

DGfZ-Preise 2015 (Dissertationen)

Experimentelle Ansätze zur Überwindung der akuten vaskulären Abstoßungsreaktion nach Verwendung porciner Xenotransplantate

HELLEN ELISA AHRENS¹, B. PETERSEN¹, DORIS HERRMANN¹, R. SCHWINZER², D. RATAJ³, A. TIEDE³, M. WINKLER⁴, W. RAMACKERS⁴, A. BONGONI⁵, R. RIEBEN⁶ und H. NIEMANN¹

Zusammenfassung

Die Übertragung porciner Xenotransplantate auf Menschen wird als vielversprechende Lösung für den Mangel an geeigneten humanen Spenderorganen angesehen, geht jedoch mit schweren Immunreaktionen einher. Um die Abstoßung von Xenotransplantaten zu verhindern, bedarf es der genetischen Modifikation der Spendertiere.

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt, um die akute vaskuläre Abstoßungsreaktion zu verhindern. Das erste Schweinmodell kombiniert die Expression von zwei anti-apoptotischen und entzündungshemmenden Transgenen, humane Hämoxygenase-1 (hHO-1) und humanes A20 (hA20), mit einem durch Zinkfinger-Nukleasen vermittelten Knockout des porcinen α -Galactosyltransferase-Gens (GGTA1-KO). In *ex-vivo*-Perfusionen mit humanem Blut wurde gezeigt, dass Nieren der GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenen Schweine im Gegensatz zu Wildtypschweinen vor einer akuten vaskulären Abstoßung geschützt waren.

Im zweiten Schweinmodell wurde die Expression von Tissue Factor (TF), einem wesentlichen Faktor in der Koagulationskaskade, durch siRNA-vermittelte RNA-Interferenz signifikant reduziert. Die verringerte TF-Expression korrelierte mit einer signifikanten Verlängerung der Gerinnungszeit nach Inkubation von Endothelzellen auf Mikrocarrier-Beads mit humanem Vollblut. Zudem war die Thrombusbildung in einem Flusskammerversuch nach Perfusion mit plättchenreichem humanem Plasma signifikant reduziert.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass beide Schweinelinien vielversprechende xenoprotektive Effekte vermitteln können. Die genetischen Modifikationen werden in neue multi-transgene Spenderschweine integriert werden, um so die Abstoßungsreaktion porciner Organe nach Transplantation in Primaten zu vermindern oder komplett zu verhindern.

¹ Institut für Nutztiergenetik, Friedrich-Loeffler-Institut, Mariensee, Neustadt am Rübenberge.
E-Mail: hellen.ahrens@fli.bund.de, bjoern.petersen@fli.bund.de, heiner.niemann@fli.bund.de

² Transplantationslabor, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover

³ Klinik für Hämatologie, Hämostaseologie, Onkologie und Stammzelltransplantation, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover

⁴ Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover

⁵ St. Vincent's Hospital, Melbourne, VIC, Australien

⁶ Departement Klinische Forschung, Universität Bern, Bern, Schweiz

Diese Arbeit wurde durch das Exzellenzcluster REBIRTH, den DFG TR CRC 127, den Schweizerischen Nationalfonds für die wissenschaftliche Forschung und das EU-Projekt „Xenome“ gefördert.

Schlüsselwörter: Xenotransplantation, transgene Schweine, akute vaskuläre Abstoßungsreaktion

Summary

Experimental approaches towards overcoming the acute vascular rejection during pig-to-primate xenotransplantation

Pig-to-human xenotransplantation is considered a promising solution for the lack of suitable human donor organs. However, it is associated with severe immune reactions. To prevent xenograft rejection, genetic modification of the donor animals is required.

This thesis pursued two different strategies to prevent the acute vascular rejection. In the first pig model, expression of two anti-apoptotic/anti-inflammatory transgenes, i.e. human heme oxygenase 1 (hHO-1) and human A20 (hA20), was combined with a zinc-finger nuclease-mediated knockout of the α -galactosyltransferase gene. Kidneys from GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenic pigs were protected from acute vascular rejection during ex vivo perfusion with human blood in contrast to kidneys from wild-type pigs.

In the second porcine model, expression of tissue factor (TF), an important factor in the coagulation cascade, was significantly reduced by siRNA-mediated RNA interference. The decreased TF expression correlated with a significant prolongation of coagulation time after incubation of endothelial cell-coated beads with human whole blood. Thrombus formation was significantly decreased after perfusion of endothelial cells with human platelet rich plasma in a flow chamber.

Results of this study show that both pig lines can provide promising xenoprotective effects. These genetic modifications will be integrated into new multi-transgenic donor pigs to reduce or prevent the xenograft rejection after pig-to-primate xenotransplantation.

This project was funded by Cluster of Excellence REBIRTH, DFG TR CRC 127, the Swiss National Science Foundation, and the EU project “Xenome”.

Keywords: Xenotransplantation, transgenic pigs, acute vascular rejection

Einleitung

Die Übertragung porciner Xenotransplantate auf Menschen wird als vielversprechende Lösung für den Mangel an geeigneten humanen Spenderorganen angesehen. Schweine werden aufgrund ihrer großen genetischen, anatomischen und physiologischen Ähnlichkeit, mit dem Menschen als geeignete Spender betrachtet. Da beide Spezies phylogenetisch nur relativ entfernt miteinander verwandt sind, würde ein porcines Xenotransplantat nach Übertragung auf einen Menschen sofort durch eine starke Immunreaktion abgestoßen werden. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu überwinden, besteht in der genetischen Veränderung der Spenderschweine. Die erste immunologische Hürde für eine erfolgreiche Xenotransplantation zwischen Schwein und Mensch bzw. Primaten allgemein ist die hyperakute Abstoßungsreaktion (HAR), die unmittelbar nach einer Xenotransplantation auftritt. Durch die Verwendung von Organen von Schweinen mit homozygotem Knockout des α 1,3-Galactosyltransferase-Gens (GGTA1-KO) (PHELPS et al., 2003) oder transgener Expression humaner Komplementregulatoren kann die HAR wirksam unterdrückt werden (BYRNE et al., 1997; COWAN et al., 2000). Gegenstand der derzeitigen For-

schung ist die akute vaskuläre Abstoßungsreaktion (AVR), die als nächste Barriere eine längerfristige Funktion der Xenotransplantate im Empfänger verhindert. Die AVR ist im Wesentlichen durch Gefäßwandnekrosen und mikrovaskuläre Thrombosen gekennzeichnet, welche Folgen fehlgeleiteter Gerinnungsvorgänge sind (IWASE et al., 2014).

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt, um die AVR durch genetische Modifikationen im Schwein zu kontrollieren. Das erste Modell stellt eine dreifach genetisch veränderte Schweinelinie dar, in der die humanen Gene für Hämoxygenase (hHO-1) und A20 (hA20), die entzündungshemmende und anti-apoptotische Funktionen haben, auf einem GGTA1-KO Hintergrund exprimiert werden (AHRENS et al., 2015b). Grundlage für die Produktion dieser Tiere war eine bereits bestehende hHO-1-transgene Schweinelinie, deren Endothelzellen gegen TNF- α -induzierte Apoptose geschützt waren und deren Nieren Resistenz gegenüber xenogener Abstoßungsreaktion während *ex-vivo*-Nierenperfusionsen zeigten (PETERSEN et al., 2011).

Als weiteres protektives Transgen wurde hA20 im porcinen Genom exprimiert. A20 verhindert Entzündungsprozesse durch Blockade der NF- κ B-induzierten Endothelzellaktivierung (COOPER et al., 1996) und schützt Zellen vor TNF- α -vermittelter Apoptose (DANIEL et al., 2004). Darüber hinaus zeigten Endothelzellen von hA20-transgenen Schweinen in einer früheren Studie immun-modulatorische Effekte durch eine reduzierte Anfälligkeit für CD95(Fas)L-vermittelten Zelltod (OROPEZA et al., 2009). Ergänzend wurde das porcine α -Galactosyltransferase-Gen durch eine Zinkfinger-Nukleasen(ZFN)-induzierte Mutation in Exon 9 ausgeschaltet (GGTA1-KO). Wie wir bereits zuvor zeigen konnten, ist diese Methode äußerst effizient im Vergleich zu konventionellen Methoden des Gen-Targetings, die auf konventionellen Verfahren der homologen Rekombination basieren (HAUSCHILD-QUINTERN et al., 2013).

Die gestörte Regulation der Blutgerinnung ist ein weiterer wichtiger Aspekt der Xenotransplantation, die im zweiten Schweinemodell untersucht wurde. Tissue Factor (TF) spielt als Hauptinitiator der extrinsischen Gerinnungskaskade eine entscheidende Rolle in der Hämostase. Während der Xenotransplantation werden die Endothelzellen des Spenderorgans in einen prokoagulatorischen Zustand versetzt, was zur Hochregulierung der TF-Expression führt (LEE et al., 2012). Um die Koagulationskaskade positiv zu beeinflussen und eine Koagulationsstörung zu verhindern, wurde die Expression von porcinem TF hier durch siRNA-vermittelte RNA-Interferenz reduziert (TFkd; AHRENS et al., 2015a), da ein kompletter Knockout von TF zu embryonaler Letalität führt, wie aus Versuchen mit Mäusen bekannt war (TOOMEY et al., 1996).

Beide genetisch veränderte Schweinelinien (GGTA1-KO/hHO-1/hA20 und TFkd) wurden in dieser Arbeit durch *in-vitro*- und *ex-vivo*-Versuche hinsichtlich ihrer funktionellen xenoprotektiven Effekte charakterisiert.

