

6 ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY

6.1 Zusammenfassung

Die Xenotransplantation porciner Zellen, Gewebe und Organe bietet eine Möglichkeit, den immensen Mangel an geeigneten allogenen Transplantaten zu überbrücken. Die Grundvoraussetzung ist hierbei neben der Lösung immunologischer und physiologischer Probleme hinsichtlich Akzeptanz und Funktionalität des Xenotransplantats im Rezipienten, die mikrobiologische Sicherheit.

Den zu den γ -Retroviren, von welchen viele in der Lage sind, Leukämien und Immundefizienzen auszulösen, gehörenden porcinen endogenen Retroviren wird dabei eine besondere Bedeutung beigemessen, da sie im Genom aller Schweine integriert sind und nicht wie die meisten anderen Pathogene durch SPF-Zucht eliminiert werden können. 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 porcinen Genoms integriert sind. Obwohl PERVs humane Zellen *in vitro* infizieren können, wurde weder in Infektionsstudien noch in ersten experimentellen Xenotransplantationen eine PERV-Übertragung beobachtet. In Anbetracht der besonderen Situation bei einer Xenotransplantation, der Exposition porciner Zellen und Organe im immunsupprimierten Organismus über mehrere Jahre, ist das Risiko einer PERV-Übertragung auf den Rezipienten nicht auszuschließen.

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

Nachdem im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die PERV-Expression in unterschiedlichen Schweinerassen, innerhalb eines Wurfs derselben Rasse sowie gewebsspezifisch variiert und die Selektion geeigneter Schweine mit einer stabilen und geringen PERV-Expression somit schwierig ist, wurden weitere Strategien zur Prävention der PERV-Übertragung entwickelt.

Basierend auf dem Mechanismus der RNA-Interferenz wurden shRNA-transgene Schweine mit um 95% verminderter PERV-Expression generiert, die in Zukunft zu mikrobiologisch sicheren Xenotransplantaten beitragen könnten.

Weiterhin erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Entwicklung von Impfstoffstrategien zur Prävention der PERV-Übertragung. Auf Basis des viralen Hüllproteins konnten in zwei Spezies (Ratten und Ziegen) neutralisierende Antikörper gegen PERV sowie das phylogenetisch eng verwandte Koala Retrovirus (KoRV) induziert werden, die in der Lage waren eine PERV- bzw. KoRV-Infektion *in vitro* zu 100% zu neutralisieren. Ein solcher Impfstoff könnte nach Klärung eventueller negativer Auswirkungen auf die Akzeptanz des Transplantats zur Impfung der Rezipienten eingesetzt werden.

Weiterhin konnten im Rahmen dieser Arbeit erste Hinweise auf eine erhöhte PERV-Expression in porcinen Melanomen gewonnen werden. Diese Beobachtung demonstriert die große Bedeutung der bisher unternommenen Anstrengungen geeignete Strategien zur Prävention der PERV-Übertragung zu entwickeln.

6.2 Summary

Xenotransplantation of porcine cells, tissues and organs may offer a solution to the severe shortage of suitable allografts. In addition to overcoming immunological rejection and problems with the physiological functionality of the xenograft, a basic requirement for xenotransplantation is to ensure microbiological safety.

Porcine endogenous retroviruses that belong to the family of γ -retroviruses of which many members are able to induce leukemias and immunodeficiencies are of particular importance. They are an integrated part of the porcine genome and cannot be eliminated by selective breeding under SPF conditions, as is the case for most other pathogens. Eliminating these viruses may prove difficult due to the fact that over 50 PERV copies are integrated into the porcine genome at different loci.

Although PERVs are able to infect human cells *in vitro*, PERV transmission has not been observed during infectivity studies or following the first experimental xenotransplantations. However, given the special situation during xenotransplantation, i.e. the presence of porcine cells and organs within an immunosuppressed host over a period of several years, the risk of a PERV transmission cannot be excluded.

Against this background, the aim of this dissertation was to contribute to the evaluation of safety as well as to the prevention of virus transmission during xenotransplantation.

The demonstration of variable PERV expression in different breeds of pig, in litters of the same race and even in different tissues of individual animals, indicates that selection of pigs with a low and stable level of PERV expression may prove difficult. Additional strategies for preventing PERV transmission were therefore developed.

Based on the mechanism of RNA interference, shRNA transgenic pigs demonstrating a drastically (95%) reduction of PERV expression were generated. Such animals could provide a source of virologically safe xenografts in the future.

In addition, as part of this work, vaccine strategies to prevent PERV transmission were addressed. Antibodies able to fully neutralize both PERV and the phylogenetically related koala retrovirus (KoRV) *in vitro* were induced in two species using an immunogen based on the viral envelope protein. After resolving the negative consequences on xenograft acceptance that potentially might occur, such a vaccine could be used to pre-vaccinate xenograft recipients.

Finally, this work provides the first evidence of elevated PERV expression in porcine melanomas, again demonstrating the importance of developing appropriate measures to prevent PERV transmission to humans.