



α 1,3-Galactosyltransferase 유전자 위치에 사람 Decay Accelerating Factor와 α 1,2-Fucosyltransferase 유전자가 Knock-in된 미니돼지 체세포

김 지 우 · 강 만 종[†]

전남대학교 농업생명과학대학 동물자원학부

Knock-in Somatic Cells of Human Decay Accelerating Factor and α 1,2-Fucosyltransferase Gene on the α 1,3-Galactosyltransferase Gene Locus of Miniature Pig

Ji Woo Kim and Man-Jong Kang[†]

Department of Animal Science, College of Agriculture & Life Science, Chonnam National University, Korea

ABSTRACT

Galactose- α 1,3-galactose (α 1,3-Gal) epitope is synthesized at a high concentration on the surface of pig cells by α 1,3-galactosyltransferase gene (GGTA1). The α 1,3-Gal is responsible for hyperacute rejection in pig-to-human xenotransplantation. The generation of transgenic pigs as organ donors for humans is necessary to eliminate the GGTA1 gene that synthesizes Gal α (1,3)Gal. To prevent hyperacute graft rejection in pig-to-human xenotransplantation, previously, we developed α 1,3-galactosyltransferase gene-knock-out somatic cell by homologous recombination. In this study, we established cell lines of α 1,3-GT knock-out expressing hDAF and hHT gene from minipig fibroblasts to apply somatic cell nuclear transfer. The hDAF and hHT mRNA were expressed in the knock-in somatic cells and α 1,3-GT mRNA was suppressed. However, the knock-in somatic cells were increased resistance to human serum-mediated cytotoxicity.

(Key word : Somatic cells, Knock-in, Gene targeting, Xenotransplantation)

서 론

2010년 United Network for Organ Sharing(UNOS)에서 보고된 자료에 따르면, 심장이식을 기다리는 자는 4,145명으로 이중 이식이 가능한 자는 2,198명으로 50% 밖에 되지 않는 수치이다. 심장뿐 아니라, 대부분의 장기이식 수용자는 늘고 있지만, 공여자는 부족한 실정에 서로 다른 종간의 장기나 세포 이식은 이 문제를 해결하기 위한 해결책 중의 하나로 많은 연구가 수행되고 있다(Cargnoni 등, 2009; Mei 등, 2009). 이종 간의 장기이식에 따른 치료 목적에 이용할 수 있는 동물자원으로써 돼지는 인간 장기의 부족한 실정을 극복해 나갈 수 있는 대체자원 중의 한 가지이다(Levy 등, 2001). 그러나 사람에게 돼지 장기를 이식하는 데 있어서 발생하는 면역학적 문제는 자연적으로 일어나는 면역체계와 anti-gal 항체의 중요한 역할

과 관련이 있다고 보고되고 있다(Morgan, 1995; Levy 등, 2001).

이종 간의 장기 이식은 수 분만에 장기의 기능을 정지시킬 수 있는 초급성 거부반응(Hyperacute rejection)을 시작으로 급성 거부반응(Acute vascular rejection), 세포성 거부반응(Cellular rejection), 만성 거부반응(Chronic rejection)으로 4단계의 거부반응을 일으킨다. 내피세포의 외래 항원에 자연적으로 반응하는 항체에 결합하기 시작하면 수분에서 수 시간 이내에 초급성 거부반응(Hyperacute xenograft rejection, HAR)이 일어난다고 보고되고 있다(Cooper 등, 1993; Shimizu와 Yamada, 2006). 급성 거부반응은 1주일~3개월에 발생하는 경우가 많으며, 수여자의 면역세포가 외래 장기를 인지하여 공격함으로써 발생하는 거부반응으로 혈액응고에 의한 혈전 형성과 허혈 증상 등 혈관 이상 증상이 발생한다. 세포성 거부반응은 주로 allotransplantation의 혼한 거부반응으로 T림프구가 이

* This study was supported by a grant (PJ00784904) from the Woo Jang-Choon projects from the Rural Development Administration, Republic of Korea.

[†] Corresponding author : Phone: +82-62-530-2113, E-mail: mjkgang@jnu.ac.kr

중장기이식 시 발생하는 거부반응에 직접적으로 작용할 수 있다는 연구 결과가 보고된 바 있다. 만성 거부반응은 수개월에서 수년 이후에 서서히 발병하며, 이식장기 세포에 대한 항체가 보체 등과 협동해서 상해를 주는 거부반응이다(Shimizu와 Yamada, 2006).

초급성거부반응(Hyperacute rejection)은 동물의 장기를 인간에게 이식할 때, 돼지의 혈관세포 표면에 붙은 당분자에 인간의 항체가 즉각 반응하여 일어나는 거부반응으로 알려져 있다(Platt와 Lin, 1998; Cooper 등, 1993; Sandrin 등, 1993). Gal α (1,3)Gal 당분자는 돼지, 마우스, new world monkeys에는 존재하지만, 인간과 old world monkeys에는 부재한다고 알려져 있으며, Xenogeneic natural antibody (XNA)에 의해 인식되는 당사슬항원(carbohydrate epitope)은 대부분이 Gal α (1,3)Gal 당분자로 α 1,3-galactosyltransferase (α 1,3-GT) 유전자가 Gal α (1,3)Gal 당분자 생성에 관여한다고 보고되어 있다(Blanken와 Van den Eijnden, 1985; Galili 등, 1987; Koren 등, 1992). α 1,3-GT 유전자를 제거시키는 것은 초급성거부반응을 극복하기 위한 방법 중 하나로, α 1,3-GT 유전자를 knock-out시킨 돼지가 생산되었다(Lai 등, 2002; Dai 등, 2002). α 1,3-GT 유전자를 knock-out 시킨 돼지 장기의 이식은 초급성 거부반응을 억제할 수 있었지만, 초급성 거부반응에 이은 급성 거부반응을 극복하기 위해서는 더 연구가 필요하다.

더 나아가, 초급성거부반응을 더욱 효과적으로 억제하기 위하여 기증자의 세포와 조직을 변화시켜 human complement inhibitor를 발현하게 하는 방법으로 접근하는 방법도 제시되고 있다. 이러한 접근으로 human complement inhibitor인 human CD59나 human decay accelerating factor(hDAF)를 porcine aortic endothelial cells(PAECs)에서 발현시킨 결과, human serum의 따른 cytolysis가 줄어든 것으로 보고되고 있다(Lachmann, 1991; Kennedy 등, 1996).

또한 Gal α (1,3)Gal의 발현을 줄이기 위하여 human α 1,2-fucosyltransferase (hHT)의 발현을 이용하는 접근 방법도 있다. hHT는 세포 표면에 Fucose 당을 붙이며, HT가 발현하는 세포에서는 Gal α (1,3)Gal이 감소하는데, 이것은 human antibody reactivity와 serum-mediated cytolysis의 감소를 야기시킨다고 알려지고 있다(Chen 등, 1996; Koike 등, 1996; Sharma 등, 1996; Cohny 등, 1997).

그러므로, 본 연구의 목적은 보다 효과적으로 초급성거부반응을 억제하기 위하여 α 1,3-GT 유전자 위치에 human complement inhibitor인 hDAF와 hHT가 knock-in된 체 세포를 개발하는 데 있다.

재료 및 방법

α 1,3-Galactosyltransferase 유전자 위치에서 hDAF와 HT 유전자가 발현하는 knock-in vector 제작

Knock-in vector는 돼지 α 1,3-GT genome 5' 영역 5.6kb의 fragment를 left arm으로 이용하였으며, 돼지 α 1,3-GT genome 3' 영역 2.5kb의 fragment를 right arm으로 이용하여 구축하였다. 또한 positive selection marker로는

neo 유전자를 이용하였으며, negative selection marker로는 DT-A 유전자를 이용하여 positive-negative 선별이 가능한 knock-in vector를 구축하였다. Knock-in vector는 돼지 α 1,3-GT의 exon 4의 start codon 위치에 hDAF, IRES, hHT를 순차적으로 연결하여 다음과 같이 제작하였다. Vector를 세포로 도입하였을 때 세포질에서 세포의 핵내로 vector가 도입되는데 관여하고 있는 것으로 알려진 nls sequence는 pEGFP-N3 DNA를 template로 하여 *NotI* restriction enzyme site가 삽입된 primer(GCGGCCGCGATTTCGGAGTTA)와 *XhoI* restriction enzyme site가 삽입된 primer(CTCGAGCCAGCTGTGGAATG)로 PCR 증폭하고 pGEM T-easy vector(promega, USA)에 subcloning하였다. Knock-in vector의 5'arm 부분의 구축을 위하여 5' fragment는 *Sall* restriction enzyme site가 삽입된 primer(GTCGACCAACTGGATCCTTAACCCATTGAGCGGTCCA)와 *NcoI* restriction enzyme site가 삽입된 primer(CCATGGTTTTCTCCTGGGAAAAGAAAAGGAGAAGGAAAATT)로 PCR 증폭하고, pGEM T-easy vector에 subcloning하였다. pGEM T-easy vector에 subcloned된 nls와 5'arm 부분을 *NotI-XhoI*과 *Sall-NcoI* 제한효소 처리하여 insert를 제조하고, *NcoI-NotI* 제한효소를 이용하여 다시 pGEM T-easy vector에 3 fragment ligation하였다. hDAF는 hDAF/T-easy vector를 template로 사용하였고, start codon ATG 위치 앞쪽 primer(TCACTAGTGATTCTAGGAATTCATG)와 *Sall* restriction enzyme site를 삽입한 primer(GTCGACGGGATCCCTAAGTCAGCAA)를 이용하여 PCR 증폭하여 pGEM T-easy vector에 subcloning하였다. 본 연구에서 사용한 hDAF/T-easy vectors는 한국생명공학연구원 강용국 박사로부터 제공받았다. nls와 5'arm이 subcloned된 pGEM T-easy vector를 *NcoI-NotI* 제한효소 처리하고 hDAF는 *BspHI-Sall* 제한효소 처리하여 insert를 제조한 후, 이를 *NotI-Sall* 제한효소 처리한 pMCDT-A vector에 3 fragment ligation 하여 pDT-nls-GT5-hDAF plasmid를 확보하였다. IRES 부분은 *Sall* restriction enzyme site를 삽입한 sense primer (GTCGACCATGCATCTAGGGC)와 antisense primer (GGGTCCACTCTAGAGGATCC)를 이용하여 PCR 증폭하였으며, pGEM T-easy vector에 subcloning하였다. hHT 유전자는 *EcoRV* restriction enzyme site를 삽입한 primer(GATATCCTGCAAGCAGCTCGGCCATG)와 3'는 stop codon 뒤 쪽으로 *BamHI* restriction enzyme site를 삽입한 primer(GGATCCTCAAGGCTTAGCCAATGTC)를 이용하여 PCR 증폭하여 pGEM T-easy vector에 subcloning하였다. Sequence를 확인하고 *EcoR V-BamHI* 로 절단하여 hHT insert를 준비하고 *EcoR V-BamHI* 제한효소 처리한 pBluescript KS vector를 제조하여 insert와 vector를 연결하여 pBKS-HT plasmid를 제조하였다. 앞에서 준비한 *Sall - Smal* IRES insert를 pBKS-HT/*Sal I-EcoR V* vector에 연결하여 pBKS-IRES-HT plasmid를 준비하였다. SV40 poly A를 연결은 PCR에 의해 Poly A의 5'에 *BamHI* restriction enzyme site를 삽입(GGATCCTCGCCCTTCCCAACAGTT)하고, 3'에 *XbaI* restriction enzyme site가 삽입된 primer(TCTAGATTAAGATACATTGATGAGTT)을 제조하고 PCR 증폭하여 pGEM T-easy vector에 subcloning하였다. pGEM T-

easy vector에 Poly A를 연결하여 얻은 plasmid는 *BamHI-Xba1*으로 절단하여 insert를 제작하였고, pBKS-IRES-HT plasmid를 *BamHI-Xba1*으로 제한효소 처리하여 vector를 제작하였으며, polyA insert와 vector를 연결시켜 pBKS-IRES-HT-polyA plasmid를 제조하였다. Knock-in vector의 3' arm 부분은 다음과 같이 PGK-neo와 α 1,3-GT 3' fragment를 연결시켰다. PGK-neo는 *Xba1* restriction enzyme site을 삽입한 5' primer(TCTAGATACCGGGTAGGGGAGCGCT)와 *HindIII* restriction enzyme site을 삽입한 3' primer(AAGCTTTCAGAAGAAGACTCGTCAAGA)을 준비된 PGK-neo plasmid를 이용하여 PCR 증폭한 후 pGEM T-easy vector에 subcloning하여 T-easy/PGK-neo plasmid를 확보하였다. α 1,3-GT 3' fragment는 5' 쪽에 *HindIII* restriction enzyme site가 삽입된 primer(AAGCTTAATGTCA AAGGAAGAGTGGTTCTG)와 3'쪽에 *SmaI* restriction enzyme site가 삽입된 primer(CCCGGGGGAAGCTTGCT CTTCTGTTAGATTC)을 이용하여 PCR 증폭한 후 pGEM T-easy vector에 subcloning하여 pGEM T-easy vector/ α 1,3-GT 3' fragment plasmid를 확보하였다. pGEM T-easy/PGK-neo plasmid를 *Xba1-HindIII*으로 절단하여 insert를 준비하고, pGEM T-easy/ α 1,3-GT 3' fragment plasmid를 *HindIII-SmaI*으로 제한효소 처리하여 insert를 준비하였다. 그리고 준비된 insert 2개를 pBluescript SK에 3 fragment ligation 시켜 pBSK-neo- α 1,3-GT 3' plasmid를 구축하였다. 준비된 pBluescript KS-IRES-HT-polyA vector를 *Sall-Xba1*으로 절단하고, pBluescript SK-neo- α 1,3-GT 3' fragment vector를 *Xba1-SmaI*으로 절단하여 각각 insert를 준비하고, pMCDT-A vector를 *Sall-SmaI*으로 절단하여 준비한 후 3 fragment ligation 하여 pDT-IRES-HT-polyA-neo-GT3' plasmid를 제조하였다. 앞에서 제조한 pDT-IRES-HT-polyA-neo-GT3' plasmid를 *NotI-Sall*으로 절단한 vector에 pDT-nls-GT5-hDAF plasmid를 *NotI-Sall*으로 절단한 insert를 연결하여 최종 pDT-nls-GT5-hDAF-IRES-hHT-polyA-neo-GT3'가 구축되었다. 본 연구에서는 이 vector를 α 1,3GT-hDAF-HT Knock-in vector라고 명명하였으며, 구축한 vector는 *NotI* 제한효소 처리를 통해 직선화하여 미니돼지 귀체세포에 transfection 하였다.

미니돼지 체세포 배양

본 연구에서 사용된 미니돼지는 국립축산과학원에서 사육되고 있는 NIH 미니돼지를 이용하였다. NIH 미니돼지 귀체세포는 조직배양 방법에 의하여 확보하였으며, 일반적인 세포배양을 위한 배지로는 15% defined Fetal Bovine Serum(Hyclone, USA), 1Xnon-essential amino acid(Welgene, Korea), 10^{-4} M β -mercaptoethanol(Sigma, USA), 100 unit/ml penicillin(Hyclone, USA), 100 ug/ml streptomycin(Hyclone, USA)을 포함하는 DMEM을 이용하였다. 일반적인 계대배양은 8×10^5 세포를 0.1% gelatin 처리된 10 cm culture dish에서 배양하였으며, 90% confluent할 때 계대 배양하였다.

미니돼지 체세포에 knock-in vector 도입과 세포 선별

Knock-in vector를 NIH 미니돼지 귀체세포에 도입하

기 위하여 electroporation 방법을 사용하였다. 미니돼지 체세포는 15% defined FBS, 1Xnon-essential amino acid, 10^{-4} M β -mercaptoethanol, 100 unit/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin이 첨가된 DMEM 배지에서 배양하였다. Transfection에 사용할 배양 중인 세포는 0.25% trypsin 처리 후 50 ml tube에 회수하였다. 50 ml tube에 회수한 세포는 hemocytometer을 이용하여 세포수를 계산한 후, 실온에서 800 rpm으로 5 min간 원심 후 상층의 배양액을 제거하였다. 회수한 세포는 차갑게 준비한 Ham's F-10 배지 20 ml로 현탁하여 다시 세포수를 계산하였으며, 실온에서 800 rpm으로 5 분동안 원심 후 배지를 제거하였다. Transfection에 사용할 최종세포는 1.2×10^7 /ml가 되도록 Ham's F-10 배지로 현탁하였으며, 이 세포 현탁액 400 ul와 직선화된 knock-in vector 10 ug/100 ul Ham's F-10 배지를 혼합한 후 4mm gap cuvette(BTX, USA)에 넣은 후 BTX Electro-cell manipulator(ECM 2001, BTX, USA)에 장착한 다음 450 V, 4 pulse, 1 ms으로 전기충격을 실시하였다. Electroporation 후 얼음 위에 큐벳을 10분간 방치 후 electroporation된 세포를 10 ml 배양액으로 옮겨 현탁한 다음 48well plate의 1 well에 2,500개 세포를 접종하였다. Transfection된 세포는 배양액에 300 ug/ml G418 (Gibco BRL Co., USA) 항생제를 이용하여 12일간 선별하였다. 선별을 위한 배양액은 3일 간격으로 교환하였다.

Knock-in된 체세포의 PCR 분석

G418 처리로 선별된 세포는 24 well에서 12 well로 계대배양할 때 500 ul 중 100 ul를 0.5 ml tube에 옮겨 4°C에서 10,000 rpm으로 10분 원심하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포는 멸균증류수 44 ul에 현탁한 후, 100°C에서 10분 동안 처리하였다. 처리 후 얼음에서 2분간 방치하고, Proteinase K(10 mg/ml) 1 ul를 첨가하여 55°C에서 130분 동안 배양하였고, 다시 얼음에서 2분 방치 후, 100°C에서 5분간 배양하였다. 100°C 배양 후에 가볍게 원심하여 총 45 ul 중 20 ul를 PCR 분석의 주형으로 사용하여 1차 PCR을 수행하였으며, 2차 PCR에서는 체세포로부터 분리한 genome DNA 100 ng을 사용하였다. PCR 반응은 Neo 3'-1(sense primer)과 HT DAF KI 3' primer 1(antisense primer)을 이용하고, 10×Tag buffer, EX tag(TAKARA, Japan), 250 uM dNTP mixture을 이용하여 94°C에서 30초간 denaturation, 68°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 4분간 extension 조건으로 수행하였다. 총 50 ul의 PCR 산물 중 20 ul를 0.8% agarose gel에서 전기 영동하여 증폭 여부를 확인하였다. Long PCR은 세포에서 추출한 genomic DNA를 주형으로 사용하였으며, Primer는 KI PCR2 SII (sense primer)와 HT DAF KI 3' primer 1(antisense primer)를 이용하고, 10×Tag buffer, LA tag(TAKARA, Japan), 250 uM dNTP mixture을 이용하여 94°C에서 30초간 denaturation, 68°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 10분간 extension을 조건으로 수행하였다. 총 50 ul의 PCR 산물 중 20 ul를 0.8% agarose gel에서 전기 영동하여 확인하였다. 각 primer의 염기서열은 Table 1에 제시하였다.

