

BioFokus

Genetisch modifizierte Schweine als Organspender für die Xenotransplantation

Prof. Dr. Eckhard Wolf, PD Dr. Elisabeth Kemter,

PD Dr. Nikolai Klymiuk, Prof. Dr. Dr. h.c. Bruno Reichart*

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, Genzentrum und Veterinärwissenschaftliches
Department der Ludwig-Maximilians-Universität München

*Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin, Ludwig-Maximilians-Universität München

Porcs génétiquement modifiés en tant que donneurs d'organes pour la xénotransplantation

Prof. Dr. Eckhard Wolf, PD Dr. Elisabeth Kemter,

PD Dr. Nikolai Klymiuk, Prof. Dr. Dr. h.c. Bruno Reichart*

Chaire de zootechnie moléculaire et biotechnologie, Centre de génétique et Département
des sciences vétérinaires de l'Université Ludwig-Maximilian, Munich

*Centre Walter-Brendel de médecine expérimentale, Université Ludwig-Maximilian, Munich

Forschung für Leben


www.forschung-leben.ch

«Forschung für Leben» wurde 1990 gegründet. Der Verein informiert über die Ziele, Aufgaben und die Bedeutung der molekularbiologischen, medizinischen und pflanzenphysiologischen Forschung. Er ist bestrebt, auch ethische Fragen des mit diesen Bereichen verbundenen Fortschritts aufzugreifen und zu diskutieren.

IMPRESSUM

BioFokus

ISSN 1661-9854
29. Jahrgang

Herausgeber

«Forschung für Leben»

Autoren:

Prof. Dr. Eckhard Wolf
PD Dr. Elisabeth Kemter
PD Dr. Nikolai Klymiuk
Prof. Dr. Dr. h.c. Bruno Reichart

Redaktion

Prof. Dr. Felix Ehrensperger
Prof. Dr. Martin Schwyzer
Dr. Iana Buch

Gestaltung

Pomcanys Marketing AG, www.pomcanys.ch

Geschäftsstelle

Verein «Forschung für Leben»
8000 Zürich
www.forschung-leben.ch

Bankverbindung

ZKB Wiedikon, IBAN: CH27 0070 0111 5012 7795 2

Zusammenfassung

Résumé

Worum es geht

Für viele chronische Erkrankungen ist der Ersatz irreversibel geschädigter Organe oder Gewebe die letzte therapeutische Option.

Der Bedarf an Zellen, Geweben und Organen für die Transplantation kann derzeit bei weitem nicht durch die verfügbaren menschlichen Spender gedeckt werden. Daher wird seit mehr als drei Jahrzehnten die Verwendung tierischer Gewebe und Organe für die Xenotransplantation diskutiert. Aus ethischen und logistischen Gründen kommen nicht-humane Primaten als Spender für die Xenotransplantation z.Zt. nicht in Frage. Aufgrund der Grösse und Funktion seiner Organe sowie der Möglichkeit, genetische Modifikationen effizient und präzise durchzuführen, ist das Schwein der favorisierte Spenderorganismus.

Dieser Beitrag bietet eine Übersicht über biotechnologische Strategien zur Überwindung von Abstoßungsreaktionen und von funktionellen Inkompatibilitäten nach Xenotransplantaten porziner Gewebe und Organe in Primaten.

De quoi s'agit-il?

Pour de nombreuses maladies chroniques, le remplacement d'organes ou de tissus irrémédiablement endommagés est la dernière option thérapeutique.

Les cellules, tissus et organes dont on a besoin pour la transplantation ne peuvent actuellement pas être fournis par les donateurs humains disponibles. C'est pourquoi on discute depuis plus de trente ans la possibilité d'utiliser des tissus et organes animaux pour effectuer des xénotransplantations. Pour des raisons éthiques et logistiques, l'utilisation de primates non hominidés en tant que donateurs n'est actuellement pas envisageable. Du fait de la taille et du fonctionnement de ses organes, ainsi que de la possibilité de réaliser des modifications génétiques efficacement et avec précision, le porc est l'organisme donneur privilégié.

Cet article propose un aperçu des stratégies biotechnologiques visant à surmonter les réactions de rejet et les incompatibilités fonctionnelles suite à la xénotransplantation de tissus et organes porcins chez le primate.

