

SCHWERPUNKT

Zur Bereitstellung von Organen für die Xenotransplantation

Gottfried BREM

ZUSAMMENFASSUNG

Die Übertragung von Organen aus Tieren auf den Menschen war in vielerlei Hinsicht ein attraktives Verfahren zur Behebung des Organmangels bei der Therapie von Organversagen. Wegen der verschiedenen Formen der Abstoßung (hyperakut, akut, chronisch) wird daran gearbeitet, Tiere durch Veränderungen im Genom so zu modifizieren, dass deren Organe vom Immunsystem des Empfängers nicht mehr attackiert werden. Dazu können Gene, die die Komplementkaskade beeinflussen, in das Genom eingeschleust werden oder Gene ausgeschaltet werden, die für bestimmte Oberflächenstrukturen, die vom menschlichen Immunsystem erkannt werden, verantwortlich sind. Für diese genetischen Veränderungen sind gentechnische (Gentransfer) und reproduktionsbiologische Verfahren (Klonen von knock-out Zellen), die indirekt auch die Wirtschaftlichkeit der Xenotransplantation beeinflussen, von großem Wert.

Schlüsselwörter: Xenotransplantation, Schwein, Abstoßungsreaktion, Retroviren, Gentransfer, Klonen, knock-out

ABSTRACT

For many reasons the use of animal organs for transplantation on human beings would be an attractive method of counteracting the lack transplantable organs for therapy of organ failure patients. Due to the various forms of organ rejection (hyper acute, acute and chronic) experiments are being carried out on animals to alter the genome in such a way that their organs would not be attacked by the immune system of the recipient. To this end, genes which could influence the complementary cascades could be introduced into the genome or genes eliminated which are responsible for certain, from the human immune system easily recognized surface structures. Gene transferring and reproduction biological methods (cloning of knock-out cells), which indirectly influence the profitability of Xenotransplantations are of great value.

Keywords: Xenotransplantations, swine, rejection, retro virus, gene transfer, cloning, knock-out

Anschrift des Autors: Univ.Prof.Dr. Gottfried BREM, Veterinärmedizinische Universität Wien
Veterinärplatz 1, A - 1210 Wien

Einleitung

Xenotransplantation ist die Übertragung von funktionsfähigen Zellen, Geweben oder Organen zwischen verschiedenen Spezies, im besonderen von Tieren auf den Menschen. Eine Nutzung von genetisch nicht veränderten tierischen Organen als Quelle für den Organersatz beim Menschen ist bislang wegen der immunologischen Unverträglichkeit und anatomisch-physiologischer Unvereinbarkeiten tierischer Organe mit dem menschlichen Organismus nicht erfolgreich gewesen. Die Geschichte der (Xeno)Transplantationsmedizin beginnt in Wien. Im Jahr 1902 berichtete Dr. ULLMANN in der Wiener Klinischen Wochenschrift über eine „Experimentelle Nierentransplantation“. In einem Spital der barmherzigen Schwestern hatte er die Niere eines Hundes auf eine Ziege transplantiert.

Allein in den deutschsprachigen Ländern erkranken jedes Jahr mehr als 50.000 Menschen aller Altersgruppen an Herz-, Leber-, Nieren- oder anderen Organerkrankungen, für die keine konventionelle Therapie zur Verfügung steht. Die einzige lebensrettende Chance dieser Patienten ist eine Organtransplantation. Glücklicherweise wurde die Transplantationsmedizin in den letzten Jahrzehnten so weit perfektioniert, dass die Überlebenschancen für Patienten nach Organübertragung enorm gestiegen sind. Transplantationspatienten müssen lebenslang eine Immunsuppressionstherapie erhalten, damit das fremde Organ später nicht doch noch abgestoßen wird.

Weltweit sterben jedes Jahr auf den Wartelisten der Transplantationszentren Tausende von Patienten, weil zu wenig Organe zur Verfügung stehen. Allein in den USA sollen 400.000 Menschen im Alter von 55 Jahren oder weniger eine Herzkondition haben, die am besten durch eine Transplantation zu therapieren wäre. Jedes Jahr sollen 160.000 dazu kommen und pro Jahr werden nur 2.300 tatsächlich transplantiert.

Diese Zahlen ließen sich für andere Krankheiten in ähnlicher Weise darstellen. Man denke nur an die Dialysepatienten, die fast alle potentielle Organempfänger sind. Der Bedarf an Organen ist jetzt schon sehr groß und steigt offensichtlich immer weiter. Dazu kommt, dass üblicherweise bei ausreichender Verfügbarkeit einer neuen Therapieform die Art und Zahl der Indikationsstellungen für diese Therapie zunimmt.

Eine umfassende Darstellung zum Thema, in der sich auch eine Auflistung relevanter Literaturstellen des Autors zum vorliegenden Text befindet, ist in dem Buch „Xenotransplantation von Zellen, Geweben oder Organen“, das beim Springer Verlag erschienen ist und unter der Leitung der Europäischen Akademie zur Erforschung von Folgen wissenschaftlich-technischer Entwicklungen, Bad Neuenahr-Ahrweiler von Beckmann u.a. herausgegeben worden.

