

Aus dem Institut für Tierzucht der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, Genzentrum  
Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

# **Untersuchung transgener Tiermodelle für die Xenotransplantation**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Elisabeth Gabriele Kemter  
aus Augsburg

München 2004

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent	Univ.-Prof. Dr. E. Wolf
1. Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl
2. Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. Dr. R.G. Erben
3. Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. S. Reese
4. Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. B. Wollanke

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

Meinen Eltern

**Aus dieser Arbeit gingen folgende Veröffentlichungen hervor:**

**Kemter, E.**, Philipp, U., Klose, R., Kuiper, H., Boelhauve, M., Distl, O., Wolf, E. and Leeb, T. (2005) Molecular cloning, expression analysis and assignment of the porcine tumor necrosis family superfamily member 10 gene (TNFSF10) to chromosome 13q34-q36 by fluorescence *in situ* hybridization and radiation hybrid mapping. Cytogenet Genome Res, akzeptiert.

Klose, R., **Kemter, E.**, Bedke, T., Bittmann, I., Keßler, B., Endres, R., Pfeffer, K., Schwinzer, R. and Wolf, E. (2005) Expression of biologically active human TRAIL in transgenic pigs. Transplantation, akzeptiert.

Klose, R., **Kemter, E.**, Keßler, B., Ott, M., Scherthaner, W., Holy, T., Lü, L., Bittmann, I., Reichart, B., Endres, R., Pfeffer, K. and Wolf, E. (2002) The murine H-2K<sup>b</sup> promoter controls expression of human TRAIL in various tissues of transgenic pigs. Transplantationsmedizin 2(Suppl):36

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungen und Tabellen.....</b>	<b>II</b>
<b>Abkürzungen.....</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Xenotransplantation .....</b>	<b>2</b>
2.1.1 Geschichte der klinischen Xenotransplantation.....	2
2.1.2 Wahl der Spenderspezies für die Xenotransplantation.....	4
2.1.3 Immunologische Hürden bei der Organtransplantation von Schwein auf Primat .....	5
2.1.3.1 Hyperakute Abstoßungsreaktion .....	6
2.1.3.2 Akut vaskuläre Abstoßungsreaktion.....	7
2.1.3.3 Zelluläre Abstoßungsreaktion.....	10
2.1.3.4 Chronische Abstoßungsreaktion .....	12
2.1.4 Strategien zur Verhinderung der Abstoßungsreaktionen.....	12
2.1.4.1 Strategien zur Verhinderung der hyperakuten Abstoßungsreaktion	12
2.1.4.2 Strategien zur Verhinderung der akut vaskulären und zellulären Abstoßungsreaktionen .....	15
2.1.5 Physiologische Hürden .....	18
2.1.6 Risiko von Zoonosen .....	19
<b>2.2 Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). 20</b>	
2.2.1 Struktur .....	20
2.2.2 TRAIL-Rezeptoren.....	21
2.2.3 Intrazelluläre Signalwege nach TRAIL/TRAIL-Rezeptor-Interaktion..	21
2.2.4 Expressionsmuster .....	23
2.2.5 Biologische Funktionen von TRAIL.....	24
<b>2.3 Transforming growth factor <math>\beta</math> 1 (TGF-<math>\beta</math>1) .....</b>	<b>31</b>
2.3.1 Struktur .....	31
2.3.2 TGF- $\beta$ 1 und Xenotransplantation.....	32
<b>2.4 Regulierbare Genexpressionssysteme.....</b>	<b>36</b>

---

<b>3</b>	<b>Tiere, Materialien und Methoden .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Tiere .....</b>	<b>39</b>
3.1.1	Schweine .....	39
3.1.2	Mäuse .....	39
<b>3.2</b>	<b>Zellen.....</b>	<b>40</b>
<b>3.3</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>40</b>
3.3.1	Antikörper .....	40
3.3.2	Chemikalien .....	40
3.3.3	Enzyme und sonstige Reagenzien .....	42
3.3.4	Kits .....	43
3.3.5	Geräte .....	43
3.3.6	Molekulargewichtsstandards für DNA und Protein .....	44
3.3.7	Verbrauchs- und sonstiges Arbeitsmaterialien .....	44
<b>3.4</b>	<b>Zusammensetzung der Puffer .....</b>	<b>45</b>
3.4.1	Puffer für molekularbiologische Methoden.....	45
3.4.1.1	DEPC-H <sub>2</sub> O (0,1 %).....	45
3.4.1.2	10x DNase I-Puffer .....	45
3.4.1.3	Proteinase K-Lösung.....	45
3.4.1.4	TE-Puffer.....	45
3.4.1.5	Cutting buffer.....	46
3.4.2	Puffer für Agarosegele .....	46
3.4.2.1	10x TBE-Puffer.....	46
3.4.2.2	1x TBE-Laufpuffer .....	46
3.4.2.3	6x Probenpuffer für DNA .....	46
3.4.3	Lösungen für Bakterienkultur .....	47
3.4.3.1	Luria-Bertani (LB)-Medium .....	47
3.4.3.2	Agar-LB-Platten.....	47
3.4.3.3	SOC-Medium .....	47
3.4.3.4	TYM-Medium.....	47
3.4.3.5	Tfb I-Puffer .....	48
3.4.3.6	Tfb II-Puffer .....	48

---

3.4.4	Lösungen für Southern-Blot (neutraler Transfer).....	48
3.4.4.1	Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH).....	48
3.4.4.2	Neutralisierungslösung [1 M Tris (pH 7,4), 1,5 M NaCl].....	48
3.4.4.3	20x SSC (pH 7,0).....	48
3.4.4.4	neutraler Transferpuffer (10x SSC).....	49
3.4.5	Lösungen für Northern-Blot.....	49
3.4.5.1	10x MOPS.....	49
3.4.5.2	RNA-Ladepuffer (Northern-Blot).....	49
3.4.5.3	Waschlösung 1 (Northern-Blot).....	49
3.4.5.4	Waschlösung 2 (Northern-Blot).....	49
3.4.5.5	Transferpuffer (pH 6,5) (Northern-Blot).....	49
3.4.6	Puffer und Lösungen für Proteinisolierung, SDS-Page und Westernblot.....	50
3.4.6.1	5x Laemmli-Puffer.....	50
3.4.6.2	Proteinextraktionspuffer (1x Laemmli).....	50
3.4.6.3	Swelling-Puffer.....	50
3.4.6.4	Proteinlysepuffer mit Iodacetamid.....	50
3.4.6.5	10x SDS-PAGE-Laufpuffer.....	51
3.4.6.6	10x Transferpuffer.....	51
3.4.6.7	1x Transferpuffer (gebrauchsfertig).....	51
3.4.6.8	Ponceau S-Lösung.....	51
3.4.6.9	10x TBS (Tris-gepufferte Salzlösung, Tris-Saline).....	51
3.4.6.10	TBS-T (0,1 %).....	52
3.4.6.11	TBS-T-Milch (3 %).....	52
3.4.6.12	Elutionspuffer.....	52
3.4.7	Nährmedien und Zusätze für die Zellkultur.....	52
3.4.7.1	Fetales Kälberserum (FKS).....	52
3.4.7.2	Nährmedium für porcine Fibroblasten.....	52
3.4.7.3	Nährmedium für PBL.....	53
3.4.7.4	Nährmedium für HEK293T- und Jurkat-Zellen.....	53
3.4.7.5	Nährmedium für PM86-Zellen.....	53
3.4.7.6	PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, pH 7,4).....	53
3.4.7.7	2x Trypsin/EDTA.....	53

<b>3.5</b>	<b>Primer, Nukleotide und Oligonukleotide .....</b>	<b>54</b>
<b>3.6</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>55</b>
3.6.1	Herstellung der Expressionsvektoren .....	55
3.6.1.1	Restriktionsenzymverdau .....	55
3.6.1.2	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	55
3.6.1.3	Ligation von DNA-Fragmenten.....	56
3.6.1.4	Herstellung transformationskompetenter Bakterien .....	56
3.6.1.5	Transformation von E. coli.....	57
3.6.1.6	Isolierung von Plasmid-DNA (Miniprep und Midiprep) aus E. coli ...	57
3.6.2	Expressionsvektoren .....	58
3.6.2.1	Das H-2K <sup>b</sup> -huTRAIL-Konstrukt.....	58
3.6.2.2	Das pcDNA3-huTRAIL- und pcDNA3-porcTRAIL-Konstrukt .....	58
3.6.2.3	Das $\alpha$ MHC-GLVPC-polyA- und TK-porcTGF $\beta$ 1-Konstrukt.....	60
3.6.3	Identifikation transgener Tiere .....	61
3.6.3.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	61
3.6.3.1.1	<i>Isolierung genomischer DNA aus Mäuseschwanzspitzen bzw. Schweineohrstanzen.....</i>	<i>61</i>
3.6.3.1.2	<i>PCR-Bedingungen .....</i>	<i>62</i>
3.6.3.1.3	<i>Agarosegelelektrophorese .....</i>	<i>63</i>
3.6.3.2	Southern-Blot .....	64
3.6.3.2.1	<i>Isolierung genomischer DNA aus EDTA-Blut von Schweinen... 64</i>	
3.6.3.2.2	<i>Isolierung genomischer DNA aus Mäuseschwänzen..... 64</i>	
3.6.3.2.3	<i>Restriktionsenzymverdau und Transfer von genomischer DNA 64</i>	
3.6.3.2.4	<i>Sondenherstellung .....</i>	<i>66</i>
3.6.3.2.5	<i>Radioaktive Markierung der Sonde..... 66</i>	
3.6.3.2.6	<i>Hybridisierung, Waschen und Signaldetektion .....</i>	<i>67</i>
3.6.3.2.7	<i>Strippen der Membran .....</i>	<i>67</i>
3.6.4	Untersuchung der Genexpression auf RNA-Ebene .....	68
3.6.4.1	RNA-Isolierung aus Zellen und Gewebe .....	68
3.6.4.2	DNase I-Verdau und reverse Transkription für RT-PCR .....	69
3.6.4.3	RT-PCR.....	70
3.6.4.4	Real-Time-RT-PCR.....	72
3.6.4.4.1	<i>DNase I-Verdau und reverse Transkription für Real-Time-RT-PCR.....</i>	<i>72</i>

---

3.6.4.4.2	<i>Real-Time-RT-PCR</i> .....	72
3.6.4.5	Northern-Blot.....	73
3.6.4.5.1	<i>Formaldehyd-Gelelektrophorese</i> .....	73
3.6.4.5.2	<i>Transfer der RNA</i> .....	74
3.6.4.5.3	<i>Radioaktive Markierung der Sonde, Hybridisierung, Waschen und Signaldetektion</i> .....	74
3.6.4.5.4	<i>Strippen der Membran</i> .....	75
3.6.5	RACE der porcinen TRAIL-cDNA .....	75
3.6.5.1	5'-RACE der porcinen TRAIL-cDNA.....	75
3.6.5.2	3'-RACE der porcinen TRAIL-cDNA.....	78
3.6.5.3	TOPO TA-Klonierung und Sequenzierung .....	78
3.6.6	Untersuchung der Genexpression auf Protein-Ebene .....	78
3.6.6.1	Protein-Isolierung aus Zellen und Gewebe .....	78
3.6.6.1.1	<i>Gesamtlysat</i> .....	78
3.6.6.1.2	<i>Zellmembran- und Zytoplasmafraktion aus Gewebe</i> .....	79
3.6.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay .....	80
3.6.6.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	80
3.6.6.4	„Semi-dry-blot“ Verfahren.....	82
3.6.6.5	Western-Immunoblot.....	83
3.6.6.6	Strippen der Membran.....	83
3.6.7	Methoden der Zellkultur .....	84
3.6.7.1	Kultivierung der Zellen.....	84
3.6.7.2	Auftauen von Zellen .....	84
3.6.7.3	Kryokonservieren von Zellen.....	84
3.6.7.3.1	<i>Adhärente Zellen</i> .....	84
3.6.7.3.2	<i>In Suspension wachsende Zellen</i> .....	85
3.6.7.4	Transfektion von Zellen .....	85
3.6.7.5	Zellisolierung .....	85
3.6.7.5.1	<i>Porcine Hautfibroblasten</i> .....	85
3.6.7.5.2	<i>PBL-Isolierung mittels Ficoll-Gradienten aus heparinisiertem Schweineblut</i> .....	86
3.6.7.6	PBL-Stimulation .....	87
3.6.7.7	Apoptoseassay.....	87

---

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>88</b>
<b>4.1</b>	<b><math>\alpha</math>MHC-GLVPc-polyA- und TK-porcTGF<math>\beta</math>1-transgene Mäuse</b> .....	<b>88</b>
4.1.1	Identifizierung und Charakterisierung transgener Mäuse .....	88
4.1.2	Transgenexpression .....	92
4.1.3	Expression von endogenem $\alpha$ MyHC .....	97
<b>4.2</b>	<b>H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-transgene Schweine</b> .....	<b>98</b>
4.2.1	Identifizierung und Charakterisierung transgener Schweine .....	98
4.2.2	Transgenexpression .....	103
4.2.3	Apoptoseassay .....	112
<b>4.3</b>	<b>Porciner TRAIL</b> .....	<b>115</b>
4.3.1	cDNA-Sequenz von porcinem TRAIL .....	115
4.3.2	Expression von porcinem TRAIL .....	116
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>118</b>
<b>5.1</b>	<b><math>\alpha</math>MHC-GLVPc-polyA- und TK-porcTGF<math>\beta</math>1-transgene Mäuse</b> .....	<b>118</b>
5.1.1	Identifizierung und Charakterisierung der Transgenintegration .....	119
5.1.2	Transgenexpression .....	120
<b>5.2</b>	<b>H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-transgene Schweine</b> .....	<b>126</b>
5.2.1	Identifizierung und Charakterisierung der Transgenintegration .....	126
5.2.2	Transgenexpression .....	127
<b>5.3</b>	<b>Porciner TRAIL</b> .....	<b>133</b>
5.3.1	cDNA-Sequenz von porcinem TRAIL .....	133
5.3.2	Expression von porcinem TRAIL .....	134
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>136</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	<b>138</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>140</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>170</b>

## Abbildungen

Abb. 2.1:	Zeitlicher Verlauf der Abstoßungsreaktionen nach diskordanter Xenotransplantation vaskularisierter Organe.....	6
Abb. 2.2:	Todesrezeptor-vermittelter und mitochondrialer Apoptosesignalweg (nach Kelley & Ashkenazi 2004) .....	22
Abb. 2.3:	Der große latente TGF- $\beta$ 1-Komplex (modifiziert nach Annes <i>et al.</i> 2003).....	31
Abb. 2.4:	Struktur des Mifepristone-induzierbaren chimären Transaktivatorproteins .....	37
Abb. 2.5:	Schematische Darstellung der intrazellulären Regulation des Mifepristone-induzierbaren Genregulatorsystems .....	38
Abb. 3.1:	Schematische Darstellung des H-2K <sup>b</sup> -huTRAIL-Konstrukts .....	58
Abb. 3.2:	Schematische Darstellung des pcDNA3-hu bzw. porc TRAIL-Konstrukts .....	59
Abb. 3.3:	Schematische Darstellung des $\alpha$ MHC-GLVPC-polyA-Konstrukts .....	60
Abb. 3.4:	Schematische Darstellung des TK-porcTGF $\beta$ 1-Konstrukts .....	61
Abb. 3.5:	Schematische Darstellung des Aufbaus eines Southern-Blots.....	65
Abb. 4.1:	PCR-Analyse zur Identifizierung von MHC-tg und TGF-tg Mäusen .....	88
Abb. 4.2:	Southern-Blot-Analysen von MHC-tg, TGF-tg und Wildtyp-Mäusen .....	91
Abb. 4.3:	Northern-Blot-Analyse der Transgenexpression in verschiedenen Organen eines acht Wochen alten MHC-tg Tieres der Linie 8.....	92
Abb. 4.4:	RT-PCR-Analysen der GLVPC- und der porcinen TGF- $\beta$ 1-Expression in verschiedenen Organen .....	94
Abb. 4.5:	Northern-Blot-Analyse der porcinen TGF- $\beta$ 1-mRNA-Expression in verschiedenen Organen eines acht Wochen alten dtg Tieres (L6/L4) nach Mifepristone-Gabe.....	95
Abb. 4.6:	Northern-Blot-Analysen der Induzierbarkeit der porcinen TGF- $\beta$ 1-mRNA-Expression im Ventrikelmyokard dtg Tiere nach Mifepristone-Gabe.....	96
Abb. 4.7:	RT-PCR-Analyse der $\alpha$ MyHC-mRNA-Expression in verschiedenen Organen von einer weiblichen acht Wochen alten Maus.....	97
Abb. 4.8:	Northern-Blot-Analyse der $\alpha$ MyHC-mRNA-Expression in verschiedenen Organen .	98
Abb. 4.9:	PCR-Analyse zur Identifizierung von H-2K <sup>b</sup> -huTRAIL-transgenen Schweinen .....	98
Abb. 4.10:	Southern-Blot-Analysen von H-2K <sup>b</sup> -huTRAIL-transgenen und Wildtyp-Schweinen nach <i>Hind</i> III-Verdau und <i>Sal</i> I-Verdau.....	101
Abb. 4.11:	Southern-Blot-Analyse von H-2K <sup>b</sup> -huTRAIL-transgenen Foundertieren und einem Wildtyp-Schwein nach <i>Xho</i> I-Verdau .....	102
Abb. 4.12:	Untersuchung auf Homozygotie und Hemizygotie durch Southern-Blot-Analysen von H-2K <sup>b</sup> -huTRAIL-transgenen Tieren der Linie 6967.....	103
Abb. 4.13:	Nachweis der humanen TRAIL-Transkription eines transgenen Schweines der Linie 6967.....	104
Abb. 4.14:	Western-Immunoblot aus Gewebefractionen von einem transgenen und einem Wildtyp-Tier .....	105

---

<b>Abb. 4.15: Western-Immunoblot von Membranfraktionen verschiedener Organe von transgenen Tieren dreier Linien und einem Wildtyp-Tier .....</b>	<b>106</b>
<b>Abb. 4.16: Analyse der humanen TRAIL-Proteinexpression auf nicht stimulierten und stimulierten transgenen PBL durch Western-Immunoblot.....</b>	<b>108</b>
<b>Abb. 4.17: Nachweis unterschiedlicher Transgenexpressionsniveaus auf PBL im Oktober und im März .....</b>	<b>109</b>
<b>Abb. 4.18: Western-Immunoblot-Analysen der humanen TRAIL-Expression in der Milz von transgenen und Wildtyp-Tieren .....</b>	<b>110</b>
<b>Abb. 4.19: Analyse der relativen humanen TRAIL-Expression in fetalen und postnatalen Geweben .....</b>	<b>111</b>
<b>Abb. 4.20: Nachweis der Apoptoseinduktion von Jurkat-Zellen durch humanen TRAIL auf porcinen PBL.....</b>	<b>114</b>
<b>Abb. 4.21: Von der cDNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz des porcinen TRAIL und Vergleich mit den TRAIL-Aminosäuresequenzen von Mensch, Ratte und Maus....</b>	<b>115</b>
<b>Abb. 4.22: qRT-PCR-Analysen der porcinen TRAIL-Transkription in fetalen und postnatalen Geweben .....</b>	<b>117</b>

## **Tabellen**

<b>Tabelle 2.1: Übersicht über die biologischen Funktionen von TRAIL .....</b>	<b>24</b>
<b>Tabelle 4.1: Nachkommen aus Kreuzungen von MHC-tg mit TGF-tg Tieren.....</b>	<b>89</b>
<b>Tabelle 4.2: Zusammenfassung der H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-Transgen-spezifischen Banden aus Southern-Blot-Analysen.....</b>	<b>99</b>

**Abkürzungen**

Abb.	Abbildung
ACR	akute T-Zell-medierte Abstoßungsreaktion (acute T-cell-mediated rejection)
ADCC	Antikörper-abhängige Zytotoxizität (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)
AHXR	akut humorale Xenotransplantatabstoßung (acute humoral xenograft rejection)
AICD	aktivierungsinduzierter Zelltod
Ak	Antikörper
AKT	Serin/Threonin-Proteinkinase
Apaf-1	apoptosis activating factor-1
APC	Antigen-präsentierende Zelle (antigen presenting cell)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AVR	akut vaskuläre Abstoßungsreaktion (acute vascular rejection)
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
BCA	Bicinchoninsäure
Bid	BH3-interacting domain death agonist
bp	Basenpaare (base pairs)
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CD	Differenzierungsmarker (cluster of differentiation)
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA (complementary deoxyribonucleic acid)
cFLIP	cellular FLICE/caspase-8 inhibitory protein
CMV	Cytomegalievirus
ConA	Concanavalin A
cpm	Impulse pro Minute (counts per minute)
d	Tag
DAF	decay accelerating factor, CD55
dATP	Deoxyadenosin-5'-triphosphat
DC	dendritische Zellen
dCTP	Deoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Deoxyguanosin-5'-triphosphat
DIABLO	direct IAP-binding protein with low pI
DISC	Apoptose-induzierender Signalkomplex (death-inducing signalling complex)

---

DL	Deutsche Landrasse
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTPs	2'-Deoxynucleotid-5'-triphosphat (deoxynucleotide triphosphates)
dpm	Zerfälle pro Minute (desintegrations per minute)
dtg	doppelt-transgenes Tier
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
dTTP	Deoxythymidin-5'-triphosphat
DXR	verzögerte Xenotransplantatabstoßung (delayed xenograft rejection)
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	extracellular signal-regulated kinase
et al.	et alii
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FADD	Fas-assozierte Todesdomäne (Fas-associated death domain containing protein)
FasL	Fas-Ligand
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
g	Gramm
<i>g</i>	relative centrifugal force (RCF) ( $= 1,119 \times 10^{-5} \times \text{rpm}^2 \times r$ )
Gal4-DBD	Gal4-DNA-Bindedomäne
GATA	Transkriptionsfaktor, der die Nukleotidsequenz WGATAR erkennt
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
GH	Wachstumshormon (growth hormone)
GT	Graviditätstag
$\alpha$ 1,3GT	$\alpha$ 1,3-Galaktosyltransferase
HAR	hyperakute Abstoßungsreaktion (hyperacute rejection)
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HT	H-Transferase
$\alpha$ HT	$\alpha$ 1,2-Fukosyltransferase (H-Transferase)
hu	human
IAP	Apoptoseinhibitoren
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
JNK	c-Jun amino-terminal kinase
kb	Kilo Basenpaare (kilo base pairs)

---

kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LAP	Latenz-assoziiertes Peptid
LLC	großer latenter TGF- $\beta$ 1-Komplex (large latent komplex)
LTBP	latent-TGF $\beta$ -binding protein
M	Molar (mol/l)
mA	Milliamper
MAC	Membranangriffskomplex
MCP	membrane cofactor protein, CD46
MEF-2	myocyte-specific enhancer factor 2
mg	Milligramm
$\mu$ g	Mikrogramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MHC-tg	Transgenes Tier für $\alpha$ MHC-GLVPC-polyA
min	Minute
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar (mmol/l)
$\mu$ M	Mikromolar ( $\mu$ mol/l)
M-MLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus-Reverse Transkriptase
MOPS	3-Morpholino-Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MyHC	myosin heavy chain
n	Anzahl
NF- $\kappa$ B	nuclear factor- $\kappa$ B
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
<i>P</i>	Signifikanzniveau
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBL	periphere Blutlymphozyten
PERV	porcine endogene Retroviren
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
p.c.	post coitum
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PHA	Phytohemagglutinin
pI	isoelektrischer Punkt
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid

p.n.	post natum
porc	porcin
PRLBD	Progesteronrezeptor-Ligandenbindungsdomäne
QPF	qualifiziert pathogen-frei
qRT-PCR	quantitative RT-PCR
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RCA	Regulatoren der Komplementaktivierung
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro min (rounds per minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
sec.	Sekunde
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SLC	kleiner latenter TGF- $\beta$ 1-Komplex (small latent komplex)
Smac	second mitochondria-derived activator of caspase
SPF	spezifiziert pathogen-frei
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (Tris buffered saline)
TCR	T-Zell-Rezeptor
TdT	terminale Deoxynucleotidyl-Transferase
Temed	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
tg	transgen
TGF- $\beta$ 1	transforming growth factor $\beta$ 1
TGF-tg	Transgenes Tier für TK-porcTGF $\beta$ 1
TNF	Tumornekrosefaktor (tumor necrosis factor)
TR	Rezeptor des Schilddrüsenhormons (thyroid hormone receptor)
TRAIL	APO-2L, TNFSF10, tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
u.a.	unter anderem
UAS	Gal4-DNA-Bindestellen (Gal4 upstream activation sequences)
UV	Ultra-Violett
V	Volt
vs.	versus
wt	Wildtyp
XNA	präformierte xenoreaktive Antikörper (xenoreactive natural antibodies)
z.B.	zum Beispiel

## 1 Einleitung

Die Xenotransplantation von porcinen Organen auf humane Empfänger könnte eine Möglichkeit darstellen, den bestehenden Mangel an Spenderorganen für die Allo-transplantation zu reduzieren. Da jedoch Mensch und Schwein immunologisch inkompatibel sind, müssen Organspendertiere genetisch modifiziert werden, um das Auftreten von Abstoßungsreaktionen zu inhibieren. Dies wurde bereits erfolgreich zur Verhinderung der unmittelbar nach Reperfusion des Xenotransplantats auftretenden hyperakuten Abstoßungsreaktion angewandt. Eine mögliche Strategie, um die später auftretende zellvermittelte Abstoßungsreaktion zu verhindern, könnte die Transgenexpression von *tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) oder von *transforming growth factor  $\beta$  1* (TGF- $\beta$ 1) sein.

TRAIL gehört zur Tumornekrosefaktor-Familie und kann nach Interaktion mit TRAIL-Rezeptoren in TRAIL-sensitiven Zellen Apoptose induzieren. Er besitzt zahlreiche immunmodulatorische Eigenschaften. Im Allografttransplantationsmodell der Maus wurde gezeigt, dass eine Expression von TRAIL auf Hornhauttransplantaten die T-Zell-medierte Abstoßungsreaktion verzögerte.

TGF- $\beta$ 1 besitzt ebenfalls zahlreiche immunmodulatorische Eigenschaften. Eine Expression von TGF- $\beta$ 1 auf Spenderorganen dürfte aufgrund seiner anti-inflammatorischen und toleranzinduzierenden Eigenschaften zu einer Verlängerung der Transplantatüberlebenszeiten führen. Da eine ubiquitäre Transgenexpression von konstitutiv aktivem TGF- $\beta$ 1 letal wirken kann, ist die Verwendung eines räumlich und zeitlich kontrollierbaren Transgenexpressionssystems indiziert.

Ziel dieser Arbeit war die Analyse von zwei transgenen Tiermodellen. Zum einem sollte ein Mifepristone-induzierbares Genregulatorsystem in der Maus, nach Expressionsanalyse der zwei diesem System zugrundeliegenden Founderlinien, etabliert werden. Weiterhin sollte in diesem Mausmodell die spezifische Regulation der Transgenexpression analysiert werden. Im zweiten Tiermodell sollte die Expression von humanem TRAIL sowie seine Funktionalität in Zellen und Geweben transgener Schweine untersucht werden, mit dem Hintergrund, gut exprimierende Tiere für die Zucht von homozygot-transgenen und/oder multitransgenen Schweinen zu bestimmen.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Xenotransplantation

Unter dem Begriff der Transplantation versteht man die Übertragung von Zellen, Geweben oder Organen. Diese erfolgt bei einer Allotransplantation zwischen Angehörigen derselben Spezies (z.B. von Mensch A auf Mensch B), bei der Xenotransplantation dagegen zwischen Angehörigen verschiedener Spezies (z.B. von Schwein auf den Menschen) (Roitt *et al.* 1995).

Transplantationen werden beim terminalen Organversagen oder bei irreversiblen degenerativen Organveränderungen als lebenserhaltende therapeutische Maßnahmen durchgeführt. Das am häufigsten transplantierte Organ ist die Niere, gefolgt von Leber und Herz (Deutsche Stiftung Organtransplantation 2003). Allerdings besteht ein großer Mangel an Spenderorganen für die Organtransplantation. So beträgt die durchschnittliche Wartezeit auf ein geeignetes Spenderherz ca. 200 Tage. Etwa 10 % der Patienten, die auf der Warteliste für eine Herztransplantation stehen, sterben während dieser Zeit (Cooper *et al.* 2000; Port *et al.* 2004). Durch die Xenotransplantation könnte das Angebot an Spenderorganen gesteigert werden. Damit diese realisiert werden kann, müssen zahlreiche Aspekte, wie das Auftreten von immunologischen Abstoßungsreaktionen, physiologische Inkompatibilitäten, das Risiko einer Krankheitsübertragung durch das Transplantat oder ethische Bedenken, berücksichtigt werden. Im Hinblick auf eine mögliche Ausbreitung von Zoonosen sind porcine endogene Retroviren (PERV) Gegenstand der Forschung (Paradis *et al.* 1999). Was das Transplantatüberleben anbelangt, werden die immunologischen Hürden als wichtiges Hindernis angesehen.

#### 2.1.1 Geschichte der klinischen Xenotransplantation

Seit Anfang des 20. Jahrhunderts wurden Versuche unternommen, Tiergewebe auf Menschen zu transplantieren, die ein Organversagen hatten. In Frankreich implantierte Princeteau im Jahr 1905 einem urämischen Kind Nierengewebe eines Kaninchens. Er stellte eine Verbesserung der Nierenfunktion fest, bevor das Kind an einer Pneumonie starb. Zwei Versuche von Joubolay im Jahr 1906 mit Schweine- und Ziegenmilch, die er an Arme beziehungsweise Beine von Patienten mit

chronischem Nierenversagen übertrug, zeitigten ebenfalls nur geringe Erfolge (Samstein & Platt 2001). Erste Erfolge bei xenogenen Nierentransplantationen gab es 1969 nach der Entwicklung von Immunsuppressiva bei einer Übertragung einer Schimpansenniere auf einen humanen Empfänger (Reemtsma 1969). Der Patient überlebte neun Monate. Todesursache war primär eine Infektion, nicht ein Nierenversagen. Das Xenotransplantat wies post mortem histologisch das Bild einer vaskulären Abstoßungsreaktion auf.

Hardy et al. (1964) führten eine orthotope Herzxenotransplantation von einem Schimpansenherzen auf einen Menschen durch. Der Patient starb zwei Stunden nach der Operation wegen mangelndem Herzminutenvolumen, bedingt durch zu geringe Größe des Spenderherzens. Eine Überlebensdauer von 20 Tagen erzielten Bailey et al. (1985) bei einer orthotopen Transplantation eines Pavianherzens auf ein Neugeborenes. Trotz immunsuppressiver Therapie wies das histologische Bild des Transplantats post mortem auf ein Organversagen durch vaskuläre Abstoßungsreaktion hin.

Man beobachtete die längsten Überlebenszeiten der Xenotransplantate in humanen Empfängern, wenn als Organspender Tierspezies verwendet wurden, die phylogenetisch nahe mit dem Menschen verwandt sind (Altweltaffen und Menschenaffen). Außerdem wurde festgestellt, dass bei Transplantationen zwischen Angehörigen verschiedener Spezies, nicht notwendigerweise auf humane Empfänger, unterschiedliche Muster von Abstoßungsreaktionen auftraten, weshalb Calne 1970 die Einteilung der Xenotransplantate in zwei Gruppen vorschlug: in konkordante und diskordante Xenotransplantate. Der Begriff konkordant wird bei einer Transplantation zwischen Angehörigen verschiedener Spezies angewendet, bei der das Transplantat in einem ähnlichen zeitlichen Rahmen abgestoßen wird wie bei einer Allotransplantation auf einen nicht sensibilisierten Empfänger („first set response“). Dagegen wird der Begriff diskordant bei einer Xenotransplantation verwendet, bei der das Transplantat einer hyperakuten Abstoßung unterworfen ist, analog einer Allotransplantation auf einen vorher gegen das Spenderorgan sensibilisierten Empfänger („second set response“). Hyperakute Abstoßung tritt bei Patienten auf, die bereits präformierte Antikörper gegen das Transplantat besitzen und diese führen zu einer Aktivierung des Komplementsystems.

Beispiel für eine konkordante Xenotransplantation ist die Organübertragung von einem Pavian oder Schimpansen auf einen humanen Empfänger. Beispiel einer diskordanten Kombination ist die Transplantation von einem Schweineorgan auf einen Menschen.

### **2.1.2 Wahl der Spenderspezies für die Xenotransplantation**

Hinsichtlich immunologischer Kompatibilität eines Xenotransplantats für den Menschen wäre eine konkordante Kombination bei der Auswahl der Spenderspezies erfolgversprechender als eine diskordante Kombination. Es gibt jedoch ernsthafte Einwände, die die Verwendung von nicht humanen Primaten als Spenderspezies für die klinische Xenotransplantation verbieten:

- Ethische Bedenken aufgrund der hohen Intelligenz und Entwicklungsstufe von nicht humanen Primaten (Cozzi & Ancona 2003).
- Primatenorgane, die in der Größe denen von adulten humanen Organen entsprechen, könnten nur von stark gefährdeten Tierarten gewonnen werden (Daar 1997).
- Gefahr von Infektionsübertragung, wie z.B. Herpesvirus B (Samstein & Platt 2001).
- Lange Generationsintervalle und hohe Kosten bei Haltung und Pflege von nicht humanen Primaten (Cozzi & Ancona 2003).

Das Schwein erscheint bei der Auswahl der Spenderspezies für die klinische Xenotransplantation aus folgenden Gründen die geeignetste Spezies zu sein:

- Aus ethischen Gründen ist das Schwein als Spenderspezies akzeptabel, da es in vielen Kulturen als Haustier zur Lebensmittelgewinnung gehalten wird (Fryer *et al.* 1995b).
- Es besteht eine große Verfügbarkeit an Organen, da Schweine eine relativ kurze Gestationsdauer (115 Tage) und in der Regel große Würfe (10 und mehr Ferkel pro Wurf) haben (Cozzi & Ancona 2003).
- Schweine können relativ einfach unter qualifiziert pathogen-freien Bedingungen gehalten werden (QPF-Haltung) (Iverson & Talbot 1998; Tucker *et al.* 2002).

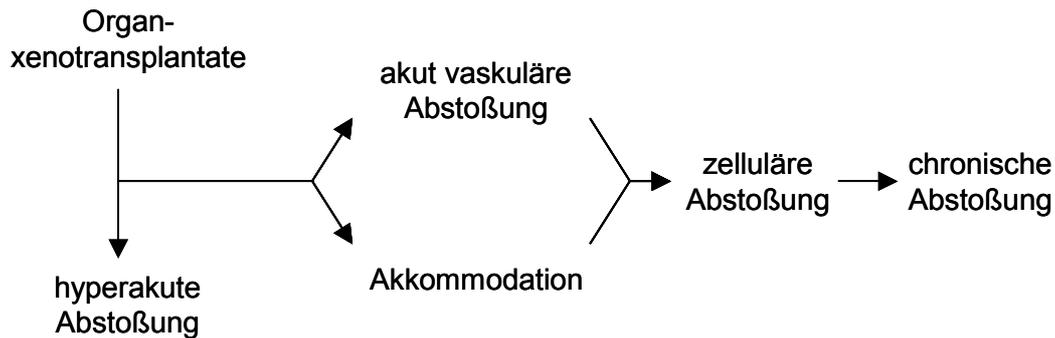
- Schweineorgane besitzen physiologische und anatomische Ähnlichkeiten mit denen des Menschen (Hammer *et al.* 1998).
- Genetische Modifikationen bei Schweineorganen sind möglich (Niemann & Kues 2000).

### **2.1.3 Immunologische Hürden bei der Organtransplantation von Schwein auf Primat**

Bei der diskordanten Xenotransplantation ist bezüglich der immunologischen Hürden zwischen Transplantaten aus Zellen und Gewebe und Organtransplantaten zu unterscheiden (Cascalho & Platt 2001).

Transplantate aus isolierten Zellen, z.B. Hepatozyten, werden durch die unmittelbare Umgebung, durch Wachstumsfaktoren und durch das Einwachsen von Kapillaren des Empfängers ernährt und am Leben erhalten. Dagegen werden Gewebetransplantate, z.B. Hautgewebe, durch Wachstumsfaktoren des Spenders als auch des Empfängers versorgt und besitzen eine gemischte Gefäßversorgung sowohl aus eingesprossenen Gefäßen vom Empfängerorganismus als auch aus Blutgefäßen, die durch spontane Anastomosen von Spender- und Empfängerkapillaren entstanden sind. Bei Transplantation vaskularisierter Organe wird das Spenderorgan durch Anastomosen seiner großen Blutgefäße mit denen des Empfängersystems verbunden. Jenseits dieser Anastomosenverbindung bleibt das Xenotransplantat vollständig porcinen Ursprungs und somit autonom. Daher ist das transplantierte Organ, im Gegensatz zu Zelltransplantaten, nicht durch Inkompatibilitäten der unmittelbaren Umgebung gefährdet. Andererseits ist das Spenderorgan über das Blutgefäßsystem direkt den verschiedenen Bestandteilen des Empfängerimmunsystems ausgesetzt. Diese enge Interaktion des Empfängerimmunsystems mit dem Spendergefäßendothel ist Basis für die auftretenden Abstoßungsreaktionen, die bisher den erfolgreichen klinischen Einsatz der Xenotransplantation vaskularisierter Organe verhindert haben.

Die bei diskordanter Xenotransplantation vaskularisierter solider Organe auftretenden Abstoßungsreaktionen werden nach dem zeitlichen Verlauf der Transplantatabstoßung eingeteilt (Cascalho & Platt 2001) (Abbildung 2.1).



**Abb. 2.1:** Zeitlicher Verlauf der Abstoßungsreaktionen nach diskordanter Xenotransplantation vaskularisierter Organe

### 2.1.3.1 Hyperakute Abstoßungsreaktion

Innerhalb von Sekunden bis Minuten nach Reperfusion xenotransplanteder diskordanter vaskularisierter Organe tritt die hyperakute Abstoßung (HAR) des Transplantats auf (Calne 1970). Ursache ist die Bindung von präformierten xenoreaktiven Antikörpern (XNA) des Empfängerorganismus an Endothelzellen des Organtransplantats mit nachfolgender rascher Aktivierung der Endothelzellen (Typ 1-Aktivierung) und des klassischen Weges der Komplementkaskade über Erkennung von Antigen-Antikörper-Komplexen (Auchincloss, Jr. & Sachs 1998). Die Folge ist die Organzerstörung mit mikrovaskulären Thrombosen und interstitiellen Hämorrhagien.

Bei der diskordanten Spezieskombination ist die komplementvermittelte Transplantatzerstörung durch den Empfängerorganismus sehr wirkungsvoll, da die porcinen membrangebundenen Regulatoren des Komplementsystems, wie CD55, CD59 und CD46, humanes Komplement nicht effektiv hemmen können. Es wird ebenfalls diskutiert, dass die Komplementregulatoren, die normalerweise das Gewebe bei Komplementaktivierung schützen, auf porcinem Gewebe in zu geringer Menge exprimiert werden und dadurch keinen ausreichenden Schutz bieten können (Atkinson *et al.* 1991; Lachmann 1991; Ish *et al.* 1993).

Die präformierten komplementbindenden xenoreaktiven Antikörper sind bei der HAR überwiegend gegen die Galaktosyl  $\alpha$ -1,3-Galaktose (Gal $\alpha$ 1-3Gal)-Zuckerepitope (auch bezeichnet als  $\alpha$ Gal-Epitop, Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-R-Zuckerepitop oder  $\alpha$ -Galaktosyl-Epitop) gerichtet (Good *et al.* 1992; Oriol *et al.* 1993; Sandrin *et al.*

1993; Galili 2001). Bis zu  $10^6 - 10^7$   $\alpha$ Gal-Epitope können auf der Oberfläche von Schweinezellen und -geweben exprimiert sein (Galili *et al.* 1988b). Die anti-Gal $\alpha$ 1-3Gal-Antikörper stellen beim Menschen mit 80 – 90 % die größte Fraktion an präformierten komplementbindenden anti-Spezies-Antikörpern dar (Cooper *et al.* 1994; Parker *et al.* 1994). Ungefähr 1 – 8 % der zirkulierenden Immunglobuline beim Menschen sind anti- $\alpha$ Gal-XNA (Galili *et al.* 1993; McMorrow *et al.* 1997).

Das  $\alpha$ Gal-Epitop ist eine Zuckerstruktur, die auf Zellen der meisten Gewebe inklusive den Endothelzellen aller Säugetiere vorkommt. Ausnahmen sind Altweltaffen (Affen aus Asien und Afrika), Menschenaffen und Menschen (Galili *et al.* 1987; Galili *et al.* 1988b), bei denen das für die Glykosylierung von Glykolipiden und Glykoproteinen verantwortliche Enzym, die  $\alpha$ 1,3-Galaktosyltransferase ( $\alpha$ 1,3GT), aufgrund von Mutationen im Leseraster als Pseudogen vorliegt (Larsen *et al.* 1990; Galili & Swanson 1991). Diesen Spezies fehlt daher das funktionell aktive Glykosylierungsenzym und somit das  $\alpha$ Gal-Epitop. Sie produzieren lebenslang als Antwort auf einen kontinuierlichen antigenen Stimulus durch Darmbakterien (Galili *et al.* 1988a) große Mengen an natürlichen Antikörpern (Ak), die spezifisch an die  $\alpha$ Gal-Epitope binden (Galili *et al.* 1987; Galili *et al.* 1988b).

Neben den anti- $\alpha$ Gal-Ak gibt es im humanen Serum noch weitere präformierte anti-Schwein-spezifische Ak, z.B. gegen das Monosaccharid N-Glykolyneuraminsäure, die einen Einfluss auf die Auslösung der HAR von Xenotransplantaten vom Schwein im Menschen haben können (Asaoka & Matsuda 1994; Zhu & Hurst 2002).

### **2.1.3.2 Akut vaskuläre Abstoßungsreaktion**

In einem Xenotransplantat, in dem die HAR vermieden wurde, beobachtet man das Auftreten einer akut vaskulären Abstoßungsreaktion (AVR). Diese tritt nach einigen Tagen bis Wochen nach Xenotransplantation auf und kann nicht durch Einsatz eines immunsuppressiven Behandlungsregimes verhindert werden (Leventhal *et al.* 1993b; Blakely *et al.* 1994; Fryer *et al.* 1995a; Platt *et al.* 1998). Weitere Bezeichnungen der AVR sind akut humorale Xenotransplantatabstoßung (AHXR) (Buhler *et al.* 2001) und verzögerte Xenotransplantatabstoßung (DXR) (Bach *et al.* 1996). Eine immunsuppressive Behandlung kann die Zeitspanne bis zur Transplantatabstoßung

verzögern, es sind aber höhere therapeutische Dosen an Immunsuppressiva als bei der Allotransplantation notwendig (Cramer *et al.* 1992a; Cramer *et al.* 1992b; Hasan *et al.* 1992; Miyazawa *et al.* 1995).

Die AVR weist ein sehr heterogenes histologisches Bild auf (Dorling 2003). Es ist durch eine Schwellung und Aktivierung der Endothelzellen, durch fokale Ischämien und durch diffuse intravaskuläre Thrombosen, welche hauptsächlich aus Fibrin bestehen, charakterisiert (Leventhal *et al.* 1993a; Blakely *et al.* 1994; Magee *et al.* 1995; McCurry *et al.* 1997). Allerdings sind weniger Hämorrhagien als bei der HAR vorhanden (Auchincloss, Jr. & Sachs 1998). Bezüglich zellulärer Infiltrate im Transplantat gibt es bei der AVR sehr unterschiedliche histologische Befunde. So wurden in einigen Fällen keine infiltrierenden Zellen festgestellt (Lin *et al.* 1998; Chen *et al.* 1999). Andere Fallberichte beschreiben dagegen das Vorkommen von aktivierten Makrophagen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) in abgestoßenen Xenotransplantaten (Leventhal *et al.* 1993b; Blakely *et al.* 1994; Itescu *et al.* 1998). Wieder andere fanden Monozyten/Makrophagen, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen sowie einige CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, aber keine NK-Zellen (Ashton-Chess *et al.* 2003). Es wurden Zusammenhänge festgestellt zwischen Art und Stärke der Zellinfiltrate und

1. der immunsuppressiven Behandlung der Transplantatempfängertiere (Ashton-Chess *et al.* 2003),
2. dem Zeitpunkt der Transplantatabstoßung (Goddard *et al.* 2002) und
3. ob das „pig-to-primate“-Xenotransplantat komplementabhängig oder -unabhängig akut vaskulär abgestoßen wurde (Dorling 2003).

Des Weiteren wurden im Serum der Xenotransplantatempfänger während der AVR deutliche Anstiege der Antikörpertiter von anti- $\alpha$ Gal- und non-anti- $\alpha$ Gal-IgG und -IgM festgestellt. Diese neugebildeten Ak wiesen andere Bindungseigenschaften auf als die präformierten IgG vor der Transplantation (Dehoux *et al.* 2002; Buhler *et al.* 2003).

Für die Pathophysiologie der AVR ist die Endothelzellaktivierung durch XNA, v.a. durch anti- $\alpha$ Gal-Ak, entscheidend (Lin *et al.* 1998; Lin *et al.* 2000). Diese kann sowohl direkt durch die Bindung der XNA an Antigene der Zelloberfläche, wie z.B. Integrine, als auch indirekt durch die Aktivierung des Komplementsystems auf geringem Niveau durch XNA und/oder durch die Bindung der XNA an Fc tragende

Zellen des Empfängers erfolgen (Hattori *et al.* 1989; Inverardi *et al.* 1992; Holzknicht & Platt 1995; Palmeshofer *et al.* 1998a; Palmeshofer *et al.* 1998b). Die komplement-abhängige AVR tritt immer zusammen mit Antikörperablagerungen auf. Es wurden allerdings auch komplement-unabhängige AVR beschrieben (Dorling 2003).

Neben den humoralen Faktoren spielen ebenfalls Zellen (Monozyten/Makrophagen und NK-Zellen) und das Zusammenwirken der verschiedenen Komponenten bei der Pathophysiologie der AVR eine wichtige Rolle (Blakely *et al.* 1994; Itescu *et al.* 1998; Quan *et al.* 2000). So wird die Monozytenadhäsion an und Migration durch das porcine Endothel u.a. über einen NK-Zell-abhängigen Signalweg vermittelt (Itescu *et al.* 2000). Weiterhin werden durch die Bindung von NK-Zellen an porcine Endothelzellen sowohl diese als auch die bindenden NK-Zellen aktiviert (Malyguine *et al.* 1996; Goodman *et al.* 1996). So wurde in *In-vitro*-Versuchen Zytotoxizität von humanen NK-Zellen nach direkter Bindung an porcine Endothelzellen, aber auch nach Antikörper-abhängiger Interaktion mit bereits von Ak gebundenen Endothelzellen (ADCC, Antikörper-abhängige Zytotoxizität) festgestellt (Watier *et al.* 1996). Gegenüber  $\alpha$ Gal-defizienten porcinen Endothelzellen wurde eine Reduktion der ADCC durch humane NK-Zellen beobachtet, während die direkte NK-Zell-Zytotoxizität in diesem Fall unverändert war (Baumann *et al.* 2004). Eine Ursache der humanen NK-Zell-Aktivierung nach Adhäsion an porcine Endothelzellen und nachfolgende Lyse dieser Zellen besteht in einer speziesspezifischen Inkompatibilität zwischen porcinen MHC-Klasse 1-Molekülen und einem inhibitorischen Rezeptor der humanen NK-Zellen (Sullivan *et al.* 1997; Schneider *et al.* 2001; Matter-Reissmann *et al.* 2002). Durch das Fehlen des inhibitorischen Signals dominieren die aktivierenden Signale der NK-Zellen, was zu einer Aktivierung dieser Zellen führt (Bakker *et al.* 2000; Lanier 2001).

Dorling (2003) schlägt vor, nur die durch humorale Faktoren bedingte Transplantat-abstoßung der Phase der AVR zuzuschreiben. Den Einfluss von NK-Zellen und Makrophagen auf den Abstoßungsprozess fasst er unter einer neuen, der AVR folgenden Abstoßungsphase, der Entzündungszell-medierten Transplantat-abstoßung, zusammen. Untersuchungen an Nagetiermodellen rechtfertigen diese Einteilung. Es fehlen jedoch entsprechende Ergebnisse im „pig-to-primate“-Modell (Dorling 2003).

Eine Beteiligung von Blutplättchen und molekulare Speziesinkompatibilitäten, z.B. von Proteinen des Blutgerinnungssystems, an der Pathophysiologie der AVR werden ebenfalls als Mechanismen der Abstoßung diskutiert. Ihre Bedeutung auf das Schicksal des Xenotransplantats wird jedoch als gering eingeschätzt (Robson *et al.* 2000; Bustos *et al.* 2001).

### **2.1.3.3 Zelluläre Abstoßungsreaktion**

Ist die immunologische Hürde der hyperakuten und der akut vaskulären Abstoßung durch Realisierung verschiedener Strategien vermieden worden, so beobachtet man das Auftreten einer zellulären Abstoßungsreaktion, auch akute T-Zell-medierte Abstoßung (ACR) genannt (Samstein & Platt 2001; Cozzi & Ancona 2003). Bei der Allotransplantation ist die ACR die am häufigsten auftretende Abstoßungsreaktion. Bei der Xenotransplantation gibt es aufgrund der bisher relativ kurzen Überlebensdauer der Xenotransplantate nur wenige Erkenntnisse darüber. Es ist daher noch keine definitive Aussage möglich, wie weit die ACR der Xenotransplantate der der Allotransplantate ähnelt. Die zelluläre Abstoßung von Allotransplantaten ist durch interstitielle Infiltrate von T-Zellen und Makrophagen charakterisiert. Es wird angenommen, dass Infiltrate von T-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen ebenfalls die zelluläre Abstoßung von Xenotransplantaten bewirken (Samstein & Platt 2001).

Die Zelladhäsion an Endothelzellen wird als erster Schritt der transendothelialen Migration und in der Folge auch der Transplantatinfiltration von Zellen angesehen (Watier *et al.* 1996). Daher wurde zur Klärung der Pathophysiologie der ACR am porcinen Endothel das Potential der humanen Leukozyten zur Adhäsion und Migration untersucht. So wurde in *In-vitro*-Versuchen eine verstärkte Adhäsion von humanen T-Zellen (Xu *et al.* 2000), Monozyten (Kwiatkowski *et al.* 1999) und Neutrophilen (Al Mohanna *et al.* 1997) an porcines im Vergleich zu humanem Endothel festgestellt. Des Weiteren ist die Erkennung und Bindung von porcinen Antigenen durch T-Zellen des Transplantatempfängers für die T-Zell-Aktivierung und somit für die Pathophysiologie der ACR ebenfalls entscheidend. T-Lymphozyten, die die akut zelluläre Abstoßung von Allotransplantaten verursachen, erkennen über ihre T-Zell-Rezeptoren (TCR) hauptsächlich Antigen-präsentierende MHC-Moleküle der Spenderzellen (direkter Signalweg) (Samstein & Platt 2001). In *In-vitro*-Versuchen

wurde die direkte Aktivierung von humanen T-Zellen durch porcine Antigen-präsentierende Zellen (APC) in verschiedenen Arbeiten nachgewiesen (Murray *et al.* 1994; Yamada *et al.* 1995a). Es gibt Hinweise auf eine Abhängigkeit der Stärke der direkten humanen T-Zell-Aktivierung von der Allelzusammensetzung der porcinen MHC-Moleküle (Yamada *et al.* 1995b). Die humane T-Zell-Aktivierung über den indirekten Signalweg wurde in *In-vitro*-Versuchen ebenfalls nachgewiesen. Hier werden die Spenderantigene von Xeno- bzw. Allotransplantaten zunächst durch APC des Empfängers in Peptide abgebaut, bevor sie über deren MHC-Moleküle den T-Zellen des Empfängerimmunsystems präsentiert werden (Dorling *et al.* 1996c).

Eine stärker auftretende zelluläre Immunantwort nach Xenotransplantation im Vergleich zur Allotransplantation wird aus folgenden Gründen erwartet: Erstens besitzt ein Xenotransplantat im Vergleich zu einem Allotransplantat eine sehr viel größere Anzahl an Fremdpeptiden, die eine starke T-Zell-Antwort über den indirekten Signalweg auslösen können (Dorling *et al.* 1996c). Zweitens kann die humorale Antwort auf Xenotransplantate die zelluläre Antwort verstärken. So beobachteten Kodaira *et al.* (2000), dass die Komplementaktivierung und Antikörperbindung an Endothelzellen die Freisetzung von Heparansulfat von deren Oberfläche bewirkte. Lösliches Heparansulfat induzierte die Reifung von APC, diese wiederum eine verstärkte Proliferation der T-Zellen und eine zytolytische T-Zell-Antwort. Drittens induziert sowohl der direkte als auch der indirekte Signalweg der T-Zell-Aktivierung durch porcine Stimulatorzellen *in-vitro* eine starke proliferative humane T-Zell-Antwort (Dorling *et al.* 1996a; Dorling *et al.* 1996b). Überdies besteht Spezieskompatibilität der kostimulatorischen Moleküle der T-Zell-Aktivierung, wie z.B. zwischen porcinem CD86 mit humanem CD28 (Rogers *et al.* 2000). Dadurch ist erklärbar, warum die direkte humane T-Zell-Antwort auf porcines Antigen mit der direkten humanen T-Zell-Antwort auf humanes Antigen bei HLA-Mismatch quantitativ vergleichbar war (Maher *et al.* 1996).

Es wird angenommen, dass T-Zellen bei der Transplantatabstoßung über zwei Mechanismen beteiligt sind: erstens über die Induktion der Synthese von anti-Spender-Ak (T-Zell-Hilfe) und somit der Antikörper-abhängigen Zytotoxizität (ADCC) und zweitens über eine direkte zytotoxische Wirkung (Sebille *et al.* 2001; Tanemura *et al.* 2002a).

### **2.1.3.4 Chronische Abstoßungsreaktion**

Bei der Xenotransplantation sind bisher noch keine Daten zur chronischen Abstoßungsreaktion vorhanden. Bei der Alлотransplantation tritt diese Abstoßung aufgrund einer langsam progressiven Vaskulopathie auf. Des Weiteren könnten die primären für das Organversagen verantwortlichen Faktoren weiterhin wirksam sein und das Transplantat schädigen (Mollnes & Fiane 2003).

## **2.1.4 Strategien zur Verhinderung der Abstoßungsreaktionen**

### **2.1.4.1 Strategien zur Verhinderung der hyperakuten Abstoßungsreaktion**

Die Strategien zur erfolgreichen Verhinderung der HAR beruhen auf zwei Ansätzen, nämlich der Beseitigung der Ursachen durch Entfernung der XNA bzw. der  $\alpha$ Gal-Epitope sowie auf der Hemmung der Komplementkaskade.

Eine spezifische Entfernung der präformierten XNA wird durch die Verwendung von Gal $\alpha$ 1,3Gal-Epitope-tragenden Affinitätssäulen erreicht (Lin *et al.* 1997; Sablinski *et al.* 1997). Es gibt zahlreiche weitere Methoden zur Depletion oder Hemmung der anti- $\alpha$ Gal-Ak, durch welche die HAR im „pig-to-baboon“-Xenotransplantationsmodell verzögert wurde (aufgelistet in Alwayn *et al.* 1999). Nachteil dieser Methoden ist aber, dass der Antikörpertiter aufgrund der kontinuierlichen Neusynthese und dem Rebound-Effekt nur transient verringert wird (Auchincloss, Jr. & Sachs 1998; Dehoux *et al.* 2002). Als eine erfolgversprechende Strategie zur dauerhaften Reduzierung von xenoreaktiven anti- $\alpha$ Gal-Ak ohne Rebound-Effekt wird die Verwendung des nichtimmunogenen injizierbaren Polymers GAS914 angesehen. So wurde nach Verwendung von GAS914 *in-vivo* eine rasche Abnahme der zirkulierenden anti- $\alpha$ Gal-Ak um über 90 % bei Fehlen einer akuten oder chronischen Toxizität festgestellt (Katopodis *et al.* 2002).

Eine weitere Strategie zur Vermeidung der HAR ist die Verringerung der  $\alpha$ Gal-Antigenexpression des Spenderorgans durch genetische Modifikation der Spender-tiere. Bei homozygoten  $\alpha$ 1,3GT-Knockout-Schweinen fehlt dieses Antigen vollständig (Phelps *et al.* 2003; Kolber-Simonds *et al.* 2004). An Erythrozyten dieser Tiere wurde *in-vitro* eine im Vergleich zu Zellen von Wildtyp-Schweinen deutlich verringerte, aber

dennoch vorhandene Antikörperbindung und Komplementaktivierung nach Inkubation mit Serum von Mensch oder Altweltaffe festgestellt (Rouhani *et al.* 2004). Durch die Überexpression verschiedener Enzyme wird ebenfalls eine Verringerung der  $\alpha$ Gal-Antigenexpression erzielt. So bewirkte die Transgenexpression von Galaktosidasen auf porcinen Endothelzellen, wie z.B. der alpha-Galaktosidase oder endo-beta-Galaktosidase C, die enzymatische Abspaltung der  $\alpha$ Gal-Epitope (Osman *et al.* 1997; Ogawa *et al.* 2000; Ogawa *et al.* 2002). Die Transgenexpression von kompetitiven Glykosilierungsenzymen führt durch den Ersatz der  $\alpha$ Gal-Epitope durch andere Zuckeroberflächenstrukturen, gegen die Menschen immunologisch tolerant sind, ebenfalls zur Verhinderung der HAR (Sandrin *et al.* 1995; Tanemura *et al.* 1998). Ein häufig verwendetes Transgen ist hierbei die  $\alpha$ 1,2-Fukosyltransferase ( $\alpha$ HT), die durch Fukosylierung von Laktosamin das Blutgruppenantigen 0 ( $\alpha$ Fuc) synthetisiert (Sandrin *et al.* 1995; Koike *et al.* 1996; Sharma *et al.* 1996; Osman *et al.* 1997).  $\alpha$ GT glykosiliert an Oberflächenproteinen das gleiche Substrat wie  $\alpha$ HT, nämlich das Oligosaccharid Laktosamin. Daher steht Laktosamin nach kompetitiver Fukosylierung durch  $\alpha$ HT für Glykosylierungen durch  $\alpha$ GT nicht mehr zur Verfügung. So führt die Expression von  $\alpha$ HT zu einer Reduzierung der Zelloberflächenepitope von  $\alpha$ Gal um circa 90 %. Obwohl diese Reduzierung beachtlich ist, werden noch genug  $\alpha$ Gal-Epitope (zwischen  $10^5$  und  $10^6$  pro Zelle) auf der Zelloberfläche exprimiert, die als ausreichend angesehen werden, um eine akut vaskuläre oder chronische Abstoßungsreaktion durch XNA auszulösen (Stone *et al.* 1997; Galili *et al.* 1997).

