

# Xenogene Zell- und Organtransplantationen – vom Labor in die Klinik\*

von Bruno Reichart<sup>1°</sup>, Sonja Guethoff<sup>1,2°</sup>, Jan-Michael Abicht<sup>1,3</sup>, Tanja Mayr<sup>1</sup>, Michael Thormann<sup>1</sup>, Stefan Buchholz<sup>1,2</sup>, Alexander Kind<sup>4</sup>, Paolo Brenner<sup>1,2</sup>

Für Patienten mit irreversiblen, schwerem Organversagen stellen Transplantationen einen letzten Ausweg dar; pankreatische Inselzellen sind bei Diabetes-Patienten indiziert. Der dramatische Organ- und Gewebe-Mangel beschränkt jedoch die Zahl der notwendigen Interventionen. Porcine Spender wären eine mögliche Alternative. Diese Eingriffe sind jedoch z. B. aufgrund der immunologischen Barrieren nach wie vor eine große Herausforderung. Im Zentrum der Lösungsmöglichkeiten stehen dabei mehrfach genetisch veränderte Tiere, bei denen man Gensequenzen entfernt bzw. hinzugefügt hat. Auf diese Weise hat man Schweinegewebe so verändert, dass Primateneempfänger abgemildert auf Xeno-Antigene reagieren.

## **Die klinischen Erfolge der humanen Organtransplantation und der Mangel an Organspenden zwingen zu Alternativen wie die der diskordanten Xenotransplantation – das Schwein als bevorzugte Spenderspezies**

In den letzten sechs Jahrzehnten haben sich die verschiedenen allogenen (von Mensch zu Mensch) Transplantationsformen sehr erfolgreich entwickelt. Die postoperative Lebensqualität wird dabei in der Regel als „hoch“ eingestuft: Organtransplantationsverfahren sind bei Patienten mit weit fortgeschrittenem, irreversiblen Organversagen deshalb die Therapie der Wahl. Konsequenterweise ist die Zahl der Indikationen zu den verschiedenen Eingriffen ständig gestiegen; demgegenüber blieb die Anzahl der Organspenden in etwa konstant (sieht man von dem wohl vorübergehenden Abfall in Deutschland ab, bedingt durch den sog. Transplantations-Skandal). Der daraus resultierende Organmangel kann zu schwerwiegenden Folgen für die jeweiligen Transplantationskandidaten führen. Zwei Beispiele sollen dies veranschaulichen:

---

\* Für den DFG Sonderforschungsbereich Transregio 127: Ludwig-Maximilians-Universität (führend) und Technische Universität München, Helmholtz-Zentrum München, Medizinische Hochschule Hannover und Friedrich-Loeffler-Institut, Technische Universität Dresden, Paul-Ehrlich- und Robert-Koch-Institute, Deutsches Primatenzentrum Göttingen.

<sup>1</sup> Sonderforschungsbereich Transregio 127, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

<sup>2</sup> Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

<sup>3</sup> Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

<sup>4</sup> Lehrstuhl für Biotechnologie, Weihenstephan, Technische Universität München.

<sup>°</sup> Die Erstautorenschaft wurde zwischen den beiden erstgenannten Autoren B. R. und S. G. geteilt.

In Deutschland beträgt die jährliche Letalität auf der Herztransplantations-Warteliste 17,7 % (Oosterlee; Rahmel 2011).

Für Nierentransplantations-Kandidaten dient die Dialyse zur Überbrückung, die jedoch mit erheblichen Einschränkungen der Lebensqualität und einer jährlichen Letalitäts- und Morbiditätsrate einhergeht, die von der Ko-morbidität (z. B. gleichzeitigem Diabetes mellitus) abhängt. Bei Patienten, die präoperativ die Hämodialyse länger als sechs Monate benötigten, sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass sie zehn Jahre nach der Nierentransplantation ein noch funktionierendes Organ haben, um die Hälfte (Meier-Kriesche; Kaplan 2002; in Deutschland müssen Nierenkranke zur Zeit im Schnitt fünf Jahre auf ein Transplantat warten, wenn es keine Möglichkeit der Lebendspende gibt).

Alternativen aus diesem therapeutischen Dilemma sind also gefragt, zumal eine wesentliche Steigerung der Spenderaten gerade in Deutschland nur schwer zu erreichen sein wird. So befinden sich weltweit maschinelle Herzunterstützungsverfahren in der Erprobung. Es handelt sich dabei meist um strombetriebene Impellerpumpen (propellerartige Antriebe im Pumpengehäuse), die ihre Energie über extrakorporale (außerhalb des Körpers befindliche) Batterien erhalten. Versorgungskabel, die auch der Pumpeneinstellung dienen, passieren die Patientenhaut in der Regel abdominell (Bauchbereich). Dies schränkt die Lebensqualität in verschiedener Weise ein und bedeutet vor allem eine permanente Infektionsgefahr. Maschinelle Herzpumpen sind dem eigenen Organ funktionell parallel geschaltet und verstärken damit seine Schlagkraft. Linksherz-Unterstützungssysteme gewähren eine Einjahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von etwa 90 %. Wenn allerdings bei sehr schwer Erkrankten beide Herzhälften unterstützt werden müssen, sinkt diese Wahrscheinlichkeit auf 50–60 % (Kirklin *et al.* 2013).

Herzunterstützungssysteme sind thrombogen, das heißt, dass sich in ihnen Blutgerinnsel bilden können, die bevorzugt ins Gehirn embolisieren und dort Schlaganfälle hervorrufen können. Eine wirksame Antikoagulation („Blutverdünnung“) wird deshalb benötigt, die wiederum zu Blutungskomplikationen führen kann.

Für Patienten mit weit fortgeschrittenem irreversiblen Herz- oder Nierenversagen wäre die Xenotransplantation eine denkbare lebensrettende Maßnahme. Von praktischer Seite möglich wären derzeit *konkordante* Organspenden, also Organe von nicht-menschlichen Primaten (Menschenaffen, wie beispielsweise Schimpansen oder auch Paviane) mit Immunsuppressions-Schemata, die den jetzigen Erfahrungen im allogenen System entsprechen (Reichenspurner *et al.* 1989).

