

8 Infektionsgefahren und ihre Einschätzbarkeit

8.1

Begriff der Xenozoonose

Die größte Herausforderung für die erfolgreiche Einführung der Xenotransplantation in die Humanmedizin ist die Identifizierung, Abschätzung und Verminderung der mit dieser Technik verbundenen Risiken.

Die konventionelle, auch als *Allotransplantation* bezeichnete Organverpflanzung ist schon immer mit dem Risiko einer Infektionsübertragung vom Spender auf den Rezipienten verbunden gewesen. Obwohl die Untersuchung des Transplantats auf eine große Anzahl von Krankheitserregern möglich ist, bleibt ein Restrisiko für den Patienten bestehen. Auch heute werden noch bekannte wie unidentifizierte Erreger auf diesem Weg übertragen.

Es gibt eine Reihe von Umständen, die dazu beitragen, dass ein Restrisiko bei der Allogtransplantation bestehen bleibt. Einer dieser Umstände ist die Geschwindigkeit, mit der eine Organverpflanzung erfolgen muss; oft von Spendern, die erst unmittelbar vorher diesen Status erhielten und daher noch nicht vollständig untersucht werden konnten. Ein weiterer Umstand ist die bei einer Allogtransplantation notwendige Immunsuppression, die es einer Infektion erleichtert, sich zu manifestieren.

Viele Probleme dieser Art werden mit der Einführung der Xenotransplantation gelöst sein. Standardisierte und untersuchte Organe oder Gewebe vom Tier werden auf Lager sein. Jedoch könnte sich das Problem der Xenozoonosis einstellen. Dieses Problem würde dann, im Gegensatz zum Infektionsrisiko bei der Allogtransplantation, das nur den Rezipienten betrifft, darüber hinaus auch das soziale Umfeld des Patienten gefährden. Gerade diese Potenzierung des Infektionsrisikos ist der Grund, weshalb die mit der Xenotransplantation verbundenen Risiken intensiv diskutiert werden.

Xenozoonosis kann als eine Infektion mit Pathogenen die von einer anderen vertebrierten Spezies stammen und über die Xenotransplantation eingebracht wurden, definiert werden. Bekannte nicht-virale Schweinepathogene, die den Menschen infizieren können, sind z.B. *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Trichinella spiralis*, *Balantidium coli*, *Aspergillus fumigatus*, *Ascaris suum*; *Salmonella*, *Streptococcus suis*, *Campylobacter coli*, *Mycobacterium avium*, *Leptospira interrogans*, *Brucella suis*, *Listeria* und *Erysipelothrix rhusiopathiae*. In Hinblick auf die Risikobewertung der Xenotransplantation sind nur Viren als Pathogene von ausschlaggebender Bedeutung und werden daher im vorliegenden

Text behandelt. Alle anderen Quellentier-Pathogene können durch Testverfahren erfasst und anschließend eliminiert werden. Selbst die meisten der bekannten Viren können durch SPF (*Specific Pathogen Free*, siehe Kap 5.4) Zuchtbedingungen aus dem Quellentier beseitigt werden. Ein hohes Infektionsrisiko könnten jedoch einige der bekannten Viren - speziell jene, die in der infizierten Zelle persistieren und keine unmittelbare Pathogenität verursachen - sowie eine nicht erfassbare Anzahl unbekannter Viren bilden.

Das Problem der Virusinfektion wird insbesondere durch die mit der Transplantation einhergehenden Maßnahmen zur Reduktion von körpereigenen Abwehr- (d.h. Abstoßungs-) reaktionen signifikant erhöht (siehe Kap. 6). Denn genau diese Immunreaktionen sind die Hauptschutzmechanismen des Körpers gegen Infektionen.

8.2

Die Virolyse - ein Hauptabwehrsystem gegen behüllte Viren, die von Nicht-Primaten stammen

Viren sind obligate intrazelluläre Parasiten, da sie keine proteinproduzierenden Strukturen und keinen energiegenerierenden Mechanismus besitzen. Am besten kann man sie sich als eine Computerdiskette vorstellen. Sie speichern zwar alle Informationen, können sie aber nicht zum Ausdruck bringen. Nur in Verbindung mit einem Computer (Wirtszelle) kann diese gespeicherte Information abgelesen und umgesetzt werden.

Die Information, die in dieser Computerdiskette gespeichert ist, hat immer eine von zwei möglichen Formen, RNA¹ oder DNA². Dies könnte zum Beispiel verglichen werden mit den MS-DOS- und MacIntosh-Formaten, welche sich stark unterscheiden, aber ohne weiteres von einem ins andere konvertiert werden können, so dass der Informationsgehalt immer gleich bleibt.

Um diese RNA- oder DNA-Information besteht eine Schutzhülle aus Protein, ähnlich dem Plastikgehäuse einer Computerdiskette. In der Welt der Viren gibt es zwei Arten von Schutzhüllen: einfache und doppelte. Eine einfache Verpackung haben die nicht-behüllten Viren. Diese Viren sind zu vergleichen mit einer einfachen Diskette, stabil und resistent. Eine doppelte Verpackung haben die behüllten Viren. Diese Verpackung ist mit einer Diskette, die in einer Diskettenbox steckt, zu vergleichen. Die Diskettenbox ist relativ instabil und leicht zerstörbar. Behüllte Viren sind labil und leicht zerstörbar.

Die Außenhülle solcher behüllter Viren (also die Diskettenboxstruktur) stammt von der Wirtszelle, von der das Virus produziert wurde (entspricht dem erstellten Computer). Es ist eine Lipidmembran (Abb. 8.1).

¹ Ribonucleinsäure

² Desoxyribonucleinsäure

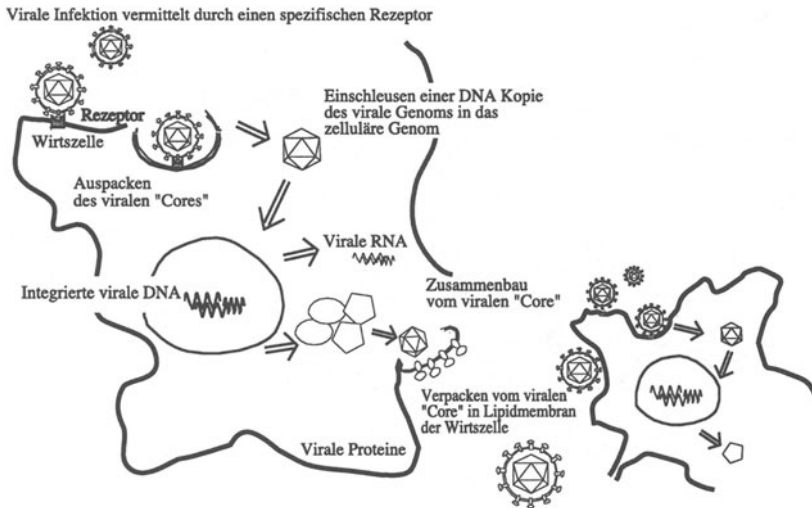


Abb. 8.1 Produktion von behüllten Retroviren

Da Viren mangels Synthesestrukturen keine alleinstehende Replikation betreiben können, sind sie obligat auf lebende syntheseaktive Zellen angewiesen. Dies bedeutet, dass sie in die empfängliche Zelle eindringen und deren Synthesemechanismen zur Replikation ausnützen müssen. Da ein Virus nur „leben“ kann, wenn es genügend Unterstützung von einer lebenden Zelle bekommt und dies der Zelle schaden kann, muss es früher oder später in eine neue Zelle „umziehen“.

Behüllte und nicht-behüllte Viren zeigen Unterschiede bei der Freisetzung. Die unbehüllten Viren warten, bis der Zelltod eintritt, um sich zu befreien, oder sie töten die Zelle mittels „*death-proteins*“.

Die behüllten Viren nehmen ihre Hülle von einer Zellmembran. Sollte dies eine interne Membran sein, z.B. die Kernmembran, sind die Viren für ihre Freisetzung entweder auf die Zellyse angewiesen, oder sie werden mit Hilfe des *Sekretorischen Weges* aus der Zelle ausgeschleust. Behüllte Viren, die ihre Hülle von der Plasmamembran erhalten, knospen aus der Zelle.

Zellen nicht-primaten Ursprungs (z. B. vom Schwein) exprimieren unter anderem Proteine, die mit dem terminalen Zuckerrest der Galaktose α (1-3)-Galaktose (α -gal) modifiziert sind, auf ihrer Zelloberfläche (siehe Kap. 6) - daher tragen behüllte Viren, die aus nicht-primaten Zellen entstehen, ebenfalls solche terminalen α -gal Zuckerreste auf ihren Hüllen (Abb. 8.2).

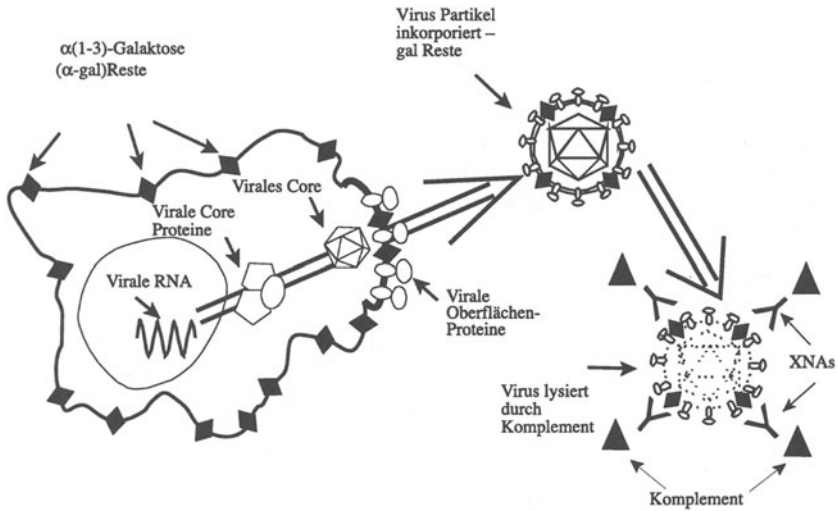


Abb. 8.2 Einbau von α (1-3) Galaktose Zuckerreste in behüllte Viren, die aus einer Nicht-Primatenzelle stammen

Der Mensch bildet als Abwehr gegen bestimmte Darmbakterien eine Reihe von Antikörpern. Eine bakterielle Komponente, gegen die Antikörper gebildet werden, ist die Galaktose α (1-3)-Galaktose (α -gal). Daher besitzt jeder Mensch präformierte anti- α -gal-Antikörper (siehe Kap. 6.2.2).

Der Hauptabwehrmechanismus gegen Infektion mit artfremden behüllten Viren nicht-primaten Ursprungs, die Virolyse, liegt darin, dass es im Menschen Antikörper gibt, die gegen Virus-Oberflächen-Proteine reagieren. Einer davon ist ein gegen Darmbakterien gerichteter anti- α -gal-Antikörper, der auch an α -gal-Epitope, die sich auf der Oberfläche solcher behüllter Viren befinden, binden kann (siehe Kap. 6.2.2). Durch deren Bindung wird auch das Komplementsystem aktiviert und dies führt zur Virolyse (Abb. 8.2, Takeuchi et al. 1996).

8.3 Unterbindung der Virolyse

Um die Aktivierung der Komplementlyse zu verhindern, die zu einer hyperakuten Abstoßreaktion gegen xenotransplantiertes Material führen würde, werden mehrere Strategien in Erwägung gezogen (siehe Kap. 6.2.2). Durch diese Ausschaltung des Komplementsystems wird jedoch auch gleichzeitig die durch die Virolyse vermittelte Eliminierung behüllter Viren verhindert, die durch xenotransplantierte Zellen in Xenotransplantat-Empfängern entstehen könnten.

8.3.1

Beseitigung zirkulierender, natürlicher, gegen das Xenotransplantat gerichteter reaktiver Antikörper (XNAs)

Zirkulierende XNAs können mit Hilfe der Immunoapheresis aus dem Körper eines Xenotransplantat-Empfängers beseitigt werden. Diese Eliminierung kann durch die Verwendung sogenannter ‚therapsorb‘ Säulen, die unspezifisch funktionieren, oder durch Säulen, die spezifisch α -gal binden (Lin et al. 1998), erreicht werden. Zusätzlich jedoch reduziert die Eliminierung xenogener Antikörper auch die Wahrscheinlichkeit der Virolyse, da ja genau die diese Reaktion auslösenden Antikörper beseitigt werden.

8.3.2

Komplementinhibition

In *ex vivo* Perfusionsexperimenten mit Humanblut konnte gezeigt werden, dass lösliche gegen C5 gerichtete Komplementinhibitoren Schweineorgane vor der hyperakuten Abstoßungsreaktion schützen konnten. Wenn zwei monoklonale Antikörper kombiniert verabreicht werden, kann sogar die hämolytische Aktivität völlig unterbunden werden. Lösliche Komplementinhibitoren dieser Art verhindern jedoch auch die virolytische Komplementreaktion und bieten so behüllten Viren von Nicht-Primaten die Möglichkeit, der Immunabwehr zu entgehen.

