

*α*1,3-Galactosyltransferase 유전자 좌위에서 Membrane Cofactor Protein을 효과적으로 발현하는 자성 돼지 섬유아세포의 생산

*오건봉, 김벨라, 황성수, 옥선아, 임석기, *박진기

농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오공학과, 441-706

Generation of Female Porcine Fibroblasts Expressing Efficiently Membrane Cofactor Protein at *α*1,3-Galactosyltransferase locus

*Keon Bong Oh, Bella Kim, Seongsoo Hwang, Sun-A Ock, Seoki Im and Jin-Ki Park

Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

ABSTRACT

Xenotransplantation of pig organs into primates results in fatal damage, referred as hyperacute rejection (HAR), and acute humoral xenograft rejection (AHXR), to the organ graft mediated by antibodies pre-existing and newly-producing in primates against their cognate pig antigens. Functional ablation of *α*1,3-galactosyltransferase (*Gal-T* KO) of pig which is an enzyme involved in synthesis of Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R antigen is essentially required to prevent HAR. Moreover, additional genetic modification under *Gal-T* KO background for enforced expression of human complement regulatory proteins which can inhibits complement activation is known to effectively impeded HAR and AHXR. In this study, we constructed a membrane cofactor protein (MCP) expression cassette under control of human *EF1a* promoter. This cassette was inserted between homologous recombination regions corresponding to *Gal-T* locus. Subsequently this vector was introduced into ear skin fibroblasts of female pig by nucleofection. We were able to obtained 40 clones by neomycin selection and 4 clones among them were identified as clones targeted into *Gal-T* locus of MCP expression cassette by long-range PCR. Real time RT-PCR was shown to down-regulation of *Gal-T* expression. From these results, we demonstrated human *EF1a* promoter could induce efficient expression of MCP on cell surface of fibroblasts of female pig.

(Key words : MCP, *Gal-T* KO, female porcine fibroblast, human *EF1a* promoter)

서 론

말기 단계의 장기 부전 환자 치료법으로 가장 좋은 해결책은 장기 이식이다. 그렇지만 장기 이식을 대기하는 수여자에 비해 공여자의 수가 극히 적어 이종의 장기를 이식하는 이종 이식이 대체 방법의 하나로 제시되고 있다. 돼지는 사람과 비교했을 때, 그 생리적 특성과 장기의 크기 등 여러 관점에서 대체 장기를 제공하기 위한 가장 적당한 재료로 인식되고 있다. 사람과 유사한 면역학적 특성을 보유한 영장류에 돼지의 장기를 이식하면 몇 분에서 몇 시간 안에 이식된 장기가 손상되면서 폐사하게 되는 초급성 거부 반응이 발생한다(Yang과 Sykes, 2007). 이 거부 반응은 사람 및 영장류에는 존재하지 않는 돼지의 Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R(Gal) 항원과 이에 대한 사람 및 영장류에 존재하는 Gal 자연항체의 면역 반응에 의해

발생한다(Macher와 Galili, 2008). 그런데 Gal 항원이 제거된 돼지의 장기를 영장류에 이식하면 초급성 거부 반응은 제어되지만, 여전히 급성 체액성(acute humoral rejection)이라 불리는 면역 거부 반응이 발생한다. 이는 돼지에는 Gal 항원 이외에 영장류에서 항원-항체 면역반응을 유도할 수 있는 다양한 종류의 항원이 존재하기 때문이라고 알려져 있다(Macchiarini 등, 1998; Chen 등, 2005).

영장류의 항체가 돼지 장기의 항원을 인식하게 되면 이의 신호에 의해 영장류의 혈액에 존재하는 보체 시스템이 활성화되어 돼지 장기의 세포들을 공격하게 된다. 한편, 영장류에는 활성화된 보체 시스템으로부터 자체 세포를 보호하는 다양한 보체 조절 단백질(complement regulatory protein)이 작동하여 활성화된 보체 시스템으로부터 자체 세포의 손상을 방지한다(Miyagawa 등, 2010). 그리하여 보체 조절 단백질인 CD59

* Correspondence : E-mail : keonoh@korea.kr, parkjk@korea.kr

(Fodor 등, 1994; Niemann 등, 2001), decay accelerating factor (White 등, 1995), membrane cofactor protein(MCP, Adams 등, 2001; Zhou 등, 2002)을 과발현하는 형질 전환 돼지가 생산되었고, 이들의 장기를 영양류에 이식하였을 때 생존 기간이 연장되었다고 보고되었다(Ekser 등, 2009). 보체 조절 단백질 과발현이 유의하게 면역 거부 반응을 억제시킬 수 있지만, 효과적으로 그 반응이 완벽하게 제어되지 않아(Ramirez 등, 2005; Davila 등, 2006), 초급성 면역 거부 반응 원인 유전자 *al-3Galactosyltransferase(Gal-T)*의 기능이 제거(knockout, KO)되고, 추가로 보체 조절 단백질이 과발현되면 더 효과적으로 면역 거부 반응이 제어될 것이라고 제안되었다(Yang과 Sykes, 2007; Miyagawa 등, 2010).