Jedoch sind konkordante xenogene Transplantationen aus ethischen und logistischen Überlegungen nicht durchführbar. Menschenaffen zeigen in Verhaltensstudien höhere kognitive Leistungen, die Organexplantationen als ethisch nicht akzeptabel erscheinen lassen. Außerdem sind sie von ihrer Zahl her eine gefährdete Tierrasse, die geschützt werden muss. Viele der nicht-menschlichen Primaten sind zudem zu klein, ihre Fortpflanzungsrate zahlenmäßig zu gering, ihr Wachstum zu langsam, um eine erfolgreiche und wirksame Alternative zur klinischen allogenen Organtransplantation darzustellen.

Die eben erwähnten Argumente würden für eine *diskordante* (Organe und Gewebe, die entwicklungsgeschichtlich aus von uns weit entfernten Spezies stammen) xenogene Organspende nicht zutreffen. Porcine (vom Schwein stammende) Organe beispielsweise

entsprechen in Größe und Anatomie den humanen Ausmaßen. Nach einer kurzen Trächtigkeit von nur ca. vier Monaten, gebären Schweine 10 bis 14 Ferkel, die wiederum nach nur sechs Monaten die Geschlechtsreife erreichen. Die erfolgreiche und sichere Züchtung der Tiere ist dem Menschen seit Jahrhunderten bekannt, da vor allem in der westlichen Welt Schweine als Nahrungsquelle dienen. Ethische Einwände sollten daher primär nicht bestehen. Für eine notwendige Immun-Toleranz wäre jedoch eine genetische Veränderung der porcinen Organe notwendig. Daher muss innerhalb der Gesellschaft diskutiert werden, ob es akzeptabel ist, gentechnisch veränderte Schweine zum Zwecke einer Transplantation zu züchten (Cozzi et al. 2009).

### **Die klinische Notwendigkeit von diskordanten zellulären Transplantationen**

Neben der Transplantation von soliden Organen gibt es auch einen klinischen Bedarf an diskordanten Zellgeweben wie die der Leber (zur Therapie des akuten Organversagens z. B. Nagata et al. 2007); bei Parkinson-Erkrankten ist die Implantation von Nervenzellen eine Therapiemöglichkeit (Badin et al. 2010; Leveque et al. 2011), bei Augenerkrankungen kommt die Transplantation der Hornhaut in Frage (Choi et al. 2011; Hara; Cooper 2011).

Ungefähr 300.000 Menschen weltweit benötigen Herzklappenprothesen, eine etablierte und lebensverlängernde Maßnahme, die trotz vieler Vorteile jedoch auch Nachteile mit sich bringt. Mechanische Modelle aus extrem widerstandsfähigen Kunststoffen können Patienten lebenslang unterstützen. Diese benötigen aber wegen der Thrombogenität der Kunststoffe eine ständige Antikoagulation (sog. „Blutverdünnung“, ein Herabsetzen der Blutgerinnbarkeit mit Medikamenten), die zu Spontanblutungen führen kann: Operierte mit mechanischen Klappenprothesen haben wegen Hämorrhagien (und Thrombembolien) eine jährliche Letalität von etwa zwei Prozent. Demgegenüber haben biologische (porcinen oder bovinen Ursprungs) Herzklappenprothesen den Vorteil, dass sie keiner Antikoagulation bedürfen, wenn ein regelmäßiger Herzrhythmus gegeben ist. Biologische (z. B. Glutaraldehyd fixierte) Herzklappen haben jedoch den Nachteil einer beschränkten Funktionsdauer, die sich insbesondere bei jungen Menschen auf wenige Jahre verkürzt zeigte (Kouchoukos et al. 2012). Als Mitursache für die kurze Funktionsdauer werden degenerative Veränderungen durch porcine Zelloberflächen-Antigene diskutiert, gegen die humane Antikörper bestehen (Kasimir et al. 2006). Eine unserer Arbeitsgruppen hat deshalb das Ziel, nicht fixierte biologische Schweineherzklappen ohne Oberflächen-Zellschicht aus genetisch modifizierten Tieren zu entwickeln, die zwei der wichtigsten Antigene nicht bilden können.

Porcine Inselzellen (Insulin produzierende Zellen der Bauchspeicheldrüse, Pankreas) stehen im Zentrum der klinisch orientierten, diskordanten Zelltherapie-Forschung. Mitursache hierfür ist die weltweit beobachtete Zunahme an Erkrankten mit Diabetes mellitus – in den nächsten zwanzig Jahren wird sich die Anzahl jener Patienten verdoppeln (Hossain et al. 2007). Obwohl eine klassische antidiabetische Therapie mit Diät,

Tabletten und Insulin bei den meisten Patienten ausreicht, stellen hypoglykämische Attacken („Unterzuckerung“) nach wie vor eine lebensbedrohliche Komplikation in 5–10 % der Fälle dar, eine Zahl, an der auch Insulinpumpen auf Grund ihrer Reaktions-trägheit nichts ändern konnten. Hypoglykämische Episoden trotz optimaler medikamentöser Therapie bei Patienten mit angeborenem Diabetes mellitus vom Typ I (etwa 10 % aller Diabetiker) können zur Indikationsstellung einer Inseltransplantation führen. Allogene Eingriffe wären eine verhältnismäßig leicht zu realisierende Lösung aus diesem therapeutischen Dilemma: Mit Hilfe einer Spritze und einer Nadel appliziert man die Inselzell-Suspension über die Pfortader in die Leber, wo die Zellen verbleiben und ihre Funktion der Zuckerregulation übernehmen. Inseltransplantationen haben ein niedriges operatives Risiko und verbessern im Erfolgsfall die Lebensqualität der Empfänger erheblich. Leider sind auf Grund des Mangels an geeigneten Spendern weltweit bislang nur 1.400 Eingriffe erfolgt (Collaborative Islet Transplant Registry 2013), da die Methode der Inseltransplantation mit dem kombinierten Nieren/Pankreas Ersatz konkurriert. In Deutschland führen alleine die Diabetologen der Dresdner TU diesen Eingriff durch, mit etwa vier Interventionen im Jahr.