Vorteile von Tierorganen

Der relative und absolute Mangel an geeigneten Organen ist das alles entscheidende Problem bei Organtransplantationen. Selbst bei Ausschöpfung aller Möglichkeiten der Organentnahme von hirntoten menschlichen Spendern, reichen die dadurch gewonnenen Organe nicht. Patienten, die wegen Organmangel keine lebensrettende Operation erhalten, werden gezwungenermaßen aufgegeben und entweder einem lebenslangen Siechtum oder baldigem Tod ausgesetzt. Dies ist ein unerträglicher Zustand.

Tierorgane wären ein idealer Ersatz, weil

- sie im Rahmen einer Entnahme-Operation von lebenden gesunden Tieren exakt zum Zeitpunkt der Transplantation gewonnen werden könnten,
- sie jederzeit in ausreichender Anzahl, voll funktionsfähig, in jedem Transplantationszentrum und zu festen Kostensätzen zur Verfügung stehen könnten,

- sie keine Vorschädigung aufgrund von Transport, Zwischenlagerung, Unterbrechung der Blutversorgung, oder Unfallereignissen wie Trauma und Schock aufweisen würden, und
- die Patienten, also die Organempfänger, optimal auf die Transplantation vorbereitet werden könnten und keine organbedingten Not- und Nachtoperationen mehr notwendig sein würden.

Bei der Übertragung von tierischen Organen auf den Menschen treten jedoch immunologische und funktionelle Probleme auf. Die immunologische Abstoßung erfolgt hyperakut, vaskulär und chronisch. Funktionelle Unterschiede sind abhängig vom Organ und erfordern Anpassungen, die gewährleisten müssen, dass das transplantierte Xeno-Organ im menschlichen Organismus richtig und anhaltend funktioniert.

Die Forschungen auf dem Gebiet der Xenotransplantation sind massiv verstärkt worden, weil die Anwendung gentechnischer Methoden eine Lösung dieser Probleme der Xenotransplantation in Aussicht stellt. Die als Organquelle vorgesehenen Tiere werden gentechnisch so verändert, dass ihre Organe nach der Transplantation nicht mehr abgestoßen werden und im Empfängerorganismus bestimmungsgemäß funktionieren können. Dazu sind mehrere verschiedene genetische Veränderungen notwendig, die durch die Übertragung und die Entfernung von Genen erreicht werden. Ziel ist die „Erstellung“ von Schweinen, die die in ihre Erbsubstanz eingebrachten Veränderungen an ihre Nachkommen vererben. In diesem Zusammenhang kommt dem Klonen, also der durch Kerntransfer möglichen Kopie von Tieren aus Zellen eine herausragende Bedeutung zu. Die notwendigen genetischen Veränderungen in Zellen können im Labor wesentlich effizienter durchgeführt werden. Außerdem ist es bei Zellen auch möglich, Gene gezielt auszuschalten und damit ihre Funktion zu unterbinden. Wenn eine Zelllinie etabliert ist, die alle ge-

wünschten Veränderungen aufweist, können mittels Klonierung transgene Tiere gewonnen werden.

Wegen der weitreichenden Ähnlichkeiten bei anatomischen, morphologischen und physiologischen Kriterien scheinen Schweine eine gute Organquelle zu sein. Deshalb wurden die meisten Untersuchungen zur Xenotransplantation beim Schwein durchgeführt. Emotionell sind Schweine in unserem Kulturkreis wesentlich akzeptabler als beispielsweise Hunde oder gar Primaten.

Mehrere Arbeitsgruppen in England, den USA, Australien und Deutschland haben in den letzten Jahren transgene Schweine für Xenotransplantationsuntersuchungen generiert. Organe spezifisch transgener Schweine überstehen nach Transplantation auf Cynomolgus-Affen die kritische hyperakute Abstoßungsreaktion und nehmen auch ihre Funktion auf. Bislang sind die Überlebenszeiten aber für ernsthafte Heilversuche beim Menschen noch zu kurz. Außerdem wird das Problem eventuell auftretender ungewollter Übertragungen von humanpathogenen Mikroorganismen und endogenen Retroviren noch heftig diskutiert. Bei aller Vor- und Umsicht, wie Haltung der Schweine unter speziellen hygienischen Bedingungen, Ausschöpfung aller diagnostischen Möglichkeiten, Transplantationen auf Primaten etc. kann ein Restrisiko nicht ausgeschlossen werden. Die Zucht von Schweinen, die keine bekannten ampho/xenotropen Retroviren in ihrem Genom enthalten, ist sicherlich ein wichtiger Faktor, kann aber auch das Risiko einer eventuellen Rekombination verschiedener retroviraler Sequenzen nicht verhindern. Zur Risikoabschätzung sei angemerkt, dass dieses Problem bei der somatischen Gentherapie, die ja häufig mittels retroviraler Vektoren versucht wird, bis zu einem gewissen Grad ebenso besteht.