8.3.3

Expression von Komplementregulationsproteinen

Viele Arbeitsgruppen bevorzugen den Ansatz, Komplementregulationsproteine zu exprimieren. Verschiedene Regulationsproteine sind bekannt, einschließlich: *Decay Accelerating Faktor* (DAF), *Membrane Co-Faktor* (MCP or CD46), Faktor H und CD59. Das MCP-Gen enthält 14 Exons und umfasst 85kb. Dieses Gen wird differenziell gespleißt und kann so zur Synthese verschiedener isoformer Proteine führen. Obwohl das MCP-Gen des Schweines einige Homologien zu dem des Menschen aufweist, kann es doch nicht humanes Komplement regulieren. Transgene Schweine, die das humane MCP-Gen exprimieren, haben auch ein Spleißmuster, das dem des Menschen sehr ähnlich ist. Insbesondere exprimieren diese Schweine MCP-Protein in Leber, weißen Blutzellen, Niere und Herz. Es konnte bereits gezeigt werden, dass diese MCP transgenen Herzen die hyperakute Abstoßreaktion überleben, wenn sie in immunsupprimierte Affen xenotransplantiert werden (Lin et al. 199, Diamond et al. 1996). Ein ähnlicher Ansatz, bei dem die funktionellen Domänen des CD59 und DAF oder des Faktor H und CD59 co-exprimiert wurden, resultierte in der Verhinderung der Ablage von aktivem C3 und somit in der Verhinderung der Bildung des *Membrane Attack Complex* (Kroschus et al. 1996, Norin et al. 1996, McKenzie et al. 1996).

Im Fall der Überexpression von Komplement-Regulatoren (CD55, DAF, CD46 MCP1, CD59 Protein) in den Quellentieren, die für die Xenotransplantation vorgesehen sind, muss man davon ausgehen, dass die regulatorischen CD-Proteine

auf Zelloberflächen exprimiert werden und dadurch sowohl die komplementvermittelte Lyse der Zellen des xenotransplantierten Organs als auch die Virolyse verhindern. Die auf der Oberfläche exprimierten CD-Proteine werden als Bestandteil der Virushülle inkorporiert und weiten so ihre immunschützende Wirkung unerwünschterweise auch auf die Viren aus (Abb. 8.3).

Der Weg der Überexpression von Komplementregulatoren wie CD59, CD55 oder CD46 ist deshalb besonders gefährlich, weil nicht nur die über α -gal vermittelte Komplementlyse ausgeschaltet wird, sondern die Viren vor jeglicher antikörpervermittelter Komplementlyse geschützt wären (Rother et al. 1995, Breun et al. 1999). Das heißt, sollte ein Patient gegen ein bestimmtes Virus schon Antikörper besitzen, könnten diese Antikörper zumindest nicht über die Komplementaktivierung eine Virolyse hervorrufen.

Alle diese Studien legen nahe, dass die Expression eines oder mehrerer Komplementregulationsfaktoren ein effektiver Ansatz für den Schutz von Xenotransplantaten vor hyperakuter Abstoßung ist. Jedoch sind DAF und andere Komplementregulatoren wie MCP nicht gleichförmig auf die Zellen verteilt, und es ist bisher nicht eindeutig geklärt, ob diese lokalisierte Expressierung der Regulationsfaktoren zum Schutze des Transplantates ausreicht. Sollte eine Komplementaktivierung an den Oberflächen erfolgen, die keinen Komplementregulationsfaktor

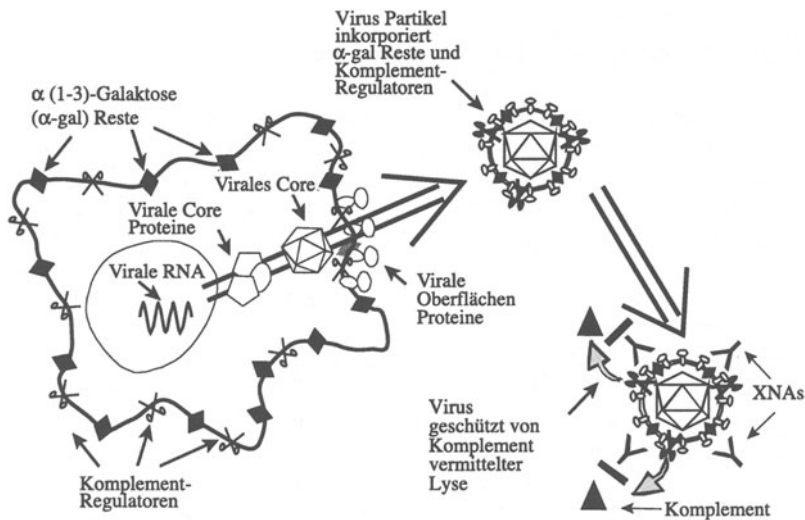


Abb. 8.3 Immunschützende Wirkung von Oberflächen-exprimierten Komplement-Regulatoren auf die Virolyse

exprimieren, dann wäre ein völliger Schutz von Xenotransplantaten durch die Expression eines Komplement-Regulators vielleicht nie möglich. Jedoch könnte die Wahrscheinlichkeit durch folgende Maßnahmen erhöht werden:

- (i) simultane Expression mehrerer Komplementregulatoren
- (ii) gleichzeitige Verwendung löslicher Komplementinhibitoren
- (iii) selektive Reduktion von Komplement durch Substanzen wie *Cobra Venom Faktor*.

8.3.4 Selektive Reduktion von Komplement

Im Komplementsystem hat C3 eine zentrale Funktion (siehe Kap. 6.2.2). Im Zuge der Komplementaktivierung wird aus C3 C3b, C3bB und anschließend C3bBb gebildet. Der Zyklus wird vervollständigt durch den von DAF und Faktor H regulierten Zerfall von C3bB und C3bBb zu C3b. Ohne dieses Recycling würde die kontinuierliche Synthese von C3bBb den Vorrat an C3 aufbrauchen und so das Komplementsystem zum Erliegen bringen. *Cobra Venom Faktor* (CVF) kann C3 als Substrat für C3bBb ersetzen, wird aber nicht wiederverwertet. Dies führt zu einer signifikanten Reduktion im Komplement. Diese Funktion des CVF könnte dem Medikament eine vielversprechende Rolle in der Unterdrückung der Komplementreaktion in Empfängern von Xenotransplantaten zuweisen. Leider ruft CVF starke Nebeneffekte hervor. Die Firma Imutran hat daher eine C3-Mutante produziert, die denselben reduzierenden Effekt auf das Komplementsystem wie CVF hat, ohne jedoch so schwere Nebenerscheinungen zu verursachen. Dieses mutierte C3-Molekül wurde Lysinon genannt (Fecke et al. 1998).

Obwohl dieser Ansatz vielversprechend für die Akzeptanz des Xenotransplantats ist, so muss doch wiederum darauf hingewiesen werden, dass jede selektive Reduktion des Komplements nicht nur das Xenotransplantat schützt, sondern auch - wie bei der Immunoadsorption - behüllte Viren von Nicht-Primaten und andere Infektionserreger.

8.3.5 Inhibition der α -gal Modifizierung

Schließlich kann die hyperaktive Abstoßreaktion auch durch Reduktion oder völlige Eliminierung der Expression von α -(1-3)-Galaktosyltransferase in den Organquellen verhindert werden. Das Unterdrücken der α -(1-3)-Galaktosyltransferase-Aktivität würde dazu führen, dass die Quellentiere keine α -gal Zuckerreste mehr auf der Organoberfläche exprimieren. Das Fehlen dieser Reste würde dann verhindern, dass die im Menschen natürlich vorhandenen Antikörper gegen α -gal die Zellyse verursachen.

Die kompetitive Inhibition der α -gal Modifizierung kann durch die Verwendung eines anderen Enzyms, wie z.B. der H-Transferase (HT), erreicht werden. HT konkurriert mit α -(1-3)-Galaktosyltransferase um α -gal Substrat. Erste Studien unter Verwendung von 3 verschiedenen transgenen Mäusestämmen (1. Ex-

pression von CD59 und HT, 2. Expression von HT und *knock-out* des α -gal, 3. Expression von CD59, HT und *knock-out* des α -gal) zeigten, dass alle 3 Versuchsansätze gleich gut gegen Komplement schützen (Kroshus et al. 1996, Norin et al. 1996, McKenzie et al. 1996). Basierend auf diesen vielversprechenden Ergebnissen wurden bereits transgene Schweine hergestellt, die HT sowie Faktor H und CD59 als chimärisches Konstrukt exprimieren.

Obwohl dies sicherlich eine elegante Methode ist, um die hyperakute Abstoßreaktion auszuschalten, so wird wiederum gleichzeitig eines der wichtigsten Virus-Abwehrsysteme, die Virolyse, verhindert, da aus dem Xenotransplantat stammende Viren keine oder reduzierte α -gal Modifizierungen tragen.

8.4

Überwinden der physikalischen Barrieren gegen Virusinfektion infolge eines die Artgrenzen überschreitenden Zell-, Gewebe- oder Organtransfers

Die Hauptbarriere gegenüber Virusinfektionen ist physikalisch. Um die Zielzellen zu erreichen, müssen Viren diese Barriere überwinden, ohne ihre Infektionsgefahr dabei zu verlieren. Im Falle der behüllten Viren ist das Risiko des Austrocknens, das zum Verlust der Infektionsfähigkeit führt, akut. Im Vergleich dazu sind die nicht behüllten Viren meistens stabil und können auch längere Zeit unter schweren Bedingungen überleben.

Normalerweise können Viren physikalische Barrieren im Menschen nur nach Verletzungen oder durch Benützung von aktiven Schleusstrukturen überwinden (Abb. 8.4).

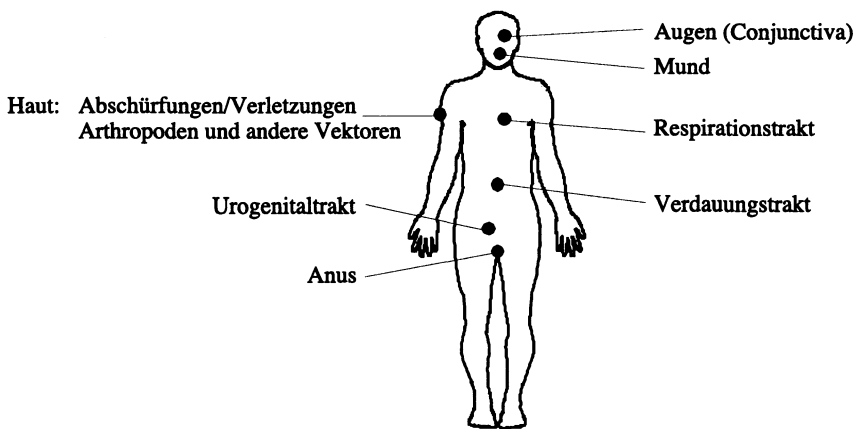


Abb. 8.4 Schematische Darstellung möglicher Eintrittspforten für Viren

Dies bildet einen effektiven Abwehrmechanismus gegenüber den meisten viralen Infektionen. Bei der Xenotransplantation wird die Barriere jedoch umgangen und Viren gelangen in die unmittelbare Nähe der Zielzellen. Auch das Austrocknen und der damit einhergehende Verlust der Infektionsgefahr behüllter Viren wird durch die Xenotransplantation und das Baden des Xenotransplantats im Blut des Empfängers außer Kraft gesetzt.

8.5 Konsequenzen der Unterbindung der Virolyse und der Umgehung von physikalischen Barrieren

Wie bereits erwähnt, kann die Kombination von SPF-Bedingungen und rigorosen Tests sicherstellen, dass die meisten bekannten Viren vor der Xenotransplantation eliminiert werden (siehe Abschnitt 8.12). In diesem Fall würde das Fehlen eines effizienten virolytischen Systems zwar den Verlust eines wertvollen *backup* Systems bedeuten, würde aber keine unmittelbaren Konsequenzen zur Folge haben. Dasselbe würde für die Umgehung der physikalischen Schutzbarrieren im Zuge einer Xenotransplantation gelten. Allerdings gibt es drei andere Umstände, in denen das Fehlen dieser zwei natürlichen Schutzmechanismen schwerwiegendere Folgen hätte. Die ersten beiden Umstände sind gegeben durch Viren, die (1) ihre genetische Information in das Wirtszellengenom integrieren oder (2) dieses episoral erhalten, ohne die Zelle obligatorisch zu lysieren. Der dritte Umstand bezieht sich auf unbekannte Viren oder auf solche, die durch bestehende Testverfahren nicht erfasst werden. Insbesondere unbekannte Viren, die nicht unmittelbar zur Krankheit führen, im Körper jedoch überleben, stellen ein erhebliches Risiko bei der Xenotransplantation dar.

8.6 Persistente Viren

Als persistente Infektion bezeichnet man den Zustand, bei dem das Virus, anstatt vom Immunsystem beseitigt zu werden, in spezifischen Zellen des Körpers überlebt. Das Immunsystem und die von ihm betriebene „Immunüberwachung“ ist für die Persistenz vieler Viren sogar verantwortlich, z.B. sind Infektionen mit Herpesviren, Cytomegalovirus (CMV) oder Epstein-Barr-Virus (EBV) inapparent, bis die Immunüberwachung durch Immunsuppression oder während einer anderen viralen Erkrankung (z.B. AIDS) außer Kraft gesetzt wird. Danach brechen die mit solchen persistenten Viren assoziierten Erkrankungen voll aus.

Diese Persistenz kann auch durch Infektionen verursacht werden, bei denen das Virus zwischen zwei Runden der Erkrankung nicht nachweisbar ist. Bestes Beispiel für diesen Typ stellen Infektionen mit dem Herpes simplex Virus dar (Fields et al. 1996). Eine andere Form der Persistenz existiert bei dem Tollwut verursachenden Virus. Hier beginnt der Krankheitsverlauf mit einer sehr langsamen Infektion, da das Virus an der Infektionswunde beträchtliche Zeit benötigt,

bevor die generelle Replikation voll anläuft (Fields et al. 1996). Andere persistente Viren zeichnen sich durch eine langsame Infektion und durch einen sich kontinuierlich verschlechternden Krankheitsverlauf aus. Dieser Umstand kann sowohl beim AIDS-Verursacher HIV und den tierischen Varianten dieses Virus (SIV, FIV, etc.) als auch bei anderen tierischen Retroviren wie *Equine Infectious Anemia* (Maury 1998) und Visna (Pepin et al. 1998) beobachtet werden. Nicht-retrovirale Erreger, wie z.B. das menschliche Morbillivirus Masern, können ebenfalls persistente Infektionen wie *Subacute Sclerosing Panencephalitis* (Liebert 1997) hervorrufen.

Es besteht die Möglichkeit, dass die Übertragung eines solchen persistenten Virustyps auf eine andere Spezies, wie z.B. im Zuge einer Xenotransplantation, den Krankheitsverlauf verändert. Jedoch kann dies ohne Veränderung der langen Inkubationszeit erfolgen, womit weiterhin das Problem einer fruhlen Diagnose bestehen bleibt.

Chronische Infektionen liegen dann vor, wenn ein Gleichgewicht zwischen Virus- und Zellvermehrung herrscht. Dieses Gleichgewicht kann sich einstellen, wenn entweder Virusvermehrung und Zellerstorung genauso schnell wie die Zellvermehrung erfolgen, oder wenn Virus- und Zellvermehrung mit gleicher Rate erfolgen und keine Zellyse durch das Virus verursacht wird. Dieses Gleichgewicht zwischen Virus- und Zellvermehrung kann sicherlich bei der Übertragung auf neue Wirte gestört werden, wie es auch mit dem Pathogenitätsprofil bis zum Zelltod geschehen kann. Wie bereits erwähnt, können solche Veränderungen sich jedoch auch schleichend einstellen und erst nach einiger Zeit bemerkbar werden.

Viele der persistenten Viren können durch Modulation des Wirtsimmunsystems der Vernichtung durch dieses ansonsten effiziente System entkommen. So können zum Beispiel Masernviren die Expression von Antigenen, die vom Immunsystem erkannt werden, während der subakuten sklerotischen Panencephalitis begrenzen. HIV zeichnet sich durch eine enorme Variation in solchen Antigenen aus. Das CMV und die Adenoviren erreichen, dass weniger MHC II-Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert werden und so das Immunsystem an Effizienz verliert. CMV reduziert zusätzlich die Produktion von Molekülen, die der Lymphozytenadhasion (ICAM-1, LFA-1) oder der Co-Stimulation (B7) dienen. Eine weitere Strategie wird von HIV, EBV und von Pockenviren verfolgt. Dabei wird die Synthese von Cytokinen modifiziert. Letztlich haben eine ganze Reihe von Viren (z.B. Influenza) verschiedene Methoden entwickelt, um die körpereigene Herstellung des klassischen antiviralen Stoffes Interferon zu vermindern. Bisher ist es nicht klar, ob diese Strategien auch dann noch funktionieren, wenn das Virus auf eine andere Spezies übertragen wurde.

8.6.1 Retrovirale Pathogenität

Retroviren (Coffin et al. 1997) enthalten ein RNA Genom, das nach der Zellinfektion in doppelsträngige DNA transkribiert wird. Diese dsDNA erlaubt anschließend die Integration des Virusgenoms in das Wirtszellengenom. In diesem integrierten Zustand wird das Virus als Provirus bezeichnet. Obwohl es einige

Stellen mit Präferenz für die provirale Integration in das Wirtsgenom gibt - solche nämlich, die aktiv transkribiert werden -, findet im allgemeinen diese Integration an zufällig gewählten Stellen statt. Wie jedes andere Wirtsgen wird das provirale Genom transkribiert und die resultierende viruspezifische RNA zur Synthese von Virusprotein und neuer genomischer RNA benutzt, die anschließend zu neuen Virionen vereinigt werden. Während der Lebensdauer der Zelle formt das integrierte Provirus einen stabilen Teil des Wirtszellgenoms und wird dementsprechend an alle Tochterzellen dieser infizierten Mutterzelle weitergegeben. Die stabile Vererbung ist ein deutlicher Unterschied zu anderen Viren, wie z.B. Adenoviren oder Poxviren, die nicht in das Wirtsgenom integrieren und die infizierte Zellen töten. Sollte ein Retrovirus eine Keimbahnzelle infizieren und integrieren, so wird er Teil der genetischen Information des Nachkommens und wird als *endogenes Provirus* bezeichnet. In diesem Falle würde das Fortbestehen der genetischen Information des Virus nicht nur auf das infizierte Individuum beschränkt bleiben, sondern es würde in jeder Nachfolgeneration erhalten bleiben.

In dieser Hinsicht gibt es zwei wichtige Eigenschaften der Retroviren. Erstens ist das Provirus immer als co-lineare DNA vorhanden, die die Struktur *LTR-Retrovirale Gene-LTR* aufweist (Abb. 8.5). Die co-lineare Struktur der retroviralen Proviren steht in scharfem Gegensatz zu Infektionen mit anderen Viren, bei denen die transferierte DNA in permutierter Form vorliegt. Zweitens stellt die integrierte provirale DNA eine permanente Quelle für neue Viren mit potentiell pathogenen Eigenschaften dar.

Bei Tieren werden Infektionen mit Retroviren oft im Zusammenhang mit Tumorinduktion, speziell Leukämie, gebracht. Retroviral hervorgerufene Tumorinduktion ist das Ergebnis mehrfacher Integrationsereignisse, die schließlich auch zu einer Integration in oder neben Gene, die an der Wachstumskontrolle beteiligt sind (Proto-Onkogene oder Tumor-Suppressoren, Abb. 8.5), führen. Dieser Vorgang, der als Insertionsmutation bezeichnet wird, verursacht die abnormale Funktion dieser Regulationsgene.

Da die Retrovirus-DNA (Provirus) bevorzugt an eine zufällige Stelle in das Wirtszellgenom eingebaut wird, sind folgende Szenarien möglich:

1. Einbau in einen nicht exprimierten Locus führt zu keinem Effekt.
2. Einbau in einen exprimierten Locus mit dem Resultat, dass das normale Genprodukt nicht mehr produziert werden kann. Dies könnte zum Zelltod führen (normalerweise ohne Bedeutung, da nur eine Zelle zerstört wird). Meistens hat so eine retrovirale Integration keine schwerwiegenden Folgen.
3. Einbau in ein Tumor-Suppressorgen (ein Gen, dessen Expression das überschüssige Wachstum der Zelle unterdrückt). Dadurch wird das Gen ausgeschaltet und es kommt zu einer Tumorentwicklung.
4. Einbau in unmittelbarer Nähe eines Genlocus. Durch Einfluss des starken viralen Regulationsmechanismus wird das normale Genprodukt, das dieser Locus kodiert, überexprimiert oder zum falschen Zeitpunkt exprimiert: Dies hat normalerweise keinen größeren Effekt (da nur eine Zelle betroffen ist).
5. Einbau in unmittelbarer Nähe eines Onkogens. Durch Einfluß des starken viralen Regulationsmechanismus wird das Onkogen überexprimiert oder zum falschen Zeitpunkt exprimiert: Dies führt zur Tumorentwicklung.

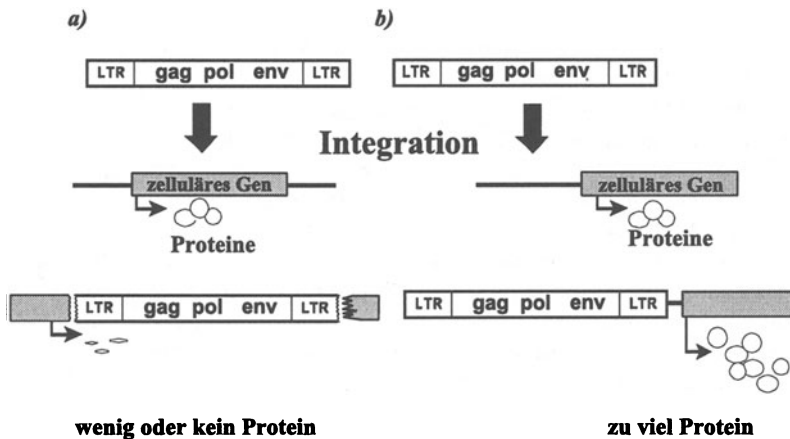


Abb. 8.5 Insertionsmutation durch Integration von Retroviren in (a) oder neben (b) zelluläre Gene, die an der Wachstumskontrolle beteiligt sind.

Da die Wahrscheinlichkeit einer einzelnen zufälligen Integration eines Retrovirus in ein oder in der Nähe eines Tumorsuppressor- oder Onkogens extrem gering ist, sind mehrere aufeinanderfolgende Integrationsereignisse nötig, damit ein derartiger Fall überhaupt biologische Signifikanz erlangen kann. Für diese wiederholte Integration ist es erforderlich, dass das Retrovirus in der Lage ist, sich mehrmals zu replizieren, also einmal zu integrieren, neue Viruspartikel zu produzieren, neue Zellen zu infizieren, erneut zu integrieren, wiederum neue Viruspartikel zu produzieren und so weiter.

Andere Erkrankungen, die im Zusammenhang mit Retroviren stehen, sind Immundefizienzen und Erkrankungen des Nervensystems (Coffin et al. 1997). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass viele Viren unabhängig von ihrem Wirt (Mensch, Schwein, Affe, Katze, Maus) eine gemeinsame Domäne im Gen für das virale Hüllprotein konserviert haben, und diese das Immunsystem des jeweiligen Wirts unterdrückt (Denner 1998). Dieser Effekt wird höchstwahrscheinlich durch die Modifikation der Cytokinherstellung erreicht (s.o.). Diese Art der Modifikation des Wirtsimmunsystems wurde für das p15 Protein des Mäuse Leukämie Virus bereits nachgewiesen (Haraguchi et al. 1995).

Es ist in der Vergangenheit bereits klar gezeigt worden, dass Retroviren die Wirtsart wechseln können. Es ist allgemein anerkannt, dass das *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV) vom Affen auf den Menschen übergesprungen ist und dort als *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) auftritt (Gao et al. 1994, Weiss, Wrangham 1999, Corbet et al. 2000). Da viele der Retroviren in Form von Proviren im Wirtsgenom integriert vorliegen und so über Generationen hinweg vererbt werden, kann eine Sequenzanalyse der jeweiligen DNA-Abschnitte klare Aussagen über die Verwandtheit dieser Proviren machen. Eine Untersuchung solcher

Art wurde auch für mit dem Mäuse Leukämie Virus verwandte endogene Retroviren durchgeführt. Diese phylogenetische Analyse ergab, dass Proviren eines bestimmten Wirts eng verwandt sind. Dies legt nahe, dass die horizontale Übertragung zwischen verschiedenen Wirten selten erfolgt. Jedoch wurden zwei Beispiele für Infektionen zwischen Arten gefunden. Das eine Beispiel betraf die Übertragung von Säugern auf Vögel mit einer anschließenden raschen Verbreitung in anderen Vogelarten. Das andere war die Übertragung des *Gibbon ape Leukemia Virus (GaLV)* auf Koalabären mit Nagetieren als wahrscheinlichem Zwischenwirt (Martin et al. 1999). Frühere Arbeiten spekulierten jedoch damit, dass dieses Virus ursprünglich von Mäusen auf Affen übersprungen ist (Lieber et al. 1975, Toderò et al. 1975). Beunruhigenderweise sind sowohl der GaLV als auch der Koalavirus eng mit den endogenen Schweineretroviren (PERVs, s.u.) verwandt (Martin et al. 1999).

8.6.2 Herpesvirus Pathogenität

Herpesviren sind behüllte Viren, die aus einem ringförmigen Proteinkern mit einer einzelnen linearen doppelsträngigen DNA von 125 - 229 kb, die im ikosaedrischen Capsid an Fibrillen fixiert ist, bestehen. Viren dieser Familie replizieren im Kern und erwerben ihre zerbrechliche Hülle (*envelope*) durch Knospung (*budding*) an der Kernmembran.

Im infizierten Wirt persistieren die Viren gewöhnlich lebenslang latent als episomale zirkuläre DNA. In dieser Zeit kann das Virus in verschiedenen Sekreten verbreitet werden. Stress oder Immunsuppression leiten den lytischen Replikationszyklus ein. Die Pathogenität der Herpesviren wird durch das Töten von Zellen während des lytischen Zyklus ausgeprägt.

Herpesviren codieren selbst für die meisten Enzyme, die für ihre Replikation notwendig sind. Dies erlaubt ihnen, in ruhenden Zellen wie Neuronen zu replizieren. Bis zu 50% der Herpesvirusgene sind für die Replikation nicht essentiell, spielen aber eine besondere Rolle bei der Ausweitung des Gewebetropismus, bei der Etablierung der Latenz oder bei der Unterdrückung der Immunantwort des Wirtes *in vivo*.

Herpesviren werden als sehr problematisch betrachtet, da sie sogar bei der einfacheren Allotransplantation große Schwierigkeiten verursachen können. Diese Probleme werden unter anderem durch die Transmission des latenten Virus von der Quelle auf den Empfänger von Organen oder Geweben verursacht. Infektionen solcher latenter Art können sich für lange Zeit manifestieren, bevor sie dann ausgelöst durch Stress oder Umweltfaktoren zum Krankheitsausbruch führen. Zusätzlich zeigen solche reaktivierten Viren nach dem Transfer auf andere Arten ein erhöhtes Pathogenitätsprofil, das zu hoch virulenten Formen des Virus führen kann (Fields et al. 1996).

Da Schweine als die wahrscheinlichsten Quellentiere für Xenotransplantate gelten (siehe Kap. 5.3), werden große Anstrengungen unternommen, potentiell zoonotische Herpesviren zu entdecken. Vor diesen intensivierten Anstrengungen waren nur zwei Herpesviren bekannt, die Schweine infizieren. Das eine, das Pseu-

dotollwutvirus (ein α -Herpesvirus), kann Hirnhautentzündung und Entzündungen der Atemorgane hervorrufen (Mettenleiter 1991). Das andere, das Schweinecytomegalovirus (ein β -Herpesvirus) kann in den Atemwegen von Schweinen nachgewiesen werden, wo es eine atrophische Rhinitis verursachen kann (Tucker et al. 1999). Im Zuge der verstärkten Suche wurden zwei weitere γ -Herpesviren (Lymphotropische Herpesviren des Schweines Typ 1 und 2) (Ehlers et al. 1999) gefunden und es ist anzunehmen, dass weitere Herpesviren in Schweinen existieren könnten.

Obwohl es möglich wäre, Quellentiere auf Infektionen mit bereits identifizierten Herpesviren hin zu untersuchen, ist es doch wahrscheinlich, dass artfremde unbekannte pathogene Herpesviren existieren. Als Konsequenz der langen Latenzperiode und des potentiell geänderten Pathogenitätsprofils ergibt sich für die Xenotransplantation, dass diese Viren und die durch sie verursachten Krankheiten nur durch ein umfassendes und langfristiges Überwachungsprogramm erfaßt werden könnten.

Neben Herpesviren müsste ein solches Monitoringprogramm auch alle anderen Viren, deren lange Latenz zwischen Infektion, Replikation und Verbreitung im Körper bekannt ist, erfassen. So müssten sicherlich das Tollwutvirus und andere bis jetzt noch unbekannte Mitglieder dieser Virenart mit vermeintlich ähnlichen Charakteristika inkludiert werden.

8.6.3

Pathogenität des Tollwutvirus

Das Tollwutvirus (Fields et al. 1996) ist ein umhülltes konisch geformtes Virus. Es enthält ein 12 kb großes Genom, das aus nicht segmentierter negativ-strand RNA besteht. Die RNA ist eng aufgewunden und wird umhüllt von einem Nukleoprotein, das seinerseits von einer Lipidhülle umgeben ist. Diese Lipidhülle stammt ursprünglich von jener Wirtszelle, in der das Virus replizierte.

Nach Biss oder Verwundung bleibt der Erreger für einen variablen Zeitraum an der Eintrittspforte lokalisiert, bis er sich an den neuen Wirt „angepasst“ hat. Diese Zeitspanne kann bis zu einem Jahr dauern. Dann, nach einer ersten Replikationsphase, gelangt das Virus über die Nerven (Vermehrung in den Schwann'schen Zellen) in Rückenmark und Hirn. In einer zweiten Phase breitet es sich dann über Nervenfasern in die Augen, Speicheldrüsen, Haarfollikel, Herz und Muskeln aus.

Es wäre daher nicht auszuschließen, dass ein tollwutähnliches Virus (und eine Reihe dieser sind bekannt) nach der Xenotransplantation für eine längere Periode im Xenotransplantat und dem benachbarten Gewebe lokalisiert bleibt, und sich nur sehr viel später, nach einer Phase der Adaptation, weiter im neuen Wirt ausbreitet.

Obwohl Tollwut bisher das beste Beispiel eines zoonotischen Virus darstellt, sind die meisten Vorkommnisse dieser Virusart auf Hunde, Katzen, wilde Säugetiere und Fledermäuse beschränkt. Jedoch muss immer wieder betont werden, dass neue Arten von Viren immer wieder identifiziert werden, und dass diese Viren sich in einer solchen Art an den Wirt anpassen können, dass es zu keiner Sym-

ptomatik mehr kommt. Nur wenn so ein Virus sich in einem neuen Wirt befindet, kommt es möglicherweise zu einer Krankheit. Dies bedeutet, dass, obwohl die Chance, dass ein unbekanntes tollwutähnliches Virus beim Schwein existiert, sehr gering ist, es nicht völlig ausgeschlossen werden kann.

8.6.4

Unbekannte und momentan unerfassbare Viren, die eine Xenozoonose auslösen könnten

Auch andere tierische Viren, deren Verwandte beim Menschen schwere chronische Infektionen wie z.B. Hepatitis oder Neoplasien (z.B. Papilloma- oder Polyomaviren) auslösen, sind möglicherweise von Relevanz. Regelmäßig werden neue Beispiele für Viren identifiziert, die zunächst in scheinbar perfekter Symbiose mit ihrem natürlichen animalischen Wirt existierten und aufgrund des Fehlens von pathogenen Merkmalen nicht erkannt wurden, die dann aber nach ihrer Übertragung auf den Menschen menschliche Erkrankungen hervorrufen können. Zu diesen Viren gehören Ebola und Marburg sowie SIV/HIV und die erst vor kurzem identifizierten Hanta- und Nipah-Viren. Vor dem Verursachen menschlicher Erkrankungen waren alle diese Viren unbekannt. Es wäre ganz sicher eine riskante Annahme, zu denken dass keine weiteren potentiell humanpathogene Viren im Tierreich existieren.

Alle oben erwähnten Beispiele für neue humanpathogene Viren sind interessanterweise behüllte Viren. All diese Viren wurden von Primaten (Ebola, Marburg, HIV), Nagetieren (Sin Nombre Hanta Virus (Young et al. 1998)), Fledermäusen (Hendra (Selvey et al. 1995, Halpin et al. 1999)) und Schweinen (Nipah (Chua et al. 1999), eventuell dienen pflanzenfressende Fledermäuse als Virusreservoir) auf den Menschen übertragen. In diesen Fällen waren die behüllten Viren trotz eines voll funktionstüchtigen Immunsystems des Wirts in der Lage, sich schnell zu etablieren und Erkrankungen hervorzurufen. Für einige dieser Viren ist ihre weitere Verbreitung durch die Humanpopulation bestens dokumentiert (Ebola, HIV). Es scheint jedoch, dass diese Ausbreitung erst nach der ursprünglichen Übertragung von Primaten erfolgte. So haben mehrere Studien keine Hinweise auf die Übertragung des von Mäusen stammenden Sin Nombre Virus vom Menschen auf den Menschen erbringen können (Vitek et al. 1996, Wells et al. 1997).

8.7

Schweine als potentielle Organquelle

Wie in Kapitel 5.3 dargelegt wird wohl das Schwein in den meisten Fällen das Quellentier der Wahl für Xenotransplantate sein.

Eine Reihe zoonotischer und potenziell zoonotischer Schweineviren sind bekannt. Zusätzlich gibt es Schweineviren, die zwar nicht als zoonotisch angesehen werden, die aber unter Laborbedingungen in humanen Zellen replizieren können. Letztlich muss auch berücksichtigt werden, dass Rekombination zu neuen Virus-typen führen kann.

8.7.1

Schweineinfluenza

Zwischen 1918 und 1919 starben 20 Millionen Menschen an Schweineinfluenza. Daher gibt dieses zoonotische Orthomyxovirus immer noch Grund zur Sorge. Diese Sorge wird genährt durch aktuelle Berichte über letal verlaufende Infektionen mit diesem Virus, insbesondere mit dem Stamm H1N1 (Rota et al. 1989). Obwohl durch das Vorhandensein eines umfassenden Grundlagenwissens die ausgehende Gefahr besser zu kontrollieren ist, wissen wir auch, dass Influenzaviren sowohl behüllt sind als auch ein segmentiertes Genom tragen. Die erste Eigenschaft macht den Vorgang des Pseudotypings (siehe Abschnitt 8.9.2) möglich, wobei die Hüllproteine verschiedener Virenstämme ausgetauscht werden. Die zweite Eigenschaft, das Tragen eines segmentierten Genoms, erlaubt, dass bei paralleler Infektion mit einem anderen Virus Austausch von genetischem Material stattfinden kann (siehe Abschnitt 8.9.3). Durch diese beiden Mechanismen können neue pathogene Eigenschaften entstehen, die ein Risikopotential beim Überschreiten der Artenbarriere darstellen.

8.7.2

Schweineparamyxovirus

Das zoonotische Schweineparamyxovirus Nipah wurde vor kurzem in Malaysia identifiziert und zeigt grippeähnliche Symptome, die mit Hautausschlag einhergehen und unter Umständen auch zum Tod führen können. Dieses Virus wurde erstmals an Arbeitern erkannt, deren Beruf wiederholten Kontakt mit Schweinen erforderte (Chant et al. 1998).

8.7.3

Japanisches Enzephalitisvirus

Das zoonotische Japanische Enzephalitis Virus (JEV), ein Flavivirus, wird nach Virusamplifikation in Schweinen von Stechmücken auf Menschen übertragen und verursacht schwere Krankheit und Tod. In Asien ist es prävalent bei Schweinen, verursacht aber bei diesen nur geringe Symptome, hauptsächlich Totgeburt oder Abort.

8.7.4

Vesicular Stomatitis Virus

Das zoonotische *Vesicular Stomatitis Virus* (VSV), Verursacher der *Stomatitis vesicularis* oder *Sore mouth* von Rindern und Pferden, ist einer der Hauptvertreter der Rhabdoviren/Vesikuloviren. VSV findet sich bei vielen Säugern und Arthropoden (z.B. Mosquitos, Sandfliegen), wobei deren Rolle als Überträger nicht geklärt ist. Arthropoden stecken sich bei virämischen Tieren an. Virusreservoir sind

Wildwiederkäuer, Wildschweine und Waschbären, wobei Erkrankungen auch bei Rindern und Pferden, selten beim Menschen, auftreten. Der Mensch zeigt Symptome von Influenza mit Fieber, Pharyngitis, Schleimhautläsionen (ähnlich Herpes) und allgemeiner Niedergeschlagenheit. Nach ein paar Tagen ist der immun-kompetente Mensch wieder fit.

8.7.5 Maul- und Klauenseuchevirus

Das zoonotische Maul- und Klauenseuchevirus ist ein Picornavirus, das selten auf den Menschen übertragen wird. Es weist meistens einen subklinischen Verlauf auf oder löst Symptome ähnlich denen im Tier aus.

8.7.6 Swine Vesicular Disease Virus

Das zoonotische *Swine Vesicular Disease Virus* (SVDV) ist die Schweinevariante des humanpathogenen Cocksackievirus B5. Der wenig kontagiöse Erreger zeichnet sich durch eine hohe Morbidität, aber geringe Letalität bei Tieren aus und verursacht eine grippeähnliche Erkrankung beim Menschen.

8.7.7 Tollwutvirus

Das zoonotische Tollwutvirus ist ein Rhabdovirus, das alle warmblütigen Tiere infiziert und fast ausschließlich tödlich ist (siehe Abschnitt 8.6.3).

8.7.8 Vaccinia Virus

Das zoonotische Poxvirus *Vaccinia* verursachte viele „Schweinepocken-Ausbrüche“ und kann den Menschen infizieren, meistens jedoch mit unerheblichen Folgen.