초기 체세포(primary somatic cell)에 특정 유전자 좌위에 유전자를 도입하는 트랜스펙션 방법이 개발되고, 이 체세포의 핵치환으로 형질전환 복제 대동물 생산 방법이 개발된 이래(McCreath 등, 2000), 여러 연구자들에 의해 *Gal-T* KO 복제 돼지가 생산되었다(Dai 등, 2002; Lai 등, 2002; Phelps 등, 2003; Ramsoondar 등, 2003; Takahagi 등, 2005; Ahn 등, 2011). 그리고 나서 *Gal-T* KO 돼지는 기존에 생산된 보체 조절 과발현 형질 전환 돼지와 비교를 통해 다중 형질 전환 돼지 생산되어 영양류의 심장, 간 등에 이식되어 이종 이식에 의한 거부 반응의 연구에 이용되고 있다(Ekser 등, 2009; Ekser 등, 2010; Ekser 등, 2012).

본 연구에서 *EF1a* 프로모터의 조절에 의해 membrane cofactor protein(MCP) 과발현을 유도하는 카세트를 제작한 후, *Gal-T* 좌위에 삽입시킨 자성 돼지 섬유아세포를 생산하였다. 이 세포는 *Gal-T* 발현량이 감소함과 동시에 MCP를 과발현하는 이형접합체 형태로 *Gal-T* 유전자가 KO된 것으로 이전의 연구에서 생산한 음성 체세포(Ko 등, 2013)와 더불어 실제 영양류에 이종 이식 연구에 사용하게 될 동형접합 *Gal-T* KO 및 MCP 과발현 형질 전환 돼지 생산을 위한 기간 및 비용을 감소시키는 데 크게 기여할 것으로 기대된다.

재료 및 방법

1. Gal-T 유전자 좌위에 MCP 발현 카세트 삽입 위한 벡터 제작

MCP cDNA 클론은 21C Frontier Human Gene Bank(Clone ID,hMU002255)에서 구입하였다. 프라이머 5'-ATCAGCTGATGGAGCCTCCCGGCCGC-3'와 5'-GCCAGCTGTCAGCCTCTCTGCTCTGCTGGA-3'를 이용하여 MCP cDNA의 양쪽 말단에 제한효소 *Pvu* II 염기서열을 위치시켰다. 사람 *EF1a* 프로모터는 *pBudCE4.1* 벡터(Invitrogen, CA, USA) 프로모터를 제한효소 *Nhe* I과 *Not* I으로 절단하여 분리하였고, *pIRESneo3* 벡터의 *Nhe* I과 *Not* I 부분에 삽입하였다. 그리고 나서 다시 제한효소 *EcoRV*와 *Sal* I를 사용하여 *EF1a-IRES/neo* 부분만

분리한 후 *pBluescript II KS +* 벡터(Stratagene, CA, USA)의 제한효소 *Sma* I과 *Sal* I 위치에 삽입하였다. *EF1a-IRES/Neo*를 포함한 *pBluescript KS II +* 벡터를 제한효소 *Not* I을 사용하여 *EF1a* 프로모터와 IRES 사이를 절단한 후 Klenow large fragment(NEB, MA, USA)를 처리하여 *Not* I 위치 염기서열을 변경하였다. 제한효소 *Pvu* II를 사용하여 분리한 MCP cDNA를 염기서열이 변경된 *Not* I에 삽입하였다(*pEF1a-MCP-IRES/neo*). *pEF1a-MCP-IRES/neo* 벡터를 제한효소 *Sma* I과 *Xba* I을 사용하여 절단한 후 Klenow large fragment(NEB)를 처리하여 염기서열을 변형시켰다. 변형된 부분을 *Sma* I을 사용하여 절단된 *Gal-T* KO 벡터(Ko 등, 2013)에 삽입하여 *Gal-T KO/EF1a-MCP-IRES/neo* 벡터를 완성하였다.

2. 돼지 귀 섬유아세포의 분리, 배양 및 유전자 도입

돼지 섬유아세포의 분리 및 배양 방법은 이전의 연구논문(Ko 등, 2013)에 자세히 기술되었다. 자성 섬유아세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM : Invitrogen, CA, USA)에 15% fetal bovine serum(Invitrogen), 1% non-essential amino acids(Invitrogen), 0.1mM β -mercaptoethanol(Invitrogen), 1% antibiotic/antimycotic(Invitrogen)을 첨가한 배양액에서 유지되었다. *Gal-T KO/EF1a-MCP-IRES/neo* 벡터를 제한효소 *Not* I을 처리하여 선형으로 만든 후 Amaxa Basic Nucleofector Kit for primary mammalian fibroblasts(#VPI-1002; Lonza, Koln, Germany)를 사용하여 자성 섬유아세포에 도입하였다.

