

## Stand der Xenotransplantationsforschung beim Schwein

**Björn Petersen**

Institut für Nutztiergenetik, Friedrich-Loeffler-Institut, Mariensee

### Einleitung

Die Organtransplantation ist bei finalem Organversagen die einzige Rettung für betroffenen Patienten. Seit dem Jahr 1963 wurden dank der Organspenden über 135 000 Organe in Deutschland transplantiert (Quelle: [www.dso.de](http://www.dso.de)), die den Empfängern eine Chance auf ein neues Leben gaben. Trotz neuer gesetzlicher Rahmenbedingungen herrscht weiterhin eine große Diskrepanz zwischen verfügbaren Spenderorganen und Patienten, die auf der Warteliste für ein passendes Spenderorgan stehen. Die bestehende Lücke führt dazu, dass allein in Deutschland täglich 4 Patienten auf der Warteliste versterben und die Wartelisten für eine Organtransplantation stetig wachsen.

### Xenotransplantation

Eine Möglichkeit den Organmangel zu überwinden, könnte die Verwendung tierischer Organe sein, die sogenannte Xenotransplantation. Xenotransplantation ist definiert als die Verpflanzung lebender Zellen oder Organe zwischen zwei Spezies. Hierbei wurde in der Vergangenheit, aufgrund ihrer phylogenetischen Verwandtschaft zunächst auf Primaten zurückgegriffen. Die letzte Xenotransplantation unter Verwendung eines Pavianherzens fand im Jahr 1984 statt. Baby Fae war mit einem schweren Herzfehler geboren und hatte nach damaligem Stand der Medizin keine Überlebenschance. Der Chirurg Leonard Bailey verpflanzte dem Mädchen ein Herz eines Pavians, welches jedoch nach 20 Tagen vom Organismus abgestoßen wurde [1]. Trotz der nahen Verwandtschaft weist die Verwendung von Primatenorganen einige entscheidende Nachteile auf. Vor allem große ethische Bedenken aufgrund der Ähnlichkeit zum Menschen stehen einer Verwendung entgegen. Zudem sind Primaten nur schwer in ausreichender Zahl unter hoch-hygienischen Bedingungen zu vermehren und die Übertragung von Zoonosen schließt eine Verwendung aus.

### Das Schwein als Organspender

Das Schwein wird aus verschiedenen Gründen mittlerweile als der am besten geeignete Organspender für den Menschen angesehen. Schweine können I) unter hoch-hygienischen Bedingungen gehalten werden, II) sind einfach zu züchten, III) haben ein kurzes Generationsintervall und große Würfe, IV) aufgrund der Verwendung als Fleischlieferant herrschen kaum ethischen Bedenken, V) Physiologie und Anatomie ähnelt der des Menschen und VI) die Organgröße passt zum Menschen. Jedoch verhinderten über lange Zeit die starken immunologischen Abwehrreaktionen eine Verwendung porciner Organe für die Xenotransplantation. Kurz nach der Transplantation eines nativen Schweineorgans kommt es zur sogenannten „hyperakuten Abstoßungsreaktion“ (HAR). Diese Abstoßungsreaktion wird vor allem durch unterschiedliche Zuckerstrukturen auf den Schweinezelloberflächen ausgelöst. Hierbei wurden Galaktose Epitope als das Hauptantigen identifiziert [2, 3]. Als weitere Hauptantigene wurden Neu5GC und die Produkte von B4GalNT2 mit den Jahren der Xenotransplantationsforschung erkannt [4-6]. Präformierte xenoreaktive Antikörper im menschlichen Blut binden an diese Zuckermoleküle und aktivieren die Komplementkaskade, was innerhalb kürzester Zeit (Minuten bis Stunden) zur Abstoßung und Zerstörung des Schweineorgans führt [7]. Die HAR kann durch Ausschaltung der für die Zuckermoleküle kodierenden Gene im Schweinengenom und zusätzlicher transgener Expression komplementregulierender Proteine überwunden werden [8]. Nach Überwindung der HAR stellt die akut-vaskuläre Abstoßungsreaktion (AVR) das nächste Hindernis für eine erfolgreiche Xenotransplantation dar. Die AVR tritt nach Stunden