Material und Methoden

Generierung GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgener Schweine

Fibroblasten einer bereits vorhandenen hHO-1-transgenen Schweinelinie (PETERSEN et al., 2011) dienten als Grundlage für das dreifach modifizierte Schweinemodell und wurden durch Elektroporation mit einem Plasmid-Paar transfiziert, das eine durch Zinkfinger-Nukleasen vermittelte Mutation im Exon 9 des GGTA1-Gens induzierte. Die transfizierten Zellen wurden mittels magnetischer Kugeln (Beads) selektiert. Zellen ohne Gal-Epitope wurden für den somatischen Kerntransfer verwendet und die rekonstruierten Embryonen durch midventrale Laparotomie auf synchronisierte Spendersauen übertragen. Die erste Trächtigkeit wurde nach 25 Tagen beendet. Die dabei gewonnenen

fetalen Fibroblasten wurden in einem zweiten Schritt mit einem Expressionsvektor für hA20 transfiziert, der auf dem Sleeping-Beauty-Transposon-System basiert (ZAYED et al., 2004). Es erfolgte eine Selektion der Fibroblasten in Neomycin-haltigem Kulturmedium, ehe sie für den somatischen Kerntransfer verwendet wurden.

Charakterisierung von GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenen Schweine

Die geborenen GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenen Ferkel wurden hinsichtlich ihrer Transgenexpression mit Hilfe von quantitativer reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) untersucht. Der Knockout des GGTA1-Gens wurde durch Durchflusszytometrie von Fibroblasten analysiert, die zuvor mit Isolektin-B4 inkubiert worden waren, welches eine hohe Affinität zu α -Galactosyl-Zuckerresten aufweist. Durch Sequenzierung der ZFN-Zielregion im GGTA1-Gen konnte die zugrunde liegende Mutation ermittelt werden.

In einem Assay mit radioaktivem Chrom (^{51}Cr) (HAUSCHILD et al., 2011) wurde die Anfälligkeit von GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenen Fibroblasten für die Lyse durch humane Antikörper/humanes Serum untersucht. Die Zellen wurden mit 100 μCi Natrium- ^{51}Cr -Chromat (GE Healthcare, Großbritannien) markiert und nach 18 Stunden mit gepooltem, komplementhaltigem humanem Serum inkubiert, ehe die abgegebene Radioaktivität mit einem Microbeta Scintillation Counter (Wallac, Finnland) gemessen wurde. Durch Inkubation der Zellen nur mit Medium wurde die spontane ^{51}Cr -Freisetzung ermittelt, durch Inkubation mit 2% Triton X-100 die maximale Freigabe. Die spezifische Lyse [%] wurde wie folgt errechnet: $(\text{experimentelle } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}) / (\text{maximale } ^{51}\text{Cr-Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr-Freisetzung}) \times 100$.

Schließlich wurden Nieren von GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenen Schweinen (transgene Versuchsgruppe) in einem *ex-vivo*-Perfusionskreislauf mit frischem humanem AB-positiven Vollblut und dem Zusatz von 1U/ml Heparin perfundiert, um die xenoprotektiven Eigenschaften der genetischen Modifikationen zu analysieren. Als Kontrollgruppen dienten vorangegangene Versuche mit Nieren von Wildtypschweinen, die mit humanem (xenogene Gruppe) oder mit porcinem (autologe Gruppe) Blut perfundiert worden waren. Während des gesamten Versuchs wurden in regelmäßigen Zeitabständen Blutproben entnommen, und folgende Parameter bestimmt: Thrombozytenkonzentration, D-Dimer-Konzentration, Antithrombin-Aktivität, Fibrinogenkonzentration und Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT)-Konzentration.

Generierung von TFkd-Schweinen

Für das zweite Projekt wurde ein Plasmid erstellt, das für eine siRNA kodierte, die gegen die Expression von TF mRNA gerichtet war (TFkd-Plasmid). Porcine Wildtyp-Fibroblasten wurden mit diesem TFkd-Plasmid sowie zur Resistenzvermittlung mit dem kommerziell erhältlichen DsRed-Vektor transfiziert und für 14 Tage mit 800 $\mu\text{g/ml}$ Geneticin im Kulturmedium selektiert. Zellen mit nachgewiesener Integration des TFkd-Plasmids wurden im Kerntransfer eingesetzt und geklonte Embryonen auf hormonell synchronisierte Empfängertiere übertragen.

Charakterisierung von TFkd-Schweinen

Die Expression der TFkd-siRNA wurde in lebend geborenen Nachkommen durch RT-qPCR unter Verwendung eines Stem-Loop-Primers untersucht (SEMAAN et al., 2012). Die Expressionslevel von TF mRNA in Fibroblasten wurden durch Standard-RT-qPCR mit denen von Wildtyp-Kontrollen verglichen. Für die Analyse der TF Proteinexpression wur-

den Western Blots mit porcinen Endothelzellen aus der Aorta (PAEC) durchgeführt. Die PAEC wurden dabei mit unterschiedlichen Konzentrationen von Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) inkubiert, um die TF Expression zu induzieren. Schließlich wurden die funktionellen Effekte des TFkd in zwei voneinander unabhängigen Gerinnungsassays charakterisiert. Im ersten Assay (BANZ und RIEBEN, 2006) wurden, TFkd PAEC auf Mikrocarrier-Beads gesät und anschließend mit humanem Vollblut inkubiert, ohne dass dem Blut Antikoagulantia zugefügt. Die Zeit bis zur Koagulation der Proben wurde visuell erfasst. Während des Gerinnungsassays wurden in regelmäßigen Zeitabständen Proben für Citratplasma genommen und darin per ELISA die Expression der Gerinnungsmarker D-Dimere und Prothrombinfragment 1 + 2 gemessen. Für den zweiten Assay wurden PAEC auf Mikrotiterplatten ausgesät und in einer Flusskammer (Bioflux 200 System, Fluxion Biosciences, USA) mit heparinisierendem, plättchenreichem humanem Plasma perfundiert (CONANT et al., 2009). Die Bildung von Thromben pro Gesichtsfeld wurde mit einer Bildverarbeitungssoftware quantifiziert und mit Image J ausgewertet.

Ergebnisse

Projekt A: GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgene Schweine

Generierung GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgener Schweine

GGTA1-KO/hHO-1-transgene Fibroblasten, die durch Transfektion mit einem ZFN-Plasmid-Paar und anschließender Selektion durch magnetische Beads erstellt worden waren, dienten als Grundlage für den somatischen Kerntransfer. Von einem GGTA1-KO/hHO-1-transgenen Feten isolierte Fibroblasten wurden für eine weitere Transfektion mit dem hA20-Expressionsvektor, der auf das Sleeping Beauty (SB) Transposon-System (ZAYED et al., 2004) basiert, und dem SB-Transposase-100X-Plasmid eingesetzt. Nach dem Transfer von 358 rekonstruierten Embryonen auf 4 Empfängertiere konnten an Tag 25 nach dem Embryotransfer 6 GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgene Feten gewonnen werden. Einer von ihnen diente als Fibroblastenspender für die Reklonierung. Für alle elf geborenen Ferkel wurde per PCR die Integration des hA20-SB-Transposons bestätigt (Daten nicht aufgeführt). Zwei GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgene Ferkeln (K746 und K747) wurden im Folgenden im Detail analysiert.

Analyse des ZFN-vermittelten GGTA1-KO

Durchflusszytometrische Analysen ergaben, dass Fibroblasten der GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenen Schweine (K746 und K747) keine Gal-Epitope aufwiesen, während diese in der Wildtyp-Positivkontrolle deutlich exprimiert wurden (Abb. 1a).

Durch Sequenzierung der ZFN-Zielregion innerhalb von Exon 9 des GGTA1-Gens wurde gezeigt, dass es in beide Allele durch eine Deletion von einer bzw. zwei Basen zu einer Leserasterverschiebung und dadurch bedingt zu einem vorzeitigen Translationsabbruch gekommen war (Abb. 1b).

Expression der Transgene hHO-1 und hA20

Durch RT-qPCR wurde die Expression beider Transgene in Fibroblasten von allen GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenen Feten und daraus reklonierten Ferkeln ermittelt. Die hHO-1 mRNA-Expression war bei den analysierten Ferkeln (n = 8) im Durchschnitt ~1,7-fach höher als bei den Feten (n = 3) (Abbildung 2a). Für hA20 wurden zum Vergleich zusätzlich Fibroblasten eines Schweins (K271) aus einer früheren hA20-transgenen Linie hinzugezogen, die über einen anderen Expressionsvektor erzeugt worden war (OROPEZA et al., 2009). Die hA20 mRNA-Expression der dreifach modifizierten Feten war ~37-fach

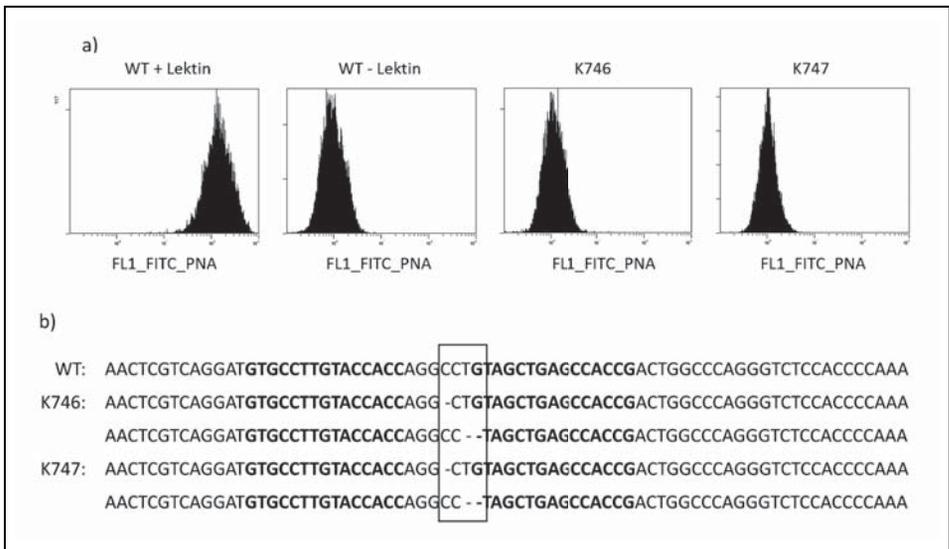


Abb. 1. Analyse des ZFN-vermittelten GGTA1-KO (nach AHRENS et al., 2015b); a) Durchflusszytometrische Analyse von GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenen (K746, K747) und Wildtypfibroblasten (WT + Lektin) nach Inkubation mit FITC-konjugiertem Isolektin-B4. Wildtypfibroblasten ohne Isolektin-Inkubation (WT - Lektin) dienten als Negativkontrolle. b) Sequenzierungsergebnis der ZFN-Zielregion innerhalb von Exon 9 des GGTA1-Genorts für die transgenen Schweine (K746, K747) im Vergleich zur nicht mutierten Sequenz (WT). Bindungsstellen der ZFN sind fettgedruckt, Mutationen sind durch einen Kasten markiert.

Analysis of ZFN-mediated GGTA1-KO; a) Flow cytometric analysis of GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenic (K746, K747) and wild-type fibroblasts (WT + Lektin) after incubation with FITC-conjugated isolectin-B4. Wild-type fibroblasts without lectin (WT - Lektin) served as negative control. b) Sequencing results of the ZFN target region within exon 9 of the GGTA1 locus for transgenic pigs (K746, K747) in comparison to the non-mutated sequence (WT). ZFN target region is indicated by bold letters, mutations are boxed.

höher, die Expression der reklonierten Ferkel ~27-fach höher als in K271 (Abbildung 2b). Beide Transgene wurden in Wildtypkontrollen nicht exprimiert.

⁵¹Cr-Freisetzungs-Assay

Die spezifische Lyse von Fibroblasten durch steigende Konzentrationen komplementhaltigen humanen Plasmas wurde im ⁵¹Cr-Freisetzungs-Assay quantifiziert. Trotz einer generell niedrigen spezifischen Lyse zeigten Fibroblasten von GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenen Schweinen im Vergleich zu Wildtypkontrollen eine reduzierte Anfälligkeit für antikörper-/komplementvermittelten Zelltod. Der Effekt war dosisabhängig und somit in der niedrigsten Verdünnungsstufe (1:5) am stärksten ausgeprägt: Durchschnittliche spezifische Lyse in WT: 18,1% ± 1,1% vs. GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgen 5% ± 1,1% (Abb. 3).

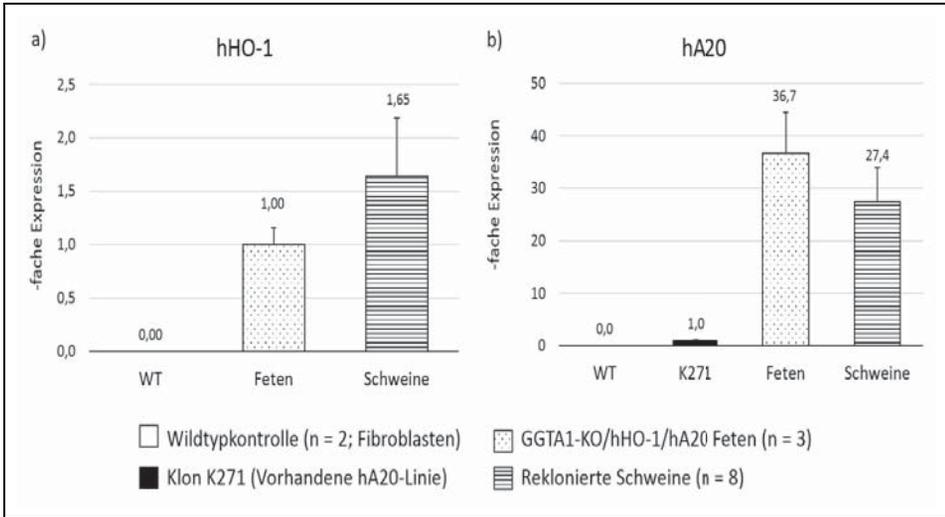


Abb. 2. Expression der Transgene durch RT-q-PCR (nach AHRENS et al., 2015b); a) HHO1 mRNA-Expression in Fibroblasten von GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenen Fetens (n = 3, gepunktet, auf 1 gesetzt) und daraus reklonierten Schweine (n = 8, gestreift). b) hA20 mRNA-Expression in Klon K271 (frühere hA20-transgenen Linie, schwarz, auf 1 gesetzt), GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenen Fetens (n = 3, gepunktet) und daraus reklonierten Schweinen (n = 8, gestreift). Wildtypfibroblasten (n = 2, weiß) dienen als Negativkontrolle. Die Ergebnisse sind als x-fache Expression + Standardabweichung angegeben, zwei technische Replikate pro Tier.

Transgene expression by RT-qPCR; a) HHO-1 mRNA expression in fibroblasts from GGTA1-KO/hHO-1/hA20 transgenic fetuses (n = 3, dotted, set = 1) and recloned pigs (n = 8, striped). b) hA20 mRNA expression in clone K271 (previous hA20-transgenic line, black, set = 1), GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenic fetuses (n = 3, dotted) and recloned pigs (n = 8, striped). Wild-type fibroblasts (n = 2, white) served as negative control. Results are -fold expression + standard deviation, two technical replicates per animal.

Ex-vivo-Nierenperfusion

Die *ex-vivo*-Perfusion von Nieren der dreifach modifizierten Schweine (transgene Gruppe) mit humanem Blut war für die komplette Versuchsdauer von 240 Minuten möglich, ohne dass die Nieren abgestoßen wurden. Obwohl für diese Versuchsgruppe kein Komplementinhibitor eingesetzt wurde, blieb der reno-vaskuläre Widerstand (RVR) konstant niedrig. Vergleichbare Ergebnisse konnten in einer historischen Kontrollgruppe für autologe Perfusion gezeigt werden, jedoch unter Verwendung eines Komplementinhibitors. In der historischen Kontrollgruppe für xenogene Perfusion hingegen wurde der Versuch trotz Zugabe des Komplementinhibitors nach einer durchschnittlichen Dauer von 142 ± 26 Minuten frühzeitig beendet, da der RVR dramatisch angestiegen war (Abbildung 4).

Während der Perfusionsdauer nahm die Thrombozytenkonzentration im Perfusat der transgenen und autologen Gruppe geringfügig ab, während sie in der xenogenen Kont-

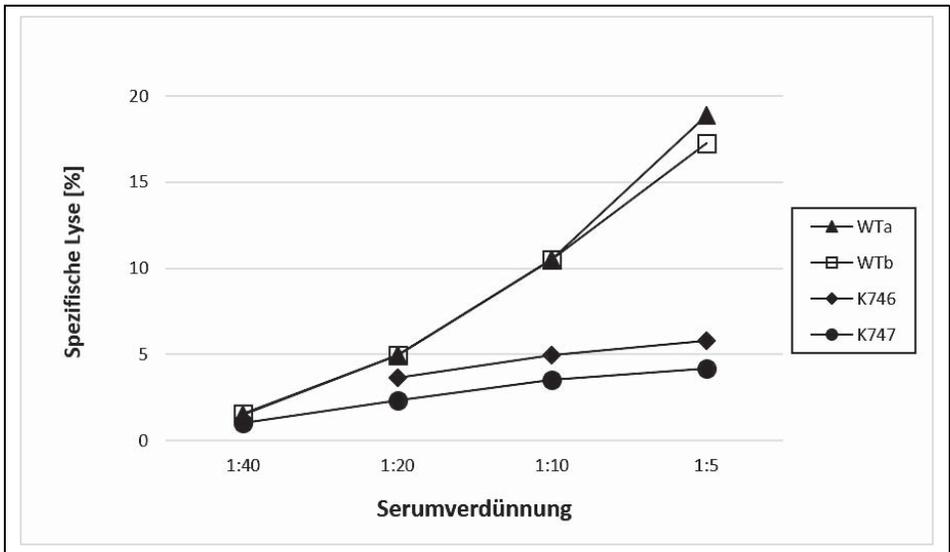


Abb. 3. Antikörper-/komplementvermittelte spezifische Lyse (nach AHRENS et al., 2015b); Anteil der spezifischen Lyse in GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenen (K746, K747) und Wildtypfibroblasten (WTa, WTb) nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen komplementhaltigen humanen Serums, ermittelt durch die Freisetzung von ^{51}Cr .

Antibody-/complement-mediated specific lysis; Proportion of specific lysis in GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenic (K746, K747) and wild-type fibroblasts (WTa, WTb) after incubation with different concentrations of complement preserved normal human serum, determined by ^{51}Cr release.

rollgruppe deutlich stärker sank (Abbildung 5a). Sowohl die Fibrinogen-Konzentration als auch die Antithrombin-Aktivität blieben in der transgenen und autologen Gruppe weitgehend konstant, nahmen in der xenogenen Gruppe hingegen deutlich ab (Abbildung 5b und c). Die Konzentrationen von D-Dimeren und Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT) blieben nur in der autologen Kontrollgruppe konstant niedrig, während für die transgene Gruppe ein mäßiger, für die xenogene Kontrollgruppe aber ein starker Anstieg im Verlauf der Perfusion verzeichnet wurde (Abb. 5d und e).

Projekt B: TFkd Schweine

Generierung von TF-Knockdown(TFkd)-Schweinen

Nach den ersten Embryotransfers auf sechs Empfängertiere konnte ein TFkd-Fetus (# 893/1) gewonnen werden und fetale Fibroblasten wurden zur Reklonierung und Embryotransfer auf 4 Empfängersauen eingesetzt. Insgesamt wurden 14 Ferkel geboren, davon 12 lebend (85,7%). Die sich aus allen zehn Transfers ergebende Kloneffizienz, definiert als Anzahl der Feten und Ferkel pro übertragenen Embryonen, betrug 2,1%. Die Integration des TFkd-Plasmids ins Genom der Schweine konnte für alle Tiere per PCR nachgewiesen werden (Daten nicht aufgeführt).

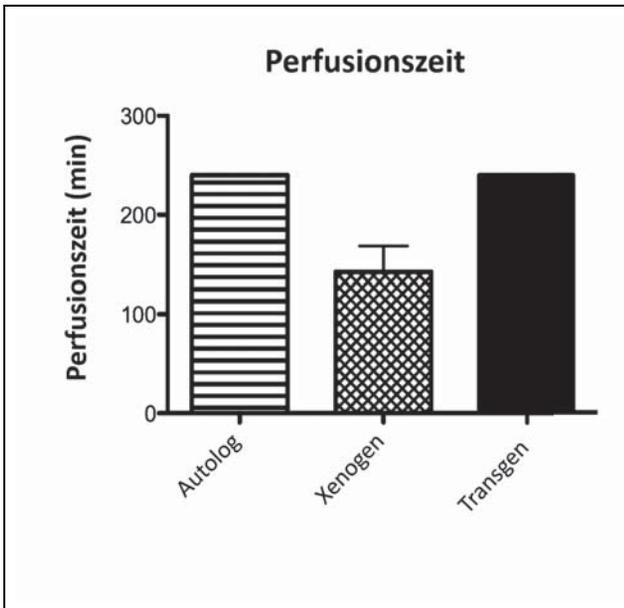


Abb. 4. Ex-vivo-Nierenperfusionszeit (nach AHRENS et al., 2015b); Ermittelte Nieren-Perfusionszeit der drei Versuchsgruppen: autolog (n = 5, gestreift), xenogen (n = 10, kariert) und GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgen (n = 2, schwarz).

Ex vivo kidney perfusion time; Kidney perfusion time of the three experimental groups: autologous (n = 5, striped), xenogeneic (n = 10, squared bar), and GGTA1-KO/hHO-1/hA20 transgenic (n = 2, black bar).

Expression von TFkd-siRNA, TF mRNA und Protein

Die Expression der gegen TF gerichteten siRNA (TFkd-siRNA) wurde anhand einer Stem-Loop-RT-qPCR in Fibroblasten überprüft. Die TFkd-siRNA wurde sowohl in Fetus # 893/1 (Abbildung 6a) als auch allen getesteten reklonierten Ferkel (Abb. 6b) exprimiert. Wildtypzellen hingegen wiesen kein PCR-Produkt auf.

Um zu charakterisieren, welchen Einfluss die TFkd-siRNA auf die Expression von TF hat, wurden die Expressionslevel für TF mRNA zwischen den Wildtypfibroblasten vor der Transfektion und den nach der Transfektion daraus hervorgegangenen Nachkommen verglichen. In Fetus # 893/1 lag das TF mRNA-Expressionslevel bei 36,8% der ursprünglichen Expression in den Wildtypzellen (Abbildung 7a). Die Gruppe der reklonierten Ferkel zeigte im Mittel sogar eine Reduktion der TF-mRNA-Expression um $94,1 \pm 4,7\%$ (Abb. 7b).

PAEC, die mit unterschiedlichen Konzentrationen TNF- α inkubiert worden waren, dienten als Grundlage für die Untersuchung der TF Protein-Expression durch einen Western Blot mit fluoreszierendem Sekundärantikörper. Quantifizierung der Blotbanden über Image J zeigte, dass die durchschnittliche Fluoreszenz-Intensität (Mean Fluorescence Intensity, MFI) in den PAEC der TFkd-Tiere im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen reduziert war (unstimuliert: TFkd: $6408,0 \pm 35,4$ MFI vs. WT: $8362,0 \pm 495,0$ MFI). Zudem stieg die TF-Expression trotz der Zugabe von TNF- α in den TFkd-Proben nur geringfügig an, während TF Protein in den Wildtypkontrollen signifikant hochreguliert wurde (stimuliert mit 10 ng/ml TNF- α : TFkd: $6613,5 \pm 367,0$ MFI vs. WT: $9491,0 \pm 357,8$ MFI, $p = 0,0497$; stimuliert mit 50 ng/ml TNF- α : TFkd $7136,0 \pm 135,8$ MFI vs. WT: $1338,0 \pm 1671,6$ MFI, $p = 0,0013$ (Abb. 8a und b).

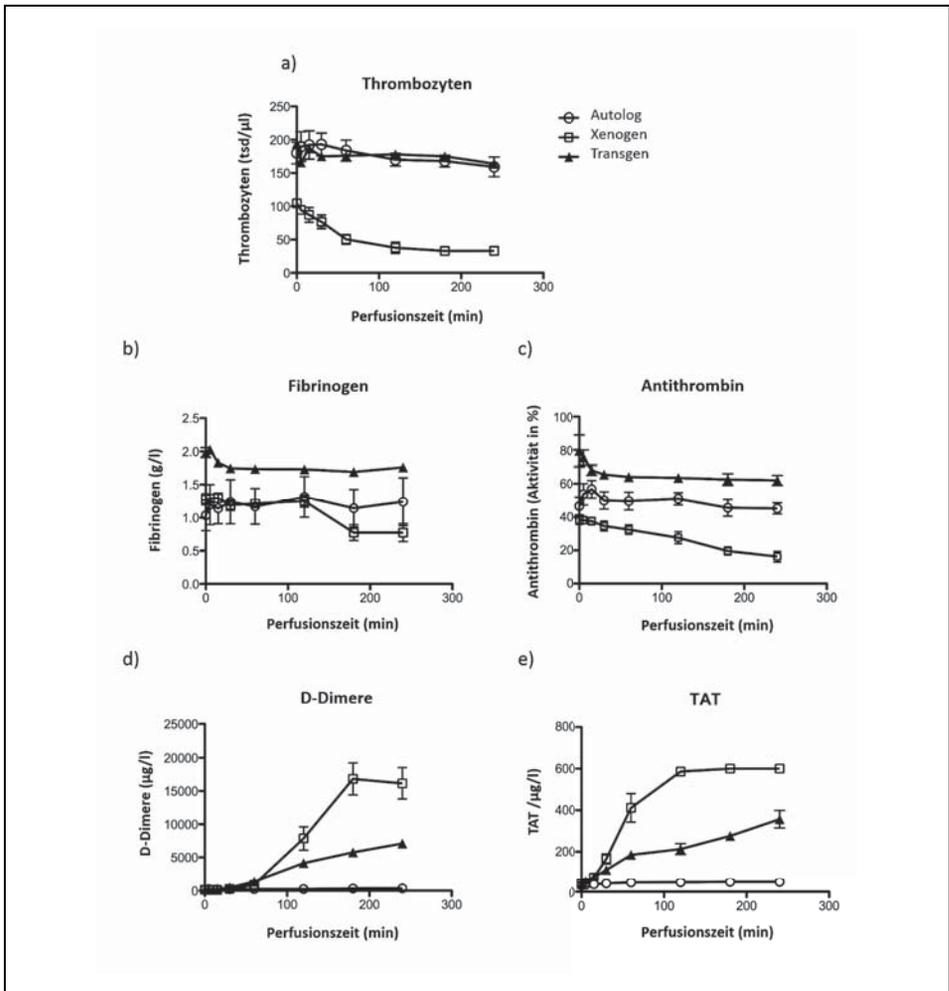


Abb. 5. Gerinnungsparameter während der Nierenperfusion (nach AHRENS et al., 2015b); Änderungen der a) Thrombozytenkonzentration, b) Fibrinogenkonzentration, c) Antithrombinaktivität, d) D-Dimer-Konzentration und e) Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT) im Verlauf der Perfusion für die drei Versuchsgruppen.

Coagulation parameters during kidney perfusion Change of a) thrombocyte count, b) Fibrinogen concentration, c) Antithrombin activity, d) D-Dimer concentration, and e) Thrombin-Antithrombin complex (TAT) during the course of perfusion for the three experimental groups.

Mikrocarrier-Bead Gerinnungsassay

Um den funktionalen Effekt des TFkd zu untersuchen, wurden PAEC auf Mikrocarrier-Beads gesät und mit humanem Vollblut inkubiert, bis die Gerinnung beobachtet werden konnte. Die durchschnittliche Gerinnungszeit nach vier unabhängigen Experimen-

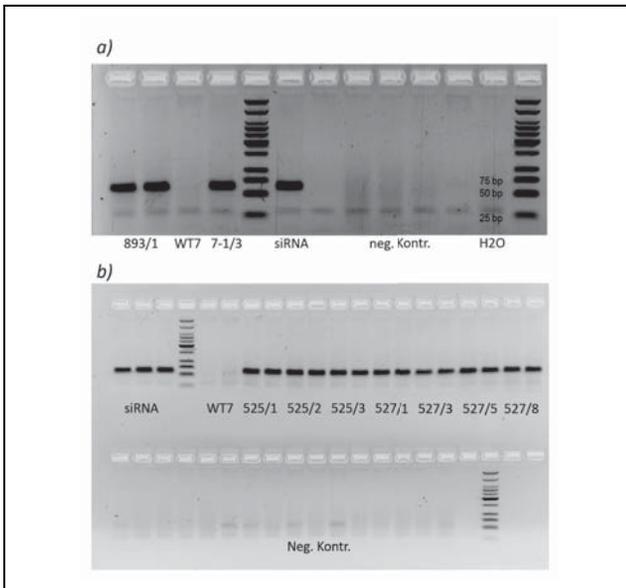


Abb. 6. Detektion der siRNA durch stem-loop RT-qPCR (nach AHRENS et al., 2015a); a) Fetus # 893/1, untransfizierte (WT7) und transfizierte Wildtypfibroblasten (7-1/3) sowie siRNA-, Wasser und Negativkontrollen. b) SiRNA-Kontrolle, untransfizierte Wildtypfibroblasten (WT7), reklonierte Ferkel (525/1 - 527/8), und Negativkontrollen.