Behüllte Viren, wie z.B. Retroviren, die sich in Tieren mit  $\alpha$ 1,3GT-Expression repliziert hatten, werden nach Infektion in Mensch, Menschenaffen bzw. Altweltaffen von deren Immunsystem über die präformierten anti- $\alpha$ Gal-Ak erkannt und eliminiert (Welsh *et al.* 1998). Aufgrund epidemiologischer Bedenken bei Deletion des  $\alpha$ Gal-Antigens beim Schwein bestehen daher Bestrebungen, beim Transplantatempfänger eine immunologische Toleranz gegen das  $\alpha$ Gal-Antigen zu erzielen. So wurde u.a. durch alpha-Gal-Ricin eine Eliminierung der anti- $\alpha$ Gal-Ak produzierenden B-Zellen erzielt (Tanemura *et al.* 2002b).

Die Hemmung der Komplementkaskade durch Überexpression von humanen membranständigen Regulatoren der Komplementaktivierung (RCA) führt ebenfalls zur Vermeidung der HAR (Schmoeckel *et al.* 1998; Schuurman *et al.* 2002). Von zahlreichen Arbeitsgruppen wurden transgene Schweine erstellt und charakterisiert, die humane RCA wie DAF (decay accelerating factor, CD55) (Cozzi & White 1995), MCP (membrane cofactor protein, CD46) (Adams *et al.* 2001; Diamond *et al.* 2001), CD59 (Fodor *et al.* 1994; Diamond *et al.* 1996) oder eine Kombination dieser Proteine (McCurry *et al.* 1995) exprimieren. Einige der RCA besitzen spezies-spezifische Wirkung (Asghar 1995; Morgan 1995; Liszewski *et al.* 1996). Vermutet wird, dass eine erhöhte Expression von porcinem CD59 auf Spenderendothelzellen die Zellen ähnlich gut gegen das humane Komplement schützt wie die Expression von humanem CD59 (Maher *et al.* 1998). Somit ist in diesem Fall die Höhe der Expression von CD59 für dessen Wirkung entscheidender als die Speziesinkompatibilität (van den Berg & Morgan 1994).

Obwohl die porcinen Organe durch die Transgenexpression der RCA vor der HAR geschützt sind, tritt dennoch eine subklinische Endothelzellaktivierung auf, die zur verzögerten Abstoßung des Transplantats führen kann. Solch eine Endothelzellaktivierung kann aufgrund einer ungenügenden Dichte oder einem „Clustern“ der Regulatorproteine auf der Zellmembran auftreten. So ist die Komplementbindung an hDAF-transgene Schweineendothelzellen zwar gegenüber den nicht modifizierten Kontrollzellen deutlich reduziert, aber dennoch vorhanden (Fecke *et al.* 2002).

Neben der Regulation des Komplementsystems durch membranständige RCA ist auch die Verwendung einer Vielzahl von löslichen Regulatoren, wie z.B. von Cobra-venom-Faktor oder von löslichem C1-Inhibitor, möglich. Diese wirken auf unterschiedlichen Stufen der Komplementkaskade (aufgelistet in Mollnes & Fiane 2003).

### 2.1.4.2 Strategien zur Verhinderung der akut vaskulären und zellulären Abstoßungsreaktionen

Zur Verhinderung der nachfolgend der HAR auftretenden Abstoßungsreaktionen wurden zahlreiche Strategien entwickelt, die großteils auf der Hemmung der die AVR und ACR auslösenden Faktoren beruhen. Es wurden folgende Ansätze beschrieben (siehe Abschnitt 2.1.4.1 und diesen Abschnitt):

- Induktion der Akkommodation
- Hemmung der Komplementkaskade
- Verringerung der  $\alpha$ Gal-Antigenexpression auf dem Spenderorgan
- Hemmung der T-Zell-Aktivierung und der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität
- Hemmung der NK-Zell-Aktivierung
- Hemmung der Leukozytenextravasation (Holgersson *et al.* 2002)
- Unterdrückung der zellulären Immunantwort durch immunsuppressive Therapie

Die Induktion der Akkommodation wird als eine wichtige Strategie zur Verhinderung der humoral-vermittelten Xenotransplantatabstoßung angesehen (Koch *et al.* 2004). Sie wurde Mitte der 80er-Jahre erstmals beschrieben, als AB0-inkompatible Nieren nach transients Depletion von anti-Blutgruppenantikörpern bei Allotransplantatempfängern mit ähnlichem Erfolg übertragen wurden wie AB0-kompatible Transplantate (Alexandre *et al.* 1985; Alexandre 2004). Bei der Akkommodation treten im Transplantat eine Reihe von biologischen Veränderungen auf. Die transplantierten Zellen und das Transplantatgewebe werden dadurch davor bewahrt, von den gegen sie gerichteten und für sie schädlichen Zellen oder anderen Faktoren geschädigt zu werden. Es treten ebenfalls Veränderungen im Immunsystem des Empfängers auf. Einige der Mechanismen der Akkommodation von Seiten des Transplantats und des Transplantatempfängers sind (Koch *et al.* 2004):

➤ Akkommodation von Seiten des Transplantats:

- Antigene werden auf dem Transplantat verloren (shedding) oder sind dahingehend verändert, dass die Avidität der Antikörperbindung verringert ist.
- Eine verstärkte Kontrolle des Komplementsystems verhindert die Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC).

➤ Akkommodation von Seiten des Transplantatempfängers:

- Änderung des Zytokinmilieus (Shift der Th1- in Th2-Antwort)
- Fehlen von T-Zell-Hilfe und dadurch Verringerung der Bildung von hochaffinen anti-Transplantatantikörpern

Beispiele von Ansätzen zur Induktion der Akkommodation sind:

- Transiente teilweise Depletion von xenoreaktiven Antikörpern (Sato *et al.* 1999; Lin *et al.* 2000)
- Erhöhte Expression von membranständigen Regulatoren der Komplementaktivierung, wie hDAF (CD55) oder hCD59 (Koch *et al.* 2004)
- Veränderung des Zytokinmilieus durch lokale Expression von viralem IL-10 (David *et al.* 2000)
- Akkommodation des Zielorgans bereits vor der Transplantation durch Induktion einer Empfängerantigen-spezifischen Immuntoleranz im Spenderschwein („surrogate tolerogenesis“) (Beschorner *et al.* 2000; Beschorner *et al.* 2003a; Beschorner *et al.* 2003b)

Aktivierte T-Zellen sind an der Pathophysiologie der ACR entscheidend beteiligt (siehe Abschnitt 2.1.3.3). So führte der apoptotische Zelltod von aktivierten zytopathischen T-Zellen zur Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit. Nach Phagozytose der apoptotischen Zellen durch APC beeinflussten diese die Differenzierung der T-Helfer-Zellen in regulatorische Immunzellen, welche für die Entstehung und Aufrechterhaltung der Transplantattoleranz verantwortlich sind (Gao *et al.* 1998; Josien *et al.* 1998). Durch Apoptose wurde ebenfalls die Anzahl an zytopathischen T-Zell-Klonen, die gegen das Transplantat gerichtet sind, reduziert (Li *et al.* 2000; Jiang & Lechler 2003). Die Apoptoseinduktion von angreifenden T-Zellen nach Antigenpräsentation in immunprivilegierten Organen führt zu einer Immuntoleranz gegen dieses Antigen. Durch die Transgenexpression von membranständigen Apoptose-induzierenden Liganden, wie z.B. von Fas-Ligand (FasL), soll in den Spenderorganen der „immunprivilegierte Status“ nachgeahmt werden (Ferguson *et al.* 2002). FasL gehört zu der Tumornekrosefaktor (TNF)-Familie und induziert in Zellen, die den Rezeptor Fas exprimieren, Apoptose (Griffith *et al.* 1995). Fas wird u.a. auf den Zellen des lymphatischen Systems exprimiert (Miyawaki *et al.* 1992; Nagata & Golstein 1995). Bei Allotransplantaten von Leber, Niere und Lunge wurde

im Nagetiermodell durch die Expression von transgenem FasL ein Schutz vor Abstoßung festgestellt (Li *et al.* 1998; Okuyama *et al.* 1998; Swenson *et al.* 1998; Schmid *et al.* 2000). Eine zu hohe FasL-Expression in der Leber führte jedoch zu einer Hepatitis. Die Expression von transgenem FasL auf Pankreasinseln und im Herzen führte allerdings aufgrund einer starken Infiltration von Neutrophilen zu einer beschleunigten Abstoßung des Transplantats (Allison *et al.* 1997; Kang *et al.* 1997; Takeuchi *et al.* 1999). Dagegen führte die Koexpression von FasL mit TGF- $\beta$ 1 durch die modulatorische und immunsuppressive Wirkung von TGF- $\beta$ 1 auf Neutrophile zu einer Verlängerung des Transplantatüberlebens (Chen *et al.* 1998). TGF- $\beta$ 1 wirkt auf aktivierte T-Zellen ebenfalls immunsuppressiv (siehe Abschnitt 2.3). Des Weiteren wurde im Nagetiermodell gezeigt, dass durch Überexpression von TGF- $\beta$ 1 in Herzallotransplantaten die Transplantatabstoßung verzögert werden konnte (Josien *et al.* 1998). Ein protektiver Effekt vor Abstoßung und somit auf das Transplantatüberleben wird ebenfalls für TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand, APO-2L), einem weiteren Mitglied der TNF-Familie, angenommen. So wurde im Mausmodell mit TRAIL-überexprimierenden Allotransplantaten (Hornhaut) gezeigt, dass TRAIL die in diesem Fall primär T-Zell-vermittelte Abstoßung verzögerte (Xie *et al.* 2003). Des Weiteren spielt TRAIL bei der peripheren Immunmodulation eine Rolle (siehe Abschnitt 2.2).

Die ACR wird u.a. durch eine starke direkte T-Zell-Antwort nach Aktivierung der T-Lymphozyten induziert. Diese Aktivierung erfolgt durch die Interaktion von humanen T-Zell-Liganden sowohl mit porcinen MHC-Molekülen als auch mit porcinen Kostimulatoren. Verhindert werden konnte die T-Zell-Aktivierung durch die Verwendung von blockierenden monoklonalen Ak, die gegen die zur T-Zell-Stimulation notwendigen Moleküle gerichtet sind (DerSimonian *et al.* 1999; Rogers *et al.* 2000; Rushworth *et al.* 2000; Buhler *et al.* 2001; Bonenfant *et al.* 2003; Tadaki *et al.* 2003; Wada *et al.* 2003; Knosalla *et al.* 2004). Durch die Verwendung von Schweine-spezifischen monoklonalen Ak wird überdies eine Organspender-spezifische Immuntherapie ermöglicht. Diese wird ebenfalls erreicht, wenn der Transplantatempfänger mit Schweine-spezifischen Peptiden immunisiert wurde und dadurch bei ihm eine xenospezifische Antikörperantwort auf porcine kostimulatorische Moleküle induziert wurde (Rogers *et al.* 2000).

Für die Induktion der Xenotransplantat-zerstörenden Wirkung durch NK-Zellen ist deren Adhäsion an und Aktivierung durch das porcine Endothel entscheidend. Die xenogene NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität wurde durch die Maskierung von porcinen Adhäsionsrezeptoren mit Schweine-spezifischen monoklonalen Ak abgeschwächt, teilweise ganz verhindert (Schneider *et al.* 2001; Costa *et al.* 2002). Eine vergleichbare Wirkung wurde durch die Transgenexpression von humanen MHC-Klasse 1-Molekülen, wie HLA-G und HLA-E, auf porcinen Endothelzellen erzielt (Forte *et al.* 2001; Matsunami *et al.* 2002).

Immunsuppressive Behandlungsregimes sind zur Unterdrückung der zellulären Abstoßungsreaktion nach der Transplantation notwendig. Die starke zellvermittelte Abstoßungsreaktion nach Xenotransplantation ist jedoch mit immunsuppressiver Therapie alleine – trotz höherer therapeutischer Dosen als in der Allosituation – nur schwer zu kontrollieren (Mollnes & Fiene 2003). Überdies ist der Transplantatempfänger durch hochdosierte Immunsuppressiva-Gaben gegenüber opportunistischen Infektionen anfälliger und es können zusätzlich toxische Nebenwirkungen auftreten. Die konventionellen Immunsuppressiva hemmen zudem die Aktivierung der T-Zellen und verhindern dadurch die Immunmodulation und die Ausbildung einer Transplantat-spezifischen Toleranz (Karim *et al.* 2002). Daher besteht das Fernziel zum Erreichen akzeptabler Überlebenszeiten von Xenotransplantaten, ähnlich wie bei der Allotransplantation, in der Reduzierung der immunsuppressiven Therapie und in der Ausbildung einer spezifischen Toleranz beim Empfänger gegenüber dem Spendergewebe (Dorling & Lechler 1998; Kirk *et al.* 1999; Knosalla & Cooper 2002; Ohdan & Sykes 2003).

### **2.1.5 Physiologische Hürden**

Bisher gibt es aufgrund der begrenzten Transplantatüberlebenszeiten nur wenige Aussagen über die physiologische Kompatibilität von xenogenen Organen und der von ihnen synthetisierten Hormone. So ist bekannt, dass porcines Insulin den Blutzuckerspiegel beim Menschen senken kann und dass Schweinenieren bei Primaten den Elektrolythaushalt regulieren können. Es gibt jedoch auch Berichte über Speziesinkompatibilitäten von porcinen Hormonen, wie z.B. von Erythropoietin,

bei Primaten. So entwickeln nicht humane Primaten mit Nierentransplantaten vom Schwein eine Anämie (Auchincloss, Jr. & Sachs 1998; Samstein & Platt 2001).

### **2.1.6 Risiko von Zoonosen**

Bei der Übertragung von Geweben kann, *per definitionem*, das Risiko einer Übertragung von unbekanntem Pathogenen nie vollständig ausgeschlossen werden. Das porcine Organ wird als ein „biologisches Produkt“ angesehen. Daher müssen mikrobiologische Sicherheitskriterien erfüllt sein, die darauf abzielen, dass keine bekannten Pathogene auf humane Empfänger bei klinischen Versuchen mit porcinen Xenotransplantaten übertragen werden (Onions *et al.* 2000; Tucker *et al.* 2002). Das Hauptaugenmerk der Forschung liegt hierbei auf den porcinen endogenen Retroviren (PERV) und ihrem möglichen Infektionspotential in nicht transgenen sowie in genetisch modifizierten Schweinen. Überdies ist ihr mögliches Infektionspotential für unbehandelte und immunsupprimierte Empfänger nach Xenotransplantatübertragung auf Primaten von Interesse (Onions *et al.* 2000; Blusch *et al.* 2002).

## 2.2 Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)

### 2.2.1 Struktur

TRAIL (APO-2L, TNFSF10) ist, wie auch andere Mitglieder der TNF-Familie (z.B. FasL oder TNF), ein Typ 2-Transmembranprotein (Wiley *et al.* 1995; Pitti *et al.* 1996). Humaner TRAIL besteht aus 281 Aminosäuren (AS) mit einem errechneten Molekulargewicht von 32,5 kDa und einem isoelektrischen Punkt (pI) von 7,01. Er besitzt einen sehr kurzen zytoplasmatischen N-Terminus (17 AS bei humanem TRAIL), eine Transmembrandomäne (21 AS bei humanem TRAIL) und einen langen extrazellulären C-Terminus (243 AS bei humanem TRAIL). Membrangebundener TRAIL kann nach Verpackung in Mikrovesikel oder nach Spaltung seiner extrazellulären Domäne durch Cysteinproteasen sekretiert werden (Mariani & Krammer 1998; Monleon *et al.* 2001). Ähnlich wie die anderen Mitglieder der TNF-Familie ist TRAIL als Homotrimer funktionell aktiv (Hymowitz *et al.* 1999; Mongkolsapaya *et al.* 1999). So bindet ein TRAIL-Homotrimer an drei Rezeptormoleküle, welche ebenfalls ein Trimer bilden. Für die Trimerstabilität und somit optimale biologische Aktivität von TRAIL ist die Bindung eines Zink-Atoms an ein ungepaartes Cystein essentiell (AS 230 bei humanem TRAIL) (Bodmer *et al.* 2000; Hymowitz *et al.* 2000).

Die humane TRAIL-cDNA besteht aus 1769 Nukleotiden, einem offenen Leseraster von 846 Nukleotiden und setzt sich aus fünf Exons zusammen. Vier Splice-Varianten sind möglich (<http://eased.bioinf.mdc-berlin.de/>). *In-vitro*-Untersuchungen mit TRAIL- $\beta$  (Fehlen von Exon 3) und TRAIL- $\gamma$  (Fehlen von Exon 2 und 3) ergaben eine Verringerung der Trimerstabilität, der Liganden-Rezeptor-Bindungs Kapazität und der Apoptosesignalinduktion im Vergleich zu TRAIL- $\alpha$  (Krieg *et al.* 2003). Bekannt sind cDNA-Sequenzen von TRAIL u.a. bei Homo sapiens (DDBJ/EMBL/GenBank Datenbankzugriffsnummer U37518), Mus musculus (U37522) und Rattus norvegicus (AY115578).

Beim Menschen ist das TRAIL-Gen auf Chromosom 3 (HSA 3q26) lokalisiert und umspannt 17,8 kb. Das 18,1 kb lange murine TRAIL-Gen befindet sich auf Chromosom 3 (MMU 3A3) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>).

### 2.2.2 TRAIL-Rezeptoren

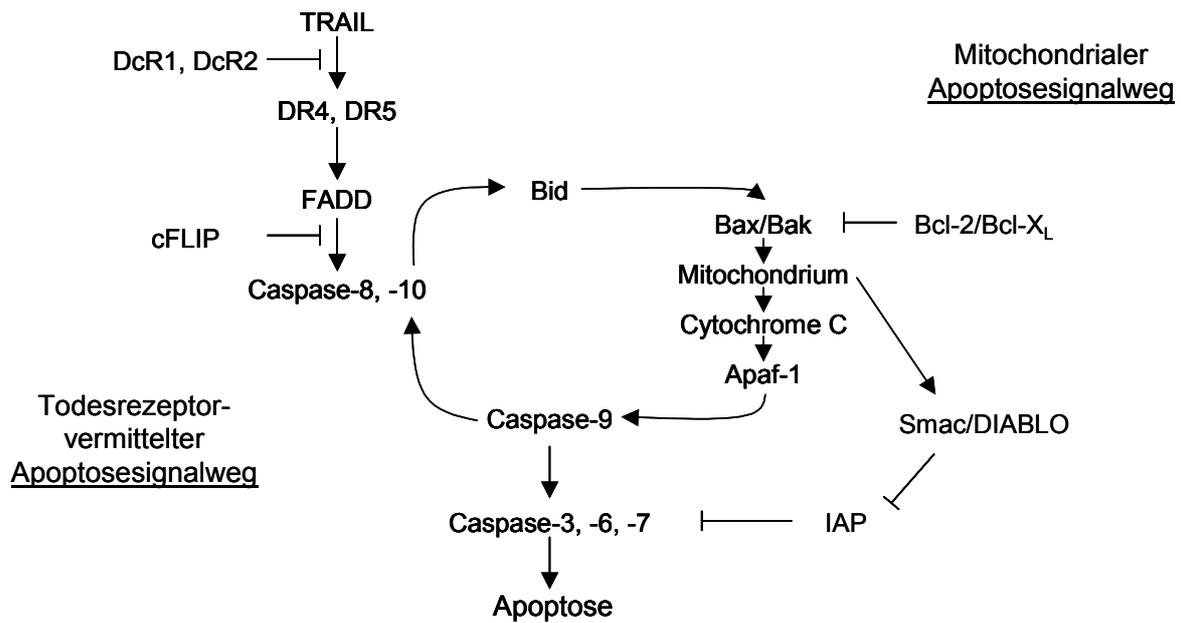
Humaner TRAIL interagiert mit vier hochaffinen Transmembranrezeptoren, die der TNF-Rezeptor-Familie angehören. Zwei von ihnen, TRAIL-R1 (DR4) und TRAIL-R2 (DR5, KILLER), besitzen eine intrazelluläre Todesdomäne (Gura 1997; Pan *et al.* 1997a; Pan *et al.* 1997b; Sheridan *et al.* 1997; Walczak *et al.* 1997). Nach Bindung von TRAIL an diese Todesrezeptoren kann Apoptose induziert werden. Dagegen erfolgt keine Apoptoseinduktion nach der Bindung von TRAIL an die Rezeptoren TRAIL-R3 (DcR1, TRID) und TRAIL-R4 (DcR2) (Degli-Esposti *et al.* 1997a; Degli-Esposti *et al.* 1997b; Pan *et al.* 1997a; MacFarlane *et al.* 1997). TRAIL-R4 hat eine gekürzte zytoplasmatische Todesdomäne, bei TRAIL-R3 fehlt sie vollständig. Diese Rezeptoren dürften als „Decoys“ agieren. Ein fünfter Rezeptor (Osteoprotegerin) hat eine Bedeutung in der Osteoklasten-Regulation und dürfte als löslicher Decoyrezeptor für TRAIL dienen (Simonet *et al.* 1997; Emery *et al.* 1998).

Bei der Maus wurden bisher zwei membranständige Decoyrezeptoren (mDcTrailr1 und mDcTrailr2) (Schneider *et al.* 2003) und der membranständige Todesrezeptor MK (murine KILLER, homolog zum humanen DR5) (Wu *et al.* 1999) gefunden.

### 2.2.3 Intrazelluläre Signalwege nach TRAIL/TRAIL-Rezeptor-Interaktion

Das trimerisierte TRAIL-Protein kann nach Bindung an Todesrezeptoren (Homotrimer aus DR4 bzw. aus DR5 oder Heterotrimer aus DR4 und DR5) Apoptose in der Zielzelle auslösen. Genauer aufgeklärt ist hierbei der Caspase-abhängige intrazelluläre Signalweg (Abbildung 2.2).

In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose neben dem Vorhandensein und der Verteilung von Todes- und Decoyrezeptoren auf der Zelloberfläche (Zhang *et al.* 2000) auch intrazellulär über Apoptosesignalweg-hemmende Proteine, wie z.B. cFLIP oder Bcl-X<sub>L</sub>, bestimmt wird (Harper *et al.* 2001; Kim *et al.* 2003). Eine Erhöhung der Empfindlichkeit der Zelle gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose ist z.B. bei Virusinfektion möglich (Kotelkin *et al.* 2003).



**Abb. 2.2: Todesrezeptor-vermittelter und mitochondrialer Apoptosesignalweg (nach Kelley & Ashkenazi 2004)**

Bei dem Caspase-abhängigen intrazellulären Signalweg, induziert durch TRAIL/TRAIL-Rezeptor-Interaktion, erfolgt über die Rekrutierung von zytoplasmatischen Proteinen an die Todesdomäne der Rezeptoren die Bildung des Apoptose-induzierenden Signalkomplexes (death-inducing signalling complex, DISC) (Kischkel *et al.* 2000; Sprick *et al.* 2000; Wang *et al.* 2001). Der DISC ist zentraler Bestandteil des Todesrezeptor-vermittelten Apoptosesignalwegs. Er enthält das Adapterprotein FADD (Fas-assoziierte Todesdomäne) und die Caspase-8 oder -10. Letztere werden durch proteolytische Spaltung aktiviert. Die Caspasen-8 und -10 sind Initiatorcaspasen der Apoptose, die das Apoptose-signal durch TRAIL an die weiter unten in der Signalkaskade liegenden ausführenden Caspasen (Caspasen-3, -6 und -7) durch deren proteolytische Spaltung und Aktivierung weiterleiten. Die Apoptose-ausführenden Caspasen bewirken dann die charakteristischen morphologischen Veränderungen einer apoptotischen Zelle, wie Schrumpfen, Kondensation und Fragmentierung von Chromatin im Zellkern und Veränderungen an der Zellmembran (Nicholson 1999). In einigen Zelltypen wird die TRAIL-induzierte Aktivierung der Caspase-3 durch die Einbeziehung des mitochondrialen Apoptosesignalwegs verstärkt (Deng *et al.* 2002; LeBlanc *et al.* 2002; Ravi & Bedi 2002; Kelley & Ashkenazi 2004). In diesen Fällen spalten und aktivieren die Caspasen-8 oder -10 Bid, ein pro-apoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie. Nach Aktivierung von zwei weiteren pro-apoptotischen Proteinen, Bax und Bak, durch Bid kommt es zur Freisetzung von apoptogenen Faktoren, wie Cytochrom C und Smac/DIABLO, aus dem Zytosol der Mitochondrien (Gong *et al.* 1999; Green & Evan 2002). Cytochrom C aktiviert, nach Bindung an Apaf-1 (apoptosis activating factor-1), die Initiatorprotease Caspase-9. Diese verstärkt die Aktivierung der Caspasen-3, -6 und -7. Smac/DIABLO bindet an Apoptoseinhibitoren (IAP) und verhindert dadurch, dass die IAP Caspase-3 inhibieren können. Dies führt ebenfalls zu einer weiteren Verstärkung der Caspase-3 Aktivierung.

Neben dem Caspase-abhängigen Signalweg wird ebenfalls ein Caspase-unabhängiger Zelltod diskutiert, der durch die Bindung von TRAIL an seine Todesrezeptoren induziert wird (Thorburn *et al.* 2003; Thorburn 2004). Überdies können durch TRAIL/TRAIL-Rezeptor-Interaktion weitere Signalwege aktiviert werden, wie z.B. die von NF- $\kappa$ B, JNK, AKT oder ERK. Die Wirkungen von TRAIL über diese Signalwege sind jedoch noch weitgehend ungeklärt (Chaudhary *et al.* 1997; Schneider *et al.* 1997; Muhlenbeck *et al.* 1998; Secchiero *et al.* 2003).

Neben apoptotischem Zelltod ist auch die Induktion von Nekrose bei Tumorzellen durch TRAIL beschrieben worden (Kemp *et al.* 2003). Eine Beteiligung von TRAIL an der Autophagie bei der Lumenbildung in einer *In-vitro*-Kultur von humanen Brustdrüsenepithelzellen wurde ebenfalls nachgewiesen (Mills *et al.* 2004).

Obwohl die Richtung der Signaltransduktion gewöhnlich von Ligand auf den Rezeptor erfolgt, wurde das „reverse signalling“ via TRAIL mit der T-Zell-Funktion in Verbindung gebracht (Chou *et al.* 2001; Tsai *et al.* 2004). TRAIL-exprimierende T-Zellen wiesen nach Bindung an T-Zell-Rezeptor und TRAIL *in-vitro* eine gesteigerte Proliferation und IFN- $\gamma$ -Produktion auf (Chou *et al.* 2001).

#### **2.2.4 Expressionsmuster**

TRAIL wird, im Gegensatz zu FasL, in einer Vielzahl von lymphatischen und nicht-lymphatischen Zellen und Organen konstitutiv exprimiert. Die Expression von TRAIL in den verschiedenen Organen wird mit seinen vielfältigen Aufgaben im Organismus in Verbindung gebracht. So weist z.B. die TRAIL-Expression im Auge oder in der Plazenta auf eine Beteiligung von TRAIL in der Immunprivilegierung dieser Organe hin (Lee *et al.* 2002; Chen *et al.* 2004).

Die TRAIL-Expression wird durch Interferon (IFN) hochreguliert. So weisen T-Zellen, NK-Zellen, Neutrophile, Monozyten und dendritische Zellen nach Aktivierung mit Typ 1- (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\omega$  und IFN- $\kappa$ ) und/oder Typ 2-IFN (IFN- $\gamma$ ) eine erhöhte TRAIL-Expression auf (Zamai *et al.* 1998; Fanger *et al.* 1999; Griffith *et al.* 1999; Johnsen *et al.* 1999; Kayagaki *et al.* 1999a; Kayagaki *et al.* 1999b; Smyth *et al.* 2001; Kamohara *et al.* 2004; Koga *et al.* 2004). Durch die Induzierbarkeit der TRAIL-

Expression auf Zellen des Immunsystems durch IFN können diese als Reaktion auf pathophysiologische Veränderungen im Körper ihre anti-tumorale und anti-virale Wirkung gegenüber TRAIL-sensitiven Zellen ausüben. Gezeigt wurde z.B. der anti-tumorale Effekt von Typ 1-IFN gegenüber zahlreichen Tumoren, der über die durch IFN induzierte TRAIL-Expression von humanen peripheren T-Zellen vermittelt wurde (Kayagaki *et al.* 1999a). Des Weiteren können IFN in maligne entarteten bzw. Virus-infizierten Zellen deren TRAIL-Expression sowie auch deren Empfindlichkeit gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose steigern (Chen *et al.* 2001a; Chawla-Sarkar *et al.* 2003). So bewirkt z.B. bei humanen Melanomzellen eine IFN- $\beta$ -Vorbehandlung eine Sensibilisierung für TRAIL-induzierte Apoptose (Chawla-Sarkar *et al.* 2002).

### 2.2.5 Biologische Funktionen von TRAIL

Für TRAIL sind zahlreiche biologische Funktionen bekannt (Tabelle 2.1). Er besitzt eine wichtige Rolle bei der Modulation des Immunsystems. In jüngeren Arbeiten wurden auch Funktionen des TRAIL/TRAIL-Rezeptor-Systems in nicht lymphatischen Zellen beschrieben.

**Tabelle 2.1: Übersicht über die biologischen Funktionen von TRAIL**

Immunmodulatorische Wirkung
„Wächterfunktion“ gegenüber
Tumorwachstum
Infektionen durch Viren und Bakterien
Negative Selektion im Thymus
Periphere Immunregulation
Einfluss auf Antikörperproduktion
Immunprivilegierung
Unterdrücken von Autoimmunerkrankungen
Funktion ohne Beteiligung von Immunzellen
Tissue (re)modeling durch
Lumenbildung von Mammadrüsengewebe
Angiogenese
Bildung extrazellulärer Matrix in der Lunge
Einfluss auf Erythropoese
Follikelatresie

TRAIL wird auf zahlreichen Zellen des Immunsystems – zum Teil konstitutiv, zum Teil induziert – exprimiert. Eine wichtige biologische Funktion von TRAIL ist die Induktion von Apoptose. Etwa zwei Drittel der *in-vitro* getesteten lymphatischen und nicht lymphatischen Tumorzelllinien erwiesen sich als TRAIL-sensitiv (Wiley *et al.* 1995; Pitti *et al.* 1996; Degli-Esposti *et al.* 1997a; Griffith & Lynch 1998). Durch systemische Verabreichung von TRAIL-neutralisierenden Antikörpern und in TRAIL-Knockout-Studien wurde die Bedeutung von TRAIL in der Überwachung und Unterdrückung des Wachstums TRAIL-sensitiver Tumorzellen durch Immunzellen *in-vivo* nachgewiesen (Cretney *et al.* 2002; Sedger *et al.* 2002; Takeda *et al.* 2002; Smyth *et al.* 2003). Überdies ist die konstitutive TRAIL-Expression auf NK-Zellen der Leber ein wichtiger endogener Mechanismus zur Vermeidung von Lebermetastasen TRAIL-sensitiver Tumore (Takeda *et al.* 2001; Seki *et al.* 2003). Eine TRAIL-Expression auf Tumorzellen oder Sezernierung von bioaktivem TRAIL in Mikrovesikeln durch Tumorzellen führte jedoch zu einer Unterstützung des Tumorzellwachstums („stealth effect“ bzw. „tumor counterattack“) durch die immunsuppressive Wirkung von TRAIL auf angreifende Immunzellen (Giovarelli *et al.* 1999; Strebel *et al.* 2002; Martinez-Lorenzo *et al.* 2004).

TRAIL, v.a. in seiner membranassoziierten Form, spielt auch bei der Eliminierung von virusinfizierten Zellen und der Limitierung der Virusvermehrung im Organismus eine entscheidende Rolle. So wurden virusinfizierte Leberzellen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose empfindlich, was bei der Pathogenese von Hepatitis-B-Virusinfektionen der Leber wichtig sein könnte (Mundt *et al.* 2003). Ebenfalls empfindlich gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose wurden Zellen nach Infektion mit dem respiratorischen Synzytialvirus, dem Erreger schwerer Atemwegserkrankungen besonders bei Kindern (Kotelkin *et al.* 2003). Die Expression von TRAIL, induziert durch die Virusinfektion, kann jedoch auch als „Waffe“ der infizierten Zellen dienen, um angreifende Immunzellen zu töten. So ist die TRAIL-Expression von HIV-1-infizierten Makrophagen und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen primär verantwortlich für die Apoptose von uninfizierten „bystander“ CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (Zhang *et al.* 2001; Miura *et al.* 2001).

Die anti-tumoralen und anti-viralen Wirkungen durch das TRAIL/TRAIL-Rezeptor-System werden sowohl durch Zellen des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems vermittelt. Auch bei anderen Funktionen der lymphatischen Zellen in

der Regulation des peripheren Immunsystems ist das TRAIL/TRAIL-Rezeptor-System involviert.

#### *a) Monozyten und Makrophagen*

Die Aktivierung und TRAIL-Expression von Makrophagen wird sowohl durch Kontakt mit verschiedenen Bakterienbestandteilen als auch nach Kontakt mit maligne entarteten Zellen induziert. Dies ist bei der Immunabwehr von bakteriellen Infektionen und zur Unterdrückung von Tumorwachstum wichtig (Halaas *et al.* 2000; Herbeuval *et al.* 2003; Halaas *et al.* 2004). So sezernieren aktivierte Makrophagen Botenstoffe, durch welche die Tumorzellen gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose empfindlicher werden (Herbeuval *et al.* 2003), und wirken sowohl durch membranständiges als auch durch sezerniertes TRAIL anti-tumoral (Griffith *et al.* 1999; Herbeuval *et al.* 2003; Washburn *et al.* 2003; Tecchio *et al.* 2004). Neben der Apoptose-induzierenden Wirkung der Makrophagen durch TRAIL ist dieses Protein auch für die Reaktivität und Homöostase der Monozyten/Makrophagen selber wichtig. So weisen Makrophagen von TRAIL-Knockout-Mäusen nach *In-vitro*-Stimulation eine veränderte Zytokinsekretion und eine reduzierte spontane Apoptoserate auf (Mi *et al.* 2003). Es wird angenommen, dass durch die Apoptose von Antigen-präsentierenden Makrophagen durch CD4<sup>+</sup>-T-Zellen über das TRAIL/TRAIL-Rezeptor-System sowohl die Makrophagen-Homöostase aufrechterhalten als auch die Immunantwort herunterreguliert wird und infizierte Makrophagen beseitigt werden (Kaplan *et al.* 2000). Autoreaktive T-Zellen können jedoch auch bei autologen, nicht aktivierten Monozyten durch TRAIL Apoptose induzieren, was zu der Pathophysiologie des idiopathischen systemischen Lupus erythematoses beiträgt (Kaplan *et al.* 2002).

#### *b) NK-Zellen*

TRAIL wird auf NK-Zellen der Leber konstitutiv und, nach IFN-Stimulation, auf NK-Zellen der Lunge und der Milz induziert exprimiert (Smyth *et al.* 2001; Takeda *et al.* 2001). Die konstitutive TRAIL-Expression auf NK-Zellen ist für deren anti-metastatische Wirkung gegenüber TRAIL-sensitiven Tumoren in der Leber wichtig (Smyth *et al.* 2001; Takeda *et al.* 2001; Sedger *et al.* 2002; Seki *et al.* 2003). Außerhalb der Leber dürften NK-Zellen mit lokal induzierter TRAIL-Expression

ebenfalls an der Kontrolle und Beseitigung spontan entstandener TRAIL-sensitiver Tumorzellen beteiligt sein (Takeda *et al.* 2002). Des Weiteren wird die TRAIL-abhängige Zytotoxizität außerhalb der Leber durch phänotypisch unreife NK-Zellen vermittelt, während reife primäre NK-Zellen ihre Wirkung über die Freisetzung von Granula oder über FasL ausüben (Zamai *et al.* 1998). Daher dürfte das TRAIL/TRAIL-Rezeptor-System, durch seine Funktion bei immaturren NK-Zellen, an der ersten Abwehrfront des angeborenen Immunsystems z.B. gegen Virusinfektionen beteiligt sein (Zamai *et al.* 1998; Sato *et al.* 2001). Weiterhin wird eine Beteiligung von NK-Zellen an der Regulation von dendritischen Zellen (DC) aufgrund der apoptotischen Wirkung von NK-Zell-TRAIL auf unreife DC angenommen (Hayakawa *et al.* 2004).

#### c) *Dendritische Zellen*

Antigen-präsentierende Zellen wie dendritische Zellen (DC) haben die Funktion, Fremd- und Eigenantigene den T-Zellen zu präsentieren und dadurch eine zielgerichtete Immunantwort zu ermöglichen. Nach Stimulierung mit IFN erwerben DC die Fähigkeit, durch induzierte TRAIL-Expression TRAIL-sensitive Tumorzellen abzutöten (Fanger *et al.* 1999). Nach Antigen-Prozessierung der apoptotischen Zellen präsentieren DC diese Antigene den T-Zellen. Weiterhin dürften nach Antigenpräsentation die aktivierten T-Zellen von den TRAIL-exprimierenden DC, an die sie sich banden, reguliert oder eliminiert werden (Fanger *et al.* 1999; Raftery *et al.* 2001; Yu *et al.* 2002). Somit dürften TRAIL-exprimierende DC sowohl eine stimulatorische als auch eine tolerogene Immunantwort induzieren können. Des Weiteren ist das TRAIL/TRAIL-Rezeptor-System auch an der Regulation der DC beteiligt (Wang *et al.* 1999; Leverkus *et al.* 2000; Hayakawa *et al.* 2004). So wurde nachgewiesen, dass NK-Zellen über TRAIL unreife DC abtöteten (Hayakawa *et al.* 2004).

#### d) *Eosinophile Granulozyten*

TRAIL hat einen protektiven Effekt auf das Überleben von eosinophilen Granulozyten (Daigle & Simon 2001; Robertson *et al.* 2002), was eine Rolle in der Pathophysiologie des allergischen Asthmas spielen dürfte (Robertson *et al.* 2002). Ebenfalls nachgewiesen wurde die Hemmung der anti-apoptotischen Wirkung verschiedener Zytokine bei Eosinophilen durch TRAIL (Daigle & Simon 2001).

#### e) *Neutrophile Granulozyten*

Neutrophile exprimieren TRAIL konstitutiv. Nach IFN- $\alpha$ - und IFN- $\gamma$ -Stimulation wird vermehrt TRAIL exprimiert und lösliches TRAIL an die Umgebung abgegeben (Kamohara *et al.* 2004; Tecchio *et al.* 2004). Dadurch können Neutrophile apoptotisch auf TRAIL-sensitive Zellen wie Leukämiezellen wirken. Des Weiteren wurde auch die Induktion des programmierten Zelltods in Neutrophilen durch TRAIL beschrieben. Dies wird als eine regulative Funktion des TRAIL/TRAIL-Rezeptor-Systems bei der konstitutiven Neutrophilen-Apoptose und als ein Mechanismus, Entzündungsorte von Neutrophilen zu reinigen, angesehen (Renshaw *et al.* 2003). Daigle *et al.* (2001; 2002), die keine apoptotische Wirkung in Neutrophile durch TRAIL beobachteten, wiesen nach, dass TRAIL die anti-apoptotische Wirkung verschiedener Zytokine bei Neutrophilen hemmte.

#### f) *B-Lymphozyten und Antikörperproduktion*

TRAIL induzierte in nicht zyklischen Plasmazellen nach der Sekretion von Antigen-spezifischen Antikörpern Apoptose. Es wird daher angenommen, dass TRAIL bei der humoralen Immunantwort und der Kontrolle der Plasmazell-Homöostase wichtig ist und dass dies *in-vivo* über einen „autonomen“ Mechanismus durch TRAIL-Expression auf Plasmazellen erfolgt (Ursini-Siegel *et al.* 2002). Des Weiteren wurde nach systemischer Verabreichung von neutralisierenden anti-TRAIL-Antikörpern in zu Autoimmunkrankheiten neigenden FasL-Knockout-Mäusen ein Anstieg von Autoantikörpern im Serum festgestellt (Kayagaki *et al.* 2002). Dies weist auf eine physiologische Rolle von TRAIL bei der Unterdrückung der Antikörperproduktion und der negativen Regulation der Immunantwort hin.

#### g) *T-Lymphozyten*

Die Funktion und die Homöostase von T-Zellen, die ein wichtiger Bestandteil des erworbenen Immunsystems sind, werden durch das TRAIL/TRAIL-Rezeptor-System entscheidend beeinflusst. Bedeutsam ist, dass das TRAIL-Protein auf aktivierten, nicht jedoch auf nativen T-Zellen gefunden wurde (Jeremias *et al.* 1998; Mariani & Krammer 1998; Kayagaki *et al.* 1999a). Einige der T-Zell-Effektorfunktionen, wie z.B. die anti-tumorale Wirkung oder die Apoptose von Antigen-präsentierenden Makrophagen, werden über TRAIL vermittelt (Kaplan *et al.* 2000; Schmaltz *et al.* 2002).

Andererseits kann TRAIL auf T-Lymphozyten auch gegen diese Zellen selbst zytotoxisch wirken. So wurde nachgewiesen, dass der TRAIL-vermittelte aktivierungsinduzierte Zelltod (AICD) bei der Differenzierung von T-Helfer-Zellen bedeutsam war (Roberts *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2003). In anderen Arbeiten, die keine Apoptoseinduktion von T-Zellen durch TRAIL feststellten, wurde gezeigt, dass TRAIL die Aktivierung von Antigen-spezifischen T-Zellen sowie deren Zellzyklusprogression und somit Proliferation der T-Lymphozyten nach Stimulation hemmt (Song *et al.* 2000; Hilliard *et al.* 2001; Lunemann *et al.* 2002). Eine T-Zell-Anergie wurde allerdings nicht induziert (Lunemann *et al.* 2002). Es wird angenommen, dass diese immunmodulatorischen Wirkungen von TRAIL auf T-Zellen für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase und für das Beenden von Immunantworten wichtig sind. Weiterhin wurde in einem Mausmodell nachgewiesen, dass die TRAIL-vermittelte Hemmung der Proliferation und Zellzyklusprogression sowie möglicherweise auch die Induktion von Anergie in diabetogenen T-Zellen zur Unterdrückung der Entstehung von Typ 1-Diabetes essentiell war (Mi *et al.* 2003).

TRAIL ist überdies auch an der Unterdrückung von weiteren Autoimmunerkrankungen, wie der Kollagen-induzierten Autoimmunarthritis und der experimentellen Autoimmunencephalomyelitis, beteiligt. Dies wurde in Mausmodellen durch die systemische Verabreichung von TRAIL-neutralisierenden Antikörpern sowie in TRAIL-Knockout-Studien gezeigt (Song *et al.* 2000; Hilliard *et al.* 2001; Lamhamedi-Cherradi *et al.* 2003). Diese Mausmodelle, deren molekulare Mechanismen noch nicht aufgeklärt sind, dienen der Untersuchung der humanen Autoimmunkrankheiten rheumatoide Arthritis und Multiple Sklerose.

Neben der Beteiligung von TRAIL an der peripheren Immunregulation wird auch ein Einfluss von TRAIL auf die negative Selektion im Thymus und somit auf die zentrale Immunregulation diskutiert (Simon *et al.* 2001; Lamhamedi-Cherradi *et al.* 2003). Eine Expression von TRAIL wurde ebenfalls auf zahlreichen Zellen und Strukturen des Auges und der Plazenta detektiert (Phillips *et al.* 1999; Lee *et al.* 2002). Es wird hier eine Beteiligung von TRAIL an der Immunprivilegierung bzw. am besonderen Immunstatus dieser Organe angenommen. Dies dürfte sowohl für die Aufrechterhaltung der Organintegrität und für die Funktion des Auges als auch für den Schutz des Fetus vor der maternalen Immunabwehr wichtig sein (Phillips *et al.* 1999; Lee *et*

*al.* 2002; Wang *et al.* 2003). Des Weiteren wird der protektive Effekt von TRAIL auf das Überleben von Hornhaut-Allotransplantaten im Mausmodell mit der Apoptose-induktion in Entzündungszellen wie T-Zellen im Kornea-Transplantat durch TRAIL in Verbindung gebracht (Xie *et al.* 2003).

In jüngeren Arbeiten wurde auch eine Beteiligung des TRAIL/TRAIL-Rezeptor-Systems an Funktionen außerhalb des Immunsystems, wie z.B. bei der Bildung und Homöostase von Gewebestrukturen, gefunden. So wurde *in-vitro* nachgewiesen, dass TRAIL durch die Induktion von Autophagie an der Lumenbildung von Brustdrüsenepithelzellen entscheidend beteiligt ist (Mills *et al.* 2004). Des Weiteren induziert TRAIL die Synthese von extrazellulärer Matrix durch Lungenfibroblasten (Yurovsky 2003) sowie die Endothelzellmigration und Vaskulogenese (Zauli *et al.* 2003; Secchiero *et al.* 2004). Überdies wurden auch vasoprotektive Effekte von TRAIL auf Endothelzellen gezeigt (Zauli *et al.* 2003). Einen Einfluss des TRAIL/TRAIL-Rezeptor-Systems auf die Reproduktionsphysiologie wird durch die Beteiligung von TRAIL bei der Follikelatresie ebenfalls angenommen (Wada *et al.* 2002; Inoue *et al.* 2003). Bei der Regulation der Homöostase der roten Blutzellen dürfte TRAIL als Apoptoseinduktor von unreifen Erythroblasten beteiligt sein (Zamai *et al.* 2004).

## 2.3 Transforming growth factor $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)

### 2.3.1 Struktur

Funktionell aktiver TGF- $\beta$ 1 ist ein etwa 24 kDa schweres Homodimer, miteinander verbunden durch eine Disulfidbrücke (<http://www.expasy.org>; Annes *et al.* 2003) (Abbildung 2.3). Von besonderer Bedeutung für die Kontrolle der TGF- $\beta$ 1-Aktivität ist die posttranslationelle Prozessierung und Regulation der Aktivierung von latentem TGF- $\beta$ 1 (Lawrence 2001; Annes *et al.* 2003). Das Molekül wird bei der Maus und beim Schwein als 390 AS langes „Vorläuferprotein“ (Precursor) translatiert (<http://www.expasy.org>). Nach Abspaltung der Peptidsignalsequenz entsteht der 361 AS lange pro-TGF- $\beta$ 1. Durch eine Endoprotease (Furin-Konvertase) wird dieser einmal gespalten. Es entsteht aktives TGF- $\beta$ 1-Protein (C-Terminus, 112 AS), das nicht kovalent mit dem Latenz-assoziierten Peptid (LAP, N-Terminus, 249 AS) verbunden ist. LAP bewirkt als Homodimer die Latenz von TGF- $\beta$ 1, da es die Bindung von TGF- $\beta$ 1 mit seinen spezifischen Zelloberflächen-Rezeptoren verhindert. Die Homomere von aktivem TGF- $\beta$ 1-Protein und von LAP bilden zusammen den kleinen latenten TGF- $\beta$ 1-Komplex (SLC). Für die Dimerisierung der LAP-Monomere sind mindestens zwei der drei Cystein-Reste des LAP (AS 33, 223 und 225) essentiell. Über Disulfidbrückenbindung ist das LAP an ein „latent-TGF $\beta$ -binding protein“ (LTBP) gebunden. SLC bildet zusammen mit dem LTBP den großen latenten TGF- $\beta$ 1-Komplex (LLC). Nach intrazellulärer Verknüpfung der einzelnen Komponenten erfolgt die Translokation des LLC in den extrazellulären Raum und Bindung an die extrazelluläre Matrix. Das LTBP ist für die effiziente Sekretion des Komplexes notwendig (Miyazono *et al.* 1991).

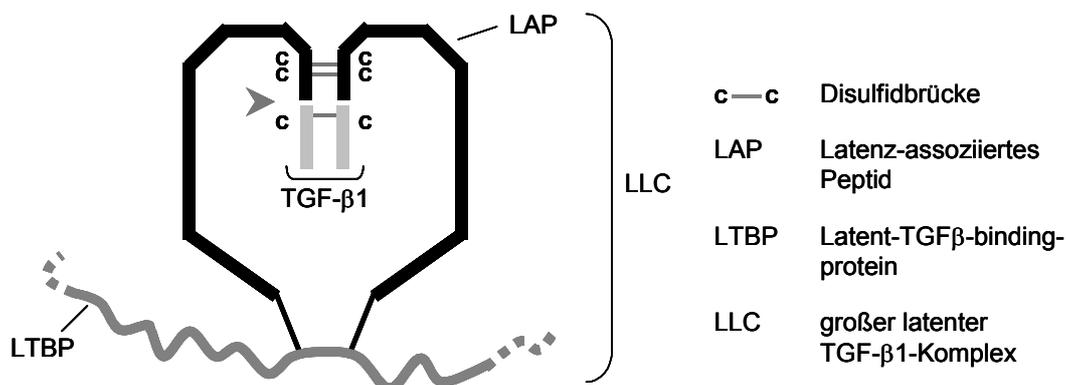


Abb. 2.3: Der große latente TGF- $\beta$ 1-Komplex (modifiziert nach Annes *et al.* 2003)

Die extrazelluläre Konzentration des aktiven TGF- $\beta$ 1 und somit die Bioverfügbarkeit dieses Zytokins wird primär durch die Sekretion und Aktivierung der latenten Form des TGF- $\beta$ 1 reguliert (Assoian *et al.* 1987; Grotendorst *et al.* 1989; Flaumenhaft *et al.* 1993). Gewebe besitzen große Mengen an latentem TGF- $\beta$ 1 und bereits die Aktivierung von einem kleinen Anteil davon bewirkt eine maximale zelluläre Antwort (Annes *et al.* 2003). Aktiver TGF- $\beta$ 1 kann aus dem latenten Komplex durch Proteasen, wie z.B. durch Plasmin, oder nicht enzymatisch durch die Wirkung von Bindungsproteinen, wie z.B. durch Thrombospondin, freigesetzt werden (Lawrence 2001). Dies wird durch Konformationsänderungen am LAP bewirkt. Die Wirkung von aktivem TGF- $\beta$ 1 kann autokrin, parakrin und möglicherweise auch endokrin erfolgen (Dennler *et al.* 2002). Seine biologische Halbwertszeit beträgt nur wenige Minuten (Wakefield *et al.* 1990). „Clearing“ und somit Inaktivierung von aktivem TGF- $\beta$ 1 kann durch lösliche TGF- $\beta$ -Bindeproteine, wie z.B. durch  $\alpha$ 2-Makroglobulin, erfolgen (Lawrence 2001).

Die Expression von aktivem TGF- $\beta$ 1, der nicht über Latenz reguliert wird, ist durch die gezielte Mutagenese von Cystein 223 und 225 des LAP in Serin (TGF- $\beta$ 1<sup>S223/225</sup>) im transgenen Tiermodell möglich (Brunner *et al.* 1989; Sellheyer *et al.* 1993). Diese Cystein-Reste sind für die Dimerisierung des LAP und somit für die Ausbildung des latenten Komplexes essentiell (Brunner *et al.* 1989). Die Expression von LAP ist intrazellulär für die korrekte Faltung des TGF- $\beta$ 1-Moleküls wichtig (Gray & Mason 1990; Zhu & Burgess 2001).

### **2.3.2 TGF- $\beta$ 1 und Xenotransplantation**

TGF- $\beta$ 1 ist ein multifunktionaler Regulator. Eine Vielzahl von Zelltypen exprimieren TGF- $\beta$ 1 und/oder sind gegenüber seinen Wirkungen empfindlich (Letterio & Roberts 1998). Seine Funktionen können in vier Bereiche zusammengefasst werden (Dennler *et al.* 2002):

- Hemmung des Zellwachstums und Förderung der Apoptose
- Stimulation der Synthese von extrazellulärer Matrix
- Regulation der Proliferation und Migration von Endothel- und Gefäßmuskelzellen
- Regulation der Proliferation, Differenzierung und Aktivierung von Immunzellen

Im Hinblick auf die Verwendung von TGF- $\beta$ 1 für die Transgenexpression in Spenderorganen ist seine Wirkung auf periphere Immunzellen relevant. Sowohl auf Zellen des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems wurden Effekte durch TGF- $\beta$ 1 festgestellt. Die Art der Wirkung von TGF- $\beta$ 1 ist jeweils vom Zelltyp, seinem Differenzierungsstatus und dem vorhandenen Zytokinmilieu abhängig (Letterio & Roberts 1998). So sind die zum Teil gegensätzlichen Effekte auf Immunzellen *in-vitro* zu erklären. Untersuchungen von TGF- $\beta$ 1-Knockout-Mäusen ergaben, dass TGF- $\beta$ 1 für die Aufrechterhaltung der Immunzellhomöostase wichtig ist. Der Phänotyp dieser Mäuse – letale multifokale Entzündungen mit Lymphozyteninfiltrationen in zahlreichen Organen – sind großteils auf das Fehlen der anti-proliferativen Effekte von TGF- $\beta$ 1 auf Lymphozyten zurückzuführen (Shull *et al.* 1992; Kulkarni *et al.* 1993).

In der frühen Phase der Entzündung wirkt TGF- $\beta$ 1 pro-inflammatorisch und initiiert die Entzündungsreaktion und die Gewebereparatur (Luethviksson & Gunnlaugsdottir 2003). Tritt eine Infektion oder Verletzung im Organismus auf, so bewirkt TGF- $\beta$ 1 die Chemotaxis von Monozyten, Neutrophilen und Lymphozyten (Wahl *et al.* 1987; Adams *et al.* 1991; Brandes *et al.* 1991; Fan *et al.* 1992; Luethviksson & Gunnlaugsdottir 2003). Neben der Rekrutierung beeinflusst TGF- $\beta$  bei Entzündungsreaktionen auch die Aktivierung, Adhäsion und Migration von ruhenden zirkulierenden Leukozyten (Adams *et al.* 1991; Wahl *et al.* 1993; Chen & Wahl 2002). Überdies induziert TGF- $\beta$ 1 die Differenzierung von Monozyten in Antigenpräsentierende Zellen (Randolph *et al.* 2002), durch welche Lymphozyten aktiviert werden können. Die pro-inflammatorischen Eigenschaften von TGF- $\beta$ 1 sind in der frühen Phase der Entzündung für die Beseitigung des auslösenden Agens und/oder für die Wiederherstellung der Gewebearchitektur wichtig. In der späten Phase der Entzündung wirkt TGF- $\beta$ 1 dagegen anti-inflammatorisch und immunsuppressiv (Luethviksson & Gunnlaugsdottir 2003), da eine zu lang andauernde Entzündung für

den Organismus schädlich ist. So wurde nachgewiesen, dass TGF- $\beta$ 1 die entzündungsauslösenden Funktionen von aktivierten Entzündungszellen, wie T-Helfer-Zellen und aktivierten Makrophagen, hemmt (Bogdan & Nathan 1993; Sporn 1999; Chen & Wahl 2002). Überdies ist TGF- $\beta$ 1 durch Beeinflussung verschiedener Signalwege, die die Apoptose z.B. über aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD) von poststimulatorischen T-Zellen vermitteln, an der Entfernung nicht mehr benötigter Immunzellen und somit an der B- und T-Zell-Homöostase beteiligt (Chung *et al.* 2000; Wahl *et al.* 2000; Sillett *et al.* 2001; Schuster & Krieglstein 2002). Für die immunsuppressiven Effekte von TGF- $\beta$ 1 sind weiterhin seine Einflüsse auf die Differenzierung von T-Zellen in regulatorische T-Zellen und auf deren immunregulatorische und tolerogene Funktionen wichtig (Miller *et al.* 1992; Chen *et al.* 1994; Chen *et al.* 1995; Nakamura *et al.* 2001; Annunziato *et al.* 2002; Zheng *et al.* 2002; Horwitz *et al.* 2003). Des Weiteren ist zur Auflösung einer Entzündungsreaktion neben der immunsuppressiven Wirkung durch regulatorische T-Zellen auch die von TGF- $\beta$ 1 beeinflusste „Clearance“/„stille“ Reinigung von apoptotischen Zellen durch Makrophagen notwendig (Fadok *et al.* 1998; Chen *et al.* 2001b). So wird durch phagozytierende Makrophagen und apoptotische T-Zellen sowohl latenter als auch aktiver TGF- $\beta$ 1 sekretiert, welcher sowohl eine erhöhte Phagozytoseaktivität von Makrophagen gegenüber Entzündungszellen und apoptotischen parenchymalen Zellen als auch eine Hemmung der Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen durch aktivierte Makrophagen bewirkt (Welch *et al.* 1990; Rose *et al.* 1995; Fadok *et al.* 1998; Letterio & Roberts 1998; Aderem & Underhill 1999; Chen *et al.* 2001b; Wahl *et al.* 2004). Weiterhin wurden auch immunsuppressive Effekte von TGF- $\beta$  auf NK-Zellen und B-Lymphozyten beschrieben (Kehrl *et al.* 1986; Mule *et al.* 1988).

TGF- $\beta$ 1 nimmt eine Schlüsselrolle bei der oralen Toleranzinduktion gegenüber nicht pathogenen Antigenen ein (Wahl *et al.* 2004). Dieser Mechanismus verhindert – vermittelt durch die TGF- $\beta$ 1-abhängigen immunsuppressiven Effekte von regulatorischen T-Zellen (Th3-Zellen) – eine dauerhafte Aktivierung des Immunsystems und einen chronischen Entzündungszustand der Darmschleimhaut, was aufgrund des kontinuierlichen Kontakts mit Fremdan antigenen, wie Darmbakterien, eintreten könnte (Chen *et al.* 1994; Weiner 2000; Weiner 2001). Des Weiteren konnten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-regulatorische T-Zellen u.a. durch TGF- $\beta$ 1 *in-vivo* eine Toleranz

gegenüber dem Transplantat vermitteln und eine CD8<sup>+</sup>-T-Zell-medierte Abstoßung verhindern (Seddon & Mason 1999; Dieckmann *et al.* 2002; Jonuleit *et al.* 2002; van Maurik *et al.* 2002). Überdies wurde durch Adenovirus-vermittelte Überexpression von TGF-β1 in Herzallotransplantaten und durch Verabreichung von rekombinantem TGF-β1 im Nagetiermodell eine protektive Funktion von TGF-β1 nachgewiesen, die die Auslösung einer Transplantatabstoßungsreaktion verhinderte (Raju *et al.* 1994; Qin *et al.* 1995; Josien *et al.* 1998).

Durch das funktionelle Zusammenwirken von TGF-β1 mit anderen Zytokinen, wie z.B. mit FasL, können Funktion und Struktur immunprivilegierter Organe wie die des Auges vor schädlichen Einflüssen des Immunsystems bewahrt werden (Chen *et al.* 1998). Im Gegensatz zu FasL, das chemotaktisch auf Neutrophile wirkt (siehe Abschnitt 2.1.4.2), hemmt TGF-β1 die Migration und die Zytotoxizität von Neutrophilen (Chen *et al.* 1998; Ghio *et al.* 2003). FasL-exprimierende Zellen und Allotransplantate wurden nach Übertragung an eine nicht immunprivilegierte Stelle aufgrund starker Neutrophileninfiltration rasch abgestoßen (siehe Abschnitt 2.1.4.2). Bei gleichzeitiger Koexpression von FasL und TGF-β1 bewirkte TGF-β1 durch seine immunsuppressive Wirkung auf T-Zellen und Neutrophile eine Unterdrückung von Entzündungsreaktionen und ein verlängertes Transplantatüberleben (Chen *et al.* 1998).

## 2.4 Regulierbare Genexpressionssysteme

Eine ubiquitäre Expression von konstitutiv aktivem TGF- $\beta$ 1 in transgenen Mäusen führte zum pränatalen Tod oder zu degenerativen Organveränderungen, abhängig vom verwendeten Promotor (Sanderson *et al.* 1995; Agah *et al.* 2000). Um Fragestellungen wie z.B. die Wirkung von als Transgen exprimiertem, konstitutiv aktivem TGF- $\beta$ 1 auf das Transplantatüberleben nach Organtransplantation zu untersuchen, sollten deshalb solche Tiermodelle verwendet werden, bei denen die Expression des Transgens zu einem definierten Zeitpunkt lokal, reversibel und schnell an- und abgeschaltet werden kann.

In den letzten zwanzig Jahren wurden ligandeninduzierbare Genregulatorsysteme entwickelt, die regulatorische Elemente zur Kontrolle der Genexpression besitzen. Beispiele hierfür sind Medikamenten-induzierbare Genregulatorsysteme (Nordstrom 2003). Die bei diesen Systemen verwendeten niedermolekularen Medikamente werden in drei Substratgruppen eingeteilt:

- a) bakterielle Repressorproteine (Tetracycline-,  $\beta$ -Galactoside- oder Streptogramin-regulierte Systeme) (Gossen & Bujard 1992; van Sloun *et al.* 1997; Fussenegger *et al.* 2000)
- b) heterodimere Proteine, die durch chemisch induzierte Dimerisierung entstehen (Rapamycin-regulierte Systeme) (Rivera *et al.* 1996)
- c) (Steroid-)Hormone (Antiprogestin-, wie z.B. Mifepristone-, Antiöstrogen-, Ecdysteroid- oder Glukokortikoid-regulierte Systeme) (Wang *et al.* 1994; No *et al.* 1996; Narumi *et al.* 1998; Putzer *et al.* 2000)

Durch die Verwendung eines Mifepristone-induzierbaren Genregulatorsystems soll eine räumliche und zeitliche Kontrolle der Transgenexpression erzielt werden. Dieses System setzt sich aus zwei Transgenkonstrukten zusammen, für die jeweils Founderlinien erstellt werden. Die eine transgene Founderlinie exprimiert den Mifepristone-induzierbaren chimären Transaktivator unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors. Die zweite Founderlinie besitzt eine Expressionskassette mit dem Zielgen unter der Kontrolle eines durch das Transaktivatorprotein regulierbaren Minimalpromotors der Thymidinkinase. Aus der Kreuzung dieser Founderlinien resultieren doppelt-transgene Tiere, die nach Verabreichung von Mifepristone eine

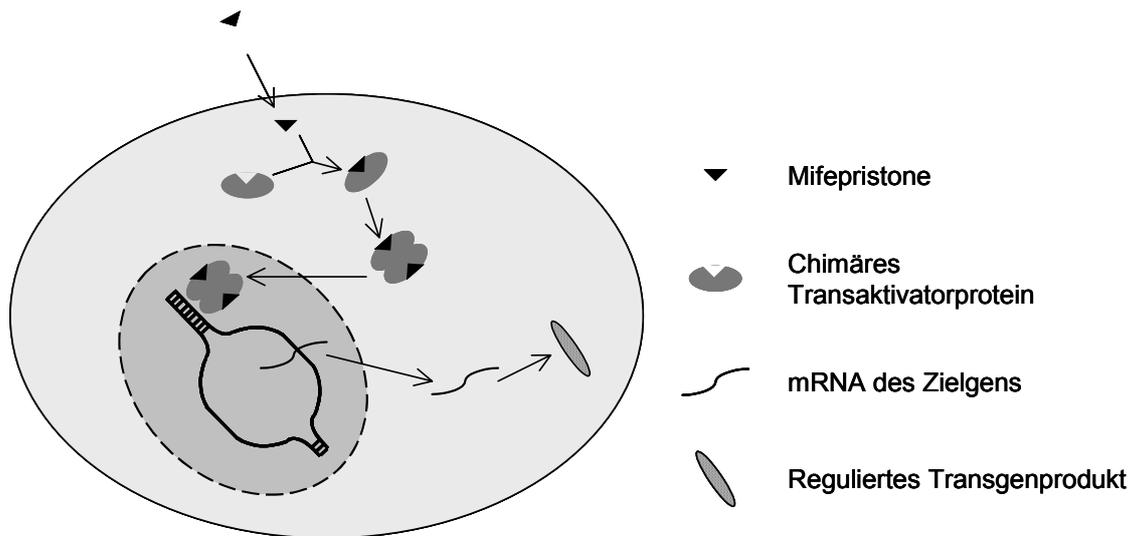
dosisabhängige gewebespezifische Expression des Zielgens aufweisen (Nordstrom 2003).



**Abb. 2.4: Struktur des Mifepristone-induzierbaren chimären Transaktivatorproteins**

Gal4DBD: Gal4-DNA-Bindedomäne; PRLBD-891, PRLBD-914: gekürzte Form der humanen Progesteronrezeptor-Ligandenbindungsdomäne mit C-terminaler Deletion von 42 bzw. 19 Aminosäuren; VP16AD, p65: Transaktivierungsdomäne von VP16 bzw. p65.

Die regulatorische Komponente dieses Systems ist das chimäre Transaktivatorprotein GLVP bzw. GLp65 (Abbildung 2.4). Dieses ist aus mehreren Komponenten zusammengesetzt: aus einer Gal4-DNA-Bindedomäne (GAL4-DBD), aus einer Bindedomäne für den Induktor Mifepristone sowie aus einer Domäne für die Transkriptionsaktivierung von VP16 bei GLVP bzw. von p65 bei GLp65. Dabei ist die Transaktivierungsdomäne viralen Ursprungs, während die DNA-Bindedomäne von Hefen abstammt. Durch Fehlen von homologen Sequenzen im Säugetiergenom sollte der chimäre Transaktivator hochspezifisch an die Gal4-DNA-Bindestellen (UAS) im Promotorbereich des zweiten Transgenkonstrukts binden. Dadurch wird vermieden, dass dieser Transkriptionsfaktor die Expression von endogenen Genen beeinflusst. Die Bindedomäne für Mifepristone besteht aus der gekürzten Form der humanen Progesteronrezeptor-Ligandenbindungsdomäne (PRLBD), genannt PRLBD-891 beziehungsweise PRLBD-914. Durch die Deletion von 42 bzw. 19 Aminosäuren am C-Terminus können an die humane PRLBD Antiprogestine, wie z.B. Mifepristone, nicht jedoch endogene Progesterone, binden.



**Abb. 2.5: Schematische Darstellung der intrazellulären Regulation des Mifepristone-induzierbaren Genregulatorsystems**

Im Falle von GLVP führt der Zusatz von Mifepristone zu Zellen, welche den chimären Transaktivator exprimieren, zu einer raschen Bindung des Antiprogestins an die gekürzte PRLBD-Domäne. Die Folge ist die Aktivierung und Dimerisierung des GLVP und anschließende Translokation des Dimers in den Zellkern. Dort bindet seine Gal4-DBD an die Aktivierungssequenzen im Promotorbereich des Zielgens (UAS). Die VP16-Transaktivierungsdomäne des GLVP gelangt dadurch an eine Position, wo es die Transkription des Zielgens induzieren kann. Die Expression des Zielgens kann somit durch Mifepristone, nicht aber durch endogenes Progesteron, induziert werden.

Das Mifepristone-induzierbare System bietet eine Reihe von Vorteilen wie (Ngan *et al.* 2002):

- die räumliche Kontrolle der Zielgenexpression durch gewebespezifische Expression des chimären Transaktivators
- die zeitliche Kontrolle der Zielgenexpression durch hohe Spezifität der Bindung von Mifepristone an die humane PRLBD (die Expressionshöhe des Zielgens ist abhängig von der Dosis von Mifepristone)
- keine Aktivierung der Zielgenexpression durch endogene Transkriptionsfaktoren
- eine sehr gute Bioverfügbarkeit sowie geringe Toxizität und geringe Nebenwirkungen von Mifepristone im Säugetierkörper (Heikinheimo *et al.* 1989; Spitz & Bardin 1993; Croxatto *et al.* 1998; Sarkar 2002)

## 3 Tiere, Materialien und Methoden

### 3.1 Tiere

#### 3.1.1 Schweine

Zu Beginn dieser Arbeit standen sieben H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-transgene Foundertiere (F0-Tiere) und Nachkommen von vier dieser Foundertiere (F1- und F2-Tiere) zur Verfügung. Erstellt wurden die transgenen Foundertiere durch Mikroinjektion des 4,6 kb großen H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-Konstrukts in die Vorkerne von Zygoten und anschließendem endoskopischen Transfer der Zygoten in die Eileiter von synchronisierten Empfängersauen nach der Methode von Besenfelder et al. (2002). Die Haltung der Schweine erfolgte unter konventionellen Bedingungen auf planbefestigten Böden mit Stroheinstreu. Es wurde mit handelsüblichen Alleinfuttermitteln für Zuchtsauen und für Ferkel gefüttert. Die Tiere erhielten Trinkwasser ad libitum.

#### 3.1.2 Mäuse

Die Linien der  $\alpha$ MHC-GLVPC-polyA- und TK-porcTGF $\beta$ 1-transgenen Mäuse, die für die vorliegende Arbeit verwendet wurden, waren jeweils durch Mikroinjektion der entsprechenden Konstrukte in Zygoten von superovulierten B6D2F1-Mäusen (Hybridmäuse aus Anpaarung von C57BL/6-Muttertier mit DBA/2-Vatertier) und anschließendem Transfer der Zygoten in die Eileiter von synchronisierten pseudo-graviden NMRI-Empfängertieren erstellt worden. Transgene Foundermäuse wurden auf den C57BL/6-Inzuchtstamm zurückgekreuzt und es wurden transgene Linien erstellt. Dies erfolgte unter konventionellen (nicht SPF) Haltungsbedingungen. B6D2F1- und C57BL/6-Mäuse wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld) bezogen.

Expressionsuntersuchungen der Mäuselinien erfolgten erst nach Umstellung der Haltung unter SPF-Bedingungen. Die untersuchten Tiere entstammten mindestens der vierten Generation (G4) und wiesen einen C57BL/6-Anteil von mindestens 96,8 % auf. Die Mäuse wurden im Alter von circa vier Wochen abgesetzt, zur Identifizierung der Tiere mit einer numerischen Ohr-Lochung versehen und, getrennt

nach Geschlecht, in Makrolon-Käfigen (Typ 2 und Typ 3) gehalten. Fütterung der Tiere erfolgte ad libitum mit Alleinfuttermitteln für Labornager (Fa. Sniff, Soest; Haltungsfutter V1534, Zuchtfutter V1126). Die Tiere erhielten angesäuertes Wasser ad libitum. Die Haltung der Tiere erfolgte bei einer Temperatur von  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , einer Luftfeuchtigkeit von  $55\% \pm 5\%$  und einem Hell/Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden. Zum Zeitpunkt des Absetzens wurden Schwanzproben der Nachkommen unter Äthernarkose genommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Erstellung und Haltung transgener Tiere erfolgten unter Einhaltung des Deutschen Tierschutzgesetzes.

### 3.2 Zellen

Folgende primäre Zellen kamen zur Anwendung:

- porcine Hautfibroblasten
- porcine periphere Blutlymphozyten (PBL) (Ficoll-gereinigt)

Folgende permanente Zelllinien kamen zur Anwendung:

- HEK293T (293tsA1609neo) (humane embryonale Nierenzellen)
- Jurkat RJP<sup>+</sup> (humane akute T-Zell-Leukämie-Zellen)
- PM86 (porcine Melanomzellen)

### 3.3 Materialien

#### 3.3.1 Antikörper

Maus anti-humanen TRAIL (IMG-256) (monoklonal) 1:500	Biocarta Europe, Hamburg
Maus anti-Aktin (MAB1501) (monoklonal) 1:10.000	Chemicon, Temecula, USA
HRP Ziege anti-Maus IgG 1:10.000	Dianova, Hamburg

#### 3.3.2 Chemikalien

Alle Chemikalien sind, soweit nicht anders angegeben, in p.a.-Qualität verwendet worden.

---

30 %Acrylamid/Bis Solution (29:1)	BioRad, München
Agar, granuliert	Difco, Detroit, USA
Agarose (15510-027)	Invitrogen, Karlsruhe
Albumin, bovin	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt
Bacto™ Trypton	BD, Heidelberg
Bacto™ Yeast Extract	Difco, Detroit, USA
Bicinchoninsäure	Sigma, Deisenhofen
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Camptothecin	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Riedel-de Haen, Deisenhofen
Concanavalin A (ConA)	Sigma, Deisenhofen
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Deisenhofen
DTT (Pulver) (1,4-Dithio-DL-threitol)	Sigma, Deisenhofen
DTT (100 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (Lösung: 1 %)	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamide	AppliChem, Darmstadt
D-(+)-Glucose Monohydrat	Merck, Darmstadt
Glycerin wasserfrei	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Iodacetamid	Sigma, Deisenhofen
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Kupfer (II)-sulfat	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Methanol	Roth, Karlsruhe
MOPS (3-Morpholino-Propansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Mangan (II)-chlorid Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumacetat wasserfrei	Merck, Darmstadt

---

Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
tri-Natriumcitrat Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Sigma, Deisenhofen
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
NP-40 (Nonidet P40)	Fluka, Deisenhofen
Phytohemagglutinin (PHA)	Sigma, Deisenhofen
Ponceau-S	Sigma, Deisenhofen
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Sigma, Deisenhofen
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (25 %)	Merck, Darmstadt
Salzsäure 1N	Merck, Darmstadt
Spermidine	Sigma, Deisenhofen
Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
Temed	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
Tween-20-Lösung	Sigma, Deisenhofen
X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside)	Invitrogen, Karlsruhe

### 3.3.3 Enzyme und sonstige Reagenzien

AmpErase <sup>®</sup> (Uracil N-glycosylase)	Roche, Mannheim
$\alpha$ -[ <sup>32</sup> P]-dCTP	Amersham Pharmacia, Freiburg
DNase I (10 U/ $\mu$ l)	Roche, Mannheim
ECL „ <i>detection reagent</i> “ (RPN2109)	Amersham, Freiburg
Erststrang-Puffer (5x) für cDNA-Synthese	Invitrogen, Karlsruhe
IFN- $\gamma$ , porcine, rekombinant	R&D Systems
M-MLV-RT (200 U/ $\mu$ l)	Invitrogen, Karlsruhe
PANcoll <sup>®</sup> humane Dichte 1,077 g/ml	Pan-Biotech, Aidenbach
Proteinase K (20 mg/ml)	Roche, Mannheim
Random Primer Hexamers (600 $\mu$ g/ml)	Roche, Mannheim
Rapid-Hyb buffer <sup>®</sup>	Amersham Biosciences
Restriktionsenzyme und -puffer	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Ribonuclease A (RNase-A) (0,2 U/ $\mu$ l)	Roche, Mannheim
Ribonuclease H (RNase-H) (2 U/ $\mu$ l)	Invitrogen, Karlsruhe

RNaseOUT™ (RNase-Inhibitor) (40 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
Superscript™ II Reverse Transkriptase® (200 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase (2000 U/μl) und 10x Ligationspuffer	MBI Fermentas, St. Leon Roth
TdT (terminale Deoxynucleotidyl-Transferase)	Invitrogen, Karlsruhe
TRIzol® Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe

### 3.3.4 Kits

Advantage® cDNA PCR Kit	BD CLONTECH, Heidelberg
Annexin V-FITC apoptosis detection kit I	BD Pharmingen, Heidelberg
BD Advantage™ 2 Polymerase Mix	BD CLONTECH, Heidelberg
High Pure PCR Purification Kit®	Roche, Mannheim
QIAGEN Blood & Cell Culture DNA Midi Kit®	Qiagen, Hilden
QIAGEN® Plasmid Midi Kit (25)	Qiagen, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit (250)	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Rediprime II Random Prime Labelling System®	Amersham, Freiburg
SMART™ RACE cDNA Amplification Kit	BD CLONTECH, Heidelberg
SYBR® GREEN PCR Master Mix	Applied Biosystems, Warrington, England
Taq DNA Polymerase Kit	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Wizard genomic DNA purification kit®	Promega, Wisconsin, USA

### 3.3.5 Geräte

Neben den Geräten der Laborgrundausrüstung wurden folgende Geräte verwendet:

Brutschrank	Heraeus, München
Eagle Eye II	Stratagene, Heidelberg
FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
Gene Pulser® II Elektroporationssystem	Bio Rad, München
Gewebe-Homogenisator (ART-Mirco D8)	ART Labortechnik, Müllheim
Leitz DM IL Mikroskop	Leica, Wetzlar
MilliBlot™ - Graphite Elektroblotter Systems	Millipore, Bedford, MA, USA
Mini Protein II und III System	Bio Rad, München
Hybridisierungsöfen	Bachofer, Reutlingen
Schüttelinkubator KF-4	Infors, Bottmingen
Schüttler IKA-Vibrax	IKA Labortechnik, Staufen
Spectrophotometer	Beckman, Palo Alto, CA, USA
Spectra Max 250 (ELISA-Reader)	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA

---

„SpeedVac“ (Vacuum Concentrator)	Bachofer, Reutlingen
Storage Phosphor Screen	Amersham Pharmacia, Freiburg
Storm 860	Amersham Pharmacia, Freiburg
Szintillationszähler LS6500	Beckman, Palo Alto, CA, USA
Transilluminator	Bachofer, Reutlingen

Thermocycler:

ABI PRISM™ 7700 Sequence Detector	Perkin Elmer, Köln
Biometra® Uno II Thermocycler	Biometra, Göttingen
Gene Amp® PCR System 9700	Perkin Elmer, Köln
Mastercycler® gradient	Eppendorf, Hamburg

Zentrifugen:

GS-6K	Beckman, München
L-90 preparative ultracentrifuge mit Rotor SW55 TI	Beckman, München
Megafuge 1.0 R	Heraeus, München
Sorvall® RC5C Plus	Kendro, Langenselbold
Tischzentrifugen mit Kühlung (5417R)	Eppendorf, Hamburg

### 3.3.6 Molekulargewichtsstandards für DNA und Protein

Molekulargewichtsstandards für DNA: alle von MBI Fermentas, St. Leon Roth

Gene Ruler™ (1 kb-DNA-Ladder: SM0311)  
 Gene Ruler™ (100 bp-DNA-Ladder-Plus: SM0321)  
 Gene Ruler™ (100 bp-DNA-Ladder: SM0241)  
 Lambda DNA/*Eco*RI + *Hind*III-Marker, 3 (SM0191)  
 pUC-Mix-Marker 8 (SM0301)

Molekulargewichtsmarker für Protein:

Low Molecular Weight Range (M-3913)	Sigma, Deisenhofen
Protein Molecular Weight Marker (SM0431)	MBI Fermentas, St. Leon Roth

### 3.3.7 Verbrauchs- und sonstiges Arbeitsmaterial

Neben den Arbeitsmaterialien der Laborgrundausrüstung wurden folgende Materialien verwendet:

Biodyne A <sup>®</sup>	Pall Gelman Laboratory, Ann Arbor, USA
Gel-Blotting-Papiere (GB002) (Whatman-Papier)	Schleicher & Schüll, Dassel
Gene Puser Cuvette (0.4 cm electrode gap)	Bio Rad, München
Hyperfilm™ ECL	Amersham Pharmacia, Freiburg
Kryogefäße	Nunc, Roskilde, DK
MicroSpin™ S-300 HR Columns	Amersham, Freiburg
PVDF-Membran (Immobilon-P Transfermembran)	Millipore, Schwalbach
QIAshredder <sup>®</sup>	Qiagen, Hilden
Saran <sup>®</sup> Wrap-Folie	Roche, Mannheim
Zentrifugenröhrchen (50 ml, 15 ml)	Schubert, Wackersdorf

### 3.4 Zusammensetzung der Puffer

Anmerkung: Als Lösungsmittel diente, soweit nicht anders angegeben, durch eine Milliporeanlage vollentsalztes Wasser, bezeichnet als Aqua bidest.

#### 3.4.1 Puffer für molekularbiologische Methoden

##### 3.4.1.1 DEPC-H<sub>2</sub>O (0,1 %)

1 ml DEPC wurden in 1000 ml Aqua bidest. über Nacht bei RT unter Rühren gelöst und dann dreimal autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei RT.

##### 3.4.1.2 10x DNase I-Puffer

250 mM Tris-HCl, (pH 8,3)

375 mM KCl

15 mM MgCl<sub>2</sub>

steril filtriert, autoklaviert und aliquotiert, Lagerung bei –20°C

##### 3.4.1.3 Proteinase K-Lösung

20 mg/ml in Aqua bidest. gelöst und aliquotiert; Lagerung bei –20°C

##### 3.4.1.4 TE-Puffer

10 mM Tris/HCl (pH 8,0)

1 mM EDTA

**3.4.1.5 Cutting buffer**

2,5 ml            1 M Tris-HCl pH 7,5  
5,0 ml            0,5 M EDTA pH 8,0  
1,0 ml            5 M NaCl  
250 µl            1 M DTT  
127 µl            Spermidine (500 mg/ml)  
ad 50 ml           Aqua bidest.  
Lagerung bei 4°C

**3.4.2 Puffer für Agarosegele****3.4.2.1 10x TBE-Puffer**

108 g            Tris-Base  
55 g            Borsäure  
40 ml            0,5 M EDTA, (pH 8,0)  
mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert

**3.4.2.2 1x TBE-Laufpuffer**

100 ml           10x TBE  
ad 1000 ml      Aqua bidest.

**3.4.2.3 6x Probenpuffer für DNA**

3 ml            Glycerin  
7 ml            Aqua bidest.  
1 Spatelspitze Bromphenolblau  
aliquotiert, Lagerung bei 4-8°C

Alternativ:      6x Ladepuffer (MBI Fermantas)

### 3.4.3 Lösungen für Bakterienkultur

#### 3.4.3.1 Luria-Bertani (LB)-Medium

10 g            Bacto Trypton  
5 g            Bacto Hefeextrakt  
10 g            NaCl  
ad 1000 ml    Aqua bidest.  
mit 5 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt, anschließend autoklaviert  
Lagerung bei RT

#### 3.4.3.2 Agar-LB-Platten

1000 ml        LB-Medium  
15 g            Agar, granuliert  
*Nach dem Autoklavieren wurde die Lösung unter ständigem Rühren mit einem Magnetrührfisch auf 50°C abgekühlt, bevor die benötigte Menge an Ampicillin (100 µg/ml) der Lösung zugegeben und die Lösung direkt in 90 mm Petrischalen gegossen wurde. Nach Aushärten des Agars wurden die Platten über Kopf bei 4°C gelagert.*

#### 3.4.3.3 SOC-Medium

2 %            Bacto Trypton  
0,5 %        Bacto Hefeextrakt  
0,05 %       NaCl  
10 mM        MgCl<sub>2</sub>  
10 mM        MgSO<sub>4</sub>  
0,4 %        Glucose  
MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> und Glucose wurden nach dem Autoklavieren zugesetzt.

#### 3.4.3.4 TYM-Medium

2 %            Bacto Trypton  
0,5 %        Bacto Hefeextrakt  
0,1 M        NaCl  
mit 5 M NaOH pH-Wert auf 7,0 eingestellt  
10 mM        MgCl<sub>2</sub> (von 2 M sterilfiltrierter Stocklösung nach dem Autoklavieren zugegeben)

**3.4.3.5 Tfb I-Puffer**

30 mM KOAc  
100 mM CaCl<sub>2</sub>  
15 % Glyzerin

50 mM MnCl<sub>2</sub> (von 3 M sterilfiltrierter Stocklösung nach dem Autoklavieren zugegeben)

**3.4.3.6 Tfb II-Puffer**

10 mM MOPS  
75 mM CaCl<sub>2</sub>  
10 mM KCl  
15 % Glyzerin

**3.4.4 Lösungen für Southern-Blot (neutraler Transfer)****3.4.4.1 Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH)**

300 ml 5 M NaCl  
20 g NaOH-Plätzchen  
ad 1000 ml Aqua bidest.

**3.4.4.2 Neutralisierungslösung [1 M Tris (pH 7,4), 1,5 M NaCl]**

121,1 g Tris  
87,7 g NaCl  
ad 1000 ml Aqua bidest.  
mit HCl auf pH 7,4 eingestellt

**3.4.4.3 20x SSC (pH 7,0)**

175,3 g NaCl  
88,2 g Na-citrat  
ad 1000 ml Aqua bidest.  
mit HCl auf pH 7,0 eingestellt

**3.4.4.4 neutraler Transferpuffer (10x SSC)**

500 ml            20x SSC (pH 7,0)  
ad 1000 ml       Aqua bidest.

**3.4.5 Lösungen für Northern-Blot****3.4.5.1 10x MOPS**

41,86 g            MOPS  
13,7 ml            3 M Na-acetat (pH 5,5)  
40 ml              250 mM EDTA (pH 8,0)  
ad 1000 ml       Aqua bidest.  
mit 5 M NaOH auf pH 6,5 eingestellt, steril und dunkel lagern, nicht autoklavieren

**3.4.5.2 RNA-Ladepuffer (Northern-Blot)**

156 µl            10x MOPS  
211 µl            37 % Formaldehyd-Lösung  
633 µl            Formamide

**3.4.5.3 Waschlösung 1 (Northern-Blot)**

75 mM            NaOH  
100 mM           NaCl

**3.4.5.4 Waschlösung 2 (Northern-Blot)**

100 mM           Tris (pH 7,5)

**3.4.5.5 Transferpuffer (pH 6,5) (Northern-Blot)**

8 ml              1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
16,98 ml        1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
ad 1000 ml      Aqua bidest.  
pH auf 6,5 eingestellt

### 3.4.6 Puffer und Lösungen für Proteinisolierung, SDS-Page und Westernblot

#### 3.4.6.1 5x Laemmli-Puffer

65,5 ml	1 M Tris (pH 6,8)
100 ml	Glycerin 100 %
2 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)
20 g	SDS
0,01 %	Bromphenolblau
ad 200 ml	Aqua bidest.

#### 3.4.6.2 Proteinextraktionspuffer (1x Laemmli)

2 ml	1 M Tris (pH7,5)
2 ml	Triton X-100
20 ml	5x Laemmli-Puffer
76 ml	Aqua bidest.

#### 3.4.6.3 Swelling-Puffer

10 mM	Tris (pH 8,0)
0,1 mM	DTT
1 mM	PMSF

#### 3.4.6.4 Proteinlysepuffer mit Iodacetamid

150 mM	NaCl
50 mM	Tris-HCl (pH 7,4)
1 %	NP-40
5 mM	EDTA
1 mM	PMSF
1 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
10 mM	NaF
10 mM	Iodacetamid

**3.4.6.5 10x SDS-PAGE-Laufpuffer**

30,3 g Tris  
144 g Glycin  
10 g SDS  
ad 1000 ml Aqua bidest.  
nicht autoklavieren, Lagerung bei 4°C

Anwendung: 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt

**3.4.6.6 10x Transferpuffer**

58 g Tris  
29 g Glycin  
3,7 g SDS  
ad 1000 ml Aqua bidest.  
nicht autoklavieren, Lagerung bei 4°C

**3.4.6.7 1x Transferpuffer (gebrauchsfertig)**

20 ml 10x Transferpuffer  
140 ml Aqua bidest.  
40 ml Methanol  
*immer frisch ansetzen*

**3.4.6.8 Ponceau S-Lösung**

0,2 g Ponceau S  
3 ml Eisessig  
ad 100 ml Aqua bidest.

**3.4.6.9 10x TBS (Tris-gepufferte Salzlösung, Tris-Saline)**

80 g NaCl  
30 g Tris  
ad 1000 ml Aqua bidest.  
mit 37%iger HCl auf pH 7,4 eingestellt

**3.4.6.10 TBS-T (0,1 %)**

100 ml	10x TBS
1 ml	Tween-20
ad 1000 ml	Aqua bidest.

**3.4.6.11 TBS-T-Milch (3 %)**

TBS-T (0,1 %)  
Magermilchpulver 3 % (w/v)

**3.4.6.12 Elutionspuffer**

62,5 mM	Tris-HCl (pH 6,7)
2 %	SDS
100 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol

**3.4.7 Nährmedien und Zusätze für die Zellkultur**

Kulturmedien, Zusätze und FKS für die Zellkultur wurden, bis auf angegebene Ausnahmen, von Invitrogen oder PAA bezogen. Steril filtriert wurde mit einem Filter GP Express Plus Membran (SCGPT01RE) (0,22  $\mu$ m) der Firma Millipore.

**3.4.7.1 Fetales Kälberserum (FKS)**

FKS wurde vor Gebrauch 30 min bei 56°C inaktiviert, steril filtriert und aliquotiert.  
Lagerung bei -20°C

**3.4.7.2 Nährmedium für porcine Fibroblasten**

Dulbecco Modified Eagle Medium (High Glucose/L-Glutamax)

mit	10 %	FKS
	1 %	Natriumpyruvat (100 mM)
	1 %	nichtessentielle Aminosäuren (100x)
	1 %	L-Glutamin (200 mM)
	1 %	Penicillin/Streptomycin (100x)
	1 $\mu$ l/100 ml	$\beta$ -Mercaptoethanol

### 3.4.7.3 Nährmedium für PBL

RPMI 1640

mit	10 %	FKS
	1 %	Natriumpyruvat (100 mM)
	1 %	L-Glutamin (200 mM)
	1 %	Penicillin/Streptomycin (100x)

### 3.4.7.4 Nährmedium für HEK293T- und Jurkat-Zellen

Dulbecco Modified Eagle Medium (Low Glucose)

mit	5 %	FKS
	1 %	Natriumpyruvat (100 mM)
	1 %	nichtessentielle Aminosäuren (100x)
	1 %	L-Glutamin (200 mM)
	1 %	Penicillin/Streptomycin (100x)
	1 µl/100 ml	β-Mercaptoethanol

### 3.4.7.5 Nährmedium für PM86-Zellen

RPMI 1640

mit	10 %	FKS
	1 %	Natriumpyruvat (100 mM)
	1 %	L-Glutamin (200 mM)
	0,5 %	Penicillin/Streptomycin (100x)

### 3.4.7.6 PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, pH 7,4)

136 mM	NaCl
8,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
2,7 mM	KCl
1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

steril filtriert und autoklaviert

### 3.4.7.7 2x Trypsin/EDTA

1 Volumenanteil 10x Trypsin/EDTA (PAA)  
 4 Volumenanteile PBS  
 aliquotiert, Lagerung bei -20°C

### 3.5 Primer, Nukleotide und Oligonukleotide

dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

MBI Fermentas, St. Leon Roth

Alle folgenden Primer und Oligonukleotide wurden vom Syntheservice des Genzentrums (Arbeitsgruppe Arnold) synthetisiert.

#### H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-Konstrukt

TRAIL #3 (sense) : 5' – TTC CTG AGC AAC TTG CAC TTG – 3'  
 β-globin #1 (antisense): 5' – GGC AGC CTG CAC TGG TGG – 3'

#### αMHC-GLVPc-polyA- und TK-porcTGFβ1-Konstrukt

αMHC #5 rev (antisense): 5' – ACC GTA CTC GTC AAT TCC AAG – 3'  
 αMHC #6 rev (antisense): 5' – GCA GTA CAG ATG AAG TTG TTT GAC A – 3'  
 Gal4 #1 (sense) : 5' – CTT CTA TCG AAC AAG CAT GCG AT – 3'  
 GLVPc4se (sense) : 5' – AAG CTA CTG TCT TCT ATC GAA C – 3'  
 hPR-LBP #2 (antisense): 5' – TGT TGT CAT GTC CTG CAT AGA TCA – 3'  
 poTGFβ #1 (sense) : 5' – GTC CAC CTG CAA GAC CAT CGA – 3'  
 poTGFβ #4 (antisense): 5' – TAT AGC CTC TCT GCG GGT CAG – 3'  
 poTGFβ #5 (antisense): 5' – GTT ATC TTT GCT GTC AGA GGA AG – 3'  
 TK sense (sense) : 5' – TTC GAA CAC GCA GAT GCA GTC – 3'  
 TGFβ anti (antisense): 5' – TGG TCT TGC AGG TGG ACA GTC – 3'

#### β-Aktin, murin

β-actin #1 (sense) : 5' – GGC ATC GTG ATG GAC TCC G – 3'  
 β-actin #2 (antisense): 5' – GCT GGA AGG TGG ACA GCG A – 3'

#### αMyHC, murin

mMHCalpha #2rev (antisense): 5' – ATG TCC TCG ATC TTG TCG AAC – 3'  
 mMHCalpha #5se (sense) : 5' – TCA GAG ATT TCT CCA ACC CAG – 3'

#### GAPDH, porcin

porcGAPDH #1 (sense) : 5' – CAA CTC CCT CAA GAT CGT CAG – 3'  
 porcGAPDH #2 (antisense): 5' – GAG CTT GAC GAA GTG GTC GTT – 3'

#### Histon-2A, porcin

H2A se (sense) : 5' – TGC TGG TGG TGG TGT CAT TC – 3'  
 H2A as (antisense): 5' – CCA GGC ATC CTT TAG ACA GTC TTC T – 3'

TRAIL, porcin

TRAIL867rev	(antisense):	5' – TAA AAA GGC <sup>C</sup> <sub>T</sub> CC <sup>A</sup> <sub>G</sub> AA <sup>A</sup> <sub>G</sub> AA <sup>A</sup> <sub>G</sub> CT GGC TTC – 3'
TRAIL #4 se	(sense) :	5' – TAC ATC TAT TCC CAA ACA TAC – 3'
TRAIL #5 se	(sense) :	5' – TGG ACA AGC TAT CCT GAC CCT ATA C – 3'
TRAIL #6 rev	(antisense):	5' – CAC CTT GAT AGA TGG AAT AGA GTC C – 3'
TRAIL #7 se	(sense) :	5' – TGT GGC TGT <sup>A</sup> <sub>G</sub> AC TTA C <sup>A</sup> <sub>G</sub> T GTA C – 3'
TRAIL #8 rev	(antisense):	5' – TCT AGT TCC ATC CAT GTT CCT G – 3'
TRAIL #9 rev	(antisense):	5' – ACG ACT CTG AAT AGT CAC TCT G – 3'
TRAIL #10 se	(sense) :	5' – TGA CAT GGA CCA AGA AGC CAG – 3'
TRAIL #11 rev	(antisense):	5' – TGG AGT ACT TGT CCT GCA TCT G – 3'
TRAIL #12 rev	(antisense):	5' – TCA CAA ACT GAC GTA GCT GCC AC – 3'
TRAIL #13 rev	(antisense):	5' – TCA TCA GCA GTA TAG GGT CAG – 3'
TRAIL #14 se	(sense) :	5' – AGT CAG ACC CTG CCT GGA CCA TG – 3'
TR #15rev	(antisense):	5' – TGT GCC ACA TAT TAG ATT CCA G – 3'
TRAIL #16 se	(sense) :	5' – AGT GGA CAA GGA GCT ACT TCT G – 3'
TR #20se_Kozak	(sense):	5' – TTA GAA TTC GCC ACC ATG GCG GTG ATG CAG ACT – 3'
TR #21rev	(antisense):	5' – TTA CTC GAG TTA GCC AAT TAA AAA GGC CC – 3'

sonstige

Adapter-Primer AdT20:	5' – ATT GAA TTC TCT AGA ACG CGT CTC GAG (T) <sub>20</sub> – 3'
Adapter-Primer Ad :	5' – ATT GAA TTC TCT AGA ACG CGT CTC GAG – 3'
Oligo-dT (20) :	5' – TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT – 3'

**3.6 Methoden****3.6.1 Herstellung der Expressionsvektoren****3.6.1.1 Restriktionsenzym-Verdau**

Für einen Restriktionsenzym-Verdau wurde die eingesetzte DNA mit dem empfohlenen Puffer und bei der erforderlichen Temperatur für 90 min in einem Volumen von 20 µl inkubiert. In der Regel wurden 10 Einheiten (U) Enzym pro µg DNA verwendet.

**3.6.1.2 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

DNA-Fragmente wurden von anderen nicht benötigten Sequenzen abgetrennt, bevor sie weiter verwendet wurden. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte über Gelelektrophorese in einem 1 – 1,5 %igen TBE-Gel (Durchführung der Agarosegelelektrophorese siehe Abschnitt 3.6.3.1.3).

Nach Gellauf und photographischer Dokumentation des Gels unter UV-Licht bei 366 nm (Eagle Eye II, Stratagene) wurde das benötigte DNA-Fragment unter UV-Licht (Transilluminator) mit einer Skalpellklinge aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die DNA mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit entsprechend den Herstellerangaben aus dem Gel isoliert. Die Konzentration der isolierten DNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese mit einem 1 – 1,5 %igen TBE-Gel durch die Verwendung von 1 µg des Lambda/*HindIII*+*EcoRI*-Markers als Standard abgeschätzt.

### 3.6.1.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektoren wurde T4-DNA-Ligase verwendet. 100 ng Vektor-DNA wurden mit dem zwei- bis dreifachen molaren Überschuss an Insert-Fragment in einem 10 µl Ansatz mit 1 µl T4-DNA-Ligase und 1 µl 10x Ligationspuffer inkubiert.

Die Berechnung der erforderlichen Insert-DNA-Menge erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{ng an Insert} = \frac{\text{ng an Vektor} * \text{kb-Größe des Inserts} * \text{molare (Vektor : Insert) DNA Ratio}}{\text{kb-Größe des Vektors}}$$

Nach einer Inkubationsdauer von 1 - 2 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C erfolgte die Enzymaktivierung bei 65°C für 10 min.

### 3.6.1.4 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Der verwendete Bakterienstamm (*E. coli* TOP10) wurde aus einer Dauerkultur zunächst auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Eine Einzelkolonie wurde dann in 5 ml TYM-Medium (mit 50 µg/ml Streptomycin, Sigma) überimpft und über Nacht bei 37°C und 170 rpm im Schüttler bebrütet. 1 – 2,5 ml dieser Vorkultur wurden in 250 ml TYM-Medium (ohne Streptomycin) überführt und im Schüttler bei 37°C inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,7 bis 0,8 (nach 2 bis 4 Stunden) wurde die Kultur in sechs 50 ml Plastikröhrchen (40 ml Bakterienkultur je

Röhrchen) verteilt und für 5 bis 10 min rasch im Eiswasserbad abgekühlt. Die Bakterien wurden dann für 10 min bei 800 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Bakterienpellets in je 12 ml eisgekühltem Tfb I-Puffer im Eiswasserbad resuspendiert. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut durch Zentrifugation bei 600 g und 4°C für 10 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet in jedem Röhrchen wurde dann in je 1,6 ml eisgekühltem Tfb II-Puffer sorgfältig resuspendiert. Je 100 µl der transformationskompetenten Bakterien wurden abschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei –80°C gelagert.

### **3.6.1.5 Transformation von *E. coli***

Ein 100 µl-Aliquot von transformationskompetenten *E. coli* TOP10-Zellen wurde von –80°C sofort auf Eis gestellt und langsam aufgetaut. 10 ng Plasmid oder bis zu 5 µl eines Ligationsansatzes wurden zur Bakterienlösung pipettiert, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte für exakt 45 sec. ein Hitzeschock bei 37°C, gefolgt von 2 – 3 min auf Eis. Anschließend wurden 800 µl LB-Medium (ohne Antibiotikum) zum Transformationsansatz pipettiert und unter leichtem Schütteln für eine Stunde bei 37°C im Thermoblock inkubiert. Die transformierten *E. coli*-Zellen wurden abschließend mit einer sterilen gebogenen Pasteur-Glaspipette auf Agar-LB-Platten (mit 50 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Nach 12 bis 16 Stunden Inkubationszeit waren Einzelkolonien sichtbar.

### **3.6.1.6 Isolierung von Plasmid-DNA (Miniprep und Midiprep) aus *E. coli***

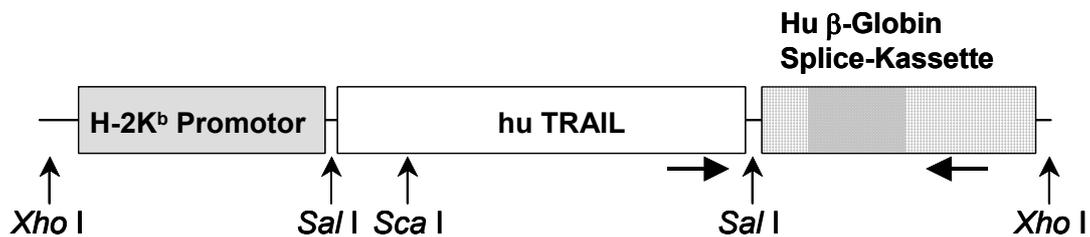
Einzelkolonien wurden von einer Agar-LB-Platte mit sterilen Pipettenspitzen gepickt und in 5 ml LB-Medium (mit 50 µg/ml Ampicillin) überführt. Nach Inkubation von 12 bis 18 Stunden bei 37°C unter konstantem Schütteln bei 170 rpm wurde Plasmid-DNA aus 4 ml Bakterienkultur mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit<sup>®</sup> entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurde anschließend mit einem Spektrophotometer bei 260 nm/280 nm bestimmt. 500 ng einer Miniprep-Plasmid-DNA wurden für die Analyse mit Restriktionsenzymen verwendet.

Wurden größere Mengen einer Plasmid-DNA (z.B. für Elektroporation von Zellen) benötigt, wurde eine Midiprep angesetzt. Hierzu wurden zu 100 ml LB Medium (mit 50 µg/ml Ampicillin) 50 µl der Miniprep-Kultur zugefügt und 12 bis 18 Stunden bei 37°C unter konstanten Schütteln bei 170 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit dem QIAGEN® Plasmid Midi Kit entsprechend den Herstellerangaben isoliert.

### 3.6.2 Expressionsvektoren

#### 3.6.2.1 Das H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-Konstrukt

Das H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-Konstrukt (pUC-H2XXS-huTRAIL) enthält die humane TRAIL-cDNA als *Sal*I-Fragment im Säugetierexpressionsvektor pUC-H2XXS (freundlicherweise überlassen von Prof. Pfeffer, Düsseldorf). Das Injektionsfragment für die Mikroinjektion wurde durch *Xho*I-Verdau aus dem Plasmid freigesetzt.



**Abb. 3.1:** Schematische Darstellung des H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-Konstrukts

Humane TRAIL-cDNA (849 bp) wurde zwischen die Promotorsequenz des murinen H-2K<sup>b</sup> (MHC-Klasse 1)-Gens (2,1 kb) und der 3'-Splice-Kassette (1,7 kb), welche von dem humanem β-Globin-Gen abstammt, über *Sal*I-Schnittstellen inseriert. Die Splice-Kassette besteht aus zwei kurzen nicht translatierten Exons (19 bp von Exon 2 und 228 bp von Exon 3), welche ein Intron (850 bp, schraffiertes Feld) flankieren, und einem Polyadenylierungssignal (593 bp). Pfeile entsprechen der Position der Transgen-spezifischen Primer.

#### 3.6.2.2 Das pcDNA3-huTRAIL- und pcDNA3-porcTRAIL-Konstrukt

Das pcDNA3-huTRAIL-Konstrukt wurde freundlicherweise von Dr. Robert Endres (Institut für Medizinische Mikrobiologie, TU München) zur Verfügung gestellt. Die humane TRAIL-cDNA ist in den pcDNA3.1(+)-Vektor (Invitrogen) an der „multiple cloning site“ inseriert.

Zur Herstellung des pcDNA3-porcTRAIL-Konstrukts wurde zunächst mit dem Advantage<sup>®</sup> cDNA PCR Kit entsprechend den Herstellerangaben die porcine TRAIL-cDNA durch zwei aufeinander folgende PCR-Reaktionen synthetisiert. Als Probe für die PCR diente die mit oligo dT Primern revers transkribierte cDNA aus Lungengewebe eines nicht transgenen Schweins. Für die RT-PCR wurden die Primer TR #20se\_Kozak (sense) und TR #15rev (antisense), für die nachfolgende seminested-PCR die Primer TR #20se\_Kozak (sense) und TR #21rev (antisense) verwendet. Der Primer TR #20se\_Kozak (5'- TTA GAA TTC GCC ACC ATG GCG GTG ATG CAG ACT -3') enthält die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *EcoRI* (gaattc) und die Kozak-Konsensussequenz (gccacc), der Primer TR #21rev (5'- TTA CTC GAG TTA GCC AAT TAA AAA GGC CC -3') die Erkennungssequenz von *XhoI* (ctcgag).

Das Produkt aus der seminested-PCR wurde auf ein 1,5 %iges TBE-Gel aufgetragen, nach Gelelektrophorese das gewünschte Fragment aus dem Gel ausgeschnitten, wie unter Abschnitt 3.6.1.2 beschrieben aufgereinigt und die Konzentration bestimmt. Anschließend wurden 2 µg des gereinigten PCR-Produkts mit je 2,5 U der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XhoI* und dem Puffer O<sup>+</sup> verdaut und, nach Aufreinigung mit dem High Pure PCR Purification Kit<sup>®</sup> und Konzentrationsbestimmung auf einem Gel (wie unter Abschnitt 3.6.1.2 beschrieben), die Ligation des Inserts mit dem entsprechend vorbereiteten pcDNA3.1(+)-Vektor (Invitrogen) durchgeführt. Nach Transformation der Plasmid-DNA in *E. coli*, Vermehrung der Bakterien und Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde durch Restriktionsenzymverdau mit *EcoRI* und *XhoI* die Integration der porcinen TRAIL-cDNA in den Vektor nachgewiesen. Durch Sequenzierung wurde die korrekte Insertsequenz überprüft. Die Sequenzierungen wurden durch den Sequenzierservice des Genzentrums (AG Blum) durchgeführt.

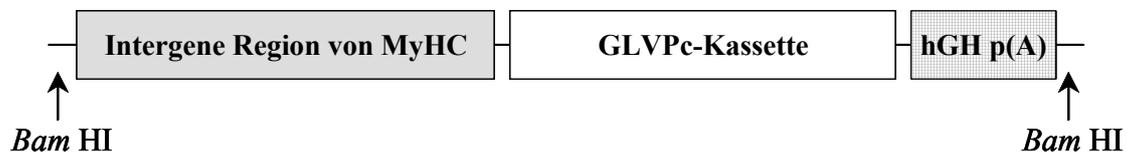


**Abb. 3.2: Schematische Darstellung des pcDNA3-hu bzw. porc TRAIL-Konstrukts**

Die cDNA von humanem (849 bp) bzw. porcinem (870 bp) TRAIL wurde in den pcDNA3.1(+)-Vektor (Invitrogen) zwischen dem hCMV-Promotor (587 bp) und dem 3'-Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormons (224 bp) inseriert. hCMV: Promotor des humanen Cytomegalievirus.

### 3.6.2.3 Das $\alpha$ MHC-GLVPc-polyA- und TK-porcTGF $\beta$ 1-Konstrukt

Die Konstrukte  $\alpha$ MHC-GLVPc-polyA und TK-porcTGF $\beta$ 1 wurden freundlicherweise von Dr. Robert Endres (Institut für Medizinische Mikrobiologie, TU München) zur Verfügung gestellt. Das  $\alpha$ MHC-GLVPc-polyA-Injektionsfragment wurde durch *Bam*HI-Verdau aus dem Plasmid freigesetzt. Bei dem TK-porcTGF $\beta$ 1-Konstrukt wurden hierzu die Enzyme *Not*I und *Kpn*I verwendet. Beide Fragmente wurden jeweils für die Mikroinjektion in Zygoten zur Erstellung transgener Mäuse verwendet.



**Abb. 3.3:** Schematische Darstellung des  $\alpha$ MHC-GLVPc-polyA-Konstrukts

Das  $\alpha$ MHC-GLVPc-polyA-Konstrukt (7,7 kb) beinhaltet die intergene Region des murinen MyHC (5,5 kb) als Promotor, die GLVPc-Kassette (1,6 kb) als kodierende Sequenz und das 3'-Polyadenylierungssignal des humanen Wachstumshormogens [hGH p(A)] (627 bp). Die GLVPc-Kassette kodiert für einen chimären Transaktivator, welcher die regulatorische Komponente des Mifepristone-induzierbaren Genregulatorsystems ist. Sie ist aus folgenden kodierenden Sequenzen zusammengesetzt:

- 1) aus der Sequenz für die Gal4-DNA-Bindedomäne aus Hefe (Gal4-DBD) (276 bp);
- 2) aus der Sequenz für die um 19 AS am C-Terminus gekürzte Form der humanen Progesteronrezeptor-Ligandenbindungsdomäne (PRLBD-914) (825 bp);
- 3) aus der Sequenz der Transkriptionsaktivierungsdomäne von VP16 des *Herpes simplex Virus* (VP16AD) (243 bp).

Der Promotor besteht aus der durch *Bam*HI- und *Sal*I-Verdau exzidierten, etwa 5,5 kb langen genomischen Region zwischen den beiden Genen für die schweren Ketten des Myosins ( $\beta$ MyHC und  $\alpha$ MyHC) der Maus. Er beinhaltet Teile des am 3'-Ende liegenden Exons von  $\beta$ MyHC, die intergene Region zwischen  $\beta$ MyHC und  $\alpha$ MyHC mit den Promotorsequenzen für  $\alpha$ MyHC und die nicht kodierenden Exons 1 bis 3 sowie Introns 1 und 2 von  $\alpha$ MyHC.



**Abb. 3.4: Schematische Darstellung des TK-porcTGFβ1-Konstrukts**

Das TK-porcTGFβ1-Konstrukt (1,7 kb) beinhaltet als kodierende Sequenz die des mutierten porcinen TGF-β1 (TGF-β1<sup>S223/225</sup>) (1,2 kb) unter der Kontrolle des Thymidinkinase (TK)-Promotors (247 bp) mit vier Kopien der Aktivierungssequenzen von Gal4 (UAS) (à 19 bp). Am 3'-Ende des Konstrukts befindet sich das Polyadenylierungssignal von SV40 (232 bp).

### 3.6.3 Identifikation transgener Tiere

#### 3.6.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

##### 3.6.3.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Mäuseschwanzspitzen bzw. Schweineohrstanzen

Schwanzspitzenproben wurden beim Absetzen der Mäuse im Alter von vier Wochen genommen. Ohrstanzen wurden von acht Tagen alten Ferkeln gewonnen. Die Lagerung der Proben erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Zur Isolierung genomischer DNA wurden 3 – 5 mm Mäuseschwanz bzw. die entsprechende Menge an Schweineohrstanze in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und in jeweils 400 µl Mastermix über Nacht bei  $55^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

<b>Mastermix:</b>	375 µl	Cutting buffer
	20 µl	20 % SDS
	5 µl	Proteinase K (20 mg/ml)

Am folgenden Tag wurden die unverdauten Bestandteile bei 15.000 g,  $20^{\circ}\text{C}$  zwei Minuten abzentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die DNA-Fällung mit 400 µl Isopropanol und zweimaliges Waschen des DNA-Pellets mit 70 %igem Ethanol. Nach Trocknung des DNA-Pellets an der Luft wurde es in 100 µl TE resuspendiert. Um sicherzustellen,

dass die DNA vollständig gelöst war, wurde sie vor der weiteren Verwendung mindestens 24 Stunden bei 4°C gelagert.

Vor Verwendung der genomischen DNA für die Genotypisierungs-PCR erfolgte eine DNA-Konzentrationsmessung an einem Spektrophotometer und die Einstellung der DNA-Konzentration auf 100 ng/µl.

### 3.6.3.1.2 PCR-Bedingungen

Zum Nachweis der Transgenintegration wurden Transgen-spezifische Primer verwendet. Es kamen folgende Primer zur Anwendung:

H-2K <sup>b</sup> -huTRAIL:	TRAIL #3 (sense) und β-globin #1 (antisense)
αMHC-GLVPC-polyA:	Gal4 #1 (sense) und αMHC #6 rev (antisense)
TK-porcTGFβ1:	TK sense (sense) und TGFβ anti (antisense)

Die Amplifikation von endogenen Sequenzen diente zur Bestätigung der Integrität der isolierten genomischen DNA. Hierzu wurden bei porciner DNA die Primer porcGAPDH #1 (sense) und porcGAPDH #2 (antisense), bei DNA von der Maus die Oligonukleotide β-actin #1 (sense) und β-actin #2 (antisense) verwendet.

Die PCR-Reaktionen wurden als 20 µl-Ansätze in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen auf Eis unter Verwendung der *Taq* DNA Polymerase (5 U/µl; Qiagen) wie folgt angesetzt:

Aqua bidest.	8,65	µl
Q-Solution (Qiagen)	4	µl
10x Puffer (Qiagen)	2	µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM) (Qiagen)	1,25	µl
dNTPs (1 mM)	1	µl
sense Primer (2 µM)	1	µl
antisense Primer (2 µM)	1	µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1	µl
DNA-Probe (100 ng/µl)	1	µl

Die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

Primerkombination	TRAIL #3 / $\beta$ -globin #1	Gal4 #1 / $\alpha$ MHC #6 rev	TK sense / TGF $\beta$ anti
Denaturierung	94 °C 4 min	94 °C 5 min	94 °C 5 min
Denaturierung	94 °C 1 min	94 °C 1 min	94 °C 1 min
Annealing	60 °C 30 sec   36x	63,5 °C 1 min   36x	58 °C 1 min   36x
Extension	72 °C 105 sec	72 °C 2 min	72 °C 1 min
finale Extension	72 °C 10 min	72 °C 10 min	72 °C 10 min

Primerkombination	GAPDH #1 / GAPDH #2	$\beta$ -actin #1 / $\beta$ -actin #2
Denaturierung	94 °C 4 min	94 °C 4 min
Denaturierung	94 °C 1 min	94 °C 1 min
Annealing	60 °C 30 sec   36x	60 °C 30 sec   36x
Extension	72 °C 105 sec	72 °C 2 min
finale Extension	72 °C 10 min	72 °C 10 min

Zum Abschluss der PCR erfolgte eine Kühlung der PCR-Proben auf 4°C im Thermocycler. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben kurzfristig bei 4°C und längerfristig bei -20°C gelagert.

Als Positivkontrolle der Genotypisierungs-PCR diente jeweils das entsprechende Transgenkonstrukt oder DNA eines transgenen Tieres, als Negativkontrolle H<sub>2</sub>O (non template control).

### 3.6.3.1.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA wurden TBE-Agarosegele verwendet. Die Gellösung und der 1x TBE-Laufpuffer wurden mit Ethidiumbromid (0,9  $\mu$ l/l) versetzt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, welche dadurch unter UV-Licht sichtbar wird. Die Proben wurden mit einem Sechstel Volumenanteil 6x Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Jeweils beiderseits flankierend wurden DNA-Größenstandards aufgetragen. Anschließend wurde die Gelelektrophorese durchgeführt. Alle Gele wurden unter Verwendung des Stratagene Eagle Eye II dokumentiert.

### **3.6.3.2 Southern-Blot**

#### ***3.6.3.2.1 Isolierung genomischer DNA aus EDTA-Blut von Schweinen***

Genomische DNA wurde aus 5 ml mit EDTA antikoaguliertem Blut mit dem QIAGEN Blood & Cell Culture DNA Midi Kit<sup>®</sup> entsprechend den Herstellerangaben isoliert.

#### ***3.6.3.2.2 Isolierung genomischer DNA aus Mäuseschwänzen***

Genomische DNA aus 0,5 cm langen Mausschwanzproben wurde mit dem Wizard genomic DNA purification kit<sup>®</sup> entsprechend den Herstellerangaben isoliert.