bis Tagen auf und wird durch eine sbgestimmte humorale und zelluläre Immunantwort ausgelöst. Hierbei werden pro-inflammatorische Zytokine und ROS (reactive oxygen species) von Neutrophilen ausgeschüttet. Zeitgleich können Xenoantikörper an Schlüssel-moleküle wie MHC Klasse I (SLA I), NKG2D/UL16 binding protein 1, NKp44 und CD28/CD83 binden und eine antikörperabhängige zellvermittelte zytotoxische Antwort von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) auslösen [9]. CD4+ T Zellen spielen hierbei durch den Fas-Fas Liganden Pathway ebenfalls eine wichtige Rolle. Dies resultiert in zytoxischen Effekten und Freisetzung von Interferon Gamma, was zu einer weiteren Aktivierung von Makrophagen und NK-Zellen führt [10, 11]. Zudem spielen bei der AVR Inkompatibilitäten zwischen dem humanen und porzinen Gerinnungssystem eine Rolle, die zu einer Mikrothrombenbildung in den Gefäßen des transplantierten Schweineorgans führen [12-14]. Um die AVR zu überwinden, werden humane Transgene wie Hemeoxygenase-1 oder A20 in Schweineorganen für die Xenotransplantation exprimiert, um die Endothelzellaktivierung zu verhindern. Humane antithrombotisch oder antikoagulatorisch wirkende Transgene wie TFPI (tissue factor pathway inhibitor), EPCR (endothelial protein C receptor) oder THBD (Thrombomodulin) helfen bei der Überwindung koagulatorischer Inkompatibilitäten [15-17]. Die zelluläre Abstoßungsreaktion ist die letzte Abstoßungsreaktion und resultiert im Absterben des transplantierten Organs innerhalb von Tagen bis Wochen und ähnelt der Abstoßungsreaktion nach einer Allotransplantation. Diese Abstoßungsreaktion wird vor allem durch Verhinderung einer T- Zell vermittelten Immunantwort durch Ausschaltung von MHC Klasse I Molekülen an der Zelloberfläche oder der Expression immunmodulatorischer bzw. T Zell regulierender Proteine in Kombination mit einer geeigneten Immunsuppression des Empfängerorganismus adressiert [18-23]. Die Entwicklung neuer Technologien wie des somatische Kerntransfers und der Genom- Editierung ermöglichte schnell und effizient genetische Veränderungen im Schweinegenom vorzunehmen und so die Xenotransplantation immer näher an die Klinik zu bringen. Mittlerweile wurden nach lebenserhaltender Transplantation eines GalKO/CD46/humanes Thrombomodulin genetisch-verändertem Schweineherzen in einen Pavian Überlebensraten von bis zu 195 und 245 Tagen erreicht (Tabelle 1) [24, 25].

**Tabelle 1** Genetisch-veränderte Schweineorgane und Überlebensraten nach Transplantation in nicht-humane Primaten (NHP: non-human Primate) nach Organ und Operationsart.

Genetische Modifikation	Transplantiertes Organ in NHP	Maximales Überleben in Tagen	Referenz
GGTA1-KO/hCD55	Niere	405	[36]
GGTA1-KO/hCD46/hTM	Herz, heterotop	945	[37]
GGTA1-KO/hCD46/hTM	Herz, orthotop	195, 245	[24, 25]

