

1 EINLEITUNG

1.1 Xenotransplantation

Die Allotransplantation, d.h. die Übertragung von Zellen und Organen zwischen genetisch verschiedenen Individuen derselben Spezies, ist eine in der Medizin weit verbreitete Methode. Laut Eurotransplant wurden im ersten Quartal des Jahres 2007 bereits 1032 Transplantationen durchgeführt; benötigt werden jedoch bislang weitere 11500 Organe, eine Zahl, die die heutigen Kapazitäten bei weitem übersteigt. Einen vielversprechenden Ansatz zur Überbrückung dieses Engpasses stellt die Xenotransplantation dar, die Übertragung von lebens- und funktionsfähigen Zellen und Organen zwischen verschiedenen Spezies.

1.1.1 Allotransplantation

Die Geschichte der Transplantation ist eng mit der Geschichte der Immunsuppressiva verbunden. 1933 wurde von dem ukrainischen Chirurgen Voronoy die erste Nierentransplantation von Mensch zu Mensch durchgeführt, die jedoch aufgrund der Gewebeunverträglichkeit scheiterte. In den folgenden Jahrzehnten wurden viele weitere erfolglose Versuche durchgeführt: Die erste erfolgreiche Transplantation einer Niere gelang 1954 dem Arzt Joseph Murray bei eineiigen Zwillingen. Mit Hilfe von Ganzkörperbestrahlungen der Transplantatempfänger und der damit verbundenen Schädigung des Knochenmarks gelang es, eine Unterdrückung des Abwehrsystems zu erzielen. Seit den frühen 60er Jahren wurden pharmakologische und biologische Verfahren der Immunsuppression entwickelt, welche die „Überlebensraten“ von transplantierten Organen dramatisch verbesserten. Die Zahl der Allotransplantationen wuchs dementsprechend zunehmend (DE VITO DABBS et al., 2000).

Heute stellt die Organtransplantation ein etabliertes Behandlungsverfahren in der Medizin dar. Allein in Deutschland sind etwa 50 Kliniken an der Transplantation von Organen beteiligt. Im Zeitraum von 1963 bis 2006 wurden in der Bundesrepublik Deutschland 79000 Allotransplantationen durchgeführt, überwiegend Nieren, aber auch Organe wie Leber, Herz, Pankreas und Lunge (Deutsche Stiftung Organtransplantation, 2006). Inzwischen ist die Zahl von Patienten, die auf ein Organ warten, derart angestiegen, dass der Bedarf weder durch Organspender noch durch Lebendspenden gedeckt werden kann. Trotz europaweiter Koordination und Verteilung geeigneter Transplantate versterben ca. 30% der Patienten auf der Warteliste, weil das benötigte Organ nicht verfügbar ist (Deutsche Stiftung Organtransplantation, 2006).

Die Bereitschaft zur Organspende innerhalb der Bevölkerung wird durch die öffentliche Diskussion über die Definition des Hirntodes, der in den meisten Ländern den Zeitpunkt der Organentnahme regelt, und die damit verbundene Angst vor einer verfrühten Explantation beschränkt (BOWMAN AND RICHARD, 2003). Obwohl die Bereitschaft zur Lebendspende bei Familienangehörigen wächst, besteht noch immer ein großer Mangel an Allotransplantaten, der die moderne Medizin auffordert, geeignete Alternativen zu finden.

1.1.2 Alternativen zur Allotransplantation

Mit Hilfe eines maschinellen „künstlichen Herzens“ ist es möglich, die Funktion des Herzens, also die Blutversorgung eines Organismus, kurzfristig zu überbrücken (LEDERMAN et al., 2002). Für Organe mit komplexen Stoffwechselwegen, wie beispielsweise die Leber, ist der Einsatz eines solchen artifiziellen Organs derzeit nicht realisierbar.

Des Weiteren bietet das sog. *tissue engineering* die Möglichkeit, morphologisch ähnliche Organe aus humanen Stammzellen zu züchten. Einfache Zellverbände können bereits heute produziert werden und auf diese Weise gewonnene Haut wurde z.B. bereits bei der Versorgung von großflächigen Brandwunden eingesetzt (BANNASCH et al., 2000). Um komplexere Organe wie Herz, Leber oder Niere zu reproduzieren, müssen jedoch erst alle nötigen zellulären Faktoren identifiziert werden, welche die Vorläuferzellen zur Differenzierung in die entsprechende Zelle mit der richtigen Morphologie und Funktion anregen.

Eine weitere vielversprechende Alternative zur Allotransplantation stellt die Xenotransplantation dar. Der erste dokumentierte Fall einer Xenotransplantation geht auf das Jahr 1905 zurück, in dem Princteau einem an Urämie leidenden Mädchen Teile einer Kaninchenniere einsetzte. 1910 übertrug Unger die Niere eines Rhesusaffen auf eine Patientin. Es folgten 1923 und 1963 Nierentransplantationen von Schafen und Schimpansen. In allen Fällen wurde das Xenotransplantat in Folge einer hyperakuten Reaktion des menschlichen Immunsystems abgestoßen. Erst durch die Behandlung eines Rezipienten mit einer Kombination verschiedener Immunsuppressiva überlebte dieser nach der Transplantation einer Schimpansen-Niere neun Monate (REEMTSMA et al., 1964). Trotz erheblich verbesserten Immunsuppressiva und wachsendem Wissen über immunologische Abstoßungsreaktionen sind bis heute noch keine Xenotransplantationen mit zufriedenstellendem Erfolg gelungen. 1985 scheiterte die Transplantation eines Pavian-Herzens auf einen Säugling, der 21 Tage nach dem Eingriff an multiple Organversagen starb (BAILEY et al., 1985). Letzte Xenotransplantationen wurden 1992 mit der Übertragung eines Schweineherzens und 1994 mit der Verpflanzung einer Schweineleber durchgeführt (MAKOWKA et al., 1994). Jedoch starben jeweils beide Rezipienten innerhalb von 24 Stunden an den Folgen einer hyperakuten Abstoßung.

Bei der Xenotransplantation wird generell zwischen der Übertragung solider Organe und der von Zellen unterschieden. Die größten Fortschritte wurden hierbei mit der Transplantation von Zellen oder Zellverbänden erzielt. Bei Diabetes Typ I-Patienten ersetzen verkapselte, fötale, porcine Inselzellen die Insulinproduktion über einen Zeitraum von bis zu zwei Jahren (ELLIOT et al., 2000). Eine verminderte immunologische Reaktion wurde hierbei durch die Verkapselung der Inselzellen und die damit verbundene räumliche Trennung des Immunsystems des Rezipienten und des xenogenen Transplantats erreicht. Darüber hinaus kann mit dieser Technik auch das Risiko einer Übertragung von Mikroorganismen minimiert werden. Weiterhin konnte die Verwendung porciner Zellen des ventralen Mesencephalon zur Behandlung von Morbus Parkinson sowie der Huntigton'schen Krankheit über einen Zeitraum von über 12 Monaten zu einer deutlichen Verbesserung der klinischen Symptome der Patienten beitragen (FINK et al., 2000, SCHUMACHER et al., 2000). Ebenso wurden porcine Hepatozyten in bioartifiziellen Leberunterstützungssystemen (Bioreaktoren) zur Leberperfusion mit Erfolg für die

Überbrückung lebensbedrohlicher Situationen nach akutem Leberversagen eingesetzt (LEVY et al., 2000, SAUER et al., 2003).

1.1.3 Das Schwein als favorisierte Organquelle für die Xenotransplantation

Als Spendertiere für die Xenotransplantation wurden aus phylogenetischer Sicht zunächst Primaten in Betracht gezogen. Insbesondere nicht-humane Primaten der Altwelt, wie Menschenaffen und Paviane, weisen in der Anatomie und Physiologie ihrer Organe sowie ihrer Blutgruppen eine hohe Kompatibilität auf. Von diesen Spendertieren wurde aus zahlreichen Gründen jedoch schnell wieder Abstand genommen: Haltung und Zucht dieser Tiere gestalten sich schwierig und sind zudem sehr kostspielig. Zudem kann durch die lange Tragzeit und geringe Nachkommenschaft keine ausreichende Anzahl an Spendertieren gewährleistet werden (FISHMAN, 1997). Ein weiterer Grund, der gegen die Verwendung von Primaten spricht, ist das aufgrund der phylogenetischen Nähe zwischen Menschen und Menschenaffen hohe Risiko der Übertragung von Mikroorganismen. So wurden bei ersten klinischen Transplantationen von Pavian-Lebern auf den Menschen Übertragungen des Simian Foamy Virus (SFV), des endogenen Retrovirus der Paviane (BaEV) und des Pavian Cytomegalievirus beobachtet (ALLAN et al., 1998; MICHAELS et al., 2001).

