

Aus der Klinik für Anaesthesiologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Herr Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler

**Xenogene Reaktion bei ex vivo Perfusion  
von dreifach genetisch modifizierten  
Schweineherzen mit humanem Blut**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Katja Gahle  
aus  
Iserlohn  
2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Jan Michael-Abicht

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Sebastian Michel  
apl. Prof. Dr. Georg Enders

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündl. Prüfung: 30.09.2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>IX</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>XI</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>12</b>
1.1 Geschichte der Xenotransplantation.....	13
1.2 Xenogene Abstoßung und ihre Mechanismen.....	15
1.2.1 Hyperakute Abstoßungsreaktion .....	15
1.2.2 Akute vaskuläre Abstoßungsreaktion .....	15
1.2.3 Thrombotische Mikroangiopathie .....	16
1.2.4 Akute zelluläre Abstoßungsreaktion .....	16
1.2.5 Chronische Abstoßungsreaktion .....	16
1.2.6 Rolle der NK-Zellen bei der xenogenen Abstoßung .....	17
1.2.7 Vermeidung xenogener Abstoßung.....	18
1.3 Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	20
<b>2 Material und Methode</b>	<b>21</b>
2.1 Art der Perfusionsversuche .....	21
2.2 Blutspender .....	21
2.3 Spendertiere .....	21
2.3.1 Auswahl und Herkunft der Spendertiere.....	21
2.3.2 Prämedikation und Anästhesie der Spendertiere .....	22

2.4 Herzexplantation.....	22
2.4.1 Explantation .....	22
2.4.2 Kanülierung des explantierten Herzens.....	23
2.5 Perfusionssystem .....	23
2.5.1 Aufbau und Vorbereitung des Systems .....	23
2.5.2 Perfusion nach Langendorff .....	26
2.5.3 Working-Heart-Perfusion.....	26
2.6 Zielparameter .....	27
2.7 Berechnete hämodynamische Parameter .....	29
2.7.1 Herzindex .....	29
2.7.2 Relatives Schlagvolumen.....	29
2.7.3 Koronarindex.....	29
2.7.4 Relativer Sauerstoffverbrauch.....	30
2.8 Isolation der mononukleären Zellen des peripheren Blutes.....	31
2.9 Durchflusszytometrie .....	31
2.10 Immunfluoreszenz der Gewebeproben .....	34
2.11 Histologie .....	34
2.12 Statistische Auswertung.....	35

### **3 Ergebnisse 36**

3.1 Herzgewicht.....	36
3.2 Hämodynamik und Blutgase.....	37
3.2.1 Mittlere Blutdrücke.....	37
3.2.2 Schlagvolumen.....	39
3.2.3 Herzfrequenz.....	40

3.2.4	Koronarindex.....	41
3.2.5	Herzindex .....	42
3.2.6	Sauerstoffverbrauch .....	43
3.2.7	Lactatkonzentration.....	44
3.3	Quantifizierung der NK-Zellen im Perfusat .....	45
3.4	Immunfluoreszenz der Gewebeproben.....	46
3.4.1	$\alpha$ -Gal/hCD46/HLA-E.....	46
3.4.2	C3b/c und C4b/c.....	49
3.4.3	IgM und IgG .....	51
3.4.4	NKp46 .....	53
3.5	Histologie.....	54
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
4.1	Relevanz für die Xenotransplantation.....	56
4.2	Working-Heart-Modell: Möglichkeiten und Grenzen .....	57
4.3	Expression von $\alpha$ -Gal, hCD46 und HLA-E in den Versuchstieren .....	59
4.4	Wirkung der genetischen Modifikationen.....	59
4.4.1	Gewebescha­den .....	59
4.4.2	Herzfunktion und Metabolismus .....	60
4.4.3	Antikörper-Ablagerungen .....	61
4.4.4	Komplementaktivierung.....	62
4.4.5	NK-Zellen und xenogene Abstoßung .....	62
4.5	Ausblick .....	64
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>68</b>

<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>74</b>
<b>Danksagung</b>	<b>75</b>

# Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ACT	Activated clotting time
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
AVR	Akute vaskuläre Abstoßungsreaktion
AZR	Akute zelluläre Abstoßungsreaktion
CLR	C-Typ Lektin Rezeptor
CR	Chronische Abstoßungsreaktion
DMSO	Dimethylsulfoxid
FACS	Fluorescence activated cell sorting
gm	Genetisch modifiziert
HAR	Hyperakute Abstoßungsreaktion
Hb	Hämoglobin-Wert
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIS-Score	Histological Injury Severity-Score
HLA	Human Leukocyte Antigen
HSA	Humanes Serumalbumin
KIR	Killer-Zelle Immunoglobulin-like Rezeptor
KRP	Komplement-regulierendes Protein
LA	Linker Vorhof
LV	Linker Ventrikel
MHC	Major Histocompatibility Complex
n.s.	Nicht signifikant
NCR	Natürlicher Zytotoxischer Rezeptor

NKR	NK-Zell-Rezeptor
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
non $\alpha$ -Gal	Nicht Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Kohlenhydratverbindungen
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
RA	Rechte Vorhof
RPMI	Zellkulturmedium, entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
RV	Rechter Ventrikel
TMA	Thrombotische Mikroangiopathie
U/min	Umdrehungen pro Minute
V.	Vena
wt	Wildtyp
$\alpha$ -Gal	Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Kohlenhydratverbindungen

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Schematische Skizze des ex vivo Perfusionsmodells. ....	24
Abbildung 2.2: Ex vivo Perfusionsmodell. ....	25
Abbildung 2.3: Gating-Strategie zur Identifizierung der NK-Zellen. ....	33
Abbildung 3.4: Zunahme der Herzgewichte in %. ....	36
Abbildung 3.5: Mittleren Aortendrucke im Verlauf der Versuche. ....	37
Abbildung 3.6: Mitteldrucke im linken Vorhof im Verlauf der Versuche. ....	38
Abbildung 3.7: Mitteldrucke im rechten Vorhof im Verlauf der Versuche. ....	38
Abbildung 3.8: Schlagvolumina bezogen auf das Herzgewicht. ....	39
Abbildung 3.9: Herzfrequenzen im Verlauf der Versuche. ....	40
Abbildung 3.10: Koronarindizes im Verlauf der Versuche. ....	41
Abbildung 3.11: Herzindizes im Verlauf der Versuche. ....	42
Abbildung 3.12: Sauerstoffverbrauch der Herzen im Verlauf der Versuche. ....	43
Abbildung 3.13: Lactatkonzentrationen im Perfusat im Verlauf der Versuche..	44
Abbildung 3.14: Lactatkonzentration während der Working-Heart-Perfusion...	44
Abbildung 3.15: Relative NK-Zellzahl im Verlauf der Versuche .....	45
Abbildung 3.16: Immunfluoreszenz - Markierung mit hCD46-Antikörper. ....	46
Abbildung 3.17: Immunfluoreszenz - Markierung mit $\alpha$ -Gal-Antikörper. ....	47
Abbildung 3.18: Immunfluoreszenz - Markierung mit HLA-E-Antikörper. ....	47
Abbildung 3.19: Immunfluoreszenz - Markierung der Gewebe. ....	48
Abbildung 3.20: Immunfluoreszenz - Markierung mit C3b/c-Antikörper. ....	49
Abbildung 3.21: Immunfluoreszenz - Markierung mit C4b/c-Antikörper. ....	49
Abbildung 3.22: Immunfluoreszenz - Markierung der Gewebe. ....	50
Abbildung 3.23: Immunfluoreszenz - Markierung mit IgM-Antikörper. ....	51

Abbildung 3.24: Immunfluoreszenz - Markierung mit IgG-Antikörper.....	51
Abbildung 3.25: Immunfluoreszenz - Markierung der Gewebe.....	52
Abbildung 3.26: Immunfluoreszenz - Markierung mit NKp46-Antikörper.....	53
Abbildung 3.27: Immunfluoreszenz - Markierung der Gewebe.....	53
Abbildung 3.28: Gewebeschnitte (HE-Färbung) nach acht Stunden Perfusion.	54
Abbildung 3.29: HIS-Score der mit HE gefärbten Gewebeschnitte. ....	55

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Versuchsablauf mit Messzeitpunkten .....	27
Tabelle 2.2: Verwendete Antikörper zur Identifizierung der NK-Zellen.....	32
Tabelle 3.3: Histologische Auswertung nach dem HIS-Score .....	55

# 1 Einleitung

Für viele Patienten stellt eine Organtransplantation die letzte Chance auf ein längerfristiges Überleben dar. Es herrscht jedoch ein bedeutender Mangel an Spendern und Spenderorganen. Während die Zahl der Patienten auf der Warteliste für ein Spenderorgan in Deutschland seit Jahren konstant hoch ist bzw. leicht zunimmt, verringert sich die Zahl der tatsächlich transplantierten Organe jedes Jahr stetig. So wurden im Jahr 2016 3708 Organe transplantiert, davon 297 im Rahmen von Herztransplantationen. 2010 waren es noch 4932 Organe, davon 366 Herzen. Ende des Jahres 2016 standen demgegenüber 725 Patienten auf der Warteliste für eine Herztransplantation. Dies entspricht einem Rückgang der Gesamtorgantransplantationen in Deutschland zwischen 2011 und 2016 um ca. 25% [1].

Auch durch den sogenannten „Organspendeskandal“ von 2012 hat die Organspendebereitschaft in Deutschland weiter abgenommen. Bei diesem wurden mehrere Transplantationszentren beschuldigt, ihren Patienten bei der zentralen Organvergabestelle Eurotransplant zu hohe Dringlichkeitsstufen zugewiesen zu haben, um diese schneller mit einem Organ versorgen zu können [2].

Die Xenotransplantation hat das Potential, die Problematik des humanen Organmangels zu entschärfen. Hierbei handelt es sich um die Übertragung von Zellen, Geweben oder Organen zwischen unterschiedlichen Spezies, z.B. vom Schwein zum Menschen. Der Begriff ist abgeleitet vom griechischen Wort „Xénos“, das übersetzt Fremder bedeutet [3-5].

Die Übertragung bei phylogenetisch sehr nah verwandten Spezies, wie Affen und Menschen, wird als konkordant bezeichnet und zeigt weit weniger immunologische Barrieren als eine diskordante Transplantation zwischen weit entfernten Spezies wie Schweinen und Menschen [6]. So tritt eine hyperakute Abstoßungsreaktion, wie in Kapitel 1.2.1 erläutert, bei konkordanten Transplantationen nicht auf. Eine über Jahre erfolgreiche Transplantation ganzer Organe von einer nicht nah verwandten Spezies zur anderen war bisher nicht möglich, da hier eine Vielzahl von artspezifischen immunologischen Barrieren überwunden werden muss. Zu diesen Inkompatibilitäten zwischen biologischen Systemen verschiedener Spezies wurden in den letzten Jahrzehnten viele Erkenntnisse gewonnen und auch Lösungskonzepte entwickelt [7].

Über die Wahl der geeigneten Tierart für zukünftige Xenotransplantationen mit Menschen wurde in den vergangenen Jahrzehnten kontrovers diskutiert. Durch die relativ nahe Verwandtschaft von Affen und Menschen galten diese lange als vielversprechendste Kandidaten. Von diesem Konzept wurde jedoch wieder Abstand genommen, da die Tiere durch die langen Zuchtzeiten, die geringe Wurfzahl und die aufwändigen Haltungsbedingungen für die Forschung und später im klinischen Alltag extrem kostenaufwendig wären und so im Vergleich zu anderen Spezies weniger Organe zur Verfügung stehen würden [8]. Auch ethische Aspekte spielten in der öffentlichen Diskussion eine große Rolle. So wurde die hohe Intelligenz der Tiere und ihre damit verbundene Fähigkeit, Leid und Schmerz zu empfinden, als ein wichtiges Argument gegen ihre Nutzung als Spendertiere angesehen. Darüber hinaus ist die Gefahr einer Übertragung pathogener Viren über die Artgrenzen hinweg bei nah verwandten Spezies wie Affen und Menschen als hoch einzustufen [9-11].

Heute gelten Schweine als die geeignetste Spezies. Sie haben kurze Zuchtzeiten und eine hohe Wurfzahl. Zudem hat der Mensch jahrhundertlang Erfahrung in der Schweinezucht. Auch der Stoffwechsel der Tiere ist dem der Menschen ähnlich, und die Organe haben die passende Größe und Leistungsfähigkeit. Von großer Bedeutung sind auch die guten Resultate, die man bei der Züchtung von gentechnisch veränderten Schweinen erzielt. Darüber hinaus kann die Gefahr der Übertragung pathogener Viren durch die entferntere Verwandtschaft als geringer eingestuft und durch eine möglichst keimfreie Aufzucht weiter minimiert werden [12-14].

In dieser Arbeit wird mit Hinblick auf die xenogene Transplantation die Interaktion von menschlichem Blut und Schweineherzen in einem ex vivo Perfusionsmodell betrachtet. Dabei wird eine Versuchsgruppe mit dreifach genetisch modifizierten Tieren (s. Kapitel 2.3.1) einer Kontrollgruppe aus Wildtyp-Schweinen gegenübergestellt. Besonderes Augenmerk gilt hier der Rolle der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) bei der akuten Organabstoßung.

## **1.1 Geschichte der Xenotransplantation**

Die Xenotransplantation ist nicht etwa eine Erfindung der modernen Medizin, sondern hatte ihre belegbaren Anfänge bereits vor mehreren Jahrhunderten. So ist die Transfusion bzw. Transplantation von Blut, Haut und Knochen von Tier zu Mensch im 16. Jahrhundert gut dokumentiert [15].

Im 20. Jahrhundert erlebte die Xenotransplantation dann einen wahren Aufschwung, vor allem durch die sich immer weiter verbessernden Operationsmöglichkeiten: Anfang des Jahrhunderts erfand Alexis Carrel eine Methode zur Anastomosierung von Blutgefäßen und ermöglichte so die ersten erfolgreichen Organtransplantationen [16].

In den 1920er Jahren hatte Serge Voronoff die Idee, tierisches Drüsengewebe in Menschen einzubringen, denen es an bestimmten Hormonen mangelte. Er führte hierzu mehrere Operationen durch, bei denen er mit dem Ziel der „Verjüngung“ Hodengewebe von Affen in die Hoden älterer Männer implantierte [16, 17]. Heute ist die xenogene Übertragung von hormonproduzierendem Gewebe ein großes Thema in der Diabetesforschung. Dabei wird versucht, tierische Inselzellen in Menschen zu transplantieren und so potenziell den Diabetes Typ 1 zu heilen [18, 19].

In den 1960er Jahren wurden erstmals Transplantationen von Affennieren zum Menschen durchgeführt. Hier wurde bei einem Patienten ein Organüberleben von neun Monaten erreicht. Dies blieb jedoch die Ausnahme. Das durchschnittliche Organüberleben betrug sonst vier bis acht Wochen [20, 21].

1964 wurde die erste xenogene Herztransplantation durchgeführt. Es wurde das Herz eines Schimpansen transplantiert. Das Organ versagte nach nur wenigen Stunden, da die Größe des Herzens nicht ausreichte, um die Zirkulation des Empfängers aufrecht zu erhalten [22].

Erst seit den letzten Jahrzehnten mit der kontinuierlich wachsenden Anzahl an effizienten Immunsuppressiva und der Möglichkeit, genetisch modifizierte Tiere zu züchten, ist die Aussicht auf ein dauerhaftes Organüberleben gegeben [23-25]. So ist es Mohiuddin et al. erstmals gelungen, ein Organüberleben von 945 Tagen zu erreichen. Es handelte sich hierbei um ein transgenes Schweineherz, das abdominal in einen Pavian transplantiert wurde, wobei der Pavian hierbei nicht auf die Pumpfunktion des xenogenen Herzens angewiesen war [26]. Der Forschungsgruppe, in der auch diese Arbeit entstand, ist es 2018 erstmals gelungen, bei einer orthotopen Herztransplantation von Schwein zu Pavian ein Überleben des Empfängers von über sechs Monaten zu erreichen [27].

## 1.2 Xenogene Abstoßung und ihre Mechanismen

### 1.2.1 Hyperakute Abstoßungsreaktion

Bei der hyperakuten Abstoßungsreaktion (HAR) handelt es sich um eine Abstoßung, die binnen Minuten und Stunden nach diskordanter, xenogener Transplantation eines Organs beginnt und durch präformierte natürliche Antikörper verursacht wird. Diese richten sich vornehmlich gegen bestimmte alpha-Galactose-Seitenketten der vaskulären Endothelzellen. Von entscheidender Bedeutung hierbei sind vor allem Gal $\alpha$ (1,3)Gal-Kohlenhydratverbindungen ( $\alpha$ -Gal). Diese Oligosaccharide finden sich auf Zellen aller Säugetiere bis auf Menschen, Menschenaffen und Altweltaffen, da diese das Enzym  $\alpha$ -1,3-Galactosyltransferase durch Stummschaltung des codierenden Gens im Laufe der Evolution verloren haben. Es wird angenommen, dass die Bildung von Antikörpern gegen diese Zuckerreste in der Kindheit durch die Exposition mit  $\alpha$ -Gal-exprimierenden Darmbakterien hervorgerufen wird. Etwa 85-95% der präformierten natürlichen Antikörper richten sich gegen  $\alpha$ -Gal. Sie bestehen hauptsächlich aus IgM und IgG. Auch die präformierten Antikörper, die sich nicht gegen  $\alpha$ -Gal richten (non  $\alpha$ -Gal), spielen bei der HAR eine Rolle, auch wenn sie nur einen geringen Anteil ausmachen. Ihre genauen Zielstrukturen sind Thema aktueller Forschung [28-31].

Antikörper-vermittelt führt die hyperakute Abstoßung rasch zur Komplement- und Gerinnungsaktivierung und in der Folge zur vollständigen Abstoßung des Organs durch massive Endothelschädigung, interstitielle Hämorrhagien, Thrombus- und Ödembildung [32-34]. Die Transplantate erscheinen makroskopisch geschwollen, ödematös verändert und zyanotisch mit epikardialen, fleckigen Einblutungen [35].

### 1.2.2 Akute vaskuläre Abstoßungsreaktion

Die akute vaskuläre Abstoßungsreaktion (AVR) wird auch als akute humorale Abstoßung oder verzögerte xenogene Abstoßung bezeichnet [36]. Sie tritt auch bei konkordanten Transplantationen auf oder bei diskordanten Transplantationen, bei denen die HAR durch die in Kapitel 1.2.7 erläuterten Strategien weitgehend verhindert wurde. Es kommt durch xenoreaktive Antikörper und mononukleare Zellen, wie Makrophagen und NK-Zellen, zur Komplement- und Endothelaktivierung und zur Einwanderung dieser Zellen ins Gewebe [37]. Hieraus entsteht ein prothrombotisches

Milieu und es kommt zu thrombotischen Gefäßverschlüssen, Fibrinablagerungen, Nekrosen und interstitiellen Hämorrhagien. Die AVR kann auch unter immunsuppressiver Therapie auftreten [36, 38-40].

### **1.2.3 Thrombotische Mikroangiopathie**

Die thrombotische Mikroangiopathie (TMA) ist eine Komplikation der Organabstoßung, die mit einer ausgedehnten Thrombozytenaggregation und Bildung von Fibrinthromben in den kleinen Gefäßen einhergeht. Eine Inkompatibilität der Gerinnungssysteme der Spender- und Empfängerspezies führt zu der mikrovaskulären Thrombenbildung. Die genauen Mechanismen sind noch nicht vollständig verstanden. Es wird angenommen, dass es über aktivierte Endothelzellen, Immunglobulinablagerungen und Aktivierung des Komplementsystems zu den Fibrinthromben kommt. Diese verursachen durch Endothelveränderungen und Minderdurchblutung Gewebeschäden [41-43].

### **1.2.4 Akute zelluläre Abstoßungsreaktion**

Die zelluläre Abstoßungsreaktion (AZR) durch T-Zellen spielt eine signifikante Rolle in der Transplantatabstoßung [44, 45]. Hierzu gibt es bisher aber wenige Studien, da die AZR von HAR und AVR, die zeitlich früher beginnen, überlagert wird und so nur wenig Infiltration von T-Zellen in den abgestoßenen Organen nachweisbar ist. Die T-Zell-Aktivierung spielt aber auch eine wichtige Rolle in der Entwicklung der HAR und AVR und fördert diese über direkte und indirekte Stoffwechselwege [41, 45-49]. Es wird angenommen, dass die T-Zell-Aktivierung in der xenogenen Transplantation stärker ausfällt als in der allogenen. Die AZR kann aber durch den Einsatz potenter Immunsuppressiva weitgehend verhindert werden [50, 51].

### **1.2.5 Chronische Abstoßungsreaktion**

Es wird angenommen, dass die chronische Abstoßungsreaktion (CR) in der xenogenen Transplantation genauso eine Rolle spielt wie in der allogenen. Hierzu gibt es nur wenige Daten, da ein längerfristiges Überleben eines xenogenen Transplantats nicht die Regel ist. Die chronische Abstoßung ist gekennzeichnet durch chronische Vaskulopathie mit Intimaverdickung, Fibrinexsudation und Zellinfiltration [32, 52].

## 1.2.6 Rolle der NK-Zellen bei der xenogenen Abstoßung

In dieser Arbeit soll vor allem die Rolle der NK-Zellen bei der Organabstoßung näher betrachtet werden. Lange Zeit wurde ihr Anteil hieran unterschätzt. Die Forschungsergebnisse in den letzten Jahren legen aber nahe, dass sie einen größeren Einfluss auf die Abstoßungsreaktion haben als bisher angenommen.

NK-Zellen gehören zu den Lymphozyten, besitzen aber keine Antigen-spezifischen Rezeptoren und sind Teil des angeborenen Immunsystems. Sie machen etwa 2-18% der Lymphozyten im peripheren Blut aus und spielen eine große Rolle bei der Immunantwort des Körpers [53]. Ihre Aufgabe ist es, Krebszellen, Virus-infizierte Zellen und mit intrazellulären Erregern befallene Zellen zu erkennen und diese durch Freisetzung von lytischen Granula direkt zu zerstören. Ein anderer Weg ist die Zerstörung der Zielzellen über Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity = ADCC) mit Hilfe ihres FcγRIII-Rezeptors (CD16) [39, 54, 55]. Die Zellen exprimieren CD56, aber kein CD3 auf ihrer Oberfläche und lassen sich so zytometrisch bestimmen.

Es gibt zwei wichtige Untergruppen von NK-Zellen: CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup>. Sie unterscheiden sich in der mehr oder minder ausgeprägten Expression von CD56 auf ihrer Zelloberfläche. Die CD56<sup>dim</sup> Population findet sich vor allem in Knochenmark, Milz und Blut, die CD56<sup>bright</sup> Population findet sich gehäuft in Lymphknoten und Tonsillen. Beide unterscheiden sich in ihrer Zytotoxizität und Zytokinproduktion. Während CD56<sup>bright</sup> nach Aktivierung viele Zytokine, vor allem Interferon  $\gamma$ , ausschütten können und eine geringe Zytotoxizität aufweisen, schütten CD56<sup>dim</sup> nur wenig Zytokine aus und haben durch ihre hohe Zytotoxizität die Fähigkeit, Krebszellen und Virus-infizierte Zellen zu lysieren.

Die Erkennung von kranken oder infizierten Zellen erfolgt über ein Zusammenspiel aktivierender und inhibierender Oberflächenrezeptoren, den NK-Zell-Rezeptoren (NKR) [56]. Es sind drei große Familien an NKRs bekannt. Die Killer-Zelle Immunoglobulin-like Rezeptor Superfamilie (KIR), die als Liganden HLA (Human Leukocyte Antigen) -A, -B und -C hat, die C-Typ Lektin Rezeptor Superfamilie (CLRs), deren Target HLA-E ist, und eine Klasse von Natürlichen Zytotoxischen Rezeptoren (NCRs), deren Liganden bisher nicht bekannt sind [57-60]. NK-Zellen erkennen demnach, ob eine Zelle genug Major Histocompatibility Complexes (MHCs) an der

Oberfläche exprimiert. Wenn nicht, überwiegt die Bindung der aktivierenden Rezeptoren und die Zelle wird lysiert. Dies bezeichnet man als „missing self theory“. NK-Zellen erkennen also nicht das Fremde, sondern den Mangel an „Eigenem“ [61, 62]. Dies spielt bei der xenogenen Abstoßung eine große Rolle. Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre legen nahe, dass NK-Zellen sowohl an der HAR als auch an der AVR beteiligt sind. So konnte beobachtet werden, dass bei xenogenen Perfusionsversuchen mit Organen von Schweinen die humanen NK-Zellen im porcinen Gewebe verbleiben [63, 64]. In vitro Studien zeigten zudem, dass NK-Zellen in der Lage sind, an Schweineendothelzellen zu binden und diese zu lysieren [65]. Darüber hinaus bewirkte die Bindung von NK-Zellen eine Aktivierung der Endothelzellen. Diese veränderten ihre Oberflächenstruktur, sodass ein prokoagulatorisches Milieu entstand.