Genetisch modifizierte Schweine als Organspender für die Xenotransplantation

Inhaltsverzeichnis

- **Methoden zur genetischen Modifikation von Schweinen** 4
- **Gene Editing** 4
- **Strategien zur Überwindung der hyperakuten Abstossung von Xenotransplantaten** 5
- **Strategien zur Überwindung zellulärer Abstossungsmechanismen** 6
- **Strategien zur Überwindung von Gerinnungsstörungen im xenogenen Organ** 7
- **Schlussfolgerungen und Ausblick** 8
- **Literatur** 10

Methoden zur genetischen Modifikation von Schweinen

Die ersten transgenen Schweine wurden vor mehr als 30 Jahren durch DNA-Mikroinjektion in die Vorkerne von befruchteten Eizellen (Zygoten) generiert. Nach der Jahrtausendwende kamen weitere Methoden wie der Spermien-vermittelte Gentransfer, lentiviraler Gentransfer u.a.m. dazu. Ein grosser Durchbruch war die Etablierung des somatischen Kerntransfers (*Somatic Cell Nuclear Transfer*, SCNT), wodurch die technologische Grundlage für eine gezielte Genmodifikation beim Schwein geschaffen wurde.^{1,2}

Gene Editing

In den letzten Jahren verlagerte sich der Fokus der genetischen Modifikation auf die Entwicklung Nukleasen-basierter Technologien (= *Gene Editing*), die neue Möglichkeiten für die genetische Modifikation im Schwein eröffnen. Die eingesetzten Nukleasen verursachen ortsspezifisch DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) und aktivieren dadurch das zelluläre DNA-Reparatursystem. Erfolgt die Reparatur durch nichthomologes End-Joining (NHEJ), entstehen häufig Mutationen, die zur Inaktivierung des Zielgens führen. Bei der Reparatur von DSB durch homologe Rekombination (HR) kann die intakte Sequenz wiederhergestellt werden. Zudem kann über diesen Mechanismus ein Genkonstrukt an einer bestimmten Stelle im Genom inserieren (Übersicht in ³).

Für die gezielte Genmodifikation im Schwein wurden bisher drei verschiedene Klassen von zielgerichteten Nukleasen erfolgreich verwendet (**Abbildung 1**): Zinkfingernukleasen (ZFN), Transcription Activator-Like Effector Nukleasen (TALEN) und das CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)/Cas (CRISPR assoziiert)-System. Während bei ZFN und TALEN die Nuklease *FokI* durch DNA-bindende Proteine zur Zielsequenz der DNA geleitet wird, findet beim CRISPR/Cas-System die Nuklease Cas durch Assoziation mit einer sogenannten *guide* RNA ihre Zielsequenz. Im Vergleich zu ZFN und TALEN hat das CRISPR/Cas-System zwei wesentliche Vorteile. Zum einen ist die Herstellung und Präparation einfacher, zum anderen ermöglicht die Verwendung mehrerer *guide* RNAs ein *Editing* multipler Gene in einem Arbeitsschritt.⁴

Mit Hilfe des CRISPR/Cas-Systems gelang es auch Schweine zu generieren, die keine funktionellen porzinen endogenen Retroviren (PERVs) haben.⁵

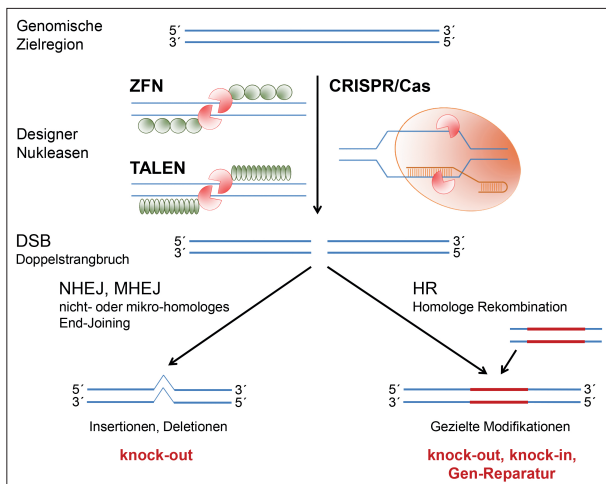


Abbildung 1: Prinzip des Gene Editing. Durch eine zielgerichtete Nuklease wird ein DNA-Doppelstrangbruch induziert, der durch verschiedene Mechanismen repariert werden kann. Die Reparatur durch nicht-homologes oder mikro-homologes End-joining führt meist zu Mutationen, welche das Gen inaktivieren können. Die Reparatur durch homologe Rekombination ermöglicht die Wiederherstellung der ursprünglichen Sequenz oder aber die gezielte Insertion einer exogen zugegebenen Sequenz (modifiziert nach ³).