Momentan wird aus zahlreichen Gründen das Schwein (*Sus Scrofa*) als potentielles Spendertier favorisiert. Neben der anatomischen und der physiologischen Ähnlichkeit der Schweineorgane zu humanen Organen (HANNON et al., 1990; SACHS, 1994) erlauben züchterische Vorteile, wie die frühe Geschlechtsreife, kurze Tragzeit und hohe Reproduktionsrate, eine kostengünstige Produktion von Spendertieren. Des Weiteren besteht die Möglichkeit der *specific pathogen free* (spf)-Haltung, wodurch bekannte zoonotische sowie potentiell pathogene Erreger weitestgehend aus der Spendertierzucht eliminiert werden können. Bis die ersten porzinen Organe für die Xenotransplantation eingesetzt werden können, müssen jedoch noch zahlreiche Hürden überwunden werden. Dazu sind vor allem physiologische und immunologische Probleme, sowie das Risiko der Übertragung porziner endogener Retroviren (PERV), welche im Genom der Schweine integriert sind und durch SPF-Maßnahmen nicht entfernt werden können, zu zählen.

Von komplexen Organen wie der Leber werden zahlreiche Enzyme und Hormone produziert, deren Kompatibilität und Funktionalität im menschlichen Körper fraglich ist (SCHON et al., 1999). Das humane Parathormon ist beispielsweise nicht mit der porzinen Niere kompatibel, so dass es zu einer vermehrten Ausscheidung von Phosphor kommt, was zur Hypophosphatämie im Serum führt, die für den Menschen lebensbedrohlich werden kann. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass humane Wachstumsfaktoren porzine Zellen zur Proliferation anregten, was aufgrund eines fehlenden Antagonisten im Schweineorgan zu unbegrenztem Wachstum führte. Des Weiteren beträgt die Körperkerntemperatur im Schwein 39°C, während sie im Menschen bei 37°C liegt, und dies könnte, ebenso wie der unterschiedliche pH-Wert zu Funktionsstörungen in metabolischen Prozessen führen. Eine weitere Frage ist die der Anpassung der unterschiedlichen Alterungsgeschwindigkeit porziner und humaner Organe. Der physiologische Aspekt bleibt daher bis zur klinischen Realisierung von Xenotransplantationen solider Organe Gegenstand intensiver Forschung, worauf im Folgenden jedoch nicht näher eingegangen wird.

Bei der Xenotransplantation kommt es, wie bei der Alлотransplantation auch, zu einer Abwehrreaktion durch das Immunsystem des Rezipienten. Diese Abstoßung lässt sich bei Alлотransplantationen durch die Verwendung von Immunsuppressiva erfolgreich unterdrücken. Die Ursache dieser Reaktion auf allogene Transplantate ist eine zytotoxische T-Zellantwort auf fremde MHC (*major histocompatibility complex*)-Moleküle. Mit Ausnahme von eineiigen Zwillingen, die über einen identischen genetischen Hintergrund verfügen, sind diese Moleküle in den seltensten Fällen kompatibel.

Porzine Zellen weisen hinsichtlich ihrer Oberflächenmoleküle deutliche Unterschiede zu humanen Zellen auf, was im Vergleich zur Alлотransplantation zu einer gesteigerten Immunantwort führt, die sich mit den gegenwärtig verfügbaren Immunsuppressiva nicht kontrollieren lässt.

Dementsprechend gilt es bis zur Realisierung der klinischen Xenotransplantation vier unterschiedliche Reaktionen des Immunsystems zu umgehen: die hyperakute vaskuläre Abstoßung, die akut vaskuläre Abstoßung, die akute T-Zell vermittelte sowie die chronische Transplantatabstoßung.

Zum Schutz vor bakteriellen Infektionen verfügt das menschliche Immunsystem über präformierte Antikörper gegen Epitope der α -1,3-Galactosyltransferase, welche auf der Oberfläche von Bakterien und Säugetierzellen vorkommen. Durch die Reaktion dieser Antikörper mit den entsprechenden Epitopen des porzinen Gefäßendothels nach einer Xenotransplantation wird das Komplement- und Gerinnungssystem aktiviert, was zum Gefäßverschluss und somit zum Absterben des Transplantats binnen weniger Minuten führen kann (hyperakute vaskuläre Abstoßung). Des Weiteren stimulieren artspezifische und Komplement-regulatorische Proteine des porzinen Transplantats wie CD59, DAF (*decay-accelerating factor*, CD55) und MCP (*membrane-cofactor protein*, CD46) zusätzlich eine unerwünschte Komplementaktivierung (ROSENGARD et al., 1995). Eine vielversprechende Möglichkeit, diese Art der Abstoßung zu überwinden, ist die bereits erfolgte Generierung von Schweinen, denen beide Kopien des α -1,3-Galactosyltransferase-kodierenden Gens fehlen (DAI et al., 2002, LAI et al., 2002, PHELPS et al., 2003), sowie transgener Schweine, in denen die Gene für Komplement-regulatorischen Proteine (DAF, CD59, MCP) durch humane Varianten ersetzt wurden (SCHMOECKEL et al., 1997).

Die akut vaskuläre Abstoßung kann vier bis acht Tage nach der Xenotransplantation auftreten. Sie wird ebenfalls durch die Reaktion mit Kohlenhydrat-Epitopen der porzinen Zellen ausgelöst. Gefolgt von einer Komplement- und Endothelzell-Aktivierung kommt es zur Anlagerung und Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Monozyten und somit zur Zellyse des porzinen Organs (COOPER, 1996). Dabei wurde häufig ein Titeranstieg von zirkulierenden porzinen IgMs beobachtet. Mit Hilfe spezifischer IgM-Depletionen (Immunapherese) sowie durch die Verwendung monoklonaler anti-IgM-Antikörper konnte jedoch im Tiermodell bereits eine akut vaskuläre Abstoßung verhindert werden (LEVENTHAL et al., 1994, SATO et al., 1999).

Innerhalb einiger Tage oder auch Wochen nach der Transplantation besteht zusätzlich die Gefahr einer akuten T-Zell-vermittelten Abstoßungsreaktion. Sie erfolgt über die Erkennung MHC-I-präsentierter Peptidantigene auf der Oberfläche fremden Gewebes durch T-Zellen des Immunsystems. Gefolgt von der klonalen Expansion spezifischer CD4-

positiver T-Helferzellen und CD8-positiver zytotoxischer T-Lymphozyten (CTLs) kommt es durch Induktion der Apoptose zum Absterben des Xenotranplantats. Gegen diese Art der Abstoßung konnten im Bereich der Allotransplantation bereits einige Immunsuppressiva erfolgreich eingesetzt werden (BROUARD et al., 1999, DORLING 2002).

Verursacht durch eine zunehmende Verengung der Blutgefäße des Transplantats kann es noch Monate oder Jahre nach der Transplantation zur chronischen Abstoßung kommen. Bei Allotransplantationen konnte nach einer Entzündung im Bereich des Transplantats eine irreversible Proliferation des Gewebes durch freigesetzte Wachstumsfaktoren beobachtet werden (SHEN et al., 1998). Die Blutgefäße verschließen sich und das Transplantat wird nekrotisch, was letztlich zum Organversagen führt. Eine Behandlung ist bislang meist nicht möglich.

1.1.4 Potentielle Übertragung von porzinen Mikroorganismen

Ein großes Problem der Xenotransplantation stellt das Risiko einer Übertragung von Mikroorganismen auf den Organempfänger dar. Bei einer Xenotransplantation werden natürliche Barrieren wie Haut und Schleimhaut umgangen und potentiell erregerehaltene Organe in direkten Kontakt mit Organen und Blutkreislauf des Empfängers gebracht. Da der Patient stark immunsupprimiert ist, können sich durch Bakterien, Viren oder Parasiten verursachte Infektionen leicht etablieren. Viele der heute bekannten Infektionskrankheiten sind aus Zoonosen hervorgegangen, wie z.B. das durch humane Immundefizienzviren (HIV) hervorgerufene AIDS (GRIMM et al., 2003) und das durch humanpathogene Coronaviren ausgelöste schwere akute Atemnotsyndrom (SARS, *severe acute respiratory syndrome*, WEINGARTL et al., 2004).

Die meisten nicht-viralen humanpathogenen Erreger des Schweins, wie *Mycobacterium avium*, *Trichinella spiralis*, *Toxoplasma gondii*, *Campylobacter coli*, *Listeria*, *Cryptosporidium parvum*, *Streptococcus suis*, *Leptospira interrogans*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* und *Brucella suis* (FISHMAN 1997, TUCKER et al., 2002) können durch SPF-Bedingungen aus dem Schwein eliminiert werden (SWINDLE, 1998). Eine größere Rolle hinsichtlich der Risikobewertung von Xenotransplantationen spielen jedoch Viren. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Viren des Schweins identifiziert, die ein potentiell humanpathogenes Potential aufweisen. Schweine stellen zum Beispiel Wirte der zu den Orthomyxoviren gehörenden Influenzaviren dar. Es konnte gezeigt werden, dass porcine Influenzaviren die Speziesbarrieren überwinden und auch Menschen infizieren können (WELLS et al., 1991). Vor allem bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem wie z.B. ältere Menschen, Kinder, AIDS-Patienten oder immunsupprimierte Patienten nach Transplantationen, können solche Infektionen letal verlaufen. Es wird vermutet, dass die Übertragung des Schweineinfluenzavirus Auslöser der Influenza-Pandemie von 1918, der sog. „Spanischen Grippe“ war, der über 20 Millionen Menschen zum Opfer fielen (TAUBENBERGER et al., 1997). Auf asiatischen Schweinefarmen kam es zu zahlreichen Todesfällen unter den Mitarbeitern, verursacht durch eine Infektion mit dem porcinen Nipah-Virus, das den Paramyxoviren zugeordnet wird. Dieses Virus führt zu fieberhaften Hirnhautentzündungen und systemischen Erkrankungen bei Menschen, Schweinen und anderen Säugetieren (CHUA et al., 2000, CHUA et al., 2003).