Die bislang schon durchgeführten Transplantationen, z.B. von Herzklappen, Hautabdeckungen etc., die Anwendung von Substanzen

wie Seren und Impfstoffe oder die Injektion von Zellen tierischen Ursprungs bei der Frischzellentherapie haben zu keiner bekannten Übertragung von Krankheitserregern geführt. Auch in Berufsgruppen, die extrem intensiven Kontakt mit Tieren haben, hätte es seit langem zu entsprechenden Erkrankungen kommen können und müssen, wenn dieses Risiko sehr groß wäre. Das Risiko der Etablierung eines neuen Krankheitserregers wäre bei Verwendung von Organen näher verwandter Spezies, also von Primaten, höher.

Spendertiere, die eigens für die XTP gezüchtet würden, könnten in sehr hygienischer und keimarmer Umgebung (SPF) aufwachsen und jederzeit zur Verfügung stehen. Die SPF-Haltung von Schweinen für die XTP hat neben den schon genannten Vorteilen auch eine Bedeutung bei der Suche und Identifikation von noch unbekanntem Erregern. Eine SPF-Einheit für den genannten Zweck sollte als geschlossene Einrichtung betrieben werden, d.h. nach der Etablierung der SPF-Herde erfolgt kein weiteres Einbringen von Tieren in diesen Bestand. Wenn die Quelle für die Xenotransplantations-Versuche immer dieselbe spezifisch keimfreie Herde ist, kann hinsichtlich der biologischen Sicherheit ein immer höher werdender Grad an Zuverlässigkeit der Prognose über fehlende Krankheitsübertragungen vom Schwein auf den Menschen erreicht werden. Nach wie vor problematisch sind aber sog. Slow-Virus-Infektionen, da hier die Inkubationszeit mehrere Jahre betragen kann. Trotzdem bietet das Konzept der geschlossenen SPF-Einheit auch hier den größtmöglichen Schutz. Man kann hoffen und erwarten, dass durch das schritt- und stufenweise Vorgehen Probleme mit heute noch unbekanntem Viren, wenn es sie geben sollte, rechtzeitig erkannt und gelöst werden können. Die ersten transgenen Zellen, Gewebe oder Organe für die XTP werden nach einem genau festgelegten Plan mit schrittweisem Vorgehen und begleitender Quality Control und Monitoring beim Menschen zum Einsatz kommen.

Abstoßung von Xenotransplantaten

Bei der xenogenen Transplantation von Tierorganen auf den Menschen führt die xenogene Abstoßungsreaktion dazu, dass Organe von nicht verwandten Spezies sehr schnell nach der Transplantation abgestoßen werden. Diese hyperakute Abstoßungsreaktion (HXR) ist zurückzuführen auf präformierte Antikörper im menschlichen Immunsystem. Durch die Bindung der präformierten Antikörper an die Endotheloberfläche der Blutgefäße des transplantierten Organs wird das Komplementsystem aktiviert. Dieses sensibilisiert Thrombozyten und Leukozyten, die über die Blutgerinnung die Mikro- und Makrozirkulation zum Stillstand bringen. Als Folge tritt ein schneller Anstieg des arteriellen Widerstandes, eine Abnahme des Blutflusses, eine Extravasation von Blut, Hämaturie bei Nierentransplantation oder Reizleitungsstörung bei Herztransplantation auf, die innerhalb von Minuten zu einem schnellen Funktionsende des Organs führen.

Durch Übertragung von geeigneten Konstrukten könnten transgene Tiere erzeugt werden, die andere Zelloberflächenantigene haben und so den Angriff der präformierten Antikörper abwehren können bzw. die die Aktivierung des Komplementsystems unterdrücken. Es handelt sich dabei um natürliche Produkte, die im normalen Organismus dazu dienen, physiologisch ablaufende Immunmechanismen und Antikörperreaktionen wieder nach unten zu regulieren. Von diesen Komplementinhibitoren gibt es zellständige und lösliche Formen, die an unterschiedlichen Stellen der Komplementaktivierungs-Kaskade wirken.

Gentransfer – aktive Genomveränderung

Per definitionem versteht man unter Gentechnik die gentechnische Veränderung von Organismen. Die Möglichkeit, fremde Gene in das Genom eines Tieres via Gentransfer einzuschleusen

und erfolgreich zu exprimieren, hat der genetischen Manipulation von Tieren eine völlig neue Dimension eröffnet. Das grundsätzliche Problem der langen Zeitabläufe in der Tierzucht kann auch der Gentransfer nicht lösen, er unterliegt in diesem Zusammenhang den gleichen Rahmenbedingungen wie konventionelle Zuchtprogramme. Aber gerade wegen der langen Generationsintervalle ist die Chance, durch Gentransfer in einer bzw. wenigen Generationen eine Veränderung zu erzielen, die mit konventionellen Zuchtverfahren viele Generationen und damit Jahrzehnte in Anspruch nehmen würde, reizvoll. Bei landwirtschaftlichen Nutztieren wird bislang hauptsächlich die DNA-Mikroinjektion genutzt. Die zweifelsohne aufregendste Entwicklung stellt derzeit die Etablierung von Klonprogrammen bei Nutztieren und deren Verwendung zur Erstellung transgener Tiere dar.