Als möglicher Risikofaktor bei der Verwendung des CRISPR/Cas-Systems, aber auch der anderen Gene Editing-Strategien, wurden mögliche *Off-Target* Effekte, d.h. Schnitte an ungewollten Stellen des Genoms diskutiert. Inzwischen gibt es eine Reihe von Verbesserungen des Verfahrens, um dieses Risiko zu minimieren. Dies betrifft z.B. die Optimierung von Sequenz und Länge der *guide* RNAs, spezielle Software zur Vorhersage von *Off-Target* Effekten, die Einstellung der Konzentration der Cas-Nuklease, oder Modifikationen der Cas-Nuklease, z.B. die Umwandlung von einem DNA-Doppelstrang- zu einem Einzelstrang-schneidenden Enzym (*Nickase*).

Für dieses System werden zwei Einzelstrang-schneidende Enzyme benötigt, die durch zwei verschiedene *guide* RNAs an eng benachbarte Stellen im Genom dirigiert werden. Dadurch wird die Spezifität des Systems im Vergleich zur klassischen Dop-

pelstrang-schneidenden Cas-Nuklease mit nur einer *guide* RNA um mehrere Größenordnungen verbessert. Zudem stehen für das Screening von *Off-Target* Effekten in kultivierten Zellen leistungsfähige Technologien zur Verfügung, so dass solche Effekte vor Verwendung solcher Zellen für die Transplantation oder für den Kerntransfer zur Erzeugung Genom-editierter Tiere weitestgehend ausgeschlossen werden können (Übersicht in ³).

Strategien zur Überwindung der hyperakuten Abstoßung von Xenotransplantaten

Eine erste immunologische Hürde stellen präformierte Antikörper im Blut von Primaten gegen bestimmte Antigene auf Schweinezellen dar. Das wichtigste Antigen ist das Zuckerepitop Galaktosyl- α 1,3-Galaktose (α Gal), das durch das Enzym α 1,3-Galaktosyl-Transferase (GGTA1) synthetisiert wird. Menschen und Altweltaffen sind defizient für dieses Enzym, werden aber mit α Gal-Epitopen auf Darmbakterien konfrontiert und haben daher hohe anti- α Gal-Antikörperspiegel. Nach Transplantation von Schweinegewebe binden diese Antikörper die auf Schweinezellen vorhandenen α Gal-Epitope und es kommt zur Aktivierung des Komplementsystems und zur hyperakuten Abstoßung des Organs bzw. Gewebes. Um diese zu überwinden, wurden zunächst transgene Schweine generiert, die membranständige Komplementregulatorische Proteine (*Membrane Cofactor Protein* = MCP = CD46; *Decay-Accelerating Factor* = DAF = CD55; *Membrane Inhibitor of Reactive Lysis* = MIRL = CD59) überexprimieren, um die Aktivierung des Komplementsystems auf verschiedenen Stufen zu blockieren.

Ein entscheidender Schritt zur Überwindung der hyperakuten Abstoßungsreaktion war die Ent-

wicklung von GGTA1-defizienten Schweinelinien⁶, die heute den genetischen Hintergrund der Wahl für weitere genetische Modifikationen von Spenderschweinen für die Xenotransplantation darstellen (Übersicht in ⁷). Inzwischen wurden neben α Gal weitere Xenoantigene bekannt, gegen die es präformierte Antikörper im menschlichen Blut gibt. Mithilfe des CRISPR/Cas Systems ist es heute möglich, mehrere Gene gleichzeitig in Schweinezellen zu inaktivieren und daraus durch Kerntransfer Schweine zu erstellen (Übersicht in ⁸).