Detection of siRNA by stem-loop RT-qPCR; a) Fetus # 893/1, untransfected (WT7) and transfected wild-type fibroblasts (7-1/3), siRNA, water, and negative controls. b) SiRNA control, untransfected wild-type fibroblasts (WT7), recloned piglets (525/1 - 527/8), and negative controls.

ten lag bei der Wildtypkontrolle bei $45,8 \pm 7,7$ Minuten. PAEC, die von TFkd-Schweinen stammten, wiesen eine signifikant verlängerte Gerinnungszeit von $73,3 \pm 8,8$ Minuten ($p < 0,0001$) auf (Abb. 9). Diese Ergebnisse spiegelten sich in den Gerinnungsparametern Prothrombinfragment 1 + 2 sowie D-Dimeren wider, die in regelmäßigen Abständen aus Citratplasmaproben des Gerinnungsansatzes ermittelt wurden. Für beide Parameter kam es während der Versuchsdauer zu einem Anstieg der Konzentration. Dieser war jedoch bei den Wildtyp-PAEC signifikant höher als bei den TFkd-PAEC (D-Dimere in WT-PAEC: $735,8 \pm 25,0$ ng/ml vs. TFkd: $254,1 \pm 31,3$ ng/ml nach 20 min.; WT: $1618,3 \pm 75,1$ ng/ml vs. TFkd: $457,6 \pm 43,7$ ng/ml nach 40 min., $p < 0,0001$; Prothrombinfragment 1 + 2 in WT-PAEC: $73,7 \pm 8,4$ ng/ml vs. TFkd: $28,7 \pm 3,6$ ng/ml nach 20 min.; WT: $93,8 \pm 14,6$ ng/ml vs. TFkd: $45,3 \pm 5,1$ ng/ml nach 40 min., $p < 0,0001$) (Abb. 10a und b).

Thrombusbildung im Flusskammer-Assay

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung wurden PAEC in Mikrotiterplatten einer Flusskammer gesät und mit heparinisiertem (1 U/ml), plättchenreichem Humanplasma perfundiert. Im Vergleich zu Wildtypkontrollen war die detektierte Thrombusbildung bei den TFkd-PAEC signifikant reduziert (TFkd: $3,18 \pm 3,75\%$, $n = 13$ Assays von 3 verschiedenen Tieren vs. WT: $23,5 \pm 13,01\%$, $n = 20$ Assays von 3 verschiedenen Tieren, $p < 0,0001$) (Abb. 11).

Diskussion

Durch die genetische Modifikation von Schweinen, die potentielle Organspender für Menschen mit terminalem Organversagen darstellen, ist es bereits möglich, die hyperakute Transplantatabstoßung als erste Hürde der Xenotransplantation zwischen Schwei-

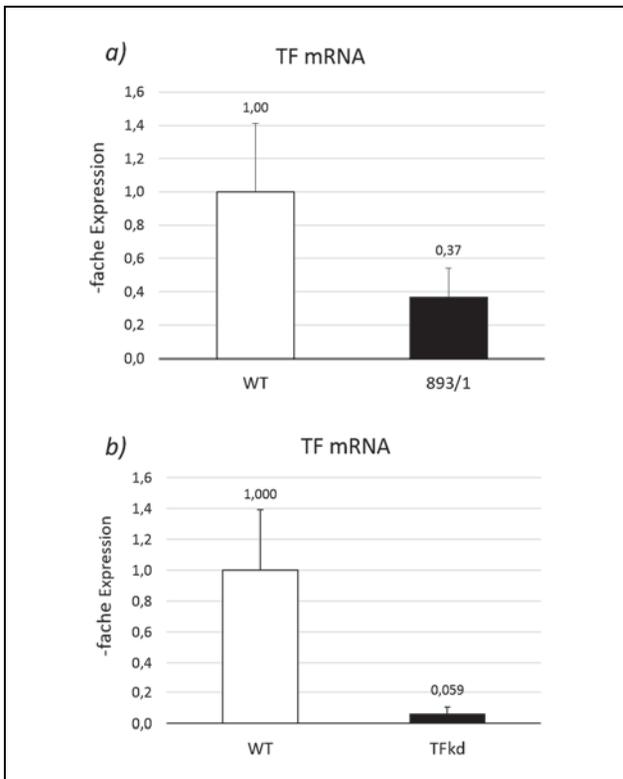


Abb. 7. TF mRNA-Expression durch RT-qPCR (nach AHRENS et al., 2015a); a) TF mRNA-Expression in untransfizierten Wildtypfibroblasten und Fetus (893/1. b) TF mRNA-Expression in untransfizierten Wildtypfibroblasten und reklonierten TFkd-Schweinen (n = 7). Ergebnisse normalisiert mit Gapdh und Eef1A1, dargestellt als Mittelwert + Standardabweichung.

TF mRNA expression by RT-qPCR; a) TF mRNA expression in untransfected wild-type fibroblasts and fetus (893/1. b) TF mRNA expression in untransfected wild-type fibroblasts and recloned TFkd pigs (n = 7). Data were normalized to Gapdh and Eef1A1 and are given as mean + SD.

nen und Primaten zu überwinden. Somit steht momentan die Prävention der akuten vasculären Abstoßungsreaktion (AVR) im Vordergrund, die ein komplex zusammenhängender Prozess aus Immunreaktion, Entzündung und Blutgerinnung ist. Aus diesem Grund sind verschiedene Herangehensweisen erforderlich, um die AVR zu unterbinden und die Überlebensdauer von Xenotransplantaten zu verlängern. Für die in dieser Arbeit erzeugten genetisch modifizierten Schweinelinien konnte gezeigt werden, dass sich durch zwei solche Strategien vielversprechende xenoprotektive Effekte erzeugen lassen. Im ersten Modell, den GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenen Schweinen, liegt der Fokus auf der Verhinderung von Entzündung und Apoptose, während mit dem TFkd-Modell eine Linie erzeugt wurde, die auf die fehlregulierte Blutgerinnung abzielt.

Projekt A

In der ersten Schweinelinie wurde das GGTA1-Gen, das für die Expression eines der wichtigsten xenogenen Antigen, dem Gal-Epitop, verantwortlich ist, mittels Zinkfinger-nukleasen (ZFN) ausgeknockt. ZFN führen zu einem Doppelstrangbruch innerhalb des Zielgens, der durch die zellulären Reparaturmechanismen wie Non-homologous end-joining häufig fehlerhaft repariert wird und somit zu einer Mutation führt. Sie können in

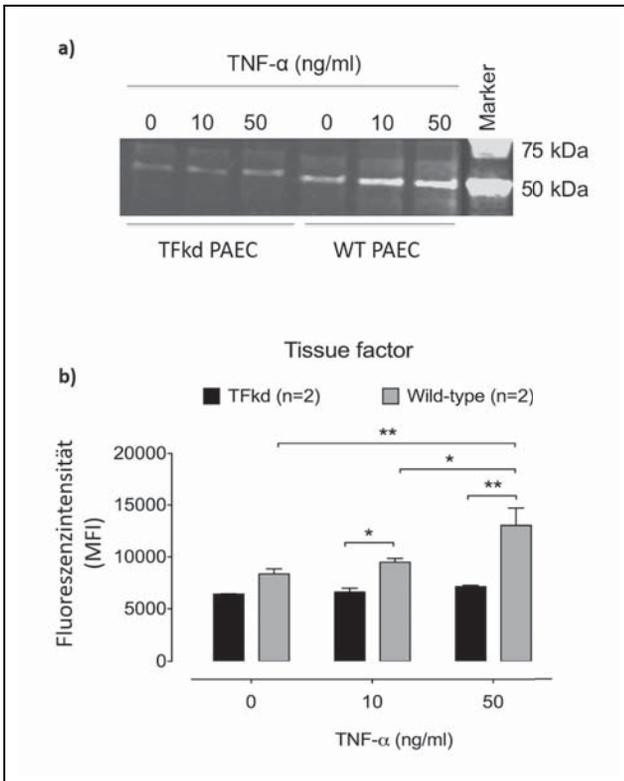


Abb. 8. TF Western Blot Analyse (nach AHRENS et al., 2015a); a) Western-Blot-Banden nach Inkubation von TFkd- und WT-PAEC mit 0 – 50 ng/ml TNF- α . b) Mittlere Fluoreszenzintensität der Blotbanden. Auswertung durch Image J. TF Western blot analysis; a) Western blot bands after incubation of TFkd and WT PAEC with 0 – 50 ng/ml TNF- α . b) Mean fluorescence intensity of blot bands. Analysis by Image J.

einem Schritt beide Allele eines Gens ausschalten und sind besonders effizient im Vergleich zu konventionellen Methoden (HAUSCHILD et al., 2011). Der Zielort der ZFN befand sich für dieses Projekt innerhalb von Exon 9 des GGTA1-Gens in der katalytisch aktiven Domäne des Enzyms. Da sich die Gal-Epitope auf der Zelloberfläche befinden, war es möglich, die Zellen nach dem Knockout mit magnetischen Beads zu selektieren. Dadurch konnten die gewünschten Gal-negativen Zellen angereichert werden, ehe sie für den somatischen Kerntransfer genutzt wurden. Durchflusszytometrie-Untersuchungen und anschließende Sequenzierung ergaben, dass der GGTA1-KO in den dreifach modifizierten Schweinen erfolgreich war. Somit wurde durch ZFN die Expression eines der wichtigsten Xenoantigene verhindert.