Diskordante porcine Inseltransplantationen können ein Weg aus diesem Spendermangel sein. Untermauert wird diese Meinung durch eindrucksvolle Ergebnisse präklinischer Studien an diabetischen Primaten, die unmodifizierte porcine Inseln (von sogenannten „Wildtyp“ Tieren) ohne und mit Mikroverkapselung erhielten. Diese die Inseln umhüllenden, mikroporösen Schichten erlauben einen Austausch von kleinen Molekülen wie etwa Zucker (einwärts) bzw. Insulin (auswärts). Größeren Molekülen, wie zellzerstörenden Antikörpern oder T-Lymphozyten (Auslöser von humoralen oder zellulären Abstoßungsreaktionen) bleibt der Zugang verwehrt (*Sun et al.* 1996; *Calafiore et al.* 2004; *Dufrane et al.* 2010). Unter diesen Umständen erübrigt sich eine Immunsuppression. Es ist jedoch noch nicht bekannt, wie lang die Kapselporen funktionstüchtig bleiben oder ob sie nach einer gewissen Zeit, z. B. durch Fibrinablagerungen, verstopft werden.

Bei nicht-mikroverkapselten porcinen Inseln wird eine Immunsuppression notwendig (*Cardona et al.* 2006; *Hering et al.* 2006); über die erfolgreiche Anwendung von genetisch veränderten Schweineinseln berichteten *Van der Windt et al.* 2009.

### **Zur Frage der Sicherheit von diskordanten xenogenen Transplantationen; der Ausschluss eines möglichen Infektionsrisikos**

Die Übertragung von krankheitserregenden Mikroorganismen – auch ein Problem im allogenen Transplantationsbereich – ist ein lange bestehender Einwand und einer der Hauptkritikpunkte gegen eine klinische Anwendung von diskordanten xenogenen Transplantationen (vom Schwein auf Primaten). Zukünftige Eingriffe bieten jedoch die Möglichkeit, geeignete porcine Spendertiere in Ruhe und ohne Zeitdruck sorgfältig auszuwählen (*Denner et al.* 2009; *Scobie; Takeuchi* 2009; *Mueller et al.* 2011). Eine wichtige Vorbedingung stellt die Aufzucht der Tiere in einer keimarmen Umgebung dar (so-

genannte „Designated Pathogene Free“ units, DPF), mit z. B. gefilterter Luft, destilliertem Wasser und sauberer Nahrung. Darüber hinaus werden humane Empfänger von porcinen xenogenen Zellen und Organen einer engmaschigen post-operativen Überwachung bedürfen, die im weiteren Verlauf gelockert, aber lebenslang anhalten wird.

Am intensivsten wurden die möglichen infektiösen Gefahren durch porcine endogene Retroviren (PERV A, B und C) diskutiert. Integriert in die Keimbahn, werden sie vertikal an die Nachkommen vererbt. Zudem zeigten *in vitro* Untersuchungen in den 90er-Jahren, dass unter künstlichen Laborbedingungen menschliche Tumorzellen mit PERV infiziert wurden (Le Tissier et al. 1997); auch sind Rekombinationen bekannt (Bartosch et al. 2004), wobei die Neubildung von PERV AC z. B. ein höheres ansteckendes Potential hat als alleinige A, B oder C Partikel (Klymiuk et al. 2002; Oldmixon et al. 2002).

Entscheidend ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass nach den wenigen bei Menschen bislang erfolgten Transplantationen keine PERV-Infektionen nachgewiesen wurden (Garkavenko et al. 2008a und b).

Dennoch hat die Internationale Gesellschaft für Xenotransplantation (IXA) für zukünftige klinische Studien strenge Bedingungen zusammengestellt, um eine höchstmögliche Sicherheit zu gewährleisten; Updates finden regelmäßig statt (First and second WHO global consultations on regulatory requirements for xenotransplantation clinical trials, Changsha, China, 2008 and Geneva, Switzerland, 2011).

## **Immunologische Barrieren der xenogenen Organtransplantation und Strategien, sie zu überwinden**

Zukünftige Xenotransplantationen von Zellen und letztendlich von Organen können einen wesentlichen Fortschritt auf dem Gebiet der regenerativen Medizin und der Transplantationsmedizin ausmachen. Haupthürden zu diesem Ziel sind biochemische Reaktionen, die etwa durch Protein-Inkompatibilitäten ausgelöst werden. Die Inkongruenzen erklären sich mit entwicklungsgeschichtlichen Divergenzen von etwa 90 Millionen Jahren, der Zeitspanne zwischen der Entstehung von Schweinen und Primaten (bzw. dem Menschen). Sollen xenogene Transplantationen klinisch erfolgreich sein, müssen deshalb starke immunologische (und auch biochemische) Unterschiede sicher und auf lange Zeit überwunden werden. Erfreulicherweise nimmt das Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen ständig zu, neue Strategien werden entwickelt, um sie zu konterkarieren. Im Folgenden sollen die wesentlichen Abläufe und Komplikationen nach einer xenogenen Organtransplantation dargestellt und die Konzepte, wie man ihnen begegnen könnte, erläutert werden.

### *Humorale Abstoßungsreaktionen vom hyperakuten Typ*

Durchströmt man ein unmodifiziertes porcines Organ (Herz oder Niere) mit Primatenblut, verbinden sich sofort präformierte (also bereits vorhandene) Antikörper mit Zuckerantigenen, die aus  $\alpha$ -1,3-Galaktosyl-Galaktose ( $\alpha$ -Gal) bestehen (vgl. Abbildung S. 10).

Diese Strukturen, den menschlichen Blutgruppen ähnlich, markieren alle Oberflächen der Schweinezellen, also auch jene, die die inneren Schichten der Blutgefäße bilden.