NK-Zellen nehmen demnach über mehrere bisher bekannte Wege an der Abstoßungsreaktion teil. Zum einen Antikörper-vermittelt über ADCC und zum anderen direkt über ihre NKR durch Lyse bzw. durch Aktivierung der Endothelzellen selbst [66]. Darüber hinaus sind sie in der Lage, proinflammatorische Zytokine, wie Interferon  $\gamma$  und Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , abzugeben [67].

Ein wichtiger Oberflächenrezeptor, der zur Familie der NCRs gehört, ist NKp46. Er ist in der Zellmembran der NK-Zellen lokalisiert und ein wichtiger aktivierender Rezeptor auf den NK-Zellen. Zu seinen Zielstrukturen gehören virale Hämagglutinine und Heparansulfat-Proteoglykane. Allerdings sind bisher nicht alle seine Zielstrukturen vollständig identifiziert [68-70]. In dieser Arbeit wird NKp46 als spezifischer Marker herangezogen, um NK-Zellen mittels Immunfluoreszenz in spezifischen Geweben nachzuweisen (s. Kapitel 3.4.4).

### **1.2.7 Vermeidung xenogener Abstoßung**

Die Forschung hat in den letzten Jahrzehnten erhebliche Fortschritte dabei gemacht, die Abstoßung bei xenogenen Transplantationen zu verringern. So ist es neben einer immunmodulatorischen Therapie vor allem die erfolgreiche Züchtung genetisch modifizierter Schweine, die einen entscheidenden Einfluss auf das Organüberleben hat [13].

Besonders hervorzuheben sind hier die  $\alpha$ -Gal Knock-out Schweine, die wenig bis gar kein  $\alpha$ -Gal auf ihren Endothelzellen exprimieren. Mit diesen Tieren ist es möglich geworden, die HAR weitgehend zu überwinden [71-78].

Vor der Möglichkeit des  $\alpha$ -Gal Knock-outs gab es andere Wege, die Interaktion zwischen Endothel und den präformierten Antikörpern zu verhindern. So war es möglich, die Antikörper durch extrakorporale Immunadsorption präoperativ zu eliminieren oder sie durch intravenöse Gabe von  $\alpha$ -Gal-Epitopen zu binden und so zu inhibieren [79].

Ein weiterer Faktor ist die Vermeidung der Komplementaktivierung durch eine Expression von humanen, inhibierenden Komplement-regulierenden Proteinen (KRPs) auf den Endothelzellen des Transplantats durch Züchtung hierfür genetisch modifizierter Schweine. Beispiele für KRPs sind hCD46, hCD55 und hCD59 [80-82].

Die für die Versuche genutzten Tieren exprimierten den KRP hCD46. Er ist Co-Faktor bei der Faktor 1 vermittelten Inaktivierung von C3b und C4b und verhindert so die Aktivierung des Komplementsystems weitgehend [83-88].

Andere Vorgehensweisen zur Inhibierung des Komplementsystems sind infundierbare Komplementregulatoren wie das Schlangengift Cobra Venom Faktor oder der Soluble Complement Receptor Type 1. Nachteil dieser Verfahren ist die systemische Inhibierung, was zu erheblichen Nebenwirkungen, wie erhöhter Infektanfälligkeit, führt [89-91].

Auch die Abstoßungsreaktion, die durch NK-Zellen hervorgerufen wird, kann teilweise verhindert werden. Durch die Abwesenheit von  $\alpha$ -Gal auf den Endothelzellen reduziert sich der Anteil von ADCC stark. Von besonderer Bedeutung für die direkte Inhibierung der NK-Zellaktivierung ist der Oberflächenmarker HLA-E. Dieser gehört zu den nicht klassischen MHCs. Der von den meisten NK-Zellen exprimierte CLR CD94/NKG2A bindet an HLA-E und kann eine Aktivierung größtenteils unterbinden [92-94].

In dieser Studie wiesen die Schweine der genetisch modifizierten Versuchsgruppe eine Überexpression von HLA-E auf. Durch diese hat sich schon in früheren Studien ein teilweiser Schutz gegen NK-Zell-Zytotoxizität gezeigt. So konnten in vitro Studien zeigen, dass eine Expression von HLA-E porcine Endothelzellen vor der Zytotoxizität der NK-Zellen schützt [95, 96].

Um eine stabile Expression von HLA-E auf den Schweineendothelzellen zu erreichen, ist eine gleichzeitige Expression von humanem  $\beta$ 2-Mikroglobulin nötig [95-99].

### **1.3 Fragestellung der vorliegenden Arbeit**

Mit Hilfe des Working-Heart-Modells (s. Kapitel 2.5) soll untersucht werden, inwieweit die xenogene Abstoßungsreaktion durch die dreifache genetische Modifikation der Spendertiere verhindert werden kann. Besonderer Fokus gilt hierbei der Rolle der NK-Zellen bei der xenogenen Abstoßung. Die Schweine der Versuchsgruppe besaßen einen Knock-out von  $\alpha$ -Gal und eine Überexpression von hCD46 und HLA-E. Der  $\alpha$ -Gal Knock-out verhindert die Bindung von präformierten natürlichen Antikörpern gegen  $\alpha$ -Gal und hCD46 ist ein inhibierender Regulator des Komplementsystems (s. Kapitel 1.2.7). HLA-E soll nun die Aktivierung der NK-Zellen über NKG2A verhindern und so die xenogene Abstoßung weiter eindämmen.

Zur Beurteilung der NK-Zellen wurde ihr Verhalten im Verlauf der Versuche beobachtet. Es wurde untersucht, wo sie sich aufhalten und wie sich ihre Anzahl mit zunehmender Dauer des Experiments verändert.

Zur Quantifizierung der abgelaufenen Abstoßungsreaktion wurden die Herzen nach Abschluss der Versuche histologisch untersucht. Darüber hinaus wurde gemessen, welche Auswirkungen es auf die Pumpfunktion der Herzen gab.

Teilweise wurden die Daten auch in einem Paper mit dem Titel „Multiple genetically modified GTKO/hCD46/HLA-E/h $\beta$ 2-mg porcine hearts are protected from complement activation and natural killer cell infiltration during ex vivo perfusion with human blood“ im Jahr 2018 in der Fachzeitschrift Xenotransplantation veröffentlicht. Das Paper ist im Literaturverzeichnis unter der Nummer [100] zu finden.

## **2 Material und Methode**

### **2.1 Art der Perfusionsversuche**

Für die Versuchsreihe wurden insgesamt zwölf Perfusionsversuche durchgeführt, bei denen Schweineherzen jeweils acht Stunden mit humanem Blut im Working-Heart-Modell perfundiert wurden.

Sechs Versuche wurden mit dreifach genetisch modifizierten Schweinen ( $\alpha$ -Gal/hCD46/HLA-E) durchgeführt. Die Perfusion erfolgte mit diluiertem Vollblut eines humanen Spenders.

Für die Kontrollgruppe wurden weitere sechs Versuche mit Wildtyp-Schweinen (nicht genetisch modifiziert) durchgeführt, ebenfalls mit diluiertem Vollblut eines humanen Spenders.

### **2.2 Blutspender**

Die Voraussetzungen zur Blutspende für die xenogene Perfusion waren männliches Geschlecht, Volljährigkeit und ein guter Gesundheitszustand. Bei der Blutspende wurden jeweils 500ml Vollblut entnommen und mit 500IE/kg heparinisiert (Heparin-Natrium-25000-Ratiopharm®, Ratiopharm, Ulm, Deutschland). Es wurde insgesamt sechs Probanden im Abstand von mindestens einem Monat zweimal Blut abgenommen, jeweils für den Wildtyp-, sowie für den genetisch modifizierten Versuch.

Alle Blutspenden für die Versuche waren von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt worden.

### **2.3 Spendertiere**

#### **2.3.1 Auswahl und Herkunft der Spendertiere**

Bei allen Spendertieren handelte es sich um Schweine des Lehrstuhls für molekulare Tierzucht und Biotechnologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (Moorversuchsgut) in Oberschleißheim. Sie wurden mindestens eine Woche vor der Explantation in der Tierhaltung des Walter-Brendel-Zentrums untergebracht, um für eine ausreichende Adaption zu sorgen. Genehmigt wurde das Projekt von der Regierung von Oberbayern mit dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532.3-102-12.

Die Tiere der Versuchsgruppe waren sechs genetisch modifizierte Schweine ( $\alpha$ -Gal, hCD46, HLA-E).

Alle zwölf Schweine, Wildtyp und genetisch modifiziert, hatten die Blutgruppe 0 und stammten aus derselben Zuchtlinie.

### **2.3.2 Prämedikation und Anästhesie der Spendertiere**

Die Spendertiere wurden mit 10mg/kg Azaperon (Stresnil, Jansen-Cliang GmbH, Neuss, Deutschland), 10-20mg/kg Ketamin (Ketavet®, Pharmacia&Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland) und 0,02mg/kg Atropinsulfat (Atropinsulfat®, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) durch Injektion in die Nackenmuskulatur prämediziert. Ein venöser Zugang wurde im Ohr gelegt und die Narkose mit 1mg/kg Propofol (Propofol-®Lipuro 2%, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und 5-7 $\mu$ g/kg/h Fentanyl Dihydrogencitrat (Fentanyl-Janssen®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) eingeleitet. Im Anschluss erfolgte die endotracheale Intubation mit einem 4.5 Spiraltubus (Safety-FLEX, Mallinckrodt, St. Louis, USA). Es wurde eine druckkontrollierte Beatmung (Siemens SC 900, Siemens AG, München, Deutschland) durchgeführt. Der Eingriff erfolgte in Rückenlage.

## **2.4 Herzexplantation**

### **2.4.1 Explantation**

Für die Explantation wurde ein Hautschnitt vom Jugulum bis zum Xiphoid und anschließend eine Sternotomie durchgeführt. Der Thymus wurde stumpf abpräpariert, das Perikard eröffnet und mit zwei Perikard-Hochnähten fixiert. Die Vena cava caudalis wurde angeschlungen, der rechte Vorhof ligiert und das Bindegewebe zwischen der Aorta und der A. pulmonalis stumpf voneinander getrennt. Die Aorta wurde nun ebenfalls angeschlungen und eine Kanüle in der Aortenwurzel platziert, die mit einer Tabaksbeutelnaht fixiert wurde. Es folgte die Gabe von 500IE/kg Heparin (Heparin-Natrium-25000-Ratiopharm®, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) zur „Vollheparinisierung“ (ACT>400 Sekunden) und 4mg Pancuroniumbromid (Pancuronium Inresa, Inresa GmbH, Freiburg, Deutschland) zur Muskelrelaxierung. Anschließend wurde die V. cava caudalis ligiert und die Aorta ascendens sowie die V. cava cranialis abgeklemmt. Über die Kanüle in der Aortenwurzel wurde 4°C kalte

Kardioplegie-Lösung (Custodiol®, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim, Deutschland) infundiert. Ein Vorhof wurde zur Volumenentlastung eröffnet, sowie die Lungenvenen durchtrennt.

Das Herz wurde mit der Lunge en bloc entnommen und in 4°C kalter Ringerlösung (Plastipur®, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., Deutschland) gelagert. Beide Lungenflügel wurden abpräpariert. Anschließend wurde das Herz gewogen.

## **2.4.2 Kanülierung des explantierten Herzens**

Zum Anschluss an das Perfusionssystem wurden in die Aorta und den Truncus pulmonalis Metallkanülen (3/4 Zoll) eingebracht und jeweils mittels einer Ligatur fixiert. Ebenso wurden beide Vorhöfe kanüliert (3/4 Zoll). Alle Pulmonalvenen wurden ligiert. Ein Katheter (Blue FlexTip® Catheter, Arrow Deutschland GmbH, Erding, Deutschland) wurde über die Vena cava caudalis ca. 4cm in den Koronarsinus vorgeschoben und beide Venae cavae anschließend ligiert. EKG-Kabel wurden an drei Kanülierungen des Herzens (Aorta, rechter und linker Vorhof) befestigt. Es wurde stets eine Ischämiezeit von 2,5 Stunden eingehalten, in der die Herzen in gekühlter Ringerlösung (Temperatur: 4°C) gelagert wurden.

## **2.5 Perfusionssystem**

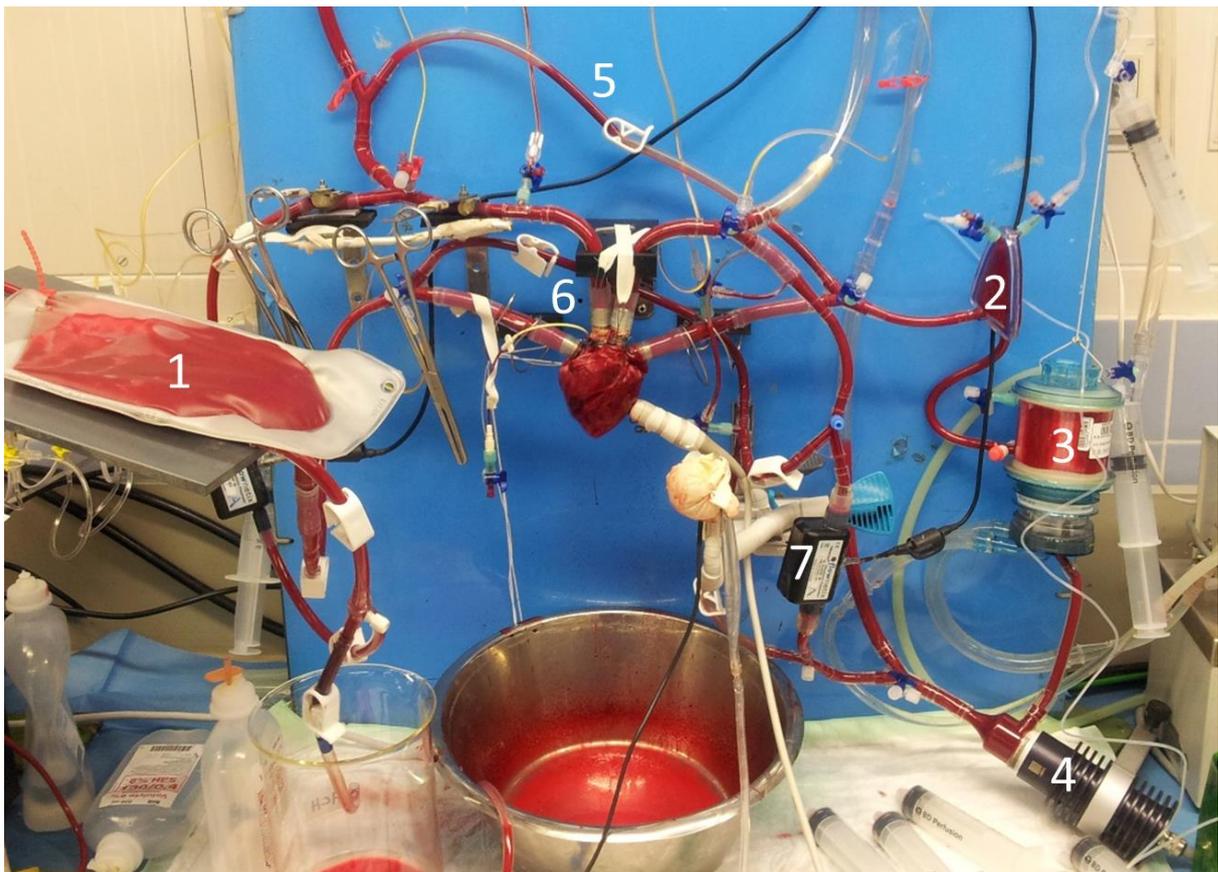
Bereits 1895 entwickelte Oscar Langendorff ein Modell zur Perfusion des Myokards durch einen retrograden Blutfluss über die Aorta. Forty et al. entwickelten dieses zu einem Modell mit aktiv arbeitendem Herzen weiter, das sich durch die Pumpfunktion des Ventrikels selbst mit Blut versorgt [101]. Auf Grundlage dieser Arbeiten ist das in dieser Versuchsreihe verwendete Working-Heart-Modell am Institut für chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität entstanden [102, 103].

### **2.5.1 Aufbau und Vorbereitung des Systems**

Das Perfusionssystem ist schematisch in Abbildung 2.1 dargestellt. Es bestand aus einem Körper- und einem Lungenkreislauf. Der Körperkreislauf besaß ein venöses Reservoir (Raumedic®-ECC, Rehau AG&Co, Rehau, Deutschland). In die Lungenstrombahn waren ein Oxygenator (HILITE® 800 LT, Rheoparin® beschichteter Hohlfaseroxygenator, MEDOS Medizintechnik AG, Stolberg, Deutschland), ein Filter



das Blut auf einen Sauerstoffpartialdruck von 100-150mmHg oxygeniert. Nach dem vollständigen Entlüften des Systems wurde das Herz über die eingebrachten Kanülen mit dem System verbunden, mit Blut gefüllt und ebenfalls entlüftet. Nach Einhalten der 2,5-stündigen Ischämiezeit wurde die Aortenklemme geöffnet und die Koronarien so mit oxygeniertem Blut gefüllt. Durch die Reperfusion begann das Herz zu flimmern, sodass es mit 5-10 Joule defibriert (Hewlett Packard Codemaster XL+®, Hewlett-Packard GmbH, Böblingen, Deutschland) und so in einen Sinusrhythmus überführt werden konnte. Anschließend wurde mit der Perfusion nach Langendorff begonnen. Während der gesamten Zeit wurde dem System über einen Perfusor (Perfusor®secura, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) kontinuierlich Glucose (Glucose 50%, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) zugeführt (1ml/h).



**Abbildung 2.2: Ex vivo Perfuisionsmodell.** 1 Reservoir; 2 Filter; 3 Oxygenator; 4 Rotationspumpe; 5/6 Umgehungskreisläufe; 7 Flussmesser

## 2.5.2 Perfusion nach Langendorff

Bei der Perfusion nach Langendorff wird das Blut den Koronararterien retrograd über die Aorta zugeführt. Es fließt hierfür vom venösen Reservoir über den rechten Umgehungskreislauf am Herzen vorbei direkt in den Lungenkreislauf, um dort vom Oxygenator mit Sauerstoff angereichert und decarboxyliert zu werden. Anschließend gelangt es über den linken Umgehungskreislauf direkt in die Aorta. Durch die vorherrschenden Druckverhältnisse bleibt die Aortenklappe geschlossen, und das Blut fließt in die rechte und linke Koronararterie. Vom Myokard gelangt das Perfusat über den Sinus coronarius und den rechten Vorhof wieder in das venöse Reservoir. Nach Langendorff wurde für 15 Minuten perfundiert (s. Tabelle 2.1). Anschließend wurde in die Working-Heart-Perfusion (s. Kapitel 2.5.3) gewechselt. Nach einer Versuchsdauer von 180 Minuten wurde erneut in den Langendorff-Modus gewechselt und dieser bis zum Versuchsende beibehalten.

## 2.5.3 Working-Heart-Perfusion

Die Working-Heart-Perfusion ahmt den natürlichen Blutfluss im menschlichen Körper nach. Das Blut wird dem Herzen aus dem Reservoir venös zugeleitet. Nach der Passage des rechten Herzens gelangt es in den Lungenkreislauf, in dem es durch Zentrifugalpumpe, Oxygenator und Partikelfilter läuft. Nach der Oxygenierung gelangt das Blut ins linke Herz und wird erneut in den Körperkreislauf ausgeworfen.

Die Working-Heart-Perfusion wurde bis zur 180. Minute ( $T_8$ ) des Versuchs durchgeführt (s. Tabelle 2.1), danach wurde wieder in die Langendorff-Perfusion geschaltet und diese bis zum Ende des Versuchs beibehalten.

Nach Beendigung der Perfusion wurde das Herz aus dem System entnommen und Kanülen sowie Katheter entfernt. Anschließend wurde es gewogen, und es wurden jeweils zwei Gewebeproben pro Ventrikel entnommen. Diese wurden mit Hilfe von Tissue-Tek (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande) bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Das restliche Herz wurde zunächst für 24 Stunden in Formalin (S3 Chemicals, Bad Oeynhausen, Deutschland) und danach in 70% Ethanol (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) eingelegt und so konserviert.

## 2.6 Zielparameter

Während des gesamten Versuches wurden zu festgelegten Zeitpunkten verschiedene Parameter bestimmt. Die Zeitpunkte können Tabelle 2.1 entnommen werden.

Zeitpunkt	Verstrichene Zeit ab Start der Perfusion [h:min]
T <sub>1</sub>	vor Perfusionsbeginn
<b>Start Langendorff-Perfusion</b>	<b>00:00</b>
T <sub>2</sub>	00:10
<b>Start Working-Heart-Perfusion</b>	<b>00:15</b>
T <sub>3</sub>	00:30
T <sub>4</sub>	01:00
T <sub>5</sub>	01:30
T <sub>6</sub>	02:00
T <sub>7</sub>	02:30
T <sub>8</sub>	03:00
<b>Start Langendorff-Perfusion</b>	<b>03:01</b>
T <sub>9</sub>	04:00
T <sub>10</sub>	05:00
T <sub>11</sub>	06:00
T <sub>12</sub>	07:00
T <sub>13</sub>	08:00

**Tabelle 2.1: Versuchsablauf mit Messzeitpunkten**

Zu jedem Zeitpunkt wurden folgende Parameter bestimmt:

- Blutdruck – folgende Drücke wurden mit Hilfe des Druckwandlers (Einfach-Druckwandler-Set, Becton Dickinson Infusion Therapy Systems Inc., Utah, USA) während des Versuches gemessen:
  - Mittlerer Aortendruck
  - Mittlerer Druck im linken Vorhof
  - Mittlerer Druck im rechten Vorhof
- Blutfluss in der Aorta ( $I_A$ ) und der A. pulmonalis ( $I_P$ )
- Temperatur – diese wurde mit Hilfe eines Infrarotthermometers (Voltcraft® Multimeter, Hirschau, Deutschland) stets an der Seitenwand des linken Ventrikels gemessen; über den Wärmetauscher und das gewärmte Blutreservoir wurde die Temperatur des Perfusats stets zwischen 36°C und 37°C gehalten
- Arterielle und koronarvenöse Blutgas- und Elektrolytanalyse (RAPIDLab1265®, Siemens AG, Erlangen, Deutschland) – basierend auf diesen Messungen erfolgte eine Zufuhr von O<sub>2</sub> sowie CO<sub>2</sub>, die Pufferung des Perfusats mit Natriumbicarbonat (Natriumhydrogencarbonat 8,4% B.Braun Infusionslösung, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und Calciumgluconat (Calciumgluconat 10% Injektionslösung, B.Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland); so wurde der pH-Wert stets konstant zwischen 7,35 und 7,45 gehalten; bei Bedarf konnte auch die Gabe vom einem Glucose-Bolus erfolgen (zusätzlich zur kontinuierlichen Zufuhr mittels Perfusor)
- Herzgewicht – nach der Explantation und nach Beendigung der Perfusion wurde das Gewicht der Herzen bestimmt

## 2.7 Berechnete hämodynamische Parameter

### 2.7.1 Herzindex

Zur Beurteilung der kardialen Pumpleistung wird der Herzindex verwendet, der für das Working-Heart-Modell als Blutfluss durch die Pulmonalarterie pro Minute bezogen auf das Herzgewicht definiert wurde.

$$HI = \frac{I_P}{m_{\text{Herz}}}$$

HI: Herzindex  $[\frac{ml}{min \cdot g}]$

IP: Blutfluss in der A. pulmonalis  $[\frac{ml}{min}]$

m<sub>Herz</sub>: Masse Herz [g]

### 2.7.2 Relatives Schlagvolumen

Das relative Schlagvolumen wird berechnet, indem der Herzindex durch die Herzfrequenz geteilt wird, und stellt die Pumpleistung des Herzens pro Herzschlag dar.

$$SV_m = \frac{HI}{HF}$$

SV<sub>m</sub>: Relatives Schlagvolumen  $[\frac{ml}{g}]$

HI: Herzindex  $[\frac{ml}{min \cdot g}]$

HF: Herzfrequenz  $[\frac{1}{min}]$

### 2.7.3 Koronarindex

Der Koronarindex beinhaltet den Blutfluss in den Koronararterien pro Minute – als Differenz der Blutflüsse der Pulmonalarterie und der Aorta – bezogen auf das Herzgewicht in Gramm.

$$KI = \frac{I_P - I_A}{m_{\text{Herz}}}$$

KI: Koronarindex  $[\frac{ml}{min \cdot g}]$

IP: Blutfluss in der A. pulmonalis  $[\frac{ml}{min}]$

$I_A$ :	Blutfluss in der Aorta $\left[\frac{ml}{min}\right]$
$m_{Herz}$ :	Masse Herz $[g]$

### 2.7.4 Relativer Sauerstoffverbrauch

Zur Berechnung des relativen Sauerstoffverbrauchs des Herzens wird die Abnahme des Sauerstoffgehalts des Bluts nach Durchfluss des Herzens verwendet und mit dem gesamten Blutfluss multipliziert.

$$VO_2 = KI \times (caO_2 - cvO_2)$$

Der Sauerstoffgehalt (arteriell und venös) berechnet sich wie folgt:

$$caO_2 = Hb \times 1,34 \times SaO_2 + pO_2 \times 0,003$$

$$cvO_2 = Hb \times 1,34 \times SvO_2 + pO_2 \times 0,003$$

$VO_2$ :	Relativer Sauerstoffverbrauch $\left[\frac{ml}{min \cdot g}\right]$
$caO_2$ :	Arterieller Sauerstoffgehalt $\left[\frac{ml}{dl}\right]$
$cvO_2$ :	Venöser Sauerstoffgehalt $\left[\frac{ml}{dl}\right]$
$Hb$ :	Hämoglobin-Wert $\left[\frac{g}{dl}\right]$
$SaO_2$ :	Arterielle Sauerstoffsättigung [%]
$SvO_2$ :	Venöse Sauerstoffsättigung [%]
$pO_2$ :	Sauerstoffpartialdruck $[mmHg]$
Hüfner-Zahl:	1,34 $\left[\frac{ml}{g}\right]$
Henry-Konstante:	0,003 $\left[\frac{ml}{mmHg \cdot dl}\right]$

Die Hüfner-Zahl von 1,34 beschreibt das Sauerstoff-Volumen in Millilitern, das unter Normalbedingungen von 1g Hämoglobin gebunden werden kann.

