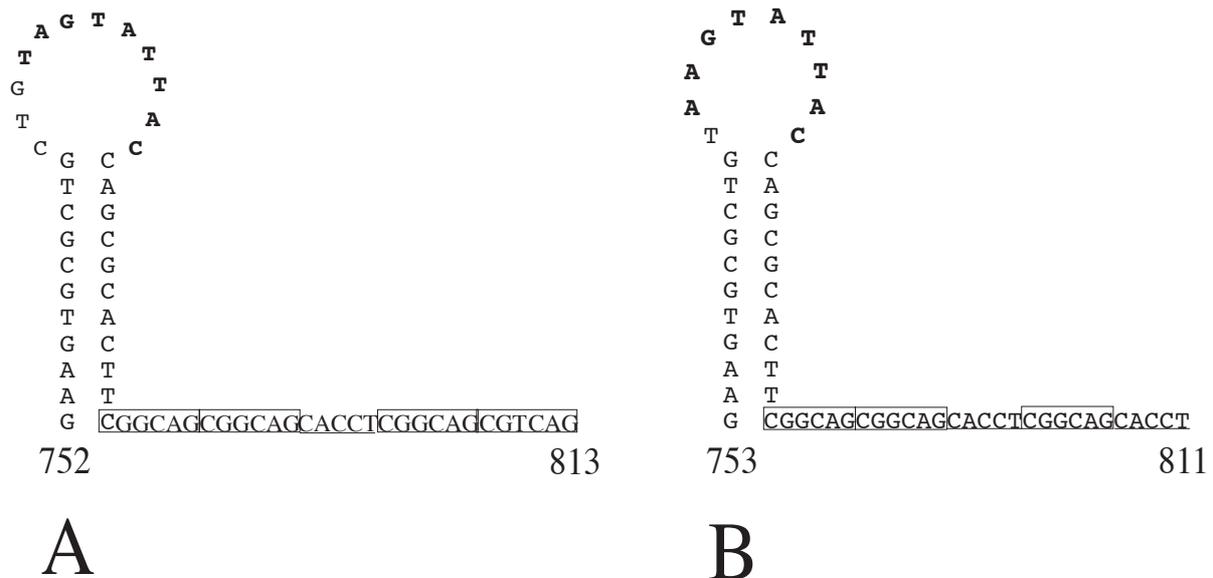


Abb. 1.6: Vergleich des Replikationsursprungs von PCV1 und PCV2. Dargestellt sind der Replikationsursprung von PCV1 (A) und PCV2 (B) mit den hoch konservierten Bereichen: Die Nonamersequenzen sind fettgedruckt hervorgehoben, die Hexamer motive durch Rechtecke gekennzeichnet und die Pentamersequenzen unterstrichen.

Für die Geminiviren konnte gezeigt werden, dass die Initiation der Virusreplikation durch die Einführung eines Einzelstrangbruches zwischen den Nukleotiden 7 und 8 im Nonamer des Plusstranges erfolgt; dies ist die Voraussetzung für die folgende „Rolling-Circle“ Replikation (Heyraud-Nitschke et al., 1995; Laufs et al., 1995; Stanley, 1995). Eine Mutation der Nukleotide 1 und 2 des Nonamers führten bei PCV1 zur Inaktivierung der Replikation (Mankertz et al., 1997). Das Nonamer stellt somit ein wichtiges Motiv für die virale Replikation dar.

1.2.3 Klinik und Epidemiologie

Die genetische Homologie zwischen PCV1 und PCV2 ist mit 70 % sehr hoch. Dennoch ist die Pathogenität der beiden Viren grundlegend unterschiedlich: PCV1 ist apathogen, während PCV2 das ätiologische Agens des *Postweaning Multisystemic Wasting Syndroms* (PMWS) in Ferkeln ist, das mit enormen volkswirtschaftlichen Verlusten einhergeht. In erster Linie sind Absetzferkel von PMWS betroffen. Klinische Symptome sind starke Abmagerung, Blässe, Kümern und Dyspnoe, oftmals verbunden mit einer hohen Mortalität. Bei der makroskopischen Untersuchung findet man vergrößerte Lymphknoten, eine nicht-kollabierte Lunge, die bräunlich erscheint, und oftmals eine gelblich-orange Verfärbung der Leber (Rosell et al., 1999). Die mikroskopische Untersuchung zeigt eine lymphozytäre Depletion und eine histiozytäre Infiltration der lymphatischen Organe (Segales et al., 2002). Ein Nachweis circoviraler DNA ist vor allem in den lymphatischen Organen möglich.