8.7.9 Schweineparvovirus

Das Schweineparvovirus (PPV), das das SMEDI-Syndrome (Stillbirth, Mummification, Embryonic Death, Infertility) auslöst, ist eine bekannte Kontamination in Trypsin und Blutprodukten (Faktor VIII). Man weiß, dass dieses Virus oft seinen Wirtsbereich ändert und dass es menschliche Zellen infizieren kann. So wurde vor kurzem berichtet, dass 5 von 10 Patienten, die Schweineinseln erhalten hatten, antiPPV Antikörper gebildet hatten (Butler 1998).

8.7.10

Pseudowutvirus

Das Pseudowutvirus (PrV), ein Herpesvirus, hat seinen natürlichen Wirt im Schwein und ist als Auslöser der Aujeszky Krankheit bekannt. Jedoch ist ebenfalls bekannt, dass es auch andere Wirte infiziert, die aber eine Sackgasse für den Lebenszyklus des Virus darstellen.

Obwohl das Virus menschliche Zellen in Laborbedingungen infizieren kann, gibt es bisher wenige Hinweise, dass diese Infektion auch auf natürlichem Weg erfolgt. Eine Ausnahme bildet hier ein Bericht über drei Patienten, die nach CNS-Symptomen sero-konvertierten. Hier konnte Kontakt mit einer Katze nachgewiesen werden, die an PrV gestorben war (Mravak et al. 1987).

8.7.11

Schweinepockenvirus

Das Schweinepockenvirus ist normalerweise eine milde Erkrankung, assoziiert mit Hautläsionen. Analog vielen anderen Pockenviren wäre es möglich, dass das Virus auch andere Spezies infizieren kann.

8.7.12

Porcines Enzephalomyocarditis Virus

Das *Enzephalomyocarditis Virus* des Schweins (EMCV), ein Picornavirus, ist weitverbreitet und kommt bei Wildnagern vor, die es dann weiterübertragen. Alle bisherigen Isolate sind serologisch einheitlich. Das Auftreten beim Schwein wird über Verunreinigungen durch Ratten, die über Wochen den Erreger ausscheiden und damit Wasser oder Futter kontaminieren, erklärt. Das Virus hat einen Tropismus für Myocard, was zu reduzierter Leistung des Organs führt. Diese Leistungsverminderung manifestiert sich als Lungen-/Leberstauung und führt in 80% der Fälle zum Exitus nach ungefähr einer Woche. Es wurde bereits herausgefunden, dass dieses Virus auch andere Säuger infizieren kann.

8.7.13

Schweinecircovirus

Vom Schweinecircovirus (PCV) sind bisher zwei Typen identifiziert worden. Typ 1 ist zwar in Schweinen weitverbreitet, scheint aber keine Krankheitssymptome hervorzurufen. Antikörper gegen PCV Typ 1 konnten in Menschen nachgewiesen werden (Tischer et al. 1995). Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass das *post weaning wasting disease* Syndrom mit dem Typ 2 PCV assoziiert ist (Meehan et al. 1998, Allan et al. 1998).

8.7.14

Schweinehepatitisvirus

Vor nicht allzu langer Zeit wurde ein bisher unbekanntes Virus beim Schwein beschrieben, das Verwandtschaft mit dem menschlichen Hepatitis-E-Virus aufweist. HEV ist ein kleines, unbehülltes Virus, das morphologisch dem Norwalk Virus ähnlich ist. Die Eigenschaften dieses Virus legen nahe, dass es ein Virus des Calici-Typus ist und als solches in ein separates Genus der Familie Caliciviridae klassifiziert werden sollte. In Menschen kann HEV cholestatische Gelbsucht hervorrufen, eine Erkrankung, die eine ungewöhnlich hohe Sterblichkeit (20%) bei schwangeren Frauen aufweist. Das Schweinevirus kann auch Hepatitis verursachen (Meng et al. 1997). Die Tatsache, dass das menschliche HEV auf Schweine übertragen werden kann (Meng et al. 1998), legt den Umkehrschluss einer möglichen Übertragung vom Schwein auf den Menschen nahe.

8.7.15

Porcine Endogene Retroviren

Retroviren der Schweine (PERVs) wurden ursprünglich aus Lymphosarkomen des Schweins isoliert. Solche Lymphosarkome treten mit einer Häufigkeit von 0,0003 bis 0,005 % beim Schlachten von Schweinen auf und stellen 25 % von allen bekannten porcinen Tumoren dar. Obwohl vermutlich die zufällige Integration von PERVs in das Schweinengenom (siehe Abschnitt 8.6.1) ein Auslöser für die Tumoren ist, wurde das bis jetzt nicht experimentell bewiesen.

PERVs treten als endogene Viren in der Keimbahn von Schweinen auf. Obwohl sie in verschiedenen Geweben der Schweine nachweisbar sind und sogar menschliche Zellen infizieren (Patience et al. 1997), gibt es noch keinen Hinweis auf ihre Replikation und Verbreitung im Menschen (Heneine et al. 1998, Patience et al. 1998a). Tests für *Porcine Endogenous Retroviruses* (PERVs) werden immer positive Ergebnisse liefern, da alle bisher getesteten Schweine mehrere dieser Viren in ihrem Genom integriert hatten. Bis heute sind PERV-A, PERV-B und PERV-C charakterisiert worden, die alle Mitglieder einer Virusfamilie sind. Obwohl mindestens sieben weitere PERV-Familien existieren, zeigten Sequenzanalysen, dass sie mehrere Stop-Codons in ihrem Genom haben, die diese Viren wahrscheinlich biologisch inaktivieren. Weltweite Studien ergaben, dass Schweine um die 10 bis 25 Kopien des PERV-A, 10 Kopien von PERV-B und keine bis mehrere Kopien von PERV-C an bestimmten Loci integriert haben (Stoye et al. 1998). Jedoch gibt es keine Hinweise, welche dieser Kopien RNA oder virale Proteine produzieren. Während PERV-A und -B humane Zellen mit hohem Titer infizieren können, scheint PERV-C in dieser Fähigkeit stark eingeschränkt zu sein (Takeuchi et al. 1998). In den Fällen von PERV-A und -B führen weitere Passagen in Zellkultur zu einer gesteigerten Infektionsgefahr für Menschen (Wilson et al. 2000). Zusätzlich gibt es bislang keine Hinweise auf Rekombination (siehe Abschnitt 8.9.1) zwischen PERVs oder auf Co-Verpackung (Abb. 8.6) von verschiedenen teilfunktionellen PERV-RNA-Genomen innerhalb oder zwischen verschiedenen PERV-Typen (A, B oder C).

Für die Herstellung von PERV-freien Schweinen wäre es jedoch entscheidend zu wissen, welche von den bisher charakterisierten endogenen *Loci* aktiv sind, um diese Stellen im Zuge der Produktion von Donorschweinen zu entfernen. Wären alle Integrationsstellen biologisch aktiv, so wäre ein vollständiges Entfernen praktisch unmöglich.

Wären nur ein oder zwei Stellen aktiv, und das scheint nachdem, was wir über menschliche (Löwer 1999) und murine (Gradner 1993) endogene Retroviren wissen, eher der Fall, könnten diese mit heutigen *knock-out*-Methoden entfernt werden. Da aber nicht nur die Primärstruktur der DNA über die biologische Aktivität entscheidet, sondern auch Modifikationen wie Methylierung, Sekundärstruktur und entwicklungs- oder gewebespezifische Regulierung, ist die biologische Aktivität schwer definitiv zu evaluieren. Doch selbst wenn es gelänge, die potentiell biologisch aktiven PERV-Kopien zu eliminieren, kann es immer noch nicht ausgeschlossen werden, dass die mit der Xenotransplantation einhergehenden Veränderungen in der Organumgebung (z.B. Immunsuppression, Medikamente) jene PERVs aktivieren, die vorher inaktiv waren. Daher muss man davon ausgehen, dass es in naher Zukunft nicht möglich sein wird, PERV-freie Schweine als Organquelle zu züchten.

8.7.16

Andere Schweineviren

Neben diesen zoonotischen und potentiell zoonotischen Schweineviren muss vor einer Xenotransplantation auf eine Reihe anderer Schweineviren hin getestet und eine Infektion durch sie ausgeschlossen werden. Es gibt jedoch keine Evidenz, dass diese Viren zoonotische Eigenschaften aufweisen.

Schweinecytomegalovirus

Der Schweinecytomegalovirus (PCMV) ist weit verbreitet in Schweinen und verursacht Einschlußkörperchen, Rhinitis sowie Schwierigkeiten bei der Reproduktion der Schweine. Obwohl bis zum heutigen Tage keine Hinweise vorliegen, dass PCMV menschliche Zellen infiziert, stellt der menschliche Herpesvirus CMV ein großes Problem in der Transplantationsmedizin dar.

Porcine Reproductive and Respiratory Virus

Das *Porcine Reproductive and Respiratory Virus* (PRRV) ist auch bekannt als seuchenhafter Spätabort der Schweine (SSS), *Swine infertility and Respiratory syndrome* (SIRS), *Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome* (PAARS), *Mystery swine disease* (MSD) und *Blue Ear disease virus*. Zu den Symptomen zählen Aborte, zu früh geborene unreife Ferkel und allgemeine Fertilitäts- und Graviditätsstörungen. Daneben kommen auch respiratorische Symptome vor. Das PRRV-Virus ist ein behülltes RNA-Virus und gehört der Familie der Arteriviridae an. Das Virus kann leicht durch Hitze, Trocknen oder herkömmliche Desinfektionsmittel inaktiviert werden.

Porcines Coronavirus

Die Porcinen Coronaviren verursachen *Vomiting and Wasting Disease*, epidemische Durchfälle, respiratorische Erkrankungen oder *Transmissible Gastroenteritis* des Schweines (TGE). Bei akuter TGE ist die Mortalitätsrate für Schweine, die jünger als drei Wochen sind, nahezu 100 %. Bei älteren ist die Mortalitätsrate geringer, kann aber durch Stress, wie z.B. Kälte, Feuchtigkeit oder sekundäre bakterielle Infektionen beeinflusst werden. Ältere heranwachsende, ausgewachsene und trächtige Schweine können infiziert werden und zeigen häufig Appetitlosigkeit oder nur einige wenige klinische Symptome der Erkrankung. Der Erreger kann im Fäzes von Schweinen noch acht Wochen und in den Lungen von Schweinen noch drei Monate nach offensichtlicher Genesung gefunden werden.

Bovine Virus Diarrhoe Virus

Das *Bovine Virus Diarrhoe Virus* (BVDV) ist ein sehr weit verbreitetes Pestivirus/Flavivirus bei Rindern. Ca. 80% der Rinder in der BRD sind seropositiv. In der Zellkultur kann man zwei Biotypen, cytopathische (die zur *Mucosal Disease* bei Rindern führt, nach vorheriger intrauteriner Infektion mit der nicht-cytopathischen Form) und nicht-cytopathische, unterscheiden. Das Virus kann jedoch sowohl Schweine, Wildwiederkäuer als auch Schafe (beim Schaf als *Border Disease* bekannt) infizieren. Ausscheidung über Speichel, Kot, Nasen- und Augensekret kann bei persistent Infizierten lebenslang dauern.

Porcine Enteroviren

Die Porcinen Enteroviren verursachen Porcine Polioencephalomyelitis, auch als Teschen/Talfan Erkrankung oder Ansteckende Schweinelähmung bekannt. Die Krankheit wird durch Picornaviren hervorgerufen und ist durch schlaffe Lähmung ohne verändertes Allgemeinbefinden charakterisiert. In den 40er und 50er Jahren trat sie seuchenhaft auf, heute ist sie durch die Durchseuchung meist eine inapparente Infektion.

Porcine Pestiviren

Die Porcinen Pestviren sind Auslöser der klassischen Schweinepest (*Swine Fever*, *Hog Cholera*). Dieser Flavivirus ist auch als *Hog Cholera Virus* (HCV) bekannt. An Schweinepest erkranken nur Suidae in akuter (hämorrhagisch/septikämisch), subakuter (zentralnervöse Störung), chronischer (lokale Inflammation im Respirations-/Digestionstrakt) oder heute häufig subklinischer (Kümmern, Fertilitätsstörung) bis inapparenter Form. Bis zu 90 % einer Herde können an Schweinepest sterben. Das Virus ist antigen verwandt mit BVDV.

Rinderpestvirus

Das Morbillivirus (Paramyoviridae) kommt hauptsächlich in Ostafrika (Kenya, Sudan) und Asien vor, wo es die gefürchtetste Rinderseuche ist, hochinfektiös und mit extremer Mortalität (bis 100 %) bei Rindern und Büffeln. Das Virus kann jedoch auch Schweine infizieren.

Afrikanisches Schweinefiebertvirus

Das Afrikanische Schweinefiebertvirus verursacht eine hochkontagiöse, generalisierende Schweinekrankheit. Das Asfarvirus ist sehr resistent, überlebt bis zu vier Monate in Fleisch und bis zu vier Wochen in kontaminierten Ställen. Es ist endemisch in Südafrika und auf der Iberischen Halbinsel. Auch Frankreich, Belgien und andere europäische Länder hatten Ausbrüche in den 60er Jahren.

In Afrika sind Schweine und deren Zecken (*Ornithodoros moubata porcinus*) das Reservoir, ohne klinische Anzeichen zu zeigen, Hausschweine werden hier über Zecken infiziert. In Europa ist aber die direkte gegenseitige Ansteckung von größerer Bedeutung, da das Virus in hohen Konzentrationen in allen Exkreten ausgeschieden wird. Überlebende Schweine sind häufig chronisch infiziert und scheiden den Erreger noch für sechs Wochen aus. Kontaminierte Ställe und Abfallfütterung von Häfen und Flughäfen sind die häufigste Ansteckungsquelle in Europa.

Porcines Calicivirus

Die Porcinen Caliciviren verursachen das Vesikulärexanthem des Schweines, dessen Symptome große Ähnlichkeiten mit MKS besitzen. Das Virus gilt aber in Europa als ausgerottet.

8.8

Übertragungsrisiko von Schweineviren auf Menschen

In einer 1999 veröffentlichten Studie von Novartis (Paradis et al. 1999) wurde beschrieben, dass von 160 untersuchten Patienten, die unter verschiedenen Behandlungsregimes bis zu 460 Tage mit lebenden Schweinezellen in Kontakt gekommen waren, die einzigen, bei denen die Existenz endogener retroviraler Schweine-DNA nachgewiesen werden konnte, aus einer Gruppe russischer Patienten stammten, die für 50 bis 60 Minuten extrakorporale Milzperfusion erhalten hatten. Jedoch wurden in eben diesen Patienten auch andere Schweinenukleinsäuren mit Ursprung aus den Mitochondrien und Centromeren nachgewiesen (Mikrochimärismus). Diese Tatsache weist darauf hin, dass vollständige Zellen des Schweines auf die Patienten übertragen worden sein könnten. Sollte das der Fall gewesen sein, so könnte der Nachweis von retroviraler Schweinenukleinsäure auch auf integrierte Sequenzen im Schweinegenom zurückzuführen sein und nicht unbedingt auf eine Infektion während der Behandlung. Dieser Mikrochimärismus, der durch die Anwesenheit mitochondrialer oder centromerischer Schweine-DNA angedeutet wurde, konnte bis zu 102 Monate lang beobachtet werden. Dieser Zeitraum ist überraschend lang. Andere Autoren haben Mikrochimärismus nach Milzzelltransplantationen beschrieben. In diesen Experimenten wurden allogene Zellen in nicht-immunsupprimierte und nicht-bestrahlte Mäuse transplantiert, was zu einer anhaltenden Toleranz geführt hat. Jedoch wurden die Mäuse nur ein Jahr lang beobachtet (Morita et al. 1998).

Paradis et al. (1999) vermuten, dass die Signale von Stamm- oder Dendritenzellen des Schweines stammen. Diese Zelltypen zeichnen sich auch durch eine

geringe Expression des α -gal aus, was es ihnen erlaubt, der durch Antikörper bedingten Immunantwort zu entkommen. Obwohl es bekannt ist, dass die menschliche Allotransplantation von soliden Organen auch Zellen des Immunsystems transferieren und dadurch wiederum die Produktion eines Mikrochimärismus auslösen kann, wurde dieses Phänomen immer nur nach einer Immunsuppression beschrieben (Starzl et al. 1993, Shustik et al. 1995). Da andere, nicht von α -gal abhängige Immunmechanismen fremde Zellen leicht beseitigen könnten, erscheint die von Paradis et al. angebotene Erklärung fragwürdig. Nicht geklärt wurde, ob das durch PCR erhaltene Signal des Mikrochimärismus tatsächlich von diesem stammte. Um diese Möglichkeit zu testen, wäre es notwendig gewesen, das PCR-Produkt zu sequenzieren (eine Spezialuntersuchung hätte das sogenannte *false priming* ausschließen können). Jedoch selbst wenn man die Schlussfolgerung der Autoren teilt, dass es keine Hinweise auf eine Infektion mit PERVs gibt, so würde dies nur für Patienten gelten, die für kurze Zeit Kontakt mit nicht-transgenen, also normalen Schweinezellen hatten und deren Immunsystem voll funktionstüchtig war.

Diese Veröffentlichung gab keinen Hinweis auf Infektionen durch andere Schweineviren. Einige Patienten wurden sogar über einen Zeitraum von 102 Monaten (8,5 Jahre) beobachtet und somit eine lange Latenz eines etwaigen Virus berücksichtigt. Obwohl diese Studie ein Infektionsrisiko durch Schweineviren nicht ausschließen kann, so ist sie doch ein Hinweis, dass solche Ereignisse sehr selten zu sein scheinen. Gleiches gilt für Infektionen durch Schweineretroviren. Die Infektion durch sie kann nicht ausgeschlossen werden, doch erscheint es im Lichte der erwähnten Studie eher unwahrscheinlich. Berücksichtigt man das Abwehrsystem der Virolyse, das gegen behüllte Viren gerichtet ist, so ist dieses Ergebnis nicht unerwartet. Jedoch erlaubt diese Studie keine Rückschlüsse auf die Konsequenzen der Xenotransplantation von komplementregulierten transgenen Organen. Ebenfalls unberücksichtigt sind die Effekte der direkten Langzeitimplantation von Xeno-Organen.

8.9 Mechanismen der Neubildung von pathogenen Viren

Bisher wurde unter anderem dargelegt, wie bekannte oder bisher unbekannte Retroviren des Schweines durch den Transfer in den Körper eines Menschen gesteigerte Pathogenität erhalten können. Das Eindringen der Retroviren in die menschlichen Zellen würde dadurch erleichtert, dass die Enge, mit der Transplantat und menschliche Zellen in direkten Kontakt treten, physische Eintrittshindernisse obsolet werden lässt. Das Komplementsystem wäre entweder durch die dementsprechende Modifikation des Transplantats oder durch die normale medizinische Routine nach Transplantationen (Immunsuppression) in seiner Wirksamkeit eingeschränkt. Dadurch würden behüllte Viren durch die Unterdrückung des durch Komplement geregelten Virolysesystems begünstigt werden.

Eine andere Art der Neubildung pathogener Viren wurde beobachtet, wenn eine Zelle von zwei verschiedenen Viren infiziert wurde. Unter diesen Bedingungen

kann ein neues Virus entstehen, das neue Eigenschaften besitzt. Dieses neue Virus kann durch Rekombination auf genetischer Ebene, durch das Neuverteilen genetischer Information (*Reassortment*) oder durch das Mischen viraler Proteine (*Pseudotyping*) entstehen. Der Lebenszyklus des Virus und seine Auswirkungen auf den Wirtskörper sind nicht vorhersagbar. Auch ein neues Pathogenitätsprofil kann entstehen. Sollte die Ursache für das Entstehen des neuen Virus auf der genetischen Ebene liegen (*Rekombination* oder *Reassortment*), so werden die Eigenschaften des neuen Virus an die nächsten Virusgenerationen weitergegeben werden. Aber selbst wenn die Neugestaltung auf der Proteinebene erfolgte (*Pseudotyping*), so kann sie es dem neuen Virus ermöglichen, andere Zelltypen als bisher zu infizieren und so neue Sekundäreffekte zu verursachen.

8.9.1 Rekombination

Das menschliche Genom besteht laut Schätzungen aus bis zu 5% retroviraler Sequenzen (Leib-Mösch et al. 1990). Diese Sequenzen sind hauptsächlich nur Bruchteile vom ganzen Genom eines Retrovirus und sind deswegen nicht biologisch aktiv. Man könnte sich jedoch vorstellen, dass es zu Rekombinationen kommen kann, wodurch funktionell aktive Retroviren generiert würden. Dies ist bereits in Mäusen gezeigt worden, die auch eine erhebliche Menge an solchen endogenen retroviralen Sequenzen besitzen.

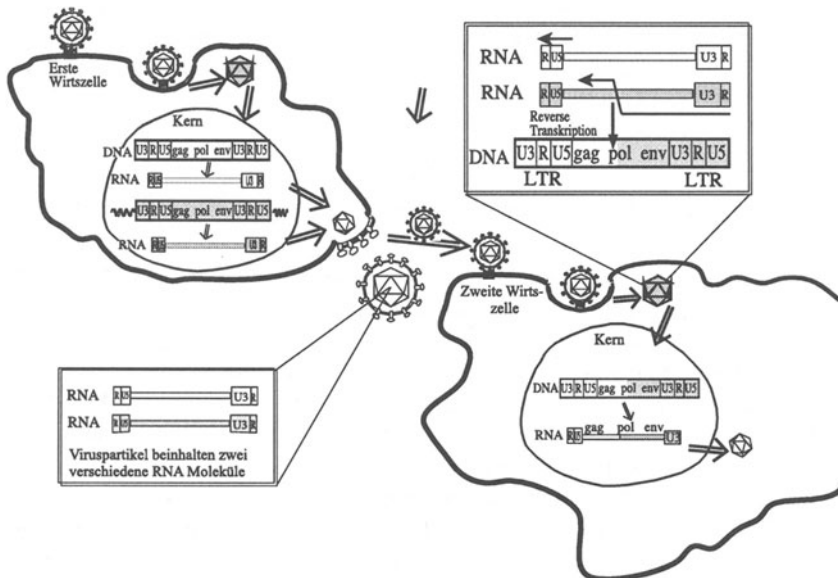


Abb. 8.6 Das Konzept der retroviralen Rekombination

Rekombination findet hauptsächlich auf der RNA-Ebene statt (Pathak, Hu 1997). Sie wird durch die erhöhte Expression von Retrovirus-Bruchteilen bevorzugt. Eine Reihe von Umwelteinflüssen, Chemikalien und Strahlung sowie Stress und andere hormoninduzierte Zustände lösen solche Expressionen aus. Abb. 8.6 verdeutlicht das Konzept retroviraler Rekombination.

① Durch Zusammenwirken mit zellspezifischen Rezeptoren infiziert ein Virus die Wirtszelle. ② Das Virus wird aufgenommen, die Hülle entfernt und die virale RNA in DNA umgeschrieben (*reverse transcription*). ③ Die DNA-Form des Virus wandert in den Wirtszellkern und integriert dort in das Wirtsgenom. ④ Das integrierte Provirus wird nun transkribiert, um virale RNA herzustellen, die sowohl der Produktion viraler Strukturproteine dient, als auch ⑤ in neugebildete Virionen verpackt wird und deren genetische Information darstellt. Diese RNA-Genome werden aufgrund einer spezifischen Verpackungssequenz erkannt und verpackt (Berkowitz et al. 1996). ⑥ Andere endogene Sequenzen von Retroviren, die auch vorhanden sein können, werden ⑦ ebenfalls in RNA transkribiert. Sollten diese RNA-Sequenzen ein Verpackungssignal besitzen, ⑧ können auch sie in neu geformte Virionen verpackt werden (es konnte sogar gezeigt werden, dass retrovirale Sequenzen ohne das entsprechende Signal oder gar Sequenzen, die nicht von Retroviren stammen, ebenfalls verpackt werden können, wenngleich mit geringer Effizienz (Patience et al. 1998). ⑨ Das Retrovirus verlässt durch Knospung die Wirtszelle. Retroviren sind die einzigen Viren mit einem diploiden Genom, da zwei Kopien der viralen RNA in einem Virus verpackt sind. Somit können sie zwei verschiedene RNA-Moleküle verpacken, wie hier durch unterschiedliche Farben angedeutet. ⑩ Das Virus infiziert eine neue Wirtszelle und wird aufgenommen. ⑪ Wurden zwei unterschiedliche RNA-Moleküle verpackt, so kann während der reversen Transkription eine Rekombination erfolgen. Vermutlich kann das die reverse Transkription ausführende Enzym (Reverse Transkriptase) während des Kopierprozesses von einem RNA-Molekül auf das andere überwechseln, ohne die DNA-Synthese zu unterbrechen (Jetzt et al. 2000) ⑫ Virale DNA-Synthese wird durch ein tRNA-Molekül eingeleitet (*Primer*), das hier an die weiße virale RNA gebunden ist. Die DNA-Synthese erfolgt bis zum Ende der als Vorlage dienenden RNA. ⑬ Als Ergebnis der abschließenden Kopie der R-Sequenz der viralen RNA kann der ursprüngliche DNA-Strang an die R-Sequenz der anderen (schwarzen) RNA-Vorlage angehängt werden. ⑭ Während der weiteren DNA-Synthese kann ein zweiter Sprung von der *schwarzen* auf die *weiße* RNA-Vorlage ⑮ in der Herstellung einer Hybrid-DNA resultieren, die Teile der *schwarzen* und *weißen* RNA-Sequenz kopiert hat. Nach der Infektion und Transkription dieses Provirus werden neue Viruspartikel entstehen, die genetische Information dieser Hybrid-DNA enthalten.