Nach Resuspension der DNA in TE wurde diese vor der weiteren Verwendung mindestens 24 Stunden bei 4°C gelagert. Durch Messung der optischen Dichte von 100 µl einer 1:50-Verdünnung bei 260 nm und 280 nm in einem Spektrophotometer wurde die DNA-Konzentration bestimmt. Bei einem Verhältnis (260 nm/280 nm) zwischen 1,6 und 2,0 wurde die DNA-Probe für weitere Analysen verwendet.

#### ***3.6.3.2.3 Restriktionsenzymverdau und Transfer von genomischer DNA***

##### **3.6.3.2.3.1 Restriktionsenzymverdau genomischer DNA vom Schwein**

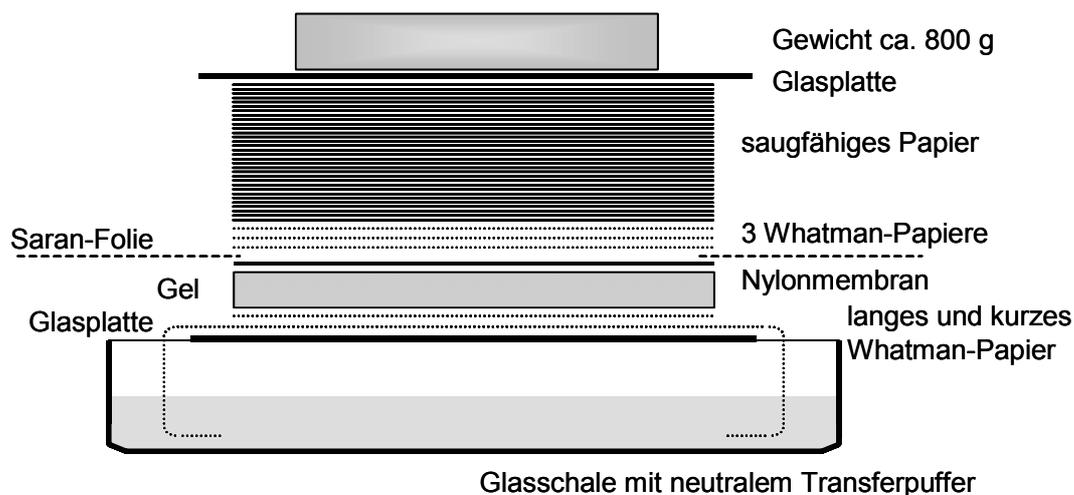
10 µg von genomischer DNA wurden mit 27 U des ausgewählten Restriktionsenzym und dem dafür erforderlichen Puffer in einem Gesamtvolumen von 30 µl über Nacht (mindestens 12 Std.) bei der erforderlichen Temperatur inkubiert. Vor dem Beladen des Gels wurden 6 µl eines 6x Ladepuffers (MBI Fermentas) zur verdauten DNA hinzupipettiert.

##### **3.6.3.2.3.2 Restriktionsenzymverdau genomischer DNA von der Maus**

10 µg von genomischer DNA wurden mit 37 U des ausgewählten Restriktionsenzym und dem dafür erforderlichen Puffer in einem Gesamtvolumen von 40 µl über Nacht (mindestens 12 Std.) verdaut. Vor dem Beladen des Gels wurde das Volumen der verdauten DNA in der „SpeedVac“ (Vacuum Concentrator) auf ca. 30 µl eingeengt und 6 µl eines 6x Ladepuffers (MBI Fermentas) hinzupipettiert.

### 3.6.3.2.3.3 Gelelektrophorese und Transfer von Restriktionsenzym-verdauter DNA

Die Restriktionsenzym-verdaute DNA wurde auf einem 0,8 %igen TBE-Gel aufgetrennt. Als Größenstandards dienten der 1 kb-Marker und der  $\lambda$ /EcoRI+HindIII - Marker. Die Gelelektrophorese wurde beendet, sobald die Bromphenolblau-Bande (der Proben mit 6x Ladebuffer) das Gelende erreicht hatte. Nach photographischer Dokumentation des Gels mit einem Lineal unter UV-Licht wurde das Gel in 0,2 N HCl geschwenkt (Depurinierung). Die Zeitdauer richtete sich nach dem Farbumschlag der Bromphenolblau-Bande von blau nach gelb (etwa 20 min). Anschließend wurde das Gel als Vorbehandlung für den neutralen Transfer einmal für 45 min in Denaturierungslösung und zweimal (1x 30 min, 1x 15 min) in Neutralisierungslösung geschwenkt. Beim Pufferwechsel wurde das Gel jeweils kurz mit Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurde die im Gel aufgetrennte, verdaute genomische DNA über neutralen Kapillartransfer auf eine ungeladene Nylonmembran (Bodyne A<sup>®</sup>) transferiert. Der Aufbau des Southern-Blots ist der Abbildung 3.5 zu entnehmen.



**Abb. 3.5: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Southern-Blots**

Eine Glasplatte wird über eine Glasschale platziert, welche den neutralen Transferpuffer enthält. Auf die Glasplatte wird luftblasenfrei zunächst ein langes, in den Transferpuffer reichendes, und darauf ein kurzes, etwa der Gelgröße entsprechendes angefeuchtetes saugfähiges Papier (Whatman-Papier, GB002, Dicke 0,4mm; Schleicher & Schuell) gelegt. Anschließend wird das Gel mit den Geltaschen zur Glasplatte hinzeigend und darauf die Nylonmembran (Bodyne A<sup>®</sup>) luftblasenfrei gelegt. Die Rückseite der Membran wird beschriftet und die rechte untere Ecke der Membran wird zur späteren Orientierung abgeschnitten. Die Randbereiche des Gels werden mit Saran-Folie abgedeckt. Dann werden drei angefeuchtete Whatman-Papiere luftblasenfrei darauf gelegt, darüber ein Stapel aus saugfähigen Papierhandtüchern. Um den Kapillartransfer zu forcieren, wird abschließend ein Gewicht von etwa 800 g auf den Blot gelegt.

Nach Kapillartransfer von 18 bis 24 Stunden wurde die Nylonmembran nach Blotabbau kurz in 6x SSC geschwenkt, auf ein neues Whatman-Papier gelegt und für etwa 10 min an der Luft getrocknet. Anschließend erfolgte das Kreuzvernetzen der transferierten DNA mit der Membran unter UV-Licht (120 J/cm<sup>2</sup>). Bis zur weiteren Verwendung wurde die Membran zwischen zwei Whatman-Papieren bei RT gelagert.

#### **3.6.3.2.4 Sondenherstellung**

Die Herstellung der humanen TRAIL-cDNA-Sonde erfolgte durch *SaI*-Verdau des H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-Konstrukts, der porcinen TRAIL-cDNA-Sonde durch *EcoRI* / *XhoI* - Verdau des pcDNA3-porcTRAIL-Plasmids und Aufreinigung der entsprechenden Banden aus dem Agarosegel wie unter Abschnitt 3.6.1.2 beschrieben.

Über RT-PCR mit den Primern porcGAPDH #1 (sense) und porcGAPDH #2 (antisense) sowie Aufreinigung des PCR-Produkts mit dem High Pure PCR Purification Kit<sup>®</sup> entsprechend den Herstellerangaben erfolgte die Sondenherstellung der porcinen GAPDH-cDNA. Analog erfolgte die Herstellung der Sonde von murinem  $\beta$ -Aktin mit den Primern  $\beta$ -actin #1 (sense) und  $\beta$ -actin #2 (antisense) bzw. von murinem  $\alpha$ MyHC mit den Primern mMHCalpha #5se (sense) und mMHCalpha #2rev (antisense).

Die Sonden zum Nachweis der Integration und Expression der  $\alpha$ MHC-GLVPc-polyA- und TK-porcTGF $\beta$ 1-Konstrukte wurden mittels PCR von Plasmid-DNA und nachfolgender Aufreinigung der PCR-Fragmente aus dem Agarosegel, wie unter Abschnitt 3.6.1.2 beschrieben, hergestellt. Als Primer für die PCR wurden verwendet:

- GLVPc4se (sense) und  $\alpha$ MHC #5 rev (antisense) für das  $\alpha$ MHC-GLVPc-polyA-Konstrukt
- TK sense (sense) und poTGF $\beta$  #5 (antisense) für das TK-porcTGF $\beta$ 1-Konstrukt

#### **3.6.3.2.5 Radioaktive Markierung der Sonde**

50 ng der zu verwendenden Sonde wurde mit dem Rediprime II Random Prime Labelling System<sup>®</sup> entsprechend den Herstellerangaben mit 50  $\mu$ Ci <sup>32</sup>P-dCTP

radioaktiv markiert. Anschließend wurden die nicht in die radioaktiv markierte Sonde eingebauten Nukleotide über MicroSpin™ S-300 HR Säulchen entfernt. Die radioaktive Strahlung pro Minute (cpm) von 5 µl einer 1:100 Verdünnung wurde mit dem Szintillationszähler LS6500 gemessen. Anschließend erfolgte die Berechnung des cpm-Wertes pro µl Sonde nach folgender Formel (Cerenkov ist ein Korrekturfaktor für Messungen ohne Szintillationsflüssigkeit):

$$\text{cpm}/\mu\text{l} = \text{cpm} * 20 (\text{Verdünnung}) * 1,55 (\text{Cerenkov})$$

#### **3.6.3.2.6 Hybridisierung, Waschen und Signaldetektion**

Die Nylonmembran wurde in ein Hybridisierungs-Glasröhrchen überführt und in Rapid-Hyb buffer® bei 65°C für mindestens 45 min in einem Hybridisierungssofen prähybridisiert. Für die Hybridisierung wurde eine Konzentration der radioaktiv markierten Sonde von  $2 \times 10^6$  cpm pro ml Rapid-Hyb buffer® benötigt. Zur Sonden-vorbereitung für die Hybridisierung wurde die benötigte Menge an Sonde für 5 min auf 95°C erhitzt und anschließend direkt auf Eis gestellt. Nach 5 bis 10 min auf Eis wurde die denaturierte Sonde direkt der Prähybridisierungslösung zugegeben. Beim Southern-Blot erfolgte die Hybridisierung bei 65°C über Nacht. Anschließend wurden drei Waschschrte zur Entfernung von unspezifisch gebundener Radioaktivität durchgeführt: 1x 20 min bei RT mit 2x SSC / 0,1 % SDS und 2x 15 min bei 65°C mit 1x SSC / 0,1 % SDS. Abschließend wurde die Southern-Blot-Membran zwischen zwei Plastikfolien eingeschweißt. Die Exposition erfolgte auf einem „Storage Phosphor Screen“. Die gespeicherten Signale wurden mit Hilfe eines Phosphor-Imagers (Storm 860) ausgelesen.

Die Hybridisierungs- und Waschlösungen wurden in den radioaktiven Flüssigabfall entsorgt.

#### **3.6.3.2.7 Strippen der Membran**

Vor erneuter Hybridisierung mit einer weiteren radioaktiv markierten Sonde wurde die zuvor verwendete Sonde durch Strippen der Membran von dieser entfernt. Hierzu wurde die feuchte Membran in ein Hybridisierungsröhrchen überführt, mit reichlich

kochender 0,1 %iger SDS-Lösung übergossen und im Hybridisierungssofen bei RT gerollt. Nach 10 min wurde die Lösung erneuert und bis zum Abkühlen auf RT auf der Membran im Hybridisierungssofen belassen. Vor der erneuten Prähybridisierung der Membran wurde die radioaktive Strahlung unter dem Szintillationshandmeßgerät gemessen. Erwies sich die Reststrahlung als zu hoch, wurde das Strippen der Membran wiederholt, ansonsten wurde die Membran bei RT getrocknet. Bis zur Wiederverwendung wurde die Nylonmembran zwischen zwei Whatman-Papieren bei RT gelagert.

### **3.6.4 Untersuchung der Genexpression auf RNA-Ebene**

*Um einen Abbau durch RNasen zu verhindern, wurden folgende Regeln beim Umgang mit RNA befolgt:*

- *Handschuhe wurden durchgehend getragen und regelmäßig gewechselt.*
- *Alle Lösungen und Plastikwaren wurden autoklaviert, Glaswaren und Magnet-rührer bei 180 °C für 12 Stunden sterilisiert.*
- *Für RNA- und Northern-Blot-Gele wurden die Gelkammern und -kämme über Nacht in 1 %iger SDS-Lösung inkubiert, anschließend mit heißem H<sub>2</sub>O und Aqua bidest. gespült.*
- *Alle Lösungen mit Ausnahme der Tris-haltigen wurden mit 0,1 % DEPC-H<sub>2</sub>O angesetzt.*
- *Beim Abwiegen der Reagenzien wurde auf den Gebrauch von Spateln verzichtet, ebenso wurde kein Reagenz zurück in den Originalbehälter gefüllt.*
- *Alle Reaktionsschritte wurden auf Eis durchgeführt.*

#### **3.6.4.1 RNA-Isolierung aus Zellen und Gewebe**

In ein 5 ml Plastikröhrchen wurde 1 ml TRIzol<sup>®</sup> Reagenz vorgelegt. 30 bis 50 mg von den bei -80°C gelagerten Proben wurden in das vorbereitete Röhrchen überführt und mit einem Gewebe-Homogenisator (ART-Mirco D8) auf Position D (23.500 rpm) für 30 bis 60 sec. homogenisiert. Zwischen den einzelnen Proben wurde der Homogenisator-Stab mit Aqua bidest., 0,2 M NaOH und abschließend nochmals mit Aqua bidest. gereinigt. Die RNA wurde entsprechend den Herstellerangaben isoliert und, abhängig von der Größe des RNA-Pellets, in 20 bis 200 µl 0,1 % DEPC-H<sub>2</sub>O

gelöst. RNA-Konzentrationsmessung erfolgte mit einem Spektrophotometer bei 260 nm und 280 nm.

RNA-Isolierung aus adhärenenten Zellen erfolgte durch direkte Zugabe von TRIzol<sup>®</sup> Reagenz auf die Zellkulturschale. Zellen, die in Suspension wuchsen, wurden vor der Zugabe von TRIzol<sup>®</sup> Reagenz pelletiert. Ein vorheriges Waschen der Zellen mit PBS wurde unterlassen, da dies zu einer erhöhten mRNA-Degradierung hätte führen können.

Bei Bedarf wurde die Qualität der RNA über die Intensität der 28S und 18S ribosomalen RNA-Banden auf einem 1 %igen TBE-Gel überprüft.

#### **3.6.4.2 DNase I-Verdau und reverse Transkription für RT-PCR**

Um mögliche DNA-Kontaminationen von der RNA-Probe zu entfernen, wurden 5 µg Gesamt-RNA mit RNase-freier DNase I bei 37°C für 30 min in einem Gesamtvolumen von 20 µl wie folgt inkubiert:

Gesamt-RNA	x µl (= 5 µg)
10 x DNase I Reaktionspuffer	2 µl
RNase-freie DNase I (10 U/µl)	0,25 µl
0,1 % DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Die Enzymaktivierung erfolgt bei 75°C für 10 min.

3 µl des DNase I-Verdaus (= 0,75 µg RNA) wurden für die reverse Transkription der RNA in cDNA mit der M-MLV reversen Transkriptase in einem Gesamtvolumen von 20 µl wie folgt eingesetzt:

---

1 µl	random primer hexamers (600 µg/ml)
1 µl	dNTPs (10 mM)
7 µl	0,1 % DEPC-H <sub>2</sub> O
3 µl	RNA, DNase I-verdaut (=0,75 µg)
	-> 5 min, 65°C
	-> auf Eis stellen
2 µl	5x Erststrangpuffer
2 µl	0,1 M DTT
	-> 10 min, 25°C
2 µl	5x Erststrangpuffer
1,5 µl	0,1 % DEPC-H <sub>2</sub> O
0,5 µl	M-MLV reverse Transkriptase (200 U/µl)
	-> 50 min, 37°C
	-> 15 min, 70°C

Nach der Inaktivierung des Enzyms bei 70°C für 15 min wurde die cDNA auf Eis gestellt, kurz abzentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.6.4.3 RT-PCR

2 µl der cDNA-Lösung wurden als Matrize für die wie folgt beschriebene PCR eingesetzt:

Aqua bidest.	7,65 µl
Q-Solution	4 µl
10x Puffer	2 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,25 µl
dNTPs (1 mM)	1 µl
sense Primer (2 µM)	1 µl
antisense Primer (2 µM)	1 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
cDNA-Probe	2 µl

Zur Amplifikation Transgen-spezifischer Sequenzen und somit zum Nachweis der Transgen-Expression kamen folgende Primer zur Anwendung:

H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL: TRAIL #3 (sense) und  $\beta$ -globin #1 (antisense)  
 $\alpha$ MHC-GLVPC-polyA: Gal4 #1 (sense) und hPR-LBP #2 (antisense)  
 TK-porcTGF $\beta$ 1: poTGF $\beta$  #1 (sense) und poTGF $\beta$  #4 (antisense)

Zum Nachweis endogener Genexpression wurden folgende Primer verwendet:

$\alpha$ MyHC (Maus): mMHCalpha #5se (sense) und mMHCalpha #2rev (antisense)  
 $\beta$ -Aktin (Maus):  $\beta$ -actin #1 (sense) und  $\beta$ -actin #2 (antisense)  
 GAPDH (Schwein): porcGAPDH #1 (sense) und porcGAPDH #2 (antisense)

Die RT-PCR-Bedingungen waren wie folgt:

RT-PCR mit den Primerkombinationen TRAIL #3 und  $\beta$ -globin #1 bzw. GAPDH #1 und GAPDH #2 waren analog den in Abschnitt 3.6.3.1.2 beschriebenen.

Primerkombination	Gal4 #1 / hPR-LBP #2 mMHCalpha #5 + #2	poTGF $\beta$ #1 + #4	$\beta$ -actin #1 + #2
Denaturierung	94 °C 5 min	94 °C 5 min	94 °C 4 min
Denaturierung	94 °C 1 min	94 °C 1 min	94 °C 1 min
Annealing	61,7 °C 1 min   40x	65 °C 1 min   40x	60 °C 1 min   36x
Extension	72 °C 90 sec	72 °C 75 sec	72 °C 90 sec
finale Extension	72 °C 10 min	72 °C 10 min	72 °C 10 min

Im Anschluss an die RT-PCR erfolgte die Gelelektrophorese, wie in Abschnitt 3.6.3.1.3 beschrieben.

Die Überprüfung der Vollständigkeit des DNase I-Verdau erfolgte durch PCR mit DNase I-verdauter RNA als Matrize.

### **3.6.4.4 Real-Time-RT-PCR**

#### **3.6.4.4.1 DNase I-Verdau und reverse Transkription für Real-Time-RT-PCR**

DNase I-Verdau von 10 µg Gesamt-RNA erfolgte mit einer RNase-freien DNase I (Invitrogen) entsprechend den Herstellerangaben. Anschließend wurde zur Überprüfung der Qualität der DNase I-verdauten RNA ein Aliquot auf ein 1 %iges TBE-Gel aufgetragen und eine Gelelektrophorese durchgeführt. Nach RNA-Konzentrationsmessung einer 1:50-Verdünnung mit dem Spektrophotometer erfolgte die cDNA-Erststrangsynthese aus 400 ng DNase I-verdauter RNA mit der Superscript™ II reversen Transkriptase und Verwendung von Random Primer Hexamers und RNaseOUT® entsprechend den Herstellerangaben.

#### **3.6.4.4.2 Real-Time-RT-PCR**

Ziel der quantitativen RT-PCR (qRT-PCR) ist es, aus der Menge an amplifiziertem PCR-Produkt auf die Transkriptionshäufigkeit bestimmter Gene zu schließen. Bei der Real-Time-RT-PCR können die PCR-Produkte direkt während ihrer Bildung erfasst werden. Verwendet wurde der DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I. Dieser Farbstoff lagert sich mit hoher Spezifität und Sensitivität in die kleine Furche doppelsträngiger DNA ein.

Stammlösungen der Plasmid-Standards wurden nach Linearisierung der Plasmide und Konzentrationsmessung mit einem Spektrophotometer bei 260 nm/280 nm durch Verdünnung der linearisierten Plasmide auf eine Millionen Moleküle pro µl hergestellt. Verwendet wurde das Plasmid pcDNA3-porcTRAIL sowie ein Plasmid mit Histon-2A, welches durch Klonierung des Histon-2A-PCR-Produkts in den TOPO TA-Klonierungsvektor entsprechend den Herstellerangaben hergestellt wurde.

Amplifikationsansätze (25 µl) für die qRT-PCR setzten sich aus 2 µl cDNA, 12,5 µl SYBR Green PCR Mix, 0,25 µl AmpErase®, 1,5 µl von sense- und antisense-Primer (gesamt je 300 nm) und 7,25 µl Aqua bidest. zusammen. Standards, unbekannte Proben und Negativkontrollen („non template control“) wurden als Triplikate pipettiert. Als genspezifische Primer wurden die Primer H2A se (sense) und H2A as (antisense) zur Amplifikation des Housekeeping-Gens Histon-2A und die Primer TRAIL #5se

(sense) und TRAIL #6rev (antisense) zum Nachweis von porciner TRAIL-Expression verwendet. Die Bedingungen für die qRT-PCR mit dem ABI PRISM™ 7700 Sequence Detector waren: Start 2 min bei 50°C für die Aktivierung der AmpErase® gefolgt von 10 min bei 95°C zur Denaturierung; Fortsetzung für 40 Zyklen mit 15 sec. bei 95°C, 30 sec. bei 60°C und 30 sec. bei 72°C. Zur Überprüfung der Spezifität der Amplifikate und um die Bildung von Primerdimeren auszuschließen erfolgte im Anschluss an die qRT-PCR die Auftrennung der Amplifikate durch Agarosegelelektrophorese.

Die Standardkurve wurde durch die Verwendung von Stammlösungen der Plasmidstandards und sechs seriellen Verdünnungen (1:5) erhalten. Dadurch wurde je eine Kopienzahl von 1 Millionen bis 320 Kopien pro Reaktionsansatz eingesetzt. Daten über die absolute und relative Häufigkeit des Vorkommens von porciner TRAIL-mRNA wurden unter Berücksichtigung der PCR-Amplifikationseffizienz und Normalisierung auf Histon-2A-mRNA als interne Referenz erhalten.

### 3.6.4.5 Northern-Blot

#### 3.6.4.5.1 Formaldehyd-Gelelektrophorese

Formaldehyd-Gele (150 ml Gesamtvolumen) wurden in einem 250 ml Erlenmeyer-Kolben wie folgt angesetzt:

<b>Formaldehyd-Gel</b>	Agarose	1,5 g
	Aqua bidest.	111 ml
	10x MOPS	15 ml
	37 % Formaldehyd-Lösung	24,3 ml
	1 % Ethidiumbromid	1,5 µl

Agarose und Aqua bidest. wurden zusammen gekocht, bis die Lösung klar war, anschließend wurden die weiteren Komponenten zugefügt. Das Gel wurde in die vorbereitete Gelkammer gegossen und mindestens eine Stunde unter dem Abzug polymerisieren gelassen.

10 µg Gesamt-RNA wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mit dem 1,7fachen Volumenanteil mit RNA-Ladepuffer und 3 µl 6x Ladepuffer (MBI) gemischt.

10 µg Gesamt-RNA	x µl
0,1 % DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 7 µl
1,7fache an RNA-Ladepuffer	11,9 µl
6x Loading dye (MBI)	3 µl

Die Proben wurden 20 min bei 70°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Vor dem Beladen der Geltaschen wurden die Deckelkondensate kurz abzentrifugiert. Der Gellauf erfolgte 20 min bei 50 V, anschließend bei 120 V, bis die Bromphenolblau-Bande das Gelende erreicht hatte. Als Laufpuffer diente 1x MOPS.

#### **3.6.4.5.2 Transfer der RNA**

Nach Ende des Gellaufs wurde das Gel mit einem Lineal unter UV-Licht fotografiert, um die Positionen der 28S- und 18S-ribosomalen RNA-Banden festzustellen. Anschließend wurde das Gel kurz mit Aqua bidest. gewaschen, bevor es in einer Glasschale zuerst in der Waschlösung 1 und anschließend in der Waschlösung 2 für jeweils 40 min bei RT auf einem Horizontalschüttler geschwenkt wurde.

Der Blotaufbau und die Behandlung der Nylonmembran (Biodyne A<sup>®</sup>) nach Blotabbau erfolgte wie beim Southern-Blot (Abschnitt 3.6.3.2.3.3) beschrieben. Der Transferpuffer (Northern Blot) (pH 6,5) wurde nach Blotabbau zum kurzzeitigen Schwenken der Membran verwendet.

#### **3.6.4.5.3 Radioaktive Markierung der Sonde, Hybridisierung, Waschen und Signaldetektion**

Die radioaktive Markierung der Sonde, die Hybridisierung, das Waschen und die Signaldetektion erfolgte wie in den Abschnitten 3.6.3.2.5 und 3.6.3.2.6 beschrieben. Die Hybridisierungszeit betrug beim Northern-Blot zwei Stunden bei 65°C.

#### 3.6.4.5.4 *Strippen der Membran*

Das Strippen der Membran erfolgte wie im Abschnitt 3.6.3.2.7 beschrieben.

#### 3.6.5 RACE der porcinen TRAIL-cDNA

Das Ziel der RACE (rapid amplification of cDNA ends) ist es, durch den Einsatz von genspezifischen Primern das vollständige 5'- beziehungsweise 3'-Ende einer nur zum Teil bekannten cDNA-Sequenz eines Gens zu amplifizieren und zu isolieren. An eine RACE kann direkt eine Klonierung und Sequenzierung angeschlossen werden. Als Ausgangsmaterial für die RACE diente Gesamt-RNA.

Als Vorarbeit für die RACE wurde ein Teil der gesuchten cDNA des porcinen TRAIL durch Primerauswahl nach Vergleich mit den bekannten cDNA-Sequenzen von Homo sapiens (DDBJ/EMBL/GenBank Datenbankzugriffsnummer U37518), Mus musculus (U37522) und Rattus norvegicus (AY115578) und RT-PCR [mit den Primern TRAIL #4 se (sense) und TRAIL867rev (antisense) sowie TRAIL#7 se (sense) und TRAIL #6 rev (antisense)] erhalten. Die nach Sequenzierung der mit dem High Pure PCR Purification Kit<sup>®</sup> aufgereinigten RT-PCR-Produkte erhaltene cDNA-Sequenz war die Grundlage für die weitere Primerauswahl für die RACE.

##### 3.6.5.1 5'-RACE der porcinen TRAIL-cDNA

5 µg RNA wurden mit einem genspezifischen Primer 1 (TRAIL #6 rev) und der Superscript<sup>™</sup> II reversen Transkriptase wie folgt in Erststrang-cDNA umgeschrieben:

##### *Primerbindung an die RNA*

Gesamt-RNA	x µl (= 5 µg)
Genspezifischer Primer 1 (20 µM)	0,5 µl
0,1 % DEPC-H <sub>2</sub> O	Ad 8 µl
	-> 10 min, 70°C
	-> auf Eis stellen

*reverse Transkription*

5x Erststrangpuffer	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNase-Inhibitor (RNase OUT™; 40 U/µl)	1 µl
dNTPs (je 2,5 mM)	1 µl
Superscript™ II reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl
	-> 10 min, 37°C
	-> 80 min, 42°C
	-> 5 min, 95°C

Es erfolgte dann der Verdau des RNA-Strangs mit 0,5 µl RNase H (20 U/µl) und 1 µl RNase A (0,2 U/µl) bei 37°C für 30 min. Anschließend wurden die nicht gebundenen Primer und dNTPs mit dem High Pure PCR Purification Kit® entsprechend den Herstellerangaben von der cDNA über Säulchen abgetrennt. Die aufgereinigte Erststrang-cDNA wurde mit 30 µl Elutionslösung eluiert und auf Eis gestellt. Das Tailen, d.h. das Anhängen eines PolyA-Schwanzes an die Erststrang-cDNA mit TdT (terminale Deoxynucleotidyl-Transferase), wurde direkt anschließend wie folgt durchgeführt:

*Tailen*

Erststrang-cDNA	28 µl
10x Puffer (Qiagen)	1,6 µl (-> = 0,5 x)
dATP (2 mM)	2,5 µl
TdT (15 U/µl)	1 µl
	-> 15 min, 37°C
	-> 15 min, 65°C

Anschließend wurde eine PCR mit dem Tailing-Produkt, dem genspezifischen Primer 2 (TRAIL #13 rev) und dem Adapter-Primer AdT20 mit der Qiagen Taq Polymerase® in einem Reaktionsansatz von 50 µl wie folgt durchgeführt:

Aqua bidest.	23,13	µl
Q-Solution (Qiagen)	10	µl
10x Puffer (Qiagen)	5	µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM) (Qiagen)	3,13	µl
dNTPs (1 mM)	2,5	µl
genspezifischer Primer 2 (20 µM)	0,5	µl
Adapter-Primer AdT20 (20 µM)	0,5	µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,25	µl
Tailing-Produkt	5	µl

Dazu wurde das Gerät Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 9700 mit folgendem Programm verwendet:

Denaturierung	92 °C	4 min	
Denaturierung	90 °C	2 min	
Annealing	55 °C	30 sec	
Extension	72 °C	20 min	
Denaturierung	94 °C	30 sec	30 Zyklen
Annealing	55 °C	30 sec	
Extension	72 °C	2 min	
finale Extension	72 °C	10 min	

Mit 5 µl des PCR-Produkts wurde mit dem genspezifischen Primer 3 (TRAIL #12 rev) und dem Adapter-Primer Ad mit der Qiagen Taq Polymerase<sup>®</sup> in einem Reaktionsansatz von 50 µl eine nested-PCR wie folgt durchgeführt:

Aqua bidest.	22,13	µl	Die nested-PCR wurde in dem Gerät Gene Amp <sup>®</sup> PCR System 9700 mit folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung 5 min bei 94°C, gefolgt von 30 Zyklen mit 5 min bei 94°C, 30 sec. bei 55°C und 1 min bei 72°C und zum Abschluss 10 min bei 72°C.
Q-Solution (Qiagen)	10	µl	
10x Puffer (Qiagen)	5	µl	
MgCl <sub>2</sub> (50 mM) (Qiagen)	3,13	µl	
dNTPs (1 mM)	2,5	µl	
genspezifischer Primer 3 (20 µM)	1	µl	
Adapter-Primer Ad (20 µM)	1	µl	
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,25	µl	
Tailing-Produkt	5	µl	

Anschließend wurden je 3 µl der PCR-Produkte auf ein 1,5 %iges TBE-Gel aufgetragen und eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. War bei der aufgetragenen PCR-Probe eine Einzelbande zu sehen und entsprach diese der zu erwartenden bp-Länge, so wurden aus dem verbliebenen, nicht auf das Gel aufgetragene PCR-Produkt mit dem High Pure PCR Purification Kit® entsprechend den Herstellerangaben die nicht gebundenen Primer und dNTPs abgetrennt und somit das 5'-RACE-Fragment zur nachfolgenden TOPO TA-Klonierung und Sequenzierung vorbereitet. Andernfalls erfolgte eine Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegel wie unter Abschnitt 3.6.1.2 beschrieben.

### **3.6.5.2 3'-RACE der porcinen TRAIL-cDNA**

Die Isolierung des 3'-Endes der porcinen TRAIL-cDNA-Sequenz erfolgte mit dem SMART™ RACE cDNA Amplification Kit entsprechend den Herstellerangaben. Der Primer TRAIL #5 se wurde als genspezifischer Primer verwendet.

### **3.6.5.3 TOPO TA-Klonierung und Sequenzierung**

Die aus RACE erhaltenen Fragmente wurden in den TOPO TA-Vektor entsprechend den Herstellerangaben hineinkloniert. Die Sequenzierungen erfolgten durch den Sequenzierservice des Genzentrums (AG Blum). Als Primer für die Sequenzierung der porcinen TRAIL-cDNA wurden folgende Oligonukleotide eingesetzt: TRAIL867 rev, TRAIL #4 se, TRAIL #5 se, TRAIL #6 rev, TRAIL #8 rev, TRAIL #9 rev, TRAIL #10 se, TRAIL #11 rev, TRAIL #12 rev, TRAIL #13 rev, TRAIL #14 se, TR #15 rev und TRAIL #16 se.

## **3.6.6 Untersuchung der Genexpression auf Protein-Ebene**

### **3.6.6.1 Protein-Isolierung aus Zellen und Gewebe**

#### **3.6.6.1.1 Gesamtlysat**

20 mg von bei -80°C gelagerten Gewebeproben wurden in 12 ml Plastikröhrchen überführt und nach Zugabe von 500 µl Proteinextraktionspuffer mit einem Gewebe-Homogenisator (ART-Mirco D8) auf Position D (23.500 rpm) für 1 bis 2 min auf Eis

homogenisiert. Nach jeder Probe wurde der Homogenisator-Stab mit Aqua bidest. und 1x PBS gereinigt. Die homogenisierten Proben wurden auf Eis gestellt, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, 5 min bei 95°C inkubiert und auf Eis gestellt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 15.000 g und 4°C wurden die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt. Zusätzlich wurden 10 µl für die Proteinkonzentrationsbestimmung aliquotiert. Die Proteinproben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Proteinisolierung aus adhärennten Zellen erfolgte nach zweimaligem Waschen mit PBS durch direkte Zugabe von Proteinextraktionspuffer auf die Zellkulturschale. Bei in Suspension wachsenden Zellen erfolgte die Zugabe des Proteinextraktionspuffers auf das Zellpellet nach einmaligem Waschen mit PBS. Der Proteinextraktionspuffer enthält SDS und dies führt zu einer Freisetzung von genomischer DNA durch Kernmembranlyse. Die Zerkleinerung der genomischen DNA erfolgte durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer Pipettenspitze und anschließende Verwendung von QIAshredder® entsprechend den Herstellerangaben.

Musste eine Kernmembranlyse und somit Freisetzung genomischer DNA bei der Proteinisolierung von Zellen vermieden werden, erfolgte die Verwendung von Proteinlysepuffer mit Iodacetamid. Dieser enthielt anstelle von SDS NP-40, wodurch weitgehend eine Kernmembranlyse verhindert wurde. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen mit dem Proteinlysepuffer gemischt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein fünfzehnminütiger Zentrifugationsschritt bei 8000 g und 4°C. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### **3.6.6.1.2 Zellmembran- und Zytoplasmafraktion aus Gewebe**

200 mg von bei -80°C gelagertem Gewebe wurde im durchgehend gefrorenen Zustand mit einem vorgekühlten Mörser und Pistill zu einem feinen Pulver verrieben. Gegebenenfalls wurde flüssiger Stickstoff zum erneuten Tiefgefrieren der Probe verwendet. Ergab sich keine weitere Konsistenzänderung des zermörserten Gewebes, wurde die Probe auf RT erwärmt und 3 ml Swelling-Puffer zugegeben. Nach Herstellung einer homogenen Lösung wurde diese in ein 12 ml Plastikröhrchen

überführt und 10 min bei RT und 400 g zentrifugiert (Pelletierung der Kerne). Der Überstand wurde in ein „Beckman Tube“ (Nr. 358119, 13x51 mm) überführt. Nach Austarierung der einzelnen Zentrifugenröhrchen wurde der Rotor (SW55 TI) in die Ultrazentrifuge eingesetzt und die Zellmembranen bei 4°C und 150.000 g in 30 min pelletiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen (Zytoplasmafraktion) und das Pellet in 80 bis 150 µl Proteinextraktionspuffer resuspendiert (Membranfraktion). Das weitere Vorgehen erfolgte wie im Abschnitt 3.6.6.1.1 beschrieben.

### **3.6.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay**

Das Prinzip der Proteinbestimmung mit BCA beruht darauf, dass Bicinchoninsäure als wasserlösliches Natriumsalz sehr sensitiv, spezifisch und stabil mit  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen reagiert. Man macht sich hier die Biuret-Reaktion der Proteine zunutze, die  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  reduzieren. Der entstehende BCA- $\text{Cu}^{1+}$ -Komplex ist stabil und wasserlöslich und zeigt eine starke Absorption bei 562 nm. Proteine in wässrigen Lösungen können daher bei 562 nm im Spektrophotometer mit dieser Methode quantifiziert werden. Proteinmessungen erfolgten in 96-well-F-Platten. Proben (je 10 µl) wurden in PBS (je 40 µl) in 1,5 ml Reaktionsgefäßen verdünnt. Aus einer Stocklösung von BSA wurde eine Verdünnungsreihe in PBS/Extraktionspuffer (4:1) mit sechs Standards (je 50 µl) in 1,5 ml Reaktionsgefäßen hergestellt. Bicinchoninsäure wurde mit 4 %iger  $\text{CuSO}_4$ -Lösung (50:1) gemischt und 200 µl dieser Lösung wurde in jedes Reaktionsgefäß gegeben. Nach kurzem Mischen wurden von jeder Probe und den Standards zweimal je 100 µl in eine 96-well-Platte pipettiert. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei 562 nm gemessen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte anhand der gemessenen Eichgerade.

### **3.6.6.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Das Prinzip der von Laemmli (1970) beschriebenen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) basiert auf der Trennung der Proteine durch den Molekularsieb-Effekt einer polymerisierten Gelmatrix aus Acrylamid und N,N'-Bisacrylamid. Unabhängig von der Proteinextraktionsmethode enthält die für die Gelelektrophorese vorbereitete denaturierte Proteinlösung SDS. Die SDS-Anionen

binden mit ihrer hydrophoben Region an ungefähr jeden zweiten Aminosäurerest. Durch die sich gegenseitig abstoßenden negativen Ladungen der SDS-Moleküle werden die Proteine langgestreckt, und ihre Eigenladung wird kompensiert. So entsteht ein stark negativ geladener Komplex, dessen Laufgeschwindigkeit im Gel sich zur Masse des Proteins proportional verhält. Durch Anlegen einer Spannung kann das Proteingemisch getrennt werden, da kleine Proteine schneller als große zur Anode wandern. Die Auftrennung der Proteine erfolgt in zwei Schritten. Zuerst laufen die zu trennenden Proben durch ein grobporiges Sammelgel mit niedriger Acrylamidkonzentration, um sie auf einen möglichst engen Bereich zu fokussieren. Anschließend werden die Proteine entsprechend ihrer Größe in einem Trenngel mit höherer Acrylamidkonzentration aufgetrennt.

Die SDS-PAGE-Untersuchungen wurden mit dem Miniprotean II- bzw. Miniprotean III-System nach der Methode von Laemmli durchgeführt. Nach Gießen der Trenngel in die entsprechend vorbereiteten Minigel-Glasplatten wurden diese mit Aqua bidest. vorsichtig überschichtet. Nach Polymerisierung über Nacht, mindestens jedoch für 60 min, wurde das Aqua bidest. vollständig entfernt und das Trenngel mit einem 5 %igen Sammelgel überschichtet. Die Kämme wurden in das flüssige Sammelgel gesteckt. Nach mindestens 60 minütiger Polymerisation des Sammelgels bei RT erfolgte die Durchführung der SDS-PAGE.

#### Zusammensetzung des Trenngels (12 %, 4 Gele)

8 ml	Aqua bidest.
6 ml	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
9,6 ml	30 % Acrylamid/Bis Solution (29:1)
240 µl	10 % SDS
12 µl	Temed
120 µl	10 % APS

#### Zusammensetzung des Sammelgels (4 Gele)

7 ml	Aqua bidest.
1,25 ml	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
1,5 ml	30 % Acrylamid/Bis Solution (29:1)
100 µl	10 % SDS
5 µl	Temed
100 µl	10 % APS

Nach Zusammenbau des Miniprotean Systems und Befüllen mit 1x SDS-PAGE-Laufpuffer wurden nach Ziehen der Kämme die Geltaschen zunächst mit Laufpuffer gespült. Dies diente zur Entfernung von nicht polymerisierten Acrylamidresten. Vor Probenauftrag erfolgte die Probenvorbereitung für 5 min bei 95°C, anschließendes Abkühlen auf Eis und Herunterzentrifugieren von Deckelkondensat. Wurde das Proteinlysate nicht mit Proteinextraktionspuffer (1x Laemmli) isoliert, so erfolgte vor der Probenvorbereitung die Zugabe von einem Fünftel Volumenanteil von 5x Laemmli-Puffer. Es wurde jeweils ein Proteinmolekulargewichtsmarker auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte im Miniprotean II-System zunächst bei 100 V bis zum Erreichen des Trenngels, anschließend bei 160 V. Beim Miniprotean III-System erfolgte der Gellauf entsprechend bei 80 V und 130 V.

#### **3.6.6.4 „Semi-dry-blot“ Verfahren**

Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurden die Proteine vom SDS-Polyacrylamidgel auf eine proteinbindende Immobilon P-PVDF-Membran elektrophoretisch transferiert. Dies erfolgte mit dem „Semi-dry-blot“ Verfahren unter Verwendung des Milliblot-Graphit Elektroblotters (Millipore). Als Vorbereitung wurden je Gel zwölf Gel-Blotting-Papiere (GB002) und eine PVDF-Membran auf die entsprechende Größe zurechtgeschnitten. Zur Benetzung der Membran wurde diese für 10 min in 100 %igem Methanol und anschließend zur Equilibrierung 30 min im Transferpuffer geschwenkt. Der Blot wurde luftblasenfrei unter „semi-dry“ Bedingungen auf die untere Graphit-Bloteinheit (Anode) wie folgt aufgebaut:

##### Blot-Sandwich (Angaben für einen Blot):

- sechs Lagen in Transferpuffer getränktes Gel-Blotting-Papier
- PVDF-Membran, mit Kugelschreiber beschriftet
- Gel
- sechs Lagen in Transferpuffer getränktes Gel-Blotting-Papier

Anschließend wurde die obere Graphit-Bloteinheit (Kathode) unter leichtem Druck aufgebracht. Die Proteine wurden mit 1 mA/cm<sup>2</sup> für 90 min auf die Membran transferiert. Der Proteintransfer (negativ geladen) erfolgte von der Kathode in Richtung Anode. Nach Beendigung des Transfers erfolgte die reversible Anfärbung

der auf der PVDF-Membran gebundenen Proteine mit Ponceau S-Lösung für 2 bis 5 min und anschließende Entfärbung des Hintergrunds durch Waschen mit Aqua dest. Nach Trocknen der Membran auf einem saugfähigen Gel-Blotting-Papier wurden die Molekulargewichtsmarker mit Kugelschreiber auf dem Blot markiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Membran trocken bei 4°C gelagert.

### **3.6.6.5 Western-Immunoblot**

Der Western-Immunoblot diente dem spezifischen Nachweis von Proteinen über Antigen-Antikörper-Kopplung. Nach Überführen der PVDF-Membran in ein 50 ml Plastikröhrchen erfolgte die Blockierung der Membran mit TBS-T-Milch (3 %) für 60 min bei RT im Hybridisierungssofen. Dadurch wurden überschüssige Proteinbindungsstellen der Membran saturiert und eine unspezifische Bindung der Nachweisreagenzien verhindert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS-T (0,1 %) bei RT (1x 15 min und 2x 5 min) erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper, verdünnt in TBS-T-Milch (3 %), über Nacht bei 4°C. Es folgten drei Waschvorgänge bei RT mit TBS-T (0,1 %) für 1x 15 min und 2x 5 min und die Zugabe des zweiten, Peroxidase-konjugierten Antikörpers ebenfalls in TBS-T-Milch (3 %) für 90 min bei RT. Abschließend folgten drei Waschvorgänge bei RT mit TBS-T (0,1 %) für 1x 15 min und 2x 5 min und Signaldetektion unter Verwendung einer ECL (Enhanced chemiluminescence)-Detektionslösung und Hyperfilm ECL entsprechend den Herstellerangaben.

### **3.6.6.6 Strippen der Membran**

Um die Membran für weitere Western-Immunoblots verwenden zu können, wurden die gebundenen Antikörper vor der erneuten Verwendung vom Blot eluiert. Hierzu wurde die Blotmembran in ein Hybridisierungsröhrchen überführt, kurz in TBS-T (0,1 %) geschwenkt und anschließend in Elutionspuffer für 60 min bei 70°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Die Membran wurde dann bei RT zweimal 10 min mit Aqua bidest. und anschließend einmal 10 min mit TBS-T (0,1 %) in jeweils großen Volumina gewaschen. Für einen erneuten Immunoblot wurde die Membran in ein neues 50 ml Plastikröhrchen überführt.

### **3.6.7 Methoden der Zellkultur**

#### **3.6.7.1 Kultivierung der Zellen**

Die Kultivierung aller in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurde in einem Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit in Gewebekulturflaschen oder -schalen durchgeführt. Ein Wechsel des Kulturmediums fand im Abstand von zwei bis drei Tagen statt, indem bei adhärennten Zellen das alte Medium durch Absaugen entfernt wurde und neues Medium in der entsprechenden Menge zugegeben wurde. Bei in Suspension wachsenden Zellen erfolgte zunächst die Pelletierung der Zellen durch fünfminütige Zentrifugation bei 300 g und anschließende Resuspension in neuem Medium. Um Kontaminationen der Zellen zu vermeiden, wurden alle Arbeiten in der Zellkultur unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank durchgeführt.

#### **3.6.7.2 Auftauen von Zellen**

Kryokonservierte Zellen wurden durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren mit auf 37°C erwärmtem Medium zügig aufgetaut. Nach zweimaligem Waschen in Medium zum Entfernen des im Einfriermedium enthaltenen DMSO wurde das Zellpellet in neuem Medium aufgenommen und die Zellen in Kulturgefäße überführt.

#### **3.6.7.3 Kryokonservieren von Zellen**

##### **3.6.7.3.1 Adhärennte Zellen**

Bei etwa 90 % Konfluenz wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 2x Trypsin-EDTA bei 37°C inkubiert. Die Zeitdauer der Trypsinierung war abhängig von den behandelten Zellen. Bei beginnender Ablösung und Vereinzelung der Zellen von der Kulturschale wurde die Trypsinierungsreaktion durch Zugabe der vierfachen Menge an serumhaltigem Medium gestoppt und die Zellen nach Vereinzelung durch Pipettieren 5 min bei 300 g pelletiert. In 1,8 ml Kryogefäßen (Nunc) wurden 100 µl DMSO vorgelegt. Das Zellpellet wurde in je 900 µl FKS pro Portion resuspendiert und mit dem vorgelegten DMSO zügig vermischt. Die Kryogefäße wurden sofort auf Trockeneis und anschließend bei –80°C für mindestens 24 Std. gelagert, ehe sie zur weiteren Lagerung in Flüssigstickstoff überführt wurden.

### **3.6.7.3.2 In Suspension wachsende Zellen**

Zellen, die in Suspension wuchsen, wurden in einer Dichte von  $10^7$  Zellen/ml in einem Gesamtvolumen von 1 ml beziehungsweise 1,5 ml in 1,8 ml Kryogefäßen eingefroren. Das Einfriermedium der PBL (periphere Blutlymphozyten) setzte sich aus 70 % Medium, 20 % FKS und 10 % DMSO, das der Jurkat-Zellen aus 90 % FKS und 10 % DMSO zusammen.

### **3.6.7.4 Transfektion von Zellen**

Die transiente Transfektion von Zellen erfolgte über Elektroporation in 0,4 cm Küvetten mit dem Gene Pulser<sup>®</sup> II Elektroporationssystem. Hierzu wurden je Ansatz folgende Mengen an proliferierenden Zellen verwendet:

- $10^7$  HEK293T-Zellen in 400  $\mu$ l DMEM / 10 % FKS
- $2 \times 10^6$  PM86-Zellen in 400  $\mu$ l PBS / 10 % FKS

Die Elektroporation wurde wie folgt durchgeführt:

- HEK293T-Zellen: 220 V und 950  $\mu$ F
- PM86-Zellen: 280 V und 950  $\mu$ F

Nach Elektroporation der Zellen mit 20  $\mu$ g Plasmid-DNA wurden die Zellen nach einer zehnmütigen Ruhephase zweimal mit Kulturmedium gewaschen, bevor sie in 100 mm-Schalen überführt wurden. Ein Mediumswechsel erfolgte nach 24 Stunden.

Die Transfektion der Zellen mit pcDNA3-GFP diente als Kontrolle der Transfektionseffizienz.

### **3.6.7.5 Zellisolierung**

#### **3.6.7.5.1 Porcine Hautfibroblasten**

Hautgewebstücke wurden nach Oberflächendesinfektion mit 70 %igem Ethanol mit einer Hautstanze am sedierten Schwein entnommen bzw. von Feten nach Entnahme aus dem Uterus und den Fruchthäuten gewonnen. Die Proben wurden in Transportmedium (PBS + 1 % Penicillin/Streptomycin) überführt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Unter der Reinraumwerkbank wurden die Hautstücke

mehrmals mit PBS gewaschen und dabei mögliche Kontaminanten, wie z.B. Hautoberfläche und Haare beim postnatalen Schwein, entfernt. Anschließend wurden sie in 1 bis 2 ml 2x Trypsin/EDTA-Lösung mit Skalpell oder Schere möglichst gut zerkleinert und gründlich durchmischt. Die Inkubation der Gewebestücke in der Trypsin/EDTA-Lösung erfolgte im Brutschrank bei 37°C. Die Dauer der Trypsin-Behandlung wurde durch mikroskopische Überwachung festgestellt. Durch Zugabe der vierfachen Menge an serumhaltigem Kulturmedium wurde die Reaktion gestoppt, die Zell- und Gewebesuspension in ein 12 ml-Röhrchen überführt und 2 min bei RT zur Sedimentation der größeren Gewebestückchen stehen gelassen. Anschließend wurde der Überstand in ein neues 12 ml-Röhrchen überführt und beide Röhrchen auf ein Gesamtvolumen von jeweils 10 ml mit Kulturmedium aufgefüllt. Nach Zentrifugation für 4 min bei 300 g wurden die Zell- und Gewebepellets in neues Kulturmedium aufgenommen und in 60 mm beziehungsweise 100 mm Gewebekulturschalen überführt. Der erste Mediumwechsel erfolgte frühestens nach 24 Stunden, spätestens am dritten Tag.

#### ***3.6.7.5.2 PBL-Isolierung mittels Ficoll-Gradienten aus heparinisiertem Schweineblut***

Um aus frischem heparinisiertem Vollblut die mononukleären Zellen (PBL) zu isolieren, wurden 15 ml Ficoll-Lösung, Dichte 1,077 (PANcoll®) in 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 25 ml Blut (1:1 mit PBS verdünnt) vorsichtig überschichtet. Bei der Dichtegradientenzentrifugation bei 1.000 g, 30 min, ohne Bremse, sammelten sich die lebenden mononukleären Zellen in der Interphase an, von der sie abpipettiert und zweimal mit großen Volumina an PBS zwecks Entfernung von Ficoll-Lösung und von Thrombozyten gewaschen wurden. Abschließend wurden die isolierten PBL mit einer Zelldichte von  $10^6$  Zellen pro ml Medium in eine Zellkulturflasche überführt und diese vor einer weiteren Verwendung der Zellen für mindestens 12 Stunden senkrecht stehend in den Brutschrank gestellt.

### 3.6.7.6 PBL-Stimulation

Die direkte Stimulation der mononukleären Zellen erfolgte für zwei bis vier Tage bei einer Zelldichte von  $10^6$  PBL/ml mit ConA (2  $\mu$ g/ml), PHA (5  $\mu$ g/ml) oder rekombinantem porcinen IFN- $\gamma$  (8 ng/ml).

Zur Stimulierung von H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-transgenen porcinen PBL mit porcinen Zytokinen wurden PBL von einem Wildtyp-Schwein für zwei Tage bei einer Zelldichte von  $10^6$  PBL/ml mit ConA (2  $\mu$ g/ml) beziehungsweise PHA (5  $\mu$ g/ml) stimuliert. Anschließend wurde nach Zentrifugation der Wildtyp-PBL das Medium abpipettiert, mit dem gleichen Volumenanteil an frischem Medium verdünnt und zur Kultivierung von transgenen PBL bei einer Zellkonzentration von  $10^6$  PBL/ml für zwei bis vier Tage verwendet.

### 3.6.7.7 Apoptoseassay

Transient transfizierte HEK293T-Zellen dienten beim Apoptoseassay als Effektorzellen bei der Kokultur mit TRAIL-sensitiven Jurkat RJP<sup>+</sup>-Zellen.

Nach transienter Transfektion von jeweils  $1,4 \times 10^7$  HEK293T-Zellen mit dem pcDNA3- bzw. pcDNA3-huTRAIL-Vektor und Aussähen auf eine 100 mm Zellkulturschale wurde am folgenden Tag ein Mediumwechsel durchgeführt. Bei einer Konfluenz von etwa 70 % (i.d.R. zwei Tage nach Elektroporation) wurde die Kokultur mit je  $10^7$  Jurkat RJP<sup>+</sup>-Zellen angesetzt. Nach einer Kokultivierungsdauer von 24 Stunden wurden die Effektorzellen vorsichtig abgenommen, mit dem Annexin V-FITC apoptosis detection kit I entsprechend den Herstellerangaben mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid (PI) gefärbt und der Anteil an apoptotischen Zellen mit dem FACS Calibur gemessen. Annexin V bindet an Phosphatidylinositol und ist ein Marker für die frühe Apoptose. Dagegen bindet Propidiumiodid an die DNA im Zellkern. PI-positive Zellen weisen daher auf eine Nekrose oder ein spätes Apoptoseereignis dieser Zellen hin. Die Grundeinstellung der Fluoreszenzkanäle 1 und 3 am FACS Calibur erfolgte mit Camptothecin-behandelten Jurkat RJP<sup>+</sup>-Zellen entsprechend den Herstellerangaben.

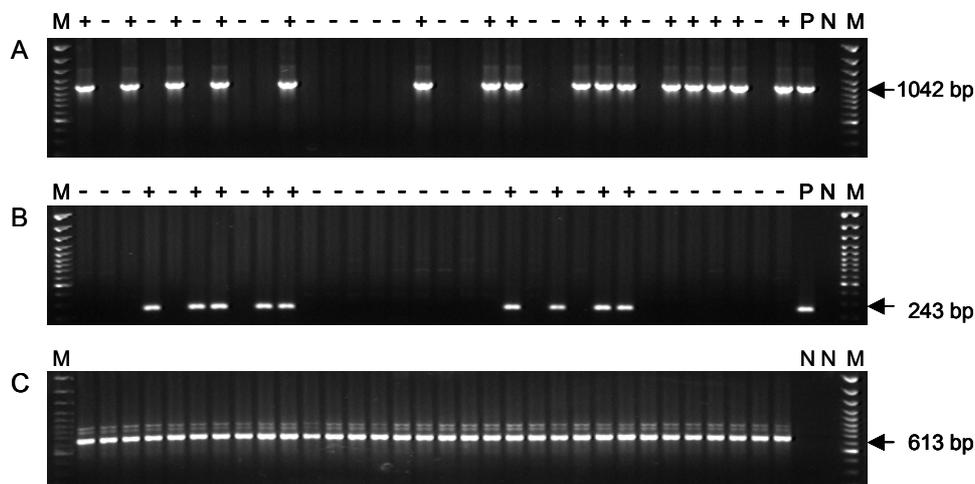
Der Assay wurde auch mit porcinen Hautfibroblasten als Effektorzellen durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 $\alpha$ MHC-GLVPc-polyA- und TK-porcTGF $\beta$ 1-transgene Mäuse

#### 4.1.1 Identifizierung und Charakterisierung transgener Mäuse

Es wurden zwei  $\alpha$ MHC-GLVPc-polyA-transgene (MHC-tg) Mauslinien (L6 und L8) und drei TK-porcTGF $\beta$ 1-transgene (TGF-tg) Mauslinien (L3, L4 und L5) von Dr. Robert Endres (Institut für Medizinische Mikrobiologie, TU München) übernommen. Bei zwei der drei TGF-tg Linien (L3 und L5) wurde durch PCR-Analysen die Integration des ersten Drittels, nicht jedoch die des vollständigen TK-porcTGF $\beta$ 1-Konstrukts nachgewiesen. In die SPF-Haltung wurden daher die MHC-tg Mauslinien 6 und 8 und die TGF-tg Mauslinie 4 mittels Embryotransfer überführt. Doppelt-transgene (dtg) Mäuse wurden durch Anpaarungen von MHC-tg mit TGF-tg Mäusen erhalten. Die Identifizierung transgener Mäuse erfolgte durch PCR-Analysen (Abbildung 4.1).



**Abb. 4.1: PCR-Analyse zur Identifizierung von MHC-tg und TGF-tg Mäusen**

Transgen-spezifische PCR-Analysen für (A)  $\alpha$ MHC-GLVPc-polyA und (B) TK-porcTGF $\beta$ 1. C: Als Kontrolle wurde für jede Probe eine PCR mit  $\beta$ -Aktin-spezifischen Primern durchgeführt. Die  $\beta$ -Aktin-Primer amplifizierten von genomischer DNA zusätzliche Fragmente von ca. 800 bp und 850 bp. Doppelt-transgene Mäuse sind transgen für  $\alpha$ MHC-GLVPc-polyA und TK-porcTGF $\beta$ 1, dagegen wurden bei nicht transgenen Mäusen in beiden Transgen-spezifischen PCR-Analysen keine Amplifikate detektiert. M: 100 bp-plus-Marker; +: transgen; -: nicht transgen für das untersuchte Transgen; P: Positiv-Kontrolle [Expressionsplasmid von  $\alpha$ MHC-GLVPc-polyA (A) bzw. TK-porcTGF $\beta$ 1 (B)]; N: Negativ-Kontrolle (Aqua bidest.).

