

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERSITY KARLOVY V PRAZE
KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Výzkum prasečích endogenních retrovirů
v souvislosti s xenotransplantacemi**

Petr Daniel

Školitel: RNDr. Jiří Hejnar CSc.

Obsah:

1. Úvod.....	3
2. Xenotransplantace	4
2.1 Význam xenotransplantací pro moderní medicínu	4
2.2 Historie xenotransplantací.....	6
2.3 Hledání vhodného zdroje xenotransplantátů.....	6
2.4 Imunologická rejekce	7
2.4.1 HAR, AVR, CMR.....	7
2.4.2 Transgenní prasata	8
3. Prasečí endogenní retrovirus (PERV).....	10
3.1 Objev prasečího endogenního retroviru a infekce buněčných linií.....	10
3.2 Výskyt prasečích endogenních retrovirů v prasečí DNA.....	11
3.3 Receptory pro PERV u člověka a jejich analogy u zvířat.....	12
4. Klinické studie PERVů na zvířecích modelech a u člověka	14
4.1 Sledování PERVů u lidských pacientů léčených xenotransplantací	14
4.2 Studie na zvířecích modelech.....	16
5. Závěr	17
6. Seznam použité literatury	18

1. Úvod

Permanentní nedostatek lidských orgánů pro transplantační léčbu vede člověka k hledání alternativní cesty náhrady orgánů. Jedním z možných východisek je využití orgánů od jiného, než lidského dárce - tedy xenotransplantace. Dobře dokumentované xenotransplantace pochází už z počátku 17. století. Původně uvažované vhodné druhy zvířat pro xenotransplantace byli primáti, avšak z mnoha důvodů (ekonomické, etické, riziko infekce) je člověk vyřadil a do popředí zájmu se dostalo prase (Cooper *et al.*, 1991). Prasata sice disponují mnoha vhodnými vlastnostmi (např. podobná velikost orgánů s lidskými orgány, rychlá dospělost a velké vrhy mláďat), ale dvě významné překážky - imunologické (Auchincloss a Sachs, 1998) a výskyt prasečích endogenních retrovirů (Breese Jr., 1970) schopných infikovat lidské buňky *in vitro* (Patience *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1998) jsou současnými hlavními zájmy vědců v oblasti xenotransplantací.

2. Xenotransplantace

Slovo xenotransplantace pochází z řeckého slova „xenos“, což v překladu znamená „cizí“. Petr Gorer roku 1964 použil slovo xenotransplantace jako synonymum doposud užívaného termínu heterotransplantace. Xenotransplantace je definována jako jakýkoliv lékařský postup zahrnující transplantaci, implantaci nebo infusi živých zvířecích buněk, tkání nebo orgánů recipientovi (člověku) anebo ex vivo kontakt lidských tělních tekutin, buněk a orgánů s živými zvířecími buňkami, tkáněmi nebo orgány. Alotransplantace (u lidí označovány jako transplantace) jsou takové transplantace, kdy dárce i recipient náleží témuž druhu. Štěpy používané pro xenotransplantace se označují jako xenoštěpy, pro alotransplantace aloštěpy nebo jen štěpy. Někdy je termín xenoštěp nahrazován synonymním souslovím xenotransplantační produkt.

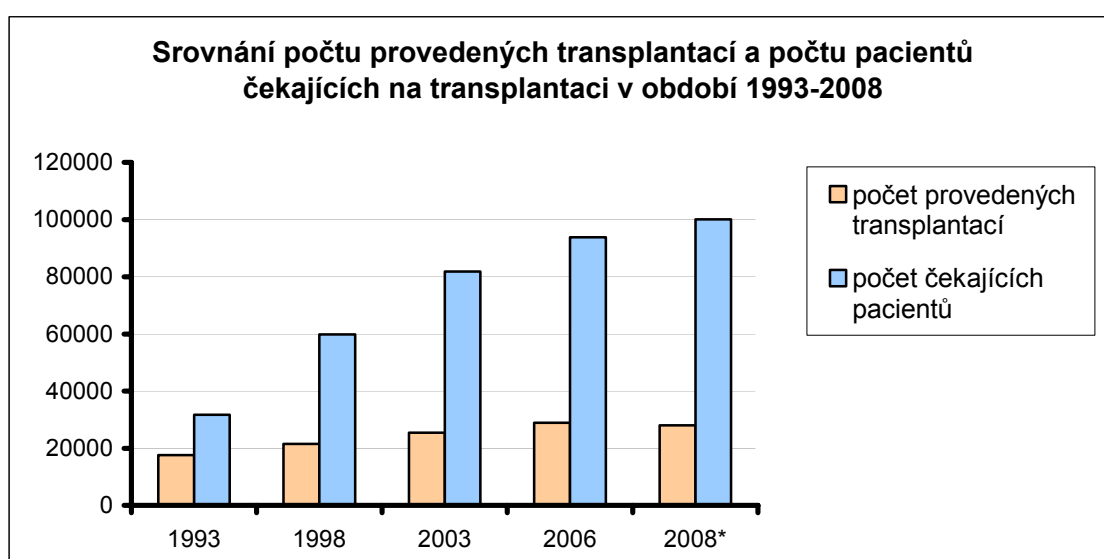
Shrnutí mnoha výzkumů veřejného mínění o xenotransplantacích (Hagelin, 2004) ukazuje, že užitečnost biotechnologie a etické hledisko jsou pro rozhodování společnosti o podpoře xenotransplantací důležitějšími faktory, než jakým je riziko infekce. V průměru 40% respondentů shledává xenotransplantace za morálně přípustné, 54% považuje xenotransplantace za užitečné, pro 57% dotázaných jsou riskantní a 42% dotázaných schvaluje další výzkum v oblasti xenotransplantací. Srovnáním výsledků z let 1996 a 2002 vyšlo najevo, že v americké a evropské společnosti mírně poklesl počet odpůrců xenotransplantací, zatímco v japonské společnosti se mírně zvýšil.

Žádný názorový rozdíl mezi muži a ženami nebyl pozorován v oblasti xenotransplantací. Zjištěno také bylo, že mezi lidmi s vyšším dosaženým vzděláním převažují zastánci xenotransplantace. Naopak mezi věřícími převažují lidé se záporným názorem na xenotransplantace (a obecně nad jakoukoliv biotechnologií).

2.1 Význam xenotransplantací pro moderní medicínu

Podle www.unos.org se v USA provede ročně více než 25 tisíc orgánových transplantací, přičemž počet čekajících příjemců je přes 100 tisíc, tedy více než 4-násob-

bek. V roce 2008 zaujímaly z orgánových transplantací největší podíl transplantace ledvin (60%), méně pak transplantace jater (22%), srdce (8%), plic (5%), slinivky břišní (1%) a tenkého střeva (0,06%), 4% připadá na multiorgánové transplantace (transplantace ledvin s pankreatem a srdce s plícemi). Množství provedených transplantací stouvalo až do roku 2006 a během posledních dvou let fluktuuje. Xenotransplantace by vyřešily problém s nedostatkem orgánů. Přinejmenším ze začátku mohou xenoštěpy sloužit jako nezbytná podpora pacientů čekajících na transplantaci, která zvyšuje pravděpodobnost dožití se transplantace.



Tabulka 1: Nárůst počtu čekatelů na transplantaci v USA ve srovnání s uskutečněnými transplantacemi (*počet čekajících pacientů za rok 2008 je zhruba odhadnut z počtu 101 783 čekatelů k 18.4.2009)

Oproti alotransplantaci mají xenotransplantace následující výhody (Magre *et al.*, 2003): a) zvířata (dárce) jsou neomezeným zdrojem orgánů, b) možnost plánování a zvolení vhodného lékařského postupu, c) možnost imunologického léčení pacientů před xenotransplantací, d) orgány jsou k dispozici ve vhodnou dobu pro transplantaci, e) chov bezpatogenních zvířat za přísných podmínek zlepšuje snižuje riziko infekce u příjemce.

2.2 Historie xenotransplantací

Xenotransplantace nejsou novou myšlenkou. Dokonce už ve starých bájích a pověstech po celém světě můžeme nalézt na popis technik, které se za xenotransplantace dají označit. První zdokumentovaná xenotransplantace se uskutečnila v 17. století. Xenotransfúze jehněčí krve provedená Jeanem-Baptistem Denisem a Paulem Emmerezem neměla prokazatelný vliv na průběh pacientovy nemoci (Farr, 1980). Až na začátku 20. století se lidé odvážili xenotransplantovat zvířecí orgány. Mathieu Jaboulay přenesl prasečí ledvinu do paže 48-leté ženy a během prvních dvou dní nasbíral 1,5 litru moči, ale třetí den došlo k rejekci xenoštěpu (Jaboulay, 1906). Několik dalších případů xenotransplantace celých orgánů ještě bylo popsáno, ale vždy s podobným koncem. Znovuobnovení zájmu xenotransplantací nastalo v souvislosti s objevem imunosupresiv v 60. letech minulého století a zejména cyklosporinu A (Borel, 1974). Vůbec nejúspěšnější xenotransplantací z hlediska přežití orgánu v těle příjemce provedl Keith Reemtsma v roce 1964, kdy transplantoval šimpanzí ledvinu 23-leté pacientce (Reemtsma *et al.*, 1964). Orgán fungoval po dobu 9 měsíců. Ve druhé polovině 20. století chirurgové provedli mnoho xenotransplantací, z nichž některé byly připomínány veřejnými médii (např. xenotransplantace paviáního srdce novorozenci „Baby Fae“). Během posledních 15 let v souvislosti s objevem nových chorob (AIDS, SARS, Creutzfeld-Jacobova nemoc aj.) a hlavně s pozorováním, že PERVY mohou infikovat lidské buněčné linie *in vitro*, vědci vyvolali debatu o rizicích PERVů, která vyústila v moratorium v mnoha vyspělých zemích (Deschamps *et al.*, 2004). Toto moratorium xenotransplantací nebylo do dnešní doby odstraněno.

2.3 Hledání vhodného zdroje xenotransplantátů

V minulosti byly xenotransplantace prováděny s různými zvířaty (Deschamps *et al.*, 2004) včetně psů, jehňat, ovcí, prasat, králíků a primátů. Otázka, který zvířecí druh se nejlépe hodí pro účel xenotransplantací, byla řešena už v první polovině 20. století. Voronoff, který se tímto problémem zabýval jako první, navrhl využívat primáty a za tímto účelem se snažil o zřízení speciálních chovných stanic pro lidoopy

ve Francouzské Guyaně. Jeho záměr byl tvrdě zkritizován širokou veřejností i vědci a už na začátku tak vyloučil z možného okruhu nejracionálnější adepty.

Fylogeneticky nejbližší příbuzní člověka, šimpanzi, patří dnes již k ohroženým druhům. Další v řadě, paviáni, jsou nevhodní vzhledem ke svým tělesným proporcím vůči člověku. Největším paviánem je pavián čakma (*Papio ursinus*), vysoký 1 m a vážící 40 kg. Hlavní výhodou využití primátů je nižší riziko výskytu hyperakutní rejekce. Nevýhodou je vysoké riziko přenosu patogenů a malý počet mláďat.

Nejvhodnějším adeptem pro xenotransplantace člověku se jeví prase (*Sus scrofa*), což podporuje řada skutečností (Cooper *et al.*, 1991). Relativně nenáročný chov, menší finanční náklady, krátká doba březosti a řada fyziologických a anatomických podobností s člověkem (stavba ledviny, srdce a cév) činí prase dobrým zdrojem xenotransplantátů. Prase dosahuje hmotnosti až 500 kilogramů a jeho orgány tak nejsou z hlediska velikosti vhodné pro člověka, který průměrně váží 80 kilogramů. Tento problém byl vyřešen použitím miniaturního prasete, které váží pouhých 120-140 kilogramů (Sachs, 1994).