RT-PCR과 Real-time PCR

Table 1. The primer sequence for PCR, RT-PCR and Real-time PCR

	Primer name	Sequence
PCR	Neo3'-1(S)	TCGTGCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATT
	HT DAF KI 3' primer 1 (AS)	GCCTACACAAGCATCTCAACTCAGGTCAGG
Long PCR	KI PCR2 SII(S)	AGGTAGAACGCACTCCTTAGCGCTCGTTGA
	HT DAF KI 3' primer 1(AS)	GCCTACACAAGCATCTCAACTCAGGTCAGG
RT-PCR and Real-time PCR	H2a (S)	GAGTACCTGACCGCGGAA
	H2a (AS)	GGCTCTCCGTCTTCTTGG
	α 1,3-GT (S)	GAGTTGGAACGCAGCACCTTCCCTT
	α 1,3-GT (AS)	TATCCAGAACAAAGAACCCTTCTGGG
	hDAF (S)	CGTACAAATGTGAAGAAAGC
	hDAF (AS)	GGTACATCAATCTGACCATT
	hHT (S)	ATCTGCCACCTGCAAGCAGCTCGGCCATGT
	hHT (AS)	GCCTCAAGGCTTAGCCAATGTCCAGAGTG

Control 세포로 사용된 NIH 미니돼지 귀체세포와 hDAF/hHT knock-in vector가 도입된 세포는 10 cm culture dish에서 배양하여 90% 정도 confluent할 때 1×PBS를 이용해 회수하였다. 회수한 세포는 RNeasy mini kit(QIAGEN, USA)를 사용하여 total RNA를 추출하였으며, 그 중 5 ug을 Superscript II RNaseH-reverse transcriptase(Invitrogen, USA)와 random primer를 이용하여 cDNA에 이용하였으며, 이 cDNA를 주형으로 다음과 같이 α 1,3-GT, hDAF, hHT의 발현을 확인하였다. 먼저, 각각의 유전자 발현을 확인하기 위한 PCR 반응에 사용된 primer는 Table 1에서 나타낸 바와 같다. PCR 반응을 위한 조성은 각각의 primer 10 pmole, 10×PCR buffer, EX HS tag(TAKARA, Japan), 250 uM dNTP mixture을 포함하며, PCR 조건은 H2a는 94°C에서 30초간 denaturation, 63°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension으로 33 cycle 수행하였다. α 1,3-GT는 94°C에서 30초간 denaturation, 63°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 40초간 extension으로 28 cycle을, hDAF는 94°C에서 30초간 denaturation, 51°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension으로 33 cycle을, hHT는 94°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분 20초간 extension으로 28 cycle 증폭하였다. 증폭 여부는 2% agarose gel에서 전체 50 ul의 PCR 반응액 중 20 ul를 전기 영동하여 확인하였다.

α 1,3-GT의 발현을 확인하기 위한 real-time PCR 반응은 SYBR green PCR Kit(QIAGEN, Germany)와 Roter-Gene 3000 system(Corbett Research)을 이용하여 아래와 같이 수행하였다. Template는 1st cDNA 40 ng을 이용하였으며, primer는 RT-PCR에서 사용한 α 1,3-GT의 primer와 같은 것을 이용하였다. PCR 조건은 94°C에서 15초간 denaturation, 50°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 20초간 extension으로 45cycle 증폭하였다. 유전자 발현의 상대적 정량은 Δ Ct값(시료의 Ct값 - H2a RNA의 Ct값)을 계산하고 난 다음 $\Delta\Delta$ Ct값(시료의 Δ Ct값 - internal control H2a의 Δ Ct값)를 구하여 internal control H2a의 발현을 1로 보았을 때의 상대적 정량을 $2^{-\Delta\Delta$ Ct값으로 계산하였다. Real-time PCR은 3반복 실시하였으며, 같은 real-time PCR 조

건에서 H2a를 internal control로 함께 실시하였다.

Cytotoxicity assay

Cytotoxicity assay는 먼저, NIH 미니돼지 귀체세포와 hDAF/hHT Knock-in vector가 도입된 세포를 24 well culture plate의 각 1 well당 5,000개/100 ul를 접종 후 37°C, CO₂ incubator에서 세포가 90% 정도 confluent할 때까지 배양하였다. 세포가 90% 정도 confluent할 때, 1×PBS로 2회 wash 실시한 후, 100% human serum과 100% human complement serum으로 배양액을 교체하여 37°C, CO₂ 배양기에서 2시간 배양하였다. 2시간 배양 후, plate에서 human serum과 human complement serum을 제거하고, 1×PBS로 2회 wash 실시하였으며, 15% FBS가 첨가된 DMEM 배양액으로 교체하여 다시 37°C, CO₂ 배양기에서 2시간 배양하였다. 2시간 배양 후 cytotoxicity assay에 사용할 CCK-8 solution(DOJINDO, Japan)을 각 well당 50 ul씩 첨가하여 37°C, CO₂ 배양기에서 2시간 배양한 후 450 nm 흡광도에서 OD값을 측정하였다. Cytotoxicity는 3반복 실시하였으며, 100% human serum을 처리한 세포의 생존율을 100%로 보았을 때의 상대적 값을 계산하였다.

결과 및 고찰

α 1,3-GT 유전자 위치에서 hDAF와 hHT 유전자가 발현하는 knock-in vector 구축

Fig. 1은 돼지 α 1,3-GT 영역을 이용하여 본 연구에서 제작한 knock-in vector의 전체적인 모식도를 나타내고 있다. α 1,3-GT 위치에서 hDAF와 hHT 유전자가 동시에 발현하는 knock-in vector의 구축은 상동 재조합을 위해 미니돼지의 α 1,3-GT 유전자의 ATG 위치 앞부분 5.6kb를 5' arm 영역으로 이용하였으며, 세포의 핵내로 벡터가 도입되도록 nls를 5' arm의 앞쪽에 연결하였다. α 1,3-GT 3' 영역 2.5kb의 fragment를 3' arm으로 이용하여 knock-

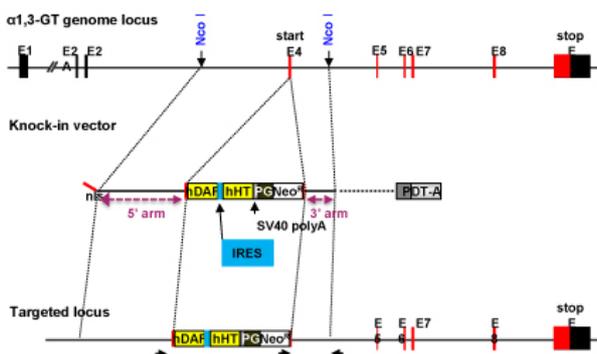


Fig. 1. Construction of α 1,3GT-hDAF-hHT knock-in vector. A α 1,3GT-hDAF-hHT knock-in vector for positive-negative selection (PNS) consists of the neomycin resistance gene (neo) as a positive selectable marker gene and the diphtheria toxin A fragment (DT-A) gene as a negative selectable marker gene. The positions of primers used for PCR and long PCR are indicated by short arrow.

in vector를 구축하였다. hDAF와 hHT는 동시에 발현할 수 있도록 Internal ribosome entry site(IRES)를 이용하여 연결하였으며, 구축된 knock-in vector를 세포에 삽입한 후 삽입된 세포만을 선별하기 위하여 positive selection marker로 neo 유전자를 사용하였고, negative marker로 DT-A를 사용하였다. α 1,3-GT 위치에서 hDAF와 hHT가 발현할 수 있도록 α 1,3-GT 유전자의 exon 4 ATG 위치에 hDAF-IRES-HT의 ATG 위치를 일치시켰다. 이러한 α 1,3GT-hDAF-hHT Knock-in vector는 상동유전자 재조합에 의하여 α 1,3-GT 유전자 위치에 삽입되면 α 1,3-GT는 knock-out되고, hDAF와 hHT는 α 1,3-GT 유전자의 gene regulatory sequence을 전체적으로 이용하여 발현할 수 있도록 제조하였다.