Die Genotypisierung der Mäuse aus Schwanzspitzen-DNA erfolgte im Alter von ca. vier Wochen (Tabelle 4.1). Aus Anpaarungen von TGF-tg Vatertier (L4) mit MHC-tg Muttertier (L6 oder L8) wurden keine lebenden dtg Nachkommen identifiziert. Dagegen befand sich unter den Nachkommen aus diesen Anpaarungen ein großer Anteil an dtg Tieren, die innerhalb der ersten vier Lebenswochen starben. Darüber hinaus waren die Wurfgrößen bei dieser Anpaarungskombination um durchschnittlich 1,6 Nachkommen gegenüber der Anpaarung von MHC-tg Vatertier (L6 oder L8) mit TGF-tg Muttertier (L4) kleiner. Bei letzterer Anpaarungskombination wurden lebende dtg Tiere identifiziert. Jedoch wurde auch hier ein hoher Anteil an dtg Tieren unter den in den ersten vier Lebenswochen verendeten Nachkommen festgestellt. Bei der Anpaarungskombination MHC-tg Vatertier mit TGF-tg Muttertier starben die Nachkommen vor der Genotypisierung im Alter von durchschnittlich 12 Tagen (n=20) [12,4 d bei L6/L4 (n=5); 11,9 d bei L8/L4 (n=15)], bei der anderen Anpaarungsvariante dagegen etwa fünf Tage früher mit durchschnittlich 7,1 Tagen (n=31) [5,6 d bei L6/L4 (n=12); 8,1 d bei L8/L4 (n=19)].

**Tabelle 4.1: Nachkommen aus Kreuzungen von MHC-tg mit TGF-tg Tieren**

A) Anpaarungskombination: Vatertier TGF-tg (L4), Muttertier MHC-tg (L6 oder L8);

V	M	Tiere/ Wurf	n	lebend				verendet				
				wt	MHC-tg	TGF-tg	dtg	wt	MHC-tg	TGF-tg	dtg	n.g.
L4	L6	7,7	69	21,7%	40,6%	20,3%	0%	0%	0%	0%	4,3%	13,0%
L4	L8	7,6	68	39,7%	10,3%	19,1%	0%	0%	0%	2,9%	13,2%	14,7%

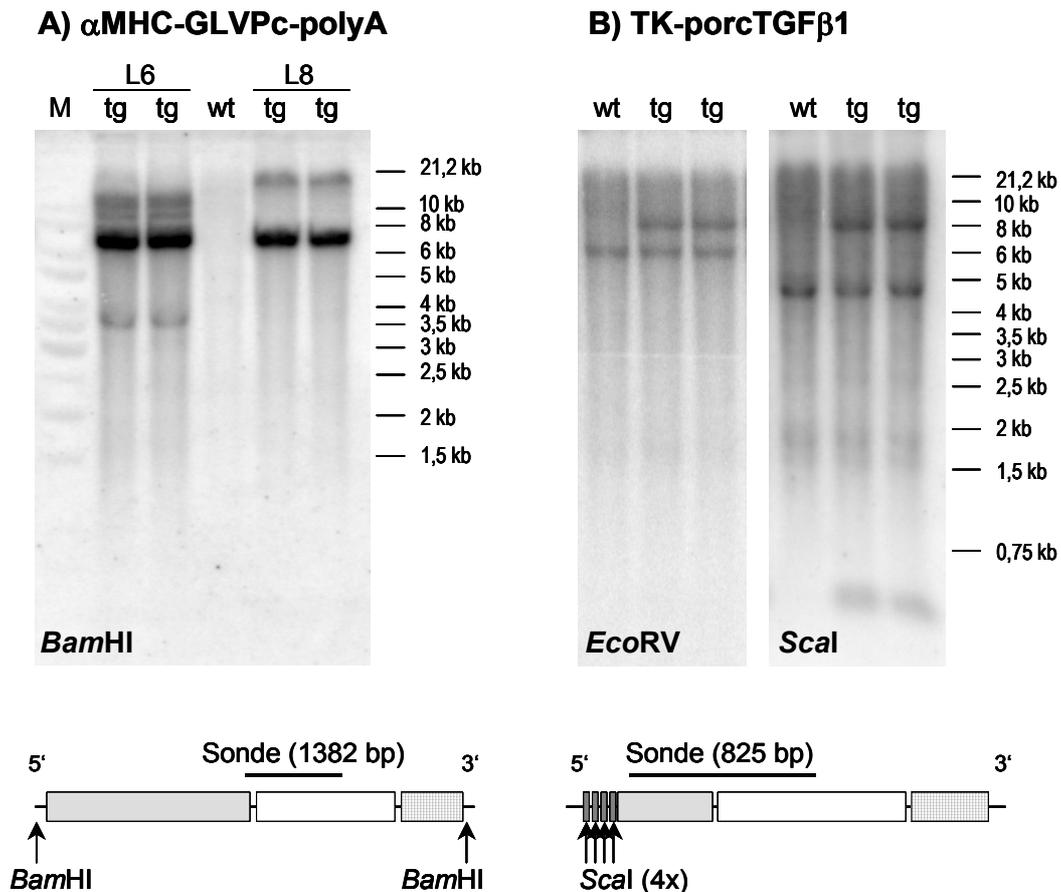
B) Anpaarungskombination: Vatertier MHC-tg (L6 oder L8), Muttertier TGF-tg (L4);

V	M	Tiere/ Wurf	n	lebend				verendet				
				wt	MHC-tg	TGF-tg	dtg	wt	MHC-tg	TGF-tg	dtg	n.g.
L6	L4	8,9	71	19,7%	28,2%	31%	12,7%	0%	0%	1,4%	2,8%	4,2%
L8	L4	9,5	104	24,0%	20,2%	20,2%	21,2%	0%	0%	0%	5,8%	8,7%

V: Vatertier; M: Muttertier; L4: TK-porcTGF $\beta$ 1-transgene Linie 4; L6, L8:  $\alpha$ MHC-GLVPc-polyA-transgene Linie 6 bzw. 8; n: Gesamtzahl der geborenen Tiere; lebend: lebende Tiere im Alter von vier Wochen; verendet: Tiere, die innerhalb der ersten vier Lebenswochen starben; wt: Wildtyp (nicht transgenes Tier); MHC-tg:  $\alpha$ MHC-GLVPc-polyA-transgene Tiere; TGF-tg: TK-porcTGF $\beta$ 1-transgene Tiere; dtg: doppelt-transgene Tiere; n.g.: nicht genotypisiert.

Mit Southern-Blot-Analysen wurde das genomische Integrationsmuster der  $\alpha$ MHC-GLVPc-polyA- und TK-porcTGF $\beta$ 1-Konstrukte in den transgenen Mauslinien untersucht (Abbildung 4.2). Mit einer Sonde für  $\alpha$ MHC-GLVPc-polyA, welche im Bereich der GLVPc-Kassette hybridisiert, wurde nach *Bam*HI-Verdau in beiden MHC-tg Linien eine etwa 7,5 kb große Bande detektiert (Abbildung 4.2 A). Diese entsprach der Größe des Mikroinjektionsfragments. Bei Tieren der Linie 6 wurden zwei weitere Banden im Bereich von etwa 11 kb und eine bei 3,5 kb nachgewiesen, bei der Linie 8 eine weitere Bande bei circa 20 kb. Da die Transgen-spezifische Bandenlänge nach *Bam*HI-Verdau der genomischen DNA mindestens der Größe des Mikroinjektionsfragments von 7,5 kb entsprechen muss, handelte es sich bei der 3,5 kb-Bande bei Tieren der MHC-tg Linie 6 vermutlich um ein unvollständiges Fragment des Mikroinjektionskonstrukts. Die Signalintensität der 7,5 kb-Bande war bei der Linie 6 stärker als bei der Linie 8. Bei Wildtyp-Mäusen wurde kein Signal detektiert.

Bei TGF-tg und Wildtyp-Mäusen wurde das Hybridisierungssignal des endogenen TGF- $\beta$ 1-Gens nach *Eco*RV-Verdau bei etwa 6 kb detektiert (Abbildung 4.2 B). Bei TGF-tg Tieren wurde zusätzlich eine ca. 8 kb große Bande nachgewiesen, deren Signalintensität in etwa der des endogenen TGF- $\beta$ 1-Signals entsprach. Nach *Scal*-Verdau wurden endogene TGF- $\beta$ 1-Banden bei etwa 4,5 kb, 1,7 kb und 1,6 kb detektiert. Transgen-spezifische Banden befanden sich bei ca. 8 kb und 0,5 kb. Unter Berücksichtigung des Schnittmusters von *Scal* (Schnittstellen bei 31, 50, 69 und 88 bp des TK-porcTGF $\beta$ 1-Mikroinjektionskonstrukts) dürfte es sich bei der 0,5 kb-Bande im *Scal*-Verdau bei der Linie 4 ebenfalls um ein unvollständiges Fragment des Mikroinjektionskonstrukts handeln.



**Abb. 4.2: Southern-Blot-Analysen von MHC-tg, TGF-tg und Wildtyp-Mäusen**

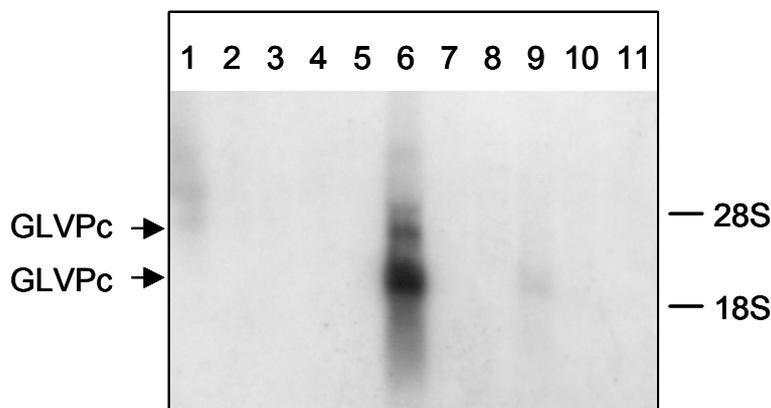
A) Southern-Blot-Analyse der MHC-tg Linien mit *Bam*HI-verdauter genomischer DNA und schematische Darstellung des  $\alpha$ MHC-GLVPc-polyA-Mikroinjektionsfragments. Die 7,5 kb große Bande entspricht der Länge der Expressionskassette. Die 3,5 kb-Bande der Linie 6 stellt ein unvollständiges Fragment des Mikroinjektionskonstrukts dar.

B) Southern-Blot-Analysen der TGF-tg Linie 4 und schematische Darstellung des TK-porcTGF $\beta$ 1-Mikroinjektionsfragments. Die Transgen-spezifische 0,5 kb-Bande der TGF-tg Linie 4 stellt ein unvollständiges Fragment des Mikroinjektionskonstrukts dar.

Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sowie Lage und Länge der verwendeten Sonde sind jeweils markiert. *Eco*RV hat innerhalb des TK-porcTGF $\beta$ 1-Konstrukts keine Schnittstelle. tg: transgenes Tier; wt: Wildtyp; M: 1 kb-DNA-Ladder.

### 4.1.2 Transgenexpression

Bei RT-PCR-Untersuchungen von MHC-tg Mäusen wurde die mRNA-Expression des chimären Transkriptionsfaktors GLVPc in allen untersuchten Organen [Haut, Zwerchfell, M. quadriceps, Ventrikelmyokard, Niere, Leber, Lunge, Milz, Großhirn, Stammhirn/Kleinhirn, Hoden (bei männlichen Tieren) bzw. Uterus (bei weiblichen Tieren)] nachgewiesen (Abbildung 4.4 C). Keine Expression wurde in Wildtyp-Mäusen detektiert (nicht gezeigt). Im Northern-Blot wurden eine starke Expression von Transgen-mRNA im Ventrikelmyokard und eine schwache Expression in der Lunge festgestellt (Abbildung 4.3). Tiere der Linien 6 und 8 exprimierten im Ventrikelmyokard etwa gleiche Mengen an mRNA des chimären Transkriptionsfaktors (nicht gezeigt). Es wurden keine Unterschiede in der Transgenexpression zwischen acht und 21 Wochen alten transgenen Tieren festgestellt (nicht gezeigt). Die Transgenexpression variierte zwischen den Tieren einer Linie unabhängig vom Alter geringgradig (nicht gezeigt).



**Abb. 4.3: Northern-Blot-Analyse der Transgenexpression in verschiedenen Organen eines acht Wochen alten MHC-tg Tieres der Linie 8**

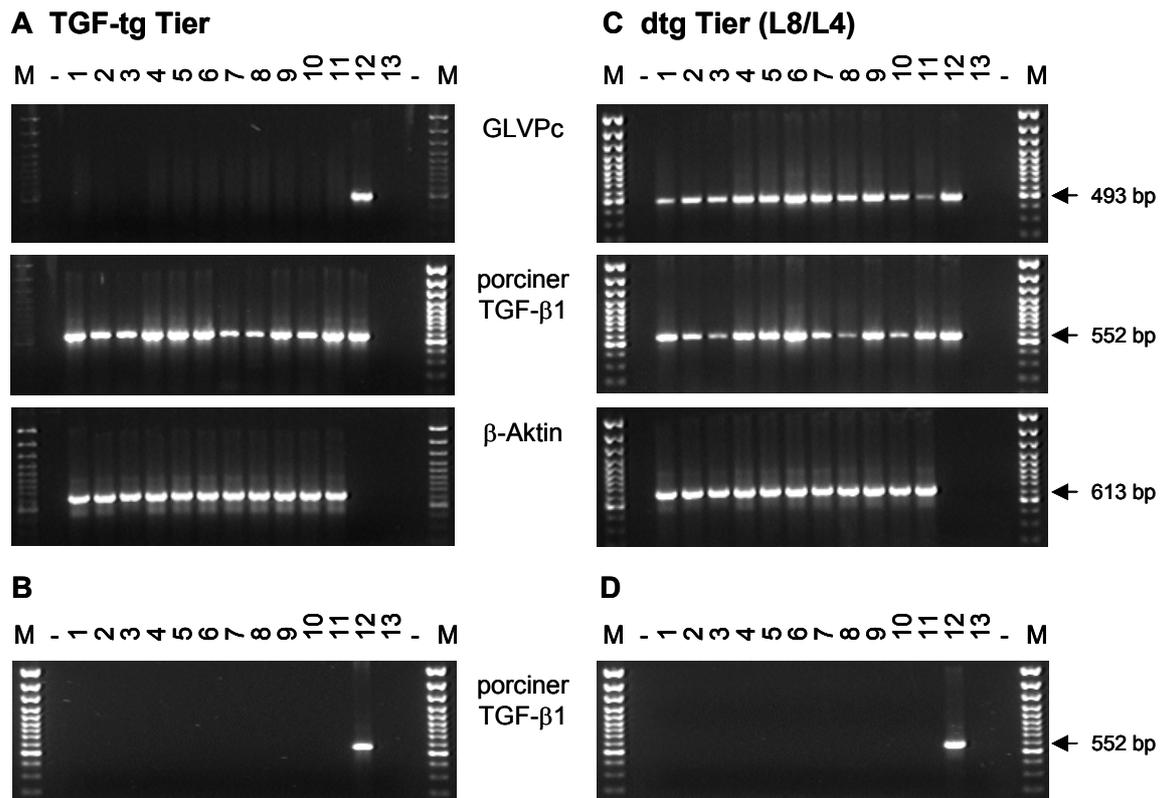
GLVPc: mRNA des chimären Transkriptionsfaktors; 1: Stammhirn/Kleinhirn; 2: Uterus; 3: Haut; 4: Zwerchfell; 5: M. quadriceps; 6: Ventrikelmyokard; 7: Niere; 8: Leber; 9: Lunge; 10: Milz; 11: Großhirn; 28S, 18S: 28S- bzw. 18S-ribosomale RNA (entsprechen 4,8 kb bzw. 1,9 kb).

Zur Untersuchung der Induzierbarkeit der porcinen TGF- $\beta$ 1-Expression durch Mifepristone wurden MHC-tg Tiere der Linie 6 bzw. 8 mit TGF-tg Tieren angepaart. Die Nachkommen dieser Würfe wurden in folgende Gruppen eingeteilt:

Wildtyp	Nativ (= nicht gespritzt) Mifepristone (= mit Mifepristone-Sesamöl-Lösung gespritzt)
MHC-tg L6	Nativ
MHC-tg L8	Nativ
TGF-tg L4	Nativ
dtg L6/L4	Nativ Ethanol (= mit Ethanol-Sesamöl-Lösung gespritzt) Mifepristone
dtg L8/L4	Nativ Ethanol Mifepristone

Die Induktion der Transgenexpression von porcinem TGF- $\beta$ 1 erfolgte durch intraperitoneale (i.p.) Gabe von Mifepristone an drei aufeinander folgenden Tagen (Tag 0 5  $\mu$ g, Tag 1 2,5  $\mu$ g und Tag 2 2,5  $\mu$ g Mifepristone, gelöst in Ethanol und Sesamöl). Sektion der acht Wochen alten Tiere erfolgte an Tag 4. Kontrolltiere wurden mit einer Ethanol-Sesamöl-Lösung (ohne Mifepristone) i.p. gespritzt.

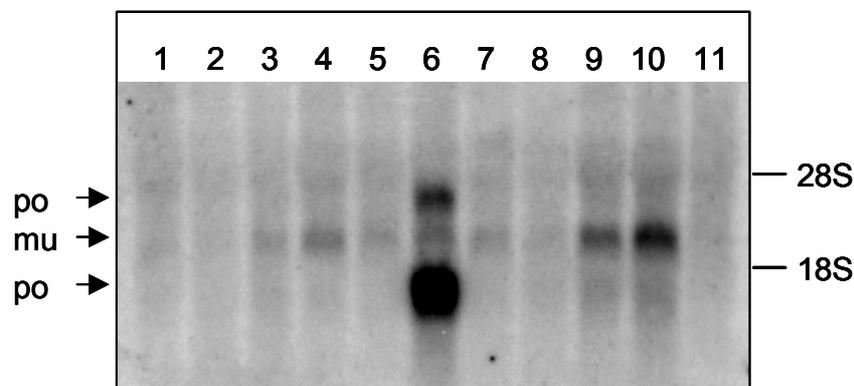
Bei RT-PCR-Untersuchungen wurde eine mRNA-Expression des TK-porcTGF $\beta$ 1-Transgens sowohl bei dtg (L6/L4 und L8/L4) als auch bei TGF-tg Tieren in allen untersuchten Organen unabhängig von der Mifepristone-Gabe festgestellt (Abbildung 4.4). Die Bandenintensitäten der RT-PCR-Fragmente unterschieden sich innerhalb des Organspektrums von dtg Tieren deutlich. Eine starke Bandenintensität wurde durchgehend im Ventrikelmyokard festgestellt, während schwache Bandenstärke bei allen untersuchten Tieren in der Leber detektiert wurde. Die Unterschiede der Bandenintensitäten von porcinem TGF- $\beta$ 1 innerhalb des Organspektrums waren bei RT-PCR von einem TGF-tg Tier geringer ausgeprägt als bei den dtg Tieren. In Wildtyp-Mäusen wurde keine Expression von porcinem TGF- $\beta$ 1 detektiert (nicht gezeigt).



**Abb. 4.4: RT-PCR-Analysen der GLVPc- und der porcinen TGF-β1-Expression in verschiedenen Organen**

**A:** Expressionsanalyse der Transgenexpression von GLVPc und porcinem TGF-β1 in einem TGF-tg Tier; Die RT-PCR-Analyse von β-Aktin diente zur Bestätigung der Effizienz der reversen Transkription. **B:** Bestätigung der Effizienz des DNase I-Verdauers der Proben aus A) erfolgte durch PCR mit DNase I-verdauter RNA als Matrize und Transgen-spezifischen Primern für porcinen TGF-β1. **C:** Expressionsanalyse analog zu A) in einem dtg Tier (L8/L4) ohne Mifepristone-Gabe; **D:** Kontroll-PCR zu C) analog wie in B). GLVPc: chimärer Transkriptionsfaktor (Transgen von MHC-tg Tier); 1: Stammhirn/Kleinhirn; 2: Uterus; 3: Haut; 4: Zwerchfell; 5: M. quadriceps; 6: Ventrikelmuskel; 7: Niere; 8: Leber; 9: Lunge; 10: Milz; 11: Großhirn; 12: Positiv-Kontrolle (αMHC-GLVPc-polyA-Plasmid oder TK-porcTGFβ1-Plasmid), bei RT-PCR von β-Aktin: wie 13; 13: Negativ-Kontrolle (Aqua bidest.); M: 100 bp-DNA-Ladder-Plus; -: leere Spur.

In Northern-Blot-Analysen wurde mit der Hybridisierungssonde für TGF- $\beta$ 1 bei acht Wochen alten Mäusen in zahlreichen Organen (Haut, Zwerchfell, M. quadriceps, Ventrikelmyokard, Niere, Lunge und Milz) eine etwa 2,1 kb große mRNA-Bande des endogenen TGF- $\beta$ 1 detektiert (Abbildung 4.5). Überdies wurden Transgenspezifische porcine TGF- $\beta$ 1-mRNA-Signale bei dtg Mäusen im Ventrikelmyokard mit sehr hoher sowie in der Lunge und in der Milz mit relativ niedriger Intensität nachgewiesen. Dagegen wurde keine porcine TGF- $\beta$ 1-Transgenexpression in Wildtyp-, MHC-tg und TGF-tg Tieren im Northern-Blot festgestellt (Abbildung 4.6).

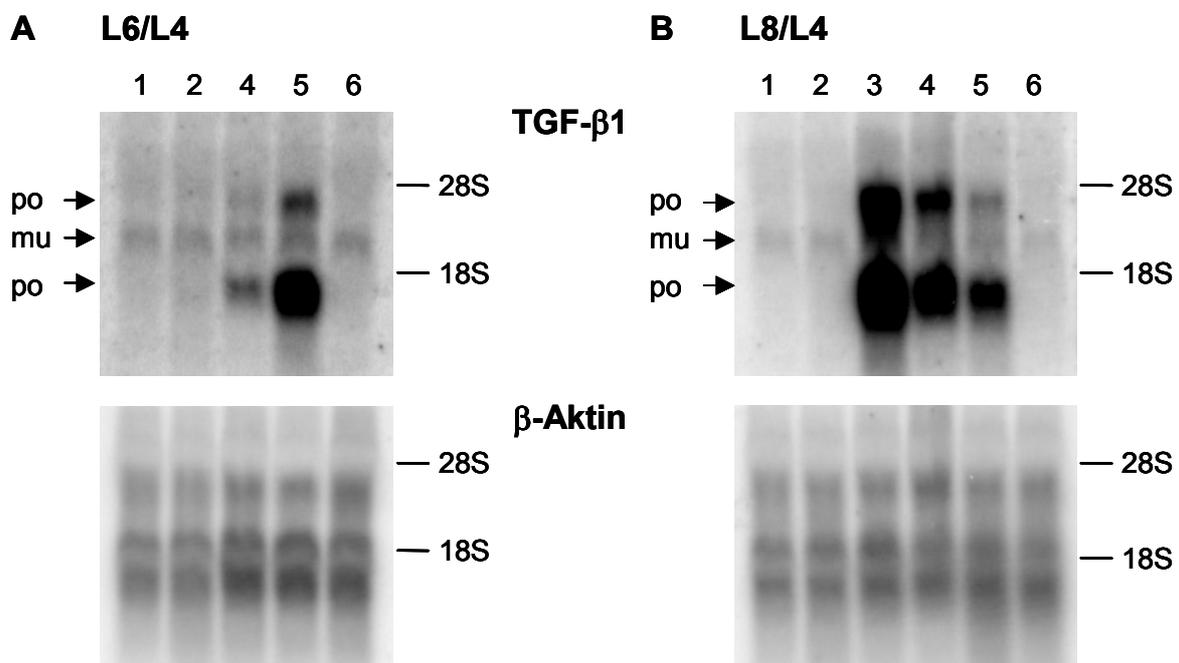


**Abb. 4.5: Northern-Blot-Analyse der porcinen TGF- $\beta$ 1-mRNA-Expression in verschiedenen Organen eines acht Wochen alten dtg Tieres (L6/L4) nach Mifepristone-Gabe**

mu: muriner TGF- $\beta$ 1 (endogen); po: porciner TGF- $\beta$ 1 (transgen); 1: Stammhirn/Kleinhirn; 2: Uterus; 3: Haut; 4: Zwerchfell; 5: M. quadriceps; 6: Ventrikelmyokard; 7: Niere; 8: Leber; 9: Lunge; 10: Milz; 11: Großhirn; 28S, 18S: 28S- bzw. 18S-ribosomale RNA (entsprechen 4,8 kb bzw. 1,9 kb).

Die Untersuchung der Induzierbarkeit der porcinen TGF- $\beta$ 1-Transgenexpression durch Gabe von Mifepristone erfolgte ebenfalls durch Northern-Blot-Analysen (Abbildung 4.6). Diese wurden mit RNA-Proben aus der Ventrikelmuskulatur der Herzen von acht Wochen alten weiblichen Tieren durchgeführt. Die zwei untersuchten Versuchsgruppen (verschiedene Linienkombinationen) setzten sich aus je einem nicht transgenen Tier sowie aus einfach-transgenen und dtg Mäusen zusammen. Die Tiere innerhalb der Versuchsgruppen stammten aus unterschiedlichen Würfen. Bei beiden Versuchsansätzen wurde bei nicht transgenen und einfach-transgenen Tieren keine porcine mRNA detektiert. Unterschiede ergaben sich dagegen bei den Transgentranskriptionsniveaus im Ventrikelmyokard dtg

Mäuse. So wies bei der Linienkombination L6/L4 das dtg Tier mit Mifepristone-Gabe eine höhere porcine TGF- $\beta$ 1-mRNA-Expression als das dtg Kontrolltier mit Ethanol-Gabe (ohne Mifepristone) auf (Abbildung 4.6 A). Allerdings war dieses Ergebnis in einem zweiten Versuchsansatz nicht reproduzierbar. So wurde bei der Linienkombination L8/L4 bei dem unbehandelten, nicht gespritzten dtg Kontrolltier eine stärkere mRNA-Expression von porcinem TGF- $\beta$ 1 detektiert als bei den gespritzten dtg Tieren (Abbildung 4.6 B).



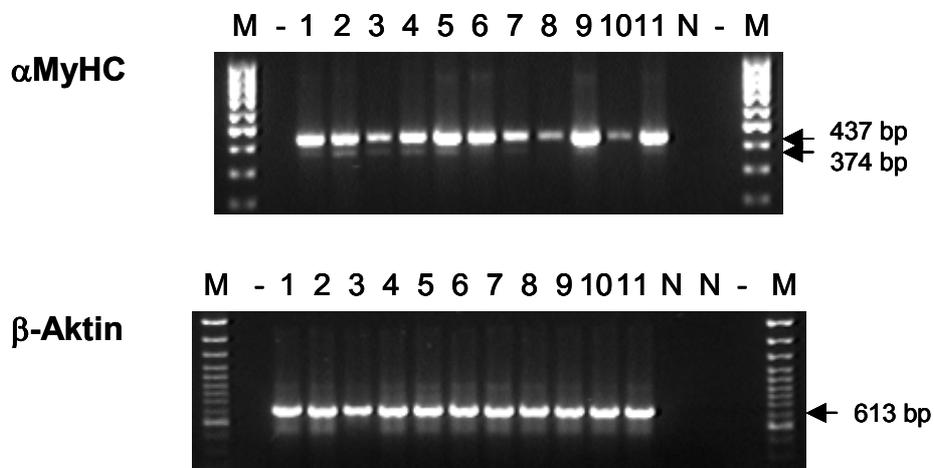
**Abb. 4.6: Northern-Blot-Analysen der Induzierbarkeit der porcinen TGF- $\beta$ 1-mRNA-Expression im Ventrikelmuskel dtg Tiere nach Mifepristone-Gabe**

A: Tiere aus der Linienkombination L6 (MHC-tg) x L4 (TGF-tg); B: Tiere aus der Linienkombination L8 (MHC-tg) x L4 (TGF-tg). Die Rehybridisierung der Northern-Blot-Membranen mit muriner  $\beta$ -Aktin-Sonde diente der Überprüfung des gleichmäßigen Beladens der Northern-Blot-Gele. mu: muriner TGF- $\beta$ 1 (endogen); po: porciner TGF- $\beta$ 1 (transgen); 1: Wildtyp-Tier, unbehandelt; 2: TGF-tg Tier; 3: dtg Tier, unbehandelt; 4: dtg Tier, mit Ethanol-Gabe (ohne Mifepristone); 5: dtg Tier, mit Mifepristone-Gabe; 6: MHC-tg Tier; 28S, 18S: 28S- bzw. 18S-ribosomale RNA (entsprechen 4,8 kb bzw. 1,9 kb).

### 4.1.3 Expression von endogenem $\alpha$ MyHC

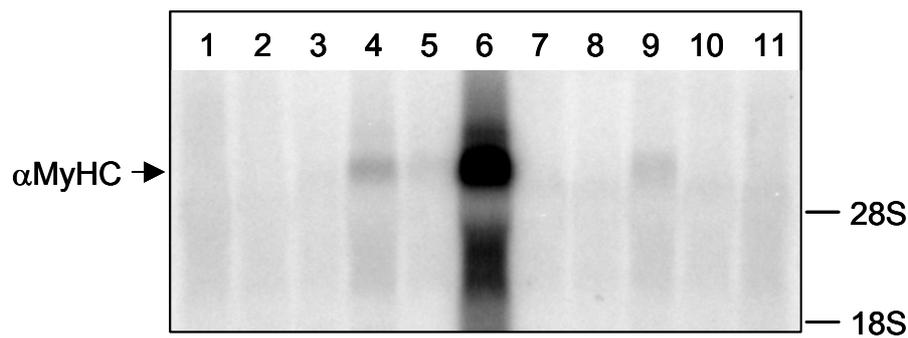
Die mRNA-Expression von  $\alpha$ MyHC (alpha myosin heavy chain) wurde mittels RT-PCR-Analysen in allen untersuchten Organen [Haut, Zwerchfell, M. quadriceps, Ventrikelmyokard, Niere, Leber, Lunge, Milz, Großhirn, Stammhirn/Kleinhirn und Uterus (bei weiblichen Tieren)] bei acht Wochen alten Mäusen nachgewiesen (Abbildung 4.7). Bei der RT-PCR mit den genspezifischen Primern mMHCalpha#5se und #2rev wurden zwei Fragmente (374 bp und 437 bp) amplifiziert, deren Spezifität durch Sequenzierung überprüft wurden. Sie unterschieden sich in der Sequenz des nicht translatierten Exons 1 des  $\alpha$ MyHC und entsprachen den unter den Zugriffsnummern M76601 und BC061145 in der Gendatenbank (DDBJ/EMBL/GenBank) hinterlegten Sequenzen.

In Northern-Blot-Analysen wurde eine starke mRNA-Expression von  $\alpha$ MyHC im Ventrikelmyokard und eine relativ schwache Expression in Zwerchfell und Lunge detektiert (Abbildung 4.8).



**Abb. 4.7: RT-PCR-Analyse der  $\alpha$ MyHC-mRNA-Expression in verschiedenen Organen von einer weiblichen acht Wochen alten Maus**

Die RT-PCR-Analyse von  $\beta$ -Aktin diente zur Bestätigung der Effizienz der reversen Transkription; 1: Stammhirn/Kleinhirn; 2: Uterus; 3: Haut; 4: Zwerchfell; 5: M. quadriceps; 6: Ventrikelmyokard; 7: Niere; 8: Leber; 9: Lunge; 10: Milz; 11: Großhirn; N: Negativ-Kontrolle (Aqua bidest.); M: 100 bp-DNA-Ladder-Plus ; –: leere Spur.



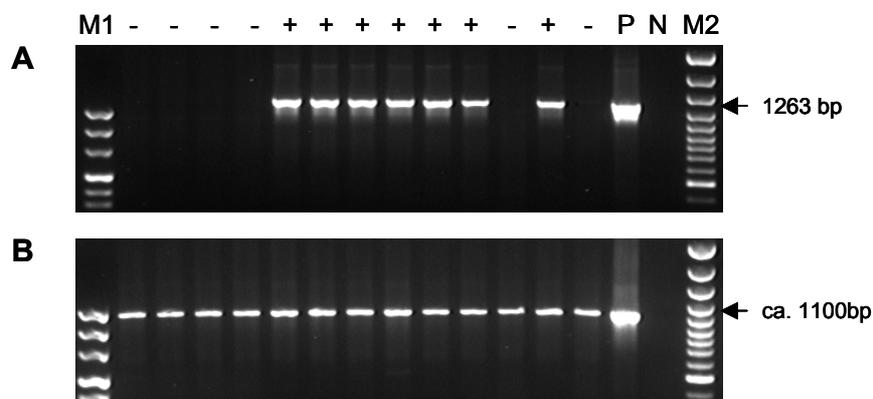
**Abb. 4.8: Northern-Blot-Analyse der  $\alpha$ MyHC-mRNA-Expression in verschiedenen Organen**

RNA wurde aus Organen einer weiblichen acht Wochen alten Maus isoliert. 1: Stammhirn/Kleinhirn; 2: Uterus; 3: Haut; 4: Zwerchfell; 5: M. quadriceps; 6: Ventrikelmyokard; 7: Niere; 8: Leber; 9: Lunge; 10: Milz; 11: Großhirn;  $\alpha$ MyHC: Transkript der alpha-Isoform der schweren Myosinkette (ca. 6 kb); 28S, 18S: 28S- bzw. 18S-ribosomale RNA (entsprechen 4,8 kb bzw. 1,9 kb).

## 4.2 H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-transgene Schweine

### 4.2.1 Identifizierung und Charakterisierung transgener Schweine

Sieben transgene Foundertiere sowie F1-Nachkommen von vier Foundertieren und F2-Tiere von einem Founderschwein standen zu Beginn dieser Arbeit zur Verfügung. Sechs Foundertiere wurden mit DL-Schweinen angepaart und alle gaben das Transgen an ihre Nachkommen weiter. Transgene Tiere wurden mittels PCR-Analysen identifiziert (Abbildung 4.9).



**Abb. 4.9: PCR-Analyse zur Identifizierung von H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-transgenen Schweinen**

A: PCR mit Transgen-spezifischen Primern; B: PCR mit Primern für GAPDH. +: transgenes Tier; -: nicht transgenes Tier; P: Positiv-Kontrolle der PCR (DNA von einem transgenen Tier); N: Negativ-Kontrolle (Aqua bidest.); M1: pUC-Mix-Marker 8; M2: 100 bp-plus-Marker.

Durch Southern-Blot-Analysen wurde das genomische Integrationsmuster des H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-Konstrukts in transgenen Tieren untersucht. Durch *Hind*III-Verdau (keine Schnittstellen im Mikroinjektionskonstrukt) erfolgte der Nachweis der Anzahl an unabhängigen Integrationsstellen des Transgens in das porcine Genom (Abbildung 4.10 A und 4.12 A). Das Vorliegen von Concatemeren, d.h. mindestens zwei Mikroinjektionsfragmente sind an einer Integrationsstelle gemeinsam in das Genom eingebaut worden, wurde durch *Scal*-Verdau (eine Schnittstelle im Konstrukt) detektiert (Abbildung 4.10 B und 4.12 A). Endogener TRAIL wurde nach *Hind*III-Verdau bei ca. 12 kb sowie nach *Scal*-Verdau bei 10 kb und 5 kb nachgewiesen. Transgen-spezifische Banden sind in der Tabelle 4.2 zusammengefasst.

**Tabelle 4.2: Zusammenfassung der H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-Transgen-spezifischen Banden aus Southern-Blot-Analysen**

Linie <sup>a</sup>	<i>Hind</i> III-Verdau	<i>Scal</i> -Verdau <sup>b</sup>
6965 a	21 kb	<u>4,6 kb</u> , 2,7 kb, 2,3 kb;
b	10 kb	– <sup>c</sup>
6967	21 kb	21 kb, <u>4,6 kb</u>
6973	21 kb, 4,6 kb;	12 kb, 7,5 kb, <u>4,6 kb</u> , 3,3 kb, 2,7 kb, 2,5 kb;
6980 a	21 kb	6 kb, <u>4,6 kb</u> , 3 kb;
b	18 kb	7 kb, <u>4,6 kb</u> , 3 kb;
6983 a	21 kb	<u>4,6 kb</u> , 2,6 kb;
b	8 kb	– <sup>c</sup>
6985 a	>21 kb, 21 kb	10 kb, 8 kb, 7,5 kb, <u>4,6 kb</u> , 3,7 kb, 2,9 kb, 1,5 kb, 0,75 kb;
b	>21 kb, 21 kb	10 kb, 7,5 kb, 6,5 kb, <u>4,6 kb</u> , 2,8 kb, 2,5 kb, 1,5 kb, 0,75 kb;
c	21 kb	7,5 kb, <u>4,6 kb</u> , 4 kb, 3,5 kb;

<sup>a</sup>: a, b, c: Unterlinien ab F1-Generation

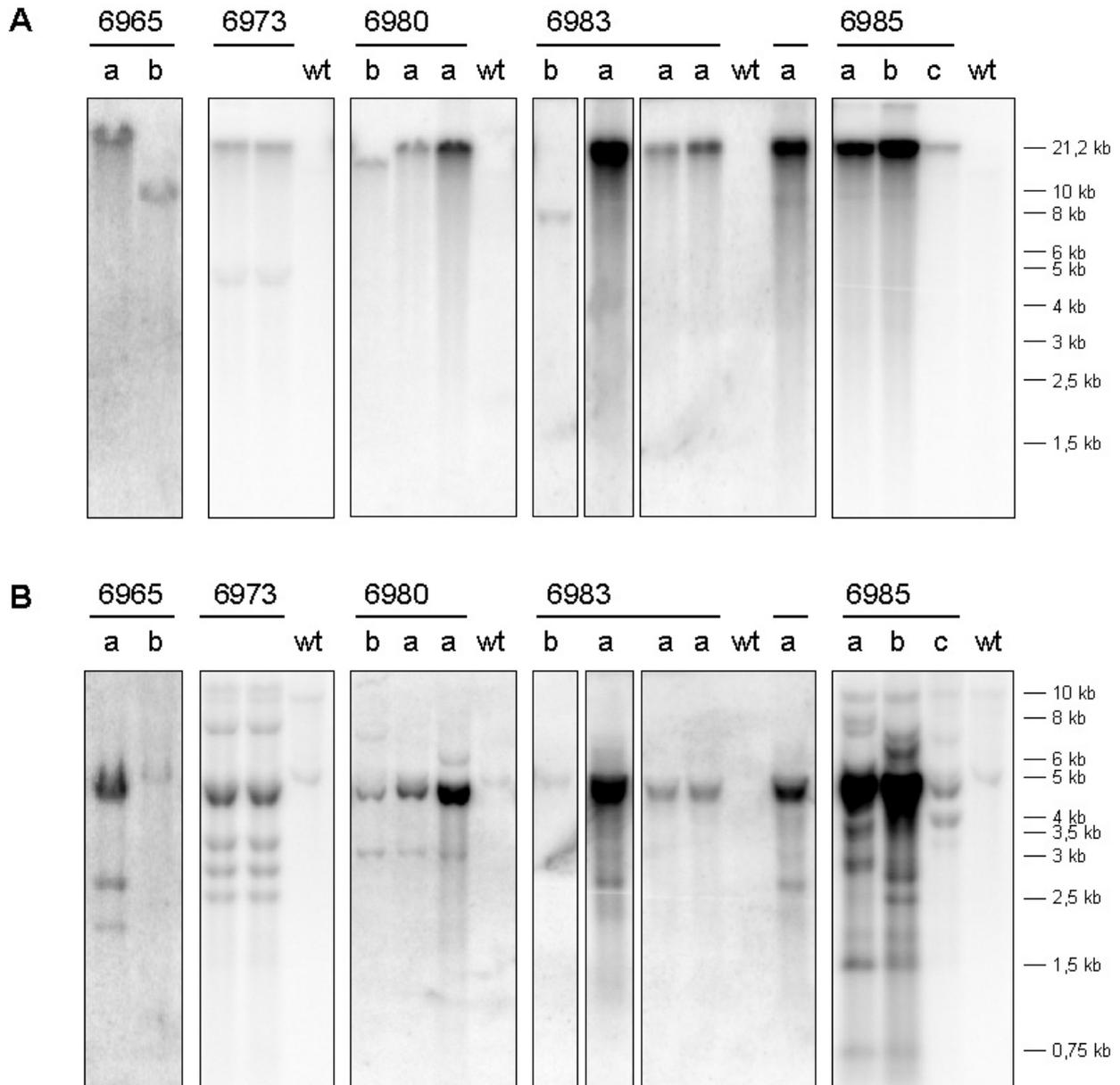
<sup>b</sup>: Die Länge des Injektionsfragments (4,6 kb) ist jeweils unterstrichen.

<sup>c</sup>: Es wurde keine Transgen-spezifische Bande nach *Scal*-Verdau detektiert.

Bei vier der sechs untersuchten Founderlinien unterschied sich das Bandenmuster nach *Hind*III- und/oder *Scal*-Verdau zwischen Foundertier und der F1-Generation. Diese Founderlinien spalteten sich daher in weitere Unterlinien auf (bezeichnet mit a, b und c hinter der Nummer des Founders). Im *Hind*III-Verdau wurden bei den H-2K<sup>b</sup>-

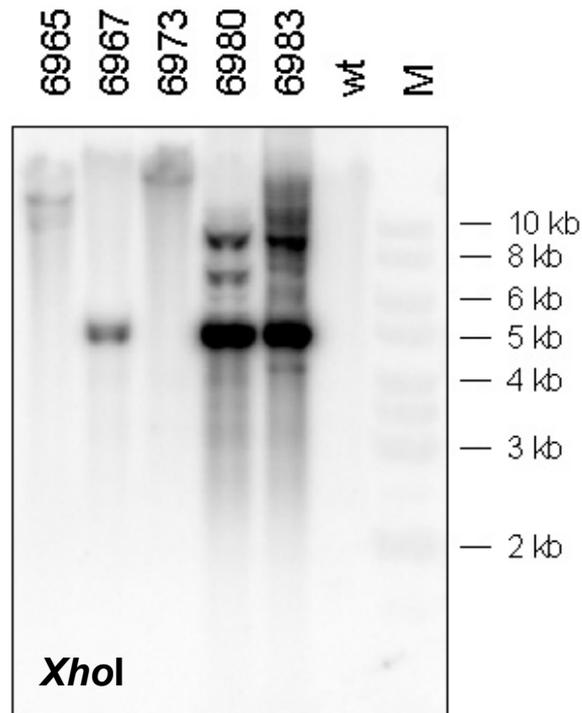
huTRAIL-transgenen Linien ein oder zwei unabhängige Integrationsereignisse nachgewiesen. Eine weitere Analyse war durch Auswertung der Southern-Blots nach *Scal*-Verdau möglich: So wurden aufgrund der Bandenanzahl nach *Scal*-Verdau bei der Linie 6985 a mehr als zwei unabhängige Integrationsereignisse nachgewiesen. Die 4,6 kb-Bande nach *Scal*-Verdau, die das Vorliegen von Concatemeren anzeigte, wurde in zwei Unterlinien (Linie 6965 b und 6983 b) nicht detektiert. Bei den nach *Scal*-Verdau detektierten Banden von 1,5 kb und 0,75 kb (Linien 6985 a und b) handelte es sich um Fragmente des Mikroinjektionskonstrukts, da die Mindestgröße der das Transgenkonstrukt enthaltenden Fragmente nach *Scal*-Verdau der genomischen DNA mindestens 2,3 kb betragen muss. In der Linie 6973 wurden zwei unabhängige Integrationsereignisse sowohl beim Foundertier als auch bei F1- und F2-Nachkommen (n=9) mit gleichem Bandenmuster detektiert. Bei F1-Nachkommen der Linie 6983 fielen unterschiedliche Bandenintensitäten bei gleichem Bandenmuster der Wurfgeschwister auf. Ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den Bandenintensitäten wurden bei Vergleich der Foundertiere nach *XhoI*-Verdau festgestellt (Abbildung 4.11).

Southern-Blot-Analysen wurden ebenfalls zur Untersuchung auf Homozygotie und Hemizygotie von Tieren der Linie 6967 herangezogen, welche aus einer Bruder-Schwester-Anpaarung (F2-Tiere mit 50 % Minipig-Anteil, beide Tiere transgen) hervorgegangen waren (Abbildung 4.12). Bei drei von sechs Tieren wurde nach *Scal*-Verdau eine um den Faktor 1,7 bis 2,4 höhere Signalstärke, standardisiert auf porcines GAPDH, als bei den Wurfgeschwistern festgestellt (Abbildung 4.12 B). Ein vergleichbares Ergebnis erbrachte ebenfalls ein *HindIII*-Verdau. Fünf dieser Tiere wurden mit nicht transgenen Schweinen angepaart. Das Transgen wurde in allen Nachkommen der drei durch Southern-Blot-Analysen identifizierten homozygot-transgenen Tiere nachgewiesen. Dagegen wurden bei den Nachkommen von hemizygot-transgenen Tieren auch nicht transgene Tiere identifiziert. So wurden die Ergebnisse aus Southern-Blot-Analysen bestätigt.



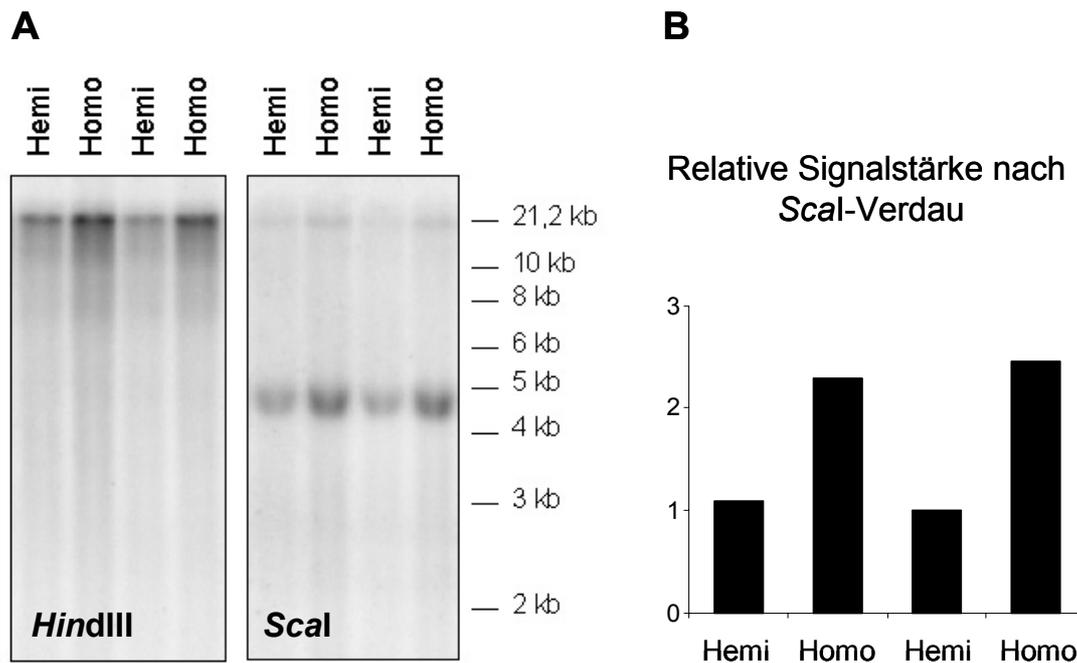
**Abb. 4.10: Southern-Blot-Analysen von H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-transgenen und Wildtyp-Schweinen nach *Hind*III-Verdau und *Scal*-Verdau**

Linienpezifisches Bandenmuster nach (A) *Hind*III-Verdau und (B) *Scal*-Verdau von F1-Tieren, bei Linie 6973 handelte es sich um F2-Tiere; wt: Wildtyp-Tier. Die Linien wurden in Founderlinien (z.B. 6965) und deren Unterlinien (bezeichnet mit a, b oder c) gegliedert. Endogene TRAIL-Banden wurde nach *Hind*III-Verdau (A) bei ca. 12 kb sowie nach *Scal*-Verdau (B) bei 10 kb und 5 kb nachgewiesen. Die 4,6 kb-Bande nach *Scal*-Verdau entspricht der Länge des Mikroinjektionskonstrukts und weist auf das Vorliegen von Concatemeren hin.



**Abb. 4.11: Southern-Blot-Analyse von H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-transgenen Foundertieren und einem Wildtyp-Schwein nach *Xho*I-Verdau**

Feststellbar sind unterschiedliche Signalstärken der Transgen-spezifischen Banden zwischen fünf Foundertieren, welche der Integration einer unterschiedlichen Gesamtzahl an Transgenkopien im Genom der Tiere entsprechen. Das Restriktionsenzym *Xho*I hat im Mikroinjektionskonstrukt keine Schnittstelle. wt: Wildtyp-Tier; M: 1 kb-DNA-Ladder.

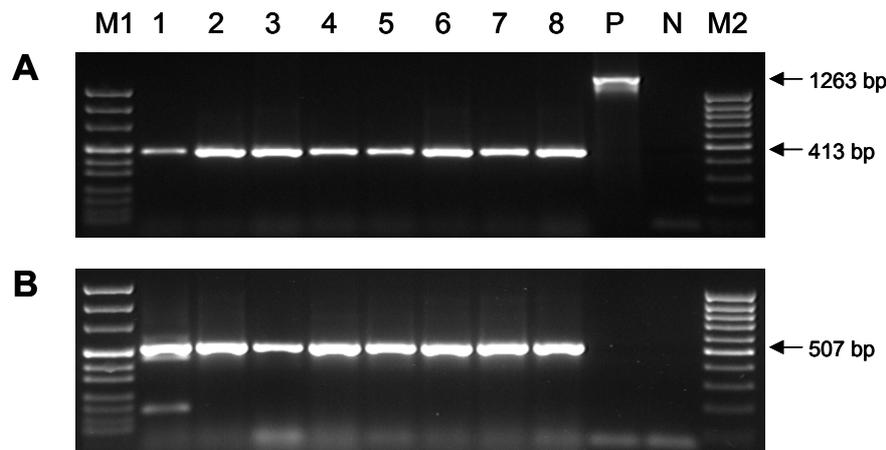


**Abb. 4.12: Untersuchung auf Homozygotie und Hemizygotie durch Southern-Blot-Analysen von H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-transgenen Tieren der Linie 6967**

A: Southern-Blot-Analysen zur Identifizierung von homozygot-transgenen und hemizygot-transgenen Tieren der Linie 6967 durch *HindIII*- und *Scal*-Verdau. B: Quantitative Auswertung der Bandenintensitäten der 4,6 kb-Bande des *Scal*-Verdau von A, jeweils standardisiert auf die Signalstärke der entsprechenden Bande nach Rehybridisierung mit porciner GAPDH-Sonde. Die Balken stellen die relative Signalstärke, bezogen auf das Tier mit der niedrigsten Bandenintensität, dar. Homo: homozygot-transgenes Tier; Hemi: hemizygot-transgenes Tier.

#### 4.2.2 Transgenexpression

Untersuchungen der mRNA-Transgenexpression wurden an Nachkommen von drei Foundertieren durchgeführt. Bei Nachkommen der Foundertiere 6967 und 6980 wurde mittels RT-PCR-Analysen Expression von humanem TRAIL-Transgen in allen untersuchten Organen (Haut, Herz, Hoden, Leber, Lunge, Milz, Muskel und Niere) detektiert (Abbildung 4.13). Bei Nachkommen der Linie 6965 wurde nur bei Tieren der Linie 6965 a Transgenexpression nachgewiesen, nicht jedoch bei Tieren der Linie 6965 b. Im Northern-Blot wurde bei der Linie 6967 eine hohe Transgenexpression in der Milz und eine niedrigere Expression im Hoden und in der Lunge festgestellt (nicht gezeigt).



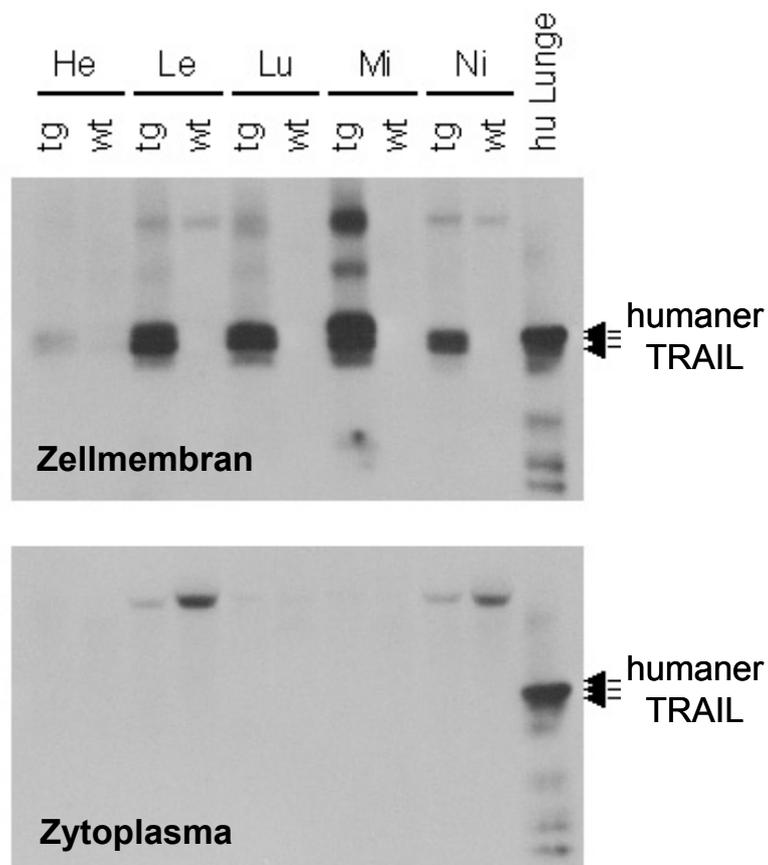
**Abb. 4.13: Nachweis der humanen TRAIL-Transkription eines transgenen Schweines der Linie 6967**

A: RT-PCR zum Nachweis der humanen TRAIL-Transgenexpression mit Transgen-spezifischen Primern. Die Amplifikate von cDNA als Matrize unterscheiden sich um die Länge der Intronsequenz der humanen  $\beta$ -Globin-Splice-Kassette von den Amplifikaten des Expressionskonstrukts (P). B: Die RT-PCR-Analyse zum Nachweis von GAPDH diente zur Bestätigung der Effizienz der reversen Transkription. 1: Haut; 2: Herz; 3: Hoden; 4: Leber; 5: Lunge; 6: Milz; 7: Muskel; 8: Niere; P: pUC-H2XXS-huTRAIL-Expressionsvektor; N: Negativ-Kontrolle (Aqua bidest.); M1: pUC-Mix-Marker 8; M2: 100 bp-Marker.

Zur Expressionsuntersuchung von humanem TRAIL-Protein wurden Western-Immunoblot-Analysen mit einem monoklonalen anti-humanen TRAIL-Antikörper (Bindungsepitop an AS 17 – 34) durchgeführt. Durch diesen wurden für humanen TRAIL-spezifische Proteinbanden bei etwa 32 kDa, 30 kDa und 28 kDa sowie, abhängig vom untersuchten Organ, eine schwächere Bande bei 20 kDa detektiert (Abbildungen 4.14, 4.15 und 4.18). Wurde Proteinlysepuffer mit Iodacetamid verwendet, detektierte der Antikörper die 28 kDa Bande des humanen TRAIL nicht (Abbildung 4.16). Porcines TRAIL-Protein wurde nicht detektiert.

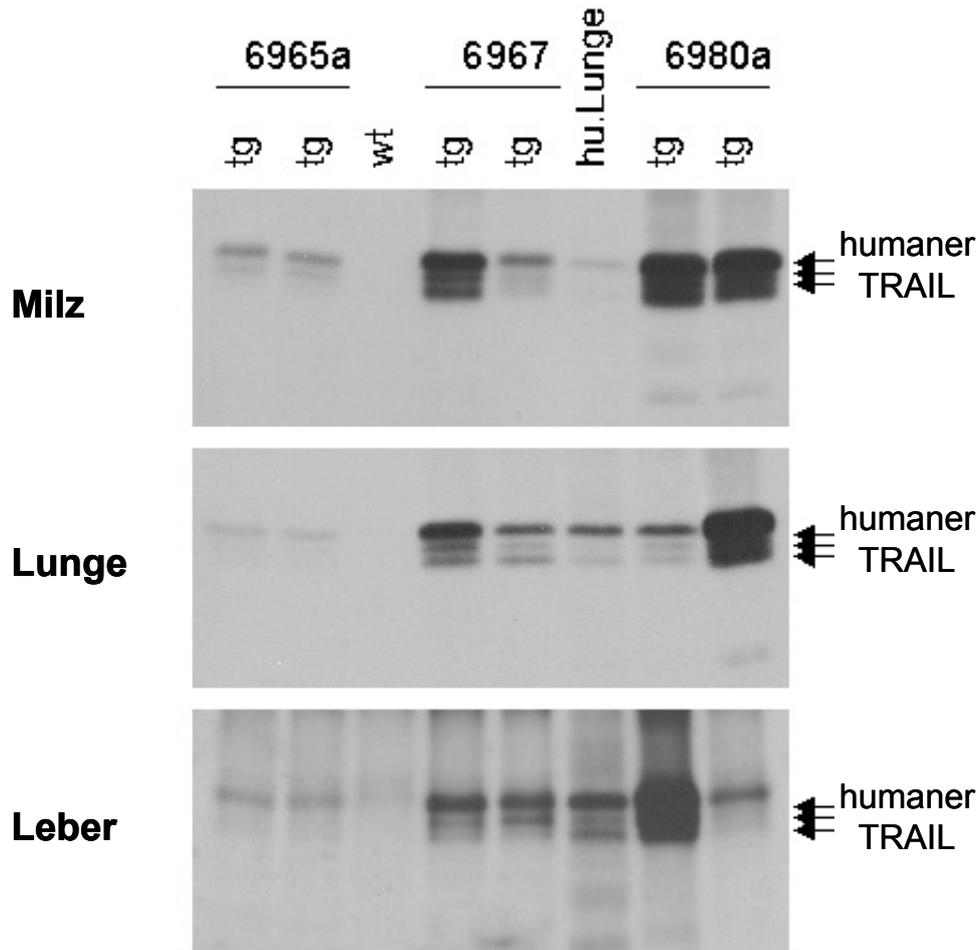
Expression von humanem TRAIL-Protein auf der Zellmembran wurde durch Western-Immunoblots aus Zellmembranpräparationen nachgewiesen. Wie aus Abbildung 4.14 ersichtlich, war bei dem untersuchten F3-Tier der Linie 6967 die Proteinexpression in der Milz am höchsten, gefolgt von Lunge und Leber. Relativ niedrige Transgenexpression wiesen Niere und Herz auf. Im Zytoplasma wurde kein humanes TRAIL-

Protein detektiert. Humane TRAIL-Proteinexpression auf der Zellmembran wurde außerdem bei Tieren der Linie 6965 a und 6980 a in vier Organen untersucht (Abbildung 4.15, Niere nicht gezeigt). Bei allen drei untersuchten Linien war die Proteinexpression in der Milz am höchsten, gefolgt von Lunge und Leber. Relativ niedrige Transgenexpression wurde in der Niere detektiert. Tiere der Linie 6965 a exprimierten das Transgen in allen untersuchten Organen auf einem niedrigeren Niveau als Tiere der Linien 6967 und 6980 a. Innerhalb einer Linie wurden z.T. große Schwankungen der Transgenexpression zwischen den verschiedenen Tieren festgestellt.