3. 섬유아세포의 선별 및 유전자 분석

유전자 도입 48시간 후 G418(Invitrogen)이 400 mg/ml 농도로 첨가된 배양액에서 선별을 실시하였다. Neomycin 저항 세포는 100 mg/ml의 농도로 of proteinase K가 첨가된 용해용액(50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl[pH 8.3], 2 mM MgCl₂, 0.45% NP-40, 0.5% Tween 20)에서 용해 후 유전체 DNA를 추출하였다. MCP 과발현 카세트가 *Gal-T* 유전자 좌위에 적중되었는지는 미량의 세포 용해물을 주형으로 프라이머 12(5'-TCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATT-3')와 138(5'-TTATAGAGAAACAAGAGTCCTAATTGACTTGT-3')을 이용한 NeoPCR과, 세포의 유전체 DNA를 주형으로 프라이머 146(5'-AATGGTGGAGAGTAGCTGGGAATGTTACAG-3')과 143(5'-AACTTGCACCATGAAGTCTCTGCACTCCAG-3')을 이용한 F-PCR 분석을 수행하였다.

4. 양적 역전사 증합효소 연쇄반응(Real Time RT-PCR)

섬유아세포로부터 총 RNA는 RNeasy Mini Kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 추출하였다. cDNA는 oligo-dT 프라이머와 Super Script III First Strand cDNA Synthesis Kit(Invitrogen)를 이용해 합성하였다. 유전자 전사체 발현량은

Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR I Kit(Roche, Germany)을 이용한 real-time PCR 방법으로 분석하였다. *Gal-T* 발현 분석을 위한 프라이머는 5'-TACATCATGGTGGATGATATCTC-3'와 5'-GCCTGTAGCTGAGCCACCGACTG-3'를 사용하였고, *MCP* mRNA 발현을 위한 프라이머는 5'-GAAGCTATGGAGCTCATTGGTAAA-3'와 5'-TTGCTACTGATCCTTAAAGTTCAC-3'를 사용하였다. 대조군으로 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(*Gapdh*)에 대한 프라이머는 5'-TCGGAGTGAACGGATTTG-3'와 5'-CCTGGAAGATGGTGGATGG-3'를 사용하였다.

5. 유세포 분석(Flow Cytometry Analysis)

배양 중인 섬유아세포를 Hank's balanced salt solution(HBSS)로 3회 세척 후, enzyme-free cell dissociation solution(EMD Millipore Corporation, MA, USA)을 처리하여 세포를 부유하였다. 그리고 1시간 0°C에서 fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated anti-CD46 항체(BioLegend, CA, USA)와 배양한 후 유세포 분석기(BD FACSVantageTMSE, Germany)로 측정했다.

결과 및 고찰

1. Gal-T 유전자 좌위에 MCP 과발현 카세트가 삽입된 자성 체세포 클론의 생산

돼지의 장기를 영양류에 이식하면 발생하는 초급성 면역 거부 반응을 극복하기 위한 가장 효율적인 방법은 *Gal-T* 기능이 완전히 제거된 돼지의 장기를 이식하는 것으로 알려져 있다(Hauschild 등, 2011; Kolber-Simonds 등, 2004; Nottle 등, 2007; Phelps 등, 2003). 본 연구에 사용된 Nucleofection을 포함한 고전적인 유전자의 체세포 도입 방법으로는 특정 유전자의 동형접합 KO 체세포를 생산할 수 없어, 결과적으로 이 세포를 공여세포로 핵이식에 사용하면 이형접합 돼지가 생산된다. 따라서 효율적으로 자손을 증가시키기 위하여 일반적으로 *Gal-T*가 이형접합의 형태로 KO된 공여 세포는 옹성의 것을 선호하게 된다(Klymiuk 등, 2010).

현재까지 보고된 동형접합 *Gal-T* KO 돼지의 경우는 G1(또는 G2) 옹성 이형접합 *Gal-T* KO 돼지와 G2 자성 이형접합 *Gal-T* KO 돼지와는 비교배에 의해 생산되었다. 본 연구는 이미 개발된 *Gal-T* 유전자 좌위에 *MCP* 과발현 카세트가 삽입된 옹성 이형접합 체세포(Ko 등, 2013)에 추가적으로 *Gal-T* 좌위에 *MCP* 과발현 카세트가 삽입된 자성 체세포를 생산하여 동형접합 형질전환 돼지 생산 기간을 단축시키고자 실시하였다. 이를 위하여 우선 *MCP* 과발현을 위하여 돼지의 세포에서 효율적인 유전자 발현을 유도한다고 알려진 *EF1a* 프로모터(Londrigan 등, 2007)를 발현조절 부위로 사용한 *MCP* 과발현 카세트를 재료 및 방법에서 기술한 바와 같이 제작하였

다. 그리고 나서 *Gal-T* KO를 위해 제작된 벡터 사이에 도입하여 *Gal-T KO/EF1a-MCP-IRES/neo* 벡터를 완성하였다.