Woher kommen diese präformierten Antikörper? Menschen und Altweltaffen (wie etwa Paviane) sind durch einen Genmangel nicht in der Lage,  $\alpha$ -Gal zu bilden, wohl aber Antikörper innerhalb der ersten beiden Lebensjahre als Reaktion auf  $\alpha$ -Gal-Epitope von Darmbakterien (*Galili* 2013). Die Antigen/Antikörper Bindung wiederum aktiviert innerhalb von Sekunden eine biochemische Reaktion, die sogenannte Komplement-Kaskade. Diese bedingt eine Auflösung der lückenlosen (blutdichten) Zellverbände von Blutgefäßen der transplantierten Organe, Zellen sterben ab. Ausgedehnte Blutungen und Ödeme sind die Folge, ebenso thrombotische Verschlüsse von kleinen Gefäßen. Es kommt zu einem raschen Organversagen, innerhalb von Minuten bis zu einer Stunde.

Die eben erfolgte Beschreibung einer hyperakuten Abstoßung kann man verhindern, wenn man Schweine generiert, denen das Gen, das für das Entstehen der  $\alpha$ -Gal-Antigene zuständig ist, fehlt ( $\alpha$ -Gal-KO, Knock-out). Präformierten Antikörpern von Altweltaffen (und letztendlich Menschen) fehlt damit der Rezeptor, die Komplement-Kaskade unterbleibt.

Homozygote Gal-KO Schweine gibt es seit einiger Zeit (*Phelps et al.* 2003), auch inzwischen als Züchtung in Herden. Die Effektivität der genetisch modifizierten Organe hat man im Pavianmodell getestet und damit eine maximale Funktion der Organe von drei Monaten nach Nieren- und acht Monaten nach Herztransplantation erzielt (*Kuwaki et al.* 2005; *Yamada et al.* 2005; *Ekser et al.* 2011).  $\alpha$ -Gal-KO Tiere sind ein Grundstock für weitere gentechnische Veränderungen.

Es ist wichtig, an diesem Punkt der Darstellung darauf hinzuweisen, dass erfolgreich gentechnisch veränderte Tiere (die zum Zwecke der xenogenen Transplantation zunächst geklont, dann gezüchtet werden) sich wie ihre „normalen“ („Wildtyp“) Artgenossen entwickeln und verhalten.

#### *Humorale Abstoßungsreaktionen vom verzögerten Typ*

Mit  $\alpha$ -Gal-KO Tieren gelingt es, die eben beschriebene hyperakute Abstoßungsreaktion zu konterkarieren und transplantierte Organe wie Herz und Nieren funktionsfähig zu halten (vgl. Abbildung S. 10). Es soll in diesem Zusammenhang nicht unerwähnt bleiben, dass neben der Komplement-Kaskade auch andere Schadensmechanismen aktiviert werden, wie z. B. eine von Zellen des angeborenen Immunsystems ausgehende Reaktion (*Ezzelarab et al.* 2009). Diese Mechanismen zu verstehen und Schäden zu vermeiden, sind Ziele von zwei weiteren Arbeitsgruppen unseres Konsortiums.

Innerhalb der ersten drei post-operativen Wochen bildet das Empfänger-Immunsystem neue, stark wirksame (sekundäre) Antikörper gegen verschiedene weitere porcine (non-Gal) Epitope (*Diswall et al.* 2010; *Byrne et al.* 2011). Sie wirken wiederum über die Komplement-Kaskade, nur nicht so abrupt, sondern verzögert. Da man nicht alle diese Antigene (Epitope) gentechnisch entfernen kann, versucht man alternative Wege: Durch das Einbringen von humanen DNS-Strukturen in das Schweinegenom wird die Bildung von (menschlichen) Komplement-Regulatorproteinen (CD46, 55, 59; Knock-in-Technik;

vgl. Abbildung S. 10) angeregt. Sie helfen, die einmal initiierte Kaskade wieder anzuhalten (Pierson 2009; Eksler et al. 2012).

Wie noch gezeigt werden wird, genügen diese Modifikationen in präklinischen Experimenten dennoch nicht, um auf Dauer und sicher die Funktionsfähigkeit von Organen zu erhalten.

#### *Thrombotische Mikroangiopathie*

Die Fließeigenschaften des Blutstroms sind vor allem in den feinelumigen Kapillaren auf ein schnell funktionierendes Antikoagulationssystem angewiesen, mit dem die Zelloberflächen der Gefäßinnenschichten ausgerüstet sind. Ist dieses System geschädigt, kommt es zu (Fibrin-)Thromben, die eine Mehrzahl oder alle Gefäßlumina verstopfen. Eine Organischämie mit Organversagen, ähnlich einem Herzinfarkt, ist die Folge (Shimizu et al. 2008; Cowan et al. 2009). Auf Grund der schon erwähnten entwicklungsgeschichtlichen Diskrepanzen passen im diskordanten xenogenen System wichtige Protein-Moleküle von Schwein und Primaten nicht zusammen. Ein Beispiel: Porcines Thrombomodulin (wichtiges Protein im Blut, das vor allem in den Kapillaren die Entstehung von Gerinnsel unterbindet) bindet nur schwach Primaten-Thrombin, wodurch zu wenig Protein C gebildet wird, nicht genügend, um eine Koagulation und damit eine Fibrin- (Thromben-) Bildung zu verhindern (Roussel et al. 2008). Ein weiteres Ziel unseres Konsortiums ist es deshalb, wiederum durch gentechnischen *Knock-in*, menschliches Thrombomodulin auf Schweinezellen zu exprimieren, um diese wichtige Antikoagulations-Reaktion wieder zu ermöglichen (Petersen et al. 2009; Wuensch; Baehr; Bongoni; Kemter et al. 2014; vgl. Abbildung S. 10).

#### *Zelluläre Abstoßungsreaktionen*

Diese werden, wie im allogenen System, durch T-Lymphozyten betrieben. Zur Prophylaxe verwendet man Schemata von immunsuppressiven Medikamenten, die seit Jahrzehnten im klinischen Gebrauch erfolgreich sind.

#### *Präklinische Erfahrungen mit der xenogenen Herztransplantation*

Die besten Ergebnisse, mit 236 Tagen, wurden im präklinischen Primatenmodell mit heterotopen (an einen anatomisch anderen Ort) abdominalen Herztransplantationen erzielt (Mohiuddin et al. 2012). Dabei transplantiert man das gentechnisch modifizierte Organ in den Bauchraum des Empfängers, wobei als Blutzufuhr die jeweiligen Aortenstücke (Schlagader) und als Blutabfluss die (porcine) Pulmonalis (Lungenschlagader) und die (primaten) Vena cava abdominalis (Bauchvene) miteinander verbunden wurden. Das so perfundierte Herz schlägt, muss aber keine Pumpleistung erbringen.

Orthotop verpflanzte Organe (als kompletter Herzersatz im Brustraum fungierend) waren bis zu 57 Tage lebenserhaltend (McGregor et al. 2009). Unsere Gruppe bevorzugt seit längerer Zeit die Barnardsche heterotope, thorakale Transplantationstechnik (Bauer et al. 2010). Dabei wird das verpflanzte Organ, das sich im rechten Thorax (Brustraum) befindet, Strömungs-technisch parallel zum Empfängerherzen eingenäht, es unterstützt

dessen Pumpleistung also. Der Beweis, dass dies tatsächlich so ist, wird mit Online-Messungen der peripheren Druckkurven des transplantierten Organs erbracht. Als bestes Funktionsergebnis wurden bislang 50 Tage erreicht. Ein Vorteil dieser thorakalen, heterotopen Methode ist, dass das eigene Herz den Kreislauf weiterhin unterstützt, das Tier also nicht an der irreversiblen Abstoßung verstirbt (wie dies bei der orthotopen Technik der Fall wäre).

Zurzeit verwenden wir zwei- ( $\alpha$ -Gal-KO, CD 46) und dreifach- ( $\alpha$ -Gal-KO, CD 46, humanes Thrombomodulin) genetisch modifizierte Spendertiere und folgende Immunsuppression:

Eine Woche präoperativ erhalten die Empfänger eine einmalige Knochenmarks-Depletion (medikamentöse Verminderung), um die dort vorhandenen Antikörper produzierenden Zellen zu zerstören (*Palumbo; Anderson 2011*). Extrakorporale Immunabsorptionen – eine Methode der „Blutwäsche“, um bereits existierende oder später gebildete Antikörper zu entfernen – finden zwei Tage präoperativ, eventuell auch am Tag des Eingriffs statt. Eine aus der allogenen Herztransplantation bekannte medikamentöse Dreifach-Immunsuppression folgt, komplettiert durch Anti-T-Lymphozyten-Serum und einer thorako-abdominalen Lymphknotenbestrahlung mit sechs Gray (*Heinzelmann et al. 2008*).

In naher Zukunft werden weitere günstig wirkende, genmodifizierte Organe – nach intensiver Labortestung im Zellsystem – zur Anwendung kommen (*Petersen et al. 2011*). Mit Spannung sehen wir auch der Expression von biochemischen Konstrukten entgegen, die eine Kostimulation von T- und B-Lymphozyten blockieren, und damit das Entstehen der verschiedenen Abstoßungsreaktionen verhindern werden (*Klymiuk et al. 2012*).

Es ist unser angestrebtes Ziel – und dieses stimmt mit den internationalen Empfehlungen überein – eine konsekutive Transplantationsserie mit zehn Primaten zu erzielen, in der das transplantierte Herz in sechs Fällen mindestens drei Monate funktioniert.

#### *Erste klinische Erfahrungen mit der porcinen Inseltransplantation*

Porcines Insulin ist seit fast einem Jahrhundert bekannt und in Primaten wirksam. Ohne Immunsuppression jedoch würden unmodifizierte, Insulin produzierende Zellen innerhalb kurzer Zeit von einem Vorgang abgetötet, der mit dem Terminus „*immediate blood mediated inflammatory reaction*“ beschrieben wird. Ursache hierfür sind wiederum präformierte Antikörper, Komplementreaktionen und eine exzessive Blutgerinnung. Um sie zu verhindern, benötigt man eine Immunsuppression, die der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen ähnelt. Als Spendertiere dienten in erfolgreichen präklinischen Studien auch CD 46 positive Zellen (*Van der Windt et al. 2009*).

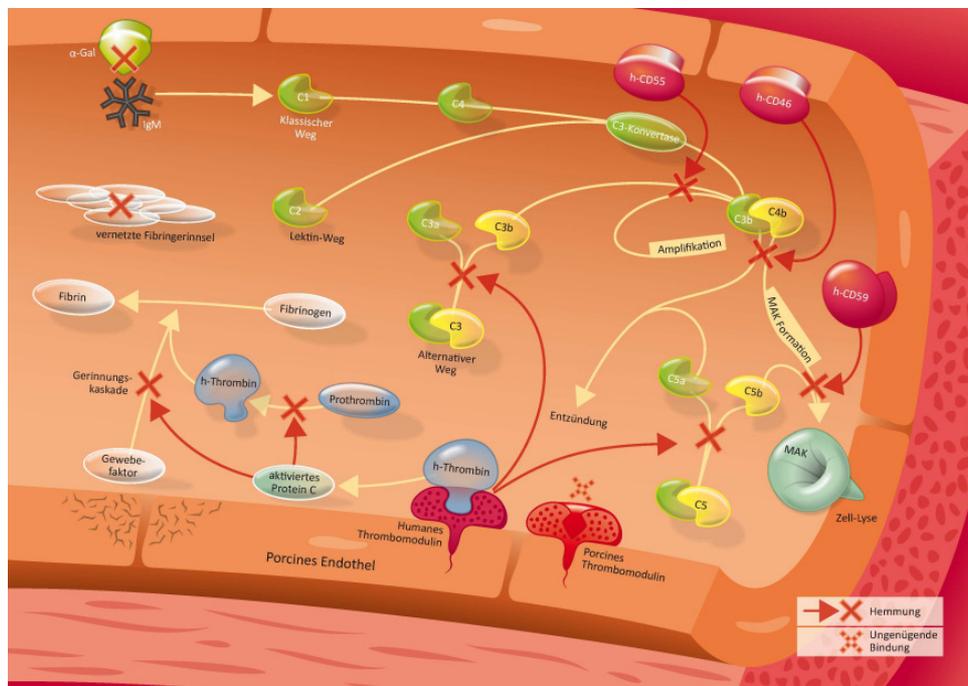
Als ersten Schritt in die Klinik verwendete die neuseeländische Firma *Living Cell Technologies* (mit dem biologischen Polymer Alginat) mikroverkapselte Inseln, mit denen sie mehr als 20 Patienten mit Diabetes Typ I und häufigen hypoglykämischen Episoden behandelte (*Elliott 2011* sowie persönliche Mitteilungen). Diese Studie, die sich vor allem mit der Dosis-Findung und der möglichen Übertragung von infektiösen Keimen befasste, erbrachte eine Verbesserung von klinischen Symptomen bei einigen Patienten: Abfall des glykolisierten Hämoglobins (als Maß der Blutzuckerwerte), Reduzierung