Potentiell übertragbare Viren, wie die kürzlich entdeckten Schweinehepatitisviren, die Herpesviren, das *vesicular stomatitis virus* (VSV), das *swine disease virus* (SDV), das

Schweinepapovirus (PPV), das Maul- und Klauenseuchevirus, das Tollwutvirus, das porcine Enzephalomyocarditisvirus sowie das Schweinepockenvirus können jedoch bei normaler Immunkompetenz oder prophylaktischer Impfung des Empfängers als eher ungefährlich eingestuft werden (BORIE et al., 1998, METTENLEITER, 1996, EHLERS et al., 1999, MENG et al., 1997). Des Weiteren können die genannten Viren durch intensive Zucht und Haltung der Schweine unter SPF-Bedingungen und strenge Kontrollen eliminiert werden (TUCKER et al., 2002). Die Entfernung der porcinen Circoviren (PCV) aus den Schweinebeständen dürfte sich schwieriger gestalten. Es existieren zwei Subtypen, PCV-1 und -2 (FENAUX et al., 2000, MANKERTZ et al., 1997), von denen PCV-2 mit dem *postweaning multisystemic wasting syndrome* (PMWS) in Verbindung gebracht wird, das bei Schweinen zu einer hohen Sterberate führt (SORDEN et al., 1999, MANKERTZ et al., 2000, ROVIRA et al., 2002), während PCV-1 nicht virulent ist. PCV-2 ist in allen Schweineherden auf der ganzen Welt vorhanden, kann persistierende Infektionen auslösen und vertikal über die Plazenta übertragen werden (ALLAN AND ELLIS, 2000, PAUL et al., 2003).

Weiterhin geht ein Risiko von unbekanntem Viren aus, die aufgrund fehlender pathogener Merkmale nur schwer zu identifizieren sind. Die Folgen einer Infektion mit bis dahin unbekanntem Viren werden am Beispiel des Ebola- und Marburgvirus (SMITH et al., 1967) sowie des SARS- und HI-Virus (GAO et al., 1999) verständlich.

Eine weiteres Risiko der Xenotransplantation besteht in der Übertragung der porcinen endogenen Retroviren (PERV), die im Genom aller Schweine integriert sind und sich deshalb durch Zucht und Haltung unter SPF-Bedingungen nicht eliminieren lassen (DENNER, 1998, MANG et al., 2001).

1.2 Retroviren

Als Ursache zahlreicher Krankheiten, die heute als Viruserkrankungen bekannt sind, wurden bis ins späte 19. Jahrhundert Gifte vermutet (Virus, lateinisch für „Gift“), da sich mit Hilfe der damals verfügbaren Methoden keine pathogenen Organismen wie Bakterien oder Protozoen nachweisen ließen. Im Jahr 1892 konnte von Dimitri Iwanowski gezeigt werden, dass die Mosaikkrankheit der Tabakpflanze durch ein ultrafiltrierbares Agens verursacht wird, das deutlich unter der Größe von Bakterien liegt (0,5 bis 5 µm). Der erste Nachweis eines tierpathogenen Virus, des Maul-und-Klauenseuche-Virus, wurde 1898 von Friedrich Loeffler und Paul Frosch erbracht. Mit verbesserten Methoden, wie z.B. Entwicklung bakteriendichter Ultrafilter, konnte im Laufe der Zeit die Existenz vieler Viren gezeigt werden. So gelang es Walter Reed im Jahre 1900, das erste humanpathogene Virus nachzuweisen, das Gelbfiebertvirus.

Retroviren wurden vor fast 100 Jahren zum ersten Mal beschrieben. 1908 konnten Wilhelm Ellermann und Oluf Bang zeigen, dass die Mäuseleukämie durch zellfreie Ultrafiltrate auf andere Mäuse übertragbar ist. Drei Jahre später gelang es Peyton Rous gesunde Hühner mit einem Ultrafiltrat aus Geflügelsarkomen zu infizieren und damit eben diese Tumorerkrankung zu induzieren. Einen weiteren Hinweis auf das pathogene Potential der Retroviren und ihre Assoziation zu Tumorerkrankungen wurde 1936 von John J. Bittner erbracht. Ihm gelang es, den Erreger zu isolieren, der zur Entstehung der malignen Milchdrüsenerkrankung der Maus führt. Dieses als Maus-Mammatumortumor-Virus

(MMTV) bezeichnete Retrovirus kann neben der konventionellen, horizontalen Übertragung auch über Zellen der Keimbahn vertikal an nachfolgende Generationen übertragen werden. Zu Beginn der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts wurden erstmals humanpathogene Vertreter der Retroviren beschrieben, wie das humane T-Zell-Leukämie-Virus (HTLV, POIESZ et al., 1980, KALYANARAMAN et al., 1982) und das humane Immundefizienzvirus (HIV, BARRE-SINOUSI et al., 1983).

Ein Charakteristikum, das allen Retroviren gemein ist und sich in der Namensgebung widerspiegelt, stellt das Enzym Reverse Transkriptase dar. Es versetzt Retroviren in die Lage, den konventionellen genetischen Informationsfluss von DNA über RNA zu Protein umzukehren. Durch die Reverse Transkriptase, die 1970 erstmals von Howard M. Temin, S. Mizutani sowie David Baltimore beschrieben wurde, wird das retrovirale einzelsträngige RNA-Genom in doppelsträngige DNA überführt.

1.2.1 Taxonomie der Retroviren

Die Familie der Retroviridae ist in sieben Genera unterteilt, die α -, β -, γ -, δ -, ϵ -Retroviren, sowie die Lentiviren und Spumaviren (Tab. 1.1). Diese Einteilung erfolgte nach genetischen und morphologischen Unterschieden der Viren sowie nach Besonderheiten während der Infektion und der durch sie verursachten Krankheiten (MODROW, 2003). Retrovirusinfektionen kommen hauptsächlich bei Wirbeltieren vor und können Krankheiten verschiedener Symptomatik induzieren, wie z.B. Tumorerkrankungen, Immundefizienzen und neurologische Defekte. Des Weiteren wird zwischen exogenen und endogenen Retroviren unterschieden.

Tabelle 1.1 Charakteristische Vertreter der Retroviren (modifiziert nach Modrow, 2003)

Genus	Mensch	Tier	Typ
α -Retrovirus		aviäre Leukoseviren (ALV)	exogen
		Rous-Sarkomvirus (RSV)	exogen
β -Retrovirus		Maus-Mammatumor-Virus (MMTV)	endo/exogen
		Mason-Pfizer-Affen-Virus (MPMV)	exogen
	HERV-K-Familie		endogen
γ -Retrovirus		porzines endogenes Retrovirus (PERV)	endogen
		felines Leukämievirus (FeLV)	exogen
		Gibbonleukämievirus (GALV)	exogen
	Erv-3		endogen
δ -Retrovirus	humane T-Zell- Leukmie-Viren (HTLV-1/HTLV-2)	Simian-Lymphotropic-Virus (STLV)	exogen
			exogen
ϵ -Retrovirus		diverse Fischretroviren	exogen
Lentivirus		Affenimmundefizienzvirus (SIV)	exogen
	humane Immundefizienzviren (HIV-1/HIV-2)	felines Immundefizienzvirus (FIV)	exogen
			exogen
Spumavirus		feline Spumaviren	exogen
		Affenspumaviren	exogen

Exogene Retroviren besitzen alle zur Expression der viralen Proteine und somit zur Freisetzung viraler Partikel notwendigen Elemente und können horizontal von Organismus zu Organismus übertragen werden. Manche exogene Retroviren enthalten

zusätzliche genetische Informationen mit tumorerzeugendem Potential, sog. Onkogene. Im Unterschied zu exogenen Retroviren sind endogene Retroviren in das Genom aller Zellen eines Organismus integriert und werden vertikal über die Keimbahn übertragen. Unter bestimmten Umständen können auch sie zur Bildung exogener, infektiöser Partikel angeregt werden. Überwiegend ist die genetische Information dieser Viren jedoch stark deletiert, so dass keine intakten Partikel mehr gebildet werden können. In den Genomen der meisten Säugetiere und Vögel wurden inzwischen hauptsächlich defekte endogene Retroviren nachgewiesen. Auch das menschliche Genom besteht zu einem Teil (1%) aus diesen Retrovirus-ähnlichen, beweglichen Elementen, den sog. Retrotransposons (KAZAZIAN, 2004).