2.4 Imunologická rejekce

Vážným lékařským problémem je imunologické odhojení (rejekce) xenotransplantátu. Po transplantaci může dojít buď k hyperakutní rejekci (HAR), akutní vaskulární rejekci (AVR/DXR) anebo k buněčně zprostředkované rejekci (CMR) (Auchincloss a Sachs, 1998).

2.4.1 HAR, AVR, CMR

Hyperakutní rejekce (HAR, hyper acute rejection) nastává do několika minut až hodin od xenotransplantace a projevuje se intravaskulární trombózou xenoštěpu, otokem a extravaskulární hemoragií. Konkordantní druhy jsou druhy, mezi nimiž po xenotransplantaci nedochází k HAR, v opačném případě se hovoří o diskordantních druhových kombinacích. Například prase je vůči člověku druhem diskordantním.

V případě xenotransplantací mezi prasetem a člověkem je příčinou HAR aktivace komplementu v důsledku navázání přirozeně se vyskytujících preformovaných xeno-reaktivních protilátek na antigen prasečích endoteliálních buněk (Oriol *et al.*, 1993), anebo nekontrolovaná aktivace komplementu vyvolaná nepřítomností lidských komplement regulačních membránových proteinů na povrchu prasečích buněk (Dalmasso *et al.*, 1991).

Hlavním epitopem na povrchu prasečích endoteliálních buněk je disacharid galaktóza- α (1-3)-galaktóza, α -Gal (Sandrin *et al.*, 1994). Enzym α -galaktozyl transferáza připojuje tento cukerný zbytek na N-acetyllaktozamin. Opice starého světa a lidoopi včetně člověka postrádají funkční gen pro α -galaktozyl transferázu a N-acetyllaktozamin je glykozylován α (1,2)-fukozylo transferázou. Předpokládá se, že protilátky (IgM) proti α -Gal jsou v organismu původně namířené proti α -Gal epitopu na povrchu střevních bakterií.

Akutní vaskulární rejekce (AVR, acute vascular rejection) nebo též opožděná rejekce xenoštěpu (DXR, delayed xenograft rejection) nebo akcelerovaná vaskulární rejekce (AVR, accelerated vascular rejection) nastává nejdříve po uplynutí jednoho dne, obvykle se objevuje během druhého až třetího dne od xenotransplantace. Tato rejekce postihuje konkordátní druhy (kombinace potkan-myš, křeček-potkan aj.). Navenek je projev AVR podobný HAR. Navázání protilátek (IgG) na povrch endoteliálních buněk a transkripce nových genů jsou hlavní příčinou AVR. AVR mohou též navodit NK-buňky, monocyty a makrofágy.

Buněčně zprostředkovaná rejekce (CMR, cell-mediated rejection) je nejméně prostudovaná. Zodpovídá za ní více buněk imunitního systému příjemce ($CD4^+$ T-lymfocyty, NK-buňky, Th2 cytokinová odpověď) (Auchincloss a Sachs, 1998). Dá se jí zabránit použitím imunosupresiv (Platt, 1998).

2.4.2 Transgenní prasata

Vyšlechtěním specifických transgenních prasat lze docílit snížení imunologických projevů recipienta, se kterými se setkáváme během xenotransplantace (viz výše).

Jedním z prvotních zájmů bylo odstranění hlavního antigenu α -Gal, který je zodpovědný za HAR. Byla vyšlechtěna prasata knock-outovaná v genu pro enzym $\alpha(1,3)$ -galaktozyl transferázu (Dai *et al.*, 2002; Phelps *et al.*, 2003). Záměna jediného nukleotidu (G za T) vedla k pozměnění jednoho kodónu a k produkci neaktivního enzymu. Při pučení prasečích endogenních retrovirů získávají viriony obal z membrány prasečích buněk a s ním i příslušný α -Gal antigen. Proto PERVy uvolněné z buněk takto upravených prasat nemají ve svém obalu antigen, proti kterému existují u lidí protilátky a mohou uniknout imunitnímu systému.

Zavedení genu pro $\alpha(1,2)$ -fukozylní transferázu do prasečích buněk snížilo množství α -Gal až o 90% (Sandrin *et al.*, 1995). Transgenní myši s geny pro $\alpha(1,2)$ -fukozylní transferázu a α -galaktosidázu (enzym, který odštěpuje α -Gal) neměly na povrchu endoteliálních buněk téměř žádné α -Gal (Osman *et al.*, 1997).

Další strategií je zavedení genů pro lidské regulační komplementové proteiny (hDAF, CD55; MCP, CD46; CD59, protektin) do prasat (Cozzi a White, 1995). Opět platí, že i viriony pučící z takto upravených buněk jsou odolnější komplementovému systému a nepodléhají lýzi (Magre *et al.*, 2004), na druhou stranu se prokázalo, že xenoštěpy z takto upravených prasečích buněk skutečně lépe přežívají u recipientů (primátů).

3. Prasečí endogenní retrovirus (PERV)

Endogenní retroviry jsou retroviry, které se v evoluční minulosti zabudovaly do hostitelské DNA germinálních buněk a procesy genetického driftu se staly trvalou součástí genetické výbavy hostitele a od té doby přenášejí horizontálně do dalších generací. Postupem času se v integrovaných endogenních retrovirech hromadily mutace, které jednotlivé ERVy inaktivovaly. Přesto byly identifikovány replikačně-kompetentní ERVy u řady studovaných druhů obratlovců včetně kuřat, koček, primátů a prasat (Boeke a Stoye, 1997). Nukleotidové sekvence ERVů jsou podobné betaretrovirovým a gammaretrovirovým rodům exogenních retrovirů (Hunter *et al.*, 2000).