**Abb. 4.14: Western-Immunoblot aus Gewebefractionen von einem transgenen und einem Wildtyp-Tier**

Porcine Proteinextrakte wurden getrennt nach Zellmembranfraktion und Zytoplasmafraktion aufgetragen (je 20 µg). Humanes TRAIL-Protein wurde in der Zellmembranfraktion nachgewiesen, nicht dagegen im Zytoplasma. tg: transgenes F3-Tier der Linie 6967; wt: Wildtyp-Tier; hu Lunge: Gesamtlisat von humaner Lunge (7,5 µg); He: Herz; Le: Leber; Lu: Lunge; Mi: Milz; Ni: Niere.



**Abb. 4.15: Western-Immunoblot von Membranfraktionen verschiedener Organe von transgenen Tieren dreier Linien und einem Wildtyp-Tier**

Als Referenz zum Vergleich der Expressionsniveaus zwischen den verschiedenen porcinen Organen wurden jeweils 7,5 µg Gesamtlisat aus humaner Lunge aufgetragen. tg: transgenes Tier der entsprechenden Linie; wt: Wildtyp-Tier; hu Lunge: Gesamtlisat aus humaner Lunge.

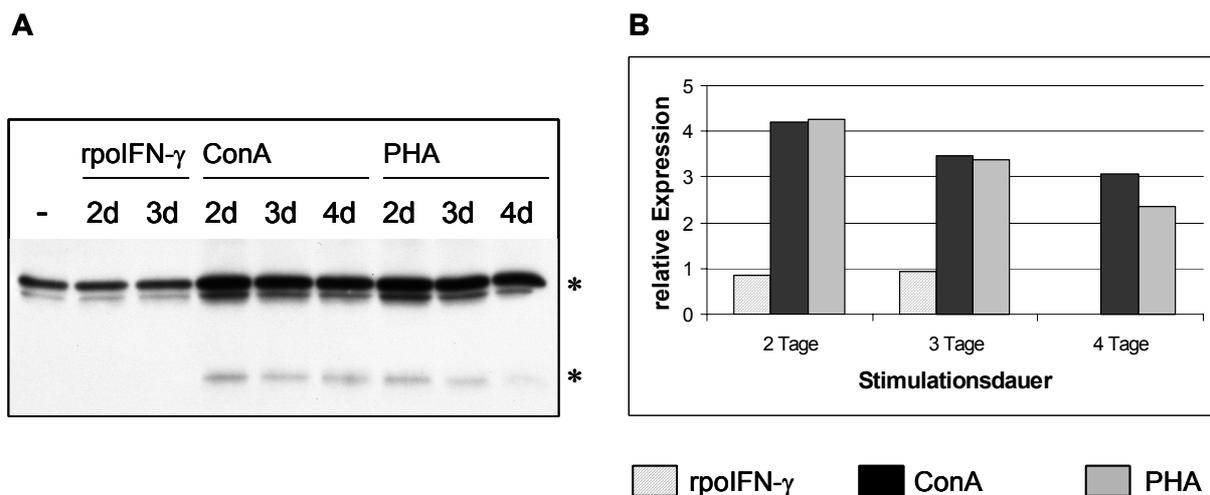
Bei Reihenuntersuchungen von Tieren aus fünf Founderlinien mit Proteingemischlysaten von verschiedenen Organen wurde festgestellt, dass die Milz bei allen untersuchten Tieren das Organ mit der höchsten Proteintransgenexpression war (nicht gezeigt). Ebenfalls ein hohes Expressionsniveau wurde in der Lunge detektiert, in der Leber hingegen eine vergleichsweise geringere Expressionshöhe. Bei einem Tier der Linie 6980a war allerdings die Transgenexpression in der Leber höher als die in der Lunge. Des Weiteren wurde ein relativ niedriges humanes TRAIL-Expressionsniveau in der Niere und der Haut nachgewiesen. Im Hoden wurde bei adulten Ebern eine sehr hohe Expression von humanem TRAIL detektiert, dagegen eine relativ niedrige bei präpuberalen Tieren. Bei weiblichen Tieren war die Expression im Ovar niedrig

bis nicht detektierbar (nicht gezeigt). Zwischen Tieren derselben Linie wurden starke Schwankungen der Expressionshöhe festgestellt. So wurde bei einem Tier der Linie 6983 a eine Transgenexpression detektiert, nicht dagegen bei einem Wurfgeschwister der gleichen Linie. Auffallend war, dass Tiere, die zum Zeitpunkt der Probennahme eine Verletzung oder eine andere Erkrankung aufwiesen, tendenziell mehr humanes TRAIL-Protein exprimierten als ihre gesunden Wurfgeschwister. Ferner bestätigte sich der Trend aus den Western-Immunoblots der Membranfraktionen, dass Schweine der Linie 6965 a niedrigere Transgenexpressionen aufwiesen als Tiere der Linie 6967. Zu den anderen Linien lagen noch zu wenige Daten von Einzeltieren vor, um eine sichere linienvergleichende Aussage der Expressionsniveaus zu treffen.

Um dennoch Angaben über die Transgenexpression von bisher nicht oder wenig untersuchten Linien machen zu können, wurden Gewebeproben [Ohrstanze und periphere Blutlymphozyten (PBL)] lebender Tiere untersucht. Es stellte sich heraus, dass Ohrstanzenproben aufgrund des höheren Aufwandes zur Proteinisolierung und der relativ niedrigen Expressionshöhe der Haut nicht geeignet waren. Stattdessen wurde für Expressionsuntersuchungen an lebenden Tieren Gesamtlysat aus PBL gewonnen. Die Expressionshöhe auf PBL ähnelte der der Milz (nicht gezeigt). Es wurden sowohl eine sehr hohe als auch fehlende Transgenexpression auf PBL bei Tieren verschiedener Linien sowie Unterschiede der Expressionshöhe bei transgenen Schweinen derselben Linie nachgewiesen (nicht gezeigt). Die bei diesen Analysen negativen Tiere bzw. Linien wurden nicht weiter berücksichtigt. Die Zucht und umfassende Expressionsuntersuchungen der transplantationsrelevanten Organe wurde auf die Tiere bzw. Linien beschränkt, die auf PBL eine Transgenexpression gezeigt hatten.

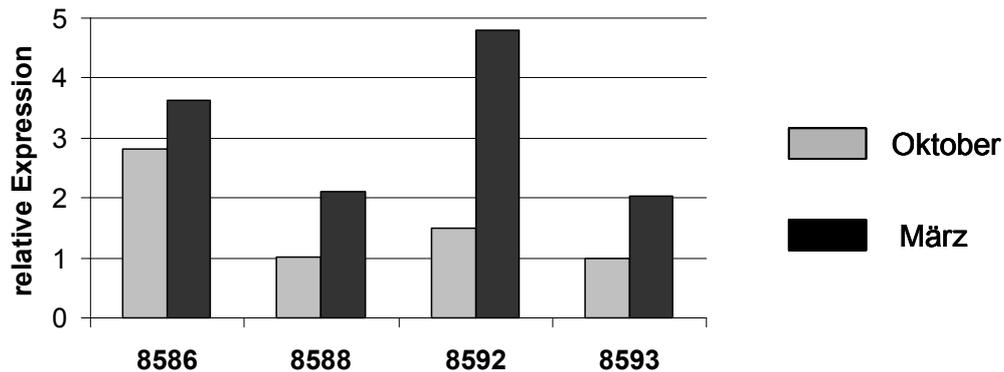
Das Zytokinmilieu und der Aktivierungsstatus von PBL könnten möglicherweise einen Einfluss auf die Regulation der Transgenexpression durch den murinen H-2K<sup>b</sup>-Promotor haben. Um diese Annahme zu untersuchen, wurden PBL eines adulten H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-transgenen F1-Tieres der Linie 6967 *in-vitro* für zwei bis vier Tage mit rekombinantem porcinem (rpo) IFN- $\gamma$ , ConA bzw. PHA stimuliert und anschließend Western-Immunoblot-Analysen aus Proteinlysaten durchgeführt. So wurde eine um den Faktor 4 im Vergleich zu den nicht stimulierten PBL erhöhte

Expression von humanem TRAIL auf zwei Tage mit ConA bzw. PHA stimulierten Zellen festgestellt (Abbildung 4.16). Eine ähnliche Wirkung wurde durch Inkubation transgener PBL mit Zellkulturüberständen erreicht, welche von porcinen Wildtyp-PBL stammten, die vorher mit ConA bzw. PHA stimuliert worden waren. Dieser Effekt war allerdings schwächer als nach direkter Stimulation mit ConA bzw. PHA (nicht gezeigt). Dagegen hatte rpolFN- $\gamma$  keine Wirkung auf die Expressionshöhe von humanem TRAIL in stimulierten transgenen PBL. Des Weiteren wurden bei vier hemizygot-transgenen F2-Tieren der Linie 6967 (Wurfgeschwister, gleiche Haltungsbedingungen) Expressionsanalysen von PBL zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten (Oktober und März) durchgeführt. Dabei war die humane TRAIL-Expression im März um den Faktor 1,3 bis 3,2 höher als im Oktober (Abbildung 4.17).



**Abb. 4.16: Analyse der humanen TRAIL-Proteinexpression auf nicht stimulierten und stimulierten transgenen PBL durch Western-Immunoblot**

A: Analyse der humanen TRAIL-Expression auf porcinen transgenen PBL eines F1-Tieres der Linie 6967. Aufgetragen wurde Proteinlysat aus je  $5 \times 10^5$  PBL, der Proteinlysepuffer enthielt Iodacetamid. –: nicht stimulierte PBL; 2d, 3d, 4d: Dauer der Stimulation (zwei bis vier Tage); \*: humaner TRAIL (etwa bei 32 kDa, 30 kDa und 20 kDa). B: Quantitative Auswertung der Western-Blot-Analyse von A. Die Balken stellen die relative Expressionssteigerung von humanem TRAIL in stimulierten Zellen bezogen auf die Expression der unstimulierten PBL dar. rpolFN- $\gamma$ , ConA, PHA: verwendete Stimulatoren; rpolFN- $\gamma$ : rekombinantes porcines IFN- $\gamma$ .

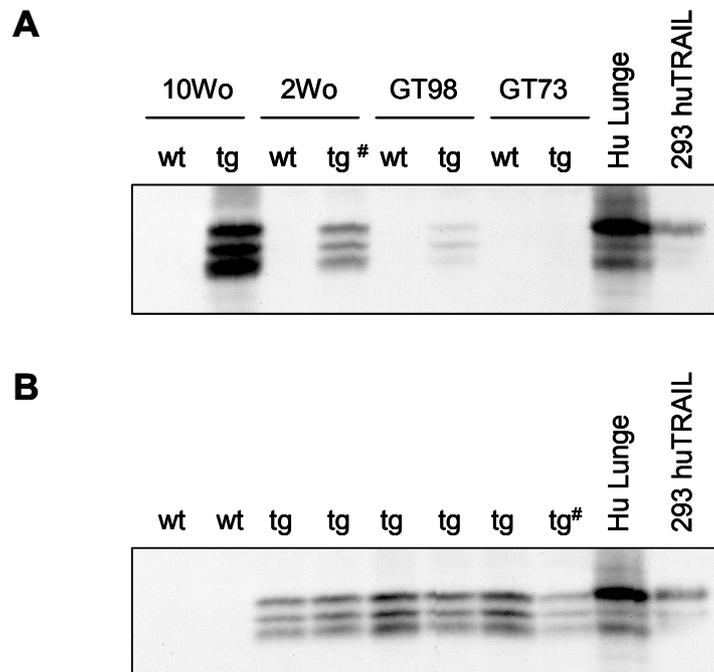


**Abb. 4.17: Nachweis unterschiedlicher Transgenexpressionsniveaus auf PBL im Oktober und im März**

Die Balken stellen die relativen Expressionsniveaus bezogen auf den niedrigsten Expressionswert aller Tiere (Expression von 8593 im Oktober = 1) dar. Die relativen Expressionsniveaus wurden durch Quantifizierung von Western-Immunoblot-Analysen ausgewertet. 8586, 8588, 8592, 8593: hemizygot-transgene Wurfgeschwister aus der Linie 6967.

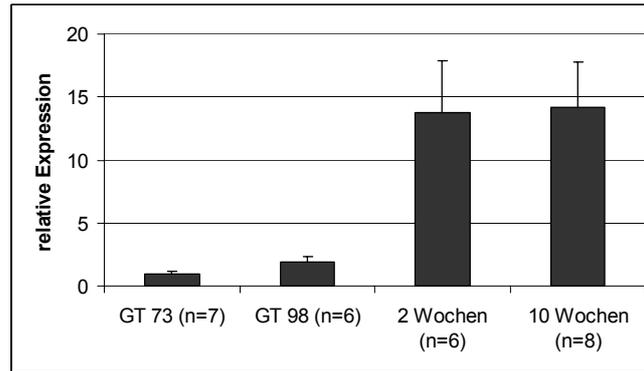
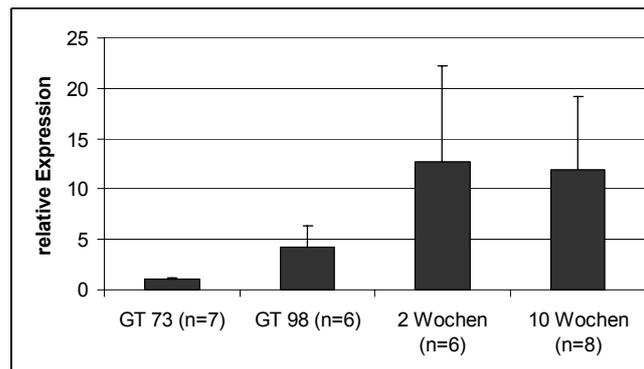
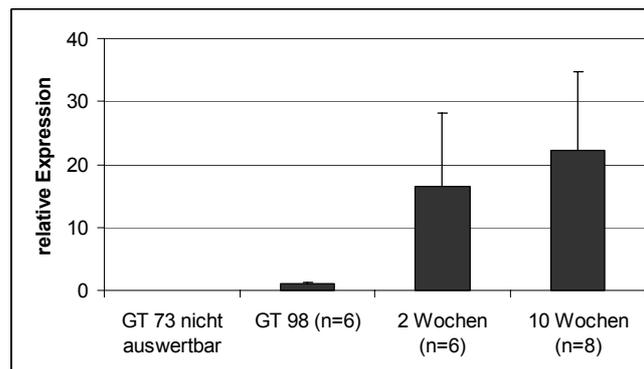
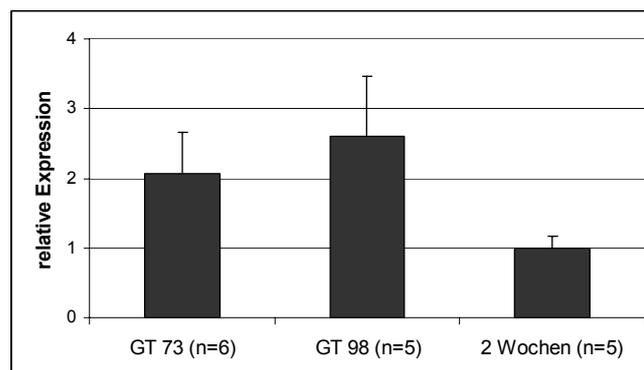
Eine mögliche altersabhängige Regulation der Transgenexpression durch den murinen H-2K<sup>b</sup>-Promotor wurde an pränatalen und postnatalen Tieren der Linie 6967 untersucht (Abbildungen 4.18 A und 4.19). Humaner TRAIL wurde am Graviditätstag (GT) 73 im Thymus, in der Milz und der Leber detektiert. In der Lunge wurde eine Expression von humanem TRAIL ab GT 98 festgestellt. Zwischen GT 73 und GT 98 wurde ein Anstieg der Expression um den Faktor 1,9 in der Milz und 4,3 in der Leber detektiert. Des Weiteren wurde in der Milz mehr humanes TRAIL-Protein exprimiert als in der Leber. Ein Expressionsanstieg zwischen GT 98 und zwei Wochen alten Tieren wurde in der Milz (Faktor 7,2), in der Leber (Faktor 3,0) sowie in der Lunge (Faktor 16,4) nachgewiesen. Zwischen zwei und zehn Wochen alten Tieren wurde in der Lunge ein leichter Anstieg der Expression um den Faktor 1,3 festgestellt. Dagegen wurde bei zwischen zwei und zehn Wochen alten Tieren in Milz und Leber kaum eine Veränderung der Expressionshöhe detektiert. Bei postnatalen Tieren wurden größere Schwankungen der Expression zwischen Wurfgeschwistern innerhalb derselben Altersgruppe nachgewiesen [Abbildungen 4.18 B und 4.19 (Standardabweichung der zwei und zehn Wochen alten Tiere)]. Bei diesen Tieren war im Organvergleich die Transgenexpression in der Milz am höchsten, gefolgt von Lunge und Leber (nicht gezeigt). Im Thymus wurde zwischen GT 73 und GT 98 ein

leichter Anstieg (Faktor 1,3) und zwischen GT 98 und zwei Wochen postnatal ein Abfall der Expression um mehr als die Hälfte detektiert (Abbildung 4.19). An GT 98 wurde im Thymus eine höhere Expression festgestellt als in der Milz (nicht gezeigt).



**Abb. 4.18: Western-Immunoblot-Analysen der humanen TRAIL-Expression in der Milz von transgenen und Wildtyp-Tieren**

A: Nachweis der Expression von humanem TRAIL in Gesamtllysate der Milz von Tieren der Linie 6967. Die Altersstufen sind angegeben. B: Analyse der Transgenexpression von zwei Wochen alten Wurfgeschwistern der Linie 6967. tg<sup>#</sup> von A) entspricht tg<sup>#</sup> von B). tg: transgenes Tier (30 µg); wt: Wildtyp-Tier (30 µg); Hu Lunge: Gesamtllysate von humaner Lunge (15 µg); 293 huTRAIL: Gesamtllysate von mit dem pcDNA3-huTRAIL-Expressionsvektor transient transfizierten 293T-Zellen (0,078 µg); Wo: Wochen; GT: Graviditätstag.

**Milz****Leber****Lunge****Thymus**

**Abb. 4.19: Analyse der relativen humanen TRAIL-Expression in fetalen und postnatalen Geweben**

Dargestellt sind die relativen durchschnittlichen Expressionsniveaus von humanem TRAIL gleichaltriger Wurfgeschwister verschiedener Altersstufen. Die Standardabweichungen sind angegeben. Die relative Transgenexpressionshöhe bezieht sich jeweils auf das niedrigste durchschnittliche Expressionsniveau. GT: Graviditätstag; n: Anzahl der untersuchten Tiere.

### 4.2.3 Apoptoseassay

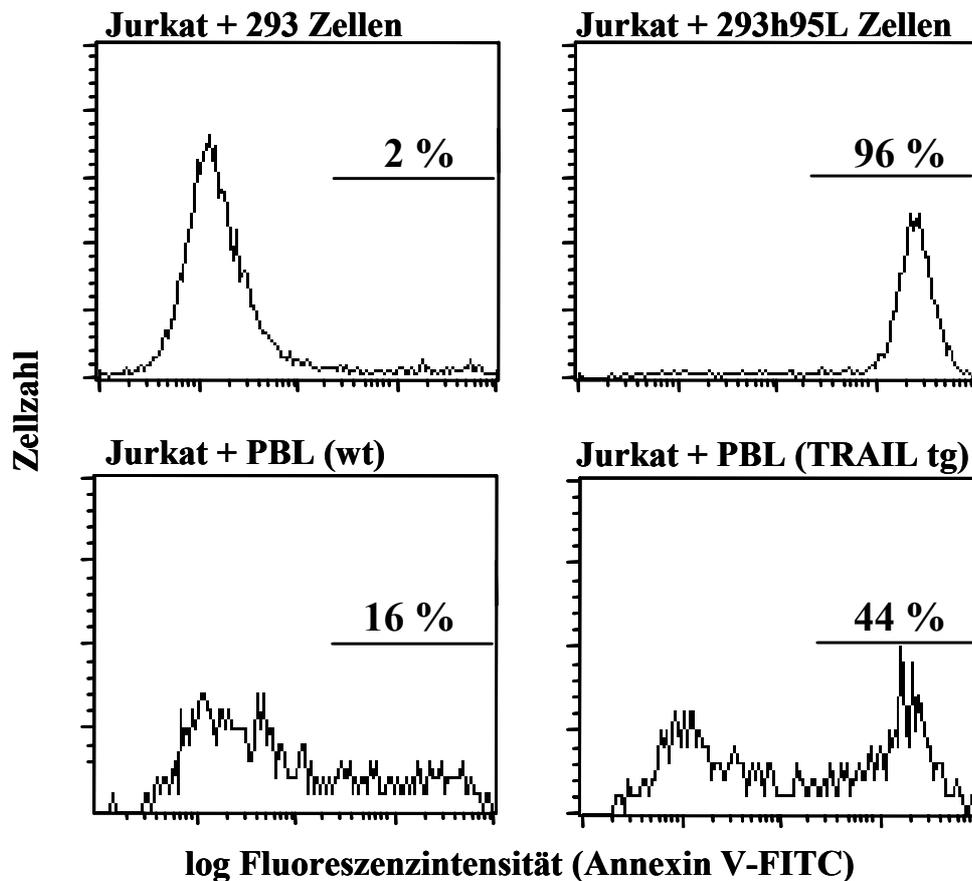
Um zu überprüfen, ob durch das Expressionsplasmid für humanen TRAIL funktionell aktives Protein exprimiert wird, wurden Apoptoseassays durchgeführt. Dazu wurden mit dem pcDNA3-huTRAIL-Plasmid transient transfizierte 293T-Zellen mit TRAIL-sensitiven Jurkat RJP<sup>+</sup>-Zellen kokultiviert. Nach einer Kokultivierungszeit von 24 Stunden wurden bis zu 11,4 % Annexin V-FITC-positive und bis zu 26,4 % Annexin V-FITC- und PI-doppelt-positive Jurkat RJP<sup>+</sup>-Zellen durch FACS-Analysen detektiert. Diese Werte waren gegenüber den Kokulturansätzen von Jurkat RJP<sup>+</sup>-Zellen mit 293T-Zellen, welche mit dem pcDNA3-Plasmid (Leervektor) transient transfiziert worden waren, deutlich erhöht (5,9 % bzw. 7,2 %). In Western-Immunoblots wurde eine sehr starke TRAIL-Expression auf den mit dem pcDNA3-huTRAIL-Vektor transient transfizierten Effektorzellen nachgewiesen (Abbildung 4.18). Keine TRAIL-Expression wurde dagegen sowohl in den mit dem Leervektor transfizierten als auch in den nicht transfizierten 293T-Zellen detektiert (nicht gezeigt).

Bei Verwendung von mit dem pUC-H2XXS-huTRAIL-Expressionsvektor transient transfizierten 293T-Zellen als Effektorzellen im Apoptoseassay wurde im Vergleich zum Kontrollansatz (mit dem Leervektor transfizierte Zellen) keine erhöhte Apoptoserate bei den Jurkat RJP<sup>+</sup>-Zellen festgestellt. Im Western-Immunoblot wurde eine im Vergleich zu pcDNA3-huTRAIL-transfizierten Zellen sehr niedrige Expression von humanem TRAIL bei mit H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-transfizierten 293T-Zellen detektiert (nicht gezeigt).

Bei Verwendung von porcinen transgenen Fibroblasten als Effektorzellen wurde eine im Vergleich zum Kontrollansatz mit nicht transgenen Fibroblasten leicht erhöhte Apoptoserate bei den Jurkat RJP<sup>+</sup>-Zellen in einem Versuchsansatz nachgewiesen. Dabei wurden 16,5 % Annexin V-FITC- und PI-doppelt-positive Jurkat RJP<sup>+</sup>-Zellen gegenüber 10,0 % durch FACS-Analysen detektiert. Bei Wiederholung des Versuchs mit Hautfibroblasten eines anderen transgenen Tieres wurden keine Unterschiede der Apoptoserate von Jurkat RJP<sup>+</sup>-Zellen nach Kokultivierung mit transgenen bzw. Wildtyp-Effektorzellen detektiert. In Western-Immunoblots wiesen die Hautfibroblasten transgener Schweine eine niedrige humane TRAIL-Expression auf (nicht

gezeigt). Eine ebenfalls niedrige humane TRAIL-Expression hatten mit dem pcDNA3-huTRAIL-Plasmid transient transfizierte PM86-Zellen (nicht gezeigt).

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Schwinzer (MHH Hannover) wurden weitere Apoptoseassays durchgeführt. Dazu wurden H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-transgene PBL verwendet, die höhere Transgenexpressionsniveaus als Hautfibroblasten aufwiesen. Als Effektorzellen für die Kokultur mit Jurkat-Zellen dienten PBL ( $2 \times 10^5$  Zellen), die für drei Tage mit ConA und IL-2 stimuliert worden waren. Nach einer Kokultivierungszeit von vier Stunden wurden die Zellen gefärbt: Ein muriner Antikörper gegen humanes CD45 markierte in der Kokultur nur die Jurkat-Zellen. Die Detektion apoptotischer Zellen erfolgte durch Annexin V-FITC. So konnte der Anteil apoptotischer Jurkat-Zellen in der Kokultur über eine Identifizierung Annexin V-FITC-positiver und CD45-positiver Zellen bestimmt werden. In diesen Kokultivierungsversuchen wurde reproduzierbar festgestellt, dass der Anteil an apoptotischen Jurkat-Zellen nach Kokultur mit Lymphoblasten transgener Tiere höher war als nach Kokultur mit nicht transgenen Lymphoblasten (Abbildung 4.20). Der Zusatz von neutralisierendem Antikörper gegen humanen TRAIL (7,5 µg/ml des anti-TRAIL-Antikörpers Klon 2E5, Alexis Biochemicals, Grünberg) zu den Kokultivierungsansätzen von Jurkat-Zellen mit TRAIL-transgenen PBL reduzierte den Anteil an apoptotischen Jurkat-Zellen auf den Wert des Kontrollansatzes mit nicht transgenen PBL.



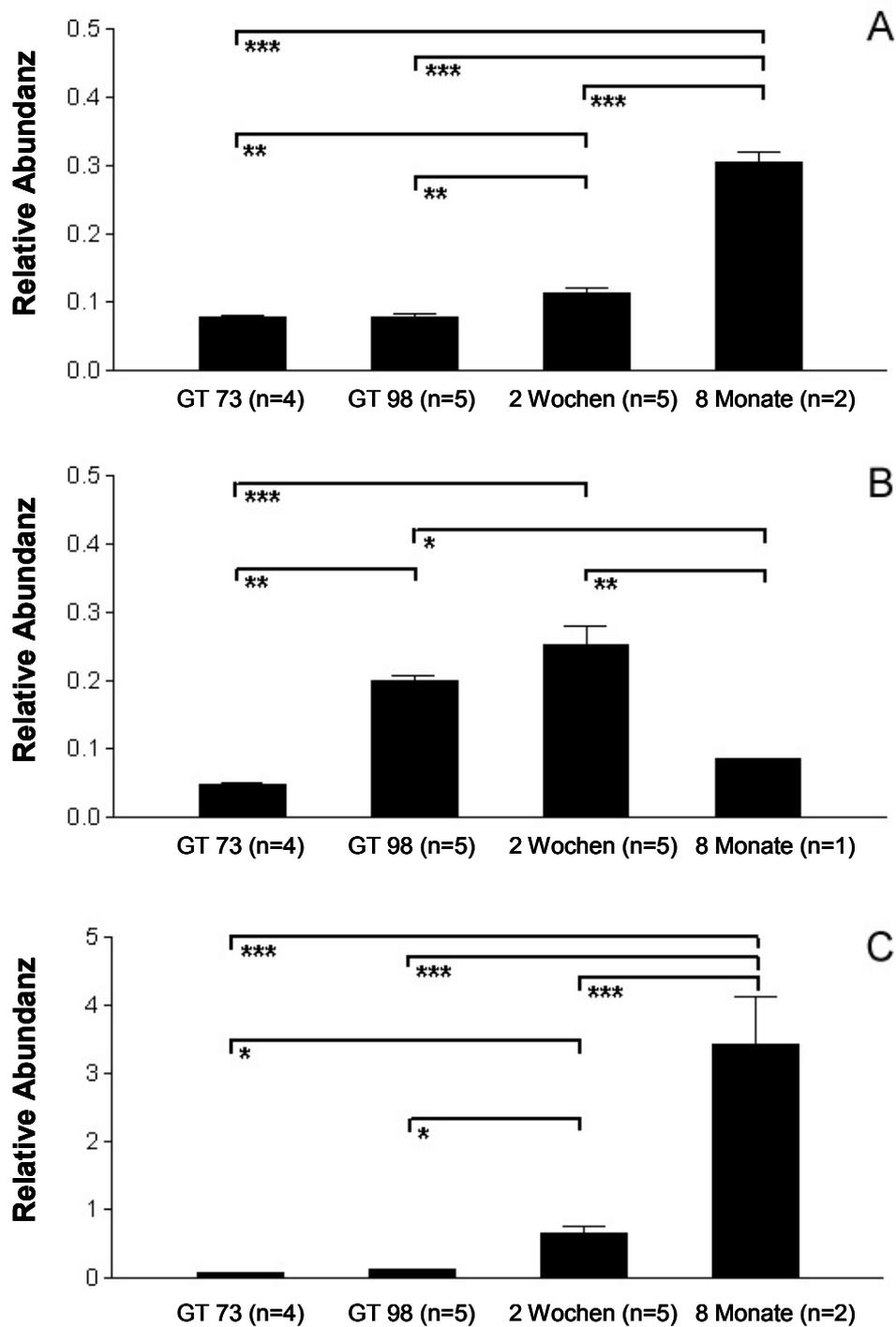
**Abb. 4.20: Nachweis der Apoptoseinduktion von Jurkat-Zellen durch humanen TRAIL auf porcinen PBL**

Detektion der apoptotischen Jurkat-Zellen durch Färbung mit Annexin V-FITC. Es wurden Jurkat-Zellen für vier Stunden kokultiviert mit 293-Zellen (Negativkontrolle), mit 293-Zellen, die mit einem Expressionsvektor für humanen FasL stabil transfiziert worden waren (293h95L-Zellen, Positivkontrolle) sowie mit porcinen PBL (von einem Wildtyp-Tier bzw. von einem TRAIL-transgenen Tier der Linie 6967), die für drei Tage mit ConA und IL-2 stimuliert worden waren. Die Kokulturen wurden mit Annexin V-FITC sowie mit einem murinen anti-humanem CD45-Antikörper und PE-konjugierten anti-murinen Ig von der Ratte gefärbt und anschließend über Durchflusszytometrie analysiert. Die Bestimmung der apoptotischen Jurkat-Zellen erfolgte über den Anteil der Annexin V-FITC-positiven CD45-positiven Zellen.



### 4.3.2 Expression von porcinem TRAIL

Durch RT-PCR- und/oder Northern-Blot-Analysen wurde eine porcine TRAIL-Expression in allen untersuchten Organen, wie Haut, Herz, Hoden, Leber, Lunge, Milz, Muskel und Niere, detektiert. In Lunge, Leber und Milz wurde eine relativ hohe mRNA-Expression nachgewiesen (nicht gezeigt). Zur Untersuchung einer möglichen entwicklungsabhängigen Regulation der porcinen TRAIL-Expression in den Organen Leber, Lunge und Niere wurden quantitative RT-PCR (qRT-PCR)-Analysen zu zwei Zeitpunkten der fetalen Entwicklung (GT 73 und GT 98) sowie postnatal bei zwei Wochen und bei acht Monaten alten Wildtyp-Schweinen durchgeführt (Abbildung 4.22). Die porcine TRAIL-Expression wurde auf die Expression des Housekeeping-Gens Histon-2A standardisiert. In allen untersuchten Proben wurden Transkripte von porcinem TRAIL detektiert. In der Niere wurden eine vergleichbare Expressionshöhe während der fetalen Entwicklung (an GT 73 und GT 98), eine leichte Erhöhung der mRNA-Abundanz während der frühen postnatalen Phase sowie eine deutliche Zunahme der Expression bei adulten Schweinen nachgewiesen (Abbildung 4.22 A). Dagegen wurde in der Lunge ein relativ starker Anstieg der Transkription zwischen GT 73 und GT 98 sowie eine weitere leichte Transkriptionserhöhung bis zu einem Alter von zwei Wochen detektiert. Die TRAIL-Expression in der Lunge war jedoch bei dem acht Monate alten Tier niedriger als bei Tieren vom GT 98 (Abbildung 4.22 B). Ähnlich wie in der Lunge wurde in der Leber während der fetalen Entwicklung ein Anstieg der Expression nachgewiesen, der jedoch geringer war. Des Weiteren wurde in der Leber im Gegensatz zur Lunge während der gesamten postnatalen Periode eine kontinuierliche Erhöhung der TRAIL-Transkription im Vergleich zur Fetalperiode detektiert (Abbildung 4.22 C).



**Abb. 4.22: qRT-PCR-Analysen der porcinen TRAIL-Transkription in fetalen und postnatalen Geweben**

A: Niere, B: Lunge, C: Leber. Die relative Abundanz wurde nach der Standardkurvenmethode berechnet (Quotient aus der Kopienzahl der TRAIL-mRNA und der Kopienzahl der mRNA des Referenzgens Histon-2A). Die Balken stellen die durchschnittliche relative Abundanzhöhe in den verschiedenen Altersstufen dar. Die Standardabweichungen sind angegeben. GT: Graviditätstag; n: Anzahl der untersuchten Tiere. \*: p-Wert < 0,05; \*\*: p-Wert < 0,01; \*\*\*: p-Wert < 0,0001.

## 5 Diskussion

Aufgrund des Spenderorganmangels für die Allotransplantation wird nach Alternativen des Organersatzes bei Patienten mit terminalem Organversagen gesucht. Die Verwendung von Schweineorganen für die Xenotransplantation könnte eine solche Alternative sein, da porcine und humane Organe viele anatomische und physiologische Gemeinsamkeiten besitzen (Clark & Whitelaw 2003). Da jedoch Mensch und Schwein immunologisch inkompatibel sind, müssen Strategien entwickelt werden, um die Abstoßung eines porcinen Xenotransplantats durch das humane Immunsystem zu verhindern. Durch genetische Modifikation von Schweineorganen kann die HAR verhindert werden. Mögliche Strategien zur Verhinderung der zellulären Abstoßungsreaktion könnten in der Transgenexpression von TGF- $\beta$ 1 und TRAIL bestehen. Grundlagen zur Untersuchung der Anwendbarkeit dieser Strategien wurden durch die hier untersuchten Tiermodelle in Maus und Schwein geschaffen.

### 5.1 $\alpha$ MHC-GLVPc-polyA- und TK-porcTGF $\beta$ 1-transgene Mäuse

TGF- $\beta$ 1 ist als multifunktionelles Protein an der Regulation vieler physiologischer Prozesse beteiligt. Seine Aktivität muss daher streng kontrolliert werden, um pathophysiologische Auswirkungen zu vermeiden (Zhu & Burgess 2001). Eine gestörte TGF- $\beta$ 1-Signaltransduktion wird mit zahlreichen Krankheiten in Verbindung gebracht, darunter Autoimmunkrankheiten, Tumore, Fibrosen und Krankheiten des Gefäßsystems wie Atherosklerose (Dennler *et al.* 2002). So ist eine lokal erhöhte Bioverfügbarkeit von TGF- $\beta$ 1 im Herzmuskelgewebe z.B. für die Pathogenese von nicht adaptiver Herzmuskelhypertrophie, von Herzmuskelfibrose und von verschiedenen Arten von Kardiomyopathien mit verantwortlich (Lijnen *et al.* 2000; Seeland *et al.* 2002). Des Weiteren hat TGF- $\beta$ 1 im Herzen auch auf andere Signalwege Einfluss. So reagieren Herzmuskelzellen bei erhöhter Bioverfügbarkeit von TGF- $\beta$ 1 durch Beeinflussung der  $\beta$ -adrenergen Signaltransduktion auf die Behandlung mit Catecholaminen mit einer erhöhten Kontraktilität (Rosenkranz *et al.* 2002). Überdies kann die Expression von konstitutiv aktivem TGF- $\beta$ 1, abhängig vom für die Transgenexpression verwendeten Promotor, zum Tod der Tiere bzw. zu degenerativen Organveränderungen, wie z.B. Herzmuskelfibrose, führen (Sellheyer *et al.* 1993; Agah *et al.* 2000; Nakajima *et al.* 2000). Im Hinblick auf die Expression

von konstitutiv aktivem TGF- $\beta$ 1 in transgenen Spenderorganen ist daher eine strenge räumliche und zeitliche Kontrolle der Transgenexpression im Organspendertier notwendig. Dies sollte durch die Verwendung eines Mifepristone-induzierbaren Genregulationssystems und eines herzspezifischen Promotors ( $\alpha$ MyHC) erreicht werden.

### 5.1.1 Identifizierung und Charakterisierung der Transgenintegration

Eine schnelle Methode, transgene Tiere zu identifizieren, stellt die Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Transgen-spezifischen Primern dar. Hierfür ist eine DNA mittlerer Qualität ausreichend, die durch ein billiges und wenige Arbeitsschritte enthaltene Isolierungsprotokoll gewonnen wurde. Mit der PCR ist jedoch nur eine Aussage über das Vorhandensein des Transgenkonstrukts, nicht aber über das Transgenintegrationsmuster möglich. Deshalb sind Southern-Blot-Analysen notwendig, um die Anzahl der unabhängigen Integrationsereignisse, das Vorliegen von Concatemeren wie auch die Orientierung der Transgenkopien innerhalb einer Integrationsstelle, die Anzahl an integrierten Kopien sowie die Integrität der Mikroinjektionsfragmente zu bestimmen. Als Concatemere bezeichnet man im Bereich der Transgentechnologie das Aneinanderlagern mehrerer Kopien des Transgenkonstrukts, das meistens in einer „head-to-tail“-Anordnung erfolgt (Rulicke & Hubscher 2000). Tiere mit einem unterschiedlichen Integrationsmuster können sich bezüglich der Transgenexpressionshöhe und -gewebespezifität unterscheiden. Ursachen hiervon sind möglicherweise Positionseffekte, d.h. eine Beeinflussung der Transgenexpression einerseits durch benachbarte endogene Sequenzen oder andererseits durch Konformationsänderung der Chromatinstruktur (Rulicke & Hubscher 2000). Daher ist es notwendig, die durch Mikroinjektion generierten transgenen Foundertiere mit Wildtyp-Tieren anzupaaren, um separate Linien mit gleichen Transgenintegrationsmustern zu erstellen.

Sowohl in den  $\alpha$ MHC-GLVPc-polyA-transgenen Mauslinien 6 und 8 als auch in der TK-porcTGF $\beta$ 1-transgenen Linie 4 wurde jeweils ein Integrationsort des Transgens nachgewiesen. Weiterhin wurde in den beiden MHC-tg Mauslinien durch die Detektion der 7,5 kb großen Transgen-spezifischen Bande, welche der Größe des Mikroinjektionskonstrukts entsprach, das Vorliegen von Concatemeren festgestellt.

Da die Signalintensität der 7,5 kb-Bande in Linie 6 stärker war als in Linie 8, ist anzunehmen, dass bei Linie 6 eine höhere Kopienzahl des Konstrukts in das Genom integriert worden war. Des Weiteren wurde bei der Linie 6 die Integration eines unvollständigen Fragments des Mikroinjektionskonstrukts nachgewiesen. Die Integration von Teilfragmenten der TK-porcTGF $\beta$ 1-Expressionskassette wurde ebenfalls bei der TGF-tg Linie 4 durch Southern-Blot-Analyse nach *ScaI*-Verdau sowie bei den TGF-tg Linien 3 und 5 durch PCR-Analyse festgestellt. Ursachen hiervon dürften eine mechanische oder enzymatische Fragmentierung des Konstrukts bei Aufreinigung vor der Mikroinjektion oder eine Degradierung des in die Vorkerne der Zygote injizierten linearisierten Konstrukts durch endogene Nukleasen sein (Rulicke & Hubscher 2000).

Die exakte Anzahl der integrierten Kopien der Mikroinjektionskonstrukte und deren Anordnung zueinander wurde nicht bestimmt, da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Bestimmung der Transgenexpression, der Überprüfung der Funktionalität des Mifepristone-induzierbaren Genregulationssystems und der biologischen Aktivität lag.

### **5.1.2 Transgenexpression**

Die mRNA für den chimären Transaktivator GLVPc wurde von den MHC-tg Mäusen in allen untersuchten Organen wie Haut, Zwerchfell, M. quadriceps, Ventrikelmyokard, Niere, Leber, Lunge, Milz, Großhirn, Stammhirn/Kleinhirn und Hoden bzw. Uterus exprimiert. Die Transkription des GLVPc wird durch den murinen Promotor  $\alpha$ MyHC (alpha myosin heavy chain) reguliert.  $\alpha$ MyHC ist eine Isoform der schweren Kette des Myosins und bildet zusammen mit anderen Proteinen, wie den leichten Ketten des Myosins, den kontraktilen Apparat der Herzmuskelzellen, die Sarkomere. Zu unterscheiden sind die beiden Isoformen  $\alpha$ MyHC und  $\beta$ MyHC. Die Expression wird gewebe- und entwicklungspezifisch reguliert (Lyons *et al.* 1990; Morkin 2000). So wird  $\alpha$ MyHC im Gegensatz zu  $\beta$ MyHC bei der Maus postnatal in den Herzmuskelzellen des Atriums und des Ventrikels auf hohem Niveau exprimiert (Gulick *et al.* 1991). Die mittels Northern-Blot festgestellte hohe Transgenexpression im Ventrikelmyokard stimmt mit diesem Expressionsmuster überein. Des Weiteren wurde neben der starken Expression von  $\alpha$ MyHC in den Herzmuskelzellen ebenfalls eine geringe Transkription in der quergestreiften Muskulatur des Zwerchfells (Gulick

*et al.* 1991), in der extraokkulären Muskulatur (Morkin 2000) und im „pulmonären Myokard“, der Muskelschicht von Lungenvenen (Subramaniam *et al.* 1991; Jones *et al.* 1994), bei der Maus beschrieben. Transgenexpression unter der Kontrolle des  $\alpha$ MyHC-Promotors wurde von Takeuchi *et al.* (1999) ebenfalls in der Niere nachgewiesen.

Da jedoch abweichend von der Literatur in weiteren Organen GLVPc-Transkripte detektiert wurden, erfolgte eine Analyse der endogenen  $\alpha$ MyHC-Expression in den Organen, in denen Transgentranskripte festgestellt worden waren. Die mittels Northern-Blot-Analysen detektierte hohe mRNA-Expression von  $\alpha$ MyHC im Ventrikelmyokard und relativ niedrige Expression in Zwerchfell und Lunge stimmt mit dem in der Literatur beschriebenen Expressionsmuster überein (Gulick *et al.* 1991; Subramaniam *et al.* 1991; Jones *et al.* 1994). Es wurden jedoch auch in allen anderen analysierten Organen, in welchen eine Transgenexpression stattgefunden hatte,  $\alpha$ MyHC-Transkripte festgestellt. Dies lässt auf eine weit verbreitete Expression von  $\alpha$ MyHC in der Maus schließen. In der murinen Lunge wurde die  $\alpha$ MyHC-Expression in der Muskelschicht der Lungenvenen lokalisiert (Subramaniam *et al.* 1991; Jones *et al.* 1994). So ist anzunehmen, dass möglicherweise auch in anderen Organen als der Lunge die Gefäße der Ort der endogenen  $\alpha$ MyHC-Transkription sein könnten. Des Weiteren lässt sich aufgrund der endogenen  $\alpha$ MyHC-Expressionsdaten schlussfolgern, dass das Expressionsmuster des chimären Transaktivators GLVPc in beiden MHC-tg Linien auf die spezifische Regulation durch den  $\alpha$ MyHC-Promotor zurückzuführen ist. Ein möglicher Positionseffekt der Transgenintegration dürfte daher nur einen geringen Einfluss auf die Transgenexpression dieser Tiere haben.

Für die Transgenexpression von TGF- $\beta$ 1 bei der Maus wurde die cDNA des porcinen TGF- $\beta$ 1 verwendet, da das porcine Protein mit den murinen TGF- $\beta$ 1-Rezeptoren funktionelle Interaktionen zeigt (Agah *et al.* 2000). Die eingesetzte cDNA wies zudem Mutationen auf, die bei der Translation zu einem Aminosäureeinbau von Serin anstelle von Cystein an den Positionen 223 und 225 führen. Damit wird konstitutiv aktiver, nicht über Latenz regulierter TGF- $\beta$ 1 translatiert (Brunner *et al.* 1989). Bei dem hier verwendeten Mifepristone-induzierbaren Genregulationssystem sollte durch die Expression des chimären Transaktivators die Transkription der Zielgens, in

---

diesem Fall von porcinem TGF- $\beta$ 1, kontrolliert werden. Die Höhe der basalen Expression des Zielgens hängt von der Expressionshöhe des chimären Transaktivatorproteins ab (Zhao *et al.* 2001): Je höher dessen Expression ist, desto höher ist auch die basale Expression des Zielgens wie auch die Expressionserhöhung des Zielgens nach Verabreichung von Mifepristone. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass in beiden MHC-tg Linien etwa gleiche mRNA-Transkriptmengen von GLVPc mittels Northern-Blot-Analysen in der Herzventrikelmuskulatur detektiert wurden.

Die Transkription von porcinem mutiertem TGF- $\beta$ 1 wurde bei TGF-tg Mäusen in allen untersuchten Organen wie Haut, Zwerchfell, M. quadriceps, Ventrikelmyokard, Niere, Leber, Lunge, Milz, Großhirn, Stammhirn/Kleinhirn und Uterus nachgewiesen. Diese basale Expression könnte sowohl durch einen Positionseffekt aufgrund der Transgenintegration als auch durch eine möglicherweise zu geringe Transkriptionskontrolle durch die vier dem Minimalpromotor der Thymidinkinase vorangestellten Gal4-DNA-Bindestellen erklärt werden. Weitere Untersuchungen zur Klärung der genauen Ursachen sind notwendig. Da die TGF-tg Tiere phänotypisch keine durch TGF- $\beta$ 1 verursachten Veränderungen aufwiesen und fertil waren, wurden sie zur Anpaarung mit MHC-tg Mäusen verwendet, um die Funktionalität des Mifepristone-induzierbaren Genregulationssystems zu überprüfen.

Analog zu den Expressionsdaten der TGF-tg Tiere wurde bei dtg Tieren in allen untersuchten Organen unabhängig von der Transkriptionsinduktion durch Mifepristone mRNA des porcinen TGF- $\beta$ 1-Transgens nachgewiesen. Die Höhe der Transgenexpression v.a. im Herzen unterschied sich aber zwischen dtg und TGF-tg Mäusen deutlich. So wurde in Northern-Blot-Analysen bei TGF-tg Mäusen im Ventrikelmyokard keine porcine TGF- $\beta$ 1-mRNA detektiert, dagegen waren bei dtg Tieren die zwei Banden für porcinen TGF- $\beta$ 1 nachweisbar. Dieses Bandenmuster wurde in anderen Arbeiten mit porcinen TGF- $\beta$ 1-transgenen Mäusen ebenfalls detektiert (Nakajima *et al.* 2000). Aufgrund einer erhöhten mRNA-Expression von porcinem TGF- $\beta$ 1 in dtg vs. TGF-tg Tieren ist anzunehmen, dass der chimäre Transaktivator GLVPc korrekt translatiert wurde und bereits ohne Induktion von Mifepristone die Transkription des Zielgens induzieren konnte. In diesem

Zusammenhang fiel auf, dass ein großer Teil der in den ersten vier Lebenswochen verendeten Nachkommen aus Anpaarungen von TGF-tg mit MHC-tg Tieren doppelt-transgen war. Die hohe Letalität ist mit großer Wahrscheinlichkeit sowohl auf die basale als auch auf die durch den chimären Transaktivator gesteigerte Expression von konstitutiv aktivem porcinem TGF- $\beta$ 1 zurückzuführen.

Zur Untersuchung der Induzierbarkeit der porcinen TGF- $\beta$ 1-Transgenexpression durch Gabe von Mifepristone wurde die Transkriptionshöhe des Transgens im Ventrikelmyokard von zwei Versuchsgruppen analysiert. So wurde im Vergleich zu dtg Tieren der Linienkombination L6/L4 bei der dtg Maus mit Mifepristonegabe eine höhere Transgenexpression als bei der ohne Mifepristoneverabreichung detektiert. Dies entspräche der erwarteten Induzierbarkeit der Zielgenexpression durch das Mifepristone-induzierbare Genregulationssystem. Dieses Ergebnis war jedoch nicht reproduzierbar, da bei der anderen Versuchsgruppe aus Tieren der Linienkombination L8/L4 das ungespritzte dtg Kontrolltier eine höhere porcine TGF- $\beta$ 1-Expression als die gespritzten dtg Mäuse aufwies.

Die basale Expression des Zielgens hängt von der Expressionshöhe des GLVPc ab, die durch den  $\alpha$ MyHC-Promotor reguliert wird. Dieser besitzt zahlreiche cis-regulatorische Elemente, wie z.B. Bindestellen für GATA-4, MEF-2 oder TR, durch welche die endogene Regulation von  $\alpha$ MyHC gewebespezifisch und als Antwort auf verschiedene (patho-)physiologische Stimuli erfolgen kann (Subramaniam *et al.* 1993; Molkentin *et al.* 1994; Lee *et al.* 1997). So ist bei der Maus der erhöhte Blutspiegel von Schilddrüsenhormon, der in der perinatalen Periode beobachtet wird, für einen Isoform-Switch von  $\beta$ MyHC in  $\alpha$ MyHC in der Herzventrikelmuskulatur verantwortlich (Lompre *et al.* 1984). Eine Beeinflussung der  $\alpha$ MyHC-Expressionshöhe erfolgt ebenfalls u.a. durch Erhöhung des Blutdrucks und Herzhypertrophie (Abnahme des  $\alpha$ MyHC-Expressionsniveaus), durch Erhöhung von IGF-1- oder GH-Blutspiegeln (Erhöhung) als auch durch Seneszenz (Abnahme) (Morkin 2000). Somit könnte eine erhöhte Synthese des chimären Transaktivators durch den Einfluss endogener Faktoren auf den  $\alpha$ MyHC-Promotor reguliert werden und in der Folge auch in Abwesenheit von Mifepristone eine starke Induktion der Expression von konstitutiv aktivem TGF- $\beta$ 1 bei dtg Tieren bewirken.

---

Eine hohe Letalität während der Säugezeit war bei Nachkommen aus Anpaarungen zur Generierung dtg Mäuse festzustellen. Dieser Effekt war stärker, wenn die Kombination TGF-tg Vatertier und MHC-tg Muttertier vorlag. Hier starben die Nachkommen mit einem durchschnittlichen Alter von 7,1 Tagen, kein dtg Tier erreichte ein Alter von vier Wochen. Auch bei der umgekehrten Anpaarungskombination (MHC-tg Vatertier und TGF-tg Muttertier) befand sich ein großer Anteil an dtg Tieren unter den mit durchschnittlich 12 Tagen verendeten Nachkommen. Jedoch gab es auch lebende dtg Tiere, die bis zu neun Monate alt wurden. Möglicherweise beeinflussen Faktoren in der Muttermilch der MHC-tg Tiere die Sterblichkeitsrate ihrer (dtg) Nachkommen.

Bei Jungtieren erfolgen in der perinatalen Periode wichtige Veränderungen im endogenen Hormonstatus. Des Weiteren werden von den Jungtieren über die Muttermilch neben den Nährstoffen auch exogene maternale Botenstoffe, wie z.B. Wachstumshormon oder Schilddrüsenhormon, oral aufgenommen (Strbak *et al.* 1974; Akasha *et al.* 1987; Nagasawa *et al.* 1988; Slebodzinski & Twardon 2004). So könnte es möglich sein, dass bei Jungtieren sowohl durch die über die Muttermilch aufgenommenen Botenstoffe als auch durch endogene Hormone eine Steigerung der GLVPc-Transgenexpression durch den  $\alpha$ MyHC-Promotor bewirkt wurde. Durch die Bindung des GLVPc an die Gal4-Aktivierungssequenzen im Promotorbereich des zweiten Transgenkonstrukts (UAS) wird die Transkription von porcinem TGF- $\beta$ 1 bereits in Abwesenheit von Mifepristone hochreguliert, was vermutlich nach Überschreiten eines Schwellenwertes letal ist. Sowohl die Höhe oder Dauer der TGF- $\beta$ 1-Expression, welche letal wirkt, als auch die über die Muttermilch übertragenen, die GLVPc-Transgenexpression beeinflussenden Botenstoffe bzw. der Hormonstatus der Jungtiere während der Säugezeit wurden bisher nicht untersucht.

Durch die Verwendung dieses Mifepristone-induzierbaren Genregulationssystems sollte eine räumliche und zeitliche Kontrolle der Transgenexpression von konstitutiv aktivem TGF- $\beta$ 1 im Herzen erzielt werden. Der chimäre Transaktivator wurde im Ventrikelmyokard funktionell aktiv stark exprimiert, Transkription wurde jedoch auch in anderen Organen wie der Lunge nachgewiesen, allerdings war die Expression dort niedriger. Somit konnte durch Einsatz des  $\alpha$ MyHC-Promotors keine nur auf das Herz beschränkte strenge räumliche Kontrolle der Transgenexpression erreicht werden.

---

Dieser Befund ist jedoch vernachlässigbar, da für Transplantationsexperimente zur Aufklärung der Wirksamkeit von TGF- $\beta$ 1 in diesem Zusammenhang nur die Expressionshöhe im Spenderorgan, nämlich im Herzen, wichtig ist.

Des Weiteren wurde bei TGF-tg Tieren das Transgen basal transkribiert. Dies hatte jedoch keine erkennbaren Auswirkungen auf die Fertilität und Lebenserwartung dieser Mäuse. Sie wurden daher zur Anpaarung mit MHC-tg Tieren verwendet. In dtg Tieren wurde die Expression von konstitutiv aktivem porcinem TGF- $\beta$ 1 durch den chimären Transaktivator stark hochreguliert. Dies erfolgte jedoch auch unabhängig von der Anwesenheit des Induktors Mifepristone. Somit lag keine zeitliche Kontrolle über die Transgenexpression von TGF- $\beta$ 1 vor, was durch zeitlich nicht begrenzte hohe Expressionsniveaus zum Tod dtg Nachkommen geführt haben könnte. Die dtg Mäuse, die die Säugezeit überlebten, wiesen, abgesehen von vereinzelt Todesfällen, eine ähnliche Lebenserwartung wie die Wurfgeschwister auf.

Trotz der fehlenden zeitlichen Kontrolle der TGF- $\beta$ 1-Transgenexpression könnten die Herzen von dtg Mäusen für die *In-vivo*-Analyse der möglichen protektiven Wirkung von TGF- $\beta$ 1 vor einer zellulären Transplantatabstoßungsreaktion verwendet werden, da sie konstitutiv aktiven TGF- $\beta$ 1 im Herzen synthetisieren. Für die Induktion der Transplantattoleranz dürfte eine Transgenexpression zum Zeitpunkt der Transplantation von Bedeutung sein (Josien *et al.* 1998). Ob eine protektive Wirkung auf das Transplantatüberleben durch aktiven TGF- $\beta$ 1 allein oder in Koexpression mit FasL auftritt, und falls ja, wie lange die Transgenexpression erfolgen muss, bedarf der Durchführung von Herztransplantationen im Nagetiermodell. Die Zucht dieser dtg Organspendertiere muss über die Anpaarungskombination von MHC-tg Vatertier mit TGF-tg Muttertier erfolgen.

Sollten transgene Schweine für die Expression von konstitutiv aktivem TGF- $\beta$ 1 erstellt werden, so ist ein anderes bzw. ein modifiziertes Genregulationssystem zu verwenden, welches eine sichere zeitliche und räumliche Kontrolle der TGF- $\beta$ 1-Expression gewährleistet. Des Weiteren ist zu beachten, dass bei Spezies mit niedrigerer Schlagfrequenz des Herzens im Vergleich zur Maus, wie das bei Mensch und Rind der Fall ist, postnatal ein größerer Anteil an der  $\beta$ -Isoform des MyHC

vorliegt, wohingegen  $\alpha$ MyHC nur in relativ geringen Mengen in der Herzventrikelmuskulatur vorhanden ist (Morkin 2000). Daher dürfte der bei den Mäusen verwendete  $\alpha$ MyHC-Promotor für eine hohe Transgenexpression im Schweineherzen nicht geeignet sein.

## 5.2 H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-transgene Schweine

Die H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-transgenen Schweine wurden über Mikroinjektion eines Expressionsvektors für humanen TRAIL in Zygoten erstellt. Es wurden keine Auffälligkeiten des Gesundheitszustandes und Habitus der transgenen Tiere im Vergleich zu den Wurfgeschwistern festgestellt. Mäuse mit transgener Expression von TRAIL wurden in der Literatur bisher nicht beschrieben. TRAIL-Knockout-Mäuse wiesen eine erhöhte Prädisposition gegenüber Autoimmunkrankheiten und Metastasierung tumoröser Zellen auf (Cretney *et al.* 2002; Lamhamedi-Cherradi *et al.* 2003).