der Menge an täglich benötigtem Insulin und verminderte Häufigkeit von Zeiten des Unterzuckers. Am wichtigsten erschienen die Beobachtungen, dass bei keinem der Transplantierten vom Spender übertragene Infektionen nachgewiesen wurden, auch nicht solche durch PERV.

Die genetisch nicht modifizierten Spendertiere wurden in einer DPF-Einheit gezüchtet. Sie entstammten einer Herde, die sich seit etwa 150 Jahren auf Auckland Island aufhält. Zu diesem Zeitpunkt hatten sie englische Schifffahrer, die auf Entdeckungsfahrten waren, in der Absicht ausgesetzt, ihren Nachschub an Schweinefleisch zu sichern. Auf dieser subarktischen Insel konnten sich die Tiere in großer Abgeschlossenheit fortpflanzen, ohne Einwirkungen von anderen Rassen oder dem Menschen.

Eine deutsche Multicenterstudie ist mit mikroverkapselten Zellen geplant, auch um Erfahrungen mit ethischen und rechtlichen Fragen der Xenotransplantation zu gewinnen. Nach erfolgreichem Abschluss und nach weiteren präklinischen Primatenstudien könnte man sich auch vorstellen, mit unseren genetisch modifizierten Tieren – auf der Basis der eben erwähnten neuseeländischen Schweine – klinisch anwendbare Pankreas-Inseln zu generieren, wobei dann eine Immunsuppression notwendig werden würde.

*Abbildung: Schema eines mit Primatenblut (Mensch, Pavian) durchbluteten porcinen Xenografts (z. B. Spenderherz)*



*Erläuterung der Abbildung:* Es ist ein porcines Blutgefäß dargestellt, auf dessen gen-modifizierten Endothel (die zum Gefäßlumen hin gerichtete Zellschicht) für die Xenotransplantation vorteilhafte Veränderungen vorgenommen worden sind.

*Oben/Mitte:*  $\alpha$ -1,3-Galactosyltransferase ist für die Bildung von  $\alpha$ -Gal Epitope notwendig. Altweltaffen (Menschen) haben dieses Gen nicht, folglich auch keine  $\alpha$ -Gal Epitope. Im Laufe ihres frühen Lebens bilden Primaten Antikörper (gegen Darmbakterien mit denselben  $\alpha$ -Gal Markern). Diese binden nach Xenotransplantation an  $\alpha$ -Gal Epitope des porcinen Grafts. Die so gebildeten Antigen/Antikörper-Komplexe aktivieren den klassischen Weg der Komplementkaskade, also multiple Proteine (C), die als unspezifische Immunantwort verschiedene Abwehrmechanismen aktivieren. Diese verschiedenen biochemischen Wege können an unterschiedlichen Stellen gehemmt werden – dargestellt durch schwarze Pfeile und Kreuze.

Die Inaktivierung des porcinen  $\alpha$ -1,3-Galactosyltransferase-Gens (*GGTA1*) führt zum Verlust der  $\alpha$ -Gal Epitope, sodass eine Aktivierung des Komplementsystems ausbleibt.

*Rechts:* Die Hemmung des Komplementsystems durch humane Komplementregulatoren (h-CD46, 55 oder 59); letztendlich werden keine MAK-Komplexe gebildet (MAK=Membran-Angriffs-Komplex), die durch Einbau in die Zellwand des Xenografts eine Lyse, somit den Zelltod zur Folge haben.

*Unten:* Als xenogene Immunantwort des porcinen Endothels auf das Primaten-Blut wird Gewebefaktor freigesetzt. Die hierdurch aktivierte Gerinnungskaskade kann durch porcines Thrombomodulin nicht effizient reguliert werden, da humanes Thrombin (h-Thrombin) nur ungenügend gebunden wird. Als Folge dieser Diskordanz kommt es zu Fibringerinnseln, Verschlüssen in den kleinen Gefäßen eines Transplantats, und der Funktionsverlust des Organs ist unvermeidlich. Bei transgenen Spendertieren, bei denen humanes Thrombomodulin auf der Gefäßwand gebildet wird, kann durch Bindung des h-Thrombins ausreichend Protein C entstehen, eine Gerinnung unterbleibt.

Die Abbildung zeigt, dass eine transgene Veränderung der Spendertiere (z. B.  $\alpha$ -Gal Knock-out, Knock-in von h-CD46, 55 und 59, von humanem Thrombomodulin) unerwünschte Reaktionen des Komplementsystems und der Gerinnungskaskade mindern und somit eine Protektion des Xenografts erzielt werden kann.

## Bibliografie

- Badin R. A.; Padoan A.; Vadori M. et al.* (2010): Long-term clinical recovery in parkinsonian monkey recipients of CTLA4-Ig transgenic porcine neural precursors, in: *Transplantation* 90, 47.
- Bartosch B.; Stefanidis D.; Myers R. et al.* (2004): Evidence and consequence of porcine endogenous retrovirus recombination, in: *Journal of Virology* 78, 13880–13890.
- Bauer A.; Postrach J.; Thormann M. et al.* (2010): First experience with heterotopic thoracic pig-to-baboon cardiac xenotransplantation, in: *Xenotransplantation* 17, 243–249.

- Byrne G. W.; Stalboeger P. G.; Du Z. et al. (2011): Identification of new carbohydrate and membrane protein antigens in cardiac xenotransplantation, in: *Transplantation* 91, 287–292.
- Calafiore R.; Basta G.; Luca G. et al. (2004): Grafts of microencapsulated pancreatic islet cells for the therapy of diabetes mellitus in non-immunosuppressed animals, in: *Biotechnology and Applied Biochemistry* 39, 159–164.
- Cardona K.; Korbitt G. S.; Milas Z. et al. (2006): Long-term survival of neonatal porcine islets in nonhuman primates by targeting costimulation pathways, in: *Nature Medicine* 12, 304–306.
- Choi H. J.; Kim M. K.; Lee H. J. et al. (2011): Efficacy of pig-to-rhesus lamellar corneal xenotransplantation, in: *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52, 6643–6650.
- Collaborative Islet Transplant Registry (2013). Online abrufbar unter: [www.citeregistry.org](http://www.citeregistry.org)
- Cowan P. J.; Roussel J. C.; d'Apice A. J. (2009): The vascular and coagulation issues in xenotransplantation, in: *Current Opinion in Organ Transplantation* 14, 161–167.
- Cozzi E.; Tallacchini M.; Flanagan E. B. et al. (2009): The International Xenotransplantation Association consensus statement on conditions for undertaking clinical trials of porcine islet products in type 1 diabetes – chapter 1: Key ethical requirements and progress toward the definition of an international regulatory framework, in: *Xenotransplantation* 16, 203–214.
- Denner J.; Schuurman H. J.; Patience C. (2009): The International Xenotransplantation Association consensus statement on conditions for undertaking clinical trials of porcine islet products in type 1 diabetes – chapter 5: Strategies to prevent transmission of porcine endogenous retroviruses, in: *Xenotransplantation* 16, 239–248.
- Diswall M.; Angstrom J.; Karlsson H. et al. (2010): Structural characterization of alpha1,3-galactosyltransferase knockout pig heart and kidney glycolipids and their reactivity with human and baboon antibodies, in: *Xenotransplantation* 17, 48–60.
- Dufrane D.; Goebbels R. M.; Gianello P. (2010): Alginate macroencapsulation of pig islets allows correction of streptozotocin-induced diabetes in primates up to 6 months without immunosuppression, in: *Transplantation* 90, 1054–1062.
- Ekser B.; Kumar G.; Veroux M.; Cooper D. K. (2011): Therapeutic issues in the treatment of vascularized xenotransplants using gal-knockout donors in nonhuman primates, in: *Current Opinion in Organ Transplantation* 16, 222–230.
- Ekser B.; Ezzelarab M.; Hara H. et al. (2012): Clinical xenotransplantation: The next medical revolution?, in: *Lancet* 379, 672–683.
- Elliott R. B. (2011): Towards xenotransplantation of pig islets in the clinic, in: *Current Opinion in Organ Transplantation* 16, 195–200.
- Ezzelarab M.; Garcia B.; Azimzadeh A. et al. (2009): The innate immune response and activation of coagulation in alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout xenograft recipients, in: *Transplantation* 87, 805–812.
- First and second WHO global consultations on regulatory requirements for xenotransplantation clinical trials, Changsha, China, November 19–21, 2008 and Geneva, Switzerland, October 17–19, 2011. Online abrufbar unter: <http://www.who.int/transplantation/xeno/en/>

- Galili U. (2013): Discovery of the natural anti-Gal antibody and its past and future relevance to medicine, in: *Xenotransplantation* 20, 138–147.
- Garkavenko O.; Dieckhoff B.; Wynyard S. et al. (2008a): Absence of transmission of potentially xenotic viruses in a prospective pig to primate islet xenotransplantation study, in: *Journal of Medical Virology* 80, 2046–2052.
- Garkavenko O.; Wynyard S.; Nathu D. et al. (2008b): Porcine endogenous retrovirus (PERV) and its transmission characteristics: a study of the New Zealand designated pathogen-free herd, in: *Cell Transplant* 17, 1381–1388.
- Hara H.; Cooper D. K. (2011): Xenotransplantation – the future of corneal transplantation?, in: *Cornea* 30, 371–378.
- Heinzelmann F.; Lang P. J.; Ottinger H. et al. (2008): Immunosuppressive total lymphoid irradiation-based reconditioning regimens enable engraftment after graft rejection or graft failure in patients treated with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, in: *International Journal of Radiation Oncology – Biology – Physics* 70, 523–528.
- Hering B. J.; Wijkstrom M.; Graham M. L. et al. (2006): Prolonged diabetes reversal after intraportal xenotransplantation of wild-type porcine islets in immunosuppressed nonhuman primates, in: *Nature Medicine* 12, 301–303.
- Hossain P.; Kavar B.; El Nahas M. (2007): Obesity and diabetes in the developing world – a growing challenge, in: *New England Journal of Medicine* 356, 213–215.
- Kasimir M. T.; Rieder E.; Seebacher G. et al. (2006): Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves, in: *Journal of Heart Valve Disease* 15, 278–286.
- Kirklin J. K.; Naftel D. C.; Kormos R. L.; Stevenson L. W.; Pagani F. D.; Miller M. A. et al. (2013): Fifth INTERMACS annual report: Risk factor analysis from more than 6000 mechanical circulatory support patients, in: *Journal of Heart and Lung Transplantation* 32, 141–156.
- Klymiuk N.; Muller M.; Brem G.; Aigner B. (2002): Characterization of porcine endogenous retrovirus gamma pro-pol nucleotide sequences, in: *Journal of Virology* 76, 11738–11743.
- Klymiuk N.; van Buerck L.; Bähr A. et al. (2012): Xenografted islet cell clusters from INSLEA29Y transgenic pigs rescue diabetes and prevent immune rejection in humanized mice, in: *Diabetes* 61, 1527–1532.
- Kouchoukos N. T.; Blackstone E. H.; Hanley F. L.; Kirlin J. W. (2012): *Kirklin/Barratt-Boyes Cardiac Surgery. Morphology, diagnostic criteria, natural history, techniques, results, and indications Cardiac surgery*, Churchill Livingstone, 4<sup>th</sup> edition.
- Kuwaki K.; Tseng Y. L.; Dor F. J. et al. (2005): Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience, in: *Nature Medicine* 11, 29–31.
- Leveque X.; Cozzi E.; Naveilhan P.; Neveu I. (2011): Intracerebral xenotransplantation: Recent findings and perspectives for local immunosuppression, in: *Current Opinion in Organ Transplantation* 16, 190–194.
- Le Tissier P.; Stoye J. P.; Takeuchi Y.; Patience C.; Weiss R. A. (1997): Two sets of human-tropic pig retrovirus, in: *Nature* 389, 681–682.