Prasečí endogenní retroviry (porcine endogenous retroviruses, PERVs) patří podle morfologie virionu do skupiny retrovirů c-typu (Breese Jr., 1970; Armstrong *et al.*, 1971; Lieber *et al.* 1975). Z fylogenetického hlediska (porovnání pol sekvence) má nejbližší k GALV (gibbon-ape leukaemia virus) a MLV (murine leukaemia virus). Velikost genomu PERVů se liší podle klonu, kompletní genom tvoří 8 kb (Akiyoshi *et al.*, 1998). Dva otevřené čtecí rámce (pro-pol a env) jsou obklopeny LTR (long terminal repeat) skládající se ze 3 oblastí (U3, R, U5) (Magre *et al.*, 2003).

3.1 Objev prasečího endogenního retroviru a infekce buněčných linií

Uvolňování virových partikulí typu C bylo pozorováno u prasečí buněčné linie PK-15 (porcine kidney 15) už na počátku 70. let minulého století (Breese Jr., 1970). Současně bylo pozorováno pučení virových partikulí typu C u mnoha zavedených prasečích buněčných linií (Armstrong *et al.*, 1971), a to konkrétně u IB-RS-2, PK-15, PS a SK6, případně u prasečí linie MPK (Lieber *et al.*, 1975), zatímco u primárních a sekundárních buněčných kultur prasečí ledviny nebyly v této době pozorovány. Tyto partikule typu C nejsou dosud spojeny s žádným onemocněním, přestože byly také popsány u prasat trpících leukémií (Moennig *et al.*, 1974). Původní studie zabývající se popisem těchto virových partikulí u prasat tvrdily, že jsou infekční jen pro prasečí buňky (Moennig *et al.*, 1974; Todaro *et al.*, 1974; Lieber *et al.*, 1975).

Velkým mezníkem ve výzkumu prasečích endogenních retrovirů bylo zveřejnění studií, že PERV je schopen infikovat lidské buňky *in vitro* (Patience *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1998). Patience prokázal, že supernatant z buněčné linie PK-15 (PERV-PK) infikuje lidské 293 buňky, norčí Mv-1-lu buňky a prasečí ST-IOWA buňky. Kromě toho, kokultivace PK-15 buněk s řadou lidských buněčných linií (např. Lung MRC-5, Muscle RD, T- a B- buněčné linie) měla za následek jejich infekci, přestože se tyto linie nepodařilo infikovat supernatantem z PK-15 buněčné linie. Druhá zkoumaná prasečí linie, MPK, infikovala pouze prasečí ST-IOWA buňky. Wilson *et al.* (1998) zjistili, že kokultivace mitogenicky aktivovaných jednojaderných buněk periferní krve (PBMC) pocházejících z NIH miniaturního prasete nebo yucatánského prasete s řadou lidských buněk vede k produktivní infekci partikulí typu C. Martin *et al.* (2000) ukázali, že také prasečí aortální endoteliální buňky (PAEC) uvolňují PERV viriony a že kokultivace X-ozářených PAEC s lidskými HEK 293 buňkami má za následek jejich infekci.

Původní zprávy hovořily o nemožnosti infekce PERV buněčných liniích primátů (Martin *et al.*, 1999), avšak záhy byly tyto zprávy vyvráceny důkazem, že i lidské, gorilí a paviání primární kožní fibroblasty a paviání B-buněčné linie jsou permissivní pro PERV (Blusch *et al.*, 2000). PERV se ale v buňkách primátů nereplikují (Ritzhaupt *et al.*, 2002).

3.2 Výskyt prasečích endogenních retrovirů v prasečí DNA

Počet kopií PERVů v prasečím genomu se pohybuje mezi 50 (Le Tissier *et al.*, 1997) až 200 (Akiyoshi *et al.*, 1998). Šest PERV-B replikačně-kompetentních celých PERVů bylo objeveno u velkého bílého prasete (Herring *et al.*, 2001), přestože v genomu převažovalo mnoho celých defektivních PERV-A sekvencí.

Na základě porovnání sekvence *env* genu PERV klonů izolovaných z prasečích PK-15 buněk a lidských 293 buněk byly rozlišeny dvě třídy prasečích endogenních retrovirů, PERV-A a PERV-B (Le Tissier *et al.*, 1997). Le Tissierova skupina prokázala, že obě třídy PERVů infikují lidské buňky, jsou produkovány v prasečích tkáních a vykazují 63-66% homologii nukleotidové sekvence k GALV. Klon prasečího endogenního retroviru, pocházející z leukocytů miniaturního prasete (PERV-

MSL), byl podrobně mapován (Akiyoshi *et al.*, 1998) a ukázalo se, že jeho nukleotidová sekvence se shoduje z 99% s retrovirem Tsukuba-1, který byl nalezen v Shimozuma buněčné linii (Suzuka *et al.*, 1986).

Takeuchi *et al.* (1998) rozdělili tyto klony PERVů do tří tříd podle podobnosti genu *env*. Třída PERV-C zahrnuje klony Tsukuba-1 a PERV-MSL. Bylo prokázáno, že PERV-A a PERV-B mohou infikovat lidské a prasečí buňky, zatímco PERV-C infikuje pouze prasečí buňky, i když MLV vektor nesoucí PERV-C *env* infikoval lidské HT1080 buňky.

PERVy izolované z lidské buněčné linie 293 kokultivované s PBMCs NIH-miniaturního prasete (Wilson *et al.*, 1998), se ukázaly být rekombinantní v genu pro *env* mezi PERV-A a PERV-C (Oldmixon *et al.*, 2002). Ukázalo se, že rekombinantní PERV A/C, který je schopen infikovat lidské buňky, se vyskytuje ve vyšším titru oproti PERV-A a PERV-B (Bartosch *et al.*, 2004).