Schweinezellen und die Zellen anderer Tiere, die als Quellen für die Xenotransplantation verwendet werden könnten, besitzen endogene retrovirale Sequenzen. Beim Schwein wurden die drei bereits erwähnten Typen (PERV-A,-B,-C), die in der Lage sind, Viruspartikel zu produzieren, charakterisiert. Aber auch andere, unvollständige und nicht aktive retrovirale Sequenzen der weiteren sieben Familien endogener Schweineretroviren könnten durch Umwelt- oder hormonelle

Stimuli aktiviert werden und dann miteinander oder mit ähnlichen defekten, aus menschlichen Zellen stammenden retroviralen Sequenzen rekombinieren. Diese Rekombination könnte letztendlich einen biologisch aktiven Retrovirus produzieren. Solche biologisch aktiven Retroviren wären dann in der Lage, zelluläre Gene zu beeinflussen - in einer ähnlichen Weise, wie schon für herkömmliche Retroviren beschrieben (siehe Abschnitt 8.6.1).

Die Rekombinationswahrscheinlichkeit hängt jedoch stark, aber nicht ausschließlich von der Ähnlichkeit der zu rekombinierenden Sequenzen ab. Rekombination zwischen nicht homologen Sequenzen ist hundert- bis tausendmal unwahrscheinlicher, als zwischen homologen (Zhang u. Temin 1993). Da die Sequenzen von menschlichen Retroviren starke Unterschiede zu denen anderer Arten aufweisen (Martin et al. 1999), ist es höchst unwahrscheinlich, dass solche Rekombinationen zwischen unterschiedlichen Spezies stattfinden. Daher ist die Wahrscheinlichkeit, dass durch die Xenotransplantation neue Retroviren mit unbekannter Pathogenität entstehen, relativ gering. Eine Rekombination zwischen Retroviren derselben Spezies ist die wahrscheinlichere Variante. Solche Innerspeziesrekombinationen sind natürlich nicht auf Anwendungen in der Xenotransplantation beschränkt, sondern finden dauernd im Tier statt.

8.9.2

Pseudotyp-Formation

Bei gleichzeitiger Infektion einer Zelle mit zwei verschiedenen behüllten Viren kann eine phänotypisch gemischte neue Virusgeneration produziert werden (Pseudotypviren). Solche Viren enthalten die genetische Information und die inneren Strukturproteine von einem Virus, besitzen jedoch in der Hülle Proteine von einem anderen oder von beiden Viren (Abb. 8.7). Daher haben Pseudotypviren das Infektionsspektrum des anderen oder beider parentaler Viren. Solche Pseudotypisierung kann theoretisch zwischen fast allen behüllten Viren entstehen.

Die Viren müssen nicht von der selben Familie stammen. So ist z.B. gezeigt worden, dass Oberflächenproteine des Influenzavirus in einen Retrovirus inkorporiert werden (Migunova, Kuznetsov 1981). Menschliche Zellen, die mit einem tierischen behüllten Virus infiziert werden, könnten daher neue Viren produzieren, die aus dem Genom und der Innenstruktur des einen und der Oberflächenstruktur des anderen behüllten Virus bestehen. Dieses Ereignis findet zwar nicht auf der genetischen Ebene statt, könnte jedoch zu neuen Virus-Kombinationen führen, die menschliche Zellen leichter infizieren und dort pathogene Folgen haben können.

8.9.3

Reassortment

Manche Viren, z.B. die Influenza-Viren, besitzen ein segmentiertes Genom. Das bedeutet, dass sie nicht nur ein Stück Nukleinsäure als Genom, sondern mehrere haben, wobei jedes Genom-Stück andere Gene kodiert. Das Virus inkorporiert einen Vertreter jedes Stückes als Genom. Wenn eine Zelle mit zwei verschiedenen segmentierten Viren gleichzeitig infiziert wird, dann können die Virus-

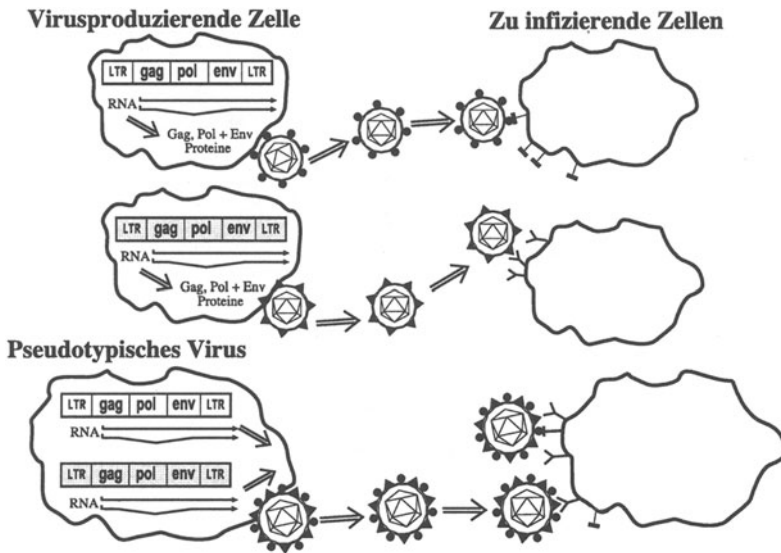


Abb. 8.7 Das Konzept der retroviralen Pseudotypisierung

Nachkommen Genom-Stücke von verschiedenen Viren inkorporieren (Abb. 8.8). Damit wird die genetische Information der Virus-Nachkommen eine Mischung der genetischen Information der ursprünglichen Viren. Dieses Geschehen nennt man *Reassortment*.

Bei Influenza kann die Folge solcher *Reassortments* das Generieren von neuen, hochvirulenten Varianten sein, die dann zu Epidemien führen können (Rota et al. 1989).

Tierische Viren, die durch Xenotransplantation in einen Patienten gelangen, könnten mit schon vorhandenen behüllten menschlichen Viren zu einem *Reassortment* führen und dadurch ein neues, virulentes Virus erzeugen.

8.10 Mögliche Adaptation der Viren

Zusätzlich zu den Problemen, die bei einer artübergreifenden Transmission durch neue Pathogenität und durch neue Viren aufgrund von genetischem oder phänotypischem Mischen entstehen können, kann es weitere Schwierigkeiten geben. Es darf nicht vergessen werden, dass Xenotransplantation auch die Adaptation exis-

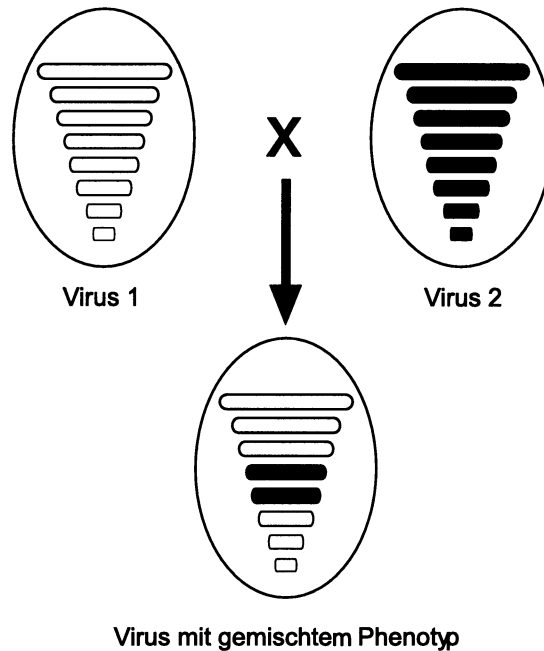


Abb. 8.8 Das Konzept des Reassortments

tierender Viren an die neue Umgebung verursachen und dies wiederum ungeahnte Auswirkung auf deren Pathogenität haben kann.

8.10.1

Freie Bahn nach einer Runde der Replikation in menschlichen Zellen

Anfänglich wurde beschrieben, dass menschliche Zellen die Fähigkeit der α -gal-Expression auf ihrer Oberfläche verloren haben. Ein Virus, das in diesen Zellen vermehrt wird, enthält somit ebenfalls kein α -gal auf seiner Hülle und ist daher nicht virolyseempfindlich. Dies ist der Grund, weswegen behüllte, tierische Viren nach der ersten Replikationsrunde in menschlichen Zellen gegenüber der α -gal-vermittelten Virolyse widerstandsfähig werden (Abb. 8.9).

8.10.2

Aufdecken neuer Eintrittspforten

Virusanlagerung an eine Zelle setzt spezifische Bindungsstrukturen voraus. Dazu hat das Virus spezielle *Viral Attachment Proteins* (VAP) oder Liganden, die an

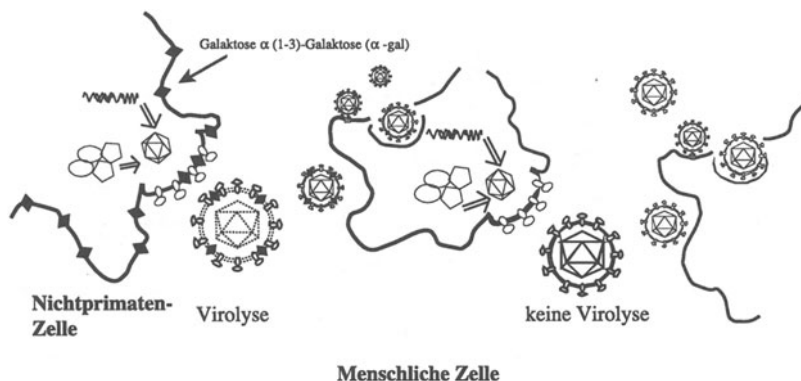


Abb. 8.9 Nach Replikation in menschlichen Zellen sind Viren nicht virolyseempfindlich

zelluläre Rezeptoren binden können. Diese Bindung ist in den meisten Fällen reversibel (bevor es zum nächsten Schritt, der Penetration, kommt).

Rezeptoren sind normalerweise Oberflächen-Zellstrukturen, die für ein normales Funktionieren der Zelle wichtig sind. Viren haben diese Strukturen, um sich an die Zellen spezifisch anzulagern. Die Bindung eines Virus an einen Rezeptor muß nicht dessen Funktion beeinflussen, aber das Vorkommen des Rezeptors bedingt weitgehend das Wirtsspektrum und den Tropismus des Virus.

Normalerweise wird ein Rezeptor von einem bestimmten Virus verwendet, manchmal wird er aber auch von verschiedenen Viren benutzt, insbesondere dann, wenn es sich um einen Zuckerrest handelt.

Einige Schutz-Moleküle, die auf der Oberfläche von xenotransplantiertem Material erzeugt werden, um die hyperakute Abstoßreaktion zu verhindern, können ebenso als Rezeptoren für Viren dienen.¹

8.10.3 Adaptation

Die Expression von Molekülen menschlichen Ursprungs (wie z.B. CD46 oder CD55) in transgenen Organen kann zur Adaptation tierischer Viren führen. Adaptierte Viren können dann diese Moleküle sowohl im Tier als auch im xenotransplantierten Patienten als Rezeptor benützen. Dies bedeutet, dass solche Moleküle schon im Quellentier als Rezeptor fungieren können, falls dieses nach

¹ Beispiele dafür sind das CD46-Molekül, das von Masernviren als Rezeptor benützt wird (Dorig et al. 1993, Nanche et al. 1993), oder das CD55-Molekül, das die Echo- und Cocksackie B-Viren als Rezeptor benützen (Ward et al. 1998, Bergelson et al. 1995).

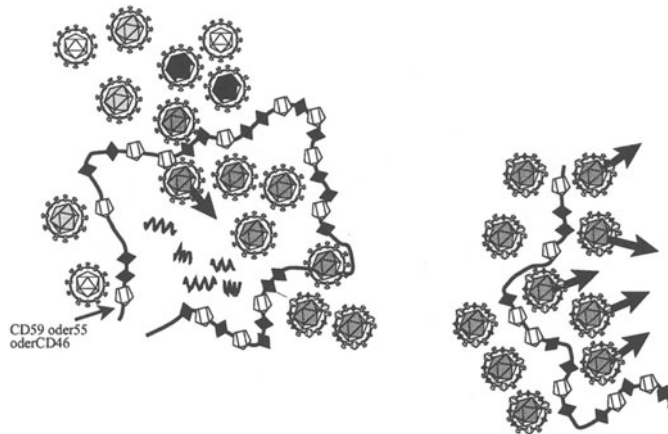


Abb. 8.10 Das Konzept der Adaptation

genetischer Modifizierung Komplementregulatoren wie CD59, CD55 oder CD46 auf der Oberfläche exprimiert. Sollte ein Virus vorhanden sein, das durch Mutation den Rezeptor erkennt, kann die Zelle infiziert werden. Die Viren, die dann wiederum von diesen Zellen erzeugt werden, sind identisch mit der Mutante, die den Rezeptor verwenden konnte. Dadurch können alle diese neu erzeugten Viren den Rezeptor verwenden, sowohl im Quelltier als auch nachher im xenotransplantierten Patienten (Abb. 8.10).