α 1,3-GT 유전자가 knock-out된 돼지의 생산이 보고된 바 있으며, 이는 α 1,3-GT 유전자가 제거되었어도 임신이나 출산에 있어 문제가 없음을 보고하고 있다(Lai 등, 2002; Dai 등, 2002). 따라서 돼지 α 1,3-GT 유전자의 ATG site에 IRES에 의하여 hDAF와 hHT가 연결된 유전자의 ATG site를 일치시키게 한다면 α 1,3-GT 유전자는 knock-out되면서 hDAF와 hHT 유전자를 knock-in 하여 α 1,3-GT 유전자 영역의 promoter와 enhancer 등의 gene regulatory sequence에 의해 발현할 수 있을 것으로 추측된다. 이를 통해 α 1,3-GT 유전자가 발현하는 만큼 hDAF와 hHT 유전자가 발현될 것으로 생각된다. 본 연구에서는 α 1,3-GT 유전자 영역을 이용하여 knock-in vector를 구축하였고, 상동 유전자 재조합을 통해 세포에 knock-in vector의 도입 유무를 확인하기 위한 방법으로 positive-negative selection을 이용하였다. Positive selection marker로 neo 유전자를 사용하였고, negative selection marker로는 diphtheria toxin A (DT-A) 유전자를 사용하였다. Diphtheria toxin A fragment는 cytoplasm에서 elongation factor 2 (EF-2)을 불활성화 시켜 단백질 합성을 억제하고 세포 사멸을 일으킨다(Yamaizumi 등, 1978)고 알려져 있으며 knock-in vector가 비특이적으로 삽입되면 DT-A 유전자가 발현하여 세포가 사멸하게 된다. 이러한 positive-

negative selection marker를 이용한 gene targeting vector는 생쥐 ES cell을 이용한 gene targeting에 이용되어져 왔다(Yanagawa 등, 1999). 따라서 본 연구에서 구축한 knock-in vector도 positive selection marker로 neo 유전자와 negative selection marker로 DT-A 유전자를 가지고 있으므로 돼지 체세포에서 정상적으로 기능하여 knock-in vector 도입 세포의 선별이 가능할 것으로 생각된다.

α 1,3GT-hDAF-hHT knock-in vector 도입 및 선별

본 실험에서 α 1,3GT-hDAF-hHT knock-in vector를 NIH 미니돼지 귀 체세포 5×10^6 에 electroporation으로 도입하였다. Transfection된 세포는 12일 동안 G418을 300 ug/ml의 농도로 처리하여 선별하였으며, 상동유전자 재조합이 일어났을 것으로 추정되는 colony만을 pick-up하여 1차 PCR을 수행하였다. 그 결과, Table 1에 나타낸 바와 같이 총 4회 반복에서 174개의 colony를 PCR 분석하였다. 1차 PCR에서 확인된 positive colony는 3개였다. 이들 colony를 계대 배양하여 genome DNA를 회수한 다음, 2차 PCR과 Long PCR로 상동유전자 재조합 여부를 다시 확인하였다.

G418 처리를 통해 선별된 세포는 forward primer로 Neo 유전자 영역의 Neo 3'-1, reverse primer로 knock-in vector 3' arm의 바깥부분의 염기서열을 사용한 HT DAF KI 3'-1을 이용하여 PCR 증폭하였다. PCR 증폭결과는 Fig. 2에서 나타낸 바와 같이, transfection을 통해 상동 재조합이 일어나 α 1,3GT-hDAF-hHT knock-in vector가 도입된 세포 3개에서는 2.7 kb의 band를 확인할 수 있었다.

Transfection을 통해 확보한 knock-in된 세포는 양쪽 염색체의 α 1,3-GT 유전자 위치 중 한쪽만 삽입된 것으로 상동 유전자 재조합이 일어난 대립유전자와 일어난지 않은 대립유전자를 확인하기 위하여 본 연구에서 얻은 총 3개의 colony에서 Long PCR을 수행하였다. Long PCR은 α 1,3GT-hDAF-hHT knock-in vector의 염기서열 바깥부분의 genome 위치의 primer로 forward(KI PCR2 SI)와 reverse(HT DAF KI 3' primer 1)를 이용하였고, 결과는 Fig. 3에서 나타낸 바와 같이, 상동 유전자 재조합이 일어난 것은 7.2kb, 일어난지 않은 것은 2.7kb 위치의 band를 확인하였다.

PCR과 long PCR로 확인된 총 3개의 colony를 24 well, 12 well, 6 well, 10 cm dish로 계대배양하였고, 장시간 배양에 따라 본래의 미니돼지 세포의 핵형(karyotype)에 이상이 있는지 확인하기 위하여 핵형 검사를 실시하였다. 그 결과, Fig. 4에서 나타낸 바와 같이, 100% 미니돼지 핵형과 일치하는 것을 확인하였다.

본 연구에서는 3번의 transfection을 통하여 α 1,3GT-hDAF-hHT Knock-in vector가 도입된 colony를 3개 확보할 수 있었다. Transfection 효율은 vector와 targeted locus 사이의 total homology 길이와 isogenic vector DNA와 locus 등에 의해 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(Hasty 등, 1991). α 1,3-GT 유전자의 targeting 효율을 보면 0-9.3%까지 다양하며, Lai 등(2002)은 21 kb homologous sequence와 positive selection marker로 neo 유전자를 사용하였을 때 targeting 효율은 5%라고 보고하였다. 그러나 Dai 등(2002)은 9.31 kb homologous sequence를 사용하였으며,

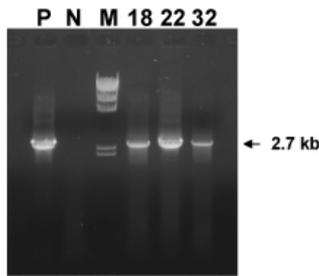


Fig. 2. PCR analysis of G418-resistant colonies. Genome DNA from G418-resistant colonies were used for PCR with the forward (Neo 3'-1) and reverse (HT DAF KI 3'-1) primer. P: control vector as positive control. N: genomic DNA of wild-type NIH minipig cell as negative control. No. 18, 22, 32: genomic DNA of G418-resistant colony.