Die Henry-Löslichkeitskonstante stellt die Löslichkeit eines Gases in einer Flüssigkeit dar. Sie beträgt für in Blut gelösten Sauerstoff unter Normalbedingungen 0,003.

## 2.8 Isolation der mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Zu den Zeitpunkten  $T_1$  und  $T_{13}$  wurden jeweils 15ml Blut für die Isolation der mononukleären Zellen (Peripheral Blood Mononuclear Cells = PBMC) entnommen. Die Isolation wurde unter einer Sterilbank wie folgt durchgeführt:

Das Blut wurde im Verhältnis 1:1 mit PBS (Phosphate buffered Saline, Gibco by Lifetechnologies, Karlsbad, USA) gemischt und in ein mit 15ml Separationsmedium (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB) gefülltes Leucosept-Röhrchen (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation (Rotina 420R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) bei 840U/min für 15 Minuten ohne Bremse. Das Plasma über dem entstandenen Buffy-Coat wurde abpipettiert und verworfen. Der Buffy-Coat wurde in ein anderes Röhrchen umgeschüttet und mit PBS 1:1 aufgefüllt. Es folgte eine Zentrifugation bei 320U/min für zehn Minuten. Hiernach wurde der Überstand verworfen, das Pellet resuspendiert und 5ml Erythrozyten-Lyse-Puffer (Artikel-Nr. A0001-0,5, Apotheke Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland) hinzugefügt. Nach einer Einwirkzeit von fünf Minuten wurde erneut bei 400U/min für vier Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet resuspendiert und mit 5ml PBS aufgefüllt. Es erfolgte erneut eine Zentrifugation bei 320U/min für zehn Minuten, der Überstand wurde verworfen und das Pellet resuspendiert.

Anschließend wurde zur Kryokonservierung je 1ml des gewonnenen Zellsuspensats mit je 0,5ml untenstehender Gefrierlösungen versetzt und das Gemisch bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung in der Durchflusszytometrie eingefroren.

Lösung 1: 95% RPMI (Gibco by Lifetechnologies, Karlsbad, USA) + 5% HSA  
(Baxalta Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland)

Lösung 2: 80% HSA + 20% DMSO (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis MO, USA)

## 2.9 Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting = FACS-Analyse) wurden die zuvor bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen PBMCs verwendet. Ziel der Analyse war die

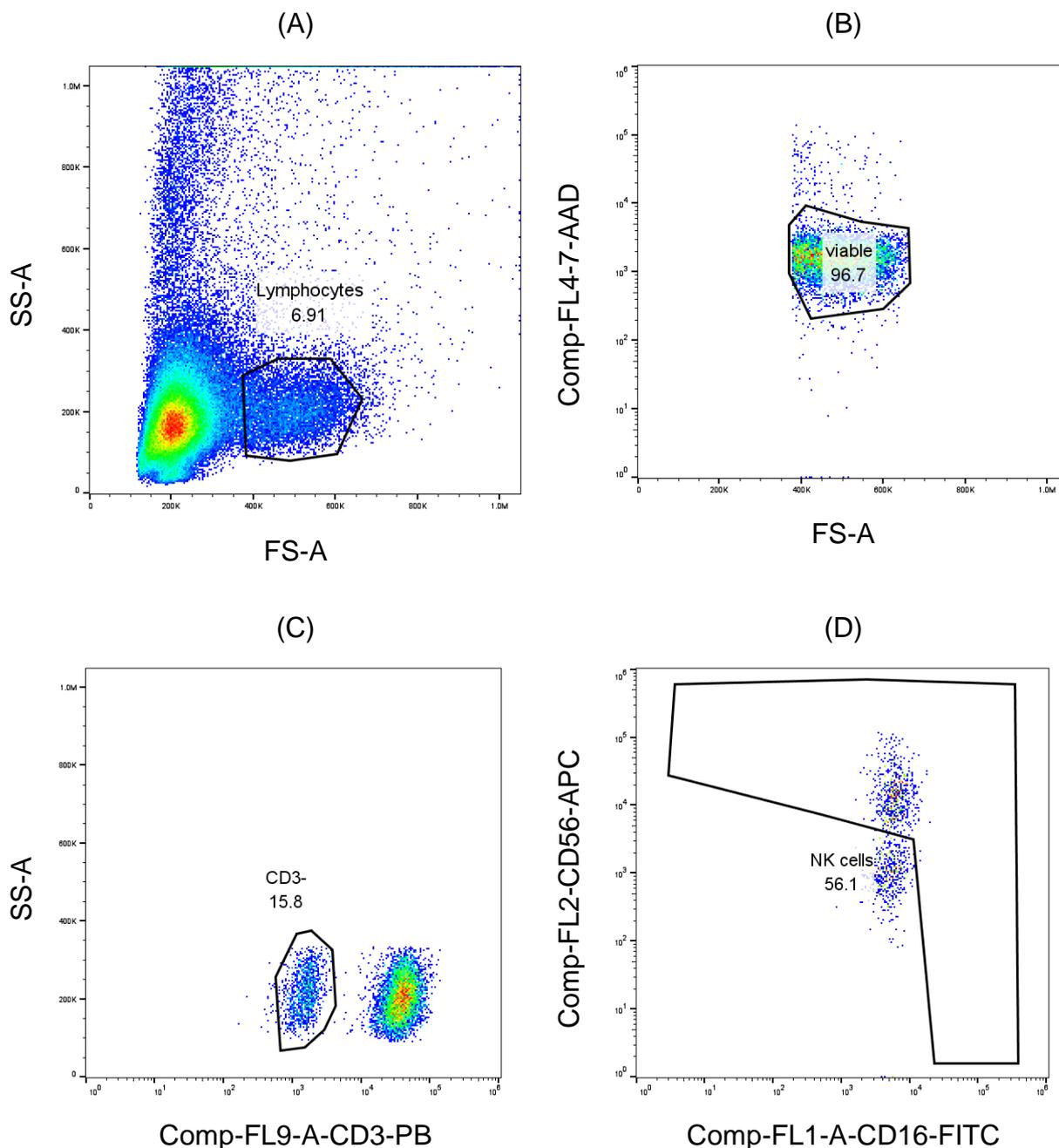
Bestimmung der Anzahl an NK-Zellen im Verlauf des Versuches. Die verwendeten Antikörper können Tabelle 2.2 entnommen werden. Die Zellen wurden aufgetaut, mit 8ml PBS gemischt und bei 1500U/min für fünf Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen und das Pellet resuspendiert war, wurde 1ml PBS zugeben. Von der Lösung wurden 10 $\mu$ l abpipettiert und mit 10 $\mu$ l Trypanblau (0,4%, Gibco by Lifetechnologies, Karlsbad, USA) gemischt, auf eine Zählkammer aufgebracht und unter dem Lichtmikroskop (Leica DM300, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) gezählt. Anschließend wurden von der verbliebenen Zelllösung so viel  $\mu$ l entnommen, dass ca. 200.000 Zellen pro FACS-Analyse zu Verfügung standen (diese Zahl wurde nicht immer erreicht). Die Zelllösung wurde bis zu einem Volumen von 100 $\mu$ l mit PBS aufgefüllt und anschließend wurden folgende Antikörper zugegeben:

Farbstoff	Antikörper	Hersteller	Volumen
Pacific Blue	CD3	BioLegend, San Diego, USA	2 $\mu$ l
FITC	CD16	BD Biosciences, New Jersey, USA	4 $\mu$ l
PE	CD56	Beckman Coulter, Inc., Brea, USA	3 $\mu$ l
7-AAD		BD Biosciences, New Jersey, USA	1 $\mu$ l

**Tabelle 2.2: Verwendete Antikörper zur Identifizierung der NK-Zellen**

Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei 4°C ohne Licht. Anschließend wurde jeder Probe 1ml PBS zugefügt und diese bei 1500U/min für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet resuspendiert und jeweils 1 $\mu$ l 7-aminoactinomycin (7-AAD) hinzugefügt. Die FACS-Analyse erfolgte mit Gallios Flow Cytometer (Beckman Coulter, Inc., Brea, USA). Die Gating-Strategie zur Ermittlung der NK-Zellen kann Abbildung 2.3 entnommen werden. Sie orientierte sich an einem Schema, das bereits in anderen Veröffentlichungen angewendet wurde [104, 105]. Die Auswertung wurde mit dem Programm © FlowJo (FlowJo LLC 2013-2016, Oregon, USA) vorgenommen. Unter Verwendung von Front- und Sidescatter wurde die Lymphozytenpopulation erfasst und über 7-AAD wurden die lebenden Zellen gefiltert. Unter Ausschluss der CD3 positiven Zellen (nur CD3-) wurde die NK-Zellpopulation

als CD56 positiv (CD56+) und/oder CD16 positiv (CD16+) identifiziert. Eine Unterteilung in weitere Subpopulationen (z.B. regulatorische (CD56<sup>bright</sup>) oder zytotoxische (CD56<sup>dim</sup>) NK-Zellen) erfolgte nicht.



**Abbildung 2.3: Gating-Strategie zur Identifizierung der NK-Zellen.** Exemplarisch ist hier das Gating von einem Wildtyp-Versuch zum Zeitpunkt T<sub>1</sub> gezeigt. (A) Lymphozyten-Gating über Front- und Sidescatter. (B) Auswahl der lebenden Zellen (viable) über 7-AAD. (C) Gating der CD3 negativen Zellen über den CD3-Antikörper in PacificBlu. (D) Identifizierung der NK-Zellen über Expression von CD16 in FITC und CD56 in APC.

## 2.10 Immunfluoreszenz der Gewebeproben

Von den in Tissue-Tek (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande) eingebetteten Gewebebiopsien der linken Ventrikel wurden 5µm dicke Kryoschnitte angefertigt. Von diesen wurde jeweils ein Schnitt pro Herz mit Aceton (S3 Chemicals, Bad Oeynhausen, Deutschland) fixiert, rehydriert und mit folgenden Antikörpern immunfluoreszenztrisch markiert: Kaninchen Anti-human C3b/c (Dako, Glostrup, Denmark), Kaninchen Anti-human C4b/c-FITC (Dako), Ziege Anti-human IgG-FITC (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis MO, USA), Ziege Anti-human IgM-FITC (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis MO, USA), Maus Anti-human hCD46 (Hycult Biotech, Uden, Niederlande), Maus Anti-human HLA-E (Biolegend, San Diego, USA), Bandeiraea Simplicifolia Isolectin B4 (BSI-B4)-FITC (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis MO, USA) und Maus Anti-human NKp46 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). Die Zellkerne wurden jeweils mit 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, Boehringer, Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) gefärbt. Die gefärbten Gewebeschnitte wurden unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops (DM14000B; Leica, Wetzlar, Deutschland) analysiert und die Fluoreszenzintensität wurde unter Verwendung von Bildverarbeitung (ImageJ 1.50i, NIH, Bethesda, MD, USA) auf nicht manipulierten TIFF-Bildern quantifiziert. Pro Herz wurden jeweils sechs Bilder analysiert und ein Mittelwert der Fluoreszenzintensität gebildet. Alle Bilder wurden unter den gleichen Bedingungen angefertigt, um eine direkte Quantifizierung und einen Vergleich der Fluoreszenzintensitäten zu ermöglichen. Die Analyse erfolgte durch das Departement Klinische Forschung der Universität Bern unter Leitung von Prof. Dr. Robert Rieben.

## 2.11 Histologie

Von jedem Herzen wurden linksventrikuläre Biopsien entnommen und in 4% gepuffertem Formalin (S3 Chemicals, Bad Oeynhausen, Deutschland) fixiert. Anschließend wurden sie in Paraffin eingebettet und 3-5µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) wie folgt gefärbt: Entparaffinieren der Präparate mit Xylol (Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland) zweimal für je zehn Minuten, Rehydratation mit absteigenden Ethanolkonzentrationen: 100%, 95% und 70% für je fünf Minuten (CLN GmbH, Niederhummel, Deutschland). Anschließend schwenken in PBS für fünf Minuten. Sieben Minuten färben mit Hämalaun (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) und 17 Minuten bläuen unter fließendem

Wasser. Gegenfärbung mit Eosin 0,1% (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) für fünf Minuten und zwei Minuten auswaschen unter fließendem Wasser. Anschließend wurden die Schnitte über eine aufsteigende Ethanolreihe (80%; 96% und 100% für je zwei Minuten) in Xylol (Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland) überführt und mit Mounting Medium (Histokitt, Karl Hecht, Sondheim, Deutschland) eingedeckelt. Nach der Färbung erfolgte die histologische Auswertung nach dem Histological Injury Severity Score (HIS-Score). Dieser beinhaltet das Ausmaß des perivaskulären Ödems, die Erythrozytenextravasate, die Thrombusentwicklung und die Hypereosinophilie. Jedem dieser Attribute wurde ein Wert von 0 bis 3 zugeordnet (0 = kein/e; 1 = wenig; 2 = intermediär; 3 = stark), sodass ein Score zwischen 0 und 12 erreicht werden konnte. Die Auswertung erfolgte mit einem Lichtmikroskop (Leica DM300, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland).

## 2.12 Statistische Auswertung

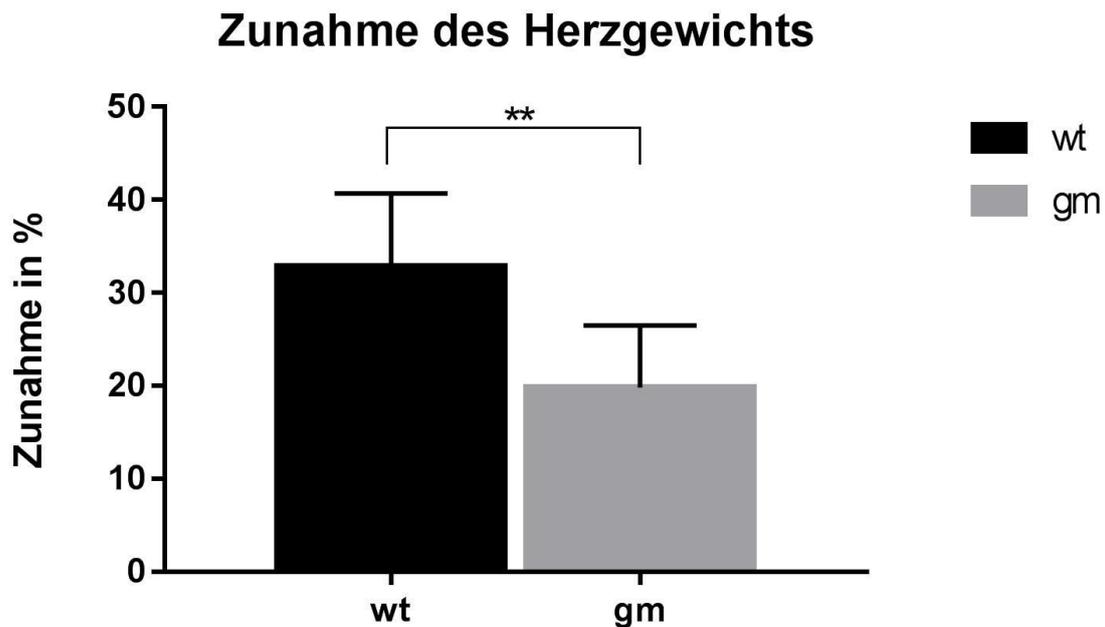
Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit den Programmen Excel (Microsoft Excel 365 Apps for Enterprise, Redmont, USA) und GraphPad Prism (Version 7, GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) mit Hilfe des arithmetischen Mittels und der Standardabweichung. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt. Es wurden zweiseitige, ungepaarte t-Tests durchgeführt, um die Gruppen miteinander zu vergleichen und zweiseitige gepaarte t-Tests bei Vergleich innerhalb von einer Gruppe. Bei Vergleich mehrerer Zeitpunkte miteinander wurde ein ungepaarter, multipler t-Test durchgeführt und nach der Holm-Šidák-Methode korrigiert. Im Vorhinein erfolgte eine Überprüfung der Normalverteilung der erhobenen Daten. Unterschiede mit einem p-Wert  $< 0,05$  wurden mit \* markiert, mit einem p-Wert  $< 0,01$  mit \*\*, mit einem p-Wert  $< 0,001$  mit \*\*\* und mit einem p-Wert  $< 0,001$  mit \*\*\*\*. Bei Parametern, bei denen eine Normalverteilung nicht angenommen werden konnte, erfolgte als nicht parametrischer Test ein Mann-Whitney-U-Test (nur bei der Auswertung des HIS-Scores angewendet).

Bei der graphischen Darstellung wurden Säulendiagramme verwendet, bei welchen die Mittelwerte durch die Säulenhöhe und die Standardabweichung durch einen vertikalen Fehlerbalken abgebildet wurden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Herzgewicht

Die Herzen wurden jeweils nach der Explantation und nach Beendigung der achtstündigen Perfusion gewogen. In beiden Gruppen wurde eine Zunahme des Herzgewichts beobachtet. Die prozentuale Gewichtszunahme war hierbei in den beiden Versuchsgruppen signifikant verschieden. So nahmen die Wildtyp-Hezen im Schnitt 33% an Gewicht zu und die genetisch modifizierten Herzen durchschnittlich 20% ( $p=0,003$ ). Dies kann auch Abbildung 3.4 entnommen werden.

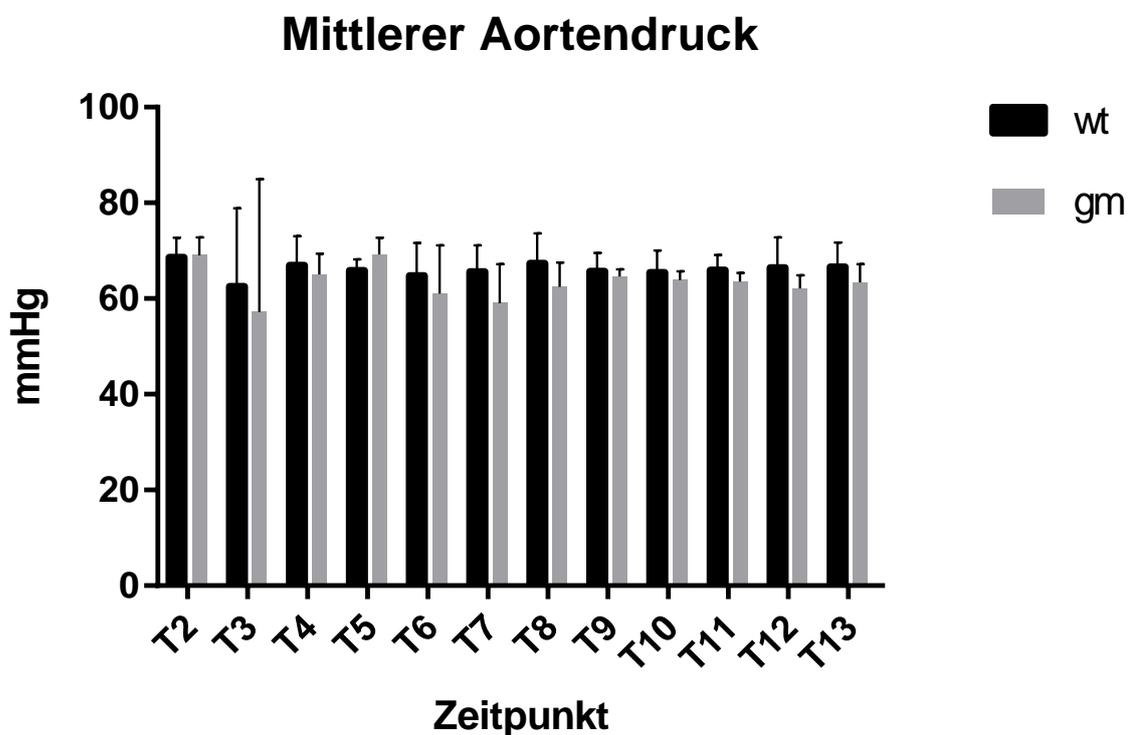


**Abbildung 3.4: Zunahme der Herzgewichte in %.** wt:  $33 \pm 8\%$ ; gm:  $20 \pm 7\%$ ;  $p = 0,003$ ; wt = Wildtyp; gm = genetisch modifiziert; wt:  $n = 6$ , gm:  $n = 6$ .