Nach den ersten Berichten über die erfolgreiche Erstellung transgener Kaninchen, Schweine und Schafe – ist der Gentransfer zu einem zuverlässigen und mit sicherer Erfolgsrate einsetzbaren Verfahren geworden. Bei der transferierten DNA handelt es sich um Genkonstrukte, die normalerweise aus wenigstens 2 Komponenten, nämlich dem sog. Strukturgen und den regulatorischen Sequenzen bestehen. Ein Strukturgen enthält die genetische Information für ein Protein. Die regulatorischen Sequenzen sind dafür verantwortlich, dass Gene exprimiert werden. Dabei bestimmen die regulatorischen Sequenzen (Promotoren, Enhancer, Kontrollregionen)

- die Gewebespezifität,
- die Menge und
- den Zeitpunkt der Genexpression.

Genkonstrukte für die Mikroinjektion werden in Plasmiden, Kosmiden oder Lambda-Phagen kloniert. Dadurch ist die Länge der Konstrukte auf 5-10 bzw. 20-40 kbp limitiert. Wenn längere Fragmente transferiert werden sollen, z.B. um genomische DNA anstelle von cDNA verwenden zu können oder zur Verbesserung der Expression von geklusterten Genen, ist die Koinjektion von 2 oder mehreren verschiede-

nen Fragmenten ein geeignetes Verfahren. Normalerweise kommt es an einer einzigen chromosomalen Lokalisation pro Genom zum Einbau der injizierten DNA. Die Tatsache, dass sich an einer Stelle mehrere Fragmente hintereinander integrieren können, weist darauf hin, dass es vor oder während der Integration zur Ligation oder Rekombination zwischen den injizierten DNA-Fragmenten kommt. Eine Möglichkeit zur Generierung von Tieren mit Transgenen einer Länge von weit mehr als 40 kbp ist die Klonierung der Fragmente in YACs (Yeast Artificial Chromosomes) und die anschließende Injektion.

Für die Expression eines Transgens ist, wie schon erwähnt, die Kombination des Strukturgens mit geeigneten regulatorischen Sequenzen entscheidend. Es gibt Hinweise, dass außer den in unmittelbarer Nähe eines Strukturgens liegenden Promotorsequenzen im 5'-Bereich und untranslatierten Sequenzen im 3'-Bereich sowie den mitunter weit entfernt liegenden Enhancern auch noch regulatorische Komponenten (MAR matrix attachment region, LCR n locus control region) existieren, die mitunter bis zu 100 kp vom eigentlichen Gen-Locus entfernt liegen und die Expression des Gens mitbeeinflussen. Das zu injizierende DNA-Fragment muss aus dem Vektor herausgeschnitten und abgetrennt werden. DNA-Mikroinjektionslösungen müssen steril und absolut frei von Verunreinigungen sein. Überlicherweise wird die Konzentration so eingestellt, dass pro Pico-liter (=10⁻¹² Liter) etwa 1.000 Kopien des Genkonstruktes enthalten sind.

Erstellung transgener Schweine

Die Erstellung transgener Schweine umfasst folgende Arbeitsschritte:

- Vorbereitung der Spendertiere durch hormonelle Superovulation,
- hormonelle Synchronisation der Empfängertiere,
- zweimalige künstliche Besamung der Spendertiere,

- Embryogewinnung im Vorkernstadium 60 Std nach HCG Applikation
- Zentrifugation der Eizellen zur Sichtbarmachung der Vorkerne
- DNA Mikroinjektion
- in vitro Zwischenkultur
- (endoskopischer) Transfer auf Empfängertiere
- Graviditätsuntersuchung der Empfängertiere
- Integrations- und Expressionsuntersuchungen bei geborenen Tieren
- Etablierung homozygot transgener Linien durch konventionelle Zuchtverfahren.

Die für die Injektion benötigten befruchteten Eizellen werden durch Eileiterspülung gewonnen. Zur Erhöhung der Zahl der Eizellen pro Spendertier erfolgt eine hormonelle Superovulation. Spendertiere werden mit PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) stimuliert. Zur Ovulationseinleitung erhalten die Tiere HCG (Human Chorionic Gonadotropin). 24 und 36 Stunden später werden sie besamt. 24 bis 27 Stunden nach der zweiten Besamung werden die Eileiter der Spendertiere gespült. Die Empfängertiere werden 12 Stunden später als die Spendertiere vorbereitet. Zur Anregung der Ovaritätigkeit erhalten sie eine reduzierte Dosis PMSG. Die Ovulationsauslösung mit 750 IU HCG erfolgt 12 Stunden nach der Ovulationsauslösung der Spendertiere. Der Embryotransfer wird 51 bis 55 Stunden nach der HCG-Gabe bei den Empfängern durchgeführt. Schweine reagieren sehr gut auf Superovulationsbehandlung und liefern im Durchschnitt mehr als 20 injizierbare Embryonen pro Spender. Die Embryogewinnung kann durch chirurgische oder endoskopische Spülung oder nach Schlachtung der Spender erfolgen.

Durch die Zentrifugation der Eizellen (z.B. 15.000 g, 3 Minuten) wandert die die Vorkerne verdeckende Granula an einen Pol der Eizellen. Die Vorkerne bleiben an ihrer ursprünglichen Lokalisation und werden sichtbar. Für die Mikroinjektion wird eine Eizelle an einer Haltepipette fixiert, und die mit DNA-Lösung gefüllte Injektionspipette wird mit Hilfe eines Mikromanipulators in einen Vorkern der Eizelle ge-

schohen, so dass ca. 1-2 pl der DNA-Lösung injiziert werden können. Nach der Mikroinjektion werden die Eizellen 1 bis 3 Stunden bis zum Transfer in vitro kultiviert. Embryonen, die morphologisch nicht mehr intakt sind, werden vor dem Transfer aussortiert.