1.2.2 Virusgenom

Das Genom der Retroviren besteht aus zwei einzelsträngigen RNA-Molekülen, welche aufgrund der 5'-Cap-Struktur und der 3'-Polyadenylierung die Charakteristika eukaryontischer mRNAs aufweisen. Je nach Genus und Vorhandensein akzessorischer Gene variiert die Genomgröße zwischen 7000 und 12000 Basen. Das RNA-Genom der porzinen endogenen Retroviren umfasst ca. 8100 Nukleotide (CZAUDERNA et al., 2000). Die Genome aller infektiösen Retroviren beinhalten die Gene *gag*, *pol* und *env*, welche für die „gruppenspezifische Antigene“ (Gag-Proteine: Matrixproteine, Kapsidproteine, Nukleokapsidproteine), die Enzyme (Reverse Transkriptase; Integrase, Protease) und die Hüllproteine kodieren. Diese Regionen werden am 5'- und 3'-Ende des Genoms von regulatorischen Kontrollsequenzen flankiert, die für die reverse Transkription und die Integration des viralen Genoms in die zelluläre DNA von großer Bedeutung sind (Abb.1.1) An die 5'-Cap-Struktur der viralen RNA schließt sich die R-Region (R: redundant) an, die in identischer Basenfolge und Orientierung auch am 3'-Ende des Genoms vorliegt. In direkter Nachbarschaft zur R-Region befindet sich eine bei γ -Retroviren etwa 75 Nukleotide lange, als U5 (U: *unique*) bezeichnete Basenfolge. Sie enthält Sequenzen, die bei der Integration des Provirus in das Zellgenom eine Rolle spielen. Im Anschluss an die U5-Region findet sich eine 18 Basen lange Primer-Bindungsstelle (PBS), die mit dem 3'-Ende einer zellulären tRNA komplexiert vorliegt und bei der viralen Replikation von Bedeutung ist. Bei PERV stellt diese tRNA eine tRNAGly, bei HIV eine tRNALys dar (BARTOSCH et al., 2002). Die Sequenzfolge zwischen der PBS und dem Beginn der *gag*-Gene wird als *leader*-Region bezeichnet. Sie beinhaltet eine Spleißdonorstelle für die Bildung aller gespleißten mRNA-Moleküle, wie z.B. die mRNA für das Env (siehe Abb. 1.1), aus dem bei PERV gp70 und p15E hervorgehen. Die Spleißakzeptorstelle liegt zwischen den für die viralen Proteine kodierenden Genen *pol* und *env*. Neben der PBS befindet sich eine kurze Sequenzfolge, die ψ -Stelle, mit deren Hilfe die RNA-Genome bei der Morphogenese an die Nukleokapsidproteinabschnitte der sich bildenden Viruspartikel binden. Im Anschluß an die viralen Gene (*gag*, *pol* und *env*) folgt ein Polypurintrakt (PPT), eine bei jedem Retrovirus unterschiedliche Folge von mindestens neun Adenosin- bzw. Guanisinresten, die für die Initiation der DNA-Doppelstrang-Synthese bei der Reversen Transkription von Bedeutung ist. An den PPT schließt sich die U3-Region an, die je nach Virustyp variiert. Die U3-Region stellt nach der Integration des viralen Genoms in das des Wirts einen wichtigen Faktor für die virale Expression dar, da sie *cis*-aktive Elemente enthält.

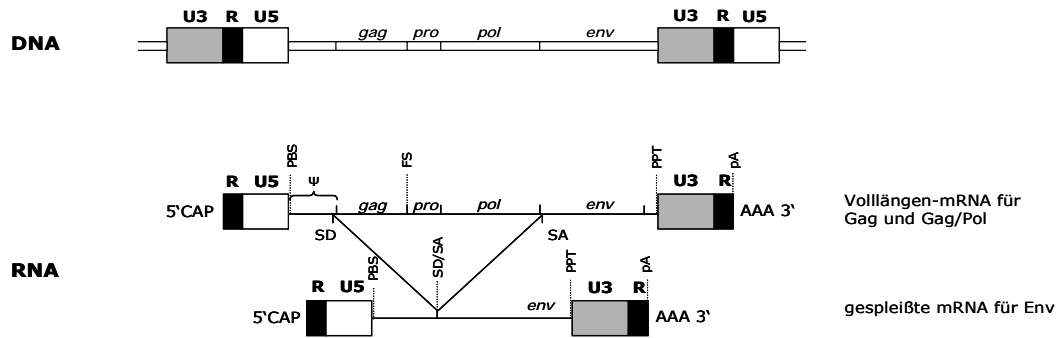


Abbildung 1.1: Genomorganisation der Retroviren

Oben: Provirale Struktur nach Integration in das zelluläre Genom. Unten: Transkribierte Vollängen-mRNA sowie die gespleißte *env*-mRNA. U3, R, U5: *long terminal repeat*, PBS: Primerbindungsstelle, Ψ -Verpackungselement, SD: Spleißdonor, SA: Spleißakzeptor, PPT: Polypurintrakt, FS: *frame shift* Stelle, pA: Polyadenylierungssignal (nach COFFIN, 1997)

1.2.3 Aufbau der Retroviren

Infektiöse retrovirale Partikel haben einen Durchmesser von ca. 100 nm. Das Kapsid ist von einer der Zytoplasmamembran der Wirtszelle abgeleiteten Hüllmembran umgeben (Abb. 1.2). Mit der Hüllmembran sind die viralen Hüllproteine TM („*transmembrane subunit*“) und SU („*surface subunit*“) assoziiert. Das TM-Protein ist über eine Region von bis zu 20 hydrophoben Aminosäuren in der Hüllmembran verankert, während das SU-Protein nicht-kovalent bzw. bei γ -Retroviren über Disulfidbrücken mit dem außerhalb der Membran gelegenen Teil des TM-Proteins verbunden ist. Auf dem Viruspartikel liegen beide Proteine jeweils als Trimere vor. Mit der Innenseite der Hüllmembran sind die Matrixproteine (MA) über aminoterminal angefügte Myristinsäurereste verbunden. Im Inneren des Viruspartikels liegt das Viruskapsid, das je nach Genus eine sphärisch-ikosaedrische oder eine konische Form aufweist. Es besteht aus Kapsidproteinen (CA), die wie die Matrixproteine Komponenten der gruppenspezifischen Antigene (Gag-Proteine) darstellen. Im Inneren des Kapsids befindet sich das Virusgenom: zwei identische, einzelsträngige RNA-Moleküle, die mit Nukleokapsidproteinen (NC), ebenfalls Komponenten der Gag-Proteine komplexiert sind. Weiterhin sind im Viruspartikel Enzyme vorhanden, die Reverse Transkriptase (RT), die Integrase (IN) und eine Protease (PR), welche bei der viralen Replikation sowie bei der Morphogenese eine bedeutende Rolle spielen. Zusätzlich zu den genannten Proteinen, die generell Bestandteile aller Retroviren darstellen, sind in komplexeren Retroviren, wie den Lentiviren und den δ -Retroviren zusätzlich regulatorische Proteine vorhanden. Die porzinen endogenen Retroviren, die dem Genus der γ -Retroviren angehören, besitzen keine regulatorischen oder akzessorischen Proteine (CZAUDERNA et al., 2000).

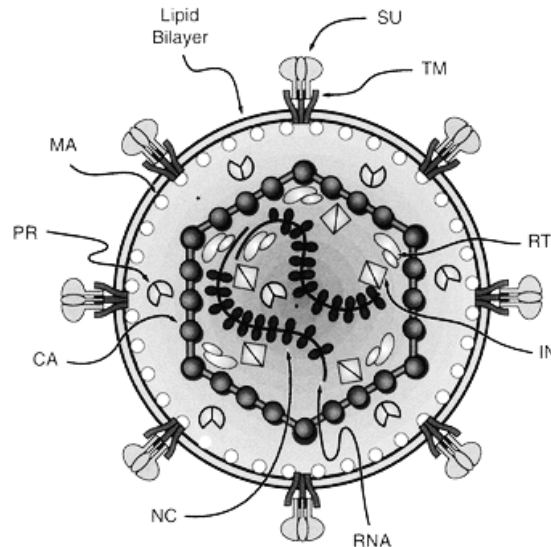


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Morphologie eines γ -Retrovirus

lipid bilayer: Lipiddoppelschicht, abgeleitet von der Wirtszelle, SU: *surface unit*, TM: Transmembranprotein, RT: reverse Transkriptase, IN: Integrase, NC: Nukleokapsid, CA: Kapsidproteine, PR: Protease, MA: Matrixproteine, (COFFIN, 1997)

1.2.4 Das pathogene Potential von Retroviren

Retrovirus-induzierte Erkrankungen sind mit einer Vielzahl unterschiedlicher Symptome assoziiert, wobei Immundefizienzen, Tumorentstehung und neurologische Defekte die häufigsten Symptome darstellen. Die Ursachen dieser Krankheitsbilder sind vielschichtig und vom Genus der Viren abhängig.