PERV-A, B a C spadají do skupiny $\gamma 1$ retrovirů (Patience *et al.*, 2001) a v prasečím genomu byly pomocí degenerovaných primerů objeveny další endogenní retroviry, které náleží skupinám $\gamma 2$ - $\gamma 5$ a 4 skupiny betaretrovirů (Patience *et al.*, 2001, Ericsson *et al.*, 2001). Z přítomnosti gammaretrovirových a betaretrovirových sekvencí v prasečím genomu můžeme odhadnout jejich pravděpodobnou evoluci. Gammaretroviry jsou mladší oproti betaretrovirům a do prasečího genomu se dostaly před 3,5 miliony lety.

3.3 Receptory pro PERV u člověka a jejich analogy u zvířat

U člověka byly identifikovány 2 receptory pro PERV-A (Ericsson *et al.*, 2003), nazvané HuPAR-1 (Human PERV-A receptor 1) a HuPAR-2 (Human PERV-A receptor 2). Vzhledem k tomu, že také PERV-B infikuje lidské buňky *in vitro*, předpokládá se i existence receptoru pro PERV-B na cytoplasmatické membráně lidských buněk, ale jeho studie není v současnosti zájmem z důvodu nižšího počtu kopií PERV-B v genomu prasete ve srovnání s PERV-A.

HuPAR-1 receptor byl objeven testováním nepermissivních SIRC buněk, které se po transdukcii cDNA knihoven pocházejících z HeLa buněk (linie permissivní pro PERV-A) staly produktivně infekční. Sekvence patřičné cDNA knihovny byla

porovnána s databází lidské DNA a podařilo se nalézt podobnou sekvenci na chromosomu 8, která byla označena jako HuPAR-1. Porovnáním sekvence HuPAR-1 byla objevena sekvence HuPAR-2 na lidském chromosomu 17. Kromě lidských receptorů, byly sekvenčním porovnáním objeveny i receptory pro PERV-A u prasete (PoPAR, porcine PERV-A receptor) a paviána (BaPAR-2, baboon PERV-A receptor 2). HuPAR-2 sdílí výraznou sekvenční homologii k BaPAR-2 (95,8%), oproti homologii k HuPAR-1 (86,5%). Exprese HuPAR-1 a HuPAR-2 byla prokázána s různou intenzitou u většiny tkání, největší exprese receptorů byla zaznamenána ve varlatech (Ericsson *et al.*, 2003).

Oba receptory (HuPAR-1, HuPAR-2) jsou transmembránové proteiny obsahující 11 transmembránových domén. Od ostatních receptorů pro gammaretroviry se odlišují v topologii, neboť jejich N a C konec se nevyskytují na stejné straně membrány, ale N konec ční do intracelulárního prostoru, zatímco C konec do extracelulárního prostoru. HuPAR-1 je protein složený z 445 aminokyselin, HuPAR-2 z 448 aminokyselin. Ericsson *et al.* (2003) poukazují na možnou funkci HuPAR-1 jako receptoru spojeného s G-proteiny pro γ -hydroxybutyrát v mozku, vzhledem k tomu, že je pro tuto skupinu receptorů charakteristická přítomnost 7 transmembránových domén, zdá se být tento poznatek mylný. Funkce HuPAR-2 v lidských buňkách není dosud známa.

Nejnovější studie (Marcucci *et al.*, 2009) zabývající se HuPAR poukazuje, že vstup PERV-A (klon PERV-A 14/220*) do buňky probíhá 11x častěji prostřednictvím HuPAR-2 receptoru, než HuPAR-1. Pro navázání obalových glykoproteinů virionu na buněčný receptor hraje důležitou roli leucin L109 ve druhé extracelulární smyčce (ve směru od N konce) receptoru HuPAR-2.

4. Klinické studie PERVů na zvířecích modelech a u člověka

4.1 Sledování PERVů u lidských pacientů léčených xenotransplantací

V roce 1997 Patience *et al.* publikoval studii, ve které prokázal schopnost PERVů infikovat lidské buňky *in vitro* během kokultivace lidských a prasečích buněk. Na základě těchto výsledků bylo ustanoveno moratorium a začalo testování pacientů, kteří byli léčeni pomocí prasečích tkání či orgánů.

Přítomnost PERVů může být detekována pomocí PCR nebo imunologicky. Testy se většinou zaměřují na přítomnost PERVů v krvi. Při detekci PERVů je důležité vyloučit možnost, že amplifikované PERV sekvence pochází z prasečích buněk přežívajících v pacientově těle. Tento jev se označuje jako mikrochimérismus. Proto při výsledku pozitivním na přítomnost PERVů je DNA dále testována na přítomnost kontrolních prasečích sekvencí (mtDNA, centromerických sekvencí) nebo buněčných genů (Heneine *et al.*, 1996). Dále pomocí RT-PCR lze zjistit přítomnost retrovirových partikulí. Z imunologických metod se využívá ELISA využívající protilátky proti PERV, např. protilátky proti povrchovým proteinům virů (Gag p30 u PERV-B), nebo použití antisér.

Při nejrozsáhlejší mezinárodní studii (Paradis *et al.*, 1999) byly testovány jednojaderné buňky periferní krve (PBMCs) a sérum u 160 pacientů různého věku (od 2 do 77 let), kteří byli léčeni pomocí různých prasečích tkáních a orgánů. Testováno bylo 100 pacientů po mimotělní slezinné perfúzi, 28 pacientů po mimotělní perfúzi jater za pomoci HepatAssist systému využívající prasečí hepatocyty, 15 pacientů po léčbě prasečími kožními štěpy, 14 pacientů po transplantaci buněk prasečích pankreatických ostrůvků, 2 pacienti po mimotělní ledvinné perfúzi a 1 po mimotělní perfúzi přes celá prasečí játra. 129 pacientů mělo negativní výsledek PCR a u 30 pacientů (cca 19%) byl zaznamenán pozitivní PCR nálezn pro PERV sekvence. U 23 z 30 pozitivně testovaných pacientů na PERV DNA byl prokázán mikrochimérismus. Zbývajících 7 pacientů nemohlo být vyšetřeno na prasečí specifické sekvence kvůli nedostatečnému množství DNA pro analýzu. Výsledkem této studie bylo i pozorování, že prasečí buňky přežívají v lidském organismu až 8,5 let,

ale ve velmi malém množství (1 prasečí PBMC na 500 000 lidských PBMC). U žádného pacienta nebyl pozitivní výsledek RT-PCR (tj. nebyl produktivně infikován) a 2 pacienti byli seropozitivní, což ale druhý kontrolní test nepotvrdil.