### 5.2.1 Identifizierung und Charakterisierung der Transgenintegration

Zur Charakterisierung der H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-transgenen Linien wurden Southern-Blot-Analysen durchgeführt. So wurde bei fünf von sechs untersuchten H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-transgenen Founderschweinen das Vorliegen mehrerer unabhängiger Integrationsereignisse nachgewiesen. Bei vier von fünf Foundertieren erfolgte überdies eine Aufspaltung in zwei bis drei Unterlinien. Eine weitere Auftrennung in Unterlinien, wie z.B. von dem Foundertier 6985, kann aufgrund des komplexen Bandenmusters nach *ScaI*-Verdau, dem möglichen Überlappen von mehreren Banden ähnlicher Größe nach *HindIII*-Verdau und der geringen Anzahl an F1-Nachkommen (drei Tiere bei 6985) nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren fiel auf, dass bei der Linie 6973 über zwei Generationen keine Segregation der an zwei unabhängigen Chromosomenabschnitten integrierten Transgenkonstrukte erfolgte. Es wird daher angenommen, dass diese auf demselben Chromosom integriert wurden. Dies bedarf jedoch einer weiteren Klärung.

Bezüglich der integrierten Kopienzahl des Mikroinjektionskonstrukts wurden deutliche Unterschiede zwischen den Linien festgestellt. So waren in den Founderlinien 6983 und 6985 deutlich mehr Kopien in das Genom integriert als z.B. in der Linie 6967. Die Kopienzahl unterschied sich auch innerhalb von Wurfgeschwistern derselben Linie, wie z.B. 6983 a. Ursächlich hierfür könnte ein Verlust an Transgenkopien im Bereich der Concatemere bei einigen Tieren sein, was zu einer besseren Stabilität der Chromatinstruktur beitragen sollte (Rulicke & Hubscher 2000). Dies hat möglicherweise positive Auswirkungen auf die Transgenexpressionshöhe. Des Weiteren wurde bei den Linien 6985 a und b im *Scal*-Verdau die Integration von Teilfragmenten des H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-Konstrukts nachgewiesen. Die Ursache für die Bildung dieser Fragmente dürfte ebenfalls in Verbindung mit der Aufreinigung der DNA für die Mikroinjektion oder mit einer Degradierung durch endogene Nukleasen der Zygote nach Mikroinjektion stehen, wie unter Abschnitt 5.1.1 beschrieben.

### **5.2.2 Transgenexpression**

Das H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-Transgen wurde bei zahlreichen Linien in allen untersuchten Geweben wie Haut, Herz, Hoden, Leber, Lunge, Milz, Muskel und Niere transkribiert und korrekt gespliced. In der Linie 6965 b wurde dagegen keine Expression des Transgens nachgewiesen. Die fehlende Transkription kann auf zahlreiche Faktoren – wie genomisches „Imprinting“ oder Positionseffekte aufgrund des Integrationsortes – zurückzuführen sein (Rulicke & Hubscher 2000).

Das Expressionsmuster der humanen TRAIL-mRNA wurde auf Proteinebene durch Western-Immunoblot-Analysen weitgehend bestätigt. Eine mögliche Expression im Muskel konnte jedoch aufgrund technischer Probleme bei der Proteinprobenaufbereitung nicht analysiert werden.

Die Transgenexpression wird durch den murinen H-2K<sup>b</sup>-Promotor reguliert, der die Transkription des H-2K<sup>b</sup>-Gens kontrolliert. Dieses Gen ist eines der MHC-Klasse 1-Gene der Maus, welche für die schwere Kette der membranständigen H-2-Antigene kodieren (David-Watine *et al.* 1990). Deren Expression erfolgt auf nahezu allen Zelltypen, Endothelzellen eingeschlossen (Momburg *et al.* 1986; Johnson & Pober 1990). Das Expressionsmuster wird entwicklungsabhängig und gewebespezifisch

---

reguliert. So werden bei der adulten Maus H-2-Antigene auf höchstem Niveau in den sekundären lymphatischen Organen, wie Milz und Lymphknoten, und auf hohem Niveau in der Lunge und im Darm exprimiert. Weiterhin wurden mittlere Expressionsniveaus im Thymus, in der Leber, im Herzen und in der Niere beschrieben. Im Hoden und in der Skelettmuskulatur wurde eine geringe Expression nachgewiesen (Drezen *et al.* 1993).

Ein ähnliches Expressionsmuster wurde bei postnatalen H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-transgenen Schweinen in allen untersuchten Linien nachgewiesen. Dies war zu erwarten, da sich die für die gewebespezifische Transkription notwendigen cis-regulatorischen Elemente innerhalb der 2 kb großen Promotorsequenz befinden, die zur Regulation der Transgenexpression verwendet wurde (Drezen *et al.* 1992). Somit war eine Interaktion von porcinen Transkriptionsfaktoren mit den cis-regulatorischen Elementen des murinen H-2K<sup>b</sup>-Promotors und damit eine gewebespezifische Regulation der Transgenexpression möglich. Eine Ausnahme bildete die teilweise höhere, vermutlich von der Geschlechtsreife abhängige Transgenexpression im Hoden. Da diese in mehreren Linien nachgewiesen wurde, ist ein Positionseffekt der Transgenintegration als Ursache weniger wahrscheinlich. Ob in diesem Fall eine Speziesinkompatibilität eines Transkriptionsfaktors vorliegt, wurde nicht untersucht. Eine weitere Abweichung vom Expressionsmuster der murinen H-2-Antigene stellte die Expression von humanem TRAIL im Herzen dar, die bisher nur bei einem H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-transgenen Tier gefunden wurde. Dieses Organ sollte jedoch aufgrund der Expressionsdaten für murines H-2-Antigen ein vergleichbares Expressionsniveau wie Leber oder Niere aufweisen.

Neben der organspezifischen Expression ist ebenfalls die Lokalisation des humanen TRAIL-Proteins von Bedeutung. So ist eine Expression von TRAIL auf der Zellmembran eine wichtige Voraussetzung für eine Interaktion mit TRAIL-Rezeptoren auf den Zielzellen und folglich für die mögliche protektive Wirkung von TRAIL gegen zelluläre Abstoßung des porcinen Xenotransplantats. Durch Analysen von fraktionierten Proteinpräparationen wurde gezeigt, dass TRAIL ausschließlich in der Membranfraktion und nicht im Zytoplasma lokalisiert war.

---

Es fiel auf, dass Tiere der Linie 6965 a im Durchschnitt niedrigere Expressionsniveaus aufwiesen als Tiere der Linie 6967. Diese Unterschiede dürften auf Positionseffekte zurückzuführen sein, bei denen die Transgentranskription durch cis-regulatorische Elemente in der genomischen Umgebung der Integrationsstelle oder durch unterschiedliche Stabilität der das Transgenkonstrukt enthaltenen Chromatinstruktur beeinflusst sein kann (Rulicke & Hubscher 2000). In den anderen Linien lagen noch zu wenige Daten von Einzeltieren vor, um linienvergleichende Aussagen über die humane TRAIL-Expressionshöhe treffen zu können. Um dennoch eine Einschätzung der Transgenexpression vornehmen zu können, wurden in bisher nicht bzw. wenig untersuchten Linien PBL von lebenden Tieren zur Proteingewinnung und Transgenanalyse verwendet, da die Expressionshöhe auf PBL die Verhältnisse in der Milz in etwa widerspiegelte. Die Identifizierung von gut exprimierenden Tieren bzw. Linien über Transgenexpression auf PBL stellte einen Kompromiss dar, um die Anzahl der Tiere bzw. Linien für die Linienzucht und die nachfolgenden umfassenden Einzeltieruntersuchungen einzugrenzen. Durch die Untersuchung der humanen TRAIL-Proteinexpression auf PBL konnte jedoch keine Aussage über die Expression in anderen Zelltypen und Organen gemacht werden. Es wurde allerdings angenommen, dass Tiere mit niedriger bzw. fehlender Transgenexpression auf einem Zelltyp, der im Organspektrum das höchste Expressionsniveau aufweisen sollte, in anderen Geweben ebenfalls nur geringe Mengen an Transgen exprimieren dürften. Diese Tiere wurden daher für die Zucht nicht berücksichtigt. So sollte durch Selektion von wahrscheinlich gut exprimierenden Einzeltieren die Erstellung transgener Linien für Xenotransplantationsexperimente möglichst kosten- und zeitsparend erfolgen.

Der H-2K<sup>b</sup>-Promotor enthält zahlreiche cis-regulatorische Elemente, an die z.B. durch verschiedene Zytokine wie IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  induzierte Transkriptionsfaktoren binden können. Daher wird bei Anwesenheit von Zytokinen die Transkription durch diesen Promotor induziert bzw. verstärkt. So ist die Transkriptionsregulation der MHC-Klasse 1-Antigene vom physiologischen Status des Tieres abhängig (David-Watine *et al.* 1990; Johnson & Pober 1990; Singer & Maguire 1990; Drezen *et al.* 1992). Aktivierte Lymphozyten sind in der Lage, nach Stimulation z.B. durch das Mitogen ConA, Zytokine zu sezernieren. Ein solcher Mechanismus der Zytokinsekretion und nachfolgender Transkriptionsinduktion liegt möglicherweise der

---

Beobachtung zugrunde, dass nach Stimulation von H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-transgenen PBL mit den Mitogenen ConA bzw. PHA bei diesen Zellen eine erhöhte humane TRAIL-Expression auftrat. Dies wurde ebenfalls bei transgenen Zellen, die mit den Mediumüberständen von stimulierten porcinen Wildtyp-PBL inkubiert wurden, festgestellt. Fodor et al. (1994) wiesen nach Stimulation von porcinen H-2K<sup>b</sup>-huCD59-transgenen PBL mit humanem rekombinatem TNF- $\alpha$  und/oder Überständen von PHA-stimulierten porcinen Kontrollzellen ebenfalls eine Steigerung der Transgenexpression nach. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass porcine Transkriptionsfaktoren an die entsprechenden cis-regulatorischen Elemente des murinen H-2K<sup>b</sup>-Promotors binden und die Regulation der Transgenexpression in Abhängigkeit vom Zytokinmilieu beeinflussen können. Welche porcinen Zytokine und die von ihnen induzierten Transkriptionsfaktoren an den murinen H-2K<sup>b</sup>-Promotor binden können, wurde nicht näher untersucht.

Als Antwort auf einen zytokinmedierten Entzündungsreiz könnte trotz anfänglich niedriger Transgenexpression auf dem porcinen Spenderorgan nach Xenotransplantation die humane TRAIL-Transkription hochreguliert werden und somit die mögliche protektive Wirkung von humanem TRAIL verstärken. Möglicherweise war ein solcher Entzündungsreiz für die deutlich unterschiedlichen Expressionshöhen bei Tieren derselben Linie verantwortlich. Überdies wurden unterschiedliche Transgenexpressionsniveaus auf PBL derselben Tiere zu zwei verschiedenen Jahreszeiten nachgewiesen, was den höheren Infektionsdruck zum Ende des Winters widerspiegeln dürfte.

Bei Mäusen reguliert der H-2K-Promotor die Antigenexpression entwicklungsstadienspezifisch. So wurden in Mäuseembryonen an Tag 7,5 post coitum (p.c.) geringe Mengen an H-2K-mRNA nachgewiesen (Hedley et al. 1989). Zwischen Tag 11 p.c. und Tag 13 p.c. stieg die H-2-Expression um den Faktor 10 sehr stark an. Danach erfolgte ein langsamerer Anstieg, bis das adulte Expressionsniveau mit einem Alter von etwa sechs Wochen erreicht wurde. Bei Tag 13 alten Mäuseembryonen war die Leber das Organ mit der höchsten H-2K-Expression (Ozato et al. 1985; Drezen et al. 1992). Ob auch beim Schwein eine entwicklungsabhängige Expressionsregulation durch den murinen H-2K<sup>b</sup>-Promotor erfolgt, wurde durch Analyse der humanen TRAIL-Expression in Gewebelysaten aus Thymus, Milz, Leber und Lunge von Tieren

---

der Linie 6967 von unterschiedlichen Altersstufen [Graviditätstag (GT) 73, GT 98, 2 Wochen post natum (p.n.), 10 Wochen p.n.] untersucht. So wurde festgestellt, dass eine entwicklungsabhängige Regulation der Transgenexpression in Tieren der Linie 6967 durch den murinen H-2K<sup>b</sup>-Promotor erfolgte. Dies widerspricht Befunden von Drezen et al. (1992), die bei Analysen der Transgenexpression von Mäusen keine entwicklungsabhängige Regulation durch einen vergleichbaren H-2K<sup>b</sup>-Promotor feststellen konnten.

In der Maus wurde in den sekundären lymphatischen Organen wie der Milz, in der ab Tag 15 p.c. die Hämatopoese erfolgt, eine hohe H-2-Antigenexpression nachgewiesen (Singer & Maguire 1990; Geiger *et al.* 1998). Da beim Schwein die Milz ab dem GT 60 als typisches sekundär lymphatisches Organ wirkt (Rehakova *et al.* 1998), ist anzunehmen, dass die relativ hohe humane TRAIL-Expression in der Milz an GT 73 und der weitere Anstieg bis zu einem Alter von zwei Wochen auf diese Funktion zurückzuführen ist. Parallelen der entwicklungsabhängigen Regulation der Transgenexpression mit der Organfunktion lassen sich ebenfalls bei der Leber ziehen. So wurde festgestellt, dass bei der Maus die Leber an Tag 13 p.c. das Organ mit der höchsten H-2K-Expression war (Ozato *et al.* 1985). Zu diesem Zeitpunkt ist die Leber hämatopoetisch aktiv (Medvinsky & Dzierzak 1998). Bei transgenen Schweinen wies die Leber im Organvergleich an GT 73 eine höhere humane TRAIL-Expression als bei fortgeschrittener Entwicklung auf. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die porcine fetale Leber bis zum GT 45 ein primäres hämatopoetisches Organ ist (Sinkora *et al.* 2000; Sinkora *et al.* 2002). Es ist daher zu vermuten, dass die porcine Leber im ersten Trimester der Gravidität aufgrund ihrer hämatopoetischen Funktion ebenfalls das Organ mit der höchsten Transgenexpression ist. In der Lunge lag an GT 73 die Transgenexpression unterhalb der Nachweisgrenze im Western-Immunoblot. Der starke Anstieg der Transgenexpression bis zu einem Alter von zwei Wochen könnte mit der Lungenentwicklung (sakkuläre und alveoläre Phase), der Ausbildung des lymphatischen Systems in der Lunge sowie der Exposition gegenüber möglichen Pathogenen in Zusammenhang stehen (Ruesse & Sinowatz 1991). Somit wurde in der Leber, Lunge und Milz ein entwicklungsabhängiger Anstieg der Transgenexpression nachgewiesen.

---

Im Thymus wurde während der gesamten Spätgravidität humanes TRAIL auf relativ hohem Expressionsniveau nachgewiesen. MHC-Klasse 1-Moleküle sind im Thymus für die Selektion und Differenzierung von CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten aus Vorläuferzellen von Bedeutung (Gill *et al.* 2003). Dieser Prozess beginnt beim Schwein um den GT 40 (Sinkora *et al.* 2000; Sinkora *et al.* 2002). Die Abnahme der Transgenexpression im Thymus zwischen GT 98 und zwei Wochen p.n. könnte mit der Involution dieses Organs und der relativen Verdrängung der MHC-Klasse 1-exprimierenden Zellen durch Bindegewebszellen in Zusammenhang stehen.

Bei postnatalen Tieren hat möglicherweise der physiologische Status der Einzeltiere einen starken Einfluss auf die Expressionshöhe. So wurden sowohl bei zwei als auch bei zehn Wochen alten Tieren größere Unterschiede der humanen TRAIL-Expressionshöhe zwischen gleichaltrigen Wurfgeschwistern festgestellt. Außerdem war zu beobachten, dass bei Tieren, die eine relativ höhere Expression in der Milz aufwiesen, ebenfalls relativ mehr Protein in Leber und Lunge als bei den Altersgenossen detektiert wurde.

Membranständiger TRAIL auf PBL transgener Schweine war funktionell aktiv und konnte in TRAIL-sensitiven Jurkat-Zellen den programmierten Zelltod induzieren. Die Apoptoseinduktion von Jurkat-Zellen erfolgt nach einer Dosis-Wirkungs-Kurve (Schneider *et al.* 2003). Es muss daher eine Mindestmenge an funktionell aktivem trimerisiertem TRAIL vorliegen, damit bei den Zielzellen die Apoptose ausgelöst wird. Die humane TRAIL-Expression auf porcinen Hautfibroblasten dürfte unter bzw. im Bereich des Schwellenwertes für die Apoptoseinduktion in Jurkat-Zellen gelegen haben. Damit wäre die schlechte Reproduzierbarkeit des Apoptoseassays mit transgenen porcinen Hautfibroblasten als Effektorzellen zu erklären. Dagegen führten die höheren Transgenexpressionsniveaus auf PBL zu reproduzierbaren Ergebnissen, nämlich einer durch TRAIL verursachten erhöhten Apoptoserate in Jurkat-Zellen.

Die H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-transgenen Schweine exprimierten funktionell aktives humanes TRAIL auf der Zellmembran. Ob eine protektive Wirkung durch Expression dieses Transgens auf das Transplantatüberleben *in-vivo* auftritt, könnte durch Xenotransplantations-Experimente im „pig-to-primate“-Modell untersucht werden.

Bevor jedoch humanen TRAIL-exprimierende Schweine als Spendertiere für die Xenotransplantation auf nicht humane Primaten verwendet werden können, muss TRAIL mit einem Transgen kombiniert werden, durch welches die HAR nach Xenotransplantation verhindert wird, z.B. durch humanen DAF. In solchen dtg Tieren könnte die mögliche protektive Wirkung von humanem TRAIL *in-vivo* untersucht werden. Durch die Verwendung von homozygot-H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-transgenen Tieren für die Anpaarung mit hDAF-transgenen Schweinen kann der Anteil an dtg Nachkommen erhöht werden. Die Identifizierung von homozygot-H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL-transgenen Tieren war mittels Southern-Blot-Analysen möglich. Eine hocheffiziente Methode zur Erstellung (multi-) transgener Schweine ist der lentiviralen Gentransfer in porcine Zygoten (Hofmann *et al.* 2003). Durch diese Methode könnte ein weiteres Transgen in TRAIL-transgene Zygoten zur Generierung multitransgener Schweine eingefügt werden.

### **5.3 Porciner TRAIL**

#### **5.3.1 cDNA-Sequenz von porcinem TRAIL**

Der ORF des porcinen TRAIL besteht aus 870 Nukleotiden und hat 85 % Identität mit der Nukleotidsequenz von humanem TRAIL. 75 % und 72 % Identität bestehen zwischen der Nukleotidsequenz von porcinem TRAIL zu den Sequenzen von Ratte bzw. Maus.

Die von der cDNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz hat eine Länge von 289 AS und besitzt 86 % Ähnlichkeit mit der von humanem TRAIL sowie 72 % und 70 % mit der TRAIL-Aminosäuresequenz von Ratte bzw. Maus. Die AS 172 bis 188 entsprechen der gemeinsamen Sequenz der Familie der TNF-Typ 2-Membranproteine. Der mögliche Transmembrananker, der für die Mitglieder dieser Familie beschrieben wurde, entspricht den AS 18 bis 28. Dieser ist in Schwein und Mensch hoch konserviert. Die Metallbindungsdomäne an Cystein 230 (Mensch) ist in Schwein, Mensch, Ratte und Maus ebenfalls hoch konserviert. An diese Aminosäure bindet Zink, welches für die Trimerisierung und Aktivität des TRAIL-Proteins wichtig ist (Bodmer *et al.* 2000; Hymowitz *et al.* 2000). Der hohe Grad an Übereinstimmung von porciner und humaner Aminosäuresequenz, besonders im Bereich der

C-terminalen Rezeptorbindungsdomäne, lässt eine Interaktion von porcinem TRAIL mit humanen TRAIL-Rezeptoren für möglich erscheinen.

### **5.3.2 Expression von porcinem TRAIL**

Porciner TRAIL wird ähnlich wie das humane Protein postnatal in einer Vielzahl von Organen ubiquitär exprimiert. Höchste Expressionsniveaus wurden hierbei in der Milz, der Leber und der Lunge detektiert. Porcine TRAIL-Transkripte wurden ebenfalls bei Feten an GT 73 und GT 98 in den untersuchten Organen Niere, Lunge und Leber durch qRT-PCR nachgewiesen. Dadurch wurde gezeigt, dass die TRAIL-Expression nicht auf das postnatale Leben beschränkt ist. Des Weiteren wurde die TRAIL-Transkription in den drei untersuchten Organen unterschiedlich entwicklungsabhängig reguliert. Im Gegensatz zu den während der Fetalentwicklung gleichbleibenden Expressionsniveaus in der Niere scheint es, dass die TRAIL-Transkription in der Lunge und der Leber reguliert war. Diese Organe wiesen eine deutliche Zunahme der mRNA-Transkriptmengen im letzten Drittel der Gravidität auf. Bei der fetalen Lunge korreliert diese deutliche Zunahme der Transkriptionshöhe mit der sakkulären Phase der Lungenentwicklung beim Schwein (Ruesse & Sinowatz 1991). Während dieser Phase erfolgt in der Lunge sowohl die Differenzierung und das Wachstum des bronchiolären und alveolären Systems wie auch die Entwicklung des Lungengefäßsystems. TRAIL dürfte an der Entwicklung des Lungengewebes beteiligt sein, da beschrieben wurde, dass TRAIL die Endothelzellmigration, die Vaskulogenese und die Synthese von extrazellulärer Matrix durch Lungenfibroblasten induzieren kann (Yurovsky 2003; Zauli *et al.* 2003; Secchiero *et al.* 2004). Überdies wurde TRAIL in der mittleren Gefäßmuskelschicht der Lungenarterien bei Maus, Ratte und Mensch detektiert (Gochuico *et al.* 2000; Secchiero *et al.* 2004). Postnatal waren ein weiterer leichter Anstieg der TRAIL-Expressionshöhe feststellbar und eine starke Abnahme beim adulten Tier. Wahrscheinlich steht die Zunahme der TRAIL-Expression in der porcinen Lunge mit dem Wachstum und der Differenzierung dieses Organs im Zusammenhang. Dies würde ebenfalls das niedrige TRAIL-Transkriptionsniveau bei dem adulten Tier erklären.

In der Leber war die Zunahme der TRAIL-Expressionshöhe in der Spätgravidität im Vergleich zu der in der Lunge weniger stark ausgeprägt. Dagegen wurde ein kontinuierlicher Anstieg der Transkriptmengen sowohl bei den zweiwöchigen als auch bei den adulten Tieren nachgewiesen. Bis zu 40 % der Leber-NK-Zellen exprimieren bei der Maus TRAIL konstitutiv (Ochi *et al.* 2004). Falls dies auch beim Schwein zutrifft, dürfte die mit dem Alter zunehmende TRAIL-Transkription auf die kontinuierliche absolute Zunahme dieser TRAIL-exprimierenden Zellen in der wachsenden Leber zurückzuführen sein. Des Weiteren wird die TRAIL-Expression auf NK-Zellen der Leber durch IFN- $\gamma$  hochreguliert (Smyth *et al.* 2001). Von Makrophagen und mononukleären Zellen der Leber wird nach Kontakt mit vom Portalblut abstammenden Infektionserregern und bakteriellen Endotoxinen u.a. auch dieses Zytokin gebildet. Da die mikrobielle Besiedelung des Darmtrakts kurz nach der Geburt erfolgt, dürfte dies nach Aktivierung von TRAIL-exprimierenden Leber-NK-Zellen zu einer starken Zunahme der postnatalen TRAIL-Transkriptmenge beim Schwein führen. Überdies dürfte ebenfalls der jeweilige Immunstatus des Tieres Auswirkungen auf die TRAIL-Expressionshöhe haben.

## 6 Zusammenfassung

Die Generierung genetisch modifizierter Organspendertiere stellt eine Möglichkeit dar, die Überlebenszeit eines porcinen Xenotransplantats in einem humanen Empfänger zu verlängern. So könnte durch Transgenexpression von TGF- $\beta$ 1 oder TRAIL auf dem Xenotransplantat möglicherweise die zelluläre Abstoßungsreaktion inhibiert werden. Grundlagen zur Untersuchung dieser Strategien *in-vivo* wurden durch die hier analysierten Tiermodelle in Maus und Schwein geschaffen.

In Mäusen wurde ein Modell eines Mifepristone-induzierbaren Genregulatorsystems etabliert, das die gewebespezifische und zeitlich kontrollierte Expression von konstitutiv aktivem TGF- $\beta$ 1 ermöglichen sollte. In diesem System sollte der chimäre Transaktivator GLVPc nur im Herzen exprimiert werden, und dieser sollte in doppelt-transgenen (dtg) Mäusen erst nach Verabreichung des Induktors Mifepristone eine auf das Herz beschränkte, zeitlich kontrollierbare Expression von konstitutiv aktivem TGF- $\beta$ 1 induzieren. Eine herzspezifische Expression sollte durch den murinen *alpha myosin heavy chain* ( $\alpha$ MyHC)-Promotor erreicht werden. Schon die Analyse der einfach-transgenen Mauslinien ergab jedoch eine ubiquitäre Expression von mRNA des Transaktivators bzw. des konstitutiv aktiven TGF- $\beta$ 1 in allen untersuchten Organen. Außerdem wurde im Herzen von dtg Mäusen eine von der Mifepristone-Gabe unabhängige hohe Transgenexpression von TGF- $\beta$ 1 nachgewiesen und eine Expressionssteigerung von TGF- $\beta$ 1 nach Mifepristone-Gabe war nicht reproduzierbar. Auffällig war überdies die hohe Letalität dtg Mäuse innerhalb der ersten vier Lebenswochen. Somit wurde durch das verwendete Genregulationssystem keine auf das Herz beschränkte, zeitlich kontrollierbare Transgenexpression von TGF- $\beta$ 1 erreicht.

Da jedoch konstitutiv aktives TGF- $\beta$ 1 im Myokard dtg Mäuse synthetisiert wurde, könnten diese Herzen dennoch für Transplantationsversuche verwendet werden. Dadurch wäre zumindest die Untersuchung der Wirkung von TGF- $\beta$ 1 auf das Transplantatüberleben möglich. Sollten transgene Schweine für die Expression von konstitutiv aktivem TGF- $\beta$ 1 erstellt werden, so wäre allerdings ein anderes bzw. modifiziertes Genregulationssystem zu verwenden, welches eine sichere zeitliche und gewebespezifische Kontrolle der TGF- $\beta$ 1-Expression gewährleistet. Des

Weiteren dürfte der bei den Mäusen verwendete  $\alpha$ MyHC-Promotor für eine hohe Transgenexpression im Schweineherzen nicht geeignet sein.

Das untersuchte porcine Tiermodell umfasste verschiedene transgene Schweinelinien, die ein Expressionskonstrukt für humanen TRAIL unter der Kontrolle des murinen H-2K<sup>b</sup>-Promotors integriert haben. Transgenexpression wurde in zahlreichen Organen mit höchsten Expressionsniveaus in Milz und Lunge detektiert, was auf eine gewebespezifische Expression des Transgens durch den murinen Promotor hinwies. Des Weiteren wurde humanes TRAIL-Protein nur in der Zellmembranfraktion von Gewebelysaten detektiert und sollte daher für eine Interaktion mit Rezeptoren zugänglich sein. Überdies war eine Regulation der humanen TRAIL-Expression durch den murinen Promotor in aktivierten transgenen Lymphozyten zu beobachten, welche erhöhte Expressionsniveaus gegenüber nicht stimulierten Lymphozyten aufwiesen. Daher kann vermutet werden, dass die humane TRAIL-Expression bei Auftreten von Entzündungsreaktionen erhöht sein dürfte. Die biologische Wirksamkeit des Transgens wurde durch einen TRAIL-spezifischen Apoptose-induzierenden Effekt von transgenen Lymphoblasten auf Jurkat-Zellen gezeigt. All dies sind Voraussetzungen für einen möglichen protektiven Effekt von humanem TRAIL zur Verhinderung einer Zell-vermittelten Xenotransplantatabstoßung.

Die Selektion von bisher nicht oder wenig untersuchten Linien erfolgte durch Analyse der Transgenexpression auf peripheren Blutlymphozyten. Dies stellte einen Kompromiss dar, um kosten- und zeitsparend gut exprimierende transgene Schweine für die Zucht von homozygoten und/oder multitransgenen Tieren zu selektionieren.

Nicht nur das Expressionsmuster von humanem TRAIL und die Regulation durch den H-2K<sup>b</sup>-Promotor in transgenen Schweinen, sondern auch die Analyse der Sequenz und der Expression des endogenen porcinen TRAIL sind in Bezug auf ihren möglichen Einfluss auf des Überleben des Xenotransplantats von Interesse. Die Aminosäuresequenz von porcinem TRAIL hat 86 % Ähnlichkeit mit der von humanem TRAIL. Eine mögliche Interaktion von porcinem TRAIL mit humanen Rezeptoren ist anzunehmen. Außerdem wurde eine gewebespezifische und entwicklungsabhängige Expression von porcinem TRAIL in zahlreichen Organen nachgewiesen. Dies dürfte mit den verschiedenen Funktionen von porcinem TRAIL in Zusammenhang stehen.

## 7 Summary

### **Analysis of transgenic animal models for xenotransplantation**

Organ xenotransplantation is a tempting alternative to decrease the human organ shortage for transplantation. Generating genetically modified organ donor animals is a possibility to prolong the survival time of a porcine xenograft into a human recipient, as shown by preventing hyperacute rejection. Transgenic expression of TGF- $\beta$ 1 or TRAIL in xenografts might prevent cellular rejection. To confirm the utility of this approach *in vivo* we created and analysed two transgenic animal models in mouse and pig.

The first model, a mifepristone-inducible gene regulatory system, was established in mice. This regulatory system is composed of two components: a chimeric transactivator protein, GLVPc, that should activate transgene transcription only in the presence of mifepristone, and a target transgene, TGF- $\beta$ 1, placed under the control of a modified thymidine kinase promoter which should be responsive only to the mifepristone-bound chimeric transactivator. This model should provide a tissue-specific and time-controlled expression of constitutive active TGF- $\beta$ 1. GLVPc should only be expressed in the heart. Only after an application of mifepristone constitutive active TGF- $\beta$ 1 should be expressed in double-transgenic mice. A heart-specific expression should be obtained by placing the GLVPc under control of the murine alpha myosin heavy chain ( $\alpha$ MyHC) promoter. However, the analysis of the two different single-transgenic mouse-lines revealed an ubiquitous mRNA expression of GLVPc and constitutive active TGF- $\beta$ 1 in all investigated organs. Furthermore, a high, mifepristone-independent expression of TGF- $\beta$ 1 was detected in the heart of double-transgenic mice. Application of mifepristone to these mice did not lead to a reproducible increased expression of TGF- $\beta$ 1. Striking was the high lethality of double-transgenic mice within the first four weeks after birth. Thus, no tissue-specific and time-controlled expression of TGF- $\beta$ 1 was achieved.

Since constitutive active TGF- $\beta$ 1 is expressed in the myocard of double-transgenic mice, these hearts could be used for transplantation. It would be at least possible to

investigate the effect of TGF- $\beta$ 1 on graft survival. To establish transgenic pigs expressing constitutive active TGF- $\beta$ 1, a different or modified gene regulation system guaranteeing a reliable tissue-specific and time-controlled TGF- $\beta$ 1 expression should be used. Furthermore, the  $\alpha$ MyHC promoter used in mice is not suitable for high transgenic expression in porcine myocard.

The second animal model we investigated involved different transgenic pig lines carrying an expression vector for human TRAIL placed under control of the murine H-2K<sup>b</sup> promoter. Transgenic expression was detected in several organs. The highest expression levels were found in spleen and lung. This indicates a tissue-specific transgenic expression regulated by the murine H-2K<sup>b</sup> promoter. Moreover, human TRAIL was only detected in the membrane fraction of tissue lysates indicating that human TRAIL protein may interact with its receptors. Since higher transgenic expression levels could be observed in activated lymphocytes compared to native ones, an upregulation of human TRAIL expression related to an inflammatory process can be assumed. The biological impact of the transgene was shown by a TRAIL-specific apoptosis-inducing effect of lymphoblasts on Jurkat cells. These results meet the requirements for a possible protective effect of human TRAIL preventing a cell-mediated rejection of the xenograft.

Since we had to deal with a high number of pig lines ( $n \geq 11$ ), we had to compromise on finding highly expressing transgenic pig lines for breeding of homozygous and/or multitransgenic animals while saving time and costs. For this purpose, we analysed human TRAIL expression on peripheral blood lymphocytes.

Not only the expression pattern and the regulation in H-2K<sup>b</sup>-huTRAIL transgenic pigs, but also the analysis of the sequence and the expression of endogenous porcine TRAIL was necessary, regarding their possible influence on xenograft survival. We found that the amino acid sequence of porcine TRAIL is 86 % similar to the one of human TRAIL. This leads to the assumption that porcine TRAIL might be able to interact with human receptors. Furthermore, a tissue specific and developmental regulated expression pattern of porcine TRAIL was found, which might be connected with its various functions.

## 8 Literaturverzeichnis

Adams DH, Hathaway M, Shaw J, Burnett D, Elias E & Strain AJ 1991 Transforming growth factor-beta induces human T lymphocyte migration in vitro. *J.Immunol.* **147** 609-612.

Adams DH, Kadner A, Chen RH & Farivar RS 2001 Human membrane cofactor protein (MCP, CD 46) protects transgenic pig hearts from hyperacute rejection in primates. *Xenotransplantation.* **8** 36-40.

Aderem A & Underhill DM 1999 Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu.Rev.Immunol.* **17** 593-623.

Agah R, Prasad KS, Linnemann R, Firpo MT, Quertermous T & Dichek DA 2000 Cardiovascular overexpression of transforming growth factor-beta(1) causes abnormal yolk sac vasculogenesis and early embryonic death. *Circ.Res.* **86** 1024-1030.

Akasha MA, Anderson RR, Eilersieck M & Nixon DA 1987 Concentration of thyroid hormones and prolactin in dairy cattle serum and milk at three stages of lactation. *J.Dairy Sci.* **70** 271-276.

Al Mohanna F, Collison K, Parhar R, Kwaasi A, Meyer B, Saleh S, Allen S, al Sedairy S, Stern D & Yacoub M 1997 Activation of naive xenogeneic but not allogeneic endothelial cells by human naive neutrophils: a potential occult barrier to xenotransplantation. *Am.J.Pathol.* **151** 111-120.

Alexandre GP 2004 From ABO-incompatible human kidney transplantation to xenotransplantation. *Xenotransplantation.* **11** 233-236.

Alexandre GP, De Bruyere M, Squifflet JP, Moriau M, Latinne D & Pirson Y 1985 Human ABO-incompatible living donor renal homografts. *Neth.J.Med.* **28** 231-234.

Allison J, Georgiou HM, Strasser A & Vaux DL 1997 Transgenic expression of CD95 ligand on islet beta cells induces a granulocytic infiltration but does not confer immune privilege upon islet allografts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94** 3943-3947.

Alwaysn IP, Basker M, Buhler L & Cooper DK 1999 The problem of anti-pig antibodies in pig-to-primate xenografting: current and novel methods of depletion and/or suppression of production of anti-pig antibodies. *Xenotransplantation.* **6** 157-168.

Annes JP, Munger JS & Rifkin DB 2003 Making sense of latent TGFbeta activation. *J.Cell Sci.* **116** 217-224.

Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Manetti R, Vanini V, Romagnani P, Maggi E & Romagnani S 2002 Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *J.Exp.Med.* **196** 379-387.

Asaoka H & Matsuda H 1994 Detection of N-glycolylneuraminic acid-containing glycoproteins from various animal erythrocytes by chicken monoclonal antibody against Hanganutziu-Deicher antigens. *J.Vet.Med.Sci.* **56** 375-377.

Asghar SS 1995 Membrane regulators of complement activation and their aberrant expression in disease. *Lab Invest* **72** 254-271.

Ashton-Chess J, Roussel JC, Manez R, Ruiz C, Moreau A, Cozzi E, Minault D, Souillou JP & Blancho G 2003 Cellular participation in delayed xenograft rejection of hCD55 transgenic pig hearts by baboons. *Xenotransplantation*. **10** 446-453.

Assoian RK, Fleurdelys BE, Stevenson HC, Miller PJ, Madtes DK, Raines EW, Ross R & Sporn MB 1987 Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84** 6020-6024.

Atkinson JP, Oglesby TJ, White D, Adams EA & Liszewski MK 1991 Separation of self from non-self in the complement system: a role for membrane cofactor protein and decay accelerating factor. *Clin.Exp.Immunol.* **86 Suppl 1** 27-30.

Auchincloss H, Jr. & Sachs DH 1998 Xenogeneic transplantation. *Annu.Rev.Immunol.* **16** 433-470.

Bach FH, Winkler H, Ferran C, Hancock WW & Robson SC 1996 Delayed xenograft rejection. *Immunol.Today* **17** 379-384.

Bailey LL, Nehlsen-Cannarella SL, Concepcion W & Jolley WB 1985 Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate. *JAMA* **254** 3321-3329.

Bakker AB, Wu J, Phillips JH & Lanier LL 2000 NK cell activation: distinct stimulatory pathways counterbalancing inhibitory signals. *Hum.Immunol.* **61** 18-27.

Baumann BC, Forte P, Hawley RJ, Rieben R, Schneider MK & Seebach JD 2004 Lack of galactose-alpha-1,3-galactose expression on porcine endothelial cells prevents complement-induced lysis but not direct xenogeneic NK cytotoxicity. *J.Immunol.* **172** 6460-6467.

Beschorner W, Sudan D, Yang T, Radio S, Stammers A, Johnson N, Shearon C, Kuszynski C, Dixon RS, Matamoros A & Langnas A 2000 Surrogate tolerogenesis: possible pretransplant induction of accommodation of pig xenografts. *Transplant.Proc.* **32** 994-995.

Beschorner WE, Shearon CC, Yang T, Langnas AN, Thompson SC, Zhao Y, Franco KL, Radio SJ & Sudan DL 2003a Pre-transplant analysis of accommodation in donor pigs. *Xenotransplantation*. **10** 66-71.

Beschorner WE, Sudan DL, Radio SJ, Yang T, Franco KL, Hill AC, Shearon CC, Thompson SC, Dixon RS, Johnson ND, Kuszynski CA, Rubocki RJ, Lechtenberg KF, Matamoros A, Jr., Goertzen TC, Fox IJ & Langnas AN 2003b Heart xenograft survival with chimeric pig donors and modest immune suppression. *Ann.Surg.* **237** 265-272.

Besenfelder U, Moedl J, Mueller M & Brem G 2002 Endoscopic embryo collection and embryo transfer into the oviduct and the uterus of pigs. *Theriogenology* **47** 1051-1060.

Blakely ML, Van der Werf WJ, Berndt MC, Dalmaso AP, Bach FH & Hancock WW 1994 Activation of intragraft endothelial and mononuclear cells during discordant xenograft rejection. *Transplantation* **58** 1059-1066.

Blusch JH, Patience C & Martin U 2002 Pig endogenous retroviruses and xenotransplantation. *Xenotransplantation*. **9** 242-251.

Bodmer JL, Meier P, Tschopp J & Schneider P 2000 Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. *J.Biol.Chem.* **275** 20632-20637.

Bogdan C & Nathan C 1993 Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **685** 713-739.

Bonenfant C, Vallee I, Sun J, Brossay A, Thibault G, Guillaumin JM, Lebranchu Y, Bardos P, Butler JE & Watier H 2003 Analysis of human CD4 T lymphocyte proliferation induced by porcine lymphoblastoid B cell lines. *Xenotransplantation*. **10** 107-119.

Brandes ME, Mai UE, Ohura K & Wahl SM 1991 Type I transforming growth factor-beta receptors on neutrophils mediate chemotaxis to transforming growth factor-beta. *J.Immunol.* **147** 1600-1606.

Brunner AM, Marquardt H, Malacko AR, Lioubin MN & Purchio AF 1989 Site-directed mutagenesis of cysteine residues in the pro region of the transforming growth factor beta 1 precursor. Expression and characterization of mutant proteins. *J.Biol.Chem.* **264** 13660-13664.

Buhler L, Xu Y, Li W, Zhu A & Cooper DK 2003 An investigation of the specificity of induced anti-pig antibodies in baboons. *Xenotransplantation*. **10** 88-93.

Buhler L, Yamada K, Kitamura H, Alwayn IP, Basker M, Appel JZ, III, Colvin RB, White-Scharf ME, Sachs DH, Robson SC, Awwad M & Cooper DK 2001 Pig kidney transplantation in baboons: anti-Gal(alpha)1-3Gal IgM alone is associated with acute humoral xenograft rejection and disseminated intravascular coagulation. *Transplantation* **72** 1743-1752.

Bustos M, Saadi S & Platt JL 2001 Platelet-mediated activation of endothelial cells: implications for the pathogenesis of transplant rejection. *Transplantation* **72** 509-515.

Calne RY 1970 Organ transplantation between widely disparate species. *Transplant.Proc.* **2** 550-556.

Cascalho M & Platt JL 2001 The immunological barrier to xenotransplantation. *Immunity*. **14** 437-446.

Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J & Hood L 1997 Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity*. **7** 821-830.

Chawla-Sarkar M, Leaman DW, Jacobs BS & Borden EC 2002 IFN-beta pretreatment sensitizes human melanoma cells to TRAIL/Apo2 ligand-induced apoptosis. *J.Immunol.* **169** 847-855.

Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, Williams BR, Sen GC, Silverman RH & Borden EC 2003 Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis*. **8** 237-249.

Chen JJ, Sun Y & Nabel GJ 1998 Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L). *Science* **282** 1714-1717.

Chen L, Liu X, Zhu Y, Cao Y, Sun L & Jin B 2004 Localization and variation of TRAIL and its receptors in human placenta during gestation. *Life Sci*. **74** 1479-1486.

Chen Q, Gong B, Mahmoud-Ahmed AS, Zhou A, Hsi ED, Hussein M & Almasan A 2001a Apo2L/TRAIL and Bcl-2-related proteins regulate type I interferon-induced apoptosis in multiple myeloma. *Blood* **98** 2183-2192.

Chen RH, Naficy S, Logan JS, Diamond LE & Adams DH 1999 Hearts from transgenic pigs constructed with CD59/DAF genomic clones demonstrate improved survival in primates. *Xenotransplantation*. **6** 194-200.

Chen W, Frank ME, Jin W & Wahl SM 2001b TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity*. **14** 715-725.

Chen W & Wahl SM 2002 TGF-beta: receptors, signaling pathways and autoimmunity. *Curr.Dir.Autoimmun*. **5** 62-91.

Chen Y, Inobe J & Weiner HL 1995 Induction of oral tolerance to myelin basic protein in CD8-depleted mice: both CD4+ and CD8+ cells mediate active suppression. *J.Immunol*. **155** 910-916.

Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA & Weiner HL 1994 Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* **265** 1237-1240.

Chou AH, Tsai HF, Lin LL, Hsieh SL, Hsu PI & Hsu PN 2001 Enhanced proliferation and increased IFN-gamma production in T cells by signal transduced through TNF-related apoptosis-inducing ligand. *J.Immunol*. **167** 1347-1352.

Chung EJ, Choi SH, Shim YH, Bang YJ, Hur KC & Kim CW 2000 Transforming growth factor-beta induces apoptosis in activated murine T cells through the activation of caspase 1-like protease. *Cell Immunol*. **204** 46-54.

Clark J & Whitelaw B 2003 A future for transgenic livestock. *Nat.Rev.Genet*. **4** 825-833.

Cooper DK, Keogh AM, Brink J, Corris PA, Klepetko W, Pierson RN, Schmoedel M, Shirakura R & Warner SL 2000 Report of the Xenotransplantation Advisory Committee of the International Society for Heart and Lung Transplantation: the present status of xenotransplantation and its potential role in the treatment of end-stage cardiac and pulmonary diseases. *J.Heart Lung Transplant*. **19** 1125-1165.

Cooper DK, Koren E & Oriol R 1994 Oligosaccharides and discordant xenotransplantation. *Immunol.Rev*. **141** 31-58.

Costa C, Barber DF & Fodor WL 2002 Human NK cell-mediated cytotoxicity triggered by CD86 and Gal alpha 1,3-Gal is inhibited in genetically modified porcine cells. *J.Immunol.* **168** 3808-3816.

Cozzi E & Ancona E 2003 Xenotransplantation, where do we stand? *J.Nephrol.* **16 Suppl 7** S16-S21.

Cozzi E & White DJ 1995 The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nat.Med.* **1** 964-966.

Cramer DV, Chapman FA, Jaffee BD, Eiras-Hreha G, Yasunaga C, Wu GD & Makowka L 1992a The effect of a new immunosuppressive drug, brequinar sodium, on concordant hamster-to-rat cardiac xenografts. *Transplant.Proc.* **24** 720-721.

Cramer DV, Chapman FA, Jaffee BD, Zajac I, Hreha-Eiras G, Yasunaga C, Wu GD & Makowka L 1992b The prolongation of concordant hamster-to-rat cardiac xenografts by brequinar sodium. *Transplantation* **54** 403-408.

Cretney E, Takeda K, Yagita H, Glaccum M, Peschon JJ & Smyth MJ 2002 Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J.Immunol.* **168** 1356-1361.

Croxatto HB, Kovacs L, Massai R, Resch BA, Fuentealba B, Salvatierra AM, Croxatto HD, Zalanyi S, Viski S & Krenacs L 1998 Effects of long-term low-dose mifepristone on reproductive function in women. *Hum.Reprod.* **13** 793-798.

Daar AS 1997 Ethics of xenotransplantation: animal issues, consent, and likely transformation of transplant ethics. *World J.Surg.* **21** 975-982.

Daigle I & Simon HU 2001 Alternative functions for TRAIL receptors in eosinophils and neutrophils. *Swiss.Med.Wkly.* **131** 231-237.

Daigle I, Yousefi S, Colonna M, Green DR & Simon HU 2002 Death receptors bind SHP-1 and block cytokine-induced anti-apoptotic signaling in neutrophils. *Nat.Med.* **8** 61-67.

David A, Chetritt J, Guillot C, Tesson L, Heslan JM, Cuturi MC, Soullillou JP & Aneon I 2000 Interleukin-10 produced by recombinant adenovirus prolongs survival of cardiac allografts in rats. *Gene Ther.* **7** 505-510.

David-Watine B, Israel A & Kourilsky P 1990 The regulation and expression of MHC class I genes. *Immunol.Today* **11** 286-292.

Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA & Goodwin RG 1997a The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity.* **7** 813-820.

Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H, Waugh J, Huang CP, DuBose RF, Goodwin RG & Smith CA 1997b Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J.Exp.Med.* **186** 1165-1170.

Dehoux JP, de la PB, Latinne D, Bazin H & Gianello P 2002 Characterization of baboon anti-porcine IgG antibodies during acute vascular rejection of porcine kidney xenograft. *Xenotransplantation*. **9** 338-349.

Deng Y, Lin Y & Wu X 2002 TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev*. **16** 33-45.

Dennler S, Goumans MJ & ten Dijke P 2002 Transforming growth factor beta signal transduction. *J.Leukoc.Biol*. **71** 731-740.

DerSimonian H, Pan L, Yatko C, Rodrigue-Way A, Johnson E & Edge AS 1999 Human anti-porcine T cell response: blocking with anti-class I antibody leads to hyporesponsiveness and a switch in cytokine production. *J.Immunol*. **162** 6993-7001.

Deutsche Stiftung Organtransplantation. Organspende und Transplantation in Deutschland. 2003.

Ref Type: Generic

Diamond LE, McCurry KR, Martin MJ, McClellan SB, Oldham ER, Platt JL & Logan JS 1996 Characterization of transgenic pigs expressing functionally active human CD59 on cardiac endothelium. *Transplantation* **61** 1241-1249.

Diamond LE, Quinn CM, Martin MJ, Lawson J, Platt JL & Logan JS 2001 A human CD46 transgenic pig model system for the study of discordant xenotransplantation. *Transplantation* **71** 132-142.

Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB & Schuler G 2002 Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J.Exp.Med*. **196** 247-253.

Dorling A 2003 Are anti-endothelial cell antibodies a pre-requisite for the acute vascular rejection of xenografts? *Xenotransplantation*. **10** 16-23.

Dorling A, Binns R & Lechler RI 1996a Direct human T-cell anti-pig xenoresponses are vigorous but significantly weaker than direct alloresponses. *Transplant.Proc*. **28** 653.

Dorling A, Binns R & Lechler RI 1996b Significant primary indirect human T-cell anti-pig xenoresponses observed using immature porcine dendritic cells and SLA-class II-negative endothelial cells. *Transplant.Proc*. **28** 654.

Dorling A & Lechler RI 1998 T cell-mediated xenograft rejection: specific tolerance is probably required for long term xenograft survival. *Xenotransplantation*. **5** 234-245.

Dorling A, Lombardi G, Binns R & Lechler RI 1996c Detection of primary direct and indirect human anti-porcine T cell responses using a porcine dendritic cell population. *Eur.J.Immunol*. **26** 1378-1387.

Drezen JM, Babinet C & Morello D 1993 Transcriptional control of MHC class I and beta 2-microglobulin genes in vivo. *J.Immunol*. **150** 2805-2813.

Drezen JM, Nouvel P, Babinet C & Morello D 1992 Different regulation of class I gene expression in the adult mouse and during development. *J.Immunol.* **149** 429-437.

Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC & Young PR 1998 Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J.Biol.Chem.* **273** 14363-14367.

Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY & Henson PM 1998 Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J.Clin.Invest* **101** 890-898.

Fan K, Ruan Q, Sensenbrenner L & Chen B 1992 Transforming growth factor-beta 1 bifunctionally regulates murine macrophage proliferation. *Blood* **79** 1679-1685.

Fanger NA, Maliszewski CR, Schooley K & Griffith TS 1999 Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J.Exp.Med.* **190** 1155-1164.

Fecke W, Long J, Richards A & Harrison R 2002 Protection of hDAF-transgenic porcine endothelial cells against activation by human complement: role of the membrane attack complex. *Xenotransplantation.* **9** 97-105.

Ferguson TA, Green DR & Griffith TS 2002 Cell death and immune privilege. *Int.Rev.Immunol.* **21** 153-172.

Flaumenhaft R, Kojima S, Abe M & Rifkin DB 1993 Activation of latent transforming growth factor beta. *Adv.Pharmacol.* **24** 51-76.

Fodor WL, Williams BL, Matis LA, Madri JA, Rollins SA, Knight JW, Velandar W & Squinto SP 1994 Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91** 11153-11157.

Forte P, Pazmany L, Matter-Reissmann UB, Stussi G, Schneider MK & Seebach JD 2001 HLA-G inhibits rolling adhesion of activated human NK cells on porcine endothelial cells. *J.Immunol.* **167** 6002-6008.

Fryer JP, Leventhal JR, Dalmaso AP, Chen S, Simone PA, Goswitz JJ, Reinsmoen NL & Matas AJ 1995a Beyond hyperacute rejection. Accelerated rejection in a discordant xenograft model by adoptive transfer of specific cell subsets. *Transplantation* **59** 171-176.

Fryer JP, Leventhal JR & Matas AJ 1995b The emergence of xenotransplantation. *Transpl.Immunol.* **3** 21-31.

Fussenegger M, Morris RP, Fux C, Rimann M, von Stockar B, Thompson CJ & Bailey JE 2000 Streptogramin-based gene regulation systems for mammalian cells. *Nat.Biotechnol.* **18** 1203-1208.

Galili U 2001 The alpha-gal epitope (Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc-R) in xenotransplantation. *Biochimie* **83** 557-563.

Galili U, Anaraki F, Thall A, Hill-Black C & Radic M 1993 One percent of human circulating B lymphocytes are capable of producing the natural anti-Gal antibody. *Blood* **82** 2485-2493.

Galili U, Clark MR, Shohet SB, Buehler J & Macher BA 1987 Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal alpha 1----3Gal epitope in primates. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84** 1369-1373.

Galili U, LaTemple DC, Walgenbach AW & Stone KR 1997 Porcine and bovine cartilage transplants in cynomolgus monkey: II. Changes in anti-Gal response during chronic rejection. *Transplantation* **63** 646-651.

Galili U, Mandrell RE, Hamadeh RM, Shohet SB & Griffiss JM 1988a Interaction between human natural anti-alpha-galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora. *Infect.Immun.* **56** 1730-1737.

Galili U, Shohet SB, Kobrin E, Stults CL & Macher BA 1988b Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *J.Biol.Chem.* **263** 17755-17762.

Galili U & Swanson K 1991 Gene sequences suggest inactivation of alpha-1,3-galactosyltransferase in catarrhines after the divergence of apes from monkeys. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88** 7401-7404.

Gao Y, Herndon JM, Zhang H, Griffith TS & Ferguson TA 1998 Antiinflammatory effects of CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis. *J.Exp.Med.* **188** 887-896.

Geiger H, Sick S, Bonifer C & Muller AM 1998 Globin gene expression is reprogrammed in chimeras generated by injecting adult hematopoietic stem cells into mouse blastocysts. *Cell* **93** 1055-1065.

Ghio M, Ottonello L, Contini P, Amelotti M, Mazzei C, Indiveri F, Puppo F & Dallegri F 2003 Transforming growth factor-beta1 in supernatants from stored red blood cells inhibits neutrophil locomotion. *Blood* **102** 1100-1107.

Gill J, Malin M, Sutherland J, Gray D, Hollander G & Boyd R 2003 Thymic generation and regeneration. *Immunol.Rev.* **195** 28-50.

Giovarelli M, Musiani P, Garotta G, Ebner R, Di Carlo E, Kim Y, Cappello P, Rigamonti L, Bernabei P, Novelli F, Modesti A, Coletti A, Ferrie AK, Lollini PL, Ruben S, Salcedo T & Forni G 1999 A "stealth effect": adenocarcinoma cells engineered to express TRAIL elude tumor-specific and allogeneic T cell reactions. *J.Immunol.* **163** 4886-4893.

Gochuico BR, Zhang J, Ma BY, Marshak-Rothstein A & Fine A 2000 TRAIL expression in vascular smooth muscle. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **278** L1045-L1050.

Goddard MJ, Dunning J, Horsley J, Atkinson C, Pino-Chavez G & Wallwork J 2002 Histopathology of cardiac xenograft rejection in the pig-to-baboon model. *J.Heart Lung Transplant.* **21** 474-484.

Gong B, Chen Q, Endlich B, Mazumder S & Almasan A 1999 Ionizing radiation-induced, Bax-mediated cell death is dependent on activation of cysteine and serine proteases. *Cell Growth Differ.* **10** 491-502.

Good AH, Cooper DK, Malcolm AJ, Ippolito RM, Koren E, Neethling FA, Ye Y, Zuhdi N & Lamontagne LR 1992 Identification of carbohydrate structures that bind human antiporcine antibodies: implications for discordant xenografting in humans. *Transplant.Proc.* **24** 559-562.

Goodman DJ, Von Albertini M, Willson A, Millan MT & Bach FH 1996 Direct activation of porcine endothelial cells by human natural killer cells. *Transplantation* **61** 763-771.

Gossen M & Bujard H 1992 Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89** 5547-5551.

Gray AM & Mason AJ 1990 Requirement for activin A and transforming growth factor-beta 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science* **247** 1328-1330.

Green DR & Evan GI 2002 A matter of life and death. *Cancer Cell* **1** 19-30.

Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR & Ferguson TA 1995 Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* **270** 1189-1192.

Griffith TS & Lynch DH 1998 TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr.Opin.Immunol.* **10** 559-563.

Griffith TS, Wiley SR, Kubin MZ, Sedger LM, Maliszewski CR & Fanger NA 1999 Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J.Exp.Med.* **189** 1343-1354.

Grotendorst GR, Smale G & Pancev D 1989 Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils. *J.Cell Physiol* **140** 396-402.

Gulick J, Subramaniam A, Neumann J & Robbins J 1991 Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes. *J.Biol.Chem.* **266** 9180-9185.

Gura T 1997 How TRAIL kills cancer cells, but not normal cells. *Science* **277** 768.

Halaas O, Liabakk NB, Vik R, Beninati C, Henneke P, Sundan A & Espevik T 2004 Monocytes stimulated with group B streptococci or interferons release tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Scand.J.Immunol.* **60** 74-81.

Halaas O, Vik R, Ashkenazi A & Espevik T 2000 Lipopolysaccharide induces expression of APO2 ligand/TRAIL in human monocytes and macrophages. *Scand.J.Immunol.* **51** 244-250.

Hammer C, Linke R, Wagner F & Diefenbeck M 1998 Organs from animals for man. *Int.Arch.Allergy Immunol.* **116** 5-21.

Hardy JD, KURRUS FD, Chavez CM, NEELY WA, Eraslan S, TURNER MD, Fabian LW & LABECKI TD 1964 HEART TRANSPLANTATION IN MAN. DEVELOPMENTAL STUDIES AND REPORT OF A CASE. *JAMA* **188** 1132-1140.

Harper N, Farrow SN, Kaptein A, Cohen GM & MacFarlane M 2001 Modulation of tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand- induced NF-kappa B activation by inhibition of apical caspases. *J.Biol.Chem.* **276** 34743-34752.

Hasan R, Van den Bogaerde JB, Wallwork J & White DJ 1992 Evidence that long-term survival of concordant xenografts is achieved by inhibition of antispecies antibody production. *Transplantation* **54** 408-413.

Hattori R, Hamilton KK, McEver RP & Sims PJ 1989 Complement proteins C5b-9 induce secretion of high molecular weight multimers of endothelial von Willebrand factor and translocation of granule membrane protein GMP-140 to the cell surface. *J.Biol.Chem.* **264** 9053-9060.