Die Integration der Retroviren in die Chromosomen der Wirtszelle erfolgt unspezifisch an zufälligen Positionen. Tumore, die nach einer langen Latenzphase zwischen Infektion und Transformation entstehen, sind monoklonalen Ursprungs, d.h. aus einer einzigen transformierten Vorläuferzelle entstanden, und können sowohl durch Aktivierung als auch durch Inaktivierung entsprechender Gene induziert werden. So konnte gezeigt werden, dass die Transformation von Zellen in den meisten Fällen durch Insertion induziert wurde, wobei die durch retrovirale Integration transformierten Gene den natürlichen physiologischen Regulationsmechanismen der Zelle entzogen werden. So führt z.B. die Aktivierung von Protoonkogenen wie *c-myc* durch die LTR-Promotoraktivität benachbarter Retroviren zur Überexpression des Transkriptionsfaktors und schließlich zur Karzinogenese (KLEIN, 1988).

In zahlreichen Tumoren von Nagern, Katzen und Vögeln wurden neben retroviralen Elementen Sequenzen mit akut transformierendem Potential entdeckt (DUESBERG and VOGT, 1970), die als virale Onkogene bezeichnet werden. Sie kodieren für Genprodukte, die zu Veränderungen der Regulation des Zellzyklus führen und somit Tumorstadium induzieren können.

Bei retroviralen Infektionen, wie z.B. durch HIV werden häufig Immunsuppressionen beobachtet, deren Mechanismus noch nicht vollständig untersucht ist.

1.2.5 Porzine endogene Retroviren (PERV)

Porzine endogene Retroviren stellen einen integralen Bestandteil des Genoms aller Schweine dar. Erstmals beschrieben wurden diese Viren Anfang der 70er Jahre des vergangenen Jahrhunderts: Im Kulturüberstand der porzinen Nierenzelllinie PK-15 konnten elektronenmikroskopisch Virus-ähnliche Partikel identifiziert werden (BRESE, 1970). Auch in Kulturüberständen anderer porziner Zelllinien konnten virale Partikel beobachtet werden, die auf Grund ihrer Morphologie dem Genus der γ -Retroviren zugeordnet wurden (ARMSTRONG et al., 1971, WOODS et al., 1973, TODARO et al., 1974).

Die als Proviren bezeichneten im porzinen Genom vorliegenden PERV sind mit über 50 Kopien an verschiedenen Loci integriert (LE TISSIER et al., 1997, PATIENCE et al., 2001, ERICSSON et al., 2001), je nach Schweinerasse kann die Zahl der Integrationen zwischen 10 und 100 liegen (BOSCH et al., 2000, HERRING et al., 2001b). Zahlreiche dieser Proviren weisen jedoch Mutationen auf und können daher keine intakten infektiösen Viruspartikel bilden (PATIENCE et al., 2001, LEE et al., 2002). Die intakten, Partikel-bildenden Proviren werden in die Subtypen PERV-A, PERV-B und PERV-C eingeteilt (TAKEUCHI et al., 1998). PERV-A und -B, sind im Gegensatz zu PERV-C, im Genom aller Schweine vorhanden, (BOSCH et al., 2000, JIN et al., 2000). Die Expression von PERV-mRNA variiert in verschiedenen Geweben, wobei im Pankreas die geringste und in Nieren die höchste Expression an PERV-mRNA zu detektieren ist (AKIYOSHI et al., 1998, CLEMENCEAU et al., 1999). Des Weiteren bestehen zwischen verschiedenen Schweinestämmen erhebliche Unterschiede bezüglich der Freisetzung von PERV-Partikeln (TACKE et al., 2000b, TACKE et al., 2003).

Die Unterscheidung der Subtypen basiert auf Variationen in der Sequenz des *env*-Gens (LE TISSIER et al., 1997) und dem daraus resultierenden Wirtsspektrum. PERV-A und PERV-B sind polytrope Viren, die Zellen verschiedener Spezies (WILSON et al., 2000, SPECKE et al., 2001a, SPECKE et al., 2002a) einschließlich des Menschen (PATIENCE et al., 1997, WILSON et al., 1998, SPECKE et al., 2001b) und nicht-humaner Primaten (BLUSCH et al., 2000, SPECKE et al., 2002b) *in vitro* infizieren können. Zur Untersuchung des Wirtsspektrums der PERV wurden umfangreiche Studien durchgeführt, dabei zeigten eine Vielzahl humaner Zelllinien und primäre Zellen nach Infektion mit PERV *in vitro* Virusreplikation und -freisetzung (WILSON et al., 2000, SPECKE et al., 2001b, SPECKE et al., 2002b). Des Weiteren konnten *in vitro* Zellen von Nerz, Katze, Pavian und Rhesusaffe mit PERV infiziert werden (WILSON et al., 2000, SPECKE et al., 2001a, SPECKE et al., 2002a). Die Replikationsrate der Viren ist in den meisten dieser Zellen allerdings sehr gering. Für PERV-A konnten zwei humane Rezeptoren identifiziert und kloniert werden (*human PERV-A receptor*, huPAR-1 und -2), deren zelluläre Funktionen bislang jedoch noch unbekannt sind (ERICSSON et al., 2003). Bei PERV-C handelt es sich um ein ecotropes Virus, das nur porzine Zellen infizieren kann (TAKEUCHI et al., 1998), wie z.B. die porzine Zelllinie ST-IOWA (OLDMIXON et al., 2002).

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie der PERV-Subtypen besteht die Möglichkeit einer Rekombination zwischen humantropen und ecotropen Viren. So konnte gezeigt werden, dass aus Mitogen-stimulierten porzinen PBMCs, PERV-Partikel freigesetzt wurden, welche das Genom von PERV-C und die Rezeptorbindestelle von PERV-A aufweisen und somit humane Zellen infizieren können (WILSON et al., 1998, WILSON et al., 2000, WOOD et al.,

2004). Diese PERV-A/C-Rekombinante war in der Lage, an humane Zellen zu adaptieren. Dies ging mit einer gesteigerten Promotoraktivität durch sequentielle Multimerisierungen im replikationsregulierenden Bereich (Bindestelle des Transkriptionsfaktors NF- κ B) der U3-Region der LTR und somit einer Erhöhung der Virusreplikation einher (DENNER et al., 2003a). Ähnliche Multimerisierungen bestimmter Sequenzmotive in den LTRs wurden bereits bei anderen γ -Retroviren, z.B. den Leukämieviren der Maus und der Katze beobachtet und korrelierten mit einer Zunahme der Pathogenität (WOLGAMOT AND MILLER, 1999). Kürzlich wurden in genomischer porciner DNA PERV-A/C rekombinante Proviren als Folge einer Autoinfektion nach exogener viraler Rekombination beschrieben (MARTIN et al., 2006).

Die porcinen endogenen Retroviren zeigen in ihrem natürlichem Wirt, dem Schwein, keine pathogene Symptomatik. Sie weisen jedoch hohe Homologien zu anderen bekannten γ -Retroviren auf, wie dem Leukämievirus der Gibbons (*gibbon ape leukemia virus*, GALV) (PATIENCE et al., 1997), dem endogenen Koala Retrovirus (KoRV) (HANGER et al., 2000), sowie zu feline und murinen γ -Retroviren (FeLV, MuLV), für die bereits beschrieben wurde, dass sie in ihrem Wirt Immundefizienzen hervorrufen und Tumore induzieren können (MIKKERS UND BERNS, 2003). Für das feline Leukämie Virus konnte gezeigt werden, dass die Tumorentwicklung von einem hohem Expressionsstatus, der Insertionsmutagenese sowie von Veränderungen in den viralen LTRs abhängt (ATHAS et al., 1995). Für die klinische Anwendung der Xenotransplantation ist dies von zentraler Bedeutung, da eine PERV-Transspeziesübertragung ebenfalls zu Immundefizienzen und aufgrund der Integration der Proviren in das zelluläre Genom zu einer erhöhten Tumorbildung führen könnte (LE TISSIER et al., 1997, PATIENCE et al., 1997, AKIYOSHI et al., 1998, DENNER et al., 1998). Kürzlich wurden PERV-Integrationsstellen im humanen Genom charakterisiert (MOALIC et al., 2006). Diese an HEK-293-Zellen durchgeführten Untersuchungen zeigten stark erhöhte Integrationshäufigkeiten an Transkriptionsstartpunkten und CpG-Inseln. Die Frequenzen der Integrationsereignisse stiegen mit den Expressionsniveau der Gene an. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das PERV-Integrationsprofil hohe Ähnlichkeiten zu dem des murinen Leukämie Virus aufweist, dessen Tumor-induzierendes Potential bekannt ist.