Empfängertiere werden nach reproduktionsbiologischen Gesichtspunkten ausgewählt. Die injizierten Embryonen werden beim Schwein in einen Eileiter abgesetzt, da sich die Embryonen durch Wanderung im Uterus (Spacing) gleichmäßig auf beide Uterushörner verteilen. In eigenen Untersuchungen ist es uns gelungen, endoskopisch gestützte Verfahren der Gewinnung und Übertragung von Embryonen aus bzw. in den Eileiter zu entwickeln, die in ihrer Effizienz den chirurgischen Verfahren gleichwertig sind. Aus tierschützerischer Sicht ist die Endoskopie vorzuziehen.

Von den aus Gentransfer geborenen Tieren werden kernhaltige Zellen gewonnen. Aus diesen wird DNA isoliert und darauf untersucht, ob die injizierte DNA ins Genom eingebaut worden ist. Für den Gentransfer beim Schwein können folgende Erfolgsraten zugrundegelegt werden:

- 20 mikroinjizierbare Zygoten pro Spender
- 70% Graviditätsrate nach Transfer von 30 Zygoten pro Empfänger
- 10% Embryoüberlebensrate, bezogen auf injizierte Zygoten
- 10% Integrationsrate

Ob das Transgen auch exprimiert wird, wird in aufwändigen RNA- und Proteinanalysen geklärt. Die Frage nach der biologischen Wirksamkeit überprüft man, indem das transgene Tier auf erwartete phänotypische Veränderungen in der Zieleigenschaft untersucht wird.

Gentranferprojekte für die Xenotransplantation

Für eine transgene Veränderung von Tierorganen kommen u.a. folgende Inhibitor-Gene in Frage:

CD46 Membran Cofactor Protein (MCP)
 CD55 Decay Accelerating Factor (DAF)
 CD59 Protectin, Membran-Inhibitor für Reaktive Lysis (MIRL)
 CD95 Zelloberflächen Molekül und Ligand
 FHp43 und FHp155 Faktor H (lösliche Form)
 sCR1 löslicher Komplement Rezeptor Typ1

Die für die Erstellung der transgenen Schweine benötigten RCA-YAC Klone mit einer Länge von bis zu 1,2 Mbp, die die gesamte Region mit den Genen für CD46, CD55, CR1 und CR2 enthalten, sind bereits kloniert und werden in Schweinezygoten injiziert. Die Hauptursache für die Komplementreaktion bei Transplantation von xenogenem Material ist die Bindung von sog. xenoreaktiven (natürlichen) Antikörpern, die gegen ein einzelnes Disaccharid, das 1,3GalaGal3, gerichtet sind. Dieses Disaccharid tritt beim Menschen nicht auf. Um diese Antigen-Antikörperreaktion bei den Xenotransplantationen zu vermeiden, kann man entweder das für die Synthese dieses Zuckers verantwortliche Gen der α 1,3-Galaktosyltransferase, ausschalten oder durch Expression eines anderen Enzyms, z.B. die α 1,2-Fucosyl-Transferase (H-Transferase) durch Kompetition die Entstehung von 1,3GalaGal3 zumindest größtenteils unterbinden. Der Transfer des Fucosyltransferase-Gens kann zu einer starken Reduzierung der α 1,3-Galaktosyltransferase führen, wie von amerikanischen Arbeitsgruppen gezeigt worden ist.

Klonen und Klone

Ein Klon ist eine ungeschlechtlich aus einem Mutterorganismus entstandene erbgleiche Nachkommenschaft. Beim Säuger und auch beim Menschen gibt es in Form eineiiger Zwillinge oder Mehrlinge natürlicherweise quasi Kloneschwister. Dieses relativ seltene Phänomen (weniger als 0,2% aller Geburten) tritt auf, wenn aus einem Embryo während der frühen Entwicklung durch zufällige Ereignisse zwei oder mehrere Zellhaufen gebildet werden, die

sich dann unabhängig weiterentwickeln und zu genetisch identischen Individuen heranwachsen.

Bei Säugetieren versteht man unter „Klonen“ in der Embryologie die Erstellung von Embryonen mit identischem Genotyp. Das aussichtsreichste Verfahren zur Erstellung einer Anzahl genetisch identischer Embryonen bzw. Tiere ist die Embryoklonierung mittels Kerntransfer. Durch Übertragung von Kernen bzw. kernhaltigen embryonalen, fetalen oder somatischen Zellen in enukleierte Eizellen kann bei ausreichender Spenderzellzahl eine theoretisch unbegrenzte Anzahl identischer Embryonen und Individuen erstellt werden.