Durch diesen Mechanismus ist es möglich, die Evolution von Viren zu forcieren, damit alle letztendlich ein neues Molekül als Rezeptor erkennen. Die einzige Beschränkung ist, dass ein Virus ursprünglich in der Lage gewesen sein muss, mit dem Rezeptor zu interagieren.

8.10.4 Immunsuppression

Schließlich darf nicht vergessen werden, dass genau wie die Allotransplantation auch die Xenotransplantation unterstützende Immunsuppression benötigt. Obwohl das endgültige Ziel der völlige Verzicht auf diese Maßnahme ist, so ist dies nicht in naher Zukunft zu erwarten (siehe Kap. 6). Es ist viel eher der Fall, dass Xenotransplantation anfänglich einer stärkeren Immunsuppression bedarf als derzeit bei Allotransplantation nötig ist. Das „Ausschalten“ des Immunsystems durch Immunsuppressionsbehandlungen während einer Xenotransplantation könnte das Risiko einer möglichen Infektion erhöhen, da Viren dadurch eine größere Chance haben, sich an die neue Umgebung anzupassen oder zu adaptieren. Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass das Ausschalten des Immunsystems bei Allo- wie auch bei Xenotransplantationen die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass latente

Infektionen wieder ausbrechen oder sich virale Krankheiten durchsetzen. Experimentell muss z.B. retrovirale Pathogenese in neugeborenen Tieren nachgewiesen werden, weil dies sonst durch das Immunsystem unterdrückt werden würde.

8.11 Das virusfreie Schwein

Die virologischen Risiken könnten reduziert werden, sollten SPF-Quellenschweine für die Produktion von Xenotransplantaten verwendet werden. Dies würde erlauben, auf die meisten bekannten Schweineviren zu testen (siehe Abschnitt 8.7 und 8.12) und diese zu eliminieren. Jedoch wird es kaum möglich sein, die Eliminierung von Herpesviren zu garantieren. Ebenso erlaubt es unsere heutige Technik nicht, Schweine zu züchten, die völlig frei von PERVs sind. Möglich wäre es zu versuchen, jene endogenen PERVs zu identifizieren, die biologisch aktiv sind und diese zu eliminieren (siehe Abschnitt 8.7.15). Weitere Sicherheitsmechanismen könnten auf Techniken basieren, die in der Gentherapie Anwendung finden. Diese Mechanismen könnten die Expression von aktiv gewordenen PERVs durch Antisense Technologie kontrollieren oder PERV-RNA durch Ribozyme eliminieren. Weiterhin könnten antivirale Medikamente entwickelt werden, die gezielt in den PERV-Entwicklungszyklus eingreifen. Sogar Impfungen gegen PERV-Infektionen wären denkbar.

Die Ribozym-Technologie scheint die ökonomischste und einfachste Methode mit der höchsten Spezifität zu sein, die bei Schweinen angewandt werden könnte. Der bislang ausbleibende Erfolg von antiviralen Medikamenten bei der Behandlung von HIV-Infektionen lässt die Anwendung von solchen Medikamenten als Sicherheitsmechanismus wenig vielversprechend erscheinen. Immunisierung und Antisense-Technologie bieten sich ebenfalls an, obwohl deren Durchführbarkeit noch zu überprüfen ist.

Viren, die nicht erfasst oder eliminiert werden können, oder die nur nach langer Inkubations- und Verbreitungszeit pathogene Symptome hervorrufen, stellen ein ungleich größeres Problem dar. Da es unwahrscheinlich ist, dass Tests entwickelt werden, die alle unbekanntes Viren erfassen, wird dieses Problem wahrscheinlich fortbestehen. (Zur Reduzierung des Infektionsrisikos durch SPF-Haltung siehe auch Kapitel 5.4)

8.12 Screening Prozeduren für zoonotische Erreger

Um zum Zwecke der Organquelle eine sichere SPF-Schweinekolonie zu etablieren, muss das Screening von Viren und anderen Pathogenen einen ersten Schritt darstellen. Jedoch muss darauf verwiesen werden, dass es bisher keinen internationalen Standard gibt, auf welche Pathogene spezifisch getestet werden sollte. Insofern kann ein SPF-Zertifikat immer nur für die Abwesenheit spezifischer Pathogene vergeben werden. Anfänglich kann der Herdenstatus mit Tests auf das

Vorhandensein von Antikörpern gegen die oben erwähnten Pathogene (siehe Abschnitt 8.7) ermittelt werden. Weiterhin muss Quellenmaterial (Zellen, Gewebe und Organe) nicht nur vor der Xenotransplantation getestet werden, sondern auch während und nach der Transplantation. Nach erfolgter Transplantation ist es notwendig, nicht nur den Rezipienten zu screenen, sondern auch seine engsten sozialen Kontakte (Familie, Freunde, Krankenhauspersonal).

In der frühen Postoperationsphase sind serologische Detektionsmethoden für Antikörper und Antigene die bevorzugte Maßnahme, sie werden jedoch durch Immunsuppression in ihrer Effektivität eingeschränkt. Hierfür stehen mehrere Techniken wie ELISA, Western Blot und Neutralisationsassays zur Verfügung, die direkt an der Probe angewendet werden können. Die Sensitivität kann durch Virus-Kultivierung erhöht werden. Sollte Kultivierung notwendig sein, werden spezielle Zelllinien, die dem Virus die Replikation ermöglichen, mit dem Testmaterial inokuliert. Zwei bis vier Wochen nach der Inokulation werden die Zellen auf das Vorhandensein von Viren untersucht. Hierfür wird entweder die Antigendetektion durch Immunofluoreszenz, *capture* ELISA, Virusisolation oder die Bewertung des cytopathischen Effekts (CPE) verwendet.

Schließlich gibt es noch eine Reihe enzymatischer und molekularer Techniken, die den hochsensitiven Nachweis viraler Proteine oder genetischer Information erlauben. Diese können allein oder im Zusammenhang mit dem oben beschriebenen Kultivierungsverfahren angewendet werden. Die enzymatischen Assays werden für spezifische Viren verwendet. So wird z.B. ein Assay für die Reverse Transkriptase zum Nachweis von Retroviren benutzt. Die molekularen Assays basieren für gewöhnlich auf der Methode der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR). Die hierfür verwandten PCR-Techniken sind die konventionelle DNA-PCR, die Reverse Transkriptase PCR, Nested-PCR und die komplizierteren Taqman Real-Time-PCR und *in situ*-PCR (Paradis et al. 1999).

Verallgemeinernd kann man sagen, dass serologische Assays ökonomisch, einfach und unabhängig von der viralen Replikation sind. Sie haben eine hohe Spezifität, doch gibt es häufig Kreuzreaktionen. Schwierig sind diese Tests in immunsupprimierten Patienten und wenn eine Infektion erst vor kurzem erfolgt ist und daher noch keine Antikörper hergestellt wurden. Molekulare Assays hingegen sind sehr sensitiv, hängen jedoch davon ab, dass ein genügend großer Teil viraler genetischer Information in der Probe vorhanden ist. Sowohl die sensitiveren quantitativen Assays als z.T. auch die klassische PCR sind jedoch anfällig für geringe Veränderungen in der genetischen Information und können so falsche Negativeergebnisse anzeigen (Klein et al. 1999). Auch die nicht oft diskutierte, aber umso relevantere, zwingende Notwendigkeit absolut korrekter Präparation und Nukleinsäureextraktion vor dem Test spielt hier eine wichtige Rolle. Um dieses Problem zu umgehen, wurden Multiplex PCR-Methoden entwickelt (Klein et al. 2000).

Um die korrekte Handhabung der Assays und damit der PCR Ergebnisse sicherzustellen, ist ein genaues Validationsprotokoll einzuhalten. Daher muss ein ausführliches Screening-Programm mehrere Tests beinhalten, die auf verschiedene Eigenschaften des Virus abzielen und an verschiedenen Stationen während der Produktion von Xenotransplantaten durchgeführt werden.

All die oben beschriebenen Assays können für die bekannten Pathogene der Organquelle angewendet werden und die Tiere können bei Vorliegen von negativen Ergebnissen (die bereits erwähnten Einschränkungen bedenkend) als SPF deklariert werden. Man muss jedoch wiederholen, dass das größere Risiko von unbekanntem Viren stammt, für die es kein Testverfahren gibt. In diesem Zusammenhang ist es besonders wichtig zu betonen, dass diese unbekanntem Viren möglicherweise keine Krankheitssymptome im natürlichen Wirt hervorrufen; gerade dies erklärt, dass sie noch nicht identifiziert wurden. Wenn ein solches Virus jedoch durch das Xenotransplantat in den menschlichen Körper gelangt, könnte es durchaus pathologische Symptome verursachen. Ein bereits bekanntes Beispiel für dieses Verhalten ist das γ -Herpes-Virus, das in Schafen keinen Phänotyp zeigt, aber für Rinder eine tödliche Infektion ist (Reid et al. 1989). Diese Viren können entweder phänotypisch oder genetisch aufgespürt werden. Unter phänotypisch versteht man, dass manche Viren eine Änderung in den Zellen, die sie infizieren, hervorrufen. Das Auftreten einer solchen Änderung wäre dann ein Zeichen, dass ein Virus vorhanden ist. Leider jedoch ist diese Methode durch zwei Faktoren in ihrer Nutzung eingeschränkt. Zum einen muss man wissen, in welchen Zellen man eine Änderung suchen soll – dies werden höchstwahrscheinlich nicht Schweinezellen sein – und zum zweiten weiß man, dass nur ein Bruchteil der bekannten Viren eine phänotypische Veränderung hervorruft. Die genetische Untersuchung basiert auf der Grundlage, dass die genetische Information (DNA oder RNA) verschiedener Viren der gleichen Familie Gemeinsamkeiten aufweist. Solche Ähnlichkeiten können nur durch die sogenannte redundante PCR-Methode nachgewiesen werden, die auf der Nukleinsäurehomologie zu anderen, bekannten Mitgliedern der gleichen Virengruppe basiert. Leider gibt es jedoch viele Viren (bekannte als auch bisher unbekannt), die nicht in große bekannte Virusfamilien fallen. Diese Viren können nicht mit den genannten Methoden aufgespürt werden. Es ist daher unmöglich, völlig pathogenfreie Organquellen zu produzieren - eine Situation, die sich wahrscheinlich in absehbarer Zeit nicht ändern lassen wird.

8.13 Schlussfolgerung

Das größte Infektionsrisiko für die Gesellschaft kommt von unbekanntem Viren mit hoher Infektionsgefahr, die sich schlecht kontrollieren lassen und die von genetisch veränderten (transgenen) Xenotransplantaten stammen. Diese müssen nicht Retroviren, sondern können auch persistente Viren mit langer Latenzzeit sein. Es ist daher von größter Wichtigkeit, dass Xenotransplantatempfänger zentral registriert und über lange Zeiträume wiederholt untersucht werden. Dieses Untersuchungsprogramm muss sich sowohl auf phänotypische als auch auf genotypische Ebenen beziehen, um mit Hilfe von „Expertensystemen“ auch bislang unbekanntem Vertreter von derzeit schon identifizierten Virusfamilien zu erfassen. Probenmaterial würde Blut, Tupperproben und Kot umfassen. Solch ein Screeningprogramm wird sicherlich sehr aufwendig und teuer und ist von einer guten molekularen Virologie, gekoppelt mit einem Informatiksystem, abhängig. Es wäre

empfehlenswert, solch ein System europaweit zu standardisieren.

Zusätzlich muss das Untersuchungsprogramm eine genaue klinische Untersuchung beinhalten, um mögliche Zeichen einer viralen Infektion baldmöglichst aufzuspüren. Dies wird sicher in den ersten sechs Wochen nach der Transplantation schwierig sein, da während dieser Periode ohnedies mit klinischen Veränderungen zu rechnen ist. Daher würde sich eine erhöhte Vorsichtnahme mit vernünftigen Quarantänemaßnahmen während dieser Zeit empfehlen. Obwohl nicht garantiert werden könnte, dass so neue pathogene Viren entdeckt und beseitigt werden würden, und obwohl es vorstellbar ist, dass neue rekombinante Viren lange nach der Transplantation entstehen (s.o.), so sollte ein solches Untersuchungsprogramm über einen Zeitraum von mindestens fünf Jahren nach der Xenotransplantation durchgeführt werden. Dieses Überwachungsprogramm sollte nach den ersten sechs Wochen für den Zeitraum von einem Jahr alle drei Monate erfolgen, danach in halbjährlichem Abstand. Sollten sich während einer dieser Untersuchungen Anzeichen einer neuen viralen Erkrankung zeigen, müsste der Patient unverzüglich isoliert und seine Kontakte untersucht werden. Wenn Xenotransplantationen eine gewisse Routine, fünf Jahre Überlebenszeit der Durchschnitt und ungefähr 200 Patienten ohne Anzeichen einer Produktion pathogener Viren (vom Transplantat stammend) über fünf Jahre nachuntersucht sein werden, könnten diese Bedingungen im Licht der dann gewonnenen Erkenntnisse neu diskutiert werden.