Hayakawa Y, Screpanti V, Yagita H, Grandien A, Ljunggren HG, Smyth MJ & Chambers BJ 2004 NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy. *J.Immunol.* **172** 123-129.

Hedley ML, Drake BL, Head JR, Tucker PW & Forman J 1989 Differential expression of the class I MHC genes in the embryo and placenta during midgestational development in the mouse. *J.Immunol.* **142** 4046-4053.

Heikinheimo O, Haukkamaa M & Lahteenmaki P 1989 Distribution of RU 486 and its demethylated metabolites in humans. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **68** 270-275.

Herbeuval JP, Lambert C, Sabido O, Cottier M, Fournel P, Dy M & Genin C 2003 Macrophages from cancer patients: analysis of TRAIL, TRAIL receptors, and colon tumor cell apoptosis. *J.Natl.Cancer Inst.* **95** 611-621.

Hilliard B, Wilmen A, Seidel C, Liu TS, Goke R & Chen Y 2001 Roles of TNF-related apoptosis-inducing ligand in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.Immunol.* **166** 1314-1319.

Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Weppert M, Vogg B, Ludwig H, Stojkovic M, Boelhaue M, Brem G, Wolf E & Pfeifer A 2003 Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Rep.* **4** 1054-1060.

Holgersson J, Ehrnfelt C, Hauzenberger E & Serrander L 2002 Leukocyte endothelial cell interactions in pig to human organ xenograft rejection. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **87** 407-415.

Holzknacht ZE & Platt JL 1995 Identification of porcine endothelial cell membrane antigens recognized by human xenoreactive natural antibodies. *J.Immunol.* **154** 4565-4575.

- Horwitz DA, Zheng SG & Gray JD 2003 The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4+ CD25+ and CD8+ regulatory T cell subsets. *J.Leukoc.Biol.* **74** 471-478.
- Hymowitz SG, Christinger HW, Fuh G, Ultsch M, O'Connell M, Kelley RF, Ashkenazi A & de Vos AM 1999 Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol.Cell* **4** 563-571.
- Hymowitz SG, O'Connell MP, Ultsch MH, Hurst A, Totpal K, Ashkenazi A, de Vos AM & Kelley RF 2000 A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry* **39** 633-640.
- Inoue N, Manabe N, Matsui T, Maeda A, Nakagawa S, Wada S & Miyamoto H 2003 Roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling pathway in granulosa cell apoptosis during atresia in pig ovaries. *J.Reprod.Dev.* **49** 313-321.
- Inverardi L, Samaja M, Motterlini R, Mangili F, Bender JR & Pardi R 1992 Early recognition of a discordant xenogeneic organ by human circulating lymphocytes. *J.Immunol.* **149** 1416-1423.
- Ish C, Ong GL, Desai N & Mattes MJ 1993 The specificity of alternative complement pathway-mediated lysis of erythrocytes: a survey of complement and target cells from 25 species. *Scand.J.Immunol.* **38** 113-122.
- Itescu S, Kwiatkowski P, Artrip JH, Kocher A, Edwards N & Michler RE 2000 Transendothelial migration and infiltration of porcine xenografts by primate monocytes requires natural killer cell-dependent activation. *Transplant.Proc.* **32** 1083.
- Itescu S, Kwiatkowski P, Artrip JH, Wang SF, Ankersmit J, Minanov OP & Michler RE 1998 Role of natural killer cells, macrophages, and accessory molecule interactions in the rejection of pig-to-primate xenografts beyond the hyperacute period. *Hum.Immunol.* **59** 275-286.
- Iverson WO & Talbot T 1998 Definition of a production specification for xenotransplantation. A European perspective. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **862** 121-124.
- Jeremias I, Herr I, Boehler T & Debatin KM 1998 TRAIL/Apo-2-ligand-induced apoptosis in human T cells. *Eur.J.Immunol.* **28** 143-152.
- Jiang S & Lechler RI 2003 Regulatory T cells in the control of transplantation tolerance and autoimmunity. *Am.J.Transplant.* **3** 516-524.
- Johnsen AC, Haux J, Steinkjer B, Nonstad U, Egeberg K, Sundan A, Ashkenazi A & Espevik T 1999 Regulation of APO-2 ligand/trail expression in NK cells-involvement in NK cell-mediated cytotoxicity. *Cytokine* **11** 664-672.
- Johnson DR & Pober JS 1990 Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically increase transcription of HLA class I heavy- and light-chain genes in vascular endothelium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87** 5183-5187.
- Jones WK, Sanchez A & Robbins J 1994 Murine pulmonary myocardium: developmental analysis of cardiac gene expression. *Dev.Dyn.* **200** 117-128.

Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J & Enk AH 2002 Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J.Exp.Med.* **196** 255-260.

Josien R, Douillard P, Guillot C, Muschen M, Anegon I, Chetritt J, Menoret S, Vignes C, Souillou JP & Cuturi MC 1998 A critical role for transforming growth factor-beta in donor transfusion-induced allograft tolerance. *J.Clin.Invest* **102** 1920-1926.

Kamohara H, Matsuyama W, Shimosato O, Abe K, Galligan C, Hashimoto S, Matsushima K & Yoshimura T 2004 Regulation of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptor expression in human neutrophils. *Immunology* **111** 186-194.

Kang SM, Schneider DB, Lin Z, Hanahan D, Dichek DA, Stock PG & Baekkeskov S 1997 Fas ligand expression in islets of Langerhans does not confer immune privilege and instead targets them for rapid destruction. *Nat.Med.* **3** 738-743.

Kaplan MJ, Lewis EE, Shelden EA, Somers E, Pavlic R, McCune WJ & Richardson BC 2002 The apoptotic ligands TRAIL, TWEAK, and Fas ligand mediate monocyte death induced by autologous lupus T cells. *J.Immunol.* **169** 6020-6029.

Kaplan MJ, Ray D, Mo RR, Yung RL & Richardson BC 2000 TRAIL (Apo2 ligand) and TWEAK (Apo3 ligand) mediate CD4+ T cell killing of antigen-presenting macrophages. *J.Immunol.* **164** 2897-2904.

Karim M, Bushell AR & Wood KJ 2002 Regulatory T cells in transplantation. *Curr.Opin.Immunol.* **14** 584-591.

Katopodis AG, Warner RG, Duthaler RO, Streiff MB, Bruelisauer A, Kretz O, Dorobek B, Persohn E, Andres H, Schweitzer A, Thoma G, Kinzy W, Quesniaux VF, Cozzi E, Davies HF, Manez R & White D 2002 Removal of anti-Galalpha1,3Gal xenoantibodies with an injectable polymer. *J.Clin.Invest* **110** 1869-1877.

Kayagaki N, Yamaguchi N, Abe M, Hirose S, Shirai T, Okumura K & Yagita H 2002 Suppression of antibody production by TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Cell Immunol.* **219** 82-91.

Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Eto H, Okumura K & Yagita H 1999a Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J.Exp.Med.* **189** 1451-1460.

Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Takeda K, Akiba H, Tsutsui H, Okamura H, Nakanishi K, Okumura K & Yagita H 1999b Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J.Immunol.* **163** 1906-1913.

Kehrl JH, Roberts AB, Wakefield LM, Jakowlew S, Sporn MB & Fauci AS 1986 Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J.Immunol.* **137** 3855-3860.

Kelley SK & Ashkenazi A 2004 Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL. *Curr.Opin.Pharmacol.* **4** 333-339.

Kemp TJ, Kim JS, Crist SA & Griffith TS 2003 Induction of necrotic tumor cell death by TRAIL/Apo-2L. *Apoptosis*. **8** 587-599.

Kim IK, Jung YK, Noh DY, Song YS, Choi CH, Oh BH, Masuda ES & Jung YK 2003 Functional screening of genes suppressing TRAIL-induced apoptosis: distinct inhibitory activities of Bcl-XL and Bcl-2. *Br.J.Cancer* **88** 910-917.

Kirk AD, Burkly LC, Batty DS, Baumgartner RE, Berning JD, Buchanan K, Fechner JH, Jr., Germond RL, Kampen RL, Patterson NB, Swanson SJ, Tadaki DK, TenHoor CN, White L, Knechtle SJ & Harlan DM 1999 Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nat.Med.* **5** 686-693.

Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ & Ashkenazi A 2000 Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*. **12** 611-620.

Knosalla C & Cooper DK 2002 Xenotransplantation and tolerance. *Front Biosci.* **7** d1280-d1287.

Knosalla C, Ryan DJ, Moran K, Gollackner B, Schuler W, Sachs DH, Awwad M, Schuurman HJ & Cooper DK 2004 Initial experience with the human anti-human CD154 monoclonal antibody, ABI793, in pig-to-baboon xenotransplantation. *Xenotransplantation*. **11** 353-360.

Koch CA, Khalpey ZI & Platt JL 2004 Accommodation: preventing injury in transplantation and disease. *J.Immunol.* **172** 5143-5148.

Kodaira Y, Nair SK, Wrenshall LE, Gilboa E & Platt JL 2000 Phenotypic and functional maturation of dendritic cells mediated by heparan sulfate. *J.Immunol.* **165** 1599-1604.

Koga Y, Matsuzaki A, Suminoe A, Hattori H & Hara T 2004 Neutrophil-derived TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a novel mechanism of antitumor effect by neutrophils. *Cancer Res.* **64** 1037-1043.

Koike C, Hayashi S, Yokoyama I, Yamakawa H, Negita M & Takagi H 1996 Converting alpha-Gal epitope of pig into H antigen. *Transplant.Proc.* **28** 553.

Kolber-Simonds D, Lai L, Watt SR, Denaro M, Arn S, Augenstein ML, Betthausen J, Carter DB, Greenstein JL, Hao Y, Im GS, Liu Z, Mell GD, Murphy CN, Park KW, Rieke A, Ryan DJ, Sachs DH, Forsberg EJ, Prather RS & Hawley RJ 2004 Production of alpha-1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101** 7335-7340.

Kotelkin A, Prikhod'ko EA, Cohen JI, Collins PL & Bukreyev A 2003 Respiratory syncytial virus infection sensitizes cells to apoptosis mediated by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J.Virol.* **77** 9156-9172.

Krieg A, Krieg T, Wenzel M, Schmitt M, Ramp U, Fang B, Gabbert HE, Gerharz CD & Mahotka C 2003 TRAIL-beta and TRAIL-gamma: two novel splice variants of the

human TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) without apoptotic potential. *Br.J.Cancer* **88** 918-927.

Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM & Karlsson S 1993 Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90** 770-774.

Kwiatkowski P, Artrip JH, Edwards NM, Lietz K, Tugulea S, Michler RE, McKenzie IF, Sandrin MS & Itescu S 1999 High-level porcine endothelial cell expression of alpha(1,2)-fucosyltransferase reduces human monocyte adhesion and activation. *Transplantation* **67** 219-226.

Lachmann PJ 1991 The control of homologous lysis. *Immunol.Today* **12** 312-315.

Laemmli UK 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** 680-685.

Lamhamedi-Cherradi SE, Zheng SJ, Maguschak KA, Peschon J & Chen YH 2003 Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL-/- mice. *Nat.Immunol.* **4** 255-260.

Lanier LL 2001 On guard--activating NK cell receptors. *Nat.Immunol.* **2** 23-27.

Larsen RD, Rivera-Marrero CA, Ernst LK, Cummings RD & Lowe JB 1990 Frameshift and nonsense mutations in a human genomic sequence homologous to a murine UDP-Gal:beta-D-Gal(1,4)-D-GlcNAc alpha(1,3)-galactosyltransferase cDNA. *J.Biol.Chem.* **265** 7055-7061.

Lawrence DA 2001 Latent-TGF-beta: an overview. *Mol.Cell Biochem.* **219** 163-170.

LeBlanc H, Lawrence D, Varfolomeev E, Totpal K, Morlan J, Schow P, Fong S, Schwall R, Sinicropi D & Ashkenazi A 2002 Tumor-cell resistance to death receptor--induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. *Nat.Med.* **8** 274-281.

Lee HO, Herndon JM, Barreiro R, Griffith TS & Ferguson TA 2002 TRAIL: a mechanism of tumor surveillance in an immune privileged site. *J.Immunol.* **169** 4739-4744.

Lee Y, Nadal-Ginard B, Mahdavi V & Izumo S 1997 Myocyte-specific enhancer factor 2 and thyroid hormone receptor associate and synergistically activate the alpha-cardiac myosin heavy-chain gene. *Mol.Cell Biol.* **17** 2745-2755.

Letterio JJ & Roberts AB 1998 Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu.Rev.Immunol.* **16** 137-161.

Leventhal JR, Dalmaso AP, Cromwell JW, Platt JL, Manivel CJ, Bolman RM, III & Matas AJ 1993a Prolongation of cardiac xenograft survival by depletion of complement. *Transplantation* **55** 857-865.

- 
- Leventhal JR, Matas AJ, Sun LH, Reif S, Bolman RM, III, Dalmaso AP & Platt JL 1993b The immunopathology of cardiac xenograft rejection in the guinea pig-to-rat model. *Transplantation* **56** 1-8.
- Leverkus M, Walczak H, McLellan A, Fries HW, Terbeck G, Brocker EB & Kampgen E 2000 Maturation of dendritic cells leads to up-regulation of cellular FLICE-inhibitory protein and concomitant down-regulation of death ligand-mediated apoptosis. *Blood* **96** 2628-2631.
- Li XC, Wells AD, Strom TB & Turka LA 2000 The role of T cell apoptosis in transplantation tolerance. *Curr.Opin.Immunol.* **12** 522-527.
- Li XK, Okuyama T, Tamura A, Enosawa S, Kaneda Y, Takahara S, Funashima N, Yamada M, Amemiya H & Suzuki S 1998 Prolonged survival of rat liver allografts transfected with Fas ligand-expressing plasmid. *Transplantation* **66** 1416-1423.
- Lijnen PJ, Petrov VV & Fagard RH 2000 Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1). *Mol.Genet.Metab* **71** 418-435.
- Lin SS, Hanaway MJ, Gonzalez-Stawinski GV, Lau CL, Parker W, Davis RD, Byrne GW, Diamond LE, Logan JS & Platt JL 2000 The role of anti-Galalpha1-3Gal antibodies in acute vascular rejection and accommodation of xenografts. *Transplantation* **70** 1667-1674.
- Lin SS, Kooyman DL, Daniels LJ, Daggett CW, Parker W, Lawson JH, Hoopes CW, Gullotto C, Li L, Birch P, Davis RD, Diamond LE, Logan JS & Platt JL 1997 The role of natural anti-Gal alpha 1-3Gal antibodies in hyperacute rejection of pig-to-baboon cardiac xenotransplants. *Transpl.Immunol.* **5** 212-218.
- Lin SS, Weidner BC, Byrne GW, Diamond LE, Lawson JH, Hoopes CW, Daniels LJ, Daggett CW, Parker W, Harland RC, Davis RD, Bollinger RR, Logan JS & Platt JL 1998 The role of antibodies in acute vascular rejection of pig-to-baboon cardiac transplants. *J.Clin.Invest* **101** 1745-1756.
- Liszewski MK, Farries TC, Lublin DM, Rooney IA & Atkinson JP 1996 Control of the complement system. *Adv.Immunol.* **61** 201-283.
- Lompre AM, Nadal-Ginard B & Mahdavi V 1984 Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J.Biol.Chem.* **259** 6437-6446.
- Luethviksson BR & Gunnlaugsdottir B 2003 Transforming growth factor-beta as a regulator of site-specific T-cell inflammatory response. *Scand.J.Immunol.* **58** 129-138.
- Lunemann JD, Waiczies S, Ehrlich S, Wendling U, Seeger B, Kamradt T & Zipp F 2002 Death ligand TRAIL induces no apoptosis but inhibits activation of human (auto)antigen-specific T cells. *J.Immunol.* **168** 4881-4888.
- Lyons GE, Schiaffino S, Sassoon D, Barton P & Buckingham M 1990 Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle. *J.Cell Biol.* **111** 2427-2436.

MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Cohen GM & Alnemri ES 1997 Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J.Biol.Chem.* **272** 25417-25420.

Magee JC, Collins BH, Harland RC, Lindman BJ, Bollinger RR, Frank MM & Platt JL 1995 Immunoglobulin prevents complement-mediated hyperacute rejection in swine-to-primate xenotransplantation. *J.Clin.Invest* **96** 2404-2412.

Maher SE, Karmann K, Min W, Hughes CC, Pober JS & Bothwell AL 1996 Porcine endothelial CD86 is a major costimulator of xenogeneic human T cells: cloning, sequencing, and functional expression in human endothelial cells. *J.Immunol.* **157** 3838-3844.

Maher SE, Pflugh DL, Larsen NJ, Rothschild MF & Bothwell AL 1998 Structure/function characterization of porcine CD59: expression, chromosomal mapping, complement-inhibition, and costimulatory activity. *Transplantation* **66** 1094-1100.

Malyguine AM, Saadi S, Platt JL & Dawson JR 1996 Human natural killer cells induce morphologic changes in porcine endothelial cell monolayers. *Transplantation* **61** 161-164.

Mariani SM & Krammer PH 1998 Surface expression of TRAIL/Apo-2 ligand in activated mouse T and B cells. *Eur.J.Immunol.* **28** 1492-1498.

Martinez-Lorenzo MJ, Anel A, Alava MA, Pineiro A, Naval J, Lasierra P & Larrad L 2004 The human melanoma cell line MelJuSo secretes bioactive FasL and APO2L/TRAIL on the surface of microvesicles. Possible contribution to tumor counterattack. *Exp.Cell Res.* **295** 315-329.

Matsunami K, Miyagawa S, Nakai R, Yamada M & Shirakura R 2002 Modulation of the leader peptide sequence of the HLA-E gene up-regulates its expression and down-regulates natural killer cell-mediated swine endothelial cell lysis. *Transplantation* **73** 1582-1589.

Matter-Reissmann UB, Forte P, Schneider MK, Filgueira L, Groscurth P & Seebach JD 2002 Xenogeneic human NK cytotoxicity against porcine endothelial cells is perforin/granzyme B dependent and not inhibited by Bcl-2 overexpression. *Xenotransplantation.* **9** 325-337.

McCurry KR, Kooyman DL, Alvarado CG, Cotterell AH, Martin MJ, Logan JS & Platt JL 1995 Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury. *Nat.Med.* **1** 423-427.

McCurry KR, Parker W, Cotterell AH, Weidner BC, Lin SS, Daniels LJ, Holzknicht ZE, Byrne GW, Diamond LE, Logan JS & Platt JL 1997 Humoral responses to pig-to-baboon cardiac transplantation: implications for the pathogenesis and treatment of acute vascular rejection and for accommodation. *Hum.Immunol.* **58** 91-105.

McMorrow IM, Comrack CA, Sachs DH & DerSimonian H 1997 Heterogeneity of human anti-pig natural antibodies cross-reactive with the Gal(alpha1,3)Galactose epitope. *Transplantation* **64** 501-510.

Medvinsky AL & Dzierzak EA 1998 Development of the definitive hematopoietic hierarchy in the mouse. *Dev.Comp Immunol.* **22** 289-301.

Mi QS, Ly D, Lamhamedi-Cherradi SE, Salojin KV, Zhou L, Grattan M, Meagher C, Zucker P, Chen YH, Nagle J, Taub D & Delovitch TL 2003 Blockade of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand exacerbates type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes* **52** 1967-1975.

Miller A, Lider O, Roberts AB, Sporn MB & Weiner HL 1992 Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89** 421-425.

Mills KR, Reginato M, Debnath J, Queenan B & Brugge JS 2004 Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101** 3438-3443.

Miura Y, Misawa N, Maeda N, Inagaki Y, Tanaka Y, Ito M, Kayagaki N, Yamamoto N, Yagita H, Mizusawa H & Koyanagi Y 2001 Critical contribution of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) to apoptosis of human CD4+ T cells in HIV-1- infected hu-PBL-NOD-SCID mice. *J.Exp.Med.* **193** 651-660.

Miyawaki T, Uehara T, Nibu R, Tsuji T, Yachie A, Yonehara S & Taniguchi N 1992 Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *J.Immunol.* **149** 3753-3758.

Miyazawa H, Murase N, Demetris AJ, Matsumoto K, Nakamura K, Ye Q, Manez R, Todo S & Starzl TE 1995 Hamster to rat kidney xenotransplantation. Effects of FK 506, cyclophosphamide, organ perfusion, and complement inhibition. *Transplantation* **59** 1183-1188.

Miyazono K, Olofsson A, Colosetti P & Heldin CH 1991 A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *EMBO J.* **10** 1091-1101.

Molkentin JD, Kalvakolanu DV & Markham BE 1994 Transcription factor GATA-4 regulates cardiac muscle-specific expression of the alpha-myosin heavy-chain gene. *Mol.Cell Biol.* **14** 4947-4957.

Mollnes TE & Fiane AE 2003 Perspectives on complement in xenotransplantation. *Mol.Immunol.* **40** 135-143.

Momburg F, Koch N, Moller P, Moldenhauer G, Butcher GW & Hammerling GJ 1986 Differential expression of Ia and Ia-associated invariant chain in mouse tissues after in vivo treatment with IFN-gamma. *J.Immunol.* **136** 940-948.

Mongkolsapaya J, Grimes JM, Chen N, Xu XN, Stuart DI, Jones EY & Sreaton GR 1999 Structure of the TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation. *Nat.Struct.Biol.* **6** 1048-1053.

Monleon I, Martinez-Lorenzo MJ, Monteagudo L, Lasierra P, Taules M, Iturralde M, Pineiro A, Larrad L, Alava MA, Naval J & Anel A 2001 Differential secretion of Fas

ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells. *J.Immunol.* **167** 6736-6744.

Morgan BP 1995 Complement regulatory molecules: application to therapy and transplantation. *Immunol.Today* **16** 257-259.

Morkin E 2000 Control of cardiac myosin heavy chain gene expression. *Microsc.Res.Tech.* **50** 522-531.

Muhlenbeck F, Haas E, Schwenzer R, Schubert G, Grell M, Smith C, Scheurich P & Wajant H 1998 TRAIL/Apo2L activates c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) via caspase- dependent and caspase-independent pathways. *J.Biol.Chem.* **273** 33091-33098.

Mule JJ, Schwarz SL, Roberts AB, Sporn MB & Rosenberg SA 1988 Transforming growth factor-beta inhibits the in vitro generation of lymphokine-activated killer cells and cytotoxic T cells. *Cancer Immunol.Immunother.* **26** 95-100.

Mundt B, Kuhnel F, Zender L, Paul Y, Tillmann H, Trautwein C, Manns MP & Kubicka S 2003 Involvement of TRAIL and its receptors in viral hepatitis. *FASEB J.* **17** 94-96.

Murray AG, Khodadoust MM, Pober JS & Bothwell AL 1994 Porcine aortic endothelial cells activate human T cells: direct presentation of MHC antigens and costimulation by ligands for human CD2 and CD28. *Immunity.* **1** 57-63.

Nagasawa H, Naito T, Namiki H, Inaba T & Mori J 1988 Relationships between milk levels of hormones and growth or puberty of offspring in mice. *Exp.Clin.Endocrinol.* **91** 119-122.

Nagata S & Golstein P 1995 The Fas death factor. *Science* **267** 1449-1456.

Nakajima H, Nakajima HO, Salcher O, Dittie AS, Dembowski K, Jing S & Field LJ 2000 Atrial but not ventricular fibrosis in mice expressing a mutant transforming growth factor-beta(1) transgene in the heart. *Circ.Res.* **86** 571-579.

Nakamura K, Kitani A & Strober W 2001 Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J.Exp.Med.* **194** 629-644.

Narumi K, Kojima A & Crystal RG 1998 Adenovirus vector-mediated perforin expression driven by a glucocorticoid-inducible promoter inhibits tumor growth in vivo. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **19** 936-941.

Ngan ES, Schillinger K, DeMayo F & Tsai SY 2002 The mifepristone-inducible gene regulatory system in mouse models of disease and gene therapy. *Semin.Cell Dev.Biol.* **13** 143-149.

Nicholson DW 1999 Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death.Differ.* **6** 1028-1042.

Niemann H & Kues WA 2000 Transgenic livestock: premises and promises. *Anim Reprod.Sci.* **60-61** 277-293.

No D, Yao TP & Evans RM 1996 Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93** 3346-3351.

Nordstrom JL 2003 The antiprogestin-dependent GeneSwitch system for regulated gene therapy. *Steroids* **68** 1085-1094.

Ochi M, Ohdan H, Mitsuta H, Onoe T, Tokita D, Hara H, Ishiyama K, Zhou W, Tanaka Y & Asahara T 2004 Liver NK cells expressing TRAIL are toxic against self hepatocytes in mice. *Hepatology* **39** 1321-1331.

Ogawa H, Kobayashi T, Yokoyama I, Nagatani N, Mizuno M, Yoshida J, Kadomatsu K, Muramatsu H, Nakao A & Muramatsu T 2002 Reduction of alpha-galactosyl xenoantigen by expression of endo-beta- galactosidase C in pig endothelial cells. *Xenotransplantation.* **9** 290-296.

Ogawa H, Muramatsu H, Kobayashi T, Morozumi K, Yokoyama I, Kurosawa N, Nakao A & Muramatsu T 2000 Molecular cloning of endo-beta -galactosidase C and its application in removing alpha -galactosyl xenoantigen from blood vessels in the pig kidney. *J.Biol.Chem.* **275** 19368-19374.

Ohdan H & Sykes M 2003 B cell tolerance to xenoantigens. *Xenotransplantation.* **10** 98-106.

Okuyama T, Fujino M, Li XK, Funeshima N, Kosuga M, Saito I, Suzuki S & Yamada M 1998 Efficient Fas-ligand gene expression in rodent liver after intravenous injection of a recombinant adenovirus by the use of a Cre-mediated switching system. *Gene Ther.* **5** 1047-1053.

Onions D, Cooper DK, Alexander TJ, Brown C, Claassen E, Foweraker JE, Harris DL, Mahy BW, Minor PD, Osterhaus AD, Pastoret PP & Yamanouchi K 2000 An approach to the control of disease transmission in pig-to-human xenotransplantation. *Xenotransplantation.* **7** 143-155.

Oriol R, Ye Y, Koren E & Cooper DK 1993 Carbohydrate antigens of pig tissues reacting with human natural antibodies as potential targets for hyperacute vascular rejection in pig-to-man organ xenotransplantation. *Transplantation* **56** 1433-1442.

Osman N, McKenzie IF, Osterried K, Ioannou YA, Desnick RJ & Sandrin MS 1997 Combined transgenic expression of alpha-galactosidase and alpha1,2-fucosyltransferase leads to optimal reduction in the major xenoepitope Galalpha(1,3)Gal. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94** 14677-14682.

Ozato K, Wan YJ & Orrison BM 1985 Mouse major histocompatibility class I gene expression begins at midsomite stage and is inducible in earlier-stage embryos by interferon. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82** 2427-2431.

Palmetshofer A, Galili U, Dalmaso AP, Robson SC & Bach FH 1998a Alpha-galactosyl epitope-mediated activation of porcine aortic endothelial cells: type I activation. *Transplantation* **65** 844-853.

- Palmetshofer A, Galili U, Dalmaso AP, Robson SC & Bach FH 1998b Alpha-galactosyl epitope-mediated activation of porcine aortic endothelial cells: type II activation. *Transplantation* **65** 971-978.
- Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R & Dixit VM 1997a An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* **277** 815-818.
- Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J & Dixit VM 1997b The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* **276** 111-113.
- Paradis K, Langford G, Long Z, Heneine W, Sandstrom P, Switzer WM, Chapman LE, Lockett C, Onions D & Otto E 1999 Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. *Science* **285** 1236-1241.
- Parker W, Bruno D, Holzkecht ZE & Platt JL 1994 Characterization and affinity isolation of xenoreactive human natural antibodies. *J.Immunol.* **153** 3791-3803.
- Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen SH, Ball S, Specht SM, Polejaeva IA, Monahan JA, Jobst PM, Sharma SB, Lamborn AE, Garst AS, Moore M, Demetris AJ, Rudert WA, Bottino R, Bertera S, Trucco M, Starzl TE, Dai Y & Ayares DL 2003 Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* **299** 411-414.
- Phillips TA, Ni J, Pan G, Ruben SM, Wei YF, Pace JL & Hunt JS 1999 TRAIL (Apo-2L) and TRAIL receptors in human placentas: implications for immune privilege. *J.Immunol.* **162** 6053-6059.
- Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A & Ashkenazi A 1996 Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J.Biol.Chem.* **271** 12687-12690.
- Platt JL, Lin SS & McGregor CG 1998 Acute vascular rejection. *Xenotransplantation.* **5** 169-175.
- Port FK, Dykstra DM, Merion RM & Wolfe RA 2004 Organ donation and transplantation trends in the USA, 2003. *Am.J.Transplant.* **4 Suppl 9** 7-12.
- Princeteau, M. Greffe Renale. 26, 249-255. 1905.  
Ref Type: Generic
- Putzer BM, Stiewe T, Crespo F & Esche H 2000 Improved safety through tamoxifen-regulated induction of cytotoxic genes delivered by Ad vectors for cancer gene therapy. *Gene Ther.* **7** 1317-1325.
- Qin L, Chavin KD, Ding Y, Favaro JP, Woodward JE, Lin J, Tahara H, Robbins P, Shaked A, Ho DY & . 1995 Multiple vectors effectively achieve gene transfer in a murine cardiac transplantation model. Immunosuppression with TGF-beta 1 or vIL-10. *Transplantation* **59** 809-816.
- Quan D, Bravery C, Chavez G, Richards A, Cruz G, Copeman L, Atkinson C, Holmes B, Davies H, Cozzi E & White D 2000 Identification, detection, and in vitro

characterization of cynomolgus monkey natural killer cells in delayed xenograft rejection of hDAF transgenic porcine renal xenografts. *Transplant.Proc.* **32** 936-937.

Rafferty MJ, Schwab M, Eibert SM, Samstag Y, Walczak H & Schonrich G 2001 Targeting the function of mature dendritic cells by human cytomegalovirus: a multilayered viral defense strategy. *Immunity.* **15** 997-1009.

Raju GP, Belland SE & Eisen HJ 1994 Prolongation of cardiac allograft survival with transforming growth factor-beta 1 in rats. *Transplantation* **58** 392-396.

Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM & Schakel K 2002 The CD16(+) (FcgammaRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J.Exp.Med.* **196** 517-527.

Ravi R & Bedi A 2002 Requirement of BAX for TRAIL/Apo2L-induced apoptosis of colorectal cancers: synergism with sulindac-mediated inhibition of Bcl-x(L). *Cancer Res.* **62** 1583-1587.

Reemtsma K 1969 Renal heterotransplantation from nonhuman primates to man. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **162** 412-418.

Rehakova Z, Trebichavsky I, Sinkora J, Splichal I & Sinkora M 1998 Early ontogeny of monocytes and macrophages in the pig. *Physiol Res.* **47** 357-363.

Renshaw SA, Parmar JS, Singleton V, Rowe SJ, Dockrell DH, Dower SK, Bingle CD, Chilvers ER & Whyte MK 2003 Acceleration of human neutrophil apoptosis by TRAIL. *J.Immunol.* **170** 1027-1033.

Rivera VM, Clackson T, Natesan S, Pollock R, Amara JF, Keenan T, Magari SR, Phillips T, Courage NL, Cerasoli F, Jr., Holt DA & Gilman M 1996 A humanized system for pharmacologic control of gene expression. *Nat.Med.* **2** 1028-1032.

Roberts AI, Devadas S, Zhang X, Zhang L, Keegan A, Greenelch K, Solomon J, Wei L, Das J, Sun E, Liu C, Yuan Z, Zhou JN & Shi Y 2003 The role of activation-induced cell death in the differentiation of T-helper-cell subsets. *Immunol.Res.* **28** 285-293.

Robertson NM, Zangrilli JG, Steplewski A, Hastie A, Lindemeyer RG, Planeta MA, Smith MK, Innocent N, Musani A, Pascual R, Peters S & Litwack G 2002 Differential expression of TRAIL and TRAIL receptors in allergic asthmatics following segmental antigen challenge: evidence for a role of TRAIL in eosinophil survival. *J.Immunol.* **169** 5986-5996.

Robson SC, Cooper DK & d'Apice AJ 2000 Disordered regulation of coagulation and platelet activation in xenotransplantation. *Xenotransplantation.* **7** 166-176.

Rogers NJ, Miranda V, Jackson I, Dorling A & Lechler RI 2000 Costimulatory blockade by the induction of an endogenous xenospecific antibody response. *Nat.Immunol.* **1** 163-168.

Roitt, I. M., Brostoff, J., and Male, D. K. Kurzes Lehrbuch der Immunologie. 1995. Georg Thieme Verlag.

Ref Type: Generic

Rose DM, Fadok VA, Riches DW, Clay KL & Henson PM 1995 Autocrine/paracrine involvement of platelet-activating factor and transforming growth factor-beta in the induction of phosphatidylserine recognition by murine macrophages. *J.Immunol.* **155** 5819-5825.

Rosenkranz S, Flesch M, Amann K, Haeuseler C, Kilter H, Seeland U, Schluter KD & Bohm M 2002 Alterations of beta-adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF-beta(1). *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **283** H1253-H1262.

Rouhani FJ, Dor FJ & Cooper DK 2004 Investigation of red blood cells from alpha1,3-galactosyltransferase-knockout pigs for human blood transfusion. *Transfusion* **44** 1004-1012.

Ruesse, I. and Sinowatz, F. Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. 1991. Verlag Paul Parey.

Ref Type: Generic

Rulicke T & Hubscher U 2000 Germ line transformation of mammals by pronuclear microinjection. *Exp.Physiol* **85** 589-601.

Rushworth SA, Bravery CA & Thompson S 2000 High sequence homology between human and pig CD40 with conserved binding to human CD154. *Transplantation* **69** 936-940.

Sablinski T, Gianello PR, Bailin M, Bergen KS, Emery DW, Fishman JA, Foley A, Hatch T, Hawley RJ, Kozlowski T, Lorf T, Meehan S, Monroy R, Powelson JA, Colvin RB, Cosimi AB & Sachs DH 1997 Pig to monkey bone marrow and kidney xenotransplantation. *Surgery* **121** 381-391.

Samstein B & Platt JL 2001 Physiologic and immunologic hurdles to xenotransplantation. *J.Am.Soc.Nephrol.* **12** 182-193.

Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB & Thorgeirsson SS 1995 Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92** 2572-2576.

Sandrin MS, Fodor WL, Mouhtouris E, Osman N, Cohny S, Rollins SA, Guilmette ER, Setter E, Squinto SP & McKenzie IF 1995 Enzymatic remodelling of the carbohydrate surface of a xenogenic cell substantially reduces human antibody binding and complement-mediated cytolysis. *Nat.Med.* **1** 1261-1267.

Sandrin MS, Vaughan HA, Dabkowski PL & McKenzie IF 1993 Anti-pig IgM antibodies in human serum react predominantly with Gal(alpha 1-3)Gal epitopes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90** 11391-11395.

Sarkar NN 2002 Mifepristone: bioavailability, pharmacokinetics and use-effectiveness. *Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol.* **101** 113-120.

Sato K, Hida S, Takayanagi H, Yokochi T, Kayagaki N, Takeda K, Yagita H, Okumura K, Tanaka N, Taniguchi T & Ogasawara K 2001 Antiviral response by

natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. *Eur.J.Immunol.* **31** 3138-3146.

Sato K, Takigami K, Miyatake T, Czismadia E, Latinne D, Bazin H, Bach FH & Soares MP 1999 Suppression of delayed xenograft rejection by specific depletion of elicited antibodies of the IgM isotype. *Transplantation* **68** 844-854.

Schmaltz C, Alpdogan O, Kappel BJ, Muriglian SJ, Rotolo JA, Ongchin J, Willis LM, Greenberg AS, Eng JM, Crawford JM, Murphy GF, Yagita H, Walczak H, Peschon JJ & van den Brink MR 2002 T cells require TRAIL for optimal graft-versus-tumor activity. *Nat.Med.* **8** 1433-1437.

Schmid RA, Stammberger U, Hillinger S, Gaspert A, Boasquevisque CH, Malipiero U, Fontana A & Weder W 2000 Fas ligand gene transfer combined with low dose cyclosporine A reduces acute lung allograft rejection. *Transpl.Int.* **13 Suppl 1** S324-S328.

Schmoeckel M, Bhatti FN, Zaidi A, Cozzi E, Waterworth PD, Tolan MJ, Pino-Chavez G, Goddard M, Warner RG, Langford GA, Dunning JJ, Wallwork J & White DJ 1998 Orthotopic heart transplantation in a transgenic pig-to-primate model. *Transplantation* **65** 1570-1577.

Schneider MK, Forte P & Seebach JD 2001 Adhesive interactions between human NK cells and porcine endothelial cells. *Scand.J.Immunol.* **54** 70-75.

Schneider P, Olson D, Tardivel A, Browning B, Lugovskoy A, Gong D, Dobles M, Hertig S, Hofmann K, Van Vlijmen H, Hsu YM, Burkly LC, Tschopp J & Zheng TS 2003 Identification of a new murine tumor necrosis factor receptor locus that contains two novel murine receptors for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J.Biol.Chem.* **278** 5444-5454.

Schneider P, Thome M, Burns K, Bodmer JL, Hofmann K, Kataoka T, Holler N & Tschopp J 1997 TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity.* **7** 831-836.

Schuster N & Kriegelstein K 2002 Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell Tissue Res.* **307** 1-14.

Schuurman HJ, Pino-Chavez G, Phillips MJ, Thomas L, White DJ & Cozzi E 2002 Incidence of hyperacute rejection in pig-to-primate transplantation using organs from hDAF-transgenic donors. *Transplantation* **73** 1146-1151.

Sebille F, Guillet M, Brouard S, Gagne K, Petzold T, Blancho G, Vanhove B & Souillou JP 2001 T-cell-mediated rejection of vascularized xenografts in the absence of induced anti-donor antibody response. *Am.J.Transplant.* **1** 21-28.

Secchiero P, Gonelli A, Carnevale E, Milani D, Pandolfi A, Zella D & Zauli G 2003 TRAIL promotes the survival and proliferation of primary human vascular endothelial cells by activating the Akt and ERK pathways. *Circulation* **107** 2250-2256.

Secchiero P, Zerbinati C, Rimondi E, Corallini F, Milani D, Grill V, Forti G, Capitani S & Zauli G 2004 TRAIL promotes the survival, migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cell Mol.Life Sci.* **61** 1965-1974.

Seddon B & Mason D 1999 Regulatory T cells in the control of autoimmunity: the essential role of transforming growth factor beta and interleukin 4 in the prevention of autoimmune thyroiditis in rats by peripheral CD4(+)CD. *J.Exp.Med.* **189** 279-288.

Sedger LM, Glaccum MB, Schuh JC, Kanaly ST, Williamson E, Kayagaki N, Yun T, Smolak P, Le T, Goodwin R & Gliniak B 2002 Characterization of the in vivo function of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L gene-deficient mice. *Eur.J.Immunol.* **32** 2246-2254.

Seeland U, Haeuseler C, Hinrichs R, Rosenkranz S, Pfitzner T, Scharffetter-Kochanek K & Bohm M 2002 Myocardial fibrosis in transforming growth factor-beta(1) (TGF-beta(1)) transgenic mice is associated with inhibition of interstitial collagenase. *Eur.J.Clin.Invest* **32** 295-303.

Seki N, Hayakawa Y, Brooks AD, Wine J, Wiltout RH, Yagita H, Tanner JE, Smyth MJ & Sayers TJ 2003 Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis is an important endogenous mechanism for resistance to liver metastases in murine renal cancer. *Cancer Res.* **63** 207-213.

Sellheyer K, Bickenbach JR, Rothnagel JA, Bundman D, Longley MA, Krieg T, Roche NS, Roberts AB & Roop DR 1993 Inhibition of skin development by overexpression of transforming growth factor beta 1 in the epidermis of transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90** 5237-5241.

Sharma A, Okabe J, Birch P, McClellan SB, Martin MJ, Platt JL & Logan JS 1996 Reduction in the level of Gal(alpha1,3)Gal in transgenic mice and pigs by the expression of an alpha(1,2)fucosyltransferase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93** 7190-7195.

Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P & Ashkenazi A 1997 Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* **277** 818-821.

Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D & . 1992 Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* **359** 693-699.

Sillett HK, Cruickshank SM, Southgate J & Trejdosiewicz LK 2001 Transforming growth factor-beta promotes 'death by neglect' in post-activated human T cells. *Immunology* **102** 310-316.

Simon AK, Williams O, Mongkolsapaya J, Jin B, Xu XN, Walczak H & Sreaton GR 2001 Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in T cell development: sensitivity of human thymocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98** 5158-5163.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A,

Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Boyle WJ & . 1997 Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89** 309-319.

Singer DS & Maguire JE 1990 Regulation of the expression of class I MHC genes. *Crit Rev.Immunol.* **10** 235-257.

Sinkora J, Rehakova Z, Sinkora M, Cukrowska B & Tlaskalova-Hogenova H 2002 Early development of immune system in pigs. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **87** 301-306.

Sinkora M, Sinkora J, Rehakova Z & Butler JE 2000 Early ontogeny of thymocytes in pigs: sequential colonization of the thymus by T cell progenitors. *J.Immunol.* **165** 1832-1839.

Slebodzinski AB & Twardon J 2004 Thyroid hormones (TH) and 5'-monodeiodinase (5'-MD) activity in goat's milk from the early, mid- and late lactation period. *Acta Vet.Hung.* **52** 349-359.

Smyth MJ, Cretney E, Takeda K, Wiltrott RH, Sedger LM, Kayagaki N, Yagita H & Okumura K 2001 Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J.Exp.Med.* **193** 661-670.

Smyth MJ, Takeda K, Hayakawa Y, Peschon JJ, van den Brink MR & Yagita H 2003 Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy. *Immunity.* **18** 1-6.

Song K, Chen Y, Goke R, Wilmen A, Seidel C, Goke A, Hilliard B & Chen Y 2000 Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression. *J.Exp.Med.* **191** 1095-1104.

Spitz IM & Bardin CW 1993 Mifepristone (RU 486)--a modulator of progestin and glucocorticoid action. *N.Engl.J.Med.* **329** 404-412.

Sporn MB 1999 TGF-beta: 20 years and counting. *Microbes.Infect.* **1** 1251-1253.

Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, Krammer PH & Walczak H 2000 FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity.* **12** 599-609.

Stone KR, Walgenbach AW, Abrams JT, Nelson J, Gillett N & Galili U 1997 Porcine and bovine cartilage transplants in cynomolgus monkey: I. A model for chronic xenograft rejection. *Transplantation* **63** 640-645.

Strbak V, Macho L, Knopp J & Struharova L 1974 Thyroxine content in mother milk and regulation of thyroid function of suckling rats. *Endocrinol.Exp.* **8** 59-69.

Strebel A, Bachmann F, Wernli M & Erb P 2002 Tumor necrosis factor-related, apoptosis-inducing ligand supports growth of mouse mastocytoma tumors by killing tumor-infiltrating macrophages. *Int.J.Cancer* **100** 627-634.

Subramaniam A, Gulick J, Neumann J, Knotts S & Robbins J 1993 Transgenic analysis of the thyroid-responsive elements in the alpha-cardiac myosin heavy chain gene promoter. *J.Biol.Chem.* **268** 4331-4336.

Subramaniam A, Jones WK, Gulick J, Wert S, Neumann J & Robbins J 1991 Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *J.Biol.Chem.* **266** 24613-24620.

Sullivan JA, Oettinger HF, Sachs DH & Edge AS 1997 Analysis of polymorphism in porcine MHC class I genes: alterations in signals recognized by human cytotoxic lymphocytes. *J.Immunol.* **159** 2318-2326.

Swenson KM, Ke B, Wang T, Markowitz JS, Maggard MA, Spear GS, Imagawa DK, Goss JA, Busuttil RW & Seu P 1998 Fas ligand gene transfer to renal allografts in rats: effects on allograft survival. *Transplantation* **65** 155-160.

Tadaki DK, Williams A, Lee KP, Kirk AD & Harlan DM 2003 Porcine CD80: cloning, characterization, and evidence for its role in direct human T-cell activation. *Xenotransplantation.* **10** 252-258.

Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Kayagaki N, Yamaguchi N, Kakuta S, Iwakura Y, Yagita H & Okumura K 2001 Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat.Med.* **7** 94-100.

Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Kayagaki N, Yagita H & Okumura K 2002 Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J.Exp.Med.* **195** 161-169.

Takeuchi T, Ueki T, Nishimatsu H, Kajiwara T, Ishida T, Jishage K, Ueda O, Suzuki H, Li B, Moriyama N & Kitamura T 1999 Accelerated rejection of Fas ligand-expressing heart grafts. *J.Immunol.* **162** 518-522.

Tanemura M, Chong AS, DiSesa VJ & Galili U 2002a Direct killing of xenograft cells by CD8+ T cells of discordant xenograft recipients. *Transplantation* **74** 1587-1595.

Tanemura M, Miyagawa S, Koyota S, Koma M, Matsuda H, Tsuji S, Shirakura R & Taniguchi N 1998 Reduction of the major swine xenoantigen, the alpha-galactosyl epitope by transfection of the alpha2,3-sialyltransferase gene. *J.Biol.Chem.* **273** 16421-16425.

Tanemura M, Ogawa H, Yin DP, Chen ZC, DiSesa VJ & Galili U 2002b Elimination of anti-Gal B cells by alpha-Gal ricin1. *Transplantation* **73** 1859-1868.

Tecchio C, Huber V, Scapini P, Calzetti F, Margotto D, Todeschini G, Pilla L, Martinelli G, Pizzolo G, Rivoltini L & Cassatella MA 2004 IFNalpha-stimulated neutrophils and monocytes release a soluble form of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) displaying apoptotic activity on leukemic cells. *Blood* **103** 3837-3844.

Thorburn A 2004 Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal.* **16** 139-144.

Thorburn J, Bender LM, Morgan MJ & Thorburn A 2003 Caspase- and serine protease-dependent apoptosis by the death domain of FADD in normal epithelial cells. *Mol.Biol.Cell* **14** 67-77.

Tsai HF, Lai JJ, Chou AH, Wang TF, Wu CS & Hsu PN 2004 Induction of costimulation of human CD4 T cells by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: possible role in T cell activation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **50** 629-639.

Tucker A, Belcher C, Moloo B, Bell J, Mazzulli T, Humar A, Hughes A, McArdle P & Talbot A 2002 The production of transgenic pigs for potential use in clinical xenotransplantation: microbiological evaluation. *Xenotransplantation.* **9** 191-202.

Ursini-Siegel J, Zhang W, Altmeyer A, Hatada EN, Do RK, Yagita H & Chen-Kiang S 2002 TRAIL/Apo-2 ligand induces primary plasma cell apoptosis. *J.Immunol.* **169** 5505-5513.

van den Berg CW & Morgan BP 1994 Complement-inhibiting activities of human CD59 and analogues from rat, sheep, and pig are not homologously restricted. *J.Immunol.* **152** 4095-4101.

van Maurik A, Herber M, Wood KJ & Jones ND 2002 Cutting edge: CD4+CD25+ alloantigen-specific immunoregulatory cells that can prevent CD8+ T cell-mediated graft rejection: implications for anti-CD154 immunotherapy. *J.Immunol.* **169** 5401-5404.

van Sloun PP, Lohman PH & Vrieling H 1997 The design of a new mutation model for active genes: expression of the Escherichia coli lac operon in mammalian cells. *Mutat.Res.* **382** 21-33.

Wada M, Amae S, Sasaki H, Ishii T, Sano N, Nio M, Hayashi Y & Ohi R 2003 The functional roles of porcine CD80 molecule and its ability to stimulate and regulate human anti-pig cellular response. *Transplantation* **75** 1887-1894.

Wada S, Manabe N, Nakayama M, Inou N, Matsui T & Miyamoto H 2002 TRAIL-decoy receptor 1 plays inhibitory role in apoptosis of granulosa cells from pig ovarian follicles. *J.Vet.Med.Sci.* **64** 435-439.

Wahl SM, Allen JB, Weeks BS, Wong HL & Klotman PE 1993 Transforming growth factor beta enhances integrin expression and type IV collagenase secretion in human monocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90** 4577-4581.

Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB & Sporn MB 1987 Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84** 5788-5792.

Wahl SM, Orenstein JM & Chen W 2000 TGF-beta influences the life and death decisions of T lymphocytes. *Cytokine Growth Factor Rev.* **11** 71-79.

Wahl SM, Swisher J, McCartney-Francis N & Chen W 2004 TGF-beta: the perpetrator of immune suppression by regulatory T cells and suicidal T cells. *J.Leukoc.Biol.* **76** 15-24.

Wakefield LM, Winokur TS, Hollands RS, Christopherson K, Levinson AD & Sporn MB 1990 Recombinant latent transforming growth factor beta 1 has a longer plasma half-life in rats than active transforming growth factor beta 1, and a different tissue distribution. *J.Clin.Invest* **86** 1976-1984.

Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA, Smith CA, Goodwin RG & Rauch CT 1997 TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.* **16** 5386-5397.

Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM & Lenardo MJ 2001 Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98** 13884-13888.

Wang J, Zheng L, Lobito A, Chan FK, Dale J, Sneller M, Yao X, Puck JM, Straus SE & Lenardo MJ 1999 Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* **98** 47-58.

Wang S, Boonman ZF, Li HC, He Y, Jager MJ, Toes RE & Niederkorn JY 2003 Role of TRAIL and IFN-gamma in CD4+ T cell-dependent tumor rejection in the anterior chamber of the eye. *J.Immunol.* **171** 2789-2796.

Wang Y, O'Malley BW, Jr., Tsai SY & O'Malley BW 1994 A regulatory system for use in gene transfer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91** 8180-8184.

Washburn B, Weigand MA, Grosse-Wilde A, Janke M, Stahl H, Rieser E, Sprick MR, Schirmacher V & Walczak H 2003 TNF-related apoptosis-inducing ligand mediates tumoricidal activity of human monocytes stimulated by Newcastle disease virus. *J.Immunol.* **170** 1814-1821.

Watier H, Guillaumin JM, Vallee I, Thibault G, Gruel Y, Lebranchu Y & Bardos P 1996 Human NK cell-mediated direct and IgG-dependent cytotoxicity against xenogeneic porcine endothelial cells. *Transpl.Immunol.* **4** 293-299.

Weiner HL 2000 Oral tolerance, an active immunologic process mediated by multiple mechanisms. *J.Clin.Invest* **106** 935-937.

Weiner HL 2001 Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol.Rev.* **182** 207-214.

Welch GR, Wong HL & Wahl SM 1990 Selective induction of Fc gamma RIII on human monocytes by transforming growth factor-beta. *J.Immunol.* **144** 3444-3448.

Welsh RM, O'Donnell CL, Reed DJ & Rother RP 1998 Evaluation of the Galalpha1-3Gal epitope as a host modification factor eliciting natural humoral immunity to enveloped viruses. *J.Virol.* **72** 4650-4656.

Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA & . 1995 Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity.* **3** 673-682.

Wu GS, Burns TF, Zhan Y, Alnemri ES & el Deiry WS 1999 Molecular cloning and functional analysis of the mouse homologue of the KILLER/DR5 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor. *Cancer Res.* **59** 2770-2775.

Xie L, Shi W & Guo P 2003 Roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in corneal transplantation. *Transplantation* **76** 1556-1559.

Xu H, Fagoaga O, Gundry SR & Bailey LL 2000 The role of human T cells in human anti-pig xenogeneic cellular responses. *Transplant.Proc.* **32** 952-953.

Yamada K, Sachs DH & DerSimonian H 1995a Direct and indirect recognition of pig class II antigens by human T cells. *Transplant.Proc.* **27** 258-259.

Yamada K, Sachs DH & DerSimonian H 1995b Human anti-porcine xenogeneic T cell response. Evidence for allelic specificity of mixed leukocyte reaction and for both direct and indirect pathways of recognition. *J.Immunol.* **155** 5249-5256.

Yu Y, Liu S, Wang W, Song W, Zhang M, Zhang W, Qin Z & Cao X 2002 Involvement of tumour necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand in enhanced cytotoxicity of lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells to activated T cells. *Immunology* **106** 308-315.

Yurovsky VV 2003 Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand enhances collagen production by human lung fibroblasts. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **28** 225-231.

Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L, Alnemri ES & Perussia B 1998 Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J.Exp.Med.* **188** 2375-2380.

Zamai L, Burattini S, Luchetti F, Canonico B, Ferri P, Melloni E, Gonelli A, Guidotti L, Papa S & Falcieri E 2004 In vitro apoptotic cell death during erythroid differentiation. *Apoptosis.* **9** 235-246.

Zauli G, Pandolfi A, Gonelli A, Di Pietro R, Guarnieri S, Ciabattini G, Rana R, Vitale M & Secchiero P 2003 Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) sequentially upregulates nitric oxide and prostanoid production in primary human endothelial cells. *Circ.Res.* **92** 732-740.

Zhang M, Li X, Pang X, Ding L, Wood O, Clouse K, Hewlett I & Dayton AI 2001 Identification of a potential HIV-induced source of bystander-mediated apoptosis in T cells: upregulation of trail in primary human macrophages by HIV-1 tat. *J.Biomed.Sci.* **8** 290-296.

Zhang XD, Nguyen T, Thomas WD, Sanders JE & Hersey P 2000 Mechanisms of resistance of normal cells to TRAIL induced apoptosis vary between different cell types. *FEBS Lett.* **482** 193-199.

Zhang XR, Zhang LY, Devadas S, Li L, Keegan AD & Shi YF 2003 Reciprocal expression of TRAIL and CD95L in Th1 and Th2 cells: role of apoptosis in T helper subset differentiation. *Cell Death.Differ.* **10** 203-210.

Zhao B, Chua SS, Burcin MM, Reynolds SD, Stripp BR, Edwards RA, Finegold MJ, Tsai SY & DeMayo FJ 2001 Phenotypic consequences of lung-specific inducible expression of FGF-3. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98** 5898-5903.

Zheng SG, Gray JD, Ohtsuka K, Yamagiwa S & Horwitz DA 2002 Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. *J.Immunol.* **169** 4183-4189.

Zhu A & Hurst R 2002 Anti-N-glycolylneuraminic acid antibodies identified in healthy human serum. *Xenotransplantation.* **9** 376-381.

Zhu HJ & Burgess AW 2001 Regulation of transforming growth factor-beta signaling. *Mol.Cell Biol.Res.Commun.* **4** 321-330.

<http://eased.bioinf.mdc-berlin.de/>

<http://www.expasy.org>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>

## 9 Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Eckhard Wolf für die Bereitstellung des Themas, seine hilfreichen Anregungen, sowie die vielfältigen Möglichkeiten der wissenschaftlichen Arbeit bedanken, die mir durch eine Beschäftigung an seinem Institut zuteil wurden.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Regina Klose für die Betreuung dieser Arbeit und ihren Willen zur stetigen Hilfe und Unterstützung sowie zur Korrektur meiner Schriftstücke.

Danken möchte ich auch Dr. Robert Endres für die Bereitstellung der Mäuse und die Einführung in die Arbeiten mit FACS-Analysen sowie Dr. Heinrich Flasswinkel und Nadja Sandholzer für die Einführung in die Immunologie und der Bereitstellung von Antikörpern.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Dr. Marc Boelhauve für die Einführung in die qRT-PCR-Analysen und für die kritische Durchsicht dieses Manuskripts.

Bei Prof. Dr. Reinhard Schwinzer und bei Tanja Bedke (MHH Hannover) bedanke ich mich herzlich für die gute Kooperation und für die Durchführung der Apoptoseassays.

Ganz besonders bedanke ich mich

- bei Frau Lili Lü für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor;
- bei Dr. Ingrid Renner-Müller, Corinna Mörth sowie dem Mäuse-Team mit Petra, Tanja und Antonia für die verantwortungsvolle Betreuung der Mäuse und der hilfreichen Zusammenarbeit;
- bei Dr. Barbara Keßler, Sonja Ewerling, Christian Erdle und allen anderen der Schweineabteilung für die verantwortungsvolle Betreuung der Schweine und der hilfreichen Zusammenarbeit bei den Probennahmen;
- bei Dr. Thomas Fröhlich für die zahlreichen Diskussionen über die Proteinanalytik;
- bei der Arbeitsgruppe Blum für die Durchführung der Sequenzierungen und der Bereitstellung der Enzyme für die RACE.

Bei Daniela Diehl bedanke ich mich herzlich für die zahlreichen Tipps und den netten Unterhaltungen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Dr. Andreas Höflich, Dr. Ottheinz Krebs, Dr. Sigrid Müller, Dr. Marlon Schneider, Dr. Irmgard Thorey, Dr. Rui Zhou, Petra Demleitner, Sylvia Jande, Tamara Holy, sowie bei meinen Mitdoktoranden Anne, Dagmar, Esther, Franziska, Lika, Maik, Regine und Sanne für die zahlreichen Unterhaltungen und der netten Atmosphäre.

Meinen Eltern und Geschwistern, die mich seit Beginn des Studiums und während der Doktorarbeit zu jeder Zeit unterstützt haben, möchte ich ebenfalls meinen besonderen Dank aussprechen.

Der Bayerischen Forschungsstiftung (Förderungsnummern 328/99, 461/01) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (FOR 535) bin ich zum Dank für die Förderung des Projektes verpflichtet. Ebenfalls zum Dank verpflichtet bin ich der LMU München für die finanzielle Unterstützung durch das Promotionsstipendium.

## Lebenslauf

Name: Elisabeth Gabriele Kemter  
Geburtsdatum: 11.01.1976  
Geburtsort: Augsburg

### Ausbildung

1982 – 1988 Volksschule Steppach

1988 – 1992 Agnes-Bernauer-Realschule Augsburg  
Abschluss: Mittlere Reife

1992 – 1996 Holbein-Gymnasium Augsburg  
Abschluss: Abitur

1996 – 2001 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität  
München  
Abschluss: Staatsexamen

01/2002 Approbation

02/2002 – 11/2004 Dissertation am Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und  
Biotechnologie, Genzentrum  
Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

### Stipendium

06/2002 – 05/2004 Promotionsstipendium der Ludwig-Maximilians-Universität  
München