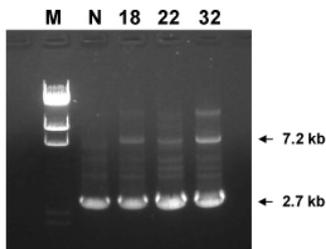


Fig. 3. Long PCR analysis of G418-resistant colonies. The fragment of 7.2 kb and 2.7 kb represents targeted locus and non-targeted locus, respectively. M: size marker λ /Hind III. N: genomic DNA of wild-type NIH minipig cell as negative control. #18, 22, 32: G418-resistant colony.

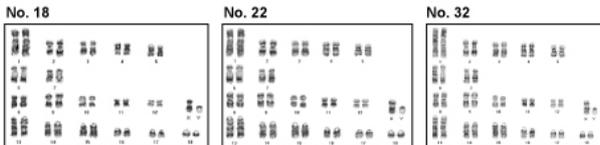


Fig. 4. Karyotyping of α 1,3GT-hDAF-hHT knock-in cell. The picture shows that the chromosome pair was lined up according to size. Karyotype of knock-in cell was shown 100% of 38, XY.

targeting 효율은 0.5~2.3%라고 보고하였다. Denning 등 (2001)에 의하여 보고된 9.3%의 높은 targeting 효율은 α

1,3-GT 유전자의 promoter에 의해 neo 유전자가 발현하도록 하였으며, 10.2 kb homologous sequence를 사용하였다고 보고하고 있다. 본 연구에서 Fig. 1에서 나타낸 바와 같이, 5.6 kb 5' arm과 2.7 kb 3' arm으로 구성된 knock-in vector를 구축하였다. 그리고 상동유전자 재조합이 일어난 세포의 선별 효율은 다소 낮은 1.7%이었다. 이러한 낮은 효율은 8.3 kb homologous sequence로 구성된 knock-in vector 때문일 것으로 추측된다.

α 1,3GT-hDAF-hHT knock-in 체세포에서 α 1,3-GT, hDAF, hHT 유전자 발현 분석

α 1,3GT-hDAF-hHT knock-in vector가 α 1,3-GT 위치에 상동 유전자 재조합을 통해 삽입되면 α 1,3-GT 유전자의 gene regulatory sequence에 의해서 hDAF와 hHT가 발현될 것이다. 그러므로 knock-in vector가 도입된 세포에서 α 1,3-GT, hDAF, hHT의 발현을 RT-PCR과 real-time PCR을 통해 확인하였다. Knock-in vector가 도입된 체세포에서 total RNA를 추출한 후, cDNA를 합성하여 이를 주형으로 하여 PCR를 수행한 결과, Fig. 5a에서 나타낸 바와 같이, hDAF와 hHT의 발현은 control 세포에서는 확인되지 않았고, knock-in vector가 도입된 세포에서만 확인되었다. Knock-in vector 도입된 세포에서 α 1,3-GT의 발현은 control에 비하여 감소하게 보였으며, real-time PCR 분석을 통해 보다 명확히 확인하였다. Fig. 5b는 real-time PCR 분석 결과로 control에서 α 1,3-GT의 발현을 100%로 보았을 때, α 1,3GT-hDAF-hHT knock-in vector 도입된 세포는 control에 비하여 α 1,3-GT의 발현이 80% 감소하였음을 확인하였다.

Gal α (1,3)Gal 당분자는 α 1,3-GT 유전자가 knock-out된 돼지 세포에서도 낮은 수준으로 발견되었는데, 이것은 설치류와 돼지에서 iGB3 synthase에 의해 발현된 것으로 보고된다(Sprangers 등, 2008; Yang과 Sykes, 2007). α 1,3-GT 유전자가 제거된 돼지에서 Gal 항원이 낮게 발현하는 것은 이종간의 장기 이식 시 초급성 거부반응을 일으킬 것으로 생각된다. hHT가 발현하는 형질전환 마우스와 돼지의 세포 배양시 Gal α (1,3)Gal 당분자를 감소시킨다고 보고된 바 있으며(Cooper 등, 1993), 본 연구에서는 hDAF와 hHT가 α 1,3-GT locus에서 α 1,3-GT 유전자의 ATG 부분에 삽입되면서 α 1,3-GT 유전자가 본래 발현되는 양만큼 발현할 수 있도록 하였다. hDAF와 hHT가 발현하도록 개발한 체세포에서 total RNA를 추출하여 cDNA 합성 후 RT-PCR을 수행한 결과, α 1,3-GT 유전자 위치에서 hDAF와 hHT 유전자가 정상적으로 발현함을 확인하

Table 2. Efficiency of gene targeting for hDAF-hHT knock-in vector on α 1,3-GT locus in porcine fibroblast

Experiments	Number of cells trasfected	No. of G418 colonies analyzed by PCR	No. of colonies analyzed by 1 st 3' PCR	No. of colonies analyzed by 2 nd 3' PCR
1	5×10 ⁶	25	1	1
2	5×10 ⁶	62	1	1
3	5×10 ⁶	45	0	0
4	5×10 ⁶	42	1	1
Total	2×10 ⁷	14	3	3(1.7%)

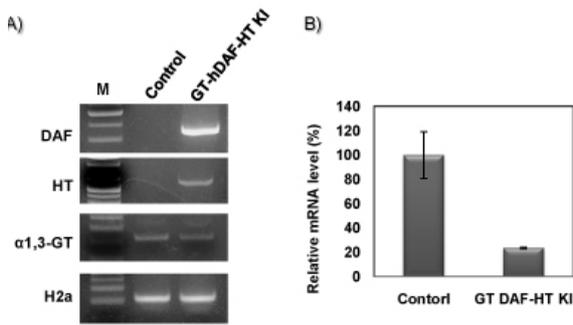


Fig. 5. The hDAF, hHT and α 1,3-GT expression in α 1,3GT-hDAF-hHT knock-in somatic cell by RT-PCR and Real-time PCR. RNA was isolated from NIH minipig and knock-in somatic cells. A) The RT-PCR was conducted with a pair of DAF specific primer, α 1,3-GT specific primer and HT specific primer, respectively. The DAF and HT expression was detected in only knock-in somatic cells, not in NIH minipig cell. α 1,3-GT expression in the knock-in cells was more decreased compared with that of control NIH minipig cells. M: size marker 100 bp ladder. B) Analysis of α 1,3-GT expression by Real-time PCR.

였다. 또한 real-time PCR 분석 결과, α 1,3-GT 유전자의 발현이 control 세포에 비하여 80% 감소되었음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 본 연구에서 개발한 knock-in vector가 도입된 체세포에서도 hDAF와 hHT의 발현이 정상적으로 이루어지고 있으며, 이러한 발현은 Gal α (1,3)Gal 당분자 발현을 감소시킬 것으로 생각된다.