Strategien zur Überwindung zellulärer Abstossungsmechanismen

Die T-Zell-vermittelte Abstossung von Xenotransplantaten ist eine wichtige Hürde, die durch Blockade der Kostimulation von T-Zellen überwunden werden kann. Die Aktivierung von T-Zellen erfolgt durch die Wechselwirkung des T-Zell-Rezeptors mit einem Antigen-beladenen MHC (*Major Histocompatibility Complex*)-Molekül einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) sowie ein zweites Signal (= Kostimulation), das durch die Interaktion von kostimulatorischen Molekülen auf der Oberfläche von T-Zellen und APCs induziert wird. Ein solches Paar von kostimulatorischen Molekülen ist CD28 auf T-Zellen und CD80/CD86 auf APCs. Deren Interaktion kann durch lösliche Moleküle, wie CTLA4-Ig oder seine affinitätsoptimierte Variante LEA29Y, welche CD80/CD86 mit höherer Affinität bindet, blockiert werden, wodurch die Aktivierung von T-Zellen verhindert wird. Diese Kostimulations-blockierenden Moleküle wurden bislang meist systemisch verabreicht. Die genetische Modifikation der Spenderschweine ermöglicht jedoch auch deren lokale Expression im Transplantat. Dies bietet die Chance, das Xe-

notransplantat vor der T-Zell-vermittelten Abstossung zu schützen, ohne eine systemische Blockade der T-Zell-Aktivierung zu verursachen. Um diese Hypothese in Bezug auf die Insel-Xenotransplantation zu testen, wurden transgene Schweine generiert, die LEA29Y unter der Kontrolle des porzinen Insulin-Promotors spezifisch in den Betazellen des Pankreas exprimieren.⁹

Nach Transplantation in diabetische, immundefiziente Mäuse waren isolierte Pankreasinseln von diesen transgenen Schweinen, aber auch die von nicht-transgenen Schweinen in der Lage, den Blutzuckerspiegel der Mäuse zu normalisieren. Nach der Transplantation menschlicher Immunzellen wurden allerdings die Wildtyp-Inseln abgestossen, während die LEA29Y-transgenen Inseln vor der Abstossung geschützt waren (**Abbildung 2**). Dabei waren nur sehr niedrige Konzentrationen von LEA29Y im Blut der transplantierten Mäuse nachweisbar, was die Hypothese der lokalen Hemmung der T-Zell-vermittelten Abstossung unterstreicht.⁹ Dieser Befund wurde inzwischen in einem weiteren Mausmodell, das einen längeren Untersuchungszeitraum erlaubt, bestätigt.¹⁰

Patienten-Zielgruppe für die xenogene Inselzell-Transplantation sind in erster Linie Typ 1-Diabetiker, die schwierig mit Insulin einzustellen sind und Gefahr laufen, in lebensbedrohliche Unterzuckerkrisen zu fallen. Für die Transplantation kommen entweder Pankreasinseln von adulten Spenderschweinen oder sogenannte neonatale Inselzell-Cluster (NICCs) von Ferkeln in Frage. Erstere haben den Nachteil, dass sie relativ schwierig zu isolieren sind und dass die Spenderschweine über einen langen Zeitraum unter aufwendigen designiert Pathogen-freien (DPF) Bedingungen gehalten werden müssen. NICCs sind vergleichsweise

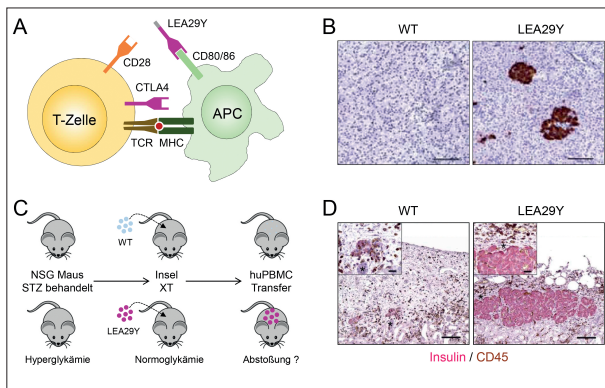


Abbildung 2: Schutz xenotransplantiertter porciner Pankreasinseln vor T-Zell-vermittelter Abstoßung durch lokale Expression von LEA29Y. **(A)** Prinzip der Kostimulations-Blockade von T-Zellen. Die Aktivierung von T-Zellen benötigt die Interaktion zwischen dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und dem Peptid-beladenen Haupthistokompatibilitäts-Komplex (MHC) auf einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC). Zudem ist als zweites Signal die Wechselwirkung zwischen CD28 und CD80/CD86 erforderlich. Die Wechselwirkung zwischen CTLA4 und CD80/CD86 hemmt die T-Zell-Aktivierung. Letzteres kann auch durch Zugabe des löslichen Moleküls CTLA4-Ig oder seiner affinitätsoptimierten Variante LEA29Y erreicht werden. **(B)** Nach Xenotransplantation (XT) von neonatalen Inselzellclustern aus normalen (WT) oder LEA29Y-transgenen Schweinen (LEA29Y) in immundefiziente (NOD-scid IL2Rgamma^{null}; NSG) diabetische Mäuse (Streptozotocin behandelt; STZ) entwickelt sich eine Insulin-positive Zellmasse, die den Blutzuckerspiegel der Mäuse normalisiert. **(C, D)** Behandelt man die Mäuse anschließend mit menschlichen Immunzellen (mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut; huPBMC) aus dem peripheren Blut, werden die WT-Inseln abgestoßen, während die transgenen Inseln vor der Abstoßung geschützt sind (modifiziert nach ⁹). CD45 markiert infiltrierende T-Zellen.

einfach zu isolieren, benötigen allerdings Zeit um zu reifen und voll funktionsfähig zu werden (Übersicht in ¹¹). Vor Abstoßungsreaktionen können xenotransplantierte Schweineinseln durch Mikro- oder Makroverkapselung geschützt werden (Übersicht in ¹²), allerdings ist in diesem Fall kein direkter Kontakt der Pankreasinseln mit dem Blutgefäß-System möglich. Daher favorisieren wir die genetische Modifikation der Spenderschweine zum Schutz der Inseln, die dann unverkapselt trans-

plantiert werden können (Übersicht in ¹³). Die notwendigen genetischen Modifikationen hängen vom Transplantationsort ab. Als mögliche Transplantationsstrategien werden u.a. die Infusion über die Pfortader in die Leber, aber auch intraperitoneale, subkutane und intramuskuläre Applikationen bzw. die Transplantation ins Knochenmark diskutiert (Übersicht in ¹²).

Neben T-Zellen sind auch natürliche Killerzellen und Makrophagen für die Abstoßung von Xenotransplantaten relevant. Um diese Mechanismen zu überwinden, wurden transgene Schweine generiert, die HLA-E/ β 2-Mikroglobulin¹⁴ bzw. humanes CD47 exprimieren¹⁵.

Strategien zur Überwindung von Gerinnungsstörungen im xenogenen Organ

Die histologische Untersuchung längerfristig überlebender Xenotransplantate zeigte eine Komplikation, die als thrombotische Mikroangiopathie bezeichnet wird. Aufgrund von Inkompatibilitäten zwischen den Blutgerinnungssystemen von Spender (Schwein) und Empfänger (Pavian) kommt es zur Bildung multipler Thromben in den Kapillaren und mittelfristig zu einer ischämischen Schädigung des Xeno-Organs. Strategien zur Überwindung von Gerinnungsstörungen nach Xenotransplantation sind die transgene Expression von CD39, endothelalem Protein C-Rezeptor (EPCR) sowie von humanem Thrombomodulin in den Spenderschweinen (Übersicht in ¹⁶).

Porzines Thrombomodulin auf den Endothelzellen des Spenderorgans kann zwar Thrombin im Blut

von Primaten binden, ist aber ein schlechter Koaktivator für gerinnungshemmendes aktiviertes Protein C. Daher haben wir transgene Schweine generiert, die humanes Thrombomodulin unter der Kontrolle des porcinen Thrombomodulin (*THBD*)-Promotors exprimieren.¹⁷ Diese Tiere zeigen eine konsistente Expression von humanem Thrombomodulin auf den Gefäßendothelzellen des Herzens. Herzen von dreifach genetisch modifizierten Schweinen (GGTA1-Defizienz sowie Überexpression von humanem CD46 und humanem Thrombomodulin) erreichten im heterotop abdominalen Transplantationsmodell im Pavian Überlebenszeiten von bis zu 945 Tagen.¹⁸