Neben der Prävention der HAR durch den GGTA1-KO verfügt die erste Schweinelinie mit hHO-1 und hA20 über zwei anti-apoptotische und entzündungshemmende Moleküle. Beide sind zudem als „xenoprotektive Gene“ bekannt (BACH et al., 1997), die Schutz vor den bei Transplantationen nicht zu vermeidenden Ischämie-Reperfusionsschäden bieten (LUTZ et al., 2008; YET et al., 2001).

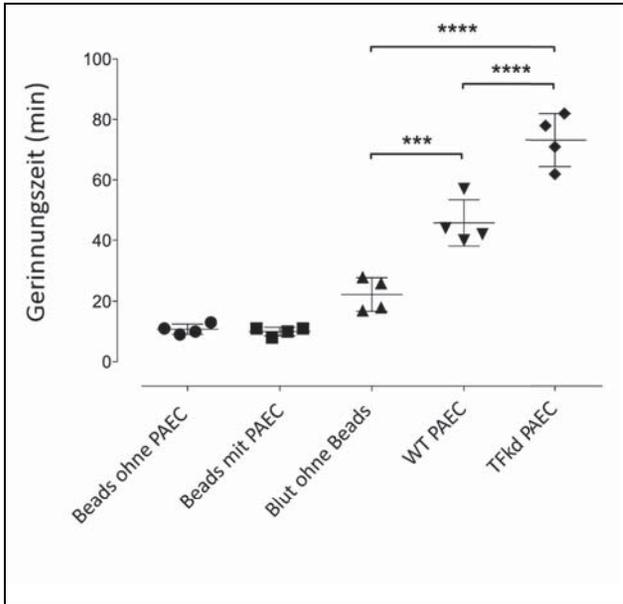


Abb. 9. Mikrocarrier-Bead-Assay (nach AHRENS et al., 2015a); Gerinnungszeit nach Inkubation von PAEC-umhüllten Beads mit humanem Vollblut. Jeder Punkt stellt ein einzelnes Experiment dar, die Linien Mittelwerte und Standardabweichungen. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, berechnet mittels One-way ANOVA mit Bonferroni post test.

Microcarrier bead assay; Coagulation time after incubation of PAEC-coated beads with human whole blood. Each point represents a single experiment, lines indicate mean and standard deviations. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ by One-way ANOVA and Bonferroni's post test.

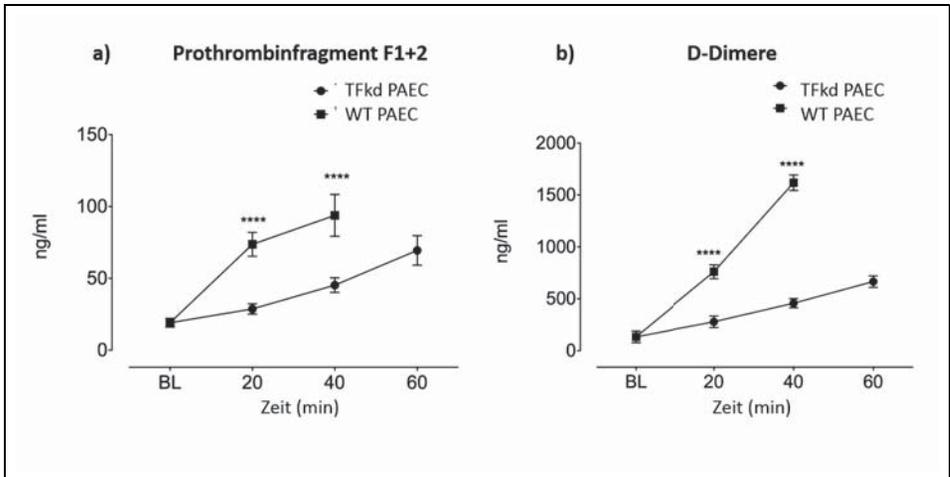


Abb. 10. Konzentration von Gerinnungsmarkern (nach AHRENS et al., 2015a); Konzentration von a) Prothrombinfragment F1 + 2 und b) D-Dimeren im Verlauf des Mikrocarrier-Bead-Assays, ermittelt durch ELISA. Die Punkte stellen Mittelwerte von $n = 4$ Experimenten dar, die Balken zeigen die Standardabweichungen. **** $p < 0,0001$ gegenüber WT, berechnet mittels One-way ANOVA mit Bonferroni post test.

Concentration of coagulation markers; Concentration of a) Prothrombin fragment F1 + 2 and b) D-Dimers during the cause of the microcarrier bead assays, determined by ELISA. Values are mean \pm standard deviation of $n = 4$ experiments. **** $p < 0.0001$ vs. WT, calculated by One-way ANOVA and Bonferroni's post test.

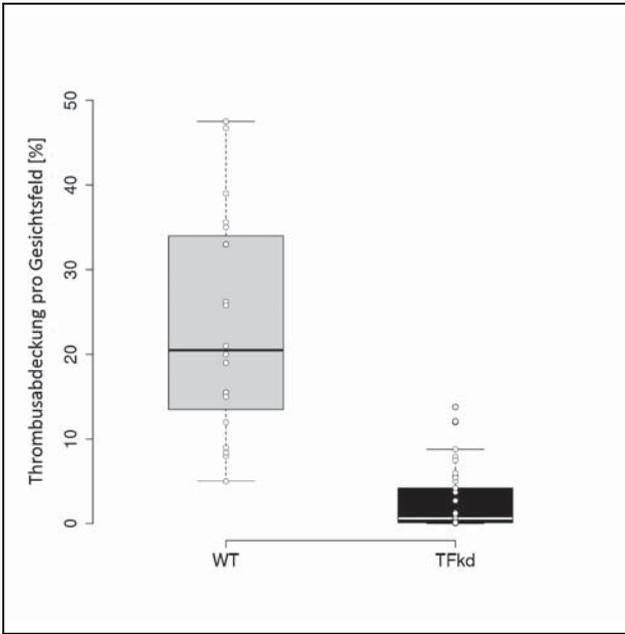


Abb. 11. Thrombusbildung nach Perfusion in Mikrotiterplatten-Flusskammer (nach AHRENS et al., 2015a); Thrombusabdeckung pro Gesichtsfeld nach Perfusion von Wildtyp- ($n = 3$) und TFkd-PAEC ($n = 3$) mit humanem plättchenreichem Plasma. $P < 0.0001$). Jeder Punkt ist eine eigene Messung. Thrombus formation after perfusion in microwell plate flow chamber; Thrombus coverage per viewing field after perfusion of wild-type ($n = 3$) and TFkd PAEC ($n = 3$) with human platelet rich plasma. $P < 0.0001$). Each dot represents a single measurement.

Die Expression und Wirkung von hHO-1 wurde bereits in einer früheren monotransgenen Linie analysiert (PETERSEN et al., 2011), welche als genetische Grundlage für die neuen, dreifach-modifizierten Schweine diente. Die beobachteten Effekte der HO-1 sind darauf zurück zu führen, dass HO-1 cytotoxisches freies Häm zu anti-apoptisch wirksamem Kohlenmonoxid (CO) (BROUARD et al., 2000), dem potenten Antioxidans Biliverdin und freiem Eisen (Fe^{2+}) abbaut. Letzteres wird in einer nicht-toxischen Form an Ferritin gebunden gespeichert (BALLA et al., 1992).

Das zweite Transgen hA20 wurde mithilfe des Sleeping-Beauty-Transposon-Systems der neuen Schweinelinie zugefügt. Transposon-Systeme haben den Vorteil, dass nur das Transposon selbst ohne Vektor Backbone ins Zielgenom integriert wird. Zudem erfolgt im Fall der Transposase SB100X die Integration des Transposons bevorzugt in permissive Loci (GARRELS et al., 2011), wodurch seine Stilllegung („gene silencing“) von Genen weniger wahrscheinlich ist. Aus diesem Grund führt genetische Modifikation durch das SB Transposon-System oft zu hoher, stabiler Genexpression.

Die schrittweise Erzeugung der Schweine mit intermediären Klonierungsschritten nach jeder genetischen Modifikation ermöglichte die schrittweise Charakterisierung und Selektion der Zellen nach Expressionshöhe der Transgene. Zudem wurde dadurch gewährleistet, dass die jeweils bestentwickelten Feten und Ferkel zur Erzeugung der neuen Schweinelinie verwendet wurden, um eine möglichst gute Ausgangslage für vitale multi-transgene Schweine zu haben.

Die Expression beider Transgene wurde durch RT-qPCR analysiert. Dadurch wurde bestätigt, dass alle GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenen Feten und Ferkel hHO-1 exprimierten. Im Vergleich zu einer bereits vorhandenen hA20-transgenen Linie, die mithilfe

eines anderen Vektorsystems erzeugt wurde (OROPEZA et al., 2009), war die mRNA-Expression von hA20 in den GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenen Ferkeln ~ 27 -fach erhöht. Diese Steigerung der Expressionshöhe lässt sich auf die Verwendung des SB-Transposon-Systems zurückführen, allerdings kann auch der Einfluss der Insertionslokalisation oder einer möglichen unterschiedlichen Kopien-Anzahl auf die Expressionshöhe nicht ausgeschlossen werden, was in dieser Arbeit jedoch nicht weiterführend untersucht wurde.

In einem ^{51}Cr -Freisetzungs-Assay konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten von GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenen Schweinen besser vor antikörper-/komplementvermittelter spezifischer Lyse geschützt waren als Wildtypkontrollen und die Zytotoxizität trotz steigender Serumkonzentration auf einem Basisniveau blieb. Zum einen fehlte in den transgenen Fibroblasten das Hauptantigen als Bindungspartner für die humanen Antikörper, um eine starke Komplementaktivierung hervorzurufen, zum anderen ist es vorstellbar, dass die anti-apoptotische Wirkung von hHO-1 und hA20 zu diesem Ergebnis beigetragen hat.

Schließlich wurden Nieren der GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenen Schweine in einem gut etablierten *ex-vivo*-Perfusionskreislauf analysiert (RAMACKERS et al., 2008), um die biologischen Funktionen der genetischen Modifikationen zu überprüfen. Die *ex-vivo*-Perfusion ersetzt keine *in-vivo*-Studie und erlaubt aufgrund der Limitierung des eingesetzten Blutvolumens keine Langzeituntersuchungen, ist jedoch ein gutes Modell, um die Resistenz gegenüber Abstoßungsreaktionen in Nieren von genetisch modifizierten Spenderschweinen einzuschätzen, ehe man Transplantationen in Primaten durchführt. Dies ist nicht nur aus Kostengründen und tierschutzrechtlicher Sicht sinnvoll, sondern bietet zudem den Vorteil, dass die Nieren direkt mit humanem statt mit Blut von nicht-humanen Primaten perfundiert werden.

Die Nierenperfusion mit heparinisiertem humanem Blut war bei den GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenen Schweinen ebenso wie bei der autologen Kontrollgruppe für die gesamte experimentelle Dauer von 240 Minuten möglich, ohne dass Anzeichen einer Abstoßungsreaktion, definiert durch den Anstieg des reno-vaskulären Widerstands, erkennbar waren. In der Gruppe der historischen Wildtypkontrollen kam es trotz des Zusatzes eines Komplementinhibitors, der das Einsetzen der Komplementaktivierung verzögert, aber nicht verhindert soll (RAMACKERS et al., 2008), zu einem vorzeitigen Ende der Perfusion (142 ± 26 Minuten). In der GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenen Gruppe konnte auf den Zusatz des Komplementinhibitors verzichtet werden, da durch den GGTA1-KO das Eintreten der HAR bereits vermieden wurde. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass die Perfusionszeit in der Wildtypgruppe ohne Komplementinhibitor deutlich verkürzt war (126 ± 72 Minuten mit Inhibitor, 60 ± 0 Minuten ohne Inhibitor) (PETERSEN et al., 2011). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der Unterschied zwischen GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenen und Wildtypschweinen noch wesentlich stärker ausgefallen wäre, wenn auch bei der Wildtypkontrolle kein Komplementinhibitor eingesetzt worden wäre. In der früheren Studie konnten Nieren von hHO-1-transgenen Schweine für 230 ± 25 Minuten mit Komplementinhibitor und 190 ± 80 Minuten ohne Komplementinhibitor perfundiert werden (PETERSEN et al., 2011). Im Vergleich zu dieser früheren Studie wird deutlich, dass die GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenen Schweine zum einen eine deutlich verlängerte Überlebenszeit als die xenogene Wildtypkontrollgruppe aufwiesen, aber auch im Vergleich zu den hHO-1-transgenen Schweinen länger perfundiert werden konnten. Es lässt sich jedoch nicht genau sagen, ob diese Verbesserung allein durch den GGTA1-KO oder den Zusatz der hA20-Expression oder ein Zusammenspiel aus beiden Faktoren erreicht wurde.

Aus Analysen der Gerinnungsparameter aus den Perfusatproben wurde ersichtlich, dass diese während der Perfusion der GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenen Nieren nicht

in so starkem Maße anstiegen (D-Dimere und TAT), beziehungsweise kaum verbraucht wurden (Thrombozyten, Fibrinogen und Antithrombinaktivität) im Vergleich zu den Wildtypnieren. Obwohl in den dreifach-modifizierten Nieren kein antikoagulatorisches Transgen exprimiert wurde, waren diese zumindest teilweise vor der Aktivierung der Gerinnungskaskade und Thrombusentstehung geschützt. Diese Wirkung lässt sich dadurch erklären, dass aufgrund der anti-apoptotischen und entzündungshemmenden Wirkung von hHO-1 und hA20 das Endothel in gewissem Umfang vor einer Schädigung und Aktivierung mit nachfolgender Expression prokoagulatorischer Moleküle wie beispielsweise TF geschützt war.

Projekt B

Diese prokoagulatorischen Mechanismen, insbesondere die Expression von Tissue Factor, standen im Fokus des zweiten Schweinemodells. TF hat als Initiator der extrinsischen Koagulationskaskade eine zentrale Bedeutung für die überschießende Gerinnungsaktivierung im Rahmen der Xenotransplantatabstoßung. Es war bereits gezeigt worden, dass porcine Endothelzellen nach Inkubation mit humanem Blut durch den Anstieg von TNF- α die Expression von TF im Rahmen prokoagulatorischer Veränderungen erhöhten (LEE et al., 2012). In einer *in-vitro*-Studie, in der die Expression von TF in neonatalen porcinen Pancreas-Inselzellen durch Antisense-RNA herunter reguliert wurde, konnte die üblicherweise bei der Xenotransplantation von Inselzellen auftretende Immunreaktion verhindert werden (MA et al., 2012).

Die Aufrechterhaltung des Blutflusses erfordert es, ein Gleichgewicht zwischen Blutungsneigung und Blutgerinnung zu bilden. Dieses System ist sehr sensibel und gleichzeitig durch eine Vielzahl von Mechanismen reguliert. Das eine oder andere Extrem kann zu einem Zustand führen, der nicht mit dem Leben vereinbar ist. Das wurde in früheren Mäusestudien deutlich, in denen ein homozygoter Knockout von TF zu embryonaler Letalität führte (CARMELIET et al., 1996; TOOMEY et al., 1996). Heterozygote Mäuse aus diesen Studien waren vital, während ihre homozygoten Geschwister aufgrund von gestörter Dottersackentwicklung und vitello-embryonalem Blutfluss zwischen Tag E8,5 und E9,5 starben. Durch die niedrige Expression von humanem TF über einen Minivektor konnten sich TF-Knockout-Mäuse aber doch weiter entwickeln und zu vitalen Jungtieren führen (PARRY et al., 1998). Diese Studien verdeutlichen, wie wichtig TF für die Embryonalentwicklung ist und dass eine erfolgreiche Entwicklung wesentlich vom TF-Expressionslevel abhängt.

Auf Grundlage dieser Daten ist TF ein interessantes Kandidatengen für einen *in-vivo*-Knockout, um eine überschießende Gerinnungsaktivierung und die Entstehung mikrovaskulärer Thrombosen nach der Xenotransplantation zu verhindern. Der Knockout wurde in der vorliegenden Studie durch eine siRNA induziert, die die Expression von TF post-transkriptionell herunter reguliert. Bisher wurden nur in wenigen Studien solche Knockdown-Tiere generiert, darunter Rinder und Schafe mit verbesserter Milch- (JABED et al., 2012) oder Fleischqualität (HU et al., 2013) sowie Schweine mit inhibierter Expression des porcinen endogenen Retrovirus (DIECKHOFF et al., 2008; RAMSOONAR et al., 2009) oder Resistenz für Maul- und Klauenseuche (HU et al., 2015). Die Schwierigkeit bestand in der vorliegenden Studie darin, ein Expressionslevel von TF zu erreichen, das mit der Embryonalentwicklung und dem Leben der Tiere vereinbar ist, aber auch einen hemmenden Einfluss auf die Entstehung mikrovaskulärer Thrombosen während der Xenotransplantation hat.

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals vitale Schweine mit stabilem TFkd generiert werden. Die Tiere entwickelten sich normal und zeigten keine Anzeichen einer erhöhten Blutungsneigung unter normalen Haltungsbedingungen. Die Expression der

siRNA konnte bei allen Tieren nachgewiesen werden und korrelierte mit einer reduzierten TF mRNA-Expression. Auch die Proteinexpression war deutlich niedriger als bei Wildtypkontrollen. Im Western Blot wurde vor allem deutlich, dass die Expression von TF in den PAEC der TFkd-Tiere trotz TNF- α -Stimulierung nur wenig anstieg, während es zu einer deutlichen Hochregulierung in der Kontrollgruppe kam. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass in der TFkd-Gruppe bereits unter unstimulierten Bedingungen der Großteil der vorhandenen TF-Moleküle exprimiert wurde und trotz Entzündungsreiz die Bereitstellung weiterer Moleküle nicht möglich war. Genau dieser Zustand wäre bei einer Xenotransplantation wünschenswert: Verhinderung spontaner Blutungen der Spenderschweine durch ausreichend hohe TF Expression, aber auch Unterbindung der TF-Hochregulierung nach Aktivierung des Endothels, um die Entstehung von Thromben zu vermeiden.