Zur Einschätzung des pathogenen Potentials der porcinen endogenen Retroviren wäre ein Tiermodell hilfreich. Auf diese Weise wäre es möglich, die Modulation der Immunantwort oder die Induktion eines Virus-assoziierten Krankheitsbildes zu untersuchen. Umfangreiche *in vivo*-Studien mit nicht-humanen Primaten und vielen Kleintieren konnten bislang keine produktive PERV-Übertragung zeigen (DENNER et al., 2003b, MARTIN et al., 2002, SPECKE et al., 2001a, SPECKE et al., 2002a, SPECKE et al., 2002b). Kürzlich wurde jedoch von einer transienten PERV-Übertragung auf fötale Lämmer nach Transplantation von porcinem Inselzellgewebe berichtet (POPP et al., 2007). Die publizierte PERV-Übertragung bei einer Transplantation porciner Inselzellen auf SCID-Mäuse (VAN DER LAAN et al., 2000, DENG et al., 2000) ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Bildung von Pseudotypen mit den murinen Leukämieviren (MLV) zurück zu führen, da Mäuse keinen PERV-A-Rezeptor besitzen (TAKEUCHI et al., 1998, ERICSSON et al., 2003). Kürzlich gelang die Generierung transgener Mäuse, die den PERV-A-Rezeptor-2 (HuPAR-2) auf ihren Zelloberflächen exprimieren (MARTINA et al., 2006). Nach Applikation

infektiöser PERV-Überstände konnte sowohl virale DNA als auch RNA detektiert werden, was auf eine produktive Infektion hinweist. Mit Hilfe dieser Mäuse wäre es möglich, das Risiko der PERV-Übertragung, deren pathogenes Potential sowie potentielle Therapeutika und präventive Maßnahmen zu untersuchen. Fiebig et al. zeigten eine *in vivo* Transspeziesübertragung des Koala Retrovirus (KoRV) auf Ratten, die zur Induktion eines Tumors führte (FIEBIG et al., 2006). Aufgrund großer Sequenzhomologien zwischen PERV und KoRV könnten Ratten somit ein geeignetes Tiermodell darstellen.

Die PERV-Übertragung auf den Menschen bei künftigen Xenotransplantationen kann nicht ausgeschlossen werden. Das Risiko steigt z.B. durch den Einsatz transgener Schweine, denen - zur verbesserten Akzeptanz des porzinen Organs im humanen Organismus - das α -Gal-Epitop durch doppelten Gen-Knockout der α 1,3-Galaktosyl-Transferase entfernt wurde (PHELPS et al., 2003). Dadurch wird zwar die Wahrscheinlichkeit einer Abstoßung des Transplantats (siehe 1.1.3) verringert, jedoch der Schutz der porzinen endogenen Retroviren vor der humanen Immunantwort erhöht: aufgrund der fehlenden Gal-Epitope in der von porzinen Zellen abgeleiteten Hüllmembran der porzinen endogenen Retroviren sind die sonst xenoreaktiven Antikörper gegen das Gal-Epitop wirkungslos.

Die Expression humaner, komplement-regulierender Proteine wie CD59, DAF und MCP (vgl. 1.1.3) auf der Oberfläche porziner Endothelzellen verringert die Aktivierung des humanen Komplementsystems und steigert somit die Akzeptanz des Xenotransplantats (MIYAGAWA et al., 1994, BYRNE et al., 1997). Es besteht jedoch die Gefahr, dass durch die Inkorporation dieser humanen Proteine in die Hüllmembran der porzinen endogenen Retroviren deren Inaktivierung durch das Komplementsystem stark eingeschränkt ist. Auf diese Weise würde ein wichtiger Bestandteil des menschlichen Immunsystems, der nachweislich in der Lage ist, γ -Retroviren zu inaktivieren, ausfallen (TAKEUCHI et al., 1996, FUJITA et al., 2003).

Zahlreiche Xenotransplantationen transgener porziner α -Gal-negativer Organe oder Zellen wurden bereits auf Paviane durchgeführt. Pavianzellen besitzen, wie auch humane Zellen, keine α -Gal-Epitope auf ihrer Oberfläche und lassen sich zudem *in vitro* infizieren (SPECKE et al., 2001a, ERICSSON et al., 2003). Bei ausreichend langer Überlebenszeit mit dem Xenotransplantat könnten Paviane daher die Möglichkeit bieten, eine eventuelle PERV-Infektion unter *in vivo*-Bedingungen zu untersuchen.

Für den klinischen Einsatz der Xenotransplantation spielt das Monitoring der Patienten nach der Transplantation eine entscheidende Rolle. Die bisher entwickelten Nachweismethoden basieren auf der indirekten immunologischen Detektion von Antikörpern gegen virale Epitope (STEPHAN et al., 2001, TACKE et al., 2001, FISCHER et al., 2003). Des Weiteren wurden hochsensitive molekularbiologische Methoden wie die quantitative *real-time* PCR für den direkten PERV-Nachweis etabliert (ARGAW et al., 2002, SHAH et al., 2003).

Sollte es trotz aller Sicherheitsvorkehrungen zu einer Übertragung der porzinen endogenen Retroviren auf den Menschen kommen, könnten die bei der HIV-Therapie eingesetzten Reverse-Transkriptase-Hemmer verwendet werden. So konnte gezeigt werden, dass das Nukleosidanalogon AZT in der Lage ist, die PERV-Replikation *in vitro* zu hemmen (QUARI et al., 2001, STEPHAN et al., 2001). Des Weiteren gelang die Induktion neutralisierender Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein von PERV (FIEBIG et

al., 2003, CHIANG et al., 2007), so dass eine Impfung gegen PERV möglich wäre. Weiterhin könnte der Einsatz der RNA-Interferenz einen Schutz bieten. So konnten Karlas et al. zeigen, dass sich die Virus-Expression in humanen PERV-infizierten Zellen um bis zu 90% reduzieren lässt (KARLAS et al., 2004).

1.2.6 Hüllproteine von PERV und KoRV

Die Hüllproteine werden durch das *env*-Gen kodiert und als gemeinsames Vorläuferprotein (gp85) am Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und glykosiliert. Im Golgi-Netzwerk wird das Vorläuferprotein von einer zellulären Furinprotease in gp70 und p15E gespalten und beide Proteine zur Zellmembran exportiert, wo es zur Virusmorphogenese und dem Abknospen der viralen Partikel kommt. Letztendlich wird der zytoplasmatische C-Terminus (p2E) des p15E von der viralen Protease abgespalten. Die Bezeichnungen der viralen Proteine mit den entsprechenden Größenangaben erfolgten nach der Analyse des Molekulargewichtes mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese (TACKE et al., 2001).

Bei zahlreichen Retroviren wurden für die Hüllproteine trimere Strukturen beschrieben (EINFELD AND HUNTER, 1988, YANG et al., 1990, ZHU et al., 2003), was auch für PERV und KoRV angenommen wird (Abb. 1.2). Das gp70-Protein kann in drei Bereiche unterteilt werden: die Rezeptor-Binde-Domäne (RBD), die prolinreiche Region (PRR) und einen konservierten Bereich (Abb. 1.3). In der RBD befindet sich N-terminal ein bei allen γ -Retroviren hochkonserviertes PHQ-Motiv, welches mit weiteren Bereichen der RBD die Rezeptorbindung vermittelt (LAVILLETTE AND KABAT, 2004, WATANABE et al., 2005). Für PERV-A und -C konnten zudem innerhalb der RBD zwei variable Bereiche identifiziert werden (LE TISSIER et al., 1997).

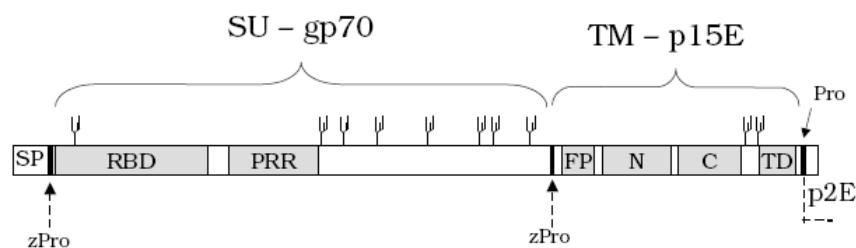


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des PERV-Hüllproteins

Die Zuckerbäume simulieren die potentiellen Glykosylierungsstellen. SU: *surface unit*, TM: Transmembranprotein, zPro: Spaltstelle für die zelluläre Protease, Pro: Spaltstelle für die virale Protease, SP: Signalpeptid für die Kotranslokation in das ER, RBD: Rezeptorbindedomäne, PRR: Prolinreiche Region, FP: Fusionspeptid, N: N-terminale Helixregion, C: C-terminale Helixregion, TD: Transmembrandomäne, p2E: kurzes Oligonukleotid, das während der Prozessierung des Hüllproteins abgespalten wird.