Schweineherzen der gleichen genetischen Konstellation wurden in München für die orthotope, lebenserhaltende Transplantation im Pavian getestet. Dabei wurden reproduzierbar Überlebenszeiten von bis über 6 Monaten erreicht (**Abbildung 3**)¹⁹, was einen Meilenstein auf dem Weg zur klinischen Anwendung der xenogenen Herztransplantation darstellt. Für diesen Erfolg waren neben den genetisch modifizierten Spenderschweinen und einem geeigneten Immunsuppressions-Protokoll¹⁸ eine Reihe von weiteren wichtigen Optimierungsschritten erforderlich. So wurden die Schweineherzen nach der Explantation und während der Implantation mit einer oxygenierten, hyperonkotischen, Erythrozyten-haltigen Lösung perfundiert, um einer ischämischen Schädigung vorzubeugen. Zudem wurden nach der Implantation Massnahmen getroffen, die ein übermässiges Wachstum des transplantierten Herzens verhinderten. Die wesentlichen Punkte waren das Frühabsetzen der Glukokortikoid-Behandlung, Blutdruck-senkende Massnahmen sowie die Behandlung mit Temsiroli-

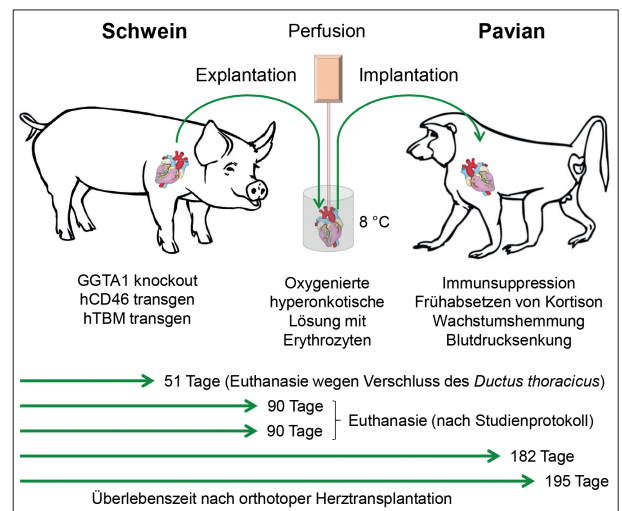


Abbildung 3: Optimierung der orthotopen xenogenen Transplantation von genetisch modifizierten Schweineherzen im Pavianmodell.

mus, einem Medikament, das dem Wachstum der Herzmuskelzellen entgegenwirkt. Vermutlich sind diese Massnahmen zur Wachstumskontrolle der transplantierten Schweineherzen nur im präklinischen Modell erforderlich, da das Schwein als Spender für einen Pavian zu gross ist. Daher müssen in diesem Modell Herzen von jungen Schweinen verwendet werden, die nach der Transplantation stark weiterwachsen. Um dieses Problem zu überwinden haben wir Schweine generiert, in denen das Wachstumshormon-Rezeptor (*GHR*)-Gen defekt ist. Diese Tiere wachsen im Vergleich zu normalen Schweinen sehr viel langsamer, sind ansonsten aber gesund und vermehrungsfähig.²⁰

Möglicherweise können damit auch im präklinischen Modell noch deutlich längere Überlebenszeiten als 6 Monate erzielt werden.

Schlussfolgerungen und Ausblick

Die jüngsten Erfolge in präklinischen Modellen zeigen, dass die Xenotransplantation von Zellen, Geweben und Organen genetisch modifizierter Spenderschweine eine realistische Option für die Klinik ist. Weder aus ethischer noch aus religiöser Sicht gibt es fundamentale Gründe gegen die Xenotransplantation als Massnahme zur Behandlung von lebensbedrohlichen oder schweren Erkrankungen.²¹ Für die Minimierung eines potentiell mit der Xenotransplantation assoziierten Infektionsrisikos wurden Leitlinien publiziert, die sowohl das Hygiene- und genetische Monitoring der Spendertiere, als auch ein Untersuchungsprogramm für Empfänger und ihre Kontaktpersonen beinhalten.²² Vor diesem Hintergrund werden in den kommenden Jahren klinische Xenotransplantations-Studien für verschiedene Organe initiiert werden.

Danksagung: Unsere Arbeiten werden im Rahmen des DFG-Transregio-Sonderforschungsbereiches 127 «Biologie der xenogenen Zell-, Gewebe- und Organtransplantation – von der Grundlagenforschung zur klinischen Anwendung» und durch das Deutsche Zentrum für Diabetesforschung (DZD) gefördert.