V další studii byly testovány PBMC od 28 pacientů, léčených pomocí mimotělních bioartifciálních jater z prasečích buněk. PCR na přítomnost PERV sekvencí bylo ve všech případech negativní (Pitkin *et al.*, 1999). Autoři kokultivovali použité prasečí hepatocyty s lidskými HEK 293 buňkami, ale infekce nebyla zaznamenána.

Dvěma pacientům, kteří podstoupili krátkodobou dialýzu za využití prasečích ledvin (Patience *et al.*, 1998), byla ihned po operaci odebrána krev pro testování PERV DNA pomocí velmi citlivé techniky „nested PCR“. Žádná PERV DNA u pacientů nebyla touto technikou odhalena ani po kontrolním testování.

10 pacientů, kteří se ve Švédsku podrobili xenotransplantaci prasečích buněk pankreatických ostrůvků, bylo sledováno na přítomnost PERV několika technikami (Heneine *et al.*, 1998). Tito pacienti prošli po transplantaci imunosupresivní léčbou (cyklosporin, prednizol, azathioprin). Výsledky PBMCs PERV PCR byly negativní, stejně jako RT-PCR sér odebraných od pacientů mezi 3 až 7 roky po xenotransplantaci. Výsledky PCR pro mtDNA byly pozitivní u 6 pacientů až do 1 roku od xenotransplantace. Protilátky proti PERV Gag p30 nebyly objeveny v séru žádného pacienta odebraného 6 měsíců po xenotransplantaci.

2 pacienti byli léčeni mimotělní jaterní perfúzí přes celá játra z transgenního prasete a poté se podrobili alotransplantaci (Levy *et al.*, 2000).

9 pacientů, kteří byli před jaterní transplantací, léčení pomocí bioartifciálních jater z prasečích buněk, poskytlo vzorky séra před a po provedení xenoperfúze (Irgang *et al.*, 2003). Séra poskytla negativní výsledek po smíchání s antiséry a protilátkami.

I přes negativní výsledky testů na přítomnost PERVů v krvi pacientů nelze vyloučit možnost infekce, neboť tyto studie byly zatím provedeny na relativně malém počtu jedinců, z nichž ani jeden nepodstoupil celoorgánovou transplantaci, mnohdy ani prasečí buňky nebyly v přímém kontaktu s lidskými (zvláště použití vospělých BAL zařízení). Léčba xenotransplantáty jen výjimečně zahrnovala imunosupresi. Někdy byly vzorky odebírány až po dlouhé době od provedení xenotransplantace.

Podmínky, které podporují infekci PERV lze navodit experimentálně u modelových zvířat.

4.2 Studie na zvířecích modelech

Po transplantaci prasečích buněk pankreatických ostrůvků do NOD/SCID myši (non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency), která napodobuje člověka, jenž podstoupil imunosupresivní léčbu, mohli Laan *et al.* (2000) detekovat expresi PERVů v několika myších tkáních. Výsledek této studie ale vyvrací pozorování Irganga *et. al* (2002), že buňky NOD myši nejsou infikovány PERVy. Vědci transplantovali prasečí buňky různým zvířatům (pavián, norek) a podrobili je imunosupresi, ale nedetekovali žádnou infekci PERVy (Specke *et al.*, 2002; Simon *et al.*, 2003; Moscoso *et al.*, 2005).

Vhodným zvířecím modelem pro studium infekce PERVy *in vivo* se zdá být primát (pavián), jehož výhodou je podobnost imunitního systému s lidským (na rozdíl od používaných malých laboratorních zvířat - myši, potkanů), přítomnost receptorů pro PERVy, ale nevýhodou jsou dosud rozporuplné výsledky infekce primátích buněčných linií PERVy. A tak se uvažuje o vytvoření myši s lidskými receptory pro PERVy, které by mohly být užitečným modelem (Martina *et al.*, 2006).

5. Závěr

Z poznatků získaných za posledních 10 let výzkumu o prasečích endogenních retrovirech není možné rozhodnout o jejich nebezpečnosti vůči recipientům a běžné veřejnosti. Souvisí to i se skutečností, že doposud neexistuje věrohodný zvířecí model pro studium prasečích endogenních retrovirů. Podrobnější studie PERVů by se měla zaměřit hlavně na miniaturní prase, které je fyziologicky nejvhodnějším dárce orgánů vůči člověku. Vztahy mezi PERVy a HERVy (lidskými endogenními retroviry, human endogenous retroviruses) nebyly prostudovány a otázka, co se stane, když se do jedné buňky dostanou odlišné endogenní retroviry, které pocházejí od hostitelů náležícím k jiným druhům, není zatím objasněna.

6. Seznam použité literatury

Akiyoshi DE, Denaro M, Zhu H, Greenstein JL, Banerjee PT, Fishman JA (1998): Identification of a full-length cDNA for an endogenous retrovirus of miniature swine. *J Virol* 72:4503-4507.

Auchincloss H Jr, Sachs DH (1998): Xenogeneic transplantation. *Annu Rev Immunol* 16:433-70.

Armstrong JA, Porterfield JS, de Madrid AT (1971): C-type virus particles in pig kidney cell lines. *J Gen Virol* 10:195-198.