Das p15E-Protein besitzt ein N-terminales, stark hydrophobes Fusionspeptid, das sich nach der Adsorption des Viruspartikels an die Wirtszelle in deren Zellmembran einlagert, um den Fusionsvorgang zu vermitteln. Dem schließen sich zwei helikale Bereiche an, die für die spätere Ausbildung des 6-Helixbündels erforderlich sind. Zwischen den beiden

Helices wurde zudem eine immunsupprimierende Domäne beschrieben (DENNER, 1998). An die N-helikale Region knüpft die Transmembrandomäne an.

Die Env-Proteine beider Retroviren besitzen N-Glykosilierungsstellen: PERV besitzt acht potentielle Glykosilierungsstellen im Bereich des Gp70 und eine im p15E; KoRV besitzt nur fünf Glykosilierungsstellen im gp70 (alle C-terminal), jedoch zwei im p15E. Für PERV wird vermutet, dass auch O-Glykosilierungen vorhanden sind (WATANABE et al., 2005). Die Glykosilierung des Hüllproteins hat zwei nachgewiesene Auswirkungen: Sie ist notwendig für die korrekte Faltung des gp85, da es sonst zum Rückhalt im ER kommt (LI et al., 1993, BATTINI et al., 1994), des Weiteren maskieren die Oligosaccharide das Hüllprotein gegenüber Angriffen des Immunsystems des Wirts (CHACKERIAN et al., 1997).

1.3 RNA-Interferenz

Eine vielversprechende Strategie zur Minimierung des Risikos der PERV-Übertragung bei der Xenotransplantation ist die Hemmung der PERV-Expression in den entsprechenden Organen mit Hilfe der RNA-Interferenz (RNAi). Darunter wird ein post-transkriptionelles Blockieren von Genen, basierend auf einer durch kurze doppelsträngige RNA-Moleküle induzierten Sequenz-spezifischen Degradierung von mRNA verstanden. Dieses Phänomen, das vermutlich einen der ältesten Abwehrmechanismen gegen virale Infektionen darstellt, wurde als erstes im Nematoden *Caenorhabditis elegans* beschrieben (FIRE et al., 1998) ist jedoch, wie spätere Arbeiten zeigten, hoch konserviert in Pflanzen, Fliegen, Würmern und Säugetieren (CAPLEN et al., 2001). Während der Replikation von RNA-Viren entstehen vorübergehend doppelsträngige RNA-Moleküle, welche in kleine 21-23 Basenpaare lange Fragmente prozessiert werden, und somit Sequenz-spezifisch an die virale mRNA binden um zu deren Abbau zu führen.

1.3.1 Mechanismus der RNA-Interferenz

Der Mechanismus der RNA-Interferenz wurde in den letzten Jahren mit Hilfe genetischer und biochemischer Studien an *C. elegans* und Zell-Extrakten aus *Drosophila melanogaster* in vielen Punkten aufgeklärt:

RNAi beruht auf einem mehrere Schritte umfassenden intrazellulären Prozess, der in zwei Phasen unterteilt werden kann: In der Initiationsphase werden doppelsträngige RNA-Moleküle endogenen (z.B. miRNA) oder exogenen Ursprungs durch die ATP-abhängige Spaltungsaktivität eines Enzyms vom Ribonuklease III-Typ (*Dicer*) in kleine 19 bis 23 Basenpaare (bp) umfassende siRNAs (*small interfering RNAs*) prozessiert (HAMMOND et al., 2001, MATZKE et al., 2001, SHARP et al., 2001, HUTVAGNER AND ZAMORE, 2002), die am 3'-Ende 2 bis 3 Nukleotide Überhang besitzen (Zamore et al., 2000, Elbashir et al., 2001a, ELBASHIR et al., 2001b, ELBASHIR et al., 2001c). Während der Effektorphase erfolgt die Zusammenlagerung dieser siRNAs mit dem *RNA induced silencing complex* (RISC) und die Spaltung der Ziel-mRNA. Nach der Assoziation der siRNA mit dem RISC kommt es durch die Helikase-Aktivität des RISC unter ATP-Verbrauch zur Entwindung der doppelsträngigen siRNA. Einer der siRNA-Einzelstränge hybridisiert sequenzspezifisch an die Ziel-mRNA die daraufhin durch die Nuklease-Aktivität des RISC degradiert und von zellulären Nukleasen abgebaut wird, wodurch die Translation des Proteins verhindert wird

(BILLY et al., 2001, YANG et al., 2000a). Der RISC kann wiederum neue siRNAs binden und entfaltet somit eine katalytische Aktivität.

Die Methode der RNA-Interferenz ist inzwischen ein wichtiges Hilfsmittel zur Aufklärung der Funktion von Genen geworden.

1.3.2 RNA-Interferenz in Säugetieren

Entgegen der hemmenden Wirkung in Pflanzen-, Invertebraten- und Insektenzellen, induziert doppelsträngige RNA einer Länge von 38 bis 1662 bp in Säugetierzellen eine Interferonreaktion, in Folge derer es zur unspezifischen Hemmung aller Genprodukte kommt (UI-TEI et al., 2000, PADDISON et al., 2002). Der Einsatz solcher RNAs zur Identifizierung von Genfunktionen oder als RNA-basiertes Therapeutikum ist daher ungeeignet. Eine solche Interferonreaktion ist schon seit langem bekannt (HUNTER et al., 1975) und dient, wie die RNAi auch, der Abwehr von Viren und anderen beweglichen genetischen Elementen (MARCUS, 1983). Um diese zu umgehen, werden zu Zwecken der Genfunktionsanalyse in Säugetierzellen siRNAs verwendet.

Diese synthetischen 10 bis 23 bp langen dsRNA-Moleküle entsprechen den Produkten der Dicer-Reaktion und sind in der Lage, die Expression eines Gens Sequenz-spezifisch zu hemmen (ELBASHIR et al., 2001b). Aufgrund ihres geringen Molekulargewichts lassen sich siRNAs in der Zellkultur mit hoher Effizienz transfizieren. Ihre Wirkung ist jedoch zeitlich begrenzt, da sie durch die Zellteilung ausverdünnung und durch RNasen abgebaut werden können.

Um eine über einen längeren Zeitpunkt stabile Hemmung der Genexpression durch RNAi zu erreichen, werden sog. short hairpin RNAs (shRNAs) eingesetzt. Bei diesen shRNAs liegen *sense*- und *antisense*-Strang durch eine Haarnadelstruktur miteinander verbunden unter der Kontrolle eines Polymerase III-Promotors vor (BRUMMELKAMP et al., 2002). Die transkribierten RNA-Moleküle besitzen eine den siRNAs ähnliche Sekundärstruktur, die den Einbau in den RISC ermöglicht. Polymerase III-Promotoren, wie der Promotor der Phosphoglyceratkinase oder der Promotor der RNase P RNA H1 (HANNON et al., 1991), werden zur Expression der shRNAs verwendet, da sie die Transkription einstellen, sobald sie auf eine Folge von vier bis fünf Thyminen treffen (MYSLINSKI et al., 2001).

1.4 Impfstoffe

Einen weiteren Ansatz zur Minimierung des Risikos der PERV-Übertragung bei der Xenotransplantation stellt die Entwicklung eines Impfstoffes dar.

Dem Körper stehen verschiedene Schutzmechanismen zur Bekämpfung von Infektionen zur Verfügung. Neben der ersten Barriere, die von Haut und Schleimhäuten gebildet wird, stellt die angeborene Immunität einen unspezifischen Abwehrmechanismus dar, der über Neutrophile, das Komplementsystem, Cytokine und bakterizide Proteine vermittelt wird. Die adaptive Immunantwort wird erst durch den Erreger selbst induziert. T-Helfer-Zellen binden Antigene des Erregers und regen B-Zellen zur Produktion von Antikörpern an, oder aktivieren cytotoxische T-Zellen (CTL), welche infizierte Zellen erkennen und anschließend lysieren. Die adaptive Immunantwort schützt gleichzeitig auch vor Infektionen mit demselben Erreger zu einem späteren Zeitpunkt.

Durch einen Impfstoff wird die adaptive Immunantwort aktiviert, um einen Langzeitschutz gegen einen Erreger zu induzieren. Dabei beeinflusst die Art des Impfstoffes und dessen Applikation die hervorgerufene Immunantwort erheblich. Daher werden im Allgemeinen verschiedene Ansätze verfolgt:

Die klassische Immunisierung mit inaktivierten Viren, oder rekombinant hergestellten viralen Proteinen, induziert eine humorale Immunantwort, die vor einer Infektion schützen kann. Eine weitere Immunisierungsmöglichkeit bieten DNA-Impfstoffe. Dabei wird die entsprechende DNA-Sequenz in einem Vektorsystem appliziert (FYNNAN et al., 1995) und im Zellkern, jedoch distinkt vom Genom, abgelesen und exprimiert. Mit der DNA-Vakzinierung konnten bisher gute zelluläre und humorale Immunantworten erzielt werden.