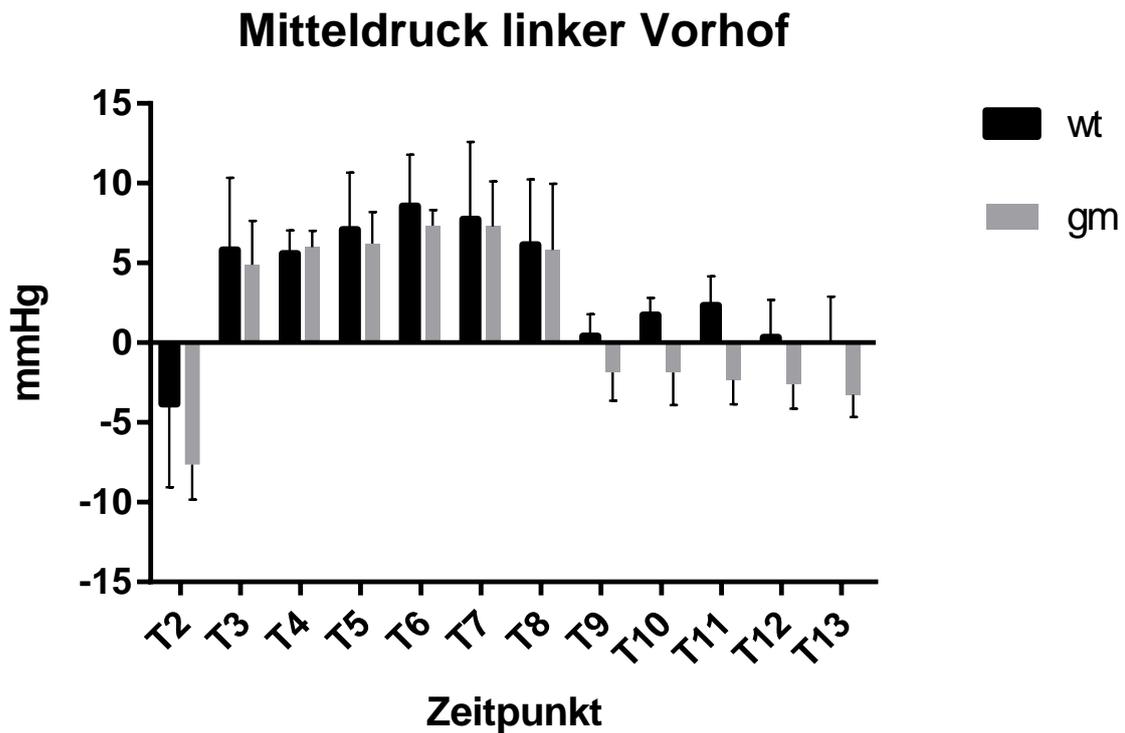
## 3.2 Hämodynamik und Blutgase

### 3.2.1 Mittlere Blutdrücke

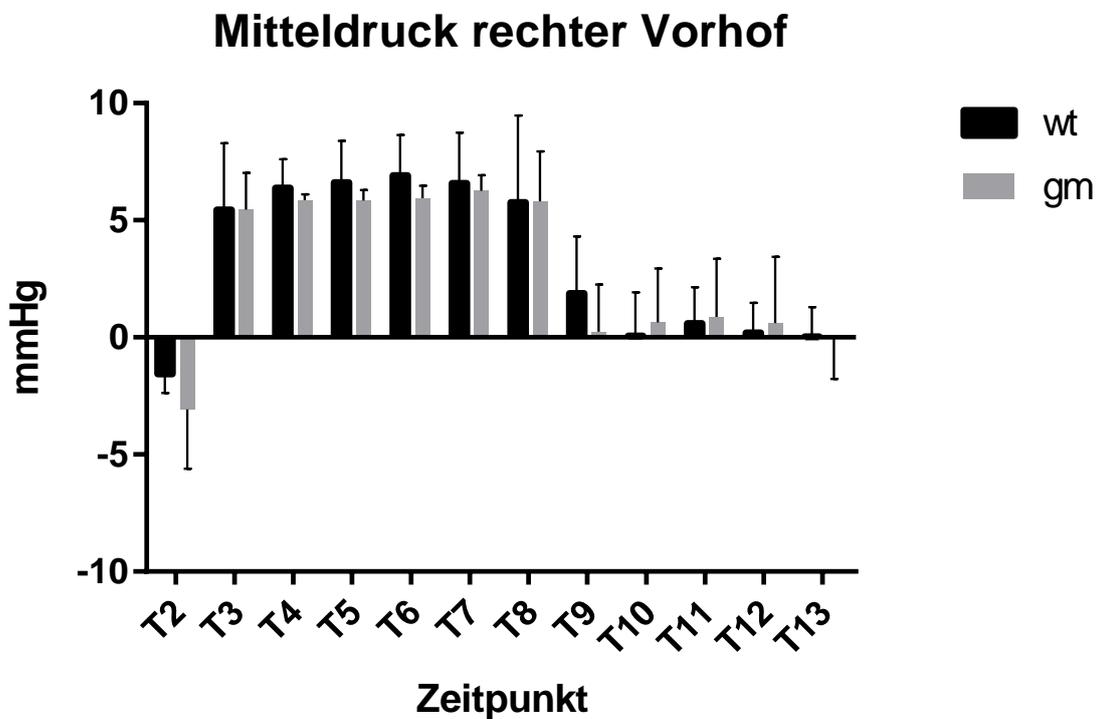
Der mittlere Aortendruck und der Blutdruck im rechten und linken Vorhof waren im Vergleich beider Versuchsgruppen nicht signifikant unterschiedlich.



**Abbildung 3.5: Mittleren Aortendrucke im Verlauf der Versuche.** Im Mittel betrug der Aortendruck bei der Wildtyp-Gruppe  $66 \pm 1$  mmHg und in der genetisch modifizierten Gruppe  $63 \pm 4$  mmHg; wt: n = 6, gm: n = 6.



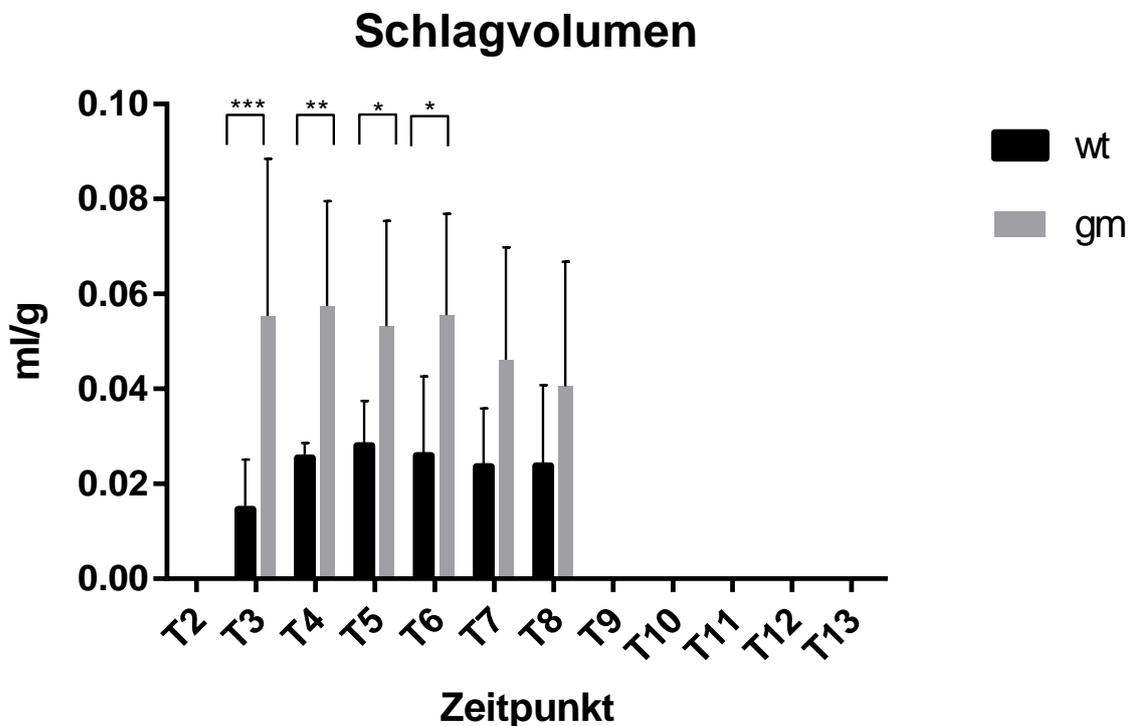
**Abbildung 3.6: Mitteldrücke im linken Vorhof im Verlauf der Versuche.** Im Mittel betrug der Blutdruck während der Working-Heart-Perfusion im linken Vorhof bei der Wildtyp-Gruppe  $7 \pm 1$  mmHg und in der genetisch modifizierten Gruppe  $6 \pm 1$  mmHg; wt: n = 6, gm: n = 6.



**Abbildung 3.7: Mitteldrücke im rechten Vorhof im Verlauf der Versuche.** Im Mittel betrug der Blutdruck im rechten Vorhof während der Working-Heart-Perfusion bei beiden Gruppen  $6 \pm 1$  mmHg; wt: n = 6, gm: n = 6.

### 3.2.2 Schlagvolumen

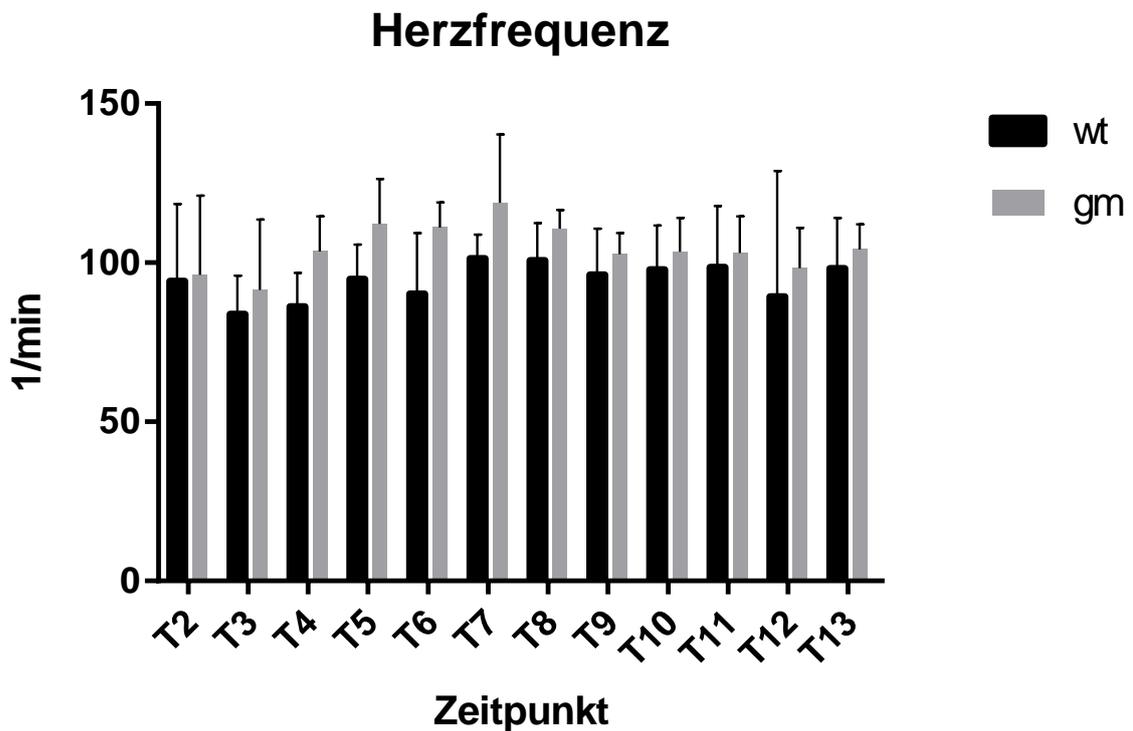
Während der Perfusion nach Langendorff (T<sub>2</sub> und T<sub>9</sub>-T<sub>13</sub>) war bei retrograder Perfusion kein Schlagvolumen vorhanden. Während der Working-Heart-Perfusion war das Schlagvolumen zwischen den beiden Gruppen zu mehreren Zeitpunkten unterschiedlich. Zu den Zeitpunkten T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub> und T<sub>6</sub> war das Schlagvolumen der genetisch modifizierten Herzen signifikant höher als das der Wildtyp-Herzen. Die einzelnen p-Werte können Abbildung 3.8 entnommen werden.



**Abbildung 3.8: Schlagvolumina bezogen auf das Herzgewicht.** Die p-Werte für die signifikanten Zeitpunkte betragen: T<sub>3</sub>: wt: 0,015 ± 0,011ml/g; gm: 0,055 ± 0,033ml/g; p<0,001; T<sub>4</sub>: wt: 0,025 ± 0,003ml/g; gm: 0,057 ± 0,022ml/g; p=0,006; T<sub>5</sub>: wt: 0,028 ± 0,009ml/g; gm: 0,053 ± 0,022ml/g; p=0,049; T<sub>6</sub>: wt: 0,026 ± 0,017ml/g; gm: 0,056 ± 0,021ml/g; p=0,012; wt: n = 6, gm: n = 6.

### 3.2.3 Herzfrequenz

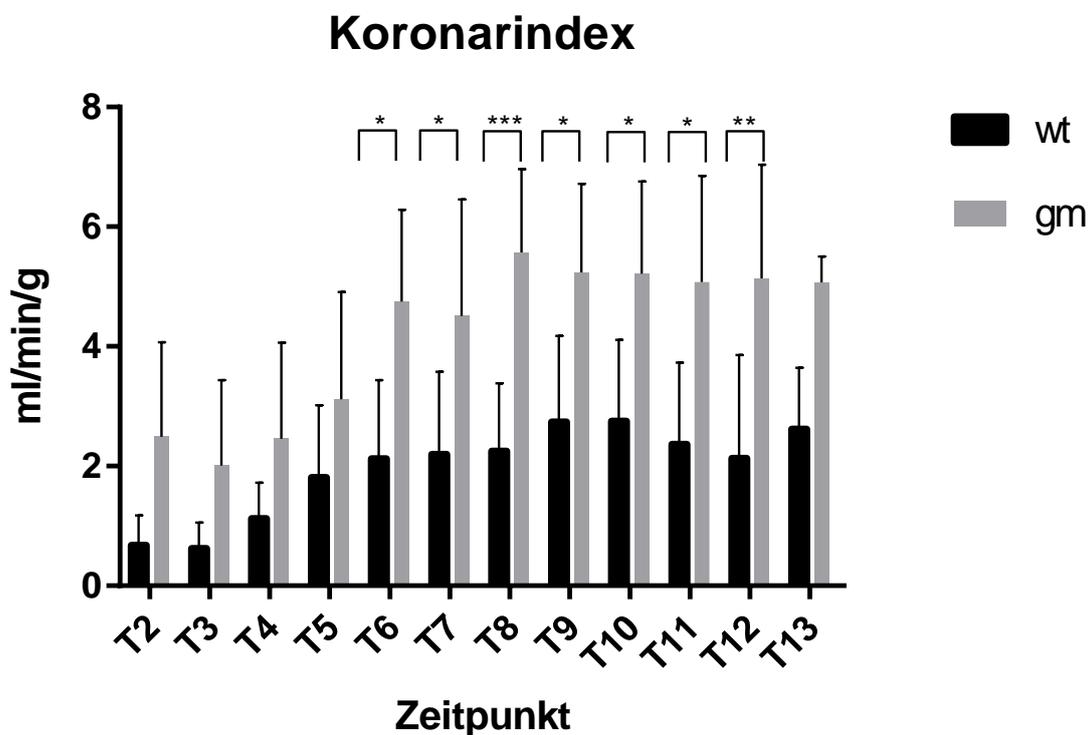
Die Herzfrequenz der genetisch modifizierten und Wildtyp-Herzen war zwischen den beiden Gruppen zu keinem Zeitpunkt signifikant verschieden. Der zeitliche Verlauf ist in Abbildung 3.9 dargestellt.



**Abbildung 3.9: Herzfrequenzen im Verlauf der Versuche.** Im Mittel betrug die Herzfrequenz bei der Wildtyp-Gruppe  $94 \pm 6$ /min und bei der genetisch modifizierten Gruppe  $104 \pm 8$ /min; wt: n = 6, gm: n = 6.

### 3.2.4 Koronarindex

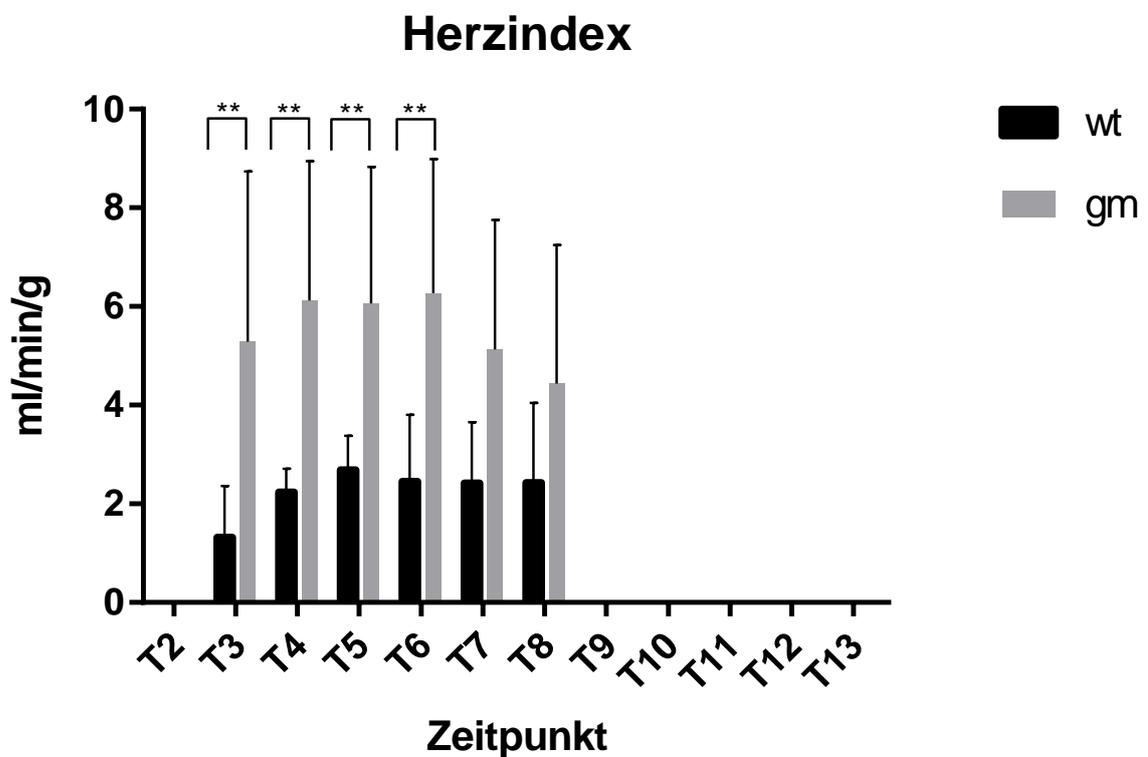
Der Koronarindex zeigte im Verlauf des Versuchs zu mehreren Zeitpunkten einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen. Zu den Zeitpunkten T<sub>6</sub> bis T<sub>12</sub> ist der Koronarfluss in der genetisch modifizierten Versuchsgruppe signifikant höher als in der Wildtyp-Gruppe. Die p-Werte der einzelnen Zeitpunkte können Abbildung 3.10 entnommen werden.



**Abbildung 3.10: Koronarindizes im Verlauf der Versuche.** Die p-Werte der einzelnen Zeitpunkte betragen: T<sub>6</sub>: wt: 2,124 ± 1,316ml/min/g; gm: 4,747 ± 1,534ml/min/g; p=0,015979; T<sub>7</sub>: wt: 2,195 ± 1,376ml/min/g; gm: 4,510 ± 1,941ml/min/g; p=0,030264; T<sub>8</sub>: wt: 2,249 ± 1,135ml/min/g; gm: 5,570 ± 1,329ml/min/g; p=0,000964; T<sub>9</sub>: wt: 2,734 ± 1,440ml/min/g; gm: 5,239 ± 1,480ml/min/g; p=0,020222; T<sub>10</sub>: wt: 2,747 ± 1,364ml/min/g; gm: 5,217 ± 1,540ml/min/g; p=0,020222; T<sub>11</sub>: wt: 2,364 ± 1,368ml/min/g; gm: 5,047 ± 1,774ml/min/g; p=0,016837; T<sub>12</sub>: wt: 2,128 ± 1,027ml/min/g; gm: 5,138 ± 1,899ml/min/g; p=0,006478; wt: n = 6, gm: n = 6.

### 3.2.5 Herzindex

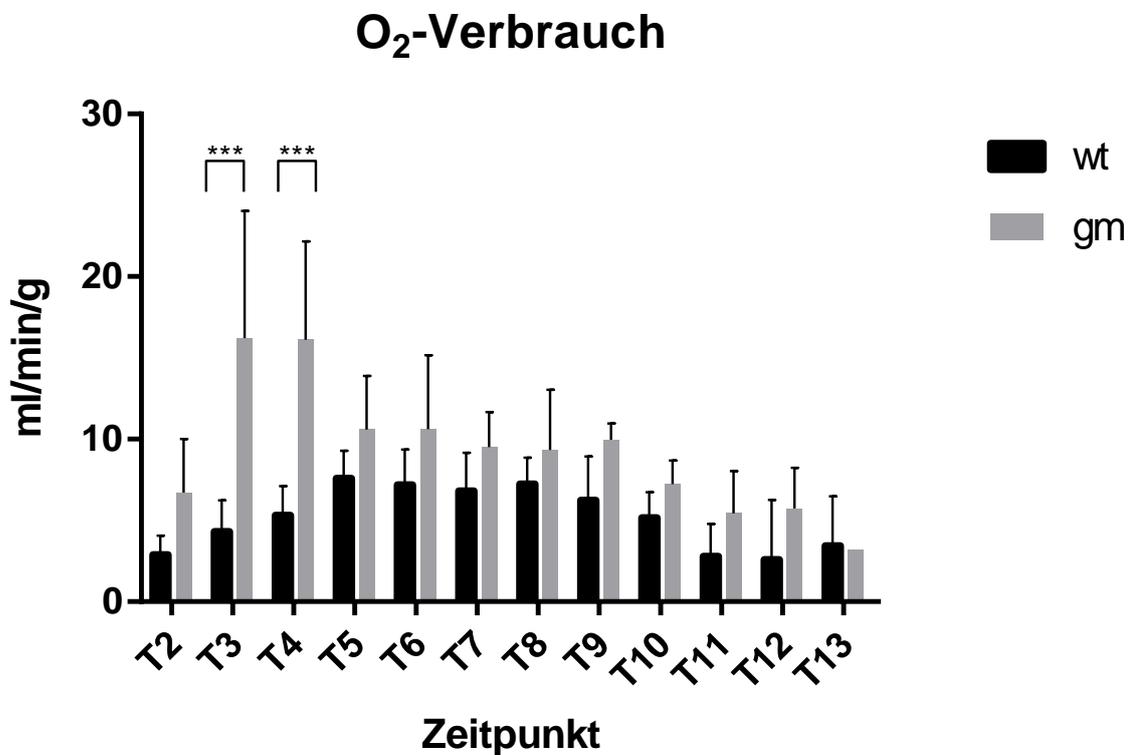
Der Herzindex ist zwischen den Gruppen zu mehreren Zeitpunkten signifikant verschieden. So ist der Herzindex zwischen T<sub>3</sub> und T<sub>6</sub> bei den genetisch modifizierten Herzen größer als bei den Wildtyp-Hezen. Die einzelnen p-Werte können Abbildung 3.11 entnommen werden.



**Abbildung 3.11: Herzindizes im Verlauf der Versuche.** Die p-Werte der einzelnen Zeitpunkte betragen: T<sub>3</sub>: wt: 1,318 ± 1,043ml/min/g; gm: 5,284 ± 3,456ml/min/g; p=0,001239; T<sub>4</sub>: wt: 2,238 ± 0,471ml/min/g; gm: 6,118 ± 2,829ml/min/g; p=0,001561; T<sub>5</sub>: wt: 2,619 ± 0,687ml/min/g; gm: 6,065 ± 2,762ml/min/g; p=0,007554; T<sub>6</sub>: wt: 2,454 ± 1,350ml/min/g; gm: 6,269 ± 2,714ml/min/g; p=0,001797; wt: n = 6, gm: n = 6.

### 3.2.6 Sauerstoffverbrauch

Der Sauerstoffverbrauch war zu zwei Zeitpunkten zwischen den beiden Gruppen signifikant verschieden. Zu Beginn der Working-Heart-Perfusion bei T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub> zeigten die genetisch modifizierten Herzen einen signifikant höheren Sauerstoffverbrauch als die Wildtyp-Hezen zu diesen Zeitpunkten. Die p-Werte können Abbildung 3.12 entnommen werden.



**Abbildung 3.12: Sauerstoffverbrauch der Herzen im Verlauf der Versuche.** Die p-Werte der einzelnen Zeitpunkte betragen: T<sub>3</sub>: wt: 4,320 ± 1,929ml/min/g; gm: 16,219 ± 7,811ml/min/g; p=0,000016; T<sub>4</sub>: wt: 5,312 ± 1,791ml/min/g; gm: 16,117 ± 6,052ml/min/g; p=0,000036, ; wt: n = 6, gm: n = 6.

### 3.2.7 Lactatkonzentration

Die Konzentration des Lactats im Perfusat zeigte zwischen den beiden Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten keinen signifikanten Unterschied (s. Abbildung 3.13). Die mittlere Lactatkonzentration während der Working-Heart-Perfusion (T<sub>3</sub>-T<sub>8</sub>) zeigt allerdings bei Vergleich der Gruppen einen signifikanten Unterschied (s. Abbildung 3.14). Außerdem ist zu beobachten, dass die Lactatkonzentration in der Wildtyp-Gruppe zwischen T<sub>3</sub> und T<sub>8</sub> kontinuierlich ansteigt und nach T<sub>8</sub>, also mit Beginn der Langendorff-Perfusion, in beiden Gruppen kontinuierlich abfällt (s. Abbildung 3.13).

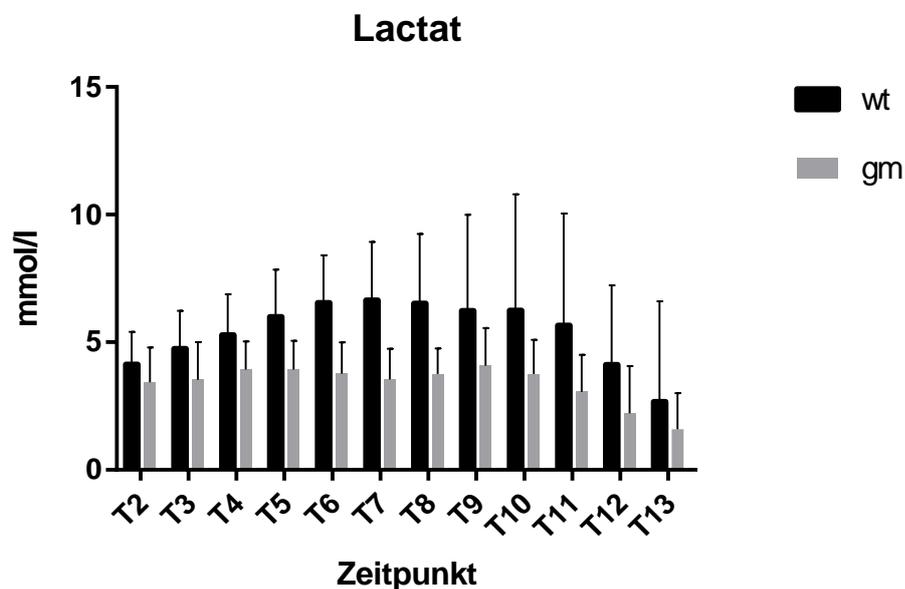


Abbildung 3.13: Lactatkonzentrationen im Perfusat im Verlauf der Versuche

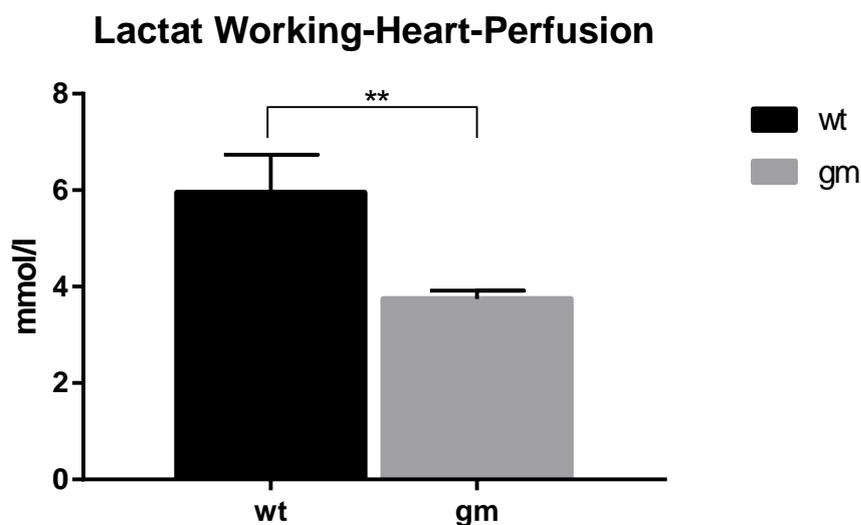


Abbildung 3.14: Lactatkonzentration während der Working-Heart-Perfusion. wt: 5,95 ± 0,78mmol/l; gm: 3,74 ± 0,18mmol/l; p<0,001; wt: n = 6, gm: n = 6.

### 3.3 Quantifizierung der NK-Zellen im Perfusat

In der Auswertung der FACS-Analyse zeigte sich, dass die relative NK-Zellzahl bezogen auf die gesamte PBMC-Zahl vom Zeitpunkt T<sub>1</sub> bis T<sub>13</sub> in der Wildtyp-Gruppe von 0,94% ( $\pm 0,77\%$ ) auf 0,21% ( $\pm 0,25\%$ ) signifikant abfällt ( $p=0,039$ ). Bei der genetisch modifizierten Gruppe mit einer Änderung von 1,39% ( $\pm 0,47\%$ ) auf 0,81% ( $\pm 0,72\%$ ) lässt sich kein signifikanter Abfall feststellen ( $p=0,080$ ). Der Vergleich der beiden Gruppen jeweils zum Zeitpunkt T<sub>1</sub> und T<sub>13</sub> zeigt keinen signifikanten Unterschied (T<sub>1</sub>: gm:1,39%  $\pm$  0,47%; wt: 0,94%  $\pm$  0,77%;  $p=0,089$ ; T<sub>13</sub>: gm:0,81%  $\pm$  0,72%; wt:0,21%  $\pm$  0,25%;  $p=0,076$ ); wt: n = 6, gm: n = 6.

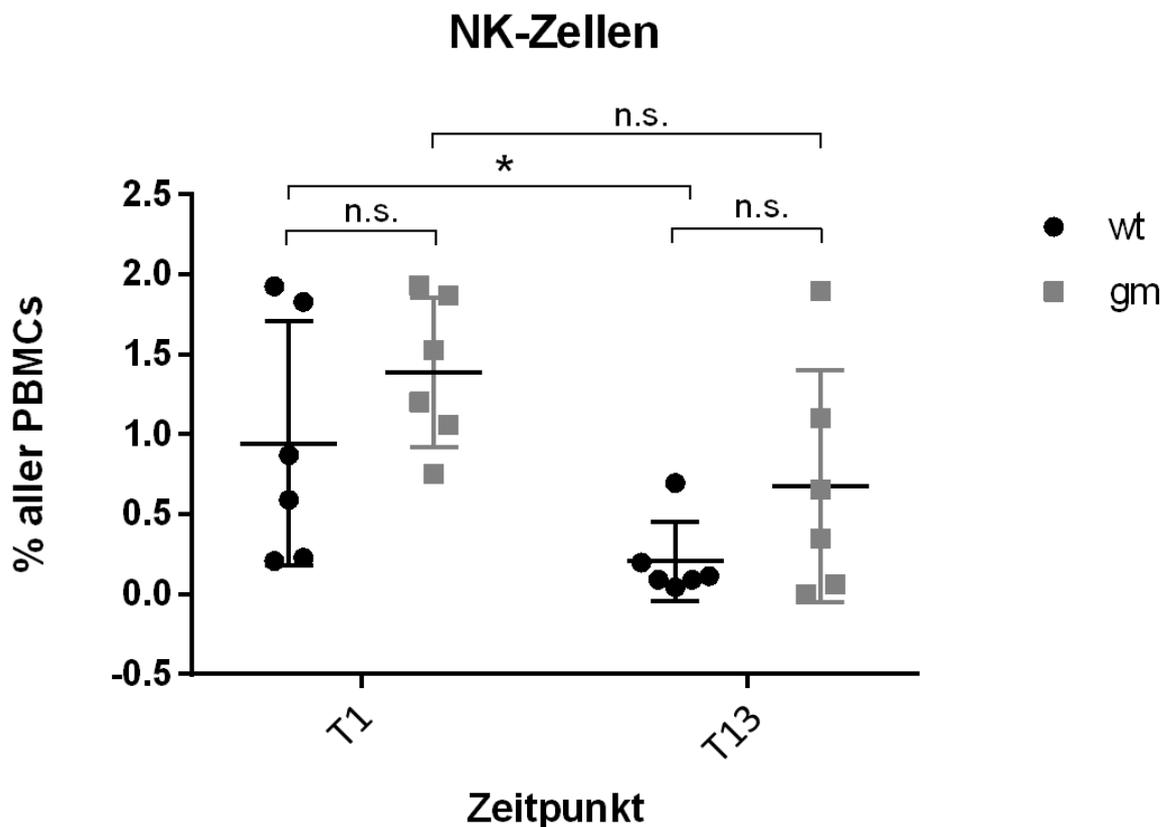
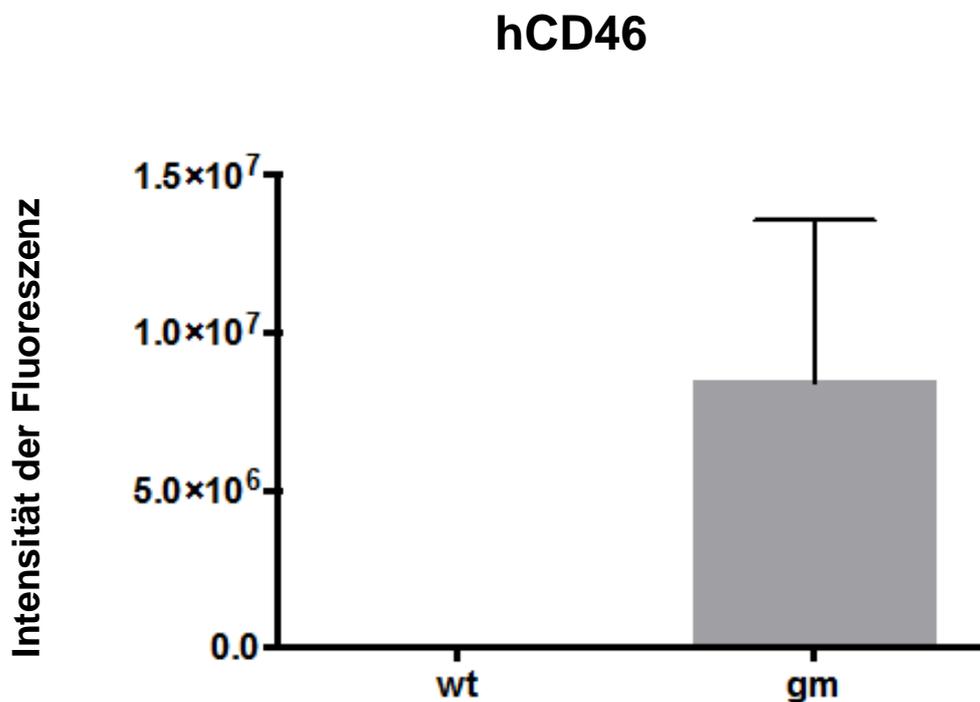


Abbildung 3.15: Relative NK-Zellzahl im Verlauf der Versuche

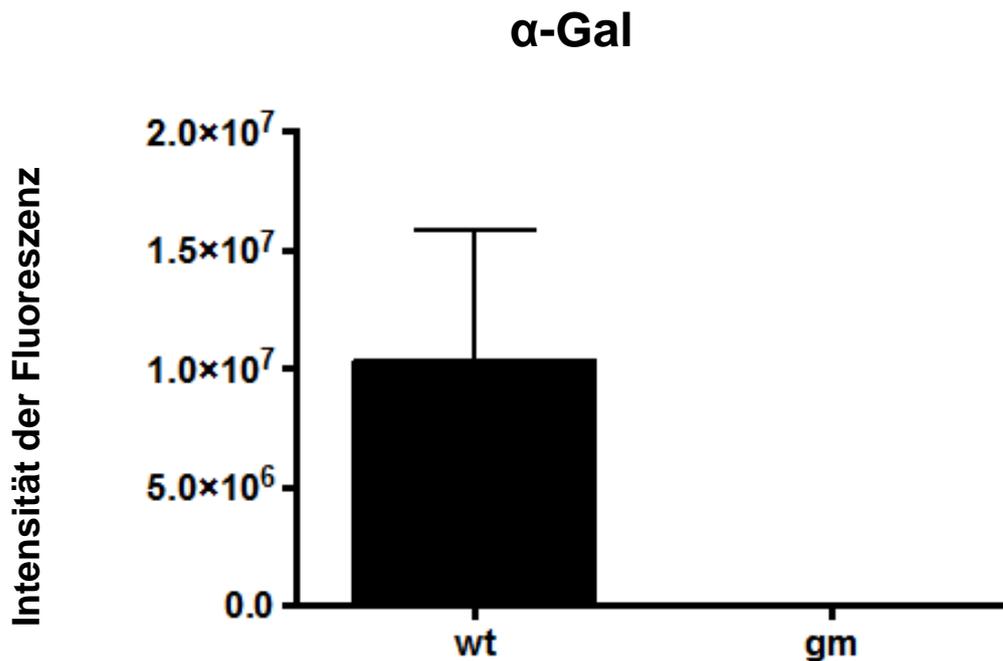
### 3.4 Immunfluoreszenz der Gewebeproben

#### 3.4.1 $\alpha$ -Gal/hCD46/HLA-E

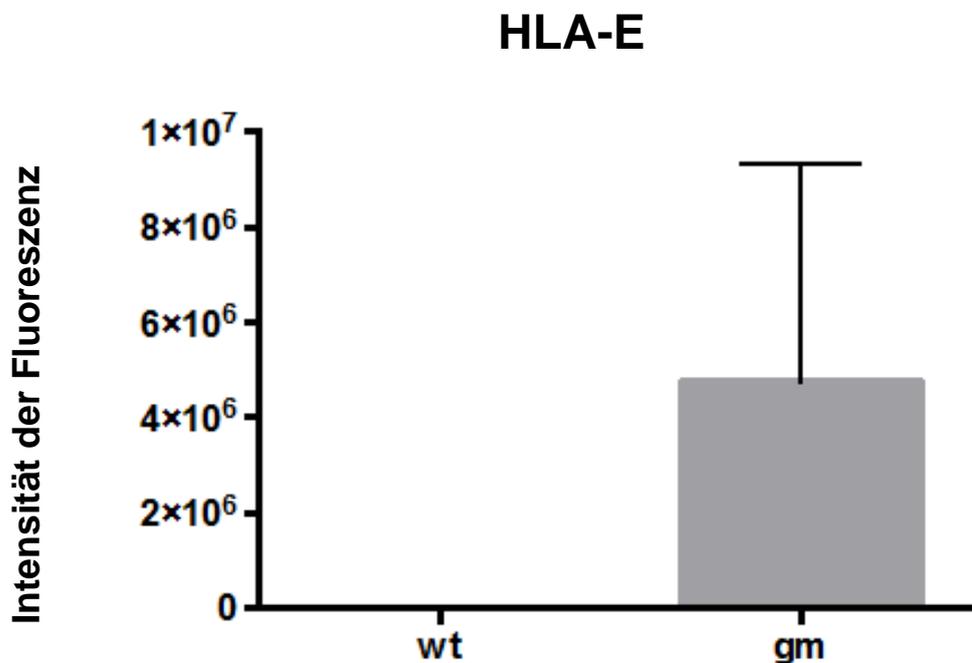
Die Immunfluoreszenz zur Überprüfung der Expression der genetischen Modifikationen in der Versuchsgruppe ergab, dass die sechs genetisch veränderten Schweine eben diejenige Transgenität aufwiesen, die für den Versuch verlangt wurde. Die Wildtyp-Schweine wiesen dagegen keine Expression von hCD46 und HLA-E auf, wohingegen ihre  $\alpha$ -Gal-Expression hoch war.



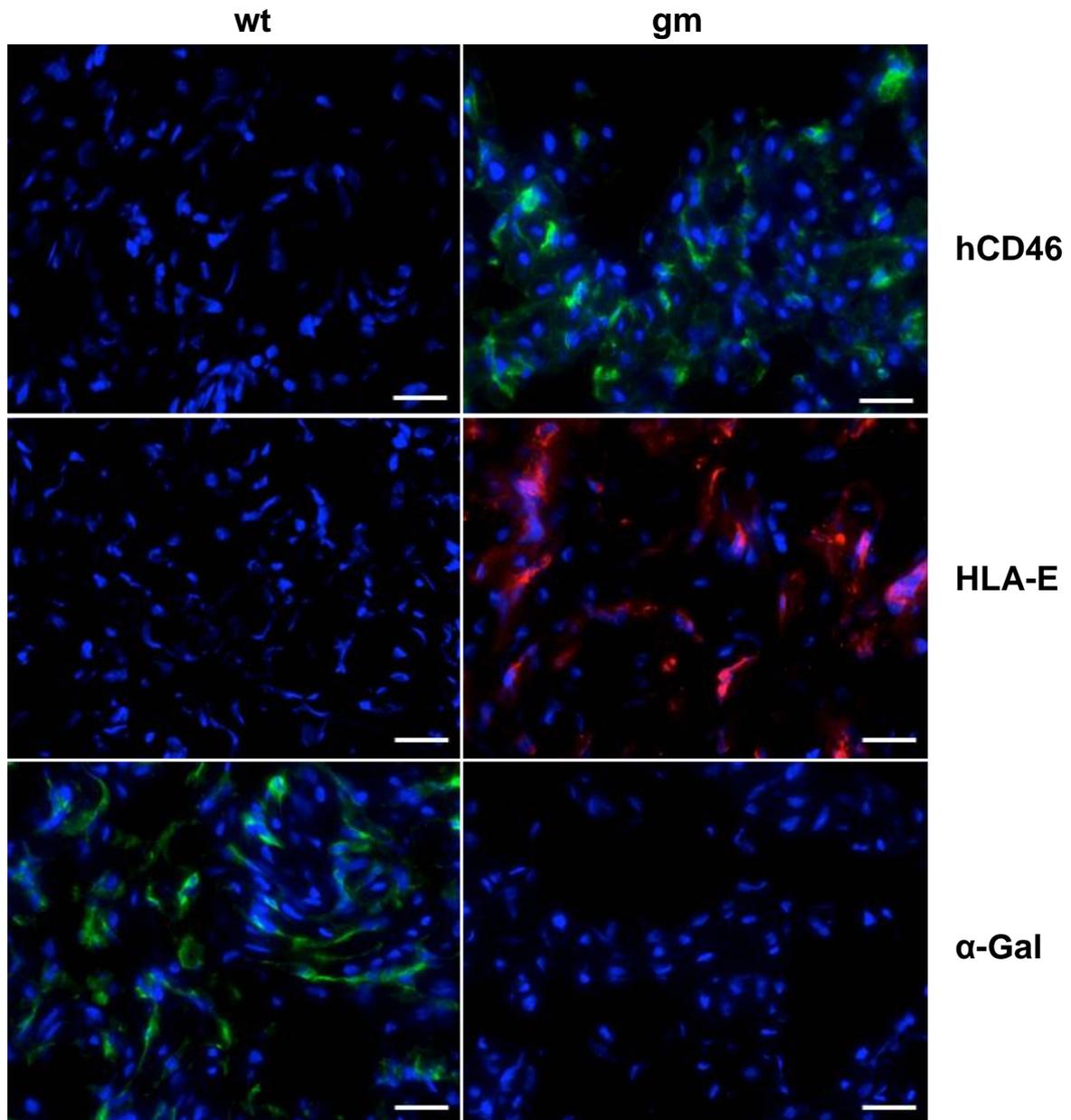
**Abbildung 3.16: Immunfluoreszenz - Markierung mit hCD46-Antikörper.** Keine Expression von hCD46 in der Wildtyp-Gruppe; wt: n = 6, gm: n = 6; mit freundlicher Genehmigung vom Departement Klinische Forschung der Universität Bern unter Leitung von Prof. Dr. Robert Rieben.



**Abbildung 3.17: Immunfluoreszenz - Markierung mit α-Gal-Antikörper.** Keine Expression von α-Gal in der genetisch modifizierten Gruppe; wt: n = 6, gm: n = 6; mit freundlicher Genehmigung vom Departement Klinische Forschung der Universität Bern unter Leitung von Prof. Dr. Robert Rieben.



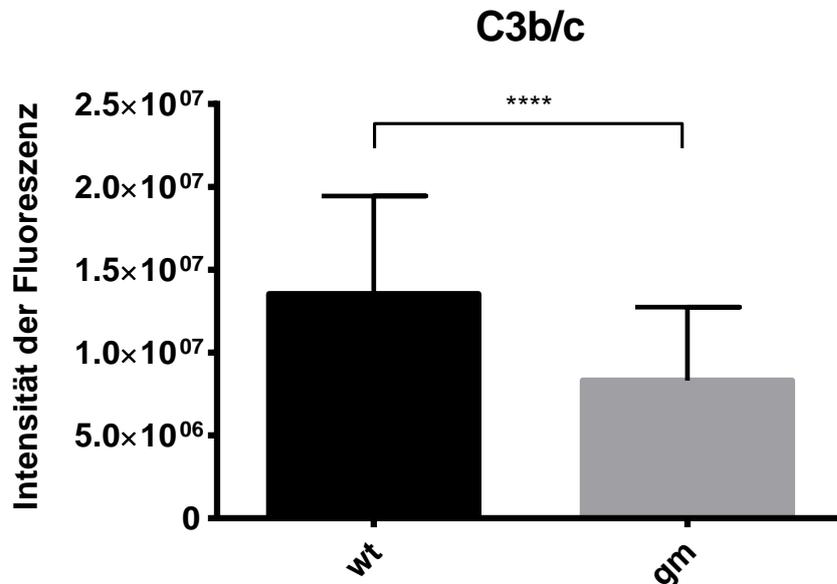
**Abbildung 3.18: Immunfluoreszenz - Markierung mit HLA-E-Antikörper.** Keine Expression von HLA-E in der Wildtyp-Gruppe; wt: n = 6, gm: n = 6; mit freundlicher Genehmigung vom Departement Klinische Forschung der Universität Bern unter Leitung von Prof. Dr. Robert Rieben.



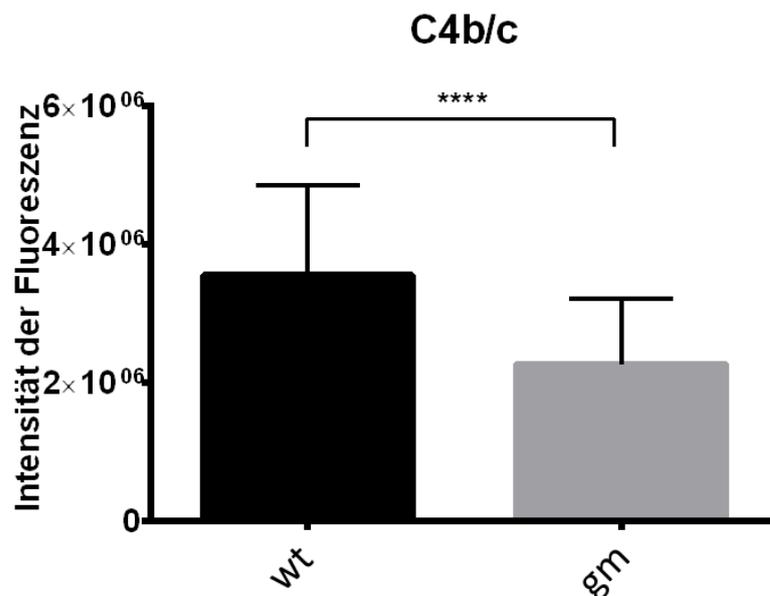
**Abbildung 3.19: Immunfluoreszenz - Markierung der Gewebe** mit hCD46 (grün) in den oberen beiden Bildern, mit HLA-E (rot) in den mittleren beiden Bildern und  $\alpha$ -Gal (grün) in den unteren beiden Bildern. Links im Wildtyp-Gewebe und rechts im genetisch modifizierten Gewebe; Bilder jeweils exemplarisch von einem Wildtyp- und einem gentechnisch modifizierten Herzen (Maßstableiste=50 $\mu$ m); verwendet wurde jeweils ein Gewebeschnitt pro Herz und sechs Bildausschnitte pro Gewebeschnitt; mit freundlicher Genehmigung vom Departement Klinische Forschung der Universität Bern unter Leitung von Prof. Dr. Robert Rieben.

### 3.4.2 C3b/c und C4b/c

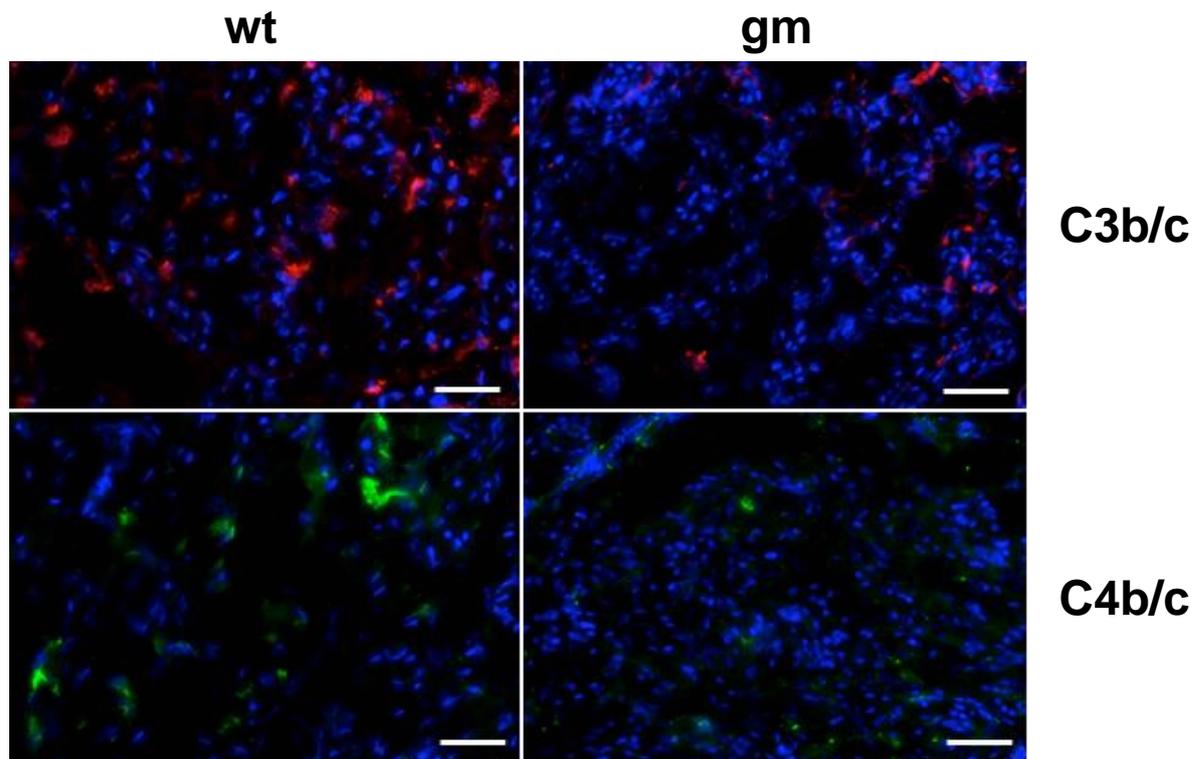
Das Immunfluoreszenz-Signal von C3b/c und C4b/c war in der genetisch modifizierten Versuchsgruppe signifikant niedriger als in der Wildtyp-Gruppe (s. Abbildung 3.20, Abbildung 3.21 und Abbildung 3.22).