Bartosch B, Stefanidis D, Myers R, Weiss R, Patience C, Takeuchi Y (2004): Evidence and consequence of porcine endogenous retrovirus recombination. *J Virol* 78:13880-13890.

Blusch JH, Patience C, Takeuchi Y, Templin C, Roos C, Von Der Helm K, Steinhoff G, Martin U (2000): Infection of nonhuman primate cells by pig endogenous retrovirus. *J Virol* 74:7687-7690.

Boeke JD, Stoye JP (1997): Retrotransposons, endogenous retroviruses, and the evolution of retroelements, 343-435. In Coffin JM, Hughes SH and Varmus HE (ed.), *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.

Borel JF, Feurer C, Gubler HU et al (1976): Biological effects of cyclosporine A: a new antilymphocyte agent. *Agents Actions* 6:468.

Breese SS Jr. (1970): Virus-like particles occurring in cultures of stable pig kidney cell lines. *Arch Gesamte Virusforsch* 30:401-404.

Cooper DKC, Ye Y, Rolf LL and Zuhdi N (1991): The pig as potential organ donor for man. In *"Xenotransplantation"* (Cooper DKC, Kemp E, Reemtsma K and White DJG, Eds), 481-500. Springer-Verlag, Heidelberg.

Cozzi E, White DJ (1995): The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nat Med* 1(9):964-966.

Dai Y, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, Monahan JA, Jobst PM, McCreath KJ, Lamborn AE, Cowell-Lucero JL, Wells KD, Colman A, Polejaeva IA, Ayares DL (2002): Targeted disruption of the α 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol* 20:251-255.

Dalmasso AP, Platt JL, Bach FH (1991): Reaction of complement with endothelial cells in a model of xenotransplantation. *Clin Exp Immunol* 86 Suppl 1:31-35.

Deschamps, JY, Roux FA, Sai P, Gouin E: (2005): History of xenotransplantation. *Xenotransplant* 12(2): 91-109.

Ericsson T, Oldmixon B, Blomberg J, et al (2001): Identification of novel porcine endogenous betaretrovirus sequences in miniature swine. *J Virol* 75:2765-2770.

Ericsson TA, Takeuchi Y, Templin C, Quinn G, Farhadian SF, Wood JC, Oldmixon BA, Suling KM, Ishii JK, Kitagawa Y, Miyazawa T, Salomon DR, Weiss RA, Patience C (2003): Identification of receptors for pig endogenous retrovirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:6759-6764.

Farr AD (1980): The first human blood transfusion. *Med Hist* 24:143.

Hagelin J (2004): Public opinion surveys about xenotransplantation. *Xenotransplant* (11):551-558.

Heneine W (1996): Strategies for diagnosis of xenotransplant-associated retroviral infections. *Mol Diagn* 1:255-260.

Heneine W, Tibell A, Switzer WM, et al (1998): No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts. *Lancet* 352: 695-699.

Herring C, Quinn G, Bower R, Parsons N, Logan NA, Brawley A, Elsome K, Whittam A, Fernandez-Suarez XM, Cunningham D et al (2001): Mapping full-length porcine endogenous retroviruses in a Large White pig. *J Virol* 75:12252-12265.

Hunter E, Casey J, Hahn B, Hayami M, Korber B, Kurth R, Neil J, Rethwilm A, Sonigo P and Stoye J (2000): Retroviridae, 369-387. In Van Regenmortel MH, Fauquet CM, Bishop DHL, Carsten EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR and Wickner RB (ed.), *Virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses*, VIIth ICTV Report. Academic Press, San Diego, Calif.

Irgang M, Sauer IM, Karlas A, Zeilinger K, Gerlach JC, Kurth R, Neuhaus P, Denner J (2003): Porcine endogenous retroviruses: no infection in patients treated with a bioreactor based on porcine liver cells. *J Clin Virol*, 28:141-154

Jaboulay M (1906): Greffe de reins au pli du coude par soudures artérielles et veineuses [Kidney grafts in the antecubital fossa by arterial and venous anastomosis]. *Lyon Med* 107:575.

Le Tissier P, Stoye JP, Takeuchi Y, Patience C, Weiss RA (1997): Two sets of human-tropic pig retrovirus. *Nature* 389:681-682.

Levy MF, Crippin J, Sutton S, Netto G, McCormack J, Curiel T, Goldstein RM, Newman JT, Gonwa TA, Banchereau J, Diamond LE, Byrne G, Logan J, Klintmalm GB (2000): Liver allotransplantation after extracorporeal hepatic support with transgenic (hCD55/hCD59) porcine livers: clinical results and lack of pig-to-human transmission of the porcine endogenous retrovirus. *Transplant* 69:272-280.

Lieber MM, Sherr CJ, Benveniste RE and Todaro GJ (1975): Biologic and immunologic properties of porcine type C viruses. *Virol* 66:616-619.

Magre S, Takeuchi Y, Bartosch B (2003): Xenotransplantation and pig endogenous retroviruses. *Rev Med Virol* 13(5):311-329.

Magre S, Takeuchi Y, Langford G, Richards A, Patience C and Weiss R (2004): Reduced sensitivity to human serum inactivation of enveloped viruses produced by pig cells transgenic for human CD55 or deficient for the galactosyl alpha(1-3) galactosyl epitope. *J Virol* 78:5812-5819.

Marcucci KT, Argaw T, Wilson CA, Salomon DR (2009): Identification of two distinct structural regions in a human porcine endogenous retrovirus receptor, HuPAR2, contributing to junction for viral entry. *Retrovirology* 6:3.

Martin U, Kiessig V, Blusch JH, Haverich A, von der Helm K, Herden T, Steinhoff G (1998): Expression of pig endogenous retrovirus by primary porcine endothelial cells and infection of human cells. *Lancet* 352:692-694.