Literatur

- Lai, L., D. Kolber-Simonds, K.W. Park, H.T. Cheong, J.L. Greenstein, G.S. Im, M. Samuel, A. Bonk, A. Rieke, B.N. Day, C.N. Murphy, D.B. Carter, R.J. Hawley, and R.S. Prather, *Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning*. *Science*, 2002. **295**(5557): p. 1089–92.
- Dai, Y., T.D. Vaught, J. Boone, S.H. Chen, C.J. Phelps, S. Ball, J.A. Monahan, P.M. Jobst, K.J. McCreath, A.E. Lamborn, J.L. Cowell-Lucero, K.D. Wells, A. Colman, I.A. Polejaeva, and D.L. Ayares, *Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs*. *Nat Biotechnol*, 2002. **20**(3): p. 251–5.
- Klymiuk, N., F. Seeliger, Y.M. Bohlooly, A. Blutke, D.G. Rudmann, and E. Wolf, *Tailored Pig Models for Preclinical Efficacy and Safety Testing of Targeted Therapies*. *Toxicol Pathol*, 2016. **44**(3): p. 346–57.
- Wang, H., H. Yang, C.S. Shivalila, M.M. Dawlaty, A.W. Cheng, F. Zhang, and R. Jaenisch, *One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering*. *Cell*, 2013. **153**(4): p. 910–8.
- Niu, D., H.J. Wei, L. Lin, H. George, T. Wang, I.H. Lee, H.Y. Zhao, Y. Wang, Y. Kan, E. Shrock, E. Llesha, G. Wang, Y. Luo, Y. Qing, D. Jiao, H. Zhao, X. Zhou, S. Wang, H. Wei, M. Guell, G.M. Church, and L. Yang, *Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9*. *Science*, 2017. **357**(6357): p. 1303–1307.
- Phelps, C.J., C. Koike, T.D. Vaught, J. Boone, K.D. Wells, S.H. Chen, S. Ball, S.M. Specht, I.A. Polejaeva, J.A. Monahan, P.M. Jobst, S.B. Sharma, A.E. Lamborn, A.S. Garst, M. Moore, A.J. Demetris, W.A. Rudert, R. Bottino, S. Bertera, M. Trucco, T.E. Starzl, Y. Dai, and D.L. Ayares, *Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs*. *Science*, 2003. **299**(5605): p. 411–4.
- Klymiuk, N., B. Aigner, G. Brem, and E. Wolf, *Genetic modification of pigs as organ donors for xenotransplantation*. *Mol Reprod Dev*, 2010. **77**(3): p. 209–21.
- Butler, J.R., J.M. Ladowski, G.R. Martens, M. Tector, and A.J. Tector, *Recent advances in genome editing and creation of genetically modified pigs*. *Int J Surg*, 2015. **23**(Pt B): p. 217–22.
- Klymiuk, N., L. van Buerck, A. Bahr, M. Offers, B. Kessler, A. Wuensch, M. Kurome, M. Thormann, K. Lochner, H. Nagashima, N. Herbach, R. Wanke, J. Seissler, and E. Wolf, *Xenografted islet cell clusters from INSLEA29Y transgenic pigs rescue diabetes and prevent immune rejection in humanized mice*. *Diabetes*, 2012. **61**(6): p. 1527–32.
- Wolf-van Buerck, L., M. Schuster, F.S. Oduncu, A. Baehr, T. Mayr, S. Guethoff, J. Abicht, B. Reichart, N. Klymiuk, E. Wolf, and J. Seissler, *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.
- Kemter, E. and E. Wolf, *Recent progress in porcine islet isolation, culture and engraftment strategies for xenotransplantation*. *Curr Opin Organ Transplant*, 2018. **23**(6): p. 633–641.
- Klymiuk, N., B. Ludwig, J. Seissler, B. Reichart, and E. Wolf, *Current concepts of using pigs as a source for beta-cell replacement therapy of type 1 diabetes*. *Curr Mol Bio Rep* 2016. **2**(2): p. 73–82.
- Kemter, E., J. Jenner, and E. Wolf, *Will genetic engineering carry xenotransplantation of pig islets to the clinic?* *Curr Diab Rep*, 2018. **18**(11): p. 103.
- Weiss, E.H., B.G. Lilienfeld, S. Muller, E. Muller, N. Herbach, B. Kessler, R. Wanke, R. Schwinger, J.D. Seebach, E. Wolf, and G. Brem, *HLA-E/human beta2-microglobulin transgenic pigs: protection against xenogeneic human anti-pig natural killer cell cytotoxicity*. *Transplantation*, 2009. **87**(1): p. 35–43.