Endogene Retroviren galten lange Jahre als Gefahr bei der Xenotransplantation. Porzine endogene Retroviren (PERV) könnten menschliche Zellen infizieren und mit humanen Retroviren rekombinieren [26]. Allerdings konnten die in vitro erhaltenen Daten von Patience in vivo nicht nachgewiesen werden [27-29]. Hierbei wurde vor allem PERV-C, welches in der Lage ist mit humanen endogenen Retroviren zu rekombinieren, als größte Gefahr angesehen. Transgene Schweine, welche eine shRNA gegen PERV exprimierten, zeigten eine signifikante Reduktion der PERV-Expression [30]. Mittlerweile wird die Gefahr der Übertragung von porzinen endogenen Retroviren (PERV) als gering eingestuft, da PERV-C freie Schweine für die Xenotransplantation zur Verfügung stehen und die CRISPR/Cas Technologie die funktionelle Ausschaltung von PERVs im Schweinegenom ermöglicht [31, 32]. Schweine mit multiplen immun-modulatorischen genetischen Modifikationen (4KO + 9 Transgene) für die experimentelle Xenotransplantation stehen für Versuche im Primatenmodell zur Verfügung [33-35]. Diese genetischen Modifikationen versprechen eine weitere Verlängerung der

Überlebensraten, was die Xenotransplantation näher an die Klinik bringt. Erste klinische Studien zur Xenotransplantation von Schweineorganen werden für die nächsten 5 Jahre erwartet.

### Literatur

1. Bailey, L.L., et al., Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate. *JAMA*, 1985. 254(23): p. 3321-9.
2. Galili, U., et al., Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal alpha 1----3Gal epitope in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84(5): p. 1369-73.
3. Galili, U., et al., Human natural anti-alpha-galactosyl IgG. II. The specific recognition of alpha (1----3)-linked galactose residues. *J Exp Med*, 1985. 162(2): p. 573-82.
4. Salama, A., et al., Potential deleterious role of anti-Neu5Gc antibodies in xenotransplantation. *Xenotransplantation*, 2015. 22(2): p. 85-94.
5. Byrne, G.W., et al., Cloning and expression of porcine beta1,4 N-acetylgalactosaminyl transferase encoding a new xenoreactive antigen. *Xenotransplantation*, 2014. 21(6): p. 543-54.
6. Byrne, G.W., et al., Identification of new carbohydrate and membrane protein antigens in cardiac xenotransplantation. *Transplantation*, 2011. 91(3): p. 287-92.
7. Galili, U., Interaction of the natural anti-Gal antibody with alpha-galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunol Today*, 1993. 14(10): p. 480-2.
8. Lai, L., et al., Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 2002. 295(5557): p. 1089-92.
9. Rieben, R. and J.D. Seebach, Xenograft rejection: IgG1, complement and NK cells team up to activate and destroy the endothelium. *Trends Immunol*, 2005. 26(1): p. 2-5.
10. Chen, G., et al., The role of anti-non-Gal antibodies in the development of acute humoral xenograft rejection of hDAF transgenic porcine kidneys in baboons receiving anti-Gal antibody neutralization therapy. *Transplantation*, 2006. 81(2): p. 273-83.
11. Puga Yung, G.L., et al., Xenotransplantation: Where do we stand in 2016? *Swiss Med Wkly*, 2017. 147: p. w14403.
12. Roussel, J.C., et al., Pig thrombomodulin binds human thrombin but is a poor cofactor for activation of human protein C and TAFI. *Am J Transplant*, 2008. 8(6): p. 1101-12.
13. Cowan, P.J., J.C. Roussel, and A.J. d'Apice, The vascular and coagulation issues in xenotransplantation. *Curr Opin Organ Transplant*, 2009. 14(2): p. 161-7.
14. Petersen, B., et al., Pigs transgenic for human thrombomodulin have elevated production of activated protein C. *Xenotransplantation*, 2009. 16(6): p. 486-495.
15. Oropeza, M., et al., Transgenic expression of the human A20 gene in cloned pigs provides protection against apoptotic and inflammatory stimuli. *Xenotransplantation*, 2009. 16(6): p. 522-34.
16. Petersen, B., et al., Pigs transgenic for human thrombomodulin have elevated production of activated protein C. *Xenotransplantation*, 2009. 16(6): p. 486-95.
17. Petersen, B., et al., Transgenic expression of human heme oxygenase-1 in pigs confers resistance against xenograft rejection during ex vivo perfusion of porcine kidneys. *Xenotransplantation*, 2011. 18(6): p. 355-68.
18. Hein, R., et al., Triple (GGTA1, CMAH, B2M) modified pigs expressing an SLA class I(low) phenotype- Effects on immune status and susceptibility to human immune responses. *Am J Transplant*, 2019.
19. Sake, H.J., et al., Possible detrimental effects of beta-2-microglobulin knockout in pigs. *Xenotransplantation*, 2019. 26(6): p. e12525.
20. Buermann, A., et al., Pigs expressing the human inhibitory ligand PD-L1 (CD 274) provide a new source of xenogeneic cells and tissues with low immunogenic properties. *Xenotransplantation*, 2018. 25(5): p. e12387.
21. Abicht, J.M., et al., Multiple genetically modified GTKO/hCD46/HLA-E/hbeta2-mg porcine hearts are protected from complement activation and natural killer cell infiltration during ex vivo perfusion with human blood. *Xenotransplantation*, 2018. 25(5): p. e12390.
22. Weiss, E.H., et al., HLA-E/human beta2-microglobulin transgenic pigs: protection against xenogeneic human anti-pig natural killer cell cytotoxicity. *Transplantation*, 2009. 87(1): p. 35-43.