α 1,3GT-hDAF-hHT knock-in 체세포에서 human complement serum 처리에 의한 cytotoxicity 분석

RT-PCR을 통해 α 1,3GT-hDAF-hHT knock-in vector가 도입된 세포에서 hDAF와 hHT의 발현을 확인하였으며, hDAF와 hHT의 발현이 human complement serum 처리에 의한 세포 생존율에 영향을 미치는 지 확인하기 위하여 cytotoxicity 분석을 수행하였다.

24 well culture plate에 control로 사용할 NIH 미니돼지 귀체세포와 knock-in된 체세포를 접종하여 90% 이상 confluent한 상태에서 100% human serum과 100% human complement serum을 2시간 처리한 결과, Fig. 6에서 나타난 바와 같이 control 세포에 비해 α 1,3GT-hDAF-hHT knock-in vector가 도입된 세포의 생존율이 30% 정도 높은 것을 확인하였다.

본 연구에서는 human complement regulatory protein 중 하나인 hDAF를 발현하도록 knock-in vector를 구축하였으며, hDAF는 세포 표면에서 complement system을 조절한다고 알려져 있다. hDAF 유전자가 발현하는 형질전환 돼지는 세포 표면에서 보체계를 조절하며, 이종 간의 장기이식이 일어나는 초급성 거부반응으로부터 효과적으로 보호한다고 보고되었다(Yang과 Sykes, 2007; Baldan 등, 2004; Chen 등, 2006). 또한 hHT의 발현은 human complement serum에 의한 세포 생존율이 증가된다는 연구결과들로 초급성 거부 반응을 방지할 수 있을 것으로 보

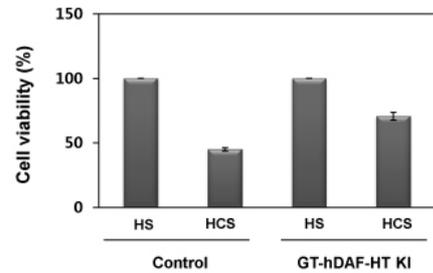


Fig. 6. Human complement serum-mediated cytotoxicity assay to α 1,3 GT-hDAF-hHT knock-in cells. The viability in cells treated with 100% human complement serum was presented compare with 100% survival in the cells treated with 100% human serum. 100% HS: 100% Human serum, 100% HCS: 100% Human complement serum.

고되고 있으며(Costa 등, 2002), 본 연구에서 구축한 knock-in vector를 도입한 체세포에서 정상적인 hHT의 발현을 통한 human complement serum에 의한 cytotoxicity를 조사하였다. 본 연구에서 개발한 체세포에서 정상적인 hDAF 유전자와 hHT 유전자의 발현을 확인하였으며, 이는 이종 간의 장기 이식 시 complement 활성화에 의해 일어나는 초급성 거부반응을 극복하는 데 도움이 될 것으로 생각된다. Control과 knock-in vector가 도입된 체세포에 100% human complement serum 처리 시 control에 비해 40% 높은 생존율을 보였으며, 이는 정상적인 hDAF와 hHT의 발현으로 인한 것으로 생각되며, human serum에 의한 cytotoxicity를 더 효과적으로 보고할 수 있을지도 모른다. 2004년 hDAF가 과발현된 형질전환 돼지의 심장을 baboon 원숭이에 이식시켰을 때 139일 생존하였음이 보고된 바 있다. 따라서 본 연구에서 hDAF와 hHT가 발현하는 체세포를 사용한 돼지 생산으로 인하여 이종간의 장기 이식 시 생존율이 증가할 것으로 생각된다.

본 연구에서 구축된 hDAF와 hHT가 발현하는 knock-in vector를 미니돼지 귀 체세포에 도입하여 knock-in 된 체세포를 개발하였다. Knock-in 된 미니돼지 체세포를 이용하여 hDAF와 hHT가 α 1,3-GT 위치에서 정상적으로 발현하는 형질전환 돼지를 생산 할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 이러한 knock-in vector 시스템을 통하여 이종 장기 이식 시 초급성 거부반응을 억제할 수 있는 많은 유전자들 중 2개 이상 발현하는 미니돼지 생산도 기대해 본다.

요 약

동물의 장기를 인간에게 이식하게 되면 초급성거부반응(Hyperacute rejection, HAR)이 일어난다. 초급성거부반응은 면역계의 구성요소 중 보체(complement)에 의해 일어나는 거부반응으로 돼지의 혈관세포 표면에 있는 Gal α (1,3)Gal 당분자에 인간의 항체가 즉각 반응하기 때문에 일어나며, α 1,3-galactosyltransferase (α 1,3-GT) 유전자는 돼지 혈관세포 표면의 Gal α (1,3)Gal 당분자 생성에