Martin U, Steinhoff G, M, Chikobava M, Anssar T, Morschheuser, and Lapin B (1999): Porcine endogenous retrovirus is transmitted neither in vivo nor in vitro from porcine endothelial cells to baboons. *Transplant Proc* 31:913-914.

Martin U, Winkler ME, Id M, Radeke H, Arseniev L, Takeuchi Y, Simon AR, Patience C, Haverich A, Steinhoff G (2000): Productive infection of primary human endothelial cells by pig endogenous retrovirus (PERV). *Xenotransplant* 7:138-142.

Martina Y, Marcucci KT, Cherqui S, Szabo A, Drysdale T, Drinivisan U, Wilson CA, Patience C and Salomon DR (2006): Mice transgenic for a human porcine endogenous retrovirus receptor are susceptible to productive viral infection. *J Virol* 80:3135-3146.

Moennig V, Frank H, Hunsmann G, Ohms P, Schwarz H and Schafer W (1974): C-type particles produced by a permanent cell line from a leukemic pig. II. Physical, chemical, and serological characterization of the particles. *Virology* 57:179-188.

Moscoso I, Hermida-Prieto M, Manez R, Lopez-Pelaez E, Centeno A, Diaz TM and Domenech N (2005): Lack of cross-species transmission of porcine endogenous

retrovirus in pig-to-baboon xenotransplantation with sustained depletion of anti-alphaGal antibodies. *Transplant* 79:777-782.

Oldmixon BA, Wood JC, Ericsson TA, Wilson CA, White-Scharf ME, Andersson G, Greenstein JL, Schuurman H-J and Patience C (2002): Porcine endogenous retrovirus transmission characteristics of an inbred herd of miniature swine. *J Virol* 76:3045.

Oriol R, Ye Y, Koren E, Cooper DKC (1993): Carbohydrate antigens of pig tissues reacting with human natural antibodies as potential targets for hyperacute vascular rejection in pig-to-man organ xenotransplantation. *Transplant* 56:1433-1442.

Osman N, McKenzie IFC, Ostenried K, Ioannou YA, Desnick RJ and Sandrin MS (1997): Combined transgenic expression of α -galactosidase and α 1,2-fucosyltransferase leads to optimal reduction in the major xenoepitope Gal α (1,3)Gal. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14677-14682.

Paradis K, Langford G, Long Z, Heneine W, Sandstrom P, Switzer WM, Chapman LE, Lockey C, Onions D, Otto E (1999): Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. *Science* 285 (5431):1236-1241.

Patience C, Patton GS, Takeuchi Y, Weiss RA, McClure MO, Rydberg L, Breimer ME (1998): No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys. *Lancet* 352:699-701.

Patience C, Takeuchi Y and Weiss RA (1997): Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med* 3:282-28

Patience C, Switzer WM, Takeuchi Y, Griffiths DJ, Goward ME, Heneine W, Stoye JP, Weiss RA (2001): Multiple groups of novel retroviral genomes in pigs and related species. *J Virol* 75(6):2771-2775.

Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen SH, Ball S, Specht SM, Polejaeva IA, Monahan JA, Jobst PM, Sharma SB, Lamborn AE, Garst AS, Moore M, Demetris AJ, Rudert WA, Bottino R, Bertera S, Trucco M, Starzl TE, Dai Y, Ayares DL (2003): Production of α 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 299:411-414.

Pitkin Z, Mullon C (1999): Evidence of absence of porcine endogenous retrovirus (PERV) infection in patients treated with a bioartificial liver support system. *Artif Organs* 23:829-833.

Platt JL (1998) New directions for organ transplantation. *Nature* 392:11-17.

Reemtsma K, McCracken BH, Schlegel JU et al (1964): Heterotransplantation of the kidney: Two clinical experiences. *Science* 143:700.

Ritzhaupt A, Van Der Laan LJ, Salomon DR, Wilson CA (2002): Porcine endogenous retrovirus infects but does not replicate in nonhuman primate primary cells and cell lines. *J Virol* 76:11312-11320.

Sachs DH (1994): The pig as a potential xenograft donor. *Vet Immunol Immunopathol* 43(1-3):185-91.

Sandrin MS, Vaughan HA, McKenzie IFC (1994): Identification of Gal α (1,3)Gal as the major epitope for pig-to-human vascularised xenografts. *Transplant Rev* 8:134-49.

Sandrin MS, Fodor WL, Mouhtouris E, Osman N, Cohn S, Rollins SA, Guilmette ER, Setter E, Squinto SP and McKenzie IFC (1995): Enzymatic remodeling of the carbohydrate surface of a xenogeneic cell substantially reduces human antibody binding and complement-mediated cytotoxicity. *Nat Med* 1:1261-1267.

Simon AR, Templin C, Schroder C, Laaff G, Tessmann R, Winkler ME, Tacke S, Denner J, Lapin B, Chikobava M et al (2003): No evidence for productive PERV infection of baboon cells in in vivo infection model. *Ann Transplant* 8:24-34.

Specke V, Plesker R, Coulibaly C, Boller K and Denner J (2002): Productive infection of a mink cell line with porcine endogenous retroviruses (PERVs) but lack of transmission to minks in vivo. *Arch Virol* 147:305-319.

Suzuka I, Shimizu N, Sekiguchi K, et al (1986): Molecular cloning of unintegrated closed circular DNA of porcine retrovirus. *FEBS Lett* 198:339-343.

Takeuchi Y, Patience C, Magre S, et al (1998): Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus. *J Virol* 72:9986-9991.

Todaro GJ, Benveniste RE, Lieber MM and Sherr CJ (1974): Characterization of a type C virus released from the porcine cell line PK(15). *Virol* 58:65-74.

van der Laan LJ, Lockey C, Griffeth BC, et al (2000): Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* 407(6800):90-94.

Wilson CA, Wong S, Muller J, Davidson CE, Rose TM, Burd P (1998): Type C retrovirus released from porcine primary peripheral blood mononuclear cells infects human cells. *J Virol* 72(4):3082-3087.