Durch Übertragung von Zellkernen in entsprechend vorbereitete Eizellen können genetisch identische Embryonen erstellt werden. Voraussetzung ist, dass die Eizelle das Metaphase-Stadium in der 2. Reifeteilung (Metaphase II) vollendet hat und die eizelleigene nukleäre DNA entfernt wurde (Enukleation). Eines der wichtigsten Phänomene beim Kerntransfer ist, dass die Kern-DNA reprogrammiert werden muss, d.h. die DNA des übertragenen Kerns muss so aktiviert werden, dass das Teilungsschema des Embryos wieder beim Stadium der Zygote beginnt, obwohl der Kern von einer Zelle stammt, die bereits mehrere oder sogar viele Teilungszyklen hinter sich hat.

Als Empfängerzellen eignen sich auch in vitro gereifte, unbefruchtete Eizellen, bei denen nach Erreichen der Metaphase II die umgebenden Cumuluszellen entfernt werden. Die Enukleation erfolgt durch Absaugen des in der Nähe des Polkörpers liegenden Zytoplasmas mit Hilfe einer Enukleationspipette. Zur Integration des Zellkerns dieser transferierten Spenderzellen in das Zellplasma der Eizelle muss die Membran der Zelle mit der Membran der Eizelle fusioniert werden. Am gebräuchlichsten ist dazu die sog. Elektrofusion, bei der durch kurzzeitige Gleichstromimpulse Poren induziert werden, die ein Zusammenfließen des Zytoplasmas ermöglichen. Die Aktivierung ist die Voraussetzung für das „Ingangkom-

men“ der Teilungsaktivität des Fusionsproduktes. Nach der erfolgten Fusion werden die Fusionskomplexe kultiviert, bis sie unblutig auf Empfänger transferiert werden können.

In einer im Februar 1997 erschienenen Arbeit demonstrierte die Arbeitsgruppe von Jan WILMUT, dass es möglich ist, auch Kerne von Feten und adulten Zellen durch Kerntransfer zur Entwicklung anzuregen. Aus 26 Tage alten Feten und aus dem Eutergewebe eines sechs Jahre alten Schafes wurden Zellen kultiviert und nach einigen Passagen in der Kultur zur Klonierung verwendet. Kerne dieser Zellen führten in einigen wenigen Fällen zur Geburt von Lämmern. Bei einem Lamm war der Spender des Kernes eine Euterzelle des adulten Schafes.

Bei der Nutzung des Klonens für die Erstellung geklonter transgener Nutztiere wird der Gentransfer bereits in der Zelllinie durchgeführt. Nach Testung der Integration und eventuell sogar der Expression des Genkonstrukts könnten dann via Kerntransfer Tiere erstellt werden. Die für eine erfolgreiche Xenotransplantation notwendigen genetischen Veränderungen können in einer Zelllinie wesentlich effizienter durchgeführt werden. Außerdem ist es bei Zellen auch möglich, bestimmte Gene funktionell auszuschalten und damit ihre Expression zu unterbinden. Wenn eine Zelllinie etabliert ist, die all diese Veränderungen aufweist, könnten anschließend entsprechende transgene Schweine erstellt werden.

Entscheidend für die Zukunft des Klonens beim Nutztier wird vor allem sein, wie sicher eine missbräuchliche der auch beim Menschen denkbaren und derzeit heftigst diskutierten Klonierung notwendigerweise zuverlässig unterbunden werden kann.

Knock out von Genen

Der Knock-out des Gens der α 1,3-Galaktosyltransferase wäre durch homologe Rekombination in Stammzellen möglich. Die bei der

Maus etablierte Stammzell-Technologie erlaubt die gezielte Ausschaltung von Genen in permanent kultivierten pluripotenten Zelllinien. Leider stehen für Schweine noch keine pluripotenten Stammzellen zur Verfügung. Die oben beschriebenen Ergebnisse beim Klonen von Tieren aus fetalen Zelllinien lassen erwarten, dass es in den nächsten Jahren möglich sein wird, den Knock-out-Ansatz auch beim Schwein zu realisieren. In den fetalen Zelllinien kann durch konventionelle molekulargenetische Verfahren ein Gen funktionell ausgeschaltet werden. Benutzt man anschließend diese genetisch modifizierten Zellen als Kernspender, ist es möglich, Tiere zu generieren, die diesen Genotyp realisieren.

Einer eigenen Strategie, dem sog. Screen-Out-Konzept, liegt die Überlegung zugrunde, dass jedes im Genom vorhandene Gen, bedingt durch die bekannte natürliche Mutationsrate, bei einzelnen Individuen nicht durch verschiedene Silent-Mutationen, sondern mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit auch von Mutationen betroffen ist, die eine Inaktivität des Allels zur Folge haben. Theoretisch können die folgenden cis-DNA Veränderungen zur funktionellen Inaktivierung eines 1,3GalaGal3 Allels führen: Insertionen, Deletionen oder Punktmutationen in den regulatorischen und/oder codierenden Regionen des Genlocus. In der Mehrzahl dieser Fälle handelt es sich dabei nicht um dominante, sondern um rezessive Mutationen. Die überwiegende Zahl dieser mutationsbedingten Veränderungen ist im Genotyp von heterozygoten Individuen maskiert.