23. Buerck, L.W., et al., LEA29Y expression in transgenic neonatal porcine islet-like cluster promotes long-lasting xenograft survival in humanized mice without immunosuppressive therapy. *Sci Rep*, 2017. 7(1): p. 3572.
24. Langin, M., et al., Consistent success in life-supporting porcine cardiac xenotransplantation. *Nature*, 2018. 564(7736): p. 430-433.
25. Muhammad, M., et al., Progressive genetic modifications with Growth Hormone Receptor Knockout extends cardiac xenograft survival to 9 months. *Nature Portfolio*, 2021.
26. Patience, C., Y. Takeuchi, and R.A. Weiss, Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat Med*, 1997. 3(3): p. 282-6.
27. Morozov, V.A., et al., No PERV transmission during a clinical trial of pig islet cell transplantation. *Virus Res*, 2017. 227: p. 34-40.
28. Denner, J., Why was PERV not transmitted during preclinical and clinical xenotransplantation trials and after inoculation of animals? *Retrovirology*, 2018. 15(1): p. 28.
29. Irgang, M., et al., Porcine endogenous retroviruses: no infection in patients treated with a bioreactor based on porcine liver cells. *J Clin Virol*, 2003. 28(2): p. 141-54.
30. Dieckhoff, B., et al., Inhibition of porcine endogenous retroviruses (PERVs) in primary porcine cells by RNA interference using lentiviral vectors. *Arch Virol*, 2007. 152(3): p. 629-34.
31. Gu, C., et al., No infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of acellular porcine aortic valves: a two-year study. *Xenotransplantation*, 2008. 15(2): p. 121-8.
32. Yang, L., et al., Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science*, 2015. 350(6264): p. 1101-4.
33. Fischer, K., et al., Viable pigs after simultaneous inactivation of porcine MHC class I and three xenoreactive antigen genes GGTA1, CMAH and B4GALNT2. *Xenotransplantation*, 2019: p. e12560.
34. Fischer, K., et al., Efficient production of multi-modified pigs for xenotransplantation by 'combineering', gene stacking and gene editing. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 29081.
35. Yue, Y., et al., Extensive germline genome engineering in pigs. *Nat Biomed Eng*, 2020.
36. Kim, S.C., et al., Long-term survival of pig-to-rhesus macaque renal xenografts is dependent on CD4 T cell depletion. *Am J Transplant*, 2019. 19(8): p. 2174-2185.
37. Mohiuddin, M.M., et al., Chimeric 2C10R4 anti-CD40 antibody therapy is critical for long-term survival of GTKO.hCD46.hTBM pig-to-primate cardiac xenograft. *Nat Commun*, 2016. 7: p. 11138.

### Kontakt

Dr. Björn Petersen, Institut für Nutztiergenetik, Friedrich-Loeffler-Institut, Mariensee  
bjoern.petersen@fli.de