Die Ergebnisse von Studien zur Reproduktion von PMWS in experimentell PCV2 infizierten Schweinen sind uneinheitlich: Zwar konnte in solchen infizierten Schweinen die PMWS-typischen mikroskopischen Veränderungen festgestellt werden, eine Ausbildung der klinischen Symptomatik fehlte jedoch (Allan et al., 1999a; Balasch et al., 1999).

Experimentell infizierte Tiere zeigten nur dann alle typischen klinischen Symptome, wenn das Immunsystem aktiviert worden war. Dies geschah entweder durch Koinfektion mit dem *Porcinen Parvovirus* (PPV) (Kim et al., 2003) oder durch Verabreichung eines immunaktivierenden Agens wie das Hämocyanin der Napfschnecke *Diodora aspera* (keyhole limpet hemocyanine, KLH) (Krakowka et al., 2001; Krakowka et al., 2000). Weiterhin konnten natürliche Koinfektionen von PCV2 mit dem *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) in 20 % bis 60 % der an PMWS erkrankten Schweine beobachtet werden (Allan et al., 2000a; Segales et al., 2002). Deshalb ist davon auszugehen, dass für eine Etablierung des spezifischen Krankheitsbildes von PMWS neben PCV2 andere Kofaktoren notwendig sind (Ellis et al., 2000a).

Die Verbreitung der porcinen Circoviren in den Schweinebeständen ist sehr hoch. So konnten Antikörper gegen das PCV1 bei Untersuchungen in 77-95 % der Schlachtschweine in Berlin und in zwei weiteren Regionen Deutschlands detektiert werden (Tischer et al., 1986). Eine Untersuchung von Sera diverser Schweinebestände konnte eine Infektion in fast allen Tieren belegen. Weiterhin konnte hierbei festgestellt werden, dass mit zunehmendem Alter der Tiere

ein höherer Antikörpertiter zu verzeichnen war (Tischer et al., 1995c). Neuere Daten belegen eine weltweit hohe Prävalenz des pathogenen PCV2. Antikörper gegen PCV2 konnten in gesunden Schlachtschweinen in Kanada in 82,4 % und in Costa Rica in 14,6 % der untersuchten Tiere nachgewiesen werden (Liu et al., 2002). Erstmals detektierte man auch in Tschechien und in Korea Infektionen mit PCV2 (Celera und Carasova, 2002; Kim et al., 2001).

1.3 Aufgabenstellung

PCV2 ist der Auslöser des *Postweaning Multisystemic Wasting Syndromes* (PMWS), das zunächst in Nordamerika und Europa auftrat und inzwischen weltweit diagnostiziert wird. PMWS führt in Schweinezucht und Mastbetrieben zu großen wirtschaftlichen Verlusten. Es ist bislang unklar, ob eine PCV Infektion eine Gefahr für den Menschen darstellen könnte.

Bislang wurden noch keinerlei Untersuchungen durchgeführt, um das Risikopotenzial porziner Circoviren in der Xenotransplantation zu beurteilen. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit folgendes untersucht werden:

1.3.1 Die Suche nach einem neuartigen Circovirus

Mit einer Konsensusprimer-PCR sollte nach einem neuen Circovirus gesucht werden, wobei der Schwerpunkt auf der Identifikation eines humanen Circovirus lag. Neuartige Circoviren sollten sequenziert und ihre Genomstruktur charakterisiert werden. Die so gewonnenen Informationen sollten wiederum in das Design der PCR-Primer einfließen, um deren Sensitivität zu erhöhen.

1.3.2 Infektionsstudien an humanen Zelllinien

Die Suszeptibilität von humanen Zelllinien für die Infektion durch die porzinen Circoviren sollte untersucht werden. Hierfür wurde repletierte Virus-DNA von PCV erzeugt. Anschließend wurden unterschiedliche humane Zellen mit diesem Material transfiziert. Darüber hinaus sollten diese Zelllinien mit Virusstocks von PCV1 und PCV2 infiziert werden. Nach Transfektion bzw. Infektion sollten sowohl die Replikationsfähigkeit der PCV, als auch die Produktivität der Infektion beurteilt werden. Gleichfalls sollte das Auftreten etwaiger zytopathogener Effekte dieser Viren in den Zellen beobachtet werden.