1.4.1 Das Koala Retrovirus (KoRV) als potentielles Modellsystem für Impfstoffversuche in Ratten

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden zum ersten Mal Koalas (*Phascolarctos cinereus*) beschrieben, die eine hohe Anfälligkeit für schlecht therapierbare Infektionskrankheiten aufwiesen. Diese Symptomatik wurde als LLIS-Syndrom bezeichnet (*leukaemia, lymphoma and immune suppression*, MCKEE et al., 2005)). Hanger et al. gelang es 2000 in Überständen Mitogen-stimulierter Koala PBMCs Koala Retrovirus (KoRV) zu detektieren und zu beschreiben (HANGER et al., 2000). Sequenzvergleiche zeigten derart hohe Homologien zu dem exogenen Gibbon-Affen-Leukämie Virus (GaLV), dass eine erst kürzlich (in den letzten 200 Jahren) erfolgte Transspeziesübertragung angenommen wird. Da Gibbon-Affen und Koalas geographisch nicht in Kontakt stehen, werden als mögliche Überträger Nagetiere vermutet. Ein Indiz hierfür sind diverse GaLV-verwandte Sequenzen, die in verschiedenen asiatischen Maus- und Rattenarten detektiert werden konnten (MARTIN et al., 1999b).

KoRV wurde in einem Großteil der Koalas Australiens nachgewiesen (40% der Koala-Population im Süden und bis zu 100% im Norden). Das LLIS-Syndrom kann zu Neoplasien in Lymphgewebe, Leukämie, Osteochondromen und anderen Tumoren, sowie zu einer aplastische Anämie, Myelodysplasie und einer Dysfunktion des Immunsystems führen. Das Syndrom ist häufig mit einer Chlamydieninfektion assoziiert, die zu Sterilität führen kann. 71% der Todesfälle in Gefangenschaft lebender Koalas und 15% der Todesfälle freilebender Tiere werden auf LLIS zurück geführt (MCKEE et al., 2005). Bisher konnte noch kein Impfstoff gegen KoRV entwickelt werden.

Kürzlich wurde eine *in vivo*-Transspeziesübertragung von KoRV auf Wistar-Ratten beschrieben, die eine humorale Immunantwort auslöste und zur Induktion eines Tumors führte (FIEBIG et al., 2006). Wistar-Ratten stellen somit ein mögliches Tiermodell für KoRV-Infektionsversuche sowie zur Erprobung diverser Impfstoffansätze gegen KoRV dar.

1.4.2 Impfstoff gegen das virale Hüllprotein am Beispiel von FeLV

In der Veterinärmedizin spielt das feline Katzen Leukämievirus (FeLV) eine bedeutende Rolle, da eine Infektion von Hauskatzen mit FeLV oft letale Folgen hat. Es kommt zur Degeneration des hematopoetischen Systems (Anämie), Immundefizienz (AIDS) und zu Lympho- und Fibrosarkomen. In seltenen Fällen kann es auch eine Leukämie auslösen.

FelV-A ist ein exogen vorkommendes Virus, es gibt jedoch auch endogen vorkommende FelV Sequenzen, aus denen sich verschiedene infektiöse Rekombinanten, wie z.B. das FelV-B (STEWART et al., 1986) ableiten. Für FelV-A konnte erstmals ein gegen ein Retrovirus gerichteter, Impfstoff entwickelt werden (MARCIANI et al., 1991, Leucogen, Virbac AG, Schweiz), der den Ausbruch der Leukose bei Katzen verhindert, jedoch keine sterile Immunität vermittelt (HOFMANN-LEHMAN et al., 2006).

FelV bietet als Impfstoffmodell einen erfolversprechenden Ansatz: Das phylogenetisch mit PERV und KoRV verwandte FelV ist bisher das einzige Retrovirus gegen das kommerzielle Impfstoffe erhältlich sind. Insgesamt stehen sieben Impfstoffe zur Verfügung: drei basieren auf inaktivierten Viruspartikeln, zwei auf viralen gp70 Untereinheiten und zwei sind rekombinant hergestellte Vakzine (SPARKES et al., 1997). Das rekombinant hergestellte Leucogen (Leucogen, Virbac AG, Schweiz) weist eine hohe protektive Wirkung auf (JARRETT AND GANIÈRE, 1996). Dieser Impfstoff basiert auf dem in *Escherichia coli* hergestellten unglykosilierten FelV-p45 und einem zusätzlichen kurzen N-terminalen Teil des p15E (MARCIANI et al., 1991), der das Fusionspeptid beinhaltet und mit dem kürzlich identifizierten Epitop E1 (LANGHAMMER et al., 2005) endet.

Ein vergleichbares Epitop konnte auch für PERV identifiziert werden (FIEBIG et al., 2003). Des Weiteren konnten neutralisierende Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein (TM) von FelV induziert werden. In einem anschließenden Infektionsversuch wiesen drei von sechs Katzen einen Schutz von bisher zwei Jahren auf (LANGHAMMER et al., 2006b).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Xenotransplantation porziner Zellen, Gewebe und Organe eröffnet eine Möglichkeit, den weltweit herrschenden Mangel an geeigneten allogenen Transplantaten zu überbrücken. Neben der Lösung immunologischer und physiologischer Probleme hinsichtlich Akzeptanz und Funktionalität des Xenotransplantats im Rezipienten, ist dessen mikrobiologische Sicherheit eine Grundvoraussetzung. So muss das Risiko einer Übertragung porziner endogener Retroviren auf ein Minimum reduziert werden.

Diese sog. PERVs sind integrierter Bestandteil des porzinen Genoms und in der Lage humane Zellen *in vitro* zu infizieren. Diese zu den γ -Retroviren gehörenden Viren können nicht durch Haltung der Schweine unter *specific pathogen free* (spf)-Bedingungen eliminiert werden und auch die Entfernung der Viren durch *knock-out*-Verfahren wird als äußerst schwierig angesehen, da PERVS mit mehr als 50 Kopien an verschiedenen Loci des porzinen Genoms integriert sind.

Obwohl weder in Infektionsstudien noch in ersten experimentellen Xenotransplantationen eine PERV-Übertragung beobachtet wurde, besteht weiterhin das Risiko eines möglichen Infektionspotentials *in vivo*. In diesem Zusammenhang ist zu bedenken, dass die gemachten Fortschritte in der Behebung der immunologischen Transplantatabstoßung, wie eine verbesserte Immunsuppression oder die gentechnische Veränderung der Spendertiere hinsichtlich humaner Oberflächenmoleküle, andererseits das Risiko einer Übertragung von Mikroorganismen wie den endogenen Viren auf den humanen Rezipienten deutlich steigern könnten, da dadurch deren Schutz vor einer humanen Immunantwort erhöht wird.

Vor diesem Hintergrund war das Ziel der vorliegenden Arbeit einen Beitrag zu der Evaluierung der Virussicherheit sowie zur Prävention der Virusübertragung bei der Xenotransplantation zu leisten.

Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die PERV-Subtypen PERV-A und -C miteinander rekombinieren können und diese Rekombination mit einer Adaptation der Viren an humane Zellen sowie einer gesteigerten Virusreplikation einherging. Daher bestand ein Ansatz zur Risikominimierung in der Identifizierung geeigneter Schweine, die kein PERV-C in ihrem Genom tragen, um so einer solchen Rekombination vorzubeugen. Des Weiteren sollten zur Evaluierung einer möglichen Selektion von Schweinen mit geringer PERV-Expression und -freisetzung unterschiedliche Schweinerassen und -kreuzungen sowie transgene Schweine, die humane Oberflächenmoleküle tragen, hinsichtlich Unterschieden in PERV-Expression und -freisetzung untersucht werden.

Darüber hinaus konnte für murine und feline γ -Retroviren bereits eine Partizipation an der Entstehung von Tumoren beschrieben werden. Bei humanen Melanomen wurden erhöhte Expressionsniveaus humaner endogene Retroviren (HERV-K) beobachtet. Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Untersuchung der PERV-Expression in porzinen Melanomen, um ein eventuelles karzinogenes Potential dieser Viren hinsichtlich einer Tumorinduktion zu evaluieren.

In Anbetracht der besonderen Situation bei einer Xenotransplantation, der Exposition porziner Organe im immunsupprimierten Organismus über mehrere Jahre, ist das Risiko einer PERV-Übertragung auf den Rezipienten nicht auszuschließen. Daher war ein Hauptziel dieser Arbeit, die Entwicklung von Strategien zur Prävention der PERV-Übertragung. Hierbei sollten basierend auf dem Mechanismus der RNA-Interferenz transgene Schweine mit stark verminderter PERV-Expression erzeugt werden, die zu mikrobiologisch sicheren Xenotransplantaten beitragen könnten.

Weiterhin sollte im Rahmen dieser Arbeit die Entwicklung von Impfstoffstrategien zur Prävention der PERV-Übertragung angestrebt werden. Ein solcher Impfstoff könnte nach Klärung eventueller negativer Auswirkungen auf die Akzeptanz des Transplantats zur Impfung der Rezipienten eingesetzt werden.