Um den funktionellen Effekt des TFkd zu untersuchen, wurden Endothelzellen aus der Aorta einiger Tiere auf Beads gesät und mit humanem Vollblut bis zum Eintreten der Gerinnung inkubiert. Da die Reaktionsoberfläche mit dem Blut durch die Beads vergrößert war, konnte in diesem Versuchsansatz auf Antikoagulantia verzichtet werden (BANZ and RIEBEN, 2006). Dadurch waren das Komplement- und Gerinnungssystem voll reaktionsfähig, was die Durchführung des Assays unter Voraussetzungen ermöglichte, die den physiologischen Bedingungen nahe kommen. Der Knockdown von TF führte zu einer signifikanten Verlängerung der Gerinnungszeit und einem entsprechend geringeren Anstieg der Gerinnungsaktivierungsmarker D-Dimere und Prothrombinfragment 1 + 2.

In einem zweiten funktionellen Test wurde die Thrombusbildung in der Bioflux 200 Mikroflusskammer untersucht. Dieses System ermöglicht im Gegensatz zu konventionellen statischen Versuchsbedingungen die Thrombusbildung unter verschiedenen laminaren Flussbedingungen. In diesem Versuch wurden PAEC mit humanem, plättchenreichem Plasma unter Zugabe von niedrig dosiertem Heparin (1 U/ml) perfundiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Thrombusbildung in TFkd-PAEC signifikant reduziert war.

Mit diesen zwei unabhängigen funktionellen Assays wurde verdeutlicht, dass der Knockdown von TF unter *in-vitro*-Bedingungen die Aktivierung von Gerinnungsvorgängen hemmt und unterstützt die These, dass dieser Knockdown *in vivo* die Bildung von mikrovaskulären Thrombosen zu verhindern.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass in dieser Arbeit zwei genetisch modifizierte Schweinelinien vorgestellt wurden, deren xenoprotektive Eigenschaften durch *in-vitro*- und *ex-vivo*-Versuche demonstriert wurden. Beide Linien sprechen unterschiedliche Aspekte der Xenotransplantatabstoßung an und haben das Potential, die schädlichen Auswirkungen der AVR zu verhindern. Aus diesem Grund bietet sich eine zukünftige Kombination der GGTA1-KO/hHO-1/hA20-transgenen Linie mit der TFkd-Linie an, um die Überlebenszeit von Xenotransplantaten wesentlich zu verbessern. Schließlich ist jedoch auch die Integration weiterer genetischer Modifikationen nötig, um beispielsweise die zelluläre Xenotransplantatabstoßung zu kontrollieren und somit das optimale Spenderschwein zu generieren, das für eine zukünftige Bereitstellung von Xenotransplantaten gezüchtet werden kann.

Danksagungen

Wir danken dem Klonteam für ihren Einsatz beim Kerntransfer und dem SVA-Team für die gute Versorgung der Schweine. Dr. Zoltán Ivics gilt unser Dank für die Bereitstellung des Sleeping Beauty-Transposonsystems und Stoyan Petkov, PhD, für dessen Modifizierung. Wir danken Dr. Joachim Denner für die Erstellung des TFkd-Plasmids. Janet Hauschild-Quintern, PhD, und Antje Frenzel danken wir für Ihren Einsatz beim GGTA1-KO.

Wiebke Baars, Sabine Bergmann, Ulrike Bohn, Birgitt Haarmeijer, Sonja Werwitzke, PhD, Pavan Sai Garimella, Alain Despont, Dr. Danny Kaulitz und Marwan Semaan, PhD sei für die gute Kooperation.

Literatur

- AHRENS, H.E., B. PETERSEN and D. HERRMANN, (2015a): siRNA mediated knockdown of tissue factor expression in pigs for xenotransplantation. *Am. J Transplant* **15**, 1407–1414.
- AHRENS, H.E., B. PETERSEN and W. RAMACKERS, (2015b): Kidneys from $\alpha 1,3$ -galactosyltransferase knockout/human heme oxygenase-1/human A20 transgenic pigs are protected from rejection during ex vivo perfusion with human blood. *Transplantation Direct* **1**, 1–8.
- BACH, F.H., C. FERRAN and D. CANDINAS, (1997): Accommodation of xenografts: expression of "protective genes" in endothelial and smooth muscle cells. *Transplant Proc.* **29**, 56–58.
- BALLA, G., H.S. JACOB and J. BALLA, (1992): Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategy of endothelium. *J. Biol. Chem.* **267**, 18148–18153.
- BANZ, Y. and R. RIEBEN, (2006): Endothelial cell protection in xenotransplantation: looking after a key player in rejection. *Xenotransplantation* **13**, 19–30.
- BROUARD, S., L.E. OTTERBEIN and J. ANRATHER, (2000): Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* **192**, 1015–1026.
- BYRNE, G.W., K.R. MCCURRY and M.J. MARTIN, (1997): Transgenic pigs expressing human CD59 and decay-accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement-mediated damage. *Transplantation* **63**, 149–155.
- CARMELIET, P., N. MACKMAN and L. MOONS, (1996): Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* **383**, 73–75.
- CONANT, C.G., M.A. SCHWARTZ and T. NEVILL, (2009): Platelet adhesion and aggregation under flow using microfluidic flow cells. *J. Vis. Exp.*
- COOPER, J.T., D.M. STROKA and C. BROSTJAN, (1996): A20 blocks endothelial cell activation through a NF-kappaB-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **271**, 18068–18073.
- COWAN, P.J., A. AMINIAN and H. BARLOW, (2000): Renal xenografts from triple-transgenic pigs are not hyperacutely rejected but cause coagulopathy in non-immunosuppressed baboons. *Transplantation* **69**, 2504–2515.
- DANIEL, S., M.B. ARVELO and V.I. PATEL, (2004): A20 protects endothelial cells from TNF-, Fas-, and NK-mediated cell death by inhibiting caspase 8 activation. *Blood* **104**, 2376–2384.
- DIECKHOFF, B., B. PETERSEN and W.A. KUES, (2008): Knockdown of porcine endogenous retrovirus (PERV) expression by PERV-specific shRNA in transgenic pigs. *Xenotransplantation* **15**, 36–45.
- GARRELS, W., S. HOLLER and U. TAYLOR, (2011): Genotype-independent transmission of transgenic fluorophore protein by boar spermatozoa. *PLoS One* **6**, e27563.
- HAUSCHILD-QUINTERN, J., B. PETERSEN and G.J. COST, (2013): Gene knockout and knockin by zinc-finger nucleases: current status and perspectives. *Cell Mol. Life Sci.* **70**, 2969–2983.
- HAUSCHILD, J., B. PETERSEN and Y. SANTIAGO, (2011): Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 12013–12017.
- HU, S., W. NI and W. SAI, (2013): Knockdown of myostatin expression by RNAi enhances muscle growth in transgenic sheep. *PLoS One* **8**, e58521.
- HU, S., J. QIAO and Q. FU, (2015): Transgenic shRNA pigs reduce susceptibility to foot and mouth disease virus infection. *Elife* **4**, e06951.

- IWASE, H., M.B. EZZELARAB and B. EKSER, (2014): The role of platelets in coagulation dysfunction in xenotransplantation, and therapeutic options. *Xenotransplantation*.
- JABED, A., S. WAGNER and J. McCRACKEN, (2012): Targeted microRNA expression in dairy cattle directs production of beta-lactoglobulin-free, high-casein milk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **109**, 16811–16816.
- LEE, K.G., H. LEE and J.M. HA, (2012): Increased human tumor necrosis factor-alpha levels induce procoagulant change in porcine endothelial cells in vitro. *Xenotransplantation* **19**, 186–195.
- LUTZ, J., A. LUONG le and M. STROBL, (2008): The A20 gene protects kidneys from ischaemia/reperfusion injury by suppressing pro-inflammatory activation. *J. Mol. Med. (Berl)* **86**, 1329–1339.
- MA, X., B. YE and F. GAO, (2012): Tissue factor knockdown in porcine islets: an effective approach to suppressing the instant blood-mediated inflammatory reaction. *Cell Transplant* **21**, 61–71.
- OROPEZA, M., B. PETERSEN and J.W. CARNWATH, (2009): Transgenic expression of the human A20 gene in cloned pigs provides protection against apoptotic and inflammatory stimuli. *Xenotransplantation* **16**, 522–534.
- PARRY, G.C., J.H. ERLICH and P. CARMELIET, (1998): Low levels of tissue factor are compatible with development and hemostasis in mice. *J Clin Invest* **101**, 560–569.
- PETERSEN, B., W. RAMACKERS and A. LUCAS-HAHN, (2011): Transgenic expression of human heme oxygenase-1 in pigs confers resistance against xenograft rejection during ex vivo perfusion of porcine kidneys. *Xenotransplantation* **18**, 355–368.
- PHELPS, C.J., C. KOIKE and T.D. VAUGHT, (2003): Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* **299**, 411–414.
- RAMACKERS, W., L. FRIEDRICH and A. TIEDE, (2008): Effects of pharmacological intervention on coagulopathy and organ function in xenoperfused kidneys. *Xenotransplantation* **15**, 46–55.
- RAMSOONDAR, J., T. VAUGHT and S. BALL, (2009): Production of transgenic pigs that express porcine endogenous retrovirus small interfering RNAs. *Xenotransplantation* **16**, 164–180.
- SEMAAN, M., D. KAULITZ and B. PETERSEN, (2012): Long-term effects of PERV-specific RNA interference in transgenic pigs. *Xenotransplantation* **19**, 112–121.
- TOOMEY, J.R., K.E. KRATZER and N.M. LASKY, (1996): Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood* **88**, 1583–1587.
- YET, S.F., R. TIAN and M.D. LAYNE, (2001): Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circ. Res.* **89**, 168–173.
- ZAYED, H., Z. IZSVAK and O. WALISKO, (2004): Development of hyperactive sleeping beauty transposon vectors by mutational analysis. *Mol. Ther.* **9**, 292–304.