

Erstellung TRAIL-transgener Schweine für die Xenotransplantation

M.Ott¹, R. Klose¹, W. Scherthner¹, R. Endres², K. Pfeffer² und E. Wolf¹

¹ Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie LMU München

² Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene TU

München

Jährlich erkranken allein in den deutschsprachigen Ländern mehr als 50.000 Menschen aller Altersgruppen an Herz-, Leber-, Nieren- oder anderen Organerkrankungen, für die keine konventionelle Therapie zur Verfügung steht. Aufgrund des Spenderorganmangels gilt die Xenotransplantation – Transplantation eines Organs oder Gewebes zwischen zwei verschiedenen Spezies – als eventuelle Alternative zur Transplantation menschlicher Organe. Das Schwein scheint aufgrund der physiologischen und anatomischen Ähnlichkeit seiner Organe zu denen des Menschen die wahrscheinlichste Organquelle zu sein (Wolf et al., 1999). Neben den ungeklärten Fragen zur Infektiosität der porcinen endogenen Retroviren für den Menschen und zu den allometrischen Wachstumsverhältnissen der Schweineorgane im Menschen, stehen die Abstoßungsreaktionen im menschlichen Empfängerorganismus gegen das transplantierte Schweineorgan als Hauptproblem der Xenotransplantation im Vordergrund. Eine Möglichkeit, diese Abstoßungsreaktionen abzuschwächen bzw. zu verhindern, ist, neben einer starken medikamentösen Immunsuppression des Empfängers, die Transplantation von Organen aus gentechnisch veränderten Schweinen.

Superovulierte präpuberale Spendersauen wurden im Abstand von 12 h zweimal künstlich besamt und geschlachtet. Nach Zählung der Gelbkörper wurden beide Eileiter mit PBS + 5 % Lammserum + 50 mg/l Gentamycinsulfat in eine Petrischale gespült und die Zygoten herausgesucht. Diese wurden zweimal für 3 min bei 15 000 g zentrifugiert, um die zahlreichen Lipidgranula an einem Pol der Eizelle zu versammeln und die Vorkerne dadurch sichtbar zu machen. Das Konstrukt, welches für humanen TNF α -related apoptosis inducing ligand (TRAIL) kodiert, wurde in einen der beiden Vorkerne, bzw. bei Mehrzellern in alle Zellkerne, mikroinjiziert. Nachfolgend wurden die mikroinjizierten Zygoten bis zum Embryotransfer im Brutschrank in PBS + 20 % Lammserum + 50 mg/l Gentamycinsulfat bei 39°C, 5 % CO₂ und 90 % N₂ aufbewahrt. Je 30 mikroinjizierte Zygoten wurden laparoskopisch (Besenfelder et al., 1997) in einen Eileiter einer zyklussynchronisierten Empfängersau transferiert. Neben einer Rauschekontrolle 20 Tage nach dem Embryotransfer (ET), erfolgte die ultraschallgestützte Trächtigkeitsuntersuchung ca. 25-30 Tage nach dem ET. Von den geborenen Ferkeln wurden Ohrproben genommen, die dann mittels PCR auf Integration des Konstrukts getestet wurden. Die Ergebnisse sind in *Tabelle 1* aufgeführt.

Tab. 1: Ergebnisse für den laparoskopischen ET mit TRAIL-mikroinjizierten Schweinezygoten

Zahl der ETs	Trächtigkeiten	Aborte	geborene Ferkel	transgene Ferkel
30	7	1	30	9

Fünf der neun Foundertiere wurden angepaart, wobei vier das Transgen an ihre Nachkommen vererbt haben. Zwei dieser Linien wurden anhand von Blutproben mittels Southern-Blot-Analyse genauer auf die Integration des Konstrukts untersucht. Dabei zeigte sich, daß eine der beiden Linien zwei unabhängige Insertionsstellen aufweist, wobei an mindestens einer

Insertionsstelle multiple Integration des Transgens vorliegt. Je ein F1-Nachkomme der beiden Linien wurde euthanasiert und Organproben (Haut, Muskel, Lunge, Herz, Leber, Niere, Milz, Hoden) mittels RT-PCR auf Expression des Transgens untersucht. Unter der Kontrolle des Mauspromotors H-2K^b sollte eine ubiquitäre Expression des Transgens erreicht werden. Humane TRAIL mRNA konnte entsprechend in allen untersuchten Organen nachgewiesen werden.

Referenzen:

Besenfelder U., Mödl J., Müller M. and Brem G. (1997)
Endoscopic embryo collection and embryo transfer into the oviduct and the uterus of pigs.
Theriogenology 47(5): 1051-1060

Wolf E., Schernthaner W., Müller S. and Brem G. (1999)
Xenotransplantation – Möglichkeiten der Tierzucht.
Zentralblatt für Chirurgie 124: 15 - 20