**Abbildung 3.20: Immunfluoreszenz - Markierung mit C3b/c-Antikörper.** wt:  $1,4 \times 10^7 \pm 6 \times 10^6$ ; gm:  $8,3 \times 10^6 \pm 4,4 \times 10^6$ ;  $p < 0,001$ ; wt: n = 6, gm: n = 6; mit freundlicher Genehmigung vom Departement Klinische Forschung der Universität Bern unter Leitung von Prof. Dr. Robert Rieben.



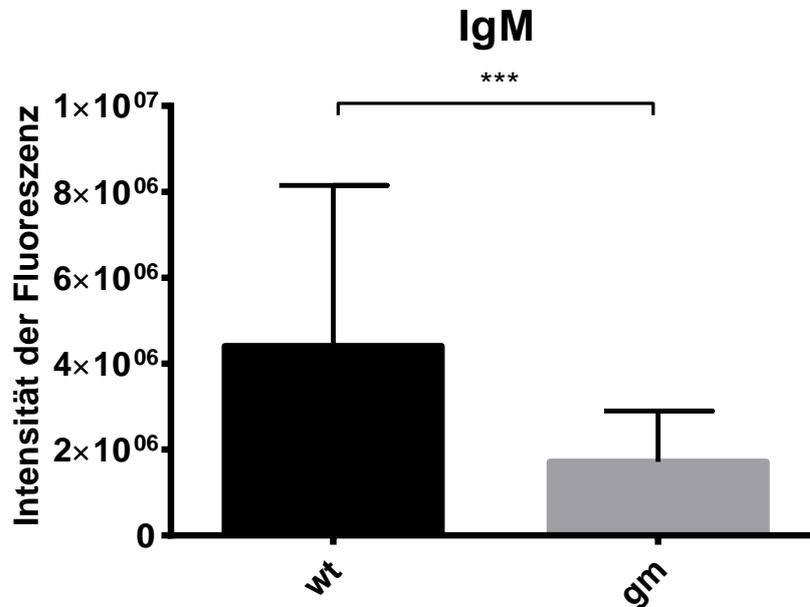
**Abbildung 3.21: Immunfluoreszenz - Markierung mit C4b/c-Antikörper.** wt:  $3,5 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^6$ ; gm:  $2,3 \times 10^6 \pm 9,4 \times 10^5$ ;  $p < 0,001$ ; wt: n = 6, gm: n = 6; mit freundlicher Genehmigung vom Departement Klinische Forschung der Universität Bern unter Leitung von Prof. Dr. Robert Rieben.



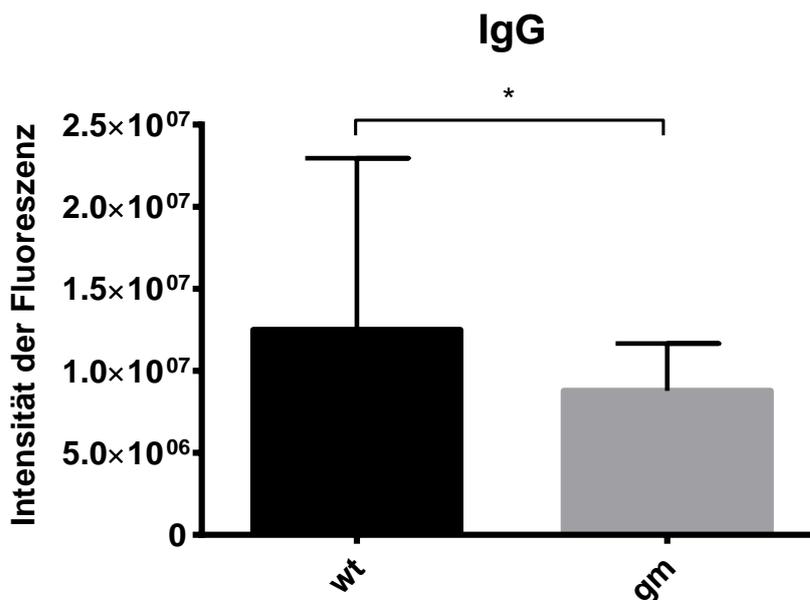
**Abbildung 3.22: Immunfluoreszenz - Markierung der Gewebe** mit C3b/c (rot) in den oberen beiden Bildern und C4b/c (grün) in den unteren beiden Bildern. Links im Wildtyp-Gewebe und rechts im genetisch modifizierten Gewebe; Bilder jeweils exemplarisch von einem Wildtyp- und einem gentechnisch modifizierten Herzen (Maßstableiste=50µm); verwendet wurde jeweils ein Gewebeschnitt pro Herz und sechs Bildausschnitte pro Gewebeschnitt; mit freundlicher Genehmigung vom Departement Klinische Forschung der Universität Bern unter Leitung von Prof. Dr. Robert Rieben.

### 3.4.3 IgM und IgG

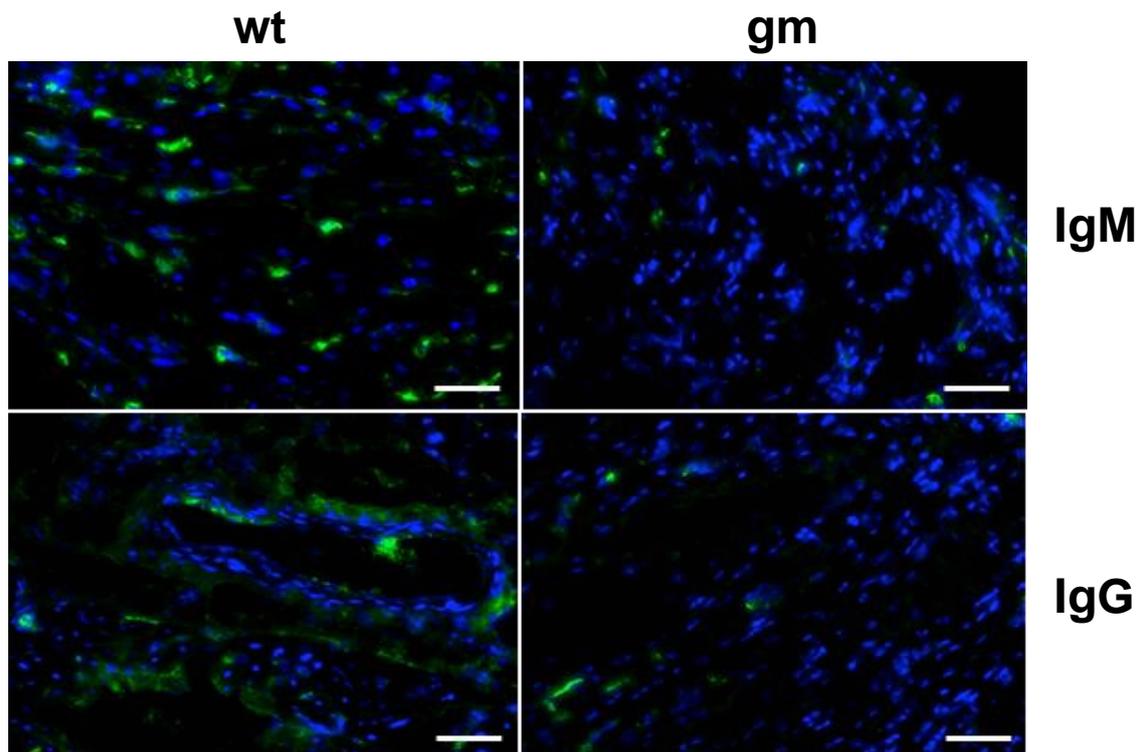
Das Immunfluoreszenz-Signal von IgM und IgG war in der genetisch modifizierten Versuchsgruppe signifikant niedriger als in der Wildtyp-Gruppe (s. Abbildung 3.23, Abbildung 3.24 und Abbildung 3.25).



**Abbildung 3.23: Immunfluoreszenz - Markierung mit IgM-Antikörper.** wt:  $4,4 \times 10^6 \pm 3,7 \times 10^6$ ; gm:  $1,7 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^6$ ;  $p < 0,001$ ; wt: n = 6, gm: n = 6; mit freundlicher Genehmigung vom Departement Klinische Forschung der Universität Bern unter Leitung von Prof. Dr. Robert Rieben.



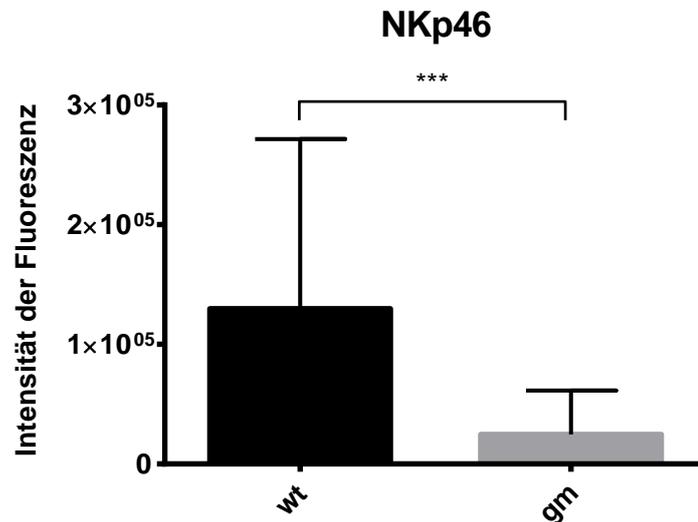
**Abbildung 3.24: Immunfluoreszenz - Markierung mit IgG-Antikörper.** wt:  $1,2 \times 10^7 \pm 1 \times 10^7$ ; gm:  $8,8 \times 10^6 \pm 2,9 \times 10^6$ ;  $p = 0,0438$ ; wt: n = 6, gm: n = 6; mit freundlicher Genehmigung vom Departement Klinische Forschung der Universität Bern unter Leitung von Prof. Dr. Robert Rieben.



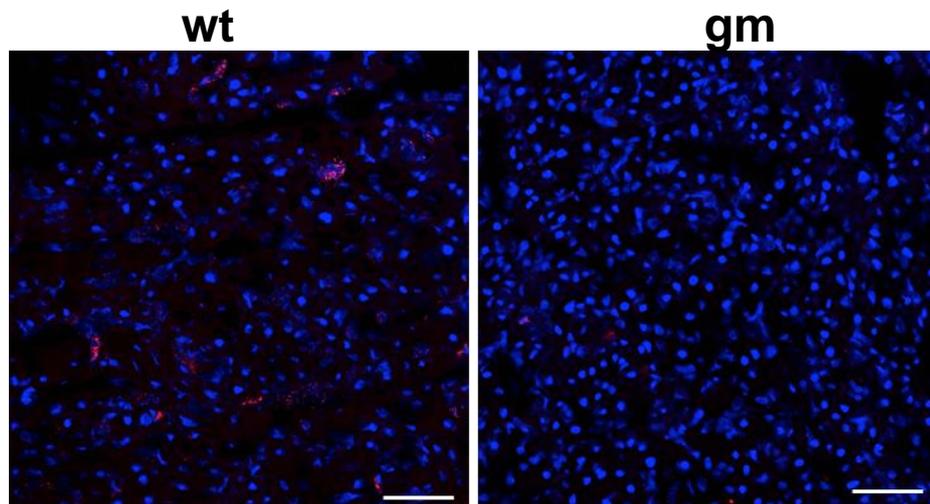
**Abbildung 3.25: Immunfluoreszenz - Markierung der Gewebe** mit IgM (grün) in den oberen beiden Bildern und IgG (grün) in den unteren beiden Bildern. Links im Wildtyp-Gewebe und rechts im genetisch modifizierten Gewebe; Bilder jeweils exemplarisch von einem Wildtyp- und einem gentechnisch modifizierten Herzen (Maßstableiste=50µm); verwendet wurde jeweils ein Gewebeschnitt pro Herz und sechs Bildausschnitte pro Gewebeschnitt; mit freundlicher Genehmigung vom Departement Klinische Forschung der Universität Bern unter Leitung von Prof. Dr. Robert Rieben.

### 3.4.4 NKp46

Die Auswertung der Immunfluoreszenz ergab, dass die Anreicherung von NK-Zellen im genetisch modifizierten Gewebe signifikant geringer ist als in den Wildtyp-Herzen (s. Abbildung 3.26 und Abbildung 3.27).



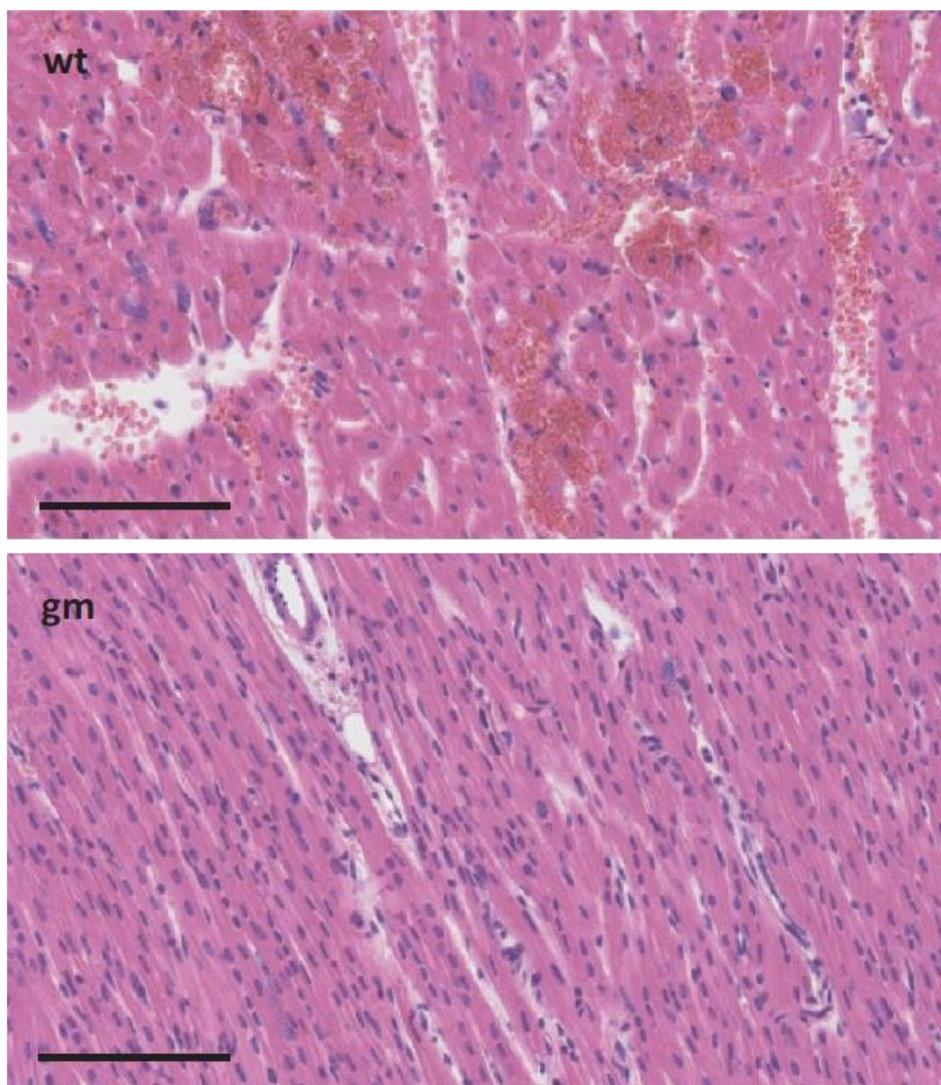
**Abbildung 3.26: Immunfluoreszenz - Markierung mit NKp46-Antikörper.** wt:  $1,3 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^5$ ; gm:  $2,5 \times 10^4 \pm 3,7 \times 10^4$ ;  $p < 0,001$ ; wt: n = 6, gm: n = 6; mit freundlicher Genehmigung vom Departement Klinische Forschung der Universität Bern unter Leitung von Prof. Dr. Robert Rieben.



**Abbildung 3.27: Immunfluoreszenz - Markierung der Gewebe** mit NKp46 (rot) und DAPI (blau). Links im Wildtyp-Gewebe und rechts im genetisch modifizierten Gewebe; Bilder jeweils exemplarisch von einem Wildtyp- und einem gentechnisch modifizierten Herzen (Maßstableiste=50µm); verwendet wurde jeweils ein Gewebeschnitt pro Herz und sechs Bildausschnitte pro Gewebeschnitt; mit freundlicher Genehmigung vom Departement Klinische Forschung der Universität Bern unter Leitung von Prof. Dr. Robert Rieben.

### 3.5 Histologie

Die Auswertung nach dem HIS-Schema ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Wildtyp- und genetisch modifizierten Herzen ( $p=0,0067$ ). Der HIS-Score der Wildtyp-Herzen betrug 6 und lag damit im Mittel signifikant höher als der HIS-Score der genetisch modifizierten Herzen mit 3,5 (s. Abbildung 3.29). Die Ergebnisse der einzelnen Komponenten des HIS-Schemas können Tabelle 3.3 entnommen werden. Exemplarisch für die Histologie eines genetisch modifizierten und eines Wildtyp-Versuchs sind in Abbildung 3.28 jeweils mikroskopische Bilder angefügt.



**Abbildung 3.28: Gewebeschnitte (HE-Färbung) nach acht Stunden Perfusion.** Auf dem oberen Bild ist ein Wildtyp-Herz abgebildet. Gut zu sehen sind hier die Erythrozytenextravasate, die Hypereosinophilie und die Ödembildung. Auf dem unteren Bild ist das genetisch modifizierte Gewebe abgebildet (Maßstableiste=100µm), verwendet wurde jeweils ein Gewebeschnitt pro Herz und fünf Bildausschnitte pro Gewebeschnitt.

		Versuchsnummer					
		1	2	3	4	5	6
Perivaskuläres Ödem	gm	2	3	2	3	2	2
	wt	3	3	3	3	3	2
Erythrozytenextravasate	gm	1	1	2	1	1	1
	wt	2	2	3	3	3	2
Thrombusbildung	gm	0	0	0	0	0	0
	wt	0	0	0	1	1	0
Hypereosinophilie	gm	0	0	0	0	0	0
	wt	0	0	1	0	0	1
HIS-Score	gm	3	4	4	4	3	3
	wt	5	5	7	7	7	5

Tabelle 3.3: Histologische Auswertung nach dem HIS-Score

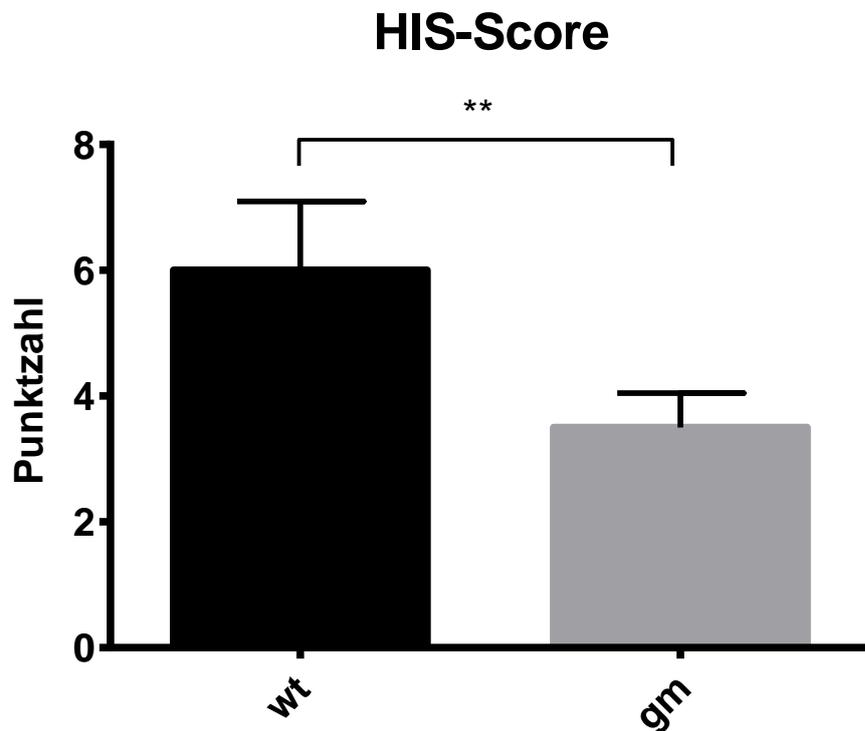


Abbildung 3.29: HIS-Score der mit HE gefärbten Gewebeschnitte. wt:  $6 \pm 1,1$ ; gm:  $3,5 \pm 0,5$ ;  $p=0,0022$ ; wt:  $n = 6$ , gm:  $n = 6$ .

## 4 Diskussion

### 4.1 Relevanz für die Xenotransplantation

Bei der Perfusion eines Wiltyp-Schweineherzens mit humanem Blut beginnt innerhalb von Minuten die hyperakute Abstoßungsreaktion (HAR). Ausgangspunkt dieser ist die Bindung präformierter natürlicher Antikörper (vor allem präformierter  $\alpha$ -Gal Antikörper) aus dem humanen Blut an die Gefäßendothelzellen im Schweineherz. Es folgt die Aktivierung des Komplementsystems und damit verbunden eine unmittelbare Schädigung des Endothels. In Folge der durch die Bindung der präformierten Antikörper ablaufenden Immunprozesse kommt es am Endothel unmittelbar bei Perfusionsbeginn zu einer Aktivierung und Adhäsion von Leukozyten. Bei der Aktivierung der Leukozyten und Endothelzellen werden Entzündungsmediatoren, wie z.B. Interleukin 6 freigesetzt, welches sowohl die Leukozytenaktivierung als auch deren Adhäsion am Endothel verstärkt. Die inflammatorischen und immunologischen Vorgänge der HAR führen zu einer Erhöhung der mikrovaskulären Gefäßpermeabilität und zu Thrombosen, die Gewebereinblutungen nach sich ziehen. Dies hat eine deutliche Gewichtszunahme des perfundierten Gewebes durch Ödembildung und interstitielle Hämorrhagien zur Folge. All diese Vorgänge führen letztendlich zu einem Organversagen des Herzens.

In den letzten Jahrzehnten wurden große Fortschritte dabei erzielt, die xenogene Organabstoßung zu verringern, um so die Xenotransplantation ganzer Organe für den Menschen möglich zu machen. Der Schlüssel hierfür sind die genetischen Modifikationen, die die Interaktion zwischen Transplantat und Empfänger auf molekularer Ebene verändern. Die Bandbreite der benefiziellen genetischen Modifikationen ist vermutlich bei weitem noch nicht ausgeschöpft. Gerade neue Verfahren zum Gen-Engineering wie CRISPR/Cas vereinfachen und beschleunigen die Entwicklung neuer genetisch modifizierter Spendertiere [106].