Entscheidend ist, durch geeignete molekulargenetische Analysen des entsprechenden Genortes in den vorhandenen Schweine-Populationen in einem Screening-Verfahren ein (einziges) heterozygoten Anlageträgartier, das eine inaktivierende Mutation enthält, zu entdecken. Mit diesem Tier kann dann eine homozygot negative Linie aufgebaut werden, die den gleichen gewünschten und benötigten Gendefekt aufweisen würde, wie eine durch Gen-Knock-out ge-

nerierte Linie. Sie würde dieser in nichts nachstehen.

Kosten und Markt

Bei der Ermittlung der Kosten für die Erstellung transgener Schweine kann auf Erfahrungswerte aus verschiedenen Bereichen der Biotechnologie zurückgegriffen werden. Im Prinzip kann davon ausgegangen werden, dass die Erstellung eines transgenen Founders zwischen 350.000.- und 700.000.- ATS kosten wird. Sollten bereits bei den für den Gentransfer benötigten Schweinen SPF oder gar Xeno/Gnotobioten eingesetzt werden, würden die Kosten sicherlich um das 0,5 bis 2 fache steigen. Hinsichtlich der gewünschten Freiheit von endogenen Retroviren (PERVs) wird diskutiert, durch Testung und Selektion Schweine zu finden bzw. auszuwählen, denen solche bestimmten Sequenzen fehlen. Die Kosten für die Erstellung transgener Schweine würden sich dadurch etwa um ein Drittel erhöhen und auch zeitlich um bis zu einem Jahr verzögern.

Bevor multi-transgen und hygienisch spezifizierte Schweine zur Verfügung stehen und für die Xenotransplantation genutzt werden können, muss mit einer Vorbereitungszeit von wenigstens drei Generationen (ca. 3 Jahre) gerechnet werden. Dazu sind nach Identifikation der am besten exprimierenden Linie pro Konstrukt Kreuzungen verschiedener transgener Linien und Sanierungen durch Embryotransfer notwendig. Eine transgene Schweinelinie, die alle Voraussetzungen erfüllt, indem sie wenigstens 4 Konstrukte (ursprünglich jeweils wenigstens 5 Founder pro Konstrukt) integriert hat und mindestens SPF Status mit getestetem Zoonose-Status hat, wird in der Grössenordnung eines zweistelligen Millionenbetrages liegen.

Die Kosten für das Klonen beim Schwein können noch nicht zuverlässig angegeben werden, aber näherungsweise dürfen sie für die Generierung klonierter transgener Ferkel um

etwa 50% höher liegen als bei konventionellem Gentransfer. Der immense Vorteil der Klonierung wäre aber, dass dabei nicht nur ein additiver sondern auch ein rekombinatorischer Gentransfer möglich wäre. Dies würde die Zahl der notwendigen Linien und damit letztendlich auch die Gesamtkosten verringern und dabei gleichzeitig eine Optimierung der genetischen Veränderungen erlauben.

Die Vollkosten für die Haltung der Schweine liegen etwa zwischen 15.- und 20.- ATS pro Tier und Tag. Bei SPF-Haltung können sie um den Faktor 10 höher liegen. Die Kosten für ein Ferkel aus konventioneller Haltung liegen zwischen 400 bis 700 ATS, für SPF-Tiere aus Versuchstierhaltungen muss etwa das zehnfache bezahlt werden. Die Gesteungskosten für ein Schwein, das zur Organentnahme aufgezogen wird, setzen sich zusammen aus den Kosten für das Ferkel und die Aufzuchtskosten. Ein 100 kg Schwein für die Organentnahme kostet in Abhängigkeit vom Hygienestatus 2.000 bis 3.500 ATS aus konventioneller Aufzucht und dem bis zu zwanzigfachen bei Tieren aus SPF-Xenobetrieben.

Zur Organentnahme werden die transgenen Schweine zum Transplantationszentrum transportiert und dort aufgestellt, gereinigt, gewaschen und desinfiziert. Zur Organentnahme werden die narkotisierten Tiere in einen speziellen Tier-Operationsraum gebracht, in entsprechender Position fixiert (Rücken- oder Seitenlage) und das Operationsfeld samt -umgebung steril abgedeckt. Die Entnahme des Organes erfolgt entsprechend den Regeln der chirurgischen Kunst.

Das entnommene Organ wird vor der Transplantation gegebenenfalls noch gespült bzw. transfundiert, um Blut und Lympheflüssigkeit des originären Organismus möglichst vollständig zu entfernen. Die Kosten für die Entnahmeoperation setzen sich zusammen aus den Kosten für Transport, Aufstallung und Vorbereitung und den Kosten für das Entnahmeteam. Die Kosten für die Entnahme eines Organes

betragen ca. 30.000.- ATS bei einem entnommenen Organ und sinken auf etwa 10.000.- ATS bei Multi-Organentnahme von einem Tier.

Die Kosten für eine Transplantation einschließlich der direkten Folgekosten schwanken zwischen den verschiedenen Transplantationszentren und Operationen sehr stark. Für das Beispiel der Nieren- und Lebertransplantation liegen die Durchnittspreise bei 400.000.- bzw. 1.500.000.- ATS.