관여한다. 따라서 인간에게 돼지의 장기를 이식하기 위해서는 α 1,3-galactosyltransferase 유전자를 제거하는 것이 필요한 것으로 알려져 있다. 본 연구실의 이전 연구에서, 시카고 미니돼지 귀체세포에서 상동 재조합(Homologous recombination)을 통해 α 1,3-galactosyltransferase 유전자가 제거된 체세포를 개발한 바 있으며, 이 체세포를 통하여 α 1,3-GT 유전자가 제거된 돼지도 생산된 바 있다. 본 연구에서는, human serum 처리 시 돼지 세포를 보호해 준다고 보고되고 있는 human complement regulator인 human Decay-accelerating factor(hDAF)와 human α 1,2-fucosyltransferase(hHT) 유전자를 α 1,3-GT 유전자 위치에 gene targeting하여 동시에 hDAF와 hHT가 발현하는 체세포를 개발하였다. Knock-in vector는 hDAF와 hHT 두 유전자가 발현할 수 있도록 IRES로 연결하였으며, α 1,3-GT 유전자의 start codon을 이용하여 발현할 수 있도록 구축하였다. 구축한 vector는 electroporation을 통해 미니 돼지 체세포에 도입하였으며, PCR 결과, α 1,3-GT 유전자 위치에서 상동 재조합이 일어났음을 확인하였다. Positive-negative 선별 방법을 통해 얻은 gene targeting 된 체세포는 RT-PCR에 의해 hDAF와 hHT 유전자의 발현이 확인되었으며, 대조군(NIH minipig)에 비해 α 1,3-GT 유전자의 발현이 감소하였다. 또한 이들 세포에 100% human complement serum을 처리하였을 때 knock-in 세포가 대조군에 비해 30% 정도 더 높은 생존율을 보였다. 따라서 개발된 체세포는 이종간 장기이식을 위한 돼지 생산과 함께 이를 이용한 이종간의 장기 이식 시 초급성 거부반응을 억제하는 데 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Baldan N, Rigotti P, Calabrese F, Cadrobbi R, Dedja A, Iacopetti I, Boldrin M, Seveso M, Dall'Olmo L, Frison L, De Benedictis G, Bernardini D, Thiene G, Cozzi E, Ancona E (2004) Ureteral stenosis in HDAF pig-to-primate renal xenotransplantation: A phenomenon related to immunological events? *Am J Transplant* 4:475-481.
- Blanken WM, Van den Eijnden DH (1985) Biosynthesis of terminal Gal α 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc-R oligosaccharide sequences on glycoconjugates. *J Biol Chem* 260:12927-12934.
- Cargnoni A, Gibelli L, Tosini A, Signoroni PB, Nassuato C, Arienti D, Lombardi G, Albertini A, Wengler GS, Parolini O (2009) Transplantation of allogeneic and xenogeneic placenta-derived cells reduces bleomycin-induced lung fibrosis. *Cell Transplant* 18:405-422.
- Chen CG, Salvaris EJ, Romanella M, Aminian A, Katerelos M, Fiscaro N, d'Apice AJ, Pearse MJ (1996) Transgenic expression of human alpha1,2-fucosyltransferase (H-transferase) prolongs mouse heart survival in an *ex vivo* model of xenograft rejection. *Transplantation* 65:832-837.
- Chen G, Sun H, Yang H, Kubelik D, Garcia B, Luo Y, Xiang Y, Qian A, Copeman L, Liu W, Cardella CJ, Wang W, Xiong Y, Wall W, White DJ, Zhong R (2006) The role of anti-non-Gal antibodies in the development of acute humoral xenograft rejection of hDAF transgenic porcine kidneys in baboons receiving anti-Gal antibody neutralization therapy. *Transplantation* 81:273-283.
- Cohney S, McKenzie IF, Patton K, Prenzoska J, Ostenreid K, Fodor WL, Sandrin MS (1997) Down-regulation of Gala(1,3) Gal expression by α 1,2-fucosyltransferase: Further characterization of α 1BV, 2-fucosyltransferase transgenic mice. *Transplantation* 64:495-500.
- Cooper DK, Good AH, Koren E, Oriol R, Malcolm AJ, Ippolito RM, Neethling FA, Ye Y, Romano E, Zuhdi N (1993) Identification of alpha-galactosyl and other carbohydrate epitopes that are bound by human anti-pig antibodies: relevance to discordant xenografting in man. *Transpl Immunol* 1:198-205.
- Costa C, Zhao L, Burton WV, Rosas C, Bondioli KR, Williams BL, Hoagland TA, Dalmaso AP, Fodor WL (2002) Transgenic pigs designed to express human CD59 and H-transferase to avoid humoral xenograft rejection. *Xenotransplantation* 9:45-57.
- 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, Ayares DL (2002) Targeted disruption of the alpha 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol* 20:251-255.
- Denning C, Burl S, Ainslie A, Bracken J, Dinnyes A, Fletcher J, King T, Ritchie M, Ritchie WA, Rollo M, de Sousa P, Travers A, Wilmut I, Clark AJ (2001) Deletion of the alpha(1,3)galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. *Nat Biotechnol* 19:559-562.
- Galili U, Clark MR, Shohet SB, Buehler J, Macher BA (1987) Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal α 1 \rightarrow 3Gal epitope in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:1369-1373.
- Hasty P, Rivera-Pérez J, Bradley A (1991) The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 11:5586-5591.
- Kennedy SP, Rollins SA, Burton WV, Sims PJ, Bothwell AL, Squinto SP, Zavoico GB (1994) Protection of porcine aortic endothelial cells from complement-mediated cell lysis and activation by recombinant human CD59. *Transplantation* 57:1494-1501.
- Koike C, Katayama A, Kadomatsu K, Hiraiwa N, Hayashi S, Kobayashi T, Hayash S, Yokoyama I, Takagi H (1996) Reduction of alpha-Gal epitopes in transgenic pig by introduction of human alpha 1-2 fucosyltransferase. *Transplant Proc* 29:894.
- Koren E, Neethling FA, Richards S, Koscec M, Ye

- Y, Zuhdi N, Cooper DK (1992) Binding and specificity of major immunoglobulin classes of preformed human anti-pig heart antibodies. *Transpl Int* 6:351-353.
16. Lachmann PJ (1991) The control of homologous lysis. *Immunol Today* 12:312-315.
 17. 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, Prather RS (2002) Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295:1089-1092.
 18. Levy GA, Ghanekar A, Mendicino M, Phillips MJ, Grant DR (2001) The present status of xenotransplantation. *Transplant Proc* 33:3050-3052.
 19. Mei J, Sgroi A, Mai G, Baertschiger R, Gonelle-Gispert C, Serre-Beinier V, Morel P, Buhler LH (2009) Improved survival of fulminant liver failure by transplantation of microencapsulated cryopreserved porcine hepatocytes in mice. *Cell Transplant* 18:101-110.
 20. Morgan BP (1995) Complement regulatory molecules: Application to therapy and transplantation. *Immunol Today* 16:257-259.
 21. Platt JL, Lin SS (1998) The future promises of xenotransplantation. *Ann N Y Acad Sci* 862:5-18.
 22. Sandrin MS, Vaughan HA, Dabkowski PL, McKenzie IF (1993) Anti-pig IgM antibodies in human serum react predominantly with Gal(alpha 1-3)Gal epitopes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11391-11395.
 23. Sharma A, Okabe J, Birch P, McClellan SB, Martin MJ, Platt JL, Logan JS (1996) Reduction in the level of Gala(1,3)Gal in transgenic mice and pigs by expression of an a(1,2) fucosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7190-195.
 24. Shimizu A, Yamada K (2006) Pathology of renal xenograft rejection in pig to non-human primate transplantation. *Clin Transplant* 15:46-52.
 25. Sprangers B, Waer M, Billiau AD (2008) Xenotransplantation: Where are we in 2008? *Kidney Int* 74: 14-21.
 26. Yamaizumi M, Mekada E, Uchida T, Okada Y (1978) One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell* 15:245-50.
 27. Yanagawa Y, Kobayashi T, Ohnishi M, Kobayashi T, Tamura S, Tsuzuki T, Sanbo M, Yagi T, Tashiro F, Miyazaki J (1999) Enrichment and efficient screening of ES cells containing a targeted mutation: the use of DT-A gene with the polyadenylation signal as a negative selection maker. *Transgenic Res* 8:215-221.
 28. Yang YG, Sykes M (2007) Xenotransplantation: Current status and a perspective on the future. *Nat Rev Immunol* 7:519-531.
- (Received: August 8 2015/ Accepted: August 17 2015)