Aufgrund der wachsenden Anzahl existierender Kombinationen von genetischen Modifikationen in Spendertieren haben ex vivo Modelle eine hohe Relevanz für die systematische Testung der xenogenen Reaktion und die Einschätzung des Nutzens einzelner Modifikationen. Sie erlauben es, besser als in vivo Modelle, einzelne Parameter gezielt zu testen, während andere Einflussfaktoren konstant gehalten

werden können. Dies erlaubt, die spezifische Auswirkung des untersuchten Parameters genauer zu quantifizieren. Hieraus ergibt sich auch eine erste Einschätzung, ob der Nutzen einer Veränderung groß genug ist, um zu rechtfertigen, sie auf eine in vivo Studie zu übertragen. Die Auswahl der richtigen transgenen Modifikationen hat hierbei einen wichtigen Stellenwert, um die Abstoßungsreaktion weitestgehend zu vermeiden. Viele genetische Modifikationen gehen mit möglichen unerwünschten Nebeneffekten für den Phänotyp der Spendertiere einher. So ist beispielsweise ein SLA (swine leukocyte antigen) Knock-out aufgrund einer induzierten Immuninsuffizienz der Spendertiere keine sinnvolle genetische Modifikation. Eine Zucht solcher Tiere wäre nur mit extremen Hygienemaßnahmen und antibiotischer Therapie möglich und somit verboten. Die Expression von HLA-E lässt keine unerwünschten Nebenwirkungen bei den Spendertieren erwarten und eine Veränderung des Phänotyps wurde bisher auch nicht beobachtet [96].

Um den Einfluss der genetischen Modifikationen im Rahmen der akuten xenogenen Abstoßung zu quantifizieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit Schweineherzen mit einem Knock-out von  $\alpha$ -Gal und einer Überexpression von hCD46 und HLA-E mit humanem Blut perfundiert. Die Überexpression von HLA-E als transgene Modifikation wurde dabei erstmalig in einem funktionellen kardialen Modell untersucht. HLA-E soll als inhibierender Rezeptor die Aktivierung der NK-Zellen und damit deren Beteiligung an der Abstoßungsreaktion eindämmen bzw. verhindern.  $\alpha$ -Gal und hCD46 verringern die HAR durch das Ausbleiben einer Bindung von präformierten  $\alpha$ -Gal Antikörpern und durch die Hemmung der Komplementaktivierung. Als Kontrolle wurden Schweineherzen perfundiert, die keine genetischen Modifikationen aufwiesen (Wildtyp-Gruppe).

## **4.2 Working-Heart-Modell: Möglichkeiten und Grenzen**

Das Working-Heart-Modell kann als ex vivo Versuchsaufbau die physiologischen Gegebenheiten nicht vollständig abbilden. Dennoch ist es in vielerlei Hinsicht ein effektives Modell, um die ersten Stunden einer xenogenen Transplantation näherungsweise darzustellen und zu untersuchen. Durch den standardisierten Aufbau sind die Versuchsbedingungen sehr exakt reproduzierbar, was für eine gute Vergleichbarkeit der Versuche untereinander sorgt.

Ein limitierender Faktor bei der Working-Heart-Perfusion ist die Akkumulation von toxischen Stoffwechselprodukten bedingt durch das Fehlen von filternden und entgiftenden Organen wie der Niere und der Leber. Diese Produkte können mit zunehmender Länge des Versuchs Zellen schädigen und zur Verringerung der Pumpleistung der Herzen führen. Bei dieser Versuchsreihe wurde die Versuchsdauer auf acht Stunden festgesetzt. Bei den zuvor mit diesem Modell durchgeführten Studien betrug die Versuchsdauer drei Stunden [102, 107].

Das Versuchsprotokoll wurde auf acht Stunden verlängert, um der Aktivierung und Migration von NK-Zellen ausreichend Zeit zu geben. Ein direkter Vergleich der Histologie zwischen dieser und den vorangegangenen Versuchsreihen ist deswegen nicht möglich. In weiterführenden Studien wäre aber die Untersuchung der Unterschiede, z.B. in der Zunahme des Gewebeschadens, zwischen der drei- und der achtstündigen Perfusion sinnvoll.

Die in Kapitel 3 dargestellten Ergebnisse sind überdies vor dem Hintergrund verschiedener Schwächen des Modells zu bewerten: Das System wurde vor Beginn der Versuche sorgfältig entlüftet. Eine völlige Vermeidung des Kontakts mit Luft ist aber nicht möglich, sodass eine gewisse Aktivierung des Immun- und Gerinnungssystems und die Gefahr von Mikroembolien durch Luftbläschen nicht vollständig ausgeschlossen werden können.

Das Schlauchsystem des Modells hat keine elastischen Eigenschaften und kann sich so nicht wie das humane Gefäßsystem an wechselnde Gegebenheiten anpassen. Über den eingebauten Windkesselmechanismus distal der Aortenklappe werden jedoch die elastischen Eigenschaften der Aorta nachgeahmt. Auch wenn auf diese Weise physiologische systolische und diastolische Drücke erreicht werden können, wird eine aortale Blutdruckkurve, wie sie unter in vivo Bedingungen besteht, nicht vollständig erreicht [102].

Wie auch bei der extrakorporalen Perfusion im Rahmen von Operationen, bei denen eine Herz-Lungen-Maschine nötig ist, kommt das Blut durch das Schlauchsystem und den Oxygenator im Working-Heart-Modell ständig in Kontakt mit Fremdoberflächen. Dies kann zur Aktivierung des Komplementsystems und der plasmatischen Gerinnung, zur Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten und zur Bildung von Zytokinen führen [108, 109]. Um diese Prozesse so gering wie möglich zu halten, wurden für das System analog zu Herz-Lungen-Maschinen Schläuche mit Phosphorylcholin-

Beschichtung verwendet. Darüber hinaus erfolgte die Perfusion mit heparinisiertem Blut. Nachteil dieser Vorgehensweise ist, dass eine Betrachtung der plasmatischen Gerinnung während der Versuche nicht möglich ist.

Die Limitationen, die das Perfusionssystem hat, betreffen beide Versuchsgruppen gleichermaßen, die genetisch modifizierte und die Wildtyp-Gruppe, und sie nehmen somit keinen Einfluss auf die Vergleichbarkeit der Gruppen. Diese beeinflussen aber durchaus die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf in vivo Studien. Hierauf muss in weiterführenden Arbeiten besonders geachtet werden. Trotzdem ist das Working-Heart-Modell eine wichtige Stufe in der Etablierung und Weiterentwicklung präklinischer in vivo Studien, wie z.B. im Pavianmodell. Hier können Ideen getestet und verfeinert und bei erfolgsversprechenden Ergebnissen auf in vivo Studien übertragen werden [110, 111].

### **4.3 Expression von $\alpha$ -Gal, hCD46 und HLA-E in den Versuchstieren**

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Untersuchungen (s. Kapitel 3.4.1) zeigen, dass die genetisch modifizierten Schweine eine Expression von HLA-E und hCD46 aufwiesen.  $\alpha$ -Gal wurde auf der Endotheloberfläche dagegen nicht exprimiert. Der erwünschte Phänotyp der genetischen Modifikationen war somit nachgewiesen. Als Kontrolle wurde auch die Immunfluoreszenz der Wildtyp-Tiere untersucht. Hier fand sich eine Expression von  $\alpha$ -Gal und keine Expression von hCD46 und HLA-E. Somit waren auch die Wildtyp-Tiere als Kontrollgruppe für die Versuchsreihe geeignet.

## **4.4 Wirkung der genetischen Modifikationen**

### **4.4.1 Gewebeschaden**

Das Myokard aller perfundierten Herzen wurde lichtmikroskopisch untersucht. Die semi-quantitative Auswertung des Gewebeschadens erfolgte nach einem Score (Histological Injury Severity-Score / HIS-Score), in den als Kenngrößen das perivaskuläre Ödem, die Erythrozytenextravasate, die Thrombusentwicklung und die Hypereosinophilie einfließen. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (s. Kapitel 3.5). So bekamen die Wildtyp-Herzen im Durchschnitt einen HIS-Score von 6, die genetisch modifizierten Herzen einen HIS-Score von 3,5.

Demnach war der Gewebeschaden in den genetisch modifizierten Herzen signifikant geringer als in den Wildtyp-Herzen. Dies zeigt deutlich die Wirksamkeit der genetischen Modifikationen für  $\alpha$ -Gal, hCD46 und HLA-E hinsichtlich der Verringerung der akuten Organabstoßung. Andere Studien zeigen die einzelnen Effekte von  $\alpha$ -Gal, hCD46 und HLA-E ebenso [85, 92, 112].

So ist es auch logisch, dass die Zunahme der Herzgewichte in den Versuchsgruppen signifikant unterschiedlich war. Die Herzen in der genetisch modifizierten Gruppe nahmen durchschnittlich 20% an Gewicht zu, die Wildtyp-Herzen 33% (s. Kapitel 3.1). Die Gewichtszunahme ist durch die Prozesse zu erklären, die im HIS-Score zur Bewertung des Gewebeschadens herangezogen werden (Thrombus- und Ödembildung, interstitielle Hämorrhagien und Infiltration des Gewebes mit Entzündungszellen). Es kommt zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Extravasation von Blutzellen und Thrombusbildung, die Gewebeeinblutungen und interstitielle Hämorrhagien nach sich ziehen. Auch entstehen interzelluläre Lücken im Endothel, sodass es zu einer vermehrten Präsentation von subendothelialen Strukturen kommt. Dies führt zu einer Thrombozytenaktivierung und -adhäsion [35, 113-115]. Diese Prozesse finden in der genetisch modifizierten Gruppe weit weniger statt. So ist das Herzgewicht ein guter Marker zur ersten Einschätzung des Schweregrades der abgelaufenen Abstoßungsreaktion.

#### **4.4.2 Herzfunktion und Metabolismus**

Durch das Windkesselsystem war der mittlere aortale Blutdruck während aller Versuche und zu allen Zeitpunkten auf konstantem Niveau (s. Kapitel 3.2.1). Auch die mittleren Drücke im linken und rechten Vorhof verhielten sich stets stabil. Im Langendorff-Modus waren sie, wie erwartet, kaum vorhanden. Ebenso zeigte die Herzfrequenz zwischen den Gruppen keinen Unterschied und hielt sich während der gesamten Versuche im physiologischen Bereich (s. Kapitel 3.2.3). Beides gewährleistete eine gute Vergleichbarkeit der Versuchsgruppen.

Insgesamt zeigten die genetisch modifizierten Herzen während der Dauer der Perfusionsversuche eine bessere Leistung als die der Wildtyp-Gruppe. So war der Koronarindex in der genetisch modifizierten Gruppe zu allen Zeitpunkten höher als in der Wildtyp-Gruppe (s. Kapitel 3.2.4). Zu den Zeitpunkten T<sub>6</sub> bis T<sub>12</sub> war er signifikant unterschiedlich. Der höhere Blutfluss und die damit einhergehende bessere

Versorgung mit Sauerstoff ist sehr wahrscheinlich auf eine bessere Integrität der Mikrozirkulation aufgrund einer geringeren immunologisch vermittelten Gewebeschädigung zurückzuführen (s. Kapitel 4.4.1).

Die oben erwähnte bessere myokardiale Versorgung der Herzen ging einher mit einer besseren kardialen Funktion. So war das Schlagvolumen und der Herzindex der genetisch modifizierten Herzen zu den Zeitpunkten T<sub>3</sub> bis T<sub>6</sub> signifikant höher als bei der Kontrollgruppe (s. Kapitel 3.2.2 und 3.2.5). Sie waren besser perfundiert und zeigten eine höhere Pumpleistung während der xenogenen Perfusion mit humanem Blut. Dies kann ebenfalls mit den stark geminderten Gewebeschädigungen erklärt werden.

Auch der Sauerstoffverbrauch der genetisch modifizierten Herzen war zu den Zeitpunkten T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub> signifikant höher als bei der Wildtyp-Gruppe (s. Kapitel 3.2.6). Dies kann ein Hinweis auf einen gesteigerten Sauerstoffbedarf der genetisch modifizierten Herzen aufgrund der erhöhten Pumpleistung sein.

Lactat kann als Marker für einen Sauerstoffmangel des Organs herangezogen werden und entsteht bei anaeroben Stoffwechselfvorgängen. Im Zuge der ablaufenden Abstoßungsreaktion kommt es durch Störung der Mikrozirkulation zu einem Sauerstoffdefizit und die Lactatkonzentration steigt an. Sie war während der Working-Heart-Perfusion bei der genetisch modifizierten Gruppe signifikant geringer und stieg auch nicht so stark an wie in der Wildtyp-Gruppe (s. Kapitel 3.2.7). Es ließ sich demnach ablesen, dass in der Wildtyp-Gruppe während der Working-Heart-Perfusion ein immer größeres Sauerstoffdefizit entstand, das mehr anaerobe Stoffwechselfvorgänge bedingte, während die Lactatkonzentration in der genetisch modifizierten Gruppe weitgehend konstant blieb.

#### **4.4.3 Antikörper-Ablagerungen**

Wie zu erwarten, war auch das Immunfluoreszenz-Signal von IgG und IgM Antikörpern (s. Kapitel 3.4.3) im Myokard der genetisch modifizierten Herzen nach xenogener Perfusion mit humanem Blut signifikant geringer, verglichen mit dem Myokard von Wildtyp-Herzen. Es konnten keine präformierten Antikörper gegen  $\alpha$ -Gal an das Endothel der Schweineherzen binden. So verhinderte der  $\alpha$ -Gal Knock-out die Entstehung der HAR weitestgehend. In den Wildtyp-Tieren, die  $\alpha$ -Gal exprimieren, fanden sich dagegen viel IgG- und IgM-Ablagerungen im Gewebe. Die geringe Menge

endothelialer Antikörper-Ablagerungen, die im genetisch modifizierten Gewebe nachgewiesen wurde, richtet sich gegen nicht- $\alpha$ -Gal-Epitope. Hiervon gibt es zahlreiche, die in ihrer Struktur noch nicht alle bekannt, aber hinsichtlich präformierter Antikörper quantitativ weniger relevant sind [28-31].

#### **4.4.4 Komplementaktivierung**

Das Immunfluoreszenz-Signal von C3b/c und C4b/c im Herzgewebe (s. Kapitel 3.4.2) war bei den Wildtyp-Tieren nach den Perfusionsversuchen hoch. Im Vergleich war dieses bei den genetisch modifizierten Tieren signifikant geringer. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Komplementaktivierung während der xenogenen Perfusion in der Kontrollgruppe stärker ausgeprägt war als in der Gruppe genetisch modifizierter Herzen. Die Überexpression von hCD46 hat somit die Aktivierung des Komplementsystems erfolgreich verhindert.

Auch in anderen Studien konnte die Wirksamkeit einer Expression von hCD46 als Komplementregulator bei der xenogenen Organabstoßung bereits bewiesen werden [84, 116, 117].

#### **4.4.5 NK-Zellen und xenogene Abstoßung**

Die Ergebnisse der FACS-Analyse zeigen, dass die relative Zahl der NK-Zellen im Perfusat während der xenogenen Perfusion von Wildtyp-Herzen signifikant abfiel. In der genetisch modifizierten Gruppe ließ sich kein signifikanter Abfall feststellen (s. Kapitel 3.3).

Der Abfall der NK-Zellzahl im Wildtyp-Perfusat zwischen  $T_1$  und  $T_{13}$  legt nahe, dass in den Wildtyp-Herzen mehr NK-Zellen im Myokard verbleiben und an der Abstoßungsreaktion teilnehmen. Es kann angenommen werden, dass die genetisch modifizierten Herzen von den NK-Zellen in geringerem Ausmaß als Zielstruktur erkannt wurden, und diese stattdessen weiter im Perfusat zirkulierten.

Bei Betrachtung der FACS Ergebnisse fällt die sehr variable NK-Zellzahl zum Zeitpunkt  $T_1$  (vor Perfusion der Herzen) auf. Nicht nur unterschieden sich die Blutspender stark untereinander, auch ihre eigene NK-Zellzahl zwischen Wildtyp- und genetisch modifiziertem Versuch, also zwischen ihren beiden Blutspenden im Abstand von mindestens einem Monat, variierte stark. Dies ist in gewissem Rahmen als

physiologisch zu werten, da die NK-Zellzahl beim Menschen ständigen Schwankungen unterliegt [25].

Ein weiterer Aspekt, der die Variabilität erklären kann, ist die Tatsache, dass die Zellen nach der PBMC-Isolation eingefroren wurden. Hieraus ergeben sich unter Umständen Schwankungen in der tatsächlichen Zahl der PBMC, da durch den Einfrierungs- und Auftauprozess Zellen absterben können. In nachfolgenden Arbeiten sollte die FACS-Analyse direkt im Anschluss an die Isolation erfolgen, um solche Ereignisse von vornherein auszuschließen und so validere Ergebnisse zu erzielen.

Das Immunfluoreszenzsignal von NKp46 war nach xenogener Perfusion im Wildtyp-Myokard signifikant höher als in Herzen genetisch modifizierter Tiere (s. Kapitel 3.4.4). Es befanden sich demnach mehr NKp46 exprimierende NK-Zellen in den Wildtyp-Herzen. Da keine weiteren NK-Zell-Marker untersucht wurden, ist nicht zu differenzieren, ob die Anzahl der NK-Zellen im Gewebe oder eine höhere Aktivität der vorhandenen NK-Zellen hierfür ursächlich war. In beiden Fällen kann jedoch die Hypothese unterstützt werden, dass die Expression von HLA-E einen protektiven Faktor für das xenogene Myokard darstellt, insbesondere für die Zellen mit dem primär größten Kontakt, den Endothelzellen. Es kann angenommen werden, dass die Expression von HLA-E diese vor der NK-Zell-Toxizität schützt und den Zelluntergang durch Lyse verhindert.

Wie groß der Einfluss von HLA-E bzw. der NK-Zellen auf die Abstoßung ist, kann durch den hier dargestellten Versuchsaufbau nicht exakt quantifiziert werden, da sich die Versuchsgruppen in mehr als einer genetischen Modifikation unterscheiden. Um die Abstoßungsreaktion allein durch NK-Zellen besser beurteilen zu können, wäre eine Versuchsreihe aufschlussreich, in der zweifach genetisch modifizierte mit dreifach genetisch modifizierten Tieren verglichen werden. Bei den dreifach genetisch modifizierten Tieren wären die gleichen Modifikationen wie in dieser Arbeit sinnvoll ( $\alpha$ -Gal/hCD46/HLA-E). Die zweifach transgenen Tiere würden die ersten beiden genetischen Modifikationen, jedoch keine Überexpression von HLA-E aufweisen und somit in der Theorie nicht vor einem Angriff der NK-Zellen geschützt sein. Hier könnte man mit den gleichen Methoden wie in dieser Arbeit noch spezifischer auf den Einfluss der NK-Zellen eingehen. Es wäre zum Beispiel möglich, den Gewebeschaden, der allein durch die NK-Zellen hervorgerufen wird, histologisch zu quantifizieren. Zum

Zeitpunkt dieser Versuchsreihe standen keine zweifach genetisch modifizierten Schweine ( $\alpha$ -Gal/hCD46) zur Verfügung.

Sowohl die Ergebnisse der FACS-Analyse als auch die Ergebnisse der Immunfluoreszenz im Herzgewebe unterstützen die Hypothese, dass die NK-Zellen bei Expression von HLA-E in geringerem Ausmaß an der xenogenen Abstoßung beteiligt sind. Sie sind in geringerer Anzahl im Herzgewebe nachweisbar und verbleiben stattdessen im Perfusat.

## 4.5 Ausblick

Wie bereits erwähnt, kann in diesem Versuchsaufbau keine genaue Differenzierung zwischen den Anteilen der einzelnen genetischen Modifikationen an der Verminderung der Abstoßungsreaktion erfolgen. Um vor allem den Einfluss von HLA-E zu quantifizieren, wäre eine Versuchsreihe mit einem Vergleich von zweifach ( $\alpha$ -Gal/hCD46) und dreifach ( $\alpha$ -Gal/hCD46/HLA-E) genetisch modifizierten Schweinen sinnvoll.

Zur Verringerung der Beteiligung der NK-Zellen an der Abstoßungsreaktion könnten weitere humane, inhibierende Oberflächenmoleküle auf der Zelloberfläche der Schweineherzen exprimiert werden (z.B. weitere HLA-Moleküle). Hierfür wäre die Züchtung dementsprechend genetisch modifizierter Schweine notwendig. Zudem müsste untersucht werden, ob eine Kombination aus zwei oder mehr inhibierenden Rezeptoren die Aktivierung der NK-Zellen effektiver eindämmt als HLA-E allein.

Durch diese Versuche ist aber auch klar geworden, dass nur die zusätzliche Expression von HLA-E die xenogene Reaktion nicht aufheben kann. Dies geht aus den funktionellen, metabolischen und histologischen Veränderungen während der Versuche hervor.

Seitdem die Xenotransplantation in den letzten Jahren der klinischen Anwendung immer nähergekommen ist, wird deutlich, dass ein möglicher Zulassungsprozess von mehrfach transgenen Spenderorganen mit einem sehr hohen Aufwand verbunden ist. Für die erste Generation von transgenen Spenderorganen in der klinischen Anwendung werden daher nur die wirksamsten genetischen Modifikationen zur Anwendung kommen.

---

In den letzten Jahren hat sich im Pavianmodell (siehe Kapitel 1.1) vor allem die transgene Kombination aus einem  $\alpha$ -Gal Knock-out und einer Überexpression von hCD46 und humanem Thrombomodulin als sehr vielversprechend erwiesen, sodass deren klinische Anwendung zum jetzigen Zeitpunkt am wahrscheinlichsten erscheint. Eine Expression von humanem Thrombomodulin führt zu einer besseren Regulation der Hämostase bzw. der Blutgerinnung und verhindert thrombotische Komplikationen [118]. So ist mit dieser Kombination an genetischen Modifikationen ein Organüberleben eines orthotop transplantierten Schweineherzens in einen Pavian von 195 Tagen erreicht worden [27]. Eine Expression von HLA-E kann in der Zukunft zusätzlich zu den o.g. Modifikationen eine Rolle in der klinischen Anwendung spielen.

## 5 Zusammenfassung

Die Xenotransplantation ist eine vielversprechende Chance zur Behebung des akuten Mangels an Spenderorganen. Durch die Vielzahl molekularer Unterschiede der Zelloberfläche zwischen den Spezies gibt es aber größere Barrieren zu überwinden als bei der allogenen Transplantation. So ist die Organabstoßung zwischen Schwein und Mensch durch die phylogenetisch entfernte Verwandtschaft diskordant und es kommt binnen Minuten und Stunden zur Entwicklung der hyperakuten Abstoßungsreaktion. Auslöser ist die Bindung präformierter natürlicher Antikörper an spezifische Epitope auf dem Schweineendothel, sogenannte  $\alpha$ -Gal Antigene. Auch die weiteren Schritte in der Organabstoßung (akute vaskuläre Abstoßungsreaktion, thrombotische Mikroangiopathie, zelluläre Abstoßungsreaktion, chronische Abstoßungsreaktion) stellen eine große Herausforderung dar. An diesen Prozessen sind unter anderem auch NK-Zellen beteiligt [6, 28-32, 36, 41-45, 52, 66].

Zur Überwindung der xenogenen Abstoßung ist es neben einer geeigneten immunmodulatorischen Therapie vor allem die geeignete genetische Modifikation der Spendertiere (Schweine), die einen entscheidenden Einfluss auf das Organüberleben hat. Besonders hervorzuheben sind hier der  $\alpha$ -Gal Knock-out und die Expression von inhibierenden, Komplement-regulierenden Proteinen, deren Wirksamkeit mehrfach nachgewiesen werden konnte [13, 71-78, 80-82].

In dieser Arbeit wurde die Abstoßungsreaktion dreifach genetisch modifizierter Schweineherzen mit der Abstoßungsreaktion nicht genetisch modifizierter Herzen in einem xenogenen ex vivo Perfusionsmodell verglichen. Besonderer Fokus lag auf der Rolle der NK-Zelle. Hierbei wurden die Herzen nach der Explantation im Working-Heart-Modell für die Dauer von acht Stunden mit humanem Blut perfundiert.

Die genetisch modifizierten Schweineherzen wiesen neben dem Knock-out von  $\alpha$ -Gal und einer Überexpression von hCD46 auch eine Expression von HLA-E auf. Der  $\alpha$ -Gal Knock-out verhindert die HAR durch das Ausbleiben einer Bindung präformierter  $\alpha$ -Gal-Antikörper. Die hCD46 Expression reduziert die Komplementaktivierung. HLA-E ist ein inhibierender Rezeptor der NK-Zellen und soll ihre Aktivierung und damit ihre Einflussnahme auf die Abstoßungsreaktion verhindern oder reduzieren [4, 32, 71-78, 83-85, 87, 88, 90-92]

Es konnte gezeigt werden, dass die Abstoßungsreaktion bei der genetisch modifizierten Gruppe erheblich geringer ausfiel als bei den Wildtyp-Herzen. Sowohl die Immunfluoreszenz von IgM und IgG als auch die von C3b/c und C4b/c war geringer ausgeprägt. Gleichzeitig konnte eine reduzierte Anzahl bzw. eine geringere Aktivität von NK-Zellen im Myokard der genetisch modifizierten Herzen nachgewiesen werden. Auch die Quantifizierung der Zellen im Perfusat mittels FACS-Analyse unterstützte die Hypothese, dass durch HLA-E Expression weniger NK-Zellen aktiviert und rekrutiert wurden.

Die histologische Auswertung nach dem HIS-Score ergab einen signifikant größeren Gewebeschaden in der Kontrollgruppe und auch das Herzgewicht am Ende der Versuche war hier signifikant höher.

Die genetisch modifizierten Herzen wiesen überdies eine bessere kardiale Funktion während der ex vivo Perfusion auf. So war der Herzindex und die Koronarperfusion während der Working-Heart-Perfusion signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

Um die Wirkung von HLA-E während der xenogenen Herzperfusion noch besser beurteilen zu können, sind Kontrollgruppen mit zweifach ( $\alpha$ -Gal/hCD46) genetisch modifizierten Herzen notwendig. Diese Studie konnte jedoch die Effektivität der verwendeten, dreifach genetisch modifizierten Herzen in Bezug auf die NK-Zellaktivierung, den Gewebeschaden und die Herzfunktion nachweisen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Organtransplantation, D.S. *Jahresbericht 2016 Organspende und Transplantation in Deutschland.* 2016; Available from: [https://www.organspende-info.de/sites/all/files/files/JB\\_2016\\_Web\(1\).pdf](https://www.organspende-info.de/sites/all/files/files/JB_2016_Web(1).pdf).
2. Haverich, A. and H. Haller, *Organtransplantation in Deutschland.* Der Internist, 2016. **57**(1): p. 7-14.
3. Cooper, D.K. and D. Ayares, *The immense potential of xenotransplantation in surgery.* Int J Surg, 2011. **9**(2): p. 122-9.
4. Cooper, D.K., et al., *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, 2000. **19**(12): p. 1125-65.
5. Ekser, B., D.K. Cooper, and A.J. Tector, *The need for xenotransplantation as a source of organs and cells for clinical transplantation.* Int J Surg, 2015. **23**(Pt B): p. 199-204.
6. Taniguchi, S. and D.K. Cooper, *Clinical xenotransplantation: past, present and future.* Annals of The Royal College of Surgeons of England, 1997. **79**(1): p. 13-19.
7. Sachs, D.H., *The Immunologic Response to Xenografts.* ILAR Journal, 1995. **37**(1): p. 16-22.
8. Behnam Manesh, S., R. Omani Samani, and S. Behnam Manesh, *Ethical Issues of Transplanting Organs from Transgenic Animals into Human Beings.* Cell Journal (Yakhteh), 2014. **16**(3): p. 353-360.
9. Lamb, D., *Animal-to-human Transplants: the Ethics of Xenotransplantation.* Journal of Medical Ethics, 1997. **23**(2): p. 124-125.
10. Daar, A.S., *Ethics of xenotransplantation: animal issues, consent, and likely transformation of transplant ethics.* World J Surg, 1997. **21**(9): p. 975-82.
11. McCarthy, C.R., *Ethical Aspects of Animal-to-Human Xenografts.* ILAR Journal, 1995. **37**(1): p. 3-9.
12. Cooper, D.K., et al., *The pathobiology of pig-to-primate xenotransplantation: a historical review.* Xenotransplantation, 2016. **23**(2): p. 83-105.
13. Cooper, D.K., et al., *The role of genetically engineered pigs in xenotransplantation research.* J Pathol, 2016. **238**(2): p. 288-99.
14. Onions, D., et al., *An approach to the control of disease transmission in pig-to-human xenotransplantation.* Xenotransplantation, 2000. **7**(2): p. 143-55.
15. Deschamps, J.Y., et al., *History of xenotransplantation.* Xenotransplantation, 2005. **12**(2): p. 91-109.
16. Cooper, D.K., B. Ekser, and A.J. Tector, *A brief history of clinical xenotransplantation.* Int J Surg, 2015. **23**(Pt B): p. 205-10.
17. Hamilton, D., *The Monkey Gland Affair.* 1986, London.
18. Hering, B.J., et al., *First update of the International Xenotransplantation Association consensus statement on conditions for undertaking clinical trials of porcine islet products in type 1 diabetes-Executive summary.* Xenotransplantation, 2016. **23**(1): p. 3-13.
19. Zhu, H.-T., et al., *Pig-Islet Xenotransplantation: Recent Progress and Current Perspectives.* Frontiers in Surgery, 2014. **1**: p. 7.
20. Shackman, R., *The Story of Kidney Transplantation.* British Medical Journal, 1966. **1**(5500): p. 1379-1383.
21. Starzl, T.E., et al., *RENAL HETEROTRANSPLANTATION FROM BABOON TO MAN: EXPERIENCE WITH 6 CASES.* Transplantation, 1964. **2**: p. 752-76.

22. Hardy, J.D., et al., *HEART TRANSPLANTATION IN MAN. DEVELOPMENTAL STUDIES AND REPORT OF A CASE*. *Jama*, 1964. **188**: p. 1132-40.
23. Allison, A.C., *Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward*. *Immunopharmacology*, 2000. **47**(2-3): p. 63-83.
24. Hammer, C., et al., *Organs from animals for man*. *Int Arch Allergy Immunol*, 1998. **116**(1): p. 5-21.
25. Ligthart, G.J., H.R. Schuit, and W. Hijmans, *Natural killer cell function is not diminished in the healthy aged and is proportional to the number of NK cells in the peripheral blood*. *Immunology*, 1989. **68**(3): p. 396-402.
26. Mohiuddin, M.M., et al., *One-Year Heterotopic Cardiac Xenograft Survival In A Pig To Baboon Model*. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 2014. **14**(2): p. 488-489.
27. Längin, M., et al., *Consistent success in life-supporting porcine cardiac xenotransplantation*. *Nature*, 2018. **564**(7736): p. 430-433.
28. Chen, G., et al., *Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys*. *Nature medicine*, 2005. **11**(12): p. 1295-1298.
29. Ezzelarab, M., D. Ayares, and D.K.C. Cooper, *Carbohydrates in xenotransplantation*. *Immunol Cell Biol*, 2005. **83**(4): p. 396-404.
30. Harnden, I., K. Kiernan, and M. Kearns-Jonker, *The Anti-Non-Gal Xenoantibody Response to Galactosyltransferase Gene Knockout (GalTKO) Pig Xenografts*. *Current opinion in organ transplantation*, 2010. **15**(2): p. 207-211.
31. Sprangers, B., M. Waer, and A.D. Billiau, *Xenograft rejection—all that glitters is not Gal*. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2006. **21**(6): p. 1486-1488.
32. Ekser, B. and D.K.C. Cooper, *Overcoming the barriers to xenotransplantation: prospects for the future*. *Expert review of clinical immunology*, 2010. **6**(2): p. 219-230.
33. Ramirez, P., et al., *Prevention of hyperacute rejection in a model of orthotopic liver xenotransplantation from pig to baboon using polytransgenic pig livers (CD55, CD59, and H-transferase)*. *Transplant Proc*, 2005. **37**(9): p. 4103-6.
34. Igaz, P., *Recent strategies to overcome the hyperacute rejection in pig to human xenotransplantation*. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 2001. **74**(5): p. 329-340.
35. Rose, A.G. and D.K. Cooper, *Venular thrombosis is the key event in the pathogenesis of antibody-mediated cardiac rejection*. *Xenotransplantation*, 2000. **7**(1): p. 31-41.
36. Gollackner, B., et al., *Acute vascular rejection of xenografts: roles of natural and elicited xenoreactive antibodies in activation of vascular endothelial cells and induction of procoagulant activity*. *Transplantation*, 2004. **77**(11): p. 1735-41.
37. Fox, A., et al., *Innate and Adaptive Immune Responses to Nonvascular Xenografts: Evidence That Macrophages Are Direct Effectors of Xenograft Rejection*. *The Journal of Immunology*, 2001. **166**(3): p. 2133-2140.
38. Sæthre, M., et al., *Cytokine Secretion Depends on Gal $\alpha$ (1,3)Gal Expression in a Pig-to-Human Whole Blood Model*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 2008. **180**(9): p. 6346-6353.
39. Rieben, R. and J.D. Seebach, *Xenograft rejection: IgG1, complement and NK cells team up to activate and destroy the endothelium*. *Trends Immunol*, 2005. **26**(1): p. 2-5.
40. Lin, S.S., et al., *The role of antibodies in acute vascular rejection of pig-to-baboon cardiac transplants*. *Journal of Clinical Investigation*, 1998. **101**(8): p. 1745-1756.
41. Houser, S.L., et al., *Thrombotic microangiopathy and graft arteriopathy in pig hearts following transplantation into baboons*. *Xenotransplantation*, 2004. **11**(5): p. 416-25.
42. Shimizu, A. and K. Yamada, *Pathology of renal xenograft rejection in pig to non-human primate transplantation*. *Clin Transplant*, 2006. **20 Suppl 15**: p. 46-52.

43. Shimizu, A., et al., *Thrombotic microangiopathic glomerulopathy in human decay accelerating factor-transgenic swine-to-baboon kidney xenografts*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(9): p. 2732-45.
44. Logan, J.S., *Prospects for xenotransplantation*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(5): p. 563-8.
45. Dorling, A. and R.I. Lechler, *T cell-mediated xenograft rejection: specific tolerance is probably required for long term xenograft survival*. Xenotransplantation, 1998. **5**(4): p. 234-45.
46. Cascalho, M., B.M. Ogle, and J.L. Platt, *Xenotransplantation and the future of renal replacement*. J Urol, 2005. **173**(4): p. 1431.
47. Cozzi, E., et al., *Long-term survival of nonhuman primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts*. Transplantation, 2000. **70**(1): p. 15-21.
48. Sandrin, M.S. and I.F. McKenzie, *Recent advances in xenotransplantation*. Curr Opin Immunol, 1999. **11**(5): p. 527-31.
49. Yamada, K., D.H. Sachs, and H. DerSimonian, *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, 1995. **155**(11): p. 5249-56.
50. Mirenda, V., et al., *Achieving Permanent Survival of Islet Xenografts by Independent Manipulation of Direct and Indirect T-Cell Responses*. Diabetes, 2005. **54**(4): p. 1048-1055.
51. Cozzi, E., et al., *Maintenance triple immunosuppression with cyclosporin A, mycophenolate sodium and steroids allows prolonged survival of primate recipients of hDAF porcine renal xenografts*. Xenotransplantation, 2003. **10**(4): p. 300-10.
52. Demetris, A.J., et al., *Pathology of Chronic Rejection: An Overview of Common Findings and Observations About Pathogenic Mechanisms and Possible Prevention*. Graft (Georgetown, Tex.), 1998. **1**(2): p. 52-59.
53. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 503-510.
54. Puga Yung, G., M.K.J. Schneider, and J.D. Seebach, *The Role of NK Cells in Pig-to-Human Xenotransplantation*. J Immunol Res, 2017. **2017**: p. 4627384.
55. Schneider, M.K. and J.D. Seebach, *Current cellular innate immune hurdles in pig-to-primate xenotransplantation*. Curr Opin Organ Transplant, 2008. **13**(2): p. 171-7.
56. Raulet, D.H., R.E. Vance, and C.W. McMahon, *Regulation of the natural killer cell receptor repertoire*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 291-330.
57. Moretta, A., et al., *Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 197-223.
58. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. Trends Immunol, 2001. **22**(11): p. 633-40.
59. Lanier, L.L., *NK cell receptors*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 359-93.
60. Garcia, P., et al., *Human T cell receptor-mediated recognition of HLA-E*. Eur J Immunol, 2002. **32**(4): p. 936-44.
61. Karre, K., *Natural killer cell recognition of missing self*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 477-480.
62. Raulet, D.H., *Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells*. Semin Immunol, 2006. **18**(3): p. 145-50.
63. Khalfoun, B., et al., *Development of an ex vivo model of pig kidney perfused with human lymphocytes. Analysis of xenogeneic cellular reactions*. Surgery, 2000. **128**(3): p. 447-57.
64. Kirk, A.D., et al., *Ex vivo characterization of human anti-porcine hyperacute cardiac rejection*. Transplantation, 1993. **56**(4): p. 785-93.
65. Schneider, M.K.J., P. Forte, and J.D. Seebach, *Adhesive Interactions between Human NK Cells and Porcine Endothelial Cells*. Scandinavian Journal of Immunology, 2001. **54**(1-2): p. 70-75.
66. Dawson, J.R., A.C. Vidal, and A.M. Malyguine, *Natural killer cell-endothelial cell interactions in xenotransplantation*. Immunol Res, 2000. **22**(2-3): p. 165-76.

67. Schuster, I.S., et al., "Natural Regulators": NK Cells as Modulators of T Cell Immunity. *Frontiers in Immunology*, 2016. **7**: p. 235.
68. Arnon, T.I., G. Markel, and O. Mandelboim, *Tumor and viral recognition by natural killer cells receptors*. *Semin Cancer Biol*, 2006. **16**(5): p. 348-58.
69. Jarahian, M., et al., *Modulation of NKp30- and NKp46-Mediated Natural Killer Cell Responses by Poxviral Hemagglutinin*. *PLoS Pathogens*, 2011. **7**(8): p. e1002195.
70. Porgador, A., *Natural cytotoxicity receptors: pattern recognition and involvement of carbohydrates*. *ScientificWorldJournal*, 2005. **5**: p. 151-4.
71. Osman, N., et al., *Combined transgenic expression of  $\alpha$ -galactosidase and  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferase leads to optimal reduction in the major xenoepitope Gal $\alpha$ (1,3)Gal*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997. **94**(26): p. 14677-14682.
72. Klymiuk, N., et al., *Genetic modification of pigs as organ donors for xenotransplantation*. *Mol Reprod Dev*, 2010. **77**(3): p. 209-21.
73. Byrne, G.W., et al., *Histopathologic insights into the mechanism of anti-non-Gal antibody-mediated pig cardiac xenograft rejection*. *Xenotransplantation*, 2013. **20**(5): p. 292-307.
74. Cooper, D.K., *Modifying the sugar icing on the transplantation cake*. *Glycobiology*, 2016. **26**(6): p. 571-81.
75. Zeyland, J., et al., *Transgenic pigs designed to express human  $\alpha$ -galactosidase to avoid humoral xenograft rejection*. *Journal of Applied Genetics*, 2013. **54**(3): p. 293-303.
76. Phelps, C.J., et al., *Production of  $\alpha$ 1,3-Galactosyltransferase-Deficient Pigs*. *Science (New York, N.Y.)*, 2003. **299**(5605): p. 411-414.
77. Kuwaki, K., et al., *Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience*. *Nat Med*, 2005. **11**(1): p. 29-31.
78. Yamada, K., et al., *Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue*. *Nat Med*, 2005. **11**(1): p. 32-4.
79. Leventhal, J.R., et al., *Removal of baboon and human antiporcine IgG and IgM natural antibodies by immunoadsorption. Results of in vitro and in vivo studies*. *Transplantation*, 1995. **59**(2): p. 294-300.
80. Carroll, M.C., *The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity*. *Annu Rev Immunol*, 1998. **16**: p. 545-68.
81. McCurry, K.R., et al., *Human complement regulatory proteins protect swine-to-primate cardiac xenografts from humoral injury*. *Nat Med*, 1995. **1**(5): p. 423-7.
82. Liszewski, M.K., T.W. Post, and J.P. Atkinson, *Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster*. *Annu Rev Immunol*, 1991. **9**: p. 431-55.
83. Cardone, J., G. Le Friec, and C. Kemper, *CD46 in innate and adaptive immunity: an update*. *Clinical and Experimental Immunology*, 2011. **164**(3): p. 301-311.
84. Loveland, B.E., et al., *Characterization of a CD46 transgenic pig and protection of transgenic kidneys against hyperacute rejection in non-immunosuppressed baboons*. *Xenotransplantation*, 2004. **11**(2): p. 171-83.
85. Diamond, L.E., et al., *A human CD46 transgenic pig model system for the study of discordant xenotransplantation*. *Transplantation*, 2001. **71**(1): p. 132-42.
86. Ekser, B., et al., *Clinical xenotransplantation: the next medical revolution?* *Lancet*, 2012. **379**(9816): p. 672-83.
87. Kim, D.D. and W.C. Song, *Membrane complement regulatory proteins*. *Clin Immunol*, 2006. **118**(2-3): p. 127-36.

88. Pierson, R.N., *Current Status of Xenotransplantation*. JAMA : the journal of the American Medical Association, 2009. **301**(9): p. 967-969.
89. Oh, J.Y., et al., *Complement depletion with cobra venom factor delays acute cell-mediated rejection in pig-to-mouse corneal xenotransplantation*. Xenotransplantation, 2010. **17**(2): p. 140-6.
90. Kobayashi, T., et al., *Delayed xenograft rejection of pig-to-baboon cardiac transplants after cobra venom factor therapy*. Transplantation, 1997. **64**(9): p. 1255-61.
91. Pruitt, S.K., et al., *The effect of soluble complement receptor type 1 on hyperacute rejection of porcine xenografts*. Transplantation, 1994. **57**(3): p. 363-70.
92. Bongoni, A.K., et al., *Complement dependent early immunological responses during ex vivo xenoperfusion of hCD46/HLA-E double transgenic pig forelimbs with human blood*. Xenotransplantation, 2014. **21**(3): p. 230-43.
93. Lee, N., et al., *HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(9): p. 5199-5204.
94. Sasaki, H., X.C. Xu, and T. Mohanakumar, *HLA-E and HLA-G expression on porcine endothelial cells inhibit xenoreactive human NK cells through CD94/NKG2-dependent and -independent pathways*. J Immunol, 1999. **163**(11): p. 6301-5.
95. Lilienfeld, B.G., et al., *Transgenic expression of HLA-E single chain trimer protects porcine endothelial cells against human natural killer cell-mediated cytotoxicity*. Xenotransplantation, 2007. **14**(2): p. 126-34.
96. Weiss, E.H., et al., *HLA-E/human beta2-microglobulin transgenic pigs: protection against xenogeneic human anti-pig natural killer cell cytotoxicity*. Transplantation, 2009. **87**(1): p. 35-43.
97. Forte, P., et al., *HLA-E expression on porcine cells: protection from human NK cytotoxicity depends on peptide loading*. Am J Transplant, 2005. **5**(9): p. 2085-93.
98. Matsunami, K., et al., *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, 2002. **73**(10): p. 1582-9.
99. Ulbrecht, M., et al., *Cell surface expression of HLA-E: interaction with human beta2-microglobulin and allelic differences*. Eur J Immunol, 1999. **29**(2): p. 537-47.
100. Abicht, J.M., et al., *Multiple genetically modified GTKO/hCD46/HLA-E/hbeta2-mg porcine hearts are protected from complement activation and natural killer cell infiltration during ex vivo perfusion with human blood*. Xenotransplantation, 2018. **25**(5): p. e12390.
101. Forty, J., D.G. White, and J. Wallwork, *A technique for perfusion of an isolated working heart to investigate hyperacute discordant xenograft rejection*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1993. **106**(2): p. 308-16.
102. Abicht, J.M., et al., *Large-Animal Biventricular Working Heart Perfusion System with Low Priming Volume-Comparison between in vivo and ex vivo Cardiac Function*. Thorac Cardiovasc Surg, 2016.
103. Suckfüll, M., et al., *Immunohistological studies of complement activation after xenogeneic perfusion of a working heart model*. Transplant International, 1994. **7**(5): p. 324-328.
104. Slyker, J.A., et al., *The impact of HIV-1 infection and exposure on natural killer (NK) cell phenotype in Kenyan infants during the first year of life*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 399.
105. Kulkarni, A.G., R.S. Paranjape, and M.R. Thakar, *Higher Expression of Activating Receptors on Cytotoxic NK Cells is Associated with Early Control on HIV-1C Multiplication*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 222.
106. Doudna, J.A. and E. Charpentier, *Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9*. Science, 2014. **346**(6213): p. 1258096.

107. Abicht, J.M., et al., *Complement C3 inhibitor Cp40 attenuates xenoreactions in pig hearts perfused with human blood*. Xenotransplantation, 2017. **24**(1).
108. Tamim, M., et al., *Heparin-coated circuits reduce complement activation and inflammatory response to cardiopulmonary bypass*. Panminerva Med, 1999. **41**(3): p. 193-8.
109. Wendel, H.P. and G. Ziemer, *Coating-techniques to improve the hemocompatibility of artificial devices used for extracorporeal circulation*. Eur J Cardiothorac Surg, 1999. **16**(3): p. 342-50.
110. Ebert, R.E., *Die protektive Wirkung von Quercetin-3-glucuronid bei xenogener Herztransplantation im ex vivo Perfusionsmodell*. 2015.
111. Erhardt, M., *Untersuchung von Veränderungen der Mikrozirkulation in mit Humanblut perfundierten Schweinherzen durch eine hyperakute Abstoßungsreaktion, sowie deren Beeinflussung durch den humanen Komplementregulator hDAF, den GPIIb/ IIIa- Inhibitor Tirofiban und das lösliche  $\alpha$ Gal-Oligosaccharid GAS 914 mittels fluoreszierender Mikrosphären*. 2009.
112. Laird, C.T., et al., *Transgenic expression of human leukocyte antigen-E attenuates GalKO.hCD46 porcine lung xenograft injury*. Xenotransplantation, 2017. **24**(2).
113. Johnson-Leger, C. and B.A. Imhof, *Forging the endothelium during inflammation: pushing at a half-open door?* Cell Tissue Res, 2003. **314**(1): p. 93-105.
114. Pober, J.S. and R.S. Cotran, *The role of endothelial cells in inflammation*. Transplantation, 1990. **50**(4): p. 537-44.
115. Saadi, S. and J.L. Platt, *Transient perturbation of endothelial integrity induced by natural antibodies and complement*. J Exp Med, 1995. **181**(1): p. 21-31.
116. Begum, N.A., et al., *Molecular remodelling of human CD46 for xenotransplantation: designing a potent complement regulator without measles virus receptor activity*. Immunology, 2000. **100**(1): p. 131-139.
117. Huang, J., et al., *Protection of xenogeneic cells from human complement-mediated lysis by the expression of human DAF, CD59 and MCP*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2001. **31**(3): p. 203-9.
118. Wuensch, A., et al., *Regulatory sequences of the porcine THBD gene facilitate endothelial-specific expression of bioactive human thrombomodulin in single- and multitransgenic pigs*. Transplantation, 2014. **97**(2): p. 138-47.

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

München, den 06.10.2021

Katja Gahle

.....

.....

Ort, Datum

Unterschrift

## Danksagung

Mein Dank gilt all denjenigen, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben, sei es in fachlicher Hinsicht oder durch Ratschläge, Motivation und Ablenkung.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Jan Abicht, meinem Doktorvater und Betreuer, für seine fortwährende Unterstützung in allen Bereichen dieser Arbeit, seien es die langen Stunden im Labor oder die Unterstützung bei der Zusammentragung und Auswertung der Ergebnisse. In gleichem Maße danken möchte ich Frau Dr. med. vet. Tanja Mayr, die einen maßgeblichen Beitrag zur Entstehung der Ergebnisse hatte und für jedes Problem stets eine Lösung wusste.

Herrn Prof. Dr. med. Bruno Reichart gilt mein vornehmlicher Dank für die Leitung und Koordination des Sonderforschungsbereichs "Biologie der xenogenen Zell- und Organtransplantation".

Zugleich danke ich Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler für die Vergabe des Dissertationsthemas und Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Pohl für die Überlassung der Räumlichkeiten und Ausstattung zur Durchführung meiner Versuche im Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Bei meinen Mitdoktoranden Fabian Werner und Isabelle Lutzmann bedanke ich mich herzlich für deren Hilfe und kollegiale, freundschaftliche Zusammenarbeit.

Bei der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Robert Rieben der Universität Bern möchte ich mich herzlich für die Zusammenarbeit und Überlassung der Daten zur Immunfluoreszenz bedanken.

Mein Dank gilt außerdem allen, die zur Durchführung und Auswertung der Versuche beigetragen haben, den Ärzten der Herzchirurgischen Klinik sowie dem Personal des Instituts für Chirurgische Forschung.

Schließlich geht ein ganz besonderer Dank an meine Familie und meine Freunde, allen voran an meine Eltern, die mich immer bedingungslos unterstützt haben, an meine Geschwister Kristina und Stefan und meinen Freund Martin.