

Übersicht

Review

Xenotransplantation: Immunologische und infektiologische Barrieren – Was wurde überwunden, was ist noch zu tun?*

©2023 Dustri-Verlag Dr. K. Feistle
ISSN 0300-5224

J. Denner

Institut für Virologie, Freie Universität Berlin, Berlin

Schlüsselwörter

Xenotransplantation – gentechnisch modifizierte Schweine – Virusübertragung – Immunsuppression

Key words

xenotransplantation – genetically modified pigs – virus transmission – immunosuppression

*Erweiterte Fassung des Vortrags auf der 14. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, 8. Oktober 2022, Estrel Congress Center Berlin.

Xenotransplantation: Immunologische und infektiologische Barrieren – Was wurde überwunden, was ist noch zu tun?

Der Mangel an menschlichen Spenderorganen führte zur Entwicklung der Xenotransplantation, als Spendertiere wurden aus verschiedenen Gründen Schweine ausgewählt. Zwei Haupthürden sind zu überwinden, bevor die Xenotransplantation zur alltäglichen Therapieform wird: die immunologische Abstoßung, vor allem die hyperakute Abstoßung, und die potenzielle Übertragung zoonotischer Mikroorganismen des Schweins, wobei zoonotisch bedeutet, dass sie in der Lage sind, im Empfänger eine Krankheit auszulösen. Zur Überwindung der Abstoßung wurden mehrfach gentechnisch modifizierte Schweine gezüchtet, bei denen Gene des Schweins ausgeknockt bzw. Gene des Menschen eingebracht wurden. In präklinischen Studien mit nicht-humanen Primaten konnte eine beachtliche Überlebensdauer von Zellen und Organen derart gentechnisch modifizierter Tiere erreicht werden, zum Beispiel von Inselzellen zur Behandlung von Diabetes sowie von Nieren und Herzen. Zur Verhinderung der Übertragung von Mikroorganismen des Schweins, vor allem von Viren, auf den Empfänger, wurden sensitive Methoden zum Nachