

**Wieloparametryczna charakterystyka transgenicznych świń na potrzeby ksenotransplantacji z uwzględnieniem analiz histochemicznych, molekularnych oraz testów funkcjonalnych in vitro**  
mgr inż. Jerzy Wiater

**Streszczenie**

Ksenotransplantacja, czyli przeszczep międzygatunkowy wydaje się być odpowiedzią na współczesny niedobór narządów. Obecnie uważa się, że świnia domowa (*Sus scrofa*) jest optymalnym gatunkiem do przeprowadzania prób klinicznych z udziałem człowieka. Niestety, duży dystans filogenetyczny między świnia a człowiekiem jest przyczyną bariery immunologicznej, która na chwilę obecną uniemożliwia ksenotransplantację. Na powierzchni komórek świni, w szczególności śródbłonna naczyniowego, występuje struktura cukrowa Gal $\alpha$ (1,3)Gal $\beta$ (1,4)GlcNAc-R zwana epitopem Gal $\alpha$ (1,3)Gal. Struktura ta powstaje w reakcji katalizowanej przez  $\alpha$ 1,3-galaktozylotransferazę ( $\alpha$ 1,3GT), enzym kodowany przez gen *GGT1*. Enzym  $\alpha$ 1,3GT bierze udział w przeniesieniu cząsteczki galaktozy z UDP-Gal i połączenie jej wiązaniem  $\alpha$ 1-3 glikozydowym z glikoproteinami lub glikosfingolipidami zawierającymi końcowe reszty Gal $\beta$ (1,4)GlcNAc-R. Człowiek wytwarza naturalne przeciwciała skierowane przeciwko epitopowi Gal $\alpha$ (1,3)Gal. Zatem istnieje wysokie ryzyko nadostrego, ostrego i opóźnionego odrzucenia ksenoprzeszczepu przez organizm biorcy. Drugim, koniecznym do przezwyciężenia problemem są różnice w powierzchniowych białkach głównego układu zgodności tkankowej (MHC) człowieka i świni. Białka MHC świni prezentują jej antygeny ludzkim limfocytom, tym samym uruchamiają odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciwko tkankom świni. Niezgodność na poziomie białek MHC prowadzi bowiem do odrzucenia ksenoprzeszczepu z udziałem komórek NK.

Rozwiązanie tych problemów mogą stanowić świnie modyfikowane genetycznie w taki sposób, aby zapobiec rozpoznaniu komórek ich narządów przez ludzki system odpornościowy. Jedną ze strategii usunięcia epitopu Gal $\alpha$ (1,3)Gal z powierzchni komórek świń jest wykorzystanie ludzkich rekombinowanych enzymów:  $\alpha$ 1,2-fukozylotransferazy (*rha*1,2-FT) oraz  $\alpha$ -galaktozydazy A (*rha*-Gal A), kodowanych odpowiednio przez geny *hFUT2* i *hGLA*. Enzym *rha*1,2-FT konkuruje z endogenną świńską  $\alpha$ 1,3GT o ten sam substrat, tym samym hamuje powstawanie epitopu Gal $\alpha$ (1,3)Gal. Natomiast *rha*-Gal A odcina końcowe reszty galaktozy z epitopu Gal $\alpha$ (1,3)Gal, tym samym staje się on mniej ksenoreaktywny. Inną strategią jest nokaut genu *pGGT1*, który można wykonać m.in. za

pomocą nukleazy z motywem „palca cynkowego” (GTKO ZFN). Z kolei aby zabezpieczyć narządy świni przed atakiem ludzkich limfocytów NK sugeruje się wprowadzenie genu *HLA-E*, kodującego ludzki leukocytny antygen E.

Głównym celem niniejszej rozprawy było zbadanie czy zaproponowane modyfikacje genetyczne obniżają ekspresję epitopu Gal $\alpha$ (1,3)Gal w komórkach świń oraz która z nich jest najefektywniejsza. Drugim niemniej ważnym celem było wykluczenie ewentualnego negatywnego wpływu modyfikacji genetycznych na budowę tkanek świń. Badaniom zostały poddane dwie tkanki: skóra i wątroba oraz keratynocyty i fibroblasty skóry hodowane *in vitro* pochodzące od świń: pojedynczo- (**Tg**: *hFUT2*, *hGLA*, *HLA-E*), podwójnie- (**2×Tg**: *hFUT2*×*hGLA*) oraz potrójnie transgenicznych (**3×Tg**: *hFUT2*×*hGLA*×*HLA-E*). Do badań wykorzystano także próbki od świń GTKO (ZFN). W badaniach morfologicznych wykorzystano rutynowe barwienie hematoksyliną i eozyną skrawków parafinowych, i mrożeniowych, odpowiednio skóry oraz wątroby świń. Do lokalizacji i analizy względnej ekspresji: rh $\alpha$ 1,2-FT, rh $\alpha$ -Gal A i HLA-E w skrawkach skóry i wątroby oraz hodowanych *in vitro* komórkach skóry świń (Tg, 2×Tg, 3×Tg) wykorzystano znakowanie immunofluorescencyjne oraz analizę za pomocą mikroskopu konfokalnego. Za pomocą metody Western blot analizowano ekspresję: rh $\alpha$ 1,2-FT, rh $\alpha$ -Gal A i HLA-E w homogenatach tkankowych i lizatach komórkowych pochodzących od świń: Tg, 2×Tg oraz 3×Tg. Z kolei do analizy poziomów ekspresji epitopu Gal $\alpha$ (1,3)Gal w skrawkach tkankowych skóry i wątroby oraz hodowanych *in vitro* komórkach skóry pochodzących od świń: Tg, 2×Tg, 3×Tg oraz GTKO (ZFN) wykorzystano lektynę GS-IB4 znakowaną fluorochromem Alexa Fluor 647 oraz analizę za pomocą mikroskopu konfokalnego. Uzyskane wyniki potwierdzano metodą Eastern blot (lektynoblotting) z wykorzystaniem lektyny GS-IB4 znakowanej HRP.

Wykazano ekspresję: rh $\alpha$ 1,2-FT, rh $\alpha$ -Gal A i HLA-E w skórze, wątrobie oraz hodowanych *in vitro* keratynocytach skóry wszystkich wariantów transgenicznych świń. Dodatkowo pokazano, że rh $\alpha$ 1,2-FT jest obecna w aparatach Golgiego wątroby świń Tg, 2×Tg oraz 3×Tg, co sugeruje jej pełną funkcjonalność. Ekspresja rh $\alpha$ 1,2-FT lub rh $\alpha$ -Gal A w istotny sposób obniża ilość epitopu Gal $\alpha$ (1,3)Gal w komórkach skóry i wątroby transgenicznych świń. Ponadto wykazano, że równoczesna obecność rh $\alpha$ 1,2-FT i rh $\alpha$ -Gal A najefektywniej obniża ekspresję epitopu Gal $\alpha$ (1,3)Gal w skórze, wątrobie oraz hodowanych *in vitro* keratynocytach. Dodatkowo pokazano, że u świń GTKO (ZFN) także zachodzi obniżenie ekspresji epitopu Gal $\alpha$ (1,3)Gal, jednakże metoda ta nie jest tak efektywna jak w przypadku świń 2×Tg.

Zastosowane metody modyfikacji genetycznych istotnie obniżają ekspresję ksenoreaktywnego epitopu Gal $\alpha$ (1,3)Gal w komórkach skóry i wątroby świń. Ponadto przeprowadzone modyfikacje genetyczne nie mają negatywnego wpływu na budowę skóry i wątroby transgenicznych świń oraz nie wpływają negatywnie na żywotność komórek skóry hodowanych *in vitro*.



Powyższe streszczenie rozprawy doktorskiej mgr inż. Jerzego Wiatera akceptuję.



dr hab. Marek Romek  
Zakład Biologii i Obrazowania Komórki  
Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych UJ