- Tena, A., J. Kurtz, D.A. Leonard, J.R. Dobrinsky, S.L. Terlou, N. Mtango, J. Versteegen, S. Germana, C. Mallard, J.S. Arn, D.H. Sachs, and R.J. Hawley, *Transgenic expression of human CD47 markedly increases engraftment in a murine model of pig-to-human hematopoietic cell transplantation*. *Am J Transplant*, 2014. **14**(12): p. 2713–22.
- Cowan, P.J., S.C. Robson, and A.J. d'Apice, *Controlling coagulation dysregulation in xenotransplantation*. *Curr Opin Organ Transplant*, 2011. **16**(2): p. 214–21.
- Wuensch, A., A. Baehr, A.K. Bongoni, E. Kemter, A. Blutke, W. Baars, S. Haertle, V. Zakhartchenko, M. Kurome, B. Kessler, C. Faber, J.M. Abicht, B. Reichart, R. Wanke, R. Schwinger, H. Nagashima, R. Rieben, D. Ayares, E. Wolf, and N. Klymiuk, *Regulatory sequences of the porcine THBD gene facilitate endothelial-specific expression of bioactive human thrombomodulin in single- and multitransgenic pigs*. *Transplantation*, 2014. **97**(2): p. 138–147.
- Mohiuddin, M.M., A.K. Singh, P.C. Corcoran, M.L. Thomas, 3rd, T. Clark, B.G. Lewis, R.F. Hoyt, M. Eckhaus, R.N. Pierson, 3rd, A.J. Belli, E. Wolf, N. Klymiuk, C. Phelps, K.A. Reimann, D. Ayares, and K.A. Horvath, *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.
- Längin, M., T. Mayr, B. Reichart, S. Michel, S. Buchholz, S. Guethoff, A. Dashkevich, A. Baehr, S. Egerer, A. Bauer, M. Mihajl, A. Panelli, L. Issl, J. Ying, A.K. Fresch, I. Buttgerit, M. Mokolke, J. Radan, F. Werner, I. Lutzmann, S. Steen, T. Sjöberg, A. Paskevicius, L. Qiuming, R. Sfriso, R. Rieben, M. Dahlhoff, B. Kessler, E. Kemter, K. Klett, R. Hinkel, C. Kupatt, A. Falkenau, S. Reu, R. Ellgass, R. Herzog, U. Binder, G. Wich, A. Skerra, D. Ayares, A. Kind, U. Schonmann, F.J. Kaup, C. Hagl, E. Wolf, N. Klymiuk, P. Brenner, and J.M. Abicht, *Consistent success in life-supporting porcine cardiac xenotransplantation*. *Nature*, 2018. **564**(7736): p. 430–433.
- Hinrichs, A., B. Kessler, M. Kurome, A. Blutke, E. Kemter, M. Bernau, A.M. Scholz, B. Rathkolb, S. Renner, S. Bultmann, H. Leonhardt, M.H. de Angelis, H. Nagashima, A. Hoeflich, W.F. Blum, M. Bidlingmaier, R. Wanke, M. Dahlhoff, and E. Wolf, *Growth hormone receptor-deficient pigs resemble the pathophysiology of human Laron syndrome and reveal altered activation of signaling cascades in the liver*. *Mol Metab*, 2018. **11**: p. 113–128.
- Sautermeister, J., R. Mathieu, and V. Bogner, *Xenotransplantation-theological-ethical considerations in an interdisciplinary symposium*. *Xenotransplantation*, 2015. **22**(3): p. 174–82.
- Fishman, J.A., L. Scobie, and Y. Takeuchi, *Xenotransplantation-associated infectious risk: a WHO consultation*. *Xenotransplantation*, 2012. **19**(2): p. 72–81.



Werden Sie Mitglied bei «Forschung für Leben»

elektronisch auf:

www.forschung-leben.ch/verein/mitgliedschaft/

oder per Schneckenpost an:

Verein «Forschung für Leben», 8000 Zürich

T +41 78 933 04 76, buch@forschung-leben.ch

- Ich werde gerne Mitglied
des Vereins «Forschung für Leben».
Mitgliederbeitrag jährlich: CHF 50.–
(Studierende sind gratis, bitte Fotokopie der
aktuellen Legi dieser Anmeldung beilegen.)
- Ich/wir werde(n) gerne Gönner
des Vereins «Forschung für Leben».
Gönnerbeitrag jährlich: CHF 500.–

Name

Vorname

Adresse

PLZ/Ort

Telefon

E-Mail