Nach der Organtransplantation müssen die Patienten in der Regel eine lebenslange Immunsuppressionstherapie durchführen. Im Normalfall ist die Nierentransplantation aber gegenüber der Dialysetherapie deutlich kostengünstiger. Die Transplantation einer Niere hat bereits im zweiten Jahr nach der Operation einen Kostenvorteil gegenüber der Dialysesituation von 250.000 ATS. Diese Differenz wächst innerhalb von 10 Jahren auf eine Summe von über 1.750.000 ATS an. Das bedeutet, dass selbst Kosten für die Bereitstellung eines Xenorganes bis zu dieser Größenordnung immer noch einen vorteilhaften Effekt haben würden, wenn man die Verbesserung der Lebensqualität und Lebenszeitverlängerung der Patienten mitberücksichtigt. Die Immunsuppression nach Allotransplantation kostet pro Jahr beispielsweise bei einer Nierentransplantation etwa 100.000.- ATS. Nach einer Xenotransplantation werden die Kosten für die Immunsuppression gemäss dem heutigen Stand des Wissens in etwa doppelt so hoch liegen wie bei Allotransplantierten.

Eine sehr attraktive Weiterentwicklung der Xenotransplantation wird darin gesehen, dass die genetische Konstellation von Tieren so weitgehend verändert werden kann, dass die Organe nach Transplantation auf den Menschen so umfassend akzeptiert werden, dass eine Immunsuppression nicht mehr nötig sein wird. Sollte dies erreicht werden können, wird die Xenotransplantation nicht nur medizinisch der Allotransplantation weit überlegen, son-

dern auch aus ökonomischer Sicht sehr vorteilhaft sein.

Die Prävalenz der Dialyse in Deutschland ist 40.000. Die Hälfte dieser Patienten kämen für eine Nierentransplantation in Frage, also auf vier Jahre verteilt 5.000 pro Jahr. Die Inzidenz der Neuaufnahmen liegt bei 12.000 pro Jahr, von denen ebenfalls die Hälfte ($n=6.000$) für eine Nierentransplantation in Frage kämen. Somit ergibt sich ein Bedarf von bis zu 10.000 Nieren pro Jahr allein in Deutschland. Weltweit kann mit einem wenigstens fünfmal so grossen Bedarf gerechnet werden, da es 750.000 Dialysepatienten gibt, von denen nur etwa 35.000 pro Jahr eine Transplantation erhalten können.

Unter Berücksichtigung eines postulierten Preises von 350.000.- ATS und des Bedarfs in Deutschland von 10.000 Nieren ergibt sich allein in Deutschland ein möglicher Umsatz für Schweinenieren zur Xenotransplantation von 3.500 Millionen ATS pro Jahr oder von etwa 15 Milliarden weltweit.

Es gibt ernstzunehmende Schätzungen, die der Xenotransplantation für das Jahr 2010 einen Markt von über 70 Milliarden ATS zutrauen. Allein in den USA sollen 400.000 Menschen im Alter von 55 Jahren oder weniger eine Herzkondition haben, die am besten durch eine Transplantation zu therapieren wäre. Jedes Jahr sollen 160.000 dazu kommen und pro Jahr werden nur 2.300 tatsächlich transplantiert.

Schlussbemerkung

Die Xenotransplantation ist zweifelsohne nicht risikofrei, weder im Hinblick auf die technische Durchführung noch auf die medizinische Anwendung. Eine Garantie für Erfolg kann in beiden Bereichen nicht gegeben werden. Am sichersten ist wohl zu erwarten, dass es gelingen wird, mehrfach transgene Schweine zu züchten.

Ein häufig diskutiertes Problem bei Xenotransplantationen, die eventuell auftretende ungewollte Übertragung von humanpathogenen Mikroorganismen und endogenen Retroviren kann beim heutigen Wissensstand wohl nicht als endgültig hundertprozentig lösbar angesehen werden. Die Zucht von Schweinen, die keine bekannten ampho/xenotropen Retroviren in ihrem Genom enthalten, ist sicherlich ein wichtiger Faktor, kann aber auch das Risiko einer eventuellen Rekombination verschiedener retroviraler Sequenzen nicht verhindern. Zur Risikoabschätzung sei angemerkt, dass dieses Problem bei der somatischen Gentherapie, die ja häufig mittels retroviraler Vektoren versucht wird, ebenso besteht. Auch die jetzt schon durchgeführten permanenten verbleibenden oder temporären Transplantationen

(z.B. Herzklappen, Hautabdeckungen etc.) oder die Applikation von Substanzen (Seren, Impfstoffen etc.) oder Zellen tierischen Ursprungs (Frischzellentherapie etc.) sowie der bei bestimmten Berufsgruppen extrem intensive Kontakt mit Tieren (z.B. Tierärzte, Tierpfleger, Metzger, Abdecker etc.) hätte ebenfalls seit langem zu neuen Krankheitserregern führen können und müssen, wenn dieses Risiko sehr groß wäre. Wie führende Virologen zeigen, wäre das Risiko der Etablierung eines neuen Krankheitserregers aber bei Verwendung von Organen näher verwandter Spezies, also von Primaten, wesentlich höher.

Die letztendliche Entscheidung, ob das verbleibende Restrisiko eingegangen werden kann, muss anhand einer gründlichen Nutzen-Risiko-Kalkulation erfolgen.