- McGregor C. G.; Byrne G. W.; Vlasin M. et al. (2009): Early cardiac function and gene expression after orthotopic cardiac xenotransplantation, in: *Xenotransplantation* 16, 356.
- Meier-Kriesche H. U.; Kaplan B. (2002): Waiting time on dialysis as the strongest modifiable risk factor for renal transplant outcomes: a paired donor kidney analysis, in: *Transplantation* 74, 1377–1381.
- Mohiuddin M. M.; Corcoran P. C.; Singh A. K. et al. (2012): T-Cell depletion extends the survival of GTKO/hCD 46 Tg pig heart xenografts in baboons for up to 8 months, in: *American Journal of Transplantation* 12, 763–771.
- Mueller N. J.; Takeuchi Y.; Mattiuzzo G.; Scobie L. (2011): Microbial safety in xenotransplantation, in: *Current Opinion in Organ Transplantation* 16, 201–206.
- Nagata H.; Nishitai R.; Shirota C. et al. (2007): Prolonged survival of porcine hepatocytes in cynomolgus monkeys, in: *Gastroenterology* 132, 321–329.
- Oldmixon B. A.; Wood J. C.; Ericsson T. A. et al. (2002): Porcine endogenous retrovirus transmission characteristics of an inbred herd of miniature swine, in: *Journal of Virology* 76, 3045–3048.
- Oosterlee A.; Rahmel A. (2011): Eurotransplant International Foundation, Annual Report.
- Palumbo A.; Anderson K. (2011): Multiple myeloma, in: *New England Journal of Medicine* 364, 1046–1060.
- Petersen B.; Ramackers W.; Tiede A. et al. (2009): Pigs transgenic for human thrombomodulin have elevated production of activated protein C, in: *Xenotransplantation* 16, 486–495.
- Petersen B.; Ramackers W.; Lucas-Hahn A. et al. (2011): Transgenic expression of human heme oxygenase-1 in pigs confers resistance against xenograft rejection during ex vivo perfusion of porcine kidneys, in: *Xenotransplantation* 18, 355–368.
- Phelps C. J.; Koike C.; Vaught T. D. et al. (2003): Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs, in: *Science* 299, 411–414.
- Pierson R. N. (2009): III. Antibody-mediated xenograft injury: mechanisms and protective strategies, in: *Transplant Immunology* 21, 65–69.
- Reichenspurner H.; Human P. A.; Boehm D. H. et al. (1989): Optimization of immunosuppression after xenogeneic heart transplantation in primates, in: *Journal of Heart and Lung Transplantation* 8, 200–207.
- Roussel J. C.; Moran C. J.; Salvaris E. J. et al. (2008): Pig thrombomodulin binds human thrombin but is a poor cofactor for activation of human protein C and TAFI, in: *American Journal of Transplantation* 8, 1101–1112.
- Scobie L.; Takeuchi Y. (2009): Porcine endogenous retrovirus and other viruses in xenotransplantation, in: *Current Opinion in Organ Transplantation* 14, 175–179.
- Shimizu A.; Hisashi Y.; Kuwaki K. et al. (2008): Thrombotic microangiopathy associated with humoral rejection of cardiac xenografts from alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs in baboons, in: *American Journal of Pathology* 172, 1471–1481.
- Sun Y.; Ma X.; Zhou D. et al. (1996): Normalization of diabetes in spontaneously diabetic cynomolgus monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppression, in: *Journal of Clinical Investigation* 98, 1417–1422.

- Van der Windt D. J.; Bottino R., Casu A. *et al.* (2009): Long-term controlled normoglycemia in diabetic non-human primates after transplantation with hCD46 transgenic porcine islets, in: *American Journal of Transplantation* 9, 2716–2726.
- Wuensch A.; Baehr A.; Bongoni A. K.; Kemter E. *et al.* (2014): Regulatory sequences of the porcine THBD gene facilitate endothelial-specific expression of bioactive human thrombomodulin in single and multitransgenic pigs, in: *Transplantation* 2014 Jan 27; 97 (2), 138–47, doi: 10.1097/TP.0b013e3182a95cbc
- Yamada K.; Yazawa K.; Shimizu A. *et al.* (2005): Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue, in: *Nature Medicine* 11, 32–34.

For patients with terminal, irreversible organ diseases, transplantations represent a last opportunity to survive; for diabetes patients, islet cells seem to be indicated. There is however, a grave shortage of donor cells and organs. Porcine donors would be a possible alternative. Immunological barriers however pose still a considerable challenge for preclinical experiments. Genetically modified animals are in the centre when looking for solutions: it is possible to add human gens or delete porcine gens. The ultimate aim is to mitigate primate recipient reactions to the xenoantigens.