Nucleofection 방법으로 선형화된 *Gal-T KO/EF1a-MCP-IRES/neo* 벡터를 자성 귀조직 섬유아세포에 도입하였다. Neomycin 선별 작업을 통해 40개의 클론을 확보하여 48-well 배양접시, 24-well 배양접시로 차례로 옮긴 후 이 중에서 세포 증식이 멈춰 세포 노화기로 추정되는 클론을 제외한 20개의 클론을 대상으로 1차 NeoPCR 유전자형 분석을 실시한 결과, 6개의 클론이 잠정적으로 *Gal-T*에 KO된 것으로 확인하였다. 이들 클론의 일부 세포는 공여세포로 제공하기 위하여 분주한 후 동결 보존하였고, 나머지 세포들은 계속 배양을 실시하여 이로부터 유전체 DNA를 추출하였다. *EF1a-MCP-IRES/neo* 벡터가 *Gal-T* 좌위에 삽입되었는지 명확하게 알아보기 위하여 상동 재조합 영역의 바깥쪽에 위치한 프라이머를 이용한 F-PCR을 수행하였다. Fig. 1에서와 같이 4개의 모든 클론에서 내인성 *Gal-T*에서 나타날 수 있는 약 8 kb 크기의 밴드와 *MCP* 과발현 카세트가 정확한 위치에 삽입되었을 경우 나타날 수 있는 약 11.9 kb 크기의 밴드를 보여주어 *EF1a-MCP-IRES/neo* 벡터가 *Gal-T* 좌위에 삽입되었다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

Table 1에서 보여준 것처럼 nucleofection 방법으로 *Gal-T* KO 벡터를 도입한 결과, neomycin 처리에도 생존한 40개의 클론을 선별하였고, 이 클론을 각각 회수하여 배양을 실시하여 10 cm 크기의 범위까지 증식하는 4개의 클론을 확보할 수 있었다. 이 클론을 상동 재조합 영역의 범위에 벗어난 위치의 염기서열을 프라이머로 F-PCR을 수행하여 4개의 모든 클론의 *Gal-T* 좌위에 *MCP* 과발현 카세트가 삽입된 것을 확인하였다. 본 연구의 *Gal-T* KO 효율은 10%로서, 이전의 연구에서 보여준 FuGENE™6 방법의 2.3%(Harrison 등, 2002)나 electroporation 방법에 의한 2% 이하(Dai 등, 2002), 8.7% 이하(Ramsoondar 등, 2003)의 결과보다 효율이 더 좋은 결과이었다. Nucleofection은 유전자를 도입하기 어렵다고 알려진 초기세포 특이적인 parameters과 트랜스펙션 용액을 조합시킨 트랜스펙션 방법(Gresch 등, 2004)으로, 다른 연구자들에 의해 green fluorescent protein reporter 유전자를 이용하여 돼지 초기 세포에서 효율

Table 1. Summary of the PCR analyses to confirm *pEF1a-MCP-IRES/neo* cassette insertion into the *Gal-T* locus for female clones

No. of nucleofected	No. of isolated clones	No. of NeoPCR positive clones(%)	No. of F-PCR positive clones ^a (%)
1	40	6 (15)	4 (10)

^a Clones with morphological fibroblast features after 24~33 days of G418 selection.

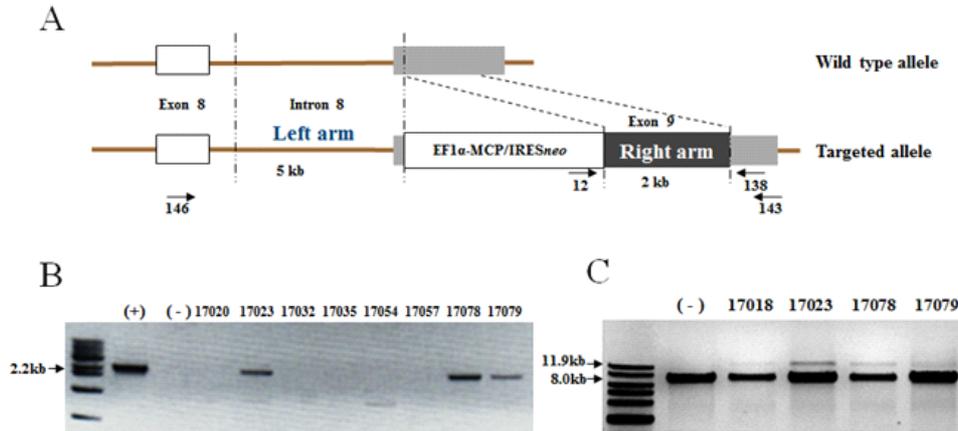


Fig. 1. PCR screening to verify insertion of *pEF1a-MCP-IRES/neo* cassette into the *Gal-T* locus for female clones. A : Strategy to screen successful *Gal-T* targeting events for female clones. The MCP expression cassette was inserted between the 5-kb left arm and the 2-kb right arm corresponding to the *Gal-T* genomic sequences. Arrows indicate the PCR primers used to verify successful targeting events, B : Preliminary PCR analysis was performed using crude lysates with primers 12 and 138, located at the neomycin resistance sequence and outside the right arm, respectively, C : The genomic DNA of preliminary positive clones was isolated and applied as template for F-PCR. Four morphologically active proliferating preliminary positive clones were selected to perform a PCR analysis using primers 146 and 143, which resulted in 8-kb and 11.9-kb bands corresponding to the endogenous sequence and the *EF1a-MCP-IRES/neo* cassette targeted at the *Gal-T* locus, respectively. On the size marker (SM), 8 kb and 10 kb indicate the corresponding sizes to the 1-kb ladder(Bioneer, Korea).

적이라는 것이 보고되었다(Nakayama 등, 2007; Sheyn 등, 2008; Skrzyszowska 등, 2008; Dickens 등, 2010). 본 연구와 이전의 연구를 종합해보면 nucleofection은 돼지 초기 섬유아 세포에 매우 효율적으로 외래 유전자를 도입시킬 수 있는 트랜스펙션 방법이라고 제안된다.

2. Gal-T 및 MCP 유전자 발현 분석

이전의 연구(Ko 등, 2013)에서 *Gal-T*가 이형 집합 형태로 KO되면 *Gal-T* 발현량이 감소한다는 것을 보여주었다. 그래서 본 연구에서도 *Gal-T* 발현량을 알아보려 #17078과 #17079 자성 클론으로부터 총 RNA를 추출하여 real time RT-PCR 분석을 실시하였다. 그 결과, 두 클론 모두 정상 세포보다 *Gal-T*의 발현이 감소하였고, 그 감소율이 옹성의 것(Ko 등, 2013)과 유사하여 *EF1a-MCP-IRES/neo* 벡터가 *Gal-T* 좌위에 삽입되었다는 것을 추가로 증명할 수 있었다(Fig. 2).

MCP 유전자가 과발현하는지를 알아보기 위하여 MCP 특이적인 프라이머를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 분석에 이용된 #17078과 #17079 두 클론 모두 MCP를 과발현한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 3A). MCP는 막 관통 당 단백질로서 세포외부 영역에 보체 조절 부분이 존재한다(Liszewski 등, 2005). 본 연구에서 MCP 세포막에서 발현되는 지를 알아보기 위해 유세포 분석을 실시하였고, Fig. 3의 B에 나타난 것처럼 MCP는 세포막에서 효율적으로 발현된다는 것을 확인하였다.

돼지와 영장류 사이의 번역학적 차이와 생리적인 부적합성이 해결되어야만 돼지의 장기를 이용한 이종 장기이식의

성공 가능성이 증가할 것이다(Yang과 and Sykes, 2007; Ekser 등, 2009). 이를 위해 기존에 생산된 *Gal-T* KO 형질전환 돼지를 기본으로 다양한 형질전환 돼지와 교배를 통해 다중 형질전환 돼지들이 생산되었다(Ramsoondar 등, 2003; Takahagi 등, 2005; Petersen 등, 2009; Phelps 등, 2009; Ekser 등, 2010;

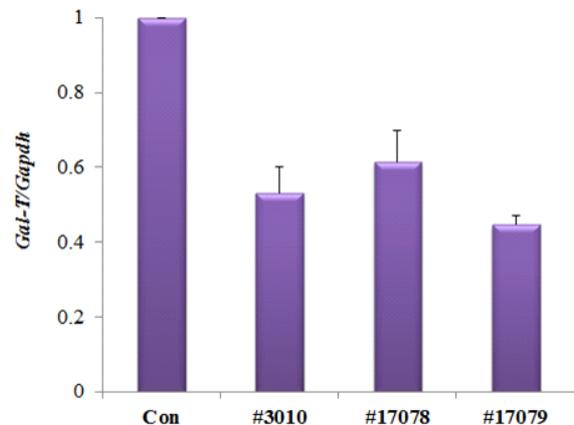


Fig. 2. Down-regulation of *Gal-T* mRNA expression in clones harboring the MCP expression cassette in the *Gal-T* locus. Real-time RT-PCR analysis of female clones #17078 and #17079. The graph indicated relative *Gal-T* expression level of clones compared to wild-type fibroblasts. The value was normalized by *Gapdh* values. Standard error shown to top of the bar. Triplicate experiments were performed. Fibroblasts isolated from wild-type were used as a control (Con).

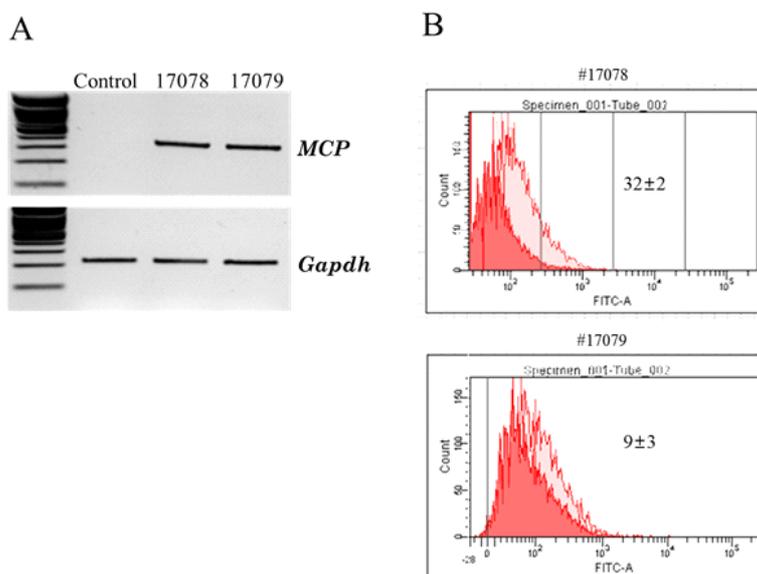


Fig. 3. A : Up-regulation of MCP mRNA expression. RT-PCR analysis of female clones #17078 and #17079 were performed. Wild-type fibroblasts indicates negative control(Con). *Gapdh* indicates loading control, B : MCP was expressed on cell surface of targeted clones. Flow cytometry analysis of #17078, and #17079 female clones(light histogram) and WT(dark histogram).

Lin 등, 2010). 본 연구에서는 *Gal-T* 좌위에 *MCP* 과발현 카세트를 삽입시킨 자성 체세포주를 생산하여 공여세포로 제공되고 있다. 이전의 연구에서 웅성 체세포주를 성공적으로 생산한 바(Ko 등, 2013) 자성과 웅성 형질전환 돼지를 생산한다면, 이 돼지의 교배를 통해 *Gal-T* 좌위에 *MCP* 과발현 카세트가 삽입된 동형접합 돼지를 생산할 것이며, 이를 통해 형질전환 돼지 생산을 위해 필요한 시간 및 관리 비용이 크게 감소되는 효과를 얻을 것으로 생각된다.

결론

사람과 유사한 면역학적 특성을 보유한 영장류에 돼지의 장기를 이식하면 이식된 장기가 손상되면서 폐사하게 되는 거부반응이 발생한다. 이 거부반응은 사람 및 영장류에는 존재하지 않는 돼지의 항원과 이에 대한 사람 및 영장류에 존재하는 항체의 면역반응에 의해 발생한다. 가장 잘 알려진 항원인 Gal의 합성효소인 Gal-T의 기능이 우선적으로 제거되어야 하며, 추가로 면역반응을 억제시킬 수 있는 보체 조절 단백질이 과발현되면 면역 거부 반응이 효과적으로 제어될 것이라고 제안되었다. 이에 본 연구에서는 *EF1a* 프로모터의 조절에 의해 *MCP* 과발현을 유도하는 카세트를 제작하였고, 이를 *Gal-T* 좌위에 삽입시킬 수 있는 벡터를 제작한 후 자성 돼지 섬유아세포에 nucleofection 방법으로 도입하였다. 선별 과정을 거쳐 40개의 클론을 확보하였고 PCR 스크리닝을 통해 4개의 클론에서 *MCP* 과발현 카세트가 *Gal-T* 좌위에 삽입된 것을 확인하였다. 이 클론은 양적 역전사 중합효소 연쇄반응 방

법으로 *Gal-T*의 발현량이 감소한다는 것을 보여주었다. 반면에, *MCP*의 발현량은 증가하며, 세포 표면에서 효과적으로 발현된다는 것을 보여주었다.

참고 문헌

- Adams DH, Kadner A, Chen RH and Farivar RS. 2001. Human membrane cofactor protein (MCP, CD 46) protects transgenic pig hearts from hyperacute rejection in primates. *Xenotransplantation* 8: 36-40.
- Ahn KS, Kim YJ, Kim M, Lee BH, Heo SY, Kang MJ, Kang YK, Lee JW, Lee KK, Kim JH, Nho WG, Hwang SS, Woo JS, Park JK, Park SB and Shim H. 2011. Resurrection of an alpha-1,3-galactosyltransferase gene-targeted miniature pig by recloning using postmortem ear skin fibroblasts. *Theriogenology* 75: 933-939.
- Chen G, Qian H, Starzl T, Sun H, Garcia B, Wang X, Wise Y, Liu Y, Xiang Y, Copeman L, Liu W, Jevnikar A, Wall W, Cooper DK, Murase N, Dai Y, Wang W, Xiong Y, White DJ and Zhong R. 2005. Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys. *Nat. Med.* 11: 1295-1298.
- Dai Y, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, Monahan JA, Jobst PM, McCreath KJ, Lamborn AE, Cowell-Lucero JL, Wells KD, Colman A, Polejaeva IA and Ayares DL. 2002. Targeted disruption of the alpha 1,3-ga-

- lactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat. Biotechnol.* 20: 251-255.
- Davila E, Byrne GW, LaBrecche PT, McGregor HC, Schwab AK, Davies WR, Rao VP, Oi K, Tazelaar HD, Logan JS and McGregor CG. 2006. T-cell responses during pig-to-primate xenotransplantation. *Xenotransplantation* 13: 31-40.
- Dickens S, Van den Berge S, Hendrickx B, Verdonck K, Lutun A and Vranckx JJ. 2010. Nonviral transfection strategies for keratinocytes, fibroblasts, and endothelial progenitor cells for *ex vivo* gene transfer to skin wounds. *Tissue Eng. Part C Methods* 16: 1601-1608.
- Ekser B, Klein E, He J, Stolz DB, Echeverri GJ, Long C, Lin CC, Ezzelarab M, Hara H, Veroux M, Ayares D, Cooper DK and Gridelli B. 2012. Genetically-engineered pig-to-baboon liver xenotransplantation: histopathology of xenografts and native organs. *PLoS one* 7: e29720.
- Ekser B, Long C, Echeverri GJ, Hara H, Ezzelarab M, Lin CC, de Vera ME, Wagner R, Klein E, Wolf RF, Ayares D, Cooper DK and Gridelli B. 2010. Impact of thrombocytopenia on survival of baboons with genetically modified pig liver transplants: clinical relevance. *Am. J. Transplant.* 10: 273-285.
- Ekser B, Rigotti P, Gridelli B and Cooper DK. 2009. Xenotransplantation of solid organs in the pig-to-primate model. *Transpl. Immunol.* 21: 87-92.
- Fodor WL, Williams BL, Matis LA, Madri JA, Rollins SA, Knight JW, Velander W and Squinto SP. 1994. Expression of a functional human complement inhibitor in a transgenic pig as a model for the prevention of xenogeneic hyperacute organ rejection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 11153-11157.
- Gresch O, Engel FB, Nestic D, Tran TT, England HM, Hickman ES, Korner I, Gan L, Chen S, Castro-Obregon S, Hammermann R, Wolf J, Muller-Hartmann H, Nix M, Siebenkotten G, Kraus G and Lun K. 2004. New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods* 33: 151-163.
- Harrison SJ, Guidolin A, Faast R, Crocker LA, Giannakis C, D'Apice AJ, Nottle MB and Lyons I. 2002. Efficient generation of alpha(1,3) galactosyltransferase knockout porcine fetal fibroblasts for nuclear transfer. *Transgenic Res.* 11: 143-150.
- Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, Queisser AL, Carnwath JW, Lucas-Hahn A, Zhang L, Meng X, Gregory PD, Schwinzer R, Cost GJ and Niemann H. 2011. Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: 12013-12017.
- Klymiuk N, Aigner B, Brem G and Wolf E. 2010. Genetic modification of pigs as organ donors for xenotransplantation. *Mol. Reprod. Dev.* 77: 209-221.
- Ko N, Lee JW, Hwang SS, Kim B, Ock SA, Lee SS, Im GS, Kang MJ, Park JK, Jong Oh S and Bong Oh K. 2013. Nucleofection-mediated alpha 1,3-galactosyltransferase gene inactivation and membrane cofactor protein expression for pig-to-primate xenotransplantation. *Anim. Biotechnol.* 24: 253-267.
- Kolber-Simonds D, Lai L, Watt SR, Denaro M, Am S, Augenstein ML, Betthausen J, Carter DB, Greenstein JL, Hao Y, Im GS, Liu Z, Mell GD, Murphy CN, Park KW, Rieke A, Ryan DJ, Sachs DH, Forsberg EJ, Prather RS and Hawley RJ. 2004. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 7335-7340.
- Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ and Prather RS. 2002. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295: 1089-1092.
- Lin CC, Ezzelarab M, Shapiro R, Ekser B, Long C, Hara H, Echeverri G, Torres C, Watanabe H, Ayares D, Dorling A and Cooper DK. 2010. Recipient tissue factor expression is associated with consumptive coagulopathy in pig-to-primate kidney xenotransplantation. *Am. J. Transplant.* 10: 1556-1568.
- Liszewski MK, Kemper C, Price JD and Atkinson JP. 2005. Emerging roles and new functions of CD46. *Springer Semin. Immunopathol.* 27: 345-358.
- Londrigan SL, Brady JL, Sutherland RM, Hawthorne WJ, Thomas HE, Jhala G, Cowan PJ, Kay TW, O'Connell PJ and Lew AM. 2007. Evaluation of promoters for driving efficient transgene expression in neonatal porcine islets. *Xenotransplantation* 14: 119-125.
- Macchiarini P, Oriol R, Azimzadeh A, de Montpreville V, Rieben R, Bovin N, Mazmanian M and Dartevelle P. 1998. Evidence of human non-alpha-galactosyl antibodies involved in the hyperacute rejection of pig lungs and their removal by pig organ perfusion. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 116: 831-843.
- Macher BA and Galili U. 2008. The Galalpha1,3Galbeta1,4GlcNAc-R (alpha-Gal) epitope: a carbohydrate of unique evolu-

- tion and clinical relevance. *Biochim. Biophys. Acta.* 1780: 75-88.
- McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KH, Colman A, Schnieke AE and Kind AJ. 2000. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 405: 1066-1069.
- Miyagawa S, Yamamoto A, Matsunami K, Wang D, Takama Y, Ueno T, Okabe M, Nagashima H and Fukuzawa M. 2010. Complement regulation in the Gal-T KO era. *Xenotransplantation* 17: 11-25.
- Nakayama A, Sato M, Shinohara M, Matsubara S, Yokomine T, Akasaka E, Yoshida M and Takao S. 2007. Efficient transfection of primarily cultured porcine embryonic fibroblasts using the Amaxa nucleofection system. *Cloning Stem Cells* 9: 523-534.
- Niemann H, Verhoeven E, Wonigeit K, Lorenz R, Hecker J, Schwinzer R, Hauser H, Kues WA, Halter R, Lemme E, Herrmann D, Winkler M, Wirth D and Paul D. 2001. Cytomegalovirus early promoter induced expression of hCD59 in porcine organs provides protection against hyperacute rejection. *Transplantation* 72: 1898-1906.
- Nottle MB, Beebe LF, Harrison SJ, McIlpatrick SM, Ashman RJ, O'Connell PJ, Salvaris EJ, Fiscaro N, Pommey S, Cowan PJ and d'Apice AJ. 2007. Production of homozygous alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by breeding and somatic cell nuclear transfer. *Xenotransplantation* 14: 339-344.
- Petersen B, Ramackers W, Tiede A, Lucas-Hahn A, Herrmann D, Barg-Kues B, Schuettler W, Friedrich L, Schwinzer R, Winkler M and Niemann H. 2009. Pigs transgenic for human thrombomodulin have elevated production of activated protein C. *Xenotransplantation* 16: 486-495.
- Phelps CJ, Ball SF, Vaught TD, Vance AM, Mendicino M, Monahan JA, Walters AH, Wells KD, Dandro AS, Ramsoondar JJ, Cooper DK and Ayares DL. 2009. Production and characterization of transgenic pigs expressing porcine CTLA4-Ig. *Xenotransplantation* 16: 477-485.
- Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen SH, Ball S, Specht SM, Polejaeva IA, Monahan JA, Jobst PM, Sharma SB, Lamborn AE, Garst AS, Moore M, Demetris AJ, Rudert WA, Bottino R, Bertera S, Trucco M, Starzl TE, Dai Y and Ayares DL. 2003. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 299: 411-414.
- Ramirez P, Montoya MJ, Rios A, Garcia Palenciano C, Majado M, Chavez R, Munoz A, Fernandez OM, Sanchez A, Segura B, Sansano T, Acosta F, Robles R, Sanchez F, Fuente T, Cascales P, Gonzalez F, Ruiz D, Martinez L, Pons JA, Rodriguez JI, Yelamos J, Cowan P, d'Apice A and Parrilla P. 2005. 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.* 37: 4103-4106.
- Ramsoondar JJ, Machaty Z, Costa C, Williams BL, Fodor WL and Bondioli KR. 2003. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-knockout cloned pigs expressing human alpha 1,2-fucosyltransferase. *Biol. Reprod.* 69: 437-445.
- Sheyn D, Pelled G, Zilberman Y, Talasazan F, Frank JM, Gazit D and Gazit Z. 2008. Nonvirally engineered porcine adipose tissue-derived stem cells: use in posterior spinal fusion. *Stem Cells* 26: 1056-1064.
- Skrzyszowska M, Samiec M, Slomski R, Lipinski D and Maly E. 2008. Development of porcine transgenic nuclear-transferred embryos derived from fibroblast cells transfected by the novel technique of nucleofection or standard lipofection. *Theriogenology* 70: 248-259.
- Takahagi Y, Fujimura T, Miyagawa S, Nagashima H, Shigehisa T, Shirakura R and Murakami H. 2005. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase gene knockout pigs expressing both human decay-accelerating factor and N-acetylglucosaminyltransferase III. *Mol. Reprod. Dev.* 71: 331-338.
- White DJ, Cozzi E, Langford G, Oglesby T, Wang MW, Wright L and Wallwork J. 1995. The control of hyperacute rejection by genetic engineering of the donor species. *Eye* 9 (Pt 2): 185-189.
- Yang YG and Sykes M. 2007. Xenotransplantation: current status and a perspective on the future. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 519-531.
- Zhou CY, McInnes E, Parsons N, Langford G, Lancaster R, Richards A, Pino-Chavez G, Dos Santos Cruz G, Copeman L, Carrington C and Thompson S. 2002. Production and characterization of a pig line transgenic for human membrane cofactor protein. *Xenotransplantation* 9: 183-190.