

# Geneettisesti muokatut siat ihmisen siirtoelinten luovuttajina

TkK-tutkielma

Turun yliopisto

Bioteknologian laitos

Biotekniikka

4/2024

Ester Pöyhtäri

(TURNIT SIVU)

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

ESTER PÖYHTÄRI: Geneettisesti muokatut siat ihmisen siirtoelimen luovuttajina

Tutkielma, 19 s.

Biotekniikka

Huhtikuu 2024

TURNIT TEKSTI TÄHÄN

Ksenotransplantaatio tarkoittaa eläimen elinten ja kudosten siirtoa ihmisiin. Ensimmäiset raportoidut ksenotransplantaatiot suoritettiin 1960-luvulla, kun simpanssilta siirrettiin munuaiset ja sydän kahteen potilaaseen. Sikaan elinluovuttajana päädyttiin simpanssien uhanalaisuuden vuoksi. Sika ja ihminen ovat fylogeneettisesti kaukana toisistaan, minkä vuoksi ensimmäiset ksenotransplantaatiot eivät olleet menestyksekkäitä. Merkittävimmiksi haasteiksi havaittiin hylkimisreaktiot, tulehdukset ja hyytymishäiriöt sekä zoonoosipatogeenisten mikro-organismien leviämisen riski.

Haasteisiin on kehitetty ratkaisuja CRISPR/Cas9-geenitekniikan avulla. Kyseisellä tekniikalla muokattuja sikoja kutsutaan GTKO-sioiksi. CRISPR/Cas9:än avulla GTKO-siasta on hiljennetty glykoproteiini  $\alpha$ -1,3-galaktosyyli transferaasi 1 -geeni hylkimisreaktion estämiseksi. Ihmisen tulehdusta sääteleviä geenejä on viety sian genomiin, mikä on vähentänyt tulehdusreaktioita ja hyytymishäiriöitä. Zoonoosipatogeenit on hiljennetty RNA-interferenssitekniikan avulla. GTKO-siat suunnitellaan perinteisesti tumansiirtotekniikalla, jossa käytetään sian sikiön fibroblastisolujen tumia. Tumat siirretään sian munasoluihin, joista alkuperäiset tumat on poistettu ja näin syntyy transgeenisia alkioita.

Ksenotransplantaatioita on suoritettu GTKO-sioilla rajoitetusti ja geneettiset muutokset eivät ole toistaiseksi antaneet tarvittavaa vastetta kliiniseen käyttöön. GTKO-siat tuovat toivoa ksenotransplantaatioille ja siirteiden selviytymisajan uskotaan paranevan tulevaisuudessa.

Avainsanat: Ksenotransplantaatio, GTKO-sika, CRISPR/Cas9, hylkimisreaktio, tulehdusreaktio, hyytymishäiriö, zoonoosipatogeeni

# Sisällys

1 Johdanto .....	1
2 Geneettinen muokkaus .....	2
2.1 Geneettisen muokkauksen periaatteet .....	2
2.2 CRISPR/Cas9 .....	4
3 Immunologia .....	7
3.1 Sika elinluovuttajana .....	7
3.2 Ksenotransplantaation haasteet .....	8
3.3 Ratkaisuja ksenotransplantaation haasteisiin .....	10
4. Ksenotransplantaatio .....	13
4.1 Siirtoelimet .....	13
4.2 Esimerkkitapaus sydän- ja munuaissiirrosta .....	15
5 Yhteenveto .....	16
6 Kirjallisuus .....	17

# 1 Johdanto

Vuonna 2022 suoritettiin 42800 elinsiirtoleikkausta. Potilaan osalta leikkaus on yksinkertaisin vaihe elinsiirtoprosessista, sillä todellinen uhka on elinten löytyminen. Maailman terveysjärjestön arvion mukaan maailmanlaajuisesta elinten tarpeesta alle kymmenen prosenttia täyttyy. U.S. Department of Health & Human Services arvion mukaan elinsiirtojonoon lisätään ihminen joka kymmenes minuutti ja joka päivä 17 ihmistä menehtyy, sillä elinten määrä ei yllä kysyntään. Elinten kysyntä kasvaa päivittäin, minkä vuoksi ratkaisua on kehitelty vuosikausia ja yksi mahdollinen on ksenotransplantaatio (Sauer 2023.)

Ksenotransplantaatio tarkoittaa eläinten elinten ja kudosten siirtoa ihmisiin. Ensimmäisiä raportoituja leikkauksista tehtiin 1960-luvun alussa, kun elinsiirto suoritettiin simpanssilta ihmiselle. Potilas selvisi yhdeksän kuukautta simpanssin munuaisella. Seuraavassa tapauksessa siirrettiin sydän simpanssilta ihmiselle, mutta leikkauksen avulla elinikä pitenei vain kaksi tuntia. Simpanssien uhanalaisuus muodostui ongelmaksi, minkä vuoksi tilalle oli löydettävä toinen luovuttajaeläin. Paviaanien uskottiin olevan hyvä vaihtoehto, mutta niidenkin kohdalla lajin uhanalaisuus oli ongelma (Hardy ja Chavez 1968; Sykes ja Sachs 2019.)

1980-luvulla kiinnostus ksenotransplantaatioihin heräsi taas, kun havaittiin kehittyneiden immunosuppressiivisten lääkkeiden vaikutus allogeenisiin transplantaatioihin. Elinluovuttajina käytettiin jälleen paviaaneja, mutta koska potilaiden eloonjäämisajat vaihtelivat 20–70 päivän välillä, päädyttiin etsimään vähemmän ongelmallista luovuttajaeläintä. 1990-luvun puolivälissä useimmat tutkijat olivat yhtä mieltä siitä, että sika olisi sopiva luovuttajaeläin koon, saatavuuden, lisääntymisominaisuuksien ja fysiologisten samankaltaisuuksien vuoksi (Sykes ja Sachs 2019.)

Suurimpana haasteena leikkauksille on hyperakuutti hylkimisreaktio (HAR), joka muodostuu, kun ihmisen vasta-aineet sitoutuvat siirtoelimen solupinnan galaktoosi- $\alpha$ -1,3-galaktoosin ( $\alpha$ -1,3-Gal) -epitoppeihin. Muita haasteita ovat zoonoosipatogeenisten mikro-organismien leviäminen ihmisiin sekä hyytymishäiriöt ja tulehdukset. Geeniteknologian sekä sian immuunijärjestelmän ja hylkimisreaktioiden ymmärryksen lisääntymisen myötä haasteisiin on osittain onnistuttu luomaan ratkaisuja, mikä mahdollistaa sian luovuttajaeläimeksi (Sykes ja Sachs 2019.)

Tämän tutkielman tarkoituksena on perehtyä sikaan ihmisen elinluovuttajana ja niihin molekyyli-tason geneettisiin muutoksiin, joita sikoihin on tehty elinluovutuksen onnistumisen parantamiseksi. Tutkielmassa käydään läpi mitä geneettinen muokkaus on ja mitä eri tapoja on muokata geenejä, etenkin sian kohdalla. Lisäksi avataan ksenotransplantaation esteitä, niiden mahdollisia ratkaisuja ja kahta esimerkkitapausta, joissa on suoritettu sydämen ja munuaisten ksenotransplantaatio.

## 2 Geneettinen muokkaus

### 2.1 Geneettisen muokkauksen periaatteet

Geneettinen muokkaus mahdollistaa elävän organismin perimän muokkauksen erittäin tarkasti. Jotta geneettinen muokkaus on mahdollista, on hallittava hyvin perusteellisesti molekyylibiologiaa ja genomiikan perusteet. Geneettinen muokkaus perustuu biologisten molekyylien, tutkielman tapauksessa DNA:n, muokkaukseen. DNA eli deoksiribonukleiinihappo on polymeeri, joka koostuu kolmesta osasta: sokerista, eli deoksiriboosista, emäksestä ja fosfaatista. Nämä kolme osaa muodostavat yhden nukleotidin ja eri nukleotidit liittyvät toisiinsa 3'-5' fosfodiesterisidoksin. Nukleotidit muodostavat DNA-nauhoja ja kaksi antiparaleellista DNA-nauhaa muodostavat kaksoiskiirteen, jossa emästen välille muodostuu vetysidoksia. Geneettisen muokkauksen kohteena ovat DNA:n emäkset, eli adeniiini, tymiini, guaniini ja sytosiini ja niiden välille muodostuvat vetysidokset. Kaksoiskierteessä emäspareina toimivat adeniiini ja tymiini, joiden väliin muodostuu kaksi vetysidosta sekä guaniini ja sytosiini, joiden välille muodostuu kolme vetysidosta (Watson ja Crick 1953.)

Eläinsolussa genomit jakaantuvat tuman ja mitokondrion välille. Tumassa lineaariset DNA-molekyylit ovat pakkautuneet kromosomeiksi, jotka koostuvat DNA:n lisäksi histoni-proteiineista. Jotta kromosomi toimii, on siinä oltava sentromeereja ja telomeereja. Sentromeerit vastaavat sisarkromatidien kiinnittämisestä toisiinsa ja niiden rooli on tärkeä solun jakautumisen aikana. Telomeerit ovat kromosomien päissä olevia DNA-sekvenssejä, jotka suojaavat kromosomien päitä ja estävät niiden lyhentymisen

solun jakautumisen aikana. Mitokondrion genomit ovat usein rengasmaisia. Nisäkkäillä mitokondrion genomit ovat pieniä ja niiden geenit koodaavat transkriptio- ja translaatiokoneistojen osia sekä hengitysketjun proteiini-komplekseja.

Geneettisen muokkauksen peruseriaatteet liittyvät tarkemmin DNA:n emäksiin ja tavoitteena on tehdä tarkkoja muutoksia, jotka vaikuttavat geenien toimintaan halutulla tavalla. Perinteisesti geneettinen muokkaus on tapahtunut mutaation vaikutuksesta, esimerkiksi spontaanisti solun jakautuessa. Mutaatio ei automaattisesti tarkoita ongelmaa, sillä ne ovat olleet esimerkiksi evoluution kannalta tärkeitä lajien sopeutumisessa ympäristöön. Mutaatiot voivat kuitenkin olla myös huonoja ja johtaa sairauksiin. Syöpä johtuu usein mutaatiosta, jolloin tietty geeni voi aktivoitua ja alkaa jakautua kontrolloimattomasti.

Mutaatioiden tullessa tunnetummiksi ja niitä tutkimalla 1900-luvun puolivälissä osoitettiin, että mutaatioiden syntyyn ja nopeuteen voi vaikuttaa säteilyllä ja kemiallisella käsittelyllä (Auerbach ja muut 1947). Seuraavat menetelmät perustuivat transposoni-insertioihin organismeihin, mutta ongelmana tässä sekä aiemmissa säteily- ja kemiallisessa käsittelyssä oli se, että aiheutuvat muutokset tapahtuvat satunnaiseen kohtaan genomia. Ensimmäiset kohdistetut genomimuutokset tehtiin 1970-luvulla hiivassa ja 1980-luvulla hiiressä. Molemmissa tapauksissa geeniin kohdistaminen riippui homologisesta rekombinaatiosta, joka oli hyvin tarkka, mutta etenkin hiiren kohdalla hyvin tehoton. Muihin lajeihin päästiin siirtymään tekniikan kehittyessä ja muun muassa CRISPR/Cas9:n kehittyessä (Carroll 2017.)

Aluksi sikoihin tehtiin mutaatioita jalostuksen kautta, mutta tämä oli hidasta ja vaikeaa ja modifikaatiot erottuivat yksilöittäin. Seuraavaksi kokeiltiin siirtää kolme vektoria sian soluihin. Kyseiset vektorit sisälsivät ihmisen sekvenssejä. Tämä lähestymistapa johti vektorien siirtymiseen yhteen kromosomaaliseen lokukseen ja solut, joissa havaittiin korkea komplementtisäätelijöiden ilmentymien, valittiin käytettäviksi sikojen lisääntymiseen somaattisella solusiirrolla. CRISPR/Cas9:n kehittyessä sen eduksi havaittiin samanaikainen kyky hiljentää geenejä ja lisätä geenejä sian genomiin (Kemter ja muut 2020)

## 2.2 CRISPR/Cas9

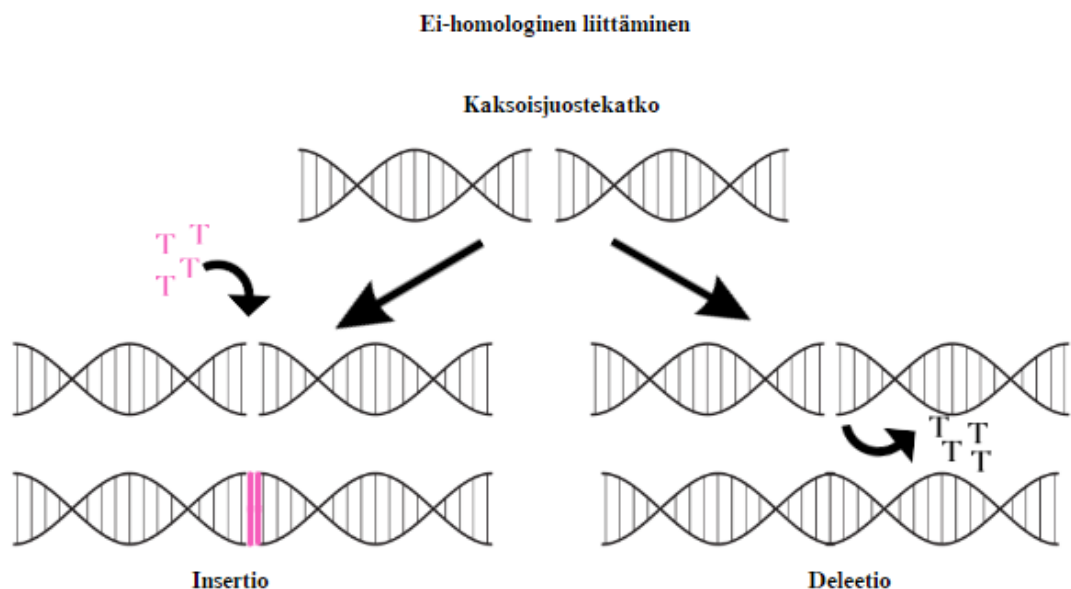
Viime vuosikymmenen aikana on syntynyt uusi lähestymistapa tutkijoille muokata geenejä ja nämä tekniikat perustuvat muokattuihin nukleaaseihin. Muokatut nukleaasit koostuvat sekvenssispesifisistä DNA:ta sitovista domeeneista, jotka on fuusioitu epäspesifiseen DNA:n katkaisumoduliin. Kyseiset nukleaasit mahdollistavat tehokkaita ja tarkkoja geneettisiä muokkauksia indusoimalla soluun kohdennettuja DNA:n kaksioisjuostekatkoja, joiden tehtävä on stimuloida solun DNA:n korjausmekanismeja. Tekniikan käyttöä helpottaa DNA:ta sitovien domeenien ohjattavuus. Domeenit ovat peräisin efektoriproteiineista (Gaj ja muut 2013.) Tämän hetken kärkipaikkoja geenimuokkauksessa pitävät sinkkisorminukleaasit, transkription aktivaattorin kaltaiset efektorinukleaasit ja CRISPR/Cas9:n RNA ohjatut nukleaasit. Kaikki tekniikat toimivat samalla periaatteella, jossa DNA:ta leikataan halutusta kohdasta. Leikkauksen jälkeen solu pyrkii korjaamaan kohdan ja tämän seurauksena voi tapahtua geenin inaktivointi tai uuden geenimateriaalin lisääntyminen. Korjausmekanismi toimii siten, että solut havaitsevat kaksoisjuostekatkot mahdollisina tappavina vaurioina ja aktivoivat mekanismeja niiden korjaamiseksi (Carroll ja Beumer 2014.)

CRISPR on lyhenne sanoista Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats ja Cas9 puolestaan sanoista CRISPR Associated System number 9. CRISPR/Cas9:n pääosat ovat Cas9-entsyymi ja opas-RNA (gRNA). gRNA on 20 emäsparia lyhyt RNA-sekvenssi, joka sitoutuu komplementaaristi haluttuun DNA-sekvenssiin. Cas9 on endonukleaasi, joka leikkaa DNA:ta. Se koostuu useasta domeenista, joilla on erilaiset toiminnot. gRNA toimii Cas9:n oppaana haluttuun kohtaan, jossa Cas9 leikkaa DNA:ta. Tämän jälkeen solun korjausmekanismi aktivoituu ja korjaa leikatun kohdan (Carroll ja Beumer 2014; Gaj ja muut 2013; Hille ja Charpentier 2016)

Ensimmäisessä vaiheessa Cas9 etsii DNA-molekyylistä sopivaa motiivia, PAM-sekvenssiä (protospacer adjacent motif), joka koostuu kolmesta emäksestä. Cas9:n PAM-sekvenssi on NGG. Tämä tarkoittaa, että ensimmäinen emäs voi olla mikä vain DNA:n neljästä emäksestä ja kaksi seuraavaa ovat guaniineja. Kun Cas9 havaitsee PAM:n DNA-sekvenssistä, se pysähtyy. Seuraavaksi yksi entsyymien domeeneista avaa kaksoisjuosteen, minkä jälkeen Cas9:n liitetty gRNA pyrkii sitoutumaan PAM:n DNA-sekvenssiin. Kaikkien 20 emäksen täytyy sopia DNA-sekvenssiin, muuten Cas9 irrottautuu ja etsii



uuden PAM:n. Jos kaikki gRNA:n emäkset ovat komplementaarisia, leikkaa Cas9 poikki molemmat DNA-nauhat ja syntyy kaksoisjuostekatko. Leikkaus tehdään kolme emästä PAM:n yläpuolelta 5'-suuntaan. Kun DNA-nauhat vahingoittuvat, solun korjausmekanismit aktivoituvat. Soluilla on kaksi erilaista tapaa korjata nämä leikkaukset ja ne voivat johtaa erilaisiin mutaatioihin. Yleisin korjausmekanismi on ei-homologinen liittäminen (Kuva 1.). Kyseinen korjausmekanismi voi tapahtua missä tahansa kohtaa solusykliä ja sen toimintamekanismi on yhdistää katkenneet DNA-ketjut. Jos korjaus on täydellinen, leikkaa Cas9 DNA-sekvenssiä uudelleen, kunnes korjaus ei ole täydellinen ja syntyy mutaatio. Tällöin gRNA ei ole enää komplementaarinen ja Cas9 irrottautuu. Mutaatiota kutsutaan insertioksi, mikäli nauhaan tulee uusia emäspareja ja deleetioksi, mikäli emäspareja katoaa. Tämän seurauksena lukukehys siirtyy riippuen siitä, tapahtuuko insertio vai deleetio. Tämä johtaa siihen, että sekvenssissä tulee nopeasti vastaan lopetuskodoni, joka lopettaa transkription. Harvinaisempi korjausmekanismi on nimeltä homologi-ohjattu korjaaminen. Korjaus voi tapahtua vain tietyissä solusyklin vaiheissa, S-vaiheessa ja G2-vaiheessa. S-vaihe on DNA:n replikaation vaihe ja G2-vaihe on DNA:n eheyden varmistamisen vaihe ennen solun jakautumista (Bhatia ja muut 2023; Cui ja muut 2019; Hille ja Charpentier 2016; Li ja muut 2019; Ryczek ja muut 2021)



Kuva 1. Ei-homologinen liittäminen on yleisin korjausmekanismi. Katkenneet DNA-ketjut yhdistetään, ja jos nauhaan lisätään emäspareja, kutsutaan mutaatiota insertioksi. Vastaavasti jos nauhasta katoaa emäspareja, kutsutaan mutaatiota deleetioksi. Muokattu lähteestä (Cui ja muut 2019).

CRISPR/Cas9:n komponenttien siirto soluun on haastava sekä monivaiheinen tehtävä ja siihen löytyy kolme tapaa: virus, ei-virusperäinen tapa ja mekaaninen tapa. Virukset ovat hyvä tapa komponenttien siirtoon, sillä ne tunkeutuvat soluun tehokkaasti. Virus tarttuu solun pinnalla oleviin reseptoreihin ja kulkeutuu soluun esimerkiksi kalvojen fuusion kautta. Tämän jälkeen vapautunut virusgenomi käyttää solujen resursseja replikoidakseen itseään ja infektoidakseen muita soluja (Bhatia ja muut 2023.) Viruksen replikaatiosta vastaava rep-geeni on korvattu siirtogeenillä ja siten virus kykenee edelleen tunkeutumaan soluun sekä indusoimaan siirtogeenin ilmentymistä. Virus ei kuitenkaan kykene enää lisääntymään solussa ja levitä infektoimaan muita soluja (Bhatia ja muut 2023.)

Ei-virusperäiset tavat CRISPR/Cas9:n siirtoon ovat nanosiirtometodeja. Tämä tarkoittaa siirtoa esimerkiksi lipidinanopartikkelien, eli liposomien ja lipidonanohiukkasten, avulla. Liposomit ovat hyvin suosittu ryhmä geenikantajina CRISPR/Cas9:lla, sillä ne ovat kationisia, biohajoavia ja biologisesti yhteensopivia. Lipidonanopartikkeleita voidaan hyödyntää *in vitro*, *in vivo* ja *ex vivo* (Bhatia ja muut 2023.)

Mikroinjektio on perinteinen esimerkki mekaanisesta transfektiosta, jossa geeni injektoidaan soluun ohuen kapillaarin avulla. Neula lävistää solukalvon, jolloin komponentit kulkeutuvat tehokkaasti suoraan tumaan. Mikroinjektion etuna on, että menetelmällä voidaan kuljettaa mitä tahansa molekyylipainoista lastia sytoplasmaan tai tumaan. Tekniikka on hidas, koska injektio on suoritettava hyvin huolellisesti, jotta solut säilyvät elinkelpoisina (Fajrial ja muut 2020.)

Eri geeninmuuntelutekniikoista tehokkaimmaksi tavaksi muokata sian genomia on todettu CRISPR/Cas9. Ensimmäiset kyseisellä tekniikalla geenimuunnellut siat syntyivät vuonna 2015. Sioista hiljennettiin GGTA1-, CMAH- ja  $\beta$ -4GalNT2-geenit, jotta HAR:n riski saatiin minimoitua. HAR on hylkimisreaktio, joka voi syntyä minuuteissa elinsiirron yhteydessä ja johtaa lopulta elimen kuolemaan. Kyseisten geenimuunteluiden todistettiin vähentävän paviaanien ja simpanssien IgM:n ja IgG:n sitoutumista sian perifeerisiin mononukleaarisoluihin jopa 90 %. Seuraavista geenimuunnelluista sioista hiljennettiin GGTA1-, CMAH- ja iGb3S-geenit. Kyseisten geenimuunteluiden todistettiin taas vähentävän ihmisen IgG:n ja IgM:n sitoutumista siirtoelimiin (Ryzyk ja muut 2021.)

Vuonna 2016 syntyi monisiirtogeenisiä sikoja, joilta oli hiljennetty GGTA1- ja CMAH-geenit sekä lisätty ihmisen CD46-, CD55-, CD59-, A20- ja HO1-geenit. Vuonna 2018

syntyi sikoja, joilta hiljennettiin ULBP1-geeni. Vuonna 2020 tehtiin merkittävimmät muunnokset sian genomiin CRISPR/Cas9:n avulla. Näiltä yksilöiltä hiljennettiin neljä geeniä, GGTA1-, CMAH-,  $\beta$ -4GalNT2- ja  $\beta$ -2M-geenit, sekä lisättiin viisi ihmisen geeniä, CD46-, CD55-, CD59-, H01- ja A20-geenit. Näytteille suoritettiin *in vitro* ihmisen komplementin aktivaatiotestejä, jotka osoittivat selvästi vähentyneen affiniteetin IgG:n ja IgM:n sekä sian munuaissolujen välillä (Ryczek ja muut 2021.)

## 3 Immunologia

### 3.1 Sika elinluovuttajana

Kun ksenografteja alettiin harkitsemaan elinvajeen ratkaisuksi, pidettiin parhaana vaihtoehtona kädellisiä. Fylogeneettisesti lähimpänä ihmistä ovat simpanssit ja simpanssin elimiä käyttäen tehtiin sekä ensimmäinen sydän- että munuaissiirto ihmiseen. Simpanssien uhanalaisuuden vuoksi kokeita ei kuitenkaan voitu jatkaa. Seuraava vaihtoehto oli paviaanit, mutta niillä saatavuuden lisäksi ongelmana oli koko. Paviaanit ovat liian pieniä toimimaan elinluovuttajina, sillä jopa suuri kokoisin paviaani painaa alle 40 kg ja niiden elimet ovat aikuiselle ihmiselle liian pieniä (Sachs 1994.)

Sika on anatomisesti ja fysiologisesti hyvin lähellä ihmistä. Tämän vuoksi sikoja, etenkin *Sus scrofa domestica*, pidetään potentiaalisina elinluovuttajina (Hryhorowicz ja muut 2017.) Sikojen etuja ovat niiden rajaton saatavuus, ihmisen elimiä vastaava elinten koko, lisääntymisominaisuudet sekä fysiologiset ja immunologiset samankaltaisuudet ihmisen kanssa (Sachs 1994.) Lisäksi siat ovat ruokailutottumuksellisesti sekä munuaisten ja keuhkojen rakenteen, toiminnan ja sepelvaltimoiden jakautumisen suhteen ihmisen kaltaisia (Borek 1987.) Naarassiat saavuttavat sukukypsyyden 5–7 kuukauden iässä ja saavat ensimmäiset porsaat noin vuoden ikäisinä. Sioilla on kiima noin kolmen viikon välein ja yhdellä kerralla voi syntyä 5–12 porsasta (Geisert ja Lucy 2018.)

Sikoja käytetään yleisesti kardiovaskulaarisessa tutkimuksessa, sillä siat ja ihmiset jakavat tärkeitä anatomisia ja fysiologisia ominaisuuksia. Tämä on mahdollista, sillä sian ja ihmisen sydämet ovat suunnilleen samaa kokoa. Lisäksi sepelvaltimon verenvirtaus, hemodynaaminen ja sydänlihaksen supistumiskyky sekä ateroskleroosin kehitys ovat

vastaavia ihmisen kanssa. Sikoja hyödynnetään myös ravitsemustutkimuksissa, sillä niiden ruoansulatus vastaa ihmisten ruoansulatusta. Siat ovat kaikkiruokaisia ja kuluttavat helposti eri ravintolisiä ja testiaineita (Swindle ja muut 1994.)

### 3.2 Ksenotransplantaation haasteet

Ihmisen ja sian välillä on huomattava fylogeneettinen etäisyys, minkä vuoksi ksenotransplantaatioissa on kolme merkittävää ongelmaa. Nämä ovat immuunihyljintä, tulehdukset ja hyytymishäiriöt sekä zoonoosipatogeenisten mikro-organismien leviäminen (Niu ja muut 2021.)

Ihmisen immuunipuolustusmekanismi suojaa ihmistä vaaroilta, joita puolustusjärjestelmä havaitsee. Kun potilas saa elinsiirteenä toisen potilaan elimen, kokee vastaanottajan immuunijärjestelmä elimen vieraana. Immuunijärjestelmä aloittaa hyökkäyksen elintä vastaan ja tätä immunologista vastetta kutsutaan immuunihylkimisreaktioksi. Hylkimisreaktioita on kolme eri päätyyppiä: hyperakuutti hylkimisreaktio (HAR), akuutti hylkimisreaktio ja krooninen hylkimisreaktio. Reaktioista HAR on vaarallisin ja tapahtuu ensimmäisen 24 tunnin sisällä. Se johtaa elinten hylkäämiseen, tromboosiin, turvotukseen ja lopulta nekroosiin. Akuutti hyljintä ilmenee yleensä muutamien viikkojen tai kuukausien päästä transplantaatiosta ja oireina on kuumetta, siirtokohdan turvotuskipua sekä siirretyn elimen toimintahäiriötä. Krooninen hyljintä ilmenee muutamien kuukausien tai vuosien päästä transplantaatiosta. Krooniselle hyljinnälle ominaista on elimen toiminnan heikkeneminen ja lopulta elimen menetys (Niu ja muut 2021.)

Ksenotransplantaatioiden immuunihylkimisreaktiot ovat samantapaisia kuin allotransplantaatioissa. Erona transplantaatioissa on se, että ksenotransplantaatioissa solupinnalta löytyy enemmän vieraita komponentteja, jotka saavat aikaan voimakkaan vasteen isännässä (Niu ja muut 2021.) HAR muodostuu, kun ihmisen vasta-aineet sitoutuvat siirtoelimeen. Kyseisistä vasta-aineista useimmat IgG ja IgM tunnistavat  $\alpha$ -1,3-Gal:n jäänteitä glykoproteiineilta ja glykolipideiltä.  $\alpha$ -1,3-Gal:a ei löydy ihmiseltä, sillä ihmiseltä puuttuvat  $\alpha$ -1,3-Gal-epitootit. Tämä on seurausta mutaatiolle glykoproteiini- $\alpha$ -

1,3-galaktosyyli transferaasi-1-geenissä (GGTA1), jolloin geeni on menettänyt toimintakykynsä (Zhou ja muut 2022.)

Kun ksenotransplantaation aikana ihminen saa siirtoelimen, hänen vasta-aineensa sitoutuvat siirtoelimen  $\alpha$ -1,3-Gal:n epitooppeihin. Tällöin komplementtikomponentin 3b tuotanto käynnistyy, komplementit aktivoituvat ja kalvoihin hyökkäävä kompleksi muodostuu. Reaktiot johtavat endoteelisolujen hajoamiseen, verisuonien tuhoutumiseen ja lopulta siirteen hylkimiseen. Endoteelisolujen hajoaminen johtaa verenvuotoon, kudosiskemiaan ja lopulta nekroosiin. Hylkimisreaktioon vaikuttaa lisäksi kapillaarien tromboottinen tukos, valtimon seinämien fibrinoidinekroosi ja neutrofiilien kertyminen. Myös typpioksidilajit, reaktiiviset happilajit ja muut vapaat radikaalit vaikuttavat reaktioon (Zhou ja muut 2022.) HAR:lle ominaisia piirteitä ovat verisuonten eheyden häiriintyminen, turvotus, runsaasti fibrilliini-pitoiset verihiutaleet sekä interstitiaalinen verenvuoto, johon liittyy myös verisuonten seinämiin kerääntyneet immunoglobuliini- ja terminaalikomplementtituotteet (Zhou ja muut 2022.)

Viivästyneen hylkimisreaktion vauriot esiintyvät verisuonistossa ja niihin liittyy vasta-aineita. Komplementeilla on hyvin vähäinen rooli reaktioissa. Viivästyneelle hylkimiselle on ominaista merkittävä iskemia ja diffuusi intravaskulaarinen koagulaatio. Tätä välittävät humoraaliset ja solunsisäiset immuunivasteet, joiden aktivoinnista seuraa endoteelisolujen aktivaatio ja liiallinen tulehdus (Zhou ja muut 2022.)

Tulehdusreaktiot ja hyytymishäiriöt ovat toinen merkittävä ongelma ksenotransplantaatioissa. Tulehdus havaitaan lisääntyneillä tulehdusmarkkereilla, eli C-reaktiivisella proteiinilla, histoneilla, sytokiineilla ja hemokiineilla. Ksenotransplantaation jälkeen vastaanottajalla havaitaan usein vuorovaikutusta tulehduksen, koagulaation ja immuunivasteen välillä. Tulehdus edistää verihiutaleiden aktivaatiota ja kasautumista, mikä johtaa hyytymishäiriöihin ja lisääntyneeseen adaptiiviseen immuunivasteeseen (Niu ja muut 2021.)

Hyytymishäiriöillä on myös suuri osallisuus siirteiden epäonnistumisessa. Koagulaatioon liittyy vuorovaikutus verihiutaleiden, hyytymistekijöiden, endoteelisolujen ja muiden verisolujen kanssa. Ksenotransplantaatioissa veritulppien kehityksessä verihiutaleiden aktivaatio on tärkeä tekijä. Verihiutaleet voivat aktivoitua vasta-aineilla, komplementeilla

ja useilla molekyyileillä. Tämän lisäksi molekyylien yhteensopimattomuus lisää tromboosia (Niu ja muut 2021.)

Kolmantena ongelmana on zoonoosipatogeenisten mikro-organismien leviämisen riski lajien välillä ja etenkin endogeenisten retrovirusten (PERV) leviäminen. PERV:n provirus-DNA:t ovat osa sian genomia, mikä mahdollistaa sen siirtymisen toiseen lajiin. Zoonoottisiin mikro-organismeihin, paitsi PERV:iin, voidaan vaikuttaa määrättyllä tai määritetyllä jalostuksella. PERV:t ovat  $\gamma$ -retrovirusia ja niillä on kolme alalajia: PERV-A, PERV-B ja PERV-C. PERV-A- ja PERV-B-alalajeja löytyy kaikista sioista, mutta PERV-C-alalajia vain osasta. Lisäksi sikarodun mukaan PERV-kopioiden määrä vaihtelee 1–100 kopion välillä, mikä tekee sen hävittämisestä haastavaa. Muiden  $\gamma$ -retrovirusten tavoin PERV:n pelätään aiheuttavan ihmisessä immuunipuutoksia ja kasvaimia (Niu ja muut 2021.)

*In vitro*-kokeet ovat osoittaneet, että PERV voi siirtyä sialta ihmissoluun ja ihmissolulta toiselle. Kokeessa PERV siirtyi immortalisoidusta sian epiteelisolulinjasta ihmisen alkion munuaissoluihin, jotka olivat vihreällä fluoresoivalla proteiinilla leimattuja. Solulinjoja kasvatettiin yhdistettyinä viikko, jonka jälkeen seurattiin, pysyvätkö PERV-alalajit aktiivisina ja kykenevätkö ne lisääntymään soluissa. Yhteensä tarkkailua tehtiin yli neljä kuukautta ja määrittely suoritettiin pisaradigitaalipolymeraasiketjureaktiolla. Havaittiin, että alatyyppejä PERV-A ja PERV-B löytyi soluista, mutta PERV-C:tä ei löytynyt kummastakaan alkuperäissolulinjasta. Tämä vahvistaa, että PERV-A ja PERV-B ovat ihmisille tropillisia, eli ne voivat tunkeutua, infektoida tai olla läsnä ihmisen soluissa (Niu ja muut 2017.)

### 3.3 Ratkaisuja ksenotransplantaation haasteisiin

Ksenotransplantaatioiden ensimmäinen immunologinen este on HAR. Pääasiallisena syynä HAR:lle on ihmisen ennalta muodostuneet vasta-aineet siirtoelimen solupinnan  $\alpha$ -1,3-Gal-epitopeille. Ihmistä kiertävästä IgG:stä 1 % koostuu luonnollisista vasta-aineista  $\alpha$ -1,3-Gal:lle (Niu ja muut 2021.) Lisäksi noin 1 % ihmisen B lymfosyyteistä kykenevät tuottamaan vasta-aineita  $\alpha$ -1,3-Gal:lle. (Galili ja muut 1993)

GGTA1 on geeni, joka vastaa  $\alpha$ -1,3-Gal:n synteesistä. Toiminnassa olevia GGTA1-geenejä löytyy useimmista nisäkkäistä, poissulkien ihmiset ja vanhan maailman häntäapinat. Sekä ihmisen että vanhan maailman häntäapinan verestä löytyy anti-Galia, joka on  $\alpha$ -1,3-Gal:n vasta-aine (Galili ja muut 1984.) Kun anti-Gal:in tajuttiin vaikuttavan suuresti HAR:n, alkoi GGTA1:en perusteellinen tutkimus. (Niu ja muut 2021)

Ennen vuotta 2002  $\alpha$ -1,3-Gal-epitootit peitettiin sian solujen pinnalta kolmella eri tavalla. (Niu ja muut 2021) Ensimmäinen tapa on ilmentää endo- $\beta$ -galaktosidaasi-C:ä sian soluissa. Kyseessä on entsyymi, joka katalysoi  $\alpha$ -1,3-Gal-disakkaridien poistamista  $\alpha$ -1,3-Gal-epitoopeista katkaisemalla  $\alpha$ -1,3-Gal-sidoksen. Endo- $\beta$ -galaktosidaasi-C-geeni kykenee vähentämään tehokkaasti  $\alpha$ -1,3-Gal-antigeeniä, mutta ei kokonaan (Ogawa ja muut 2002.)

Toinen tapa on muokata solun pinnalla olevia oligosakkarideja H-transferaasientsyymillä, jolla on sama substraattispesifisyys kuin GGTA1:llä. Entsyymi toimii siten, että se tukahduttaa  $\alpha$ -1,3-Gal-epitootin muodostumisen katalysoimalla yhteisen substraatin fukosylaatiota, jolloin GGTA1 ei pääse galaktosyloimaan sitä (Niu ja muut 2021.)

Kolmas tapa peittää  $\alpha$ -1,3-Gal-epitootit on ihmisen  $\alpha$ -galaktosidaasi-geenin siirto sian genomiin.  $\alpha$ -galaktosidaasi-entsyymi toimii siten, että se poistaa  $\alpha$ -D-galaktosin  $\alpha$ -1,3-Gal-epitootista sian solupinnoilla, mutta poisto ei ole täydellinen. (Osman ja muut 1997) Yhteistä näillä kolmella tavalla on, että endo- $\beta$ -galaktosidaasi-C:n, H-transferaasientsyymien ja  $\alpha$ -galaktosidaasi-geenin ilmennys estää HAR:a, mutta ne eivät kykene eliminoimaan  $\alpha$ -1,3-Gal-antigeeniä täydellisesti (Niu ja muut 2021.)

Täydellinen  $\alpha$ -1,3-Gal-antigeenin poisto voidaan saavuttaa GTKO-sioilla, eli sioilla, joista GGTA1-geeni on hiljennetty. (Niu ja muut 2021) Yksi tapa tuottaa GTKO-sikoja on tumansiirtotekniikalla, eli käytetään sioista peräisin olevia kloonaalisia sikiön fibroblastisoluja ja poistetaan niistä yksi  $\alpha$ -1,3-galaktositransferaasin geenilokus, jotta siat eivät enää tuottaisi  $\alpha$ -1,3-Gal:a. Soluista otetaan tumat, jotka siirretään sian munasoluihin, joista alkuperäiset tumat on poistettu ja näin syntyy muunneltu alkio (Lai ja muut 2002.)

HAR johtuu vasta-aineiden läsnäolon lisäksi komplementtijärjestelmästä. Komplementtijärjestelmä on osa elimistön immuunipuolustusta ja sen tehtävä on tunnistaa ja tuhota vieraita aineita. Ihmisen veressä ja kudospasteissa on useita komplementtia sääteleviä proteiineja. C-reaktiiviset proteiinit suojaavat soluja autologisen komplementin aiheuttamilta vaurioilta estämällä komplementtikaskadin aktivoitumisen. Kyseisten proteiinien homologinen restriktiomalli ihmisen ja sian välillä osoitti, että sian C-reaktiiviset proteiinit eivät kykene tehokkaasti kontrolloimaan ihmisen komplementtisysteemiä. Tämä johtaa komplementtivälitteisiin vaurioihin siirteissä. Tämän vuoksi siirteet, jotka ilmentävät ihmisen C-reaktiivisia proteiineja, ovat suojassa vaurioilta (Niu ja muut 2021.)

Ihmisen komplementtikaskadia säätelee pääasiassa CD46, CD55, CD59 ja C1. CD46 on kalvon kofaktoriproteiini, joka estää C3-konvertaasikompleksin muodostumista komplementin aktivaation estoon. CD55 on hajoamista kiihdyttävä tekijä ja se estää C3- ja C5-konvertaasin muodostumista ja kiihdyttää hajoamista. CD59 on protektiini tai reaktiivisen lyysin kalvo-inhibiittori ja se estää C9:n polymerisoitumisen sitoutumalla C8:aan ja C9:ään. C1-INH on komplementtia säätelevän proteiini C1:n estäjä. Se estää komplementin aktivaation kolmea reittiä pitkin:Clr- ja Cls-reittiä, lektiinireittiä ja näiden lisäksi vaihtoehtoinen reitti on sitoutua C3b:hen. Kyseisten proteiinien ilmentyminen sian soluissa paransi vastustuskykyä merkittävästi ja tämän vuoksi ihmisen komplementin säätelygeenejä ilmentäviä GTKO-sikoja käytetään pidentämään siirteiden selviytymisaikaa (Niu ja muut 2021.)

Ratkaisu tulehdusreaktioihin, mitkä johtuvat ksenotransplantaatioista, on viedä ihmisen tulehdusta sääteleviä geenejä sian genomiin. Hemioksygenaasi on tulehdusta ja solujen apoptoosia vähentävä antioksidanttinen entsyymi, jonka ilmeneminen sian soluissa voi ehkäistä näitä syntymästä. Hemioksygenaasia ilmentävät elimet voivat suojata lisäksi hyytymishäiriöitä ja tromboosia vastaan (Niu ja muut 2021.) Toinen tulehdusta säätelevä geeni on tuumorinekroositekijä alfa-indusitu-proteiini-3. Kyseinen proteiini vähentää myös tulehduksen ja solujen apoptoosin riskiä (Niu ja muut 2021.)

Ennen geenitekniikan edistymistä PERV:n leviämistä yritettiin estää muun muassa valitsemalla sikoja, joilla oli alhainen lukumäärä PERV-kopiota tai alhainen PERV-RNA:n ilmentymistaso. Siirteiden vastaanottajan rokotusta PERV-transmembraani- tai



pintavaippaproteiineilla on myös kokeiltu ja tällöin vastaanottaja muodostaa itse suojan PERV-virusia vastaan. Strategiat eivät kuitenkaan eliminoi PERV:iä (Niu ja muut 2021.)

Geenitekniikan kehityksen myötä RNA-interferenssitekniikka otettiin käyttöön PERV:n tukahduttamiseksi. PERV:ä onnistuttiin vähentämään *in vitro* PERV-spesifisten siRNA ja shRNA:n avulla. siRNA:n vaikutusta PERV:n on tutkittu reaaliaikaisen polymeerasiketjureaktion ja Western-analyysin avulla. Reaaliaikaisen polymeerasiketjureaktion tulokset osoittivat, että siRNA:lla on vaikutus PERV:n infektiokykyyn. Western-analyysi näytti selkeän vähentyneen vaikutuksen PERV:n gag-proteiinilla, mikä tukee reaaliaikaisen polymeerasiketjureaktion tuloksia (Miyagawa 2005.)

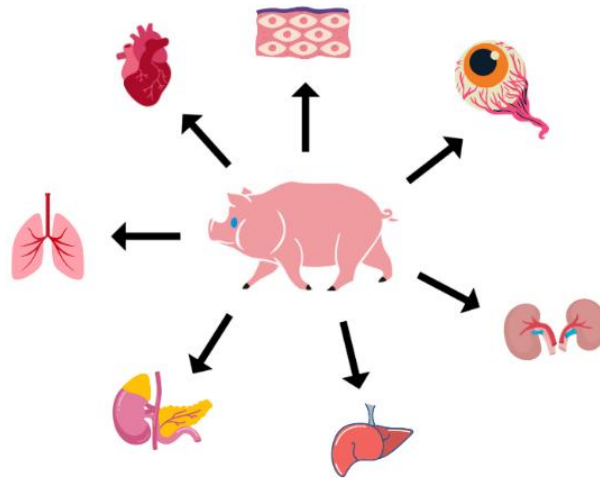
PERV-kopioiden tukahdutusta on yritetty sinkkisorminukleaaseilla, mutta niiden korkea ilmentyminen vaikutti erittäin myrkyllisesti soluihin. Syynä tähän pidetään useita PERV-kopioiden leikkauksia (Niu ja muut 2021.) Lopulta CRISPR/Cas9:n avulla onnistuttiin poistamaan PERV sian munuaisten epiteelisolulinjasta. Ensin PERV-kopioiden määrä määritettiin polymeerasiketjureaktion avulla. gRNA:iden suunnitteluun hyödynnettiin jo tunnettuja sekvenssejä PERV:lle ja muille retroviruksille sioissa. Cas9 gRNA:t suunniteltiin kohdistamaan PERV:n pol-geenin katalyyttiseen keskustaan, joka on välttämätön viruksen replikaatiolle ja infektiolle. Tutkimuksessa onnistuttiin kohdistamaan PERV-polin kaikki 62 kopiota ja osoittamaan PERV:n siirtymisen *in vitro* ihmissoluihin vähentyneen (Yang ja muut 2015.)

## 4. Ksenotransplantaatio

### 4.1 Siirtoelimet

Geenimuunnelluista sioista ksenografeiksi saadaan haiman saarekkeet, sydän, munuaiset, sarveiskalvot, iho, maksa ja keuhkot (Kuva 1.). (Niu ja muut 2021) Haiman saarekkeiden siirrot toimivat hyvin diabetespotilaiden hoidossa, mutta ongelmana on siirteiden saatavuus. Siirteitä sialta on kokeiltu diabeettiseen reesus-apinaan. Neljällä

viidestä apinasta siirre toimi ja insuliiniriippumaton normoglykemia jatkui yli 6 kuukauden ajan. Pisin siirre selvisi 965 päivää (Niu ja muut 2021.)



Kuva 1. Geenimuunnellun sian mahdollisia ksenografteja ovat iho, sarveiskalvo, munuaiset, maksa, haiman saareke, keuhkot ja sydän. Muokattu lähteestä (Niu ja muut 2021).

GTKO-sian sydämiä on kokeiltu siirteinä paviaaneille. Ensimmäisessä tapauksessa sydämissä oli kolme geenimuunnosta (GTKO/hCD46/hTBM). Siirrännäinen selvisi 945 päivää. Toisessa tapauksessa sikaan tehdyt muunnokset olivat samat ja siirre selvisi 195 päivää (Niu ja muut 2021.) Vuonna 2022 suoritettiin sydämensiirto GTKO-sialta ihmiselle ja siirre selvisi kaksi kuukautta. (Hawthorne 2022; Madhusoodanan 2022)

Munuaissiirteiden selviytyminen ksenotransplantaatioissa oli alussa vain minutteja ennen HAR:n kehittymistä. Geenimuuntelun avulla siirre on kestänyt pisimmillään jopa 310 päivää, ja kyseisellä luottavajasiialla oli kaksi geenimuunnosta (GTKO/hCD55) (Niu ja muut 2021.) Sian sarveiskalvoja on siirretty reesus-apinoihin ja pisimmillään siirre selvisi 933 päivää. (Choi ja muut 2015; Niu ja muut 2021) Ihosiirteitä sialta paviaaneille on kokeiltu, mutta pisin siirre selvisi vain 53 päivää. (Niu ja muut 2021)

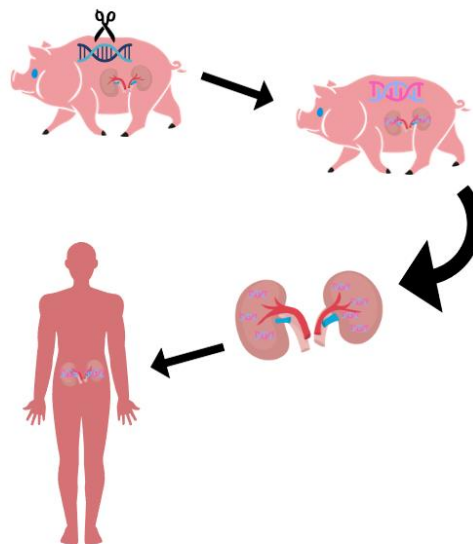
Maksa- ja keuhkosiirteet sioilta muihin kädellisiin ovat selviytyneet vain päiviä. Vuonna 2016 tehtiin maksansiirto sialta paviaanille ja siirre selvisi 25 päivää. Myöhemmin toinen maksasiirre sialta paviaanille selvisi 29 päivää (Niu ja muut 2021.) Pisin keuhkosiirre on saatu selviämään 47 päivää. Siirteen vastaanottajana toimi paviaani ja kyseiselle luovuttajasiialle tehtiin seitsemän eri geenimuunnosta (GTKO/ $\beta$ 4GalNT2-

KO/hCD46/hCD47/hEPCR/hTBM/hHO-1), jotta siirre saatiin selviytymään mahdollisimman pitkään (Niu ja muut 2021.)

## 4.2 Esimerkkitapaus sydän- ja munuaissirrosta

Seitsemäs tammikuuta 2022 Maryland Medical Centerin yliopistossa suoritettiin ensimmäinen sydämensiirto sialta ihmiselle. Potilas oli 57-vuotias mies ja hän kärsi sydämen vajaatoiminnasta. Potilas kuoli kaksi kuukautta leikkauksen jälkeen ja kuolinsyyksi todettiin sydämen vajaatoiminta (Hawthorne 2022.) Luovuttaja-sika oli GTKO-sika, johon oli tehty 10 geenimuunnosta. Luovuttajasialta oli hiljennetty kolme immuunihyljintään liittyvää geeniä sekä lisätty kuusi ihmisen geeniä. Lisäksi sialle lisättiin kasvugeeni säätelemään sian kokoa (Wang ja muut 2022.)

Ensimmäinen munuaissiirto GTKO-sialta ihmiselle suoritettiin 25. syyskuuta 2021 ja toinen 22. marraskuuta 2021 (Kuva 2.). Molemmat potilaat oli todettu aivokuolleiksi ennen leikkausta. Molemmissa tapauksissa munuaiset irrotettiin luovuttajasioilta ja säilytettiin kylmässä 6–7 tuntia ennen elinsiirtoa ihmiseen. Leikkauksen jälkeen reperfuusion palauduttua molemmat munuaiset olivat vaaleanpunaiset ja alkoivat tuottaa virtsaa muutaman minuutin sisällä (Montgomery ja muut 2022.)



Kuva 2. CRISPR/Cas9:n avulla sikaan tehdään tarvittavat geenimuunnokset, elin kerätään talteen ja lopulta siirretään siirteen vastaanottajaan. Muokattu lähteestä (Wang ja muut 2022).

Luovuttajasiat olivat GTKO-sikoja. Sioilta oli poistettu GGTA1-geeni ja niiden munuaiskapseleiden alle siirrettiin kateenkorvat kaksi kuukautta ennen leikkauksia. Siirteet irrotettiin keskilinjan laparotomian avulla ja niitä säilytettiin viileässä leikkausta odottaessa (Montgomery ja muut 2022.) Leikkauksessa ksenograftin verisuonet liitettiin potilaan reisivaltimeen- ja laskimoon ja siirre jätettiin kehon ulkopuolelle reiden yläosaan, jotta mahdolliset merkit HAR:sta olisivat nopeasti havaittavissa. Lisäksi ksenograftin virtsaputkeen asetettiin kanyyli, jotta virtsaneritystä voitaisiin seurata ja mittauksia suoritettiin tunnin välein. Lisäksi potilaan alkuperäisten munuaisten virtsan eritystä seurattiin katetrin avulla (Montgomery ja muut 2022.)

Kokeen ajan elinsiirteestä otettiin koepaloja, joille suoritettiin hematoksyliini- ja eosiinivärjäys sekä C4d-värjäys immunohistokemiallisella testillä. Tämän jälkeen koepaloja tutkittiin elektronimikroskoopilla. Koepalat otettiin 6, 24 ja 48 tunnin jälkeen ja kokeet eivät osoittaneet mitään merkkejä tulehduksesta (Montgomery ja muut 2022.)

## 5 Yhteenveto

Ksenotransplantaatiot ovat kiinnostaneet jo pitkän aikaa tutkijoita ja aihe on laajasti tutkittu. Kliinisiä kokeita sialta ihmiselle on kuitenkin vielä hyvin rajallisesti. Tärkeitä kokeellisia tuloksia on saatu muun muassa sikojen haiman saarekesoluilla ja hermosoluilla. Saarekesoluja voidaan käyttää jopa ilman immunosuppressiivisia lääkkeitä, mikäli ne kapseloidaan.

Kiinteiden elinten ksenotransplantaatiot eivät toistaiseksi ole antaneet tarvittavaa näyttöä kliiniseen käyttöön. Ennusteet paranevat kuitenkin jatkuvasti, kun aihetta tutkitaan lisää (Aristizabal ja muut 2017.)

## 6 Kirjallisuus

Aristizabal, A. M., Caicedo, L. A., Martínez, J. M., Moreno, M. & Echeverri, G. J.

(2017) Xenotrasplantes, una realidad cercana en la práctica clínica: Revisión de la literatura. *Cir Esp* **95**:62–72.

Auerbach, C., Robson, J. M. & Carr, J. G. (1947) The Chemical Production of Mutations. *Science* **105**:243–247.

Bhatia, S., Pooja & Yadav, S. K. (2023) CRISPR-Cas for genome editing: Classification, mechanism, designing and applications. *Int J Biol Macromol* **238**:124054.

Borek, F. (1987) Swine in biomedical research, vol. 3. *J Immunol Methods* **103**:285.

Carroll, D. & Beumer, K. J. (2014) Genome engineering with TALENs and ZFNs: Repair pathways and donor design. *Methods* **69**:137–141.

Choi, H. J., Lee, J. J., Kim, D. H., Kim, M. K., Lee, H. J., Ko, A. Y., ... Wee, W. R.

(2015) Blockade of CD40–CD154 Costimulatory Pathway Promotes Long-Term Survival of Full-Thickness Porcine Corneal Grafts in Nonhuman Primates: Clinically Applicable Xenocorneal Transplantation. *Am J Transplant* **15**:628–641.

Cui, Y., Dong, H., Ma, Y. & Zhang, D. (2019) Strategies for Applying Nonhomologous End Joining-Mediated Genome Editing in Prokaryotes. *ACS Synth Biol* **8**:2194–2202.

Fajrial, A. K., He, Q. Q., Wirusanti, N. I., Slansky, J. E. & Ding, X. (2020) A review of emerging physical transfection methods for CRISPR/Cas9-mediated gene editing. *Theranostics* **10**:5532–5549.

Gaj, T., Gersbach, C. A. & Barbas, C. F. (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* **31**:397–405.

- Galili, U., Anaraki, F., Thall, A., Hill-Black, C. & Radic, M. (1993) One percent of human circulating B lymphocytes are capable of producing the natural anti-Gal antibody. *Blood* **82**:2485–2493.
- Galili, U., Rachmilewitz, E. A., Peleg, A. & Flechner, I. (1984) A unique natural human IgG antibody with anti-alpha-galactosyl specificity. *J Exp Med* **160**:1519–1531.
- Geisert, R. D. & Lucy, M. C. (2018) Pig. Teoksessa *Encyclopedia of Reproduction* (ss. 641–649). Elsevier.
- Hardy, J. D. & Chavez, C. M. (1968) The first heart transplant in man. *Am J Cardiol* **22**:772–781.
- Hawthorne, W. J. (2022) World first pig-to-human cardiac xenotransplantation. *Xenotransplantation* **29**:e12733.
- Hille, F. & Charpentier, E. (2016) CRISPR-Cas: Biology, mechanisms and relevance. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **371**:20150496.
- Hryhorowicz, M., Zeyland, J., Słomski, R. & Lipiński, D. (2017) Genetically Modified Pigs as Organ Donors for Xenotransplantation. *Mol Biotechnol* **59**:435–444.
- Kemter, E., Schnieke, A., Fischer, K., Cowan, P. J. & Wolf, E. (2020) Xeno-organ donor pigs with multiple genetic modifications – the more the better? *Curr Opin Genet Dev* **64**:60–65.
- Lai, L., Kolber-Simonds, D., Park, K.-W., Cheong, H.-T., Greenstein, J. L., Im, G.-S., ... Prather, R. S. (2002) Production of  $\alpha$ -1,3-Galactosyltransferase Knockout Pigs by Nuclear Transfer Cloning. *Science* **295**:1089–1092.
- Li, J., Sun, H., Huang, Y., Wang, Y., Liu, Y. & Chen, X. (2019) Pathways and assays for DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Acta Biochim Biophys Sin* **51**:879–889.

- Madhusoodanan, J. (2022) After the First Pig-to-Human Heart Transplant, Scientists Look to the Future of Cardiac Xenotransplantation. *JAMA* **328**:1999.
- Miyagawa, S. (2005) Prevention of PERV Infections in Pig to Human Xenotransplantation by the RNA Interference Silences Gene. *J Biochem (Tokyo)* **137**:503–508.
- Montgomery, R. A., Stern, J. M., Lonze, B. E., Tatapudi, V. S., Mangiola, M., Wu, M., ... Stewart, Z. A. (2022) Results of Two Cases of Pig-to-Human Kidney Xenotransplantation. *N Engl J Med* **386**:1889–1898.
- Niu, D., Ma, X., Yuan, T., Niu, Y., Xu, Y., Sun, Z., ... Church, G. M. (2021) Porcine genome engineering for xenotransplantation. *Adv Drug Deliv Rev* **168**:229–245.
- Niu, D., Wei, H.-J., Lin, L., George, H., Wang, T., Lee, I.-H., ... Yang, L. (2017) Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science* **357**:1303–1307.
- Ogawa, H., Kobayashi, T., Yokoyama, I., Nagatani, N., Mizuno, M., Yoshida, J., ... Muramatsu, T. (2002) Reduction of  $\alpha$ -galactosyl xenoantigen by expression of endo- $\beta$ -galactosidase C in pig endothelial cells. *Xenotransplantation* **9**:290–296.
- Osman, N., McKenzie, I. F. C., Ostenried, K., Ioannou, Y. A., Desnick, R. J. & Sandrin, M. S. (1997) Combined transgenic expression of  $\alpha$ -galactosidase and  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferase leads to optimal reduction in the major xenoepitope Gal $\alpha$ (1,3)Gal. *Proc Natl Acad Sci* **94**:14677–14682.
- Ryczek, N., Hryhorowicz, M., Zeyland, J., Lipiński, D. & Słomski, R. (2021) CRISPR/Cas Technology in Pig-to-Human Xenotransplantation Research. *Int J Mol Sci* **22**:3196.
- Sachs, D. H. (1994) The pig as a potential xenograft donor. *Vet Immunol Immunopathol* **43**:185–191.

- Swindle, M. M., Smith, A. C., Laber-Laird, K. & Dungan, L. (1994) Swine in Biomedical Research: Management and Models. *ILAR J* **36**:1–5.
- Sykes, M. & Sachs, D. H. (2019) Transplanting organs from pigs to humans. *Sci Immunol* **4**:eaau6298.
- Wang, W., He, W., Ruan, Y. & Geng, Q. (2022) First pig-to-human heart transplantation. *The Innovation* **3**:100223.
- Wijkstrom, M., Iwase, H., Paris, W., Hara, H., Ezzelarab, M. & Cooper, D. K. C. (2017) Renal xenotransplantation: Experimental progress and clinical prospects. *Kidney Int* **91**:790–796.
- Yang, L., Guell, M., Niu, D., George, H., Lesha, E., Grishin, D., ... Church, G. (2015) Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science* **350**:1101–1104.
- Zhou, Q., Li, T., Wang, K., Zhang, Q., Geng, Z., Deng, S., ... Wang, Y. (2022) Current status of xenotransplantation research and the strategies for preventing xenograft rejection. *Front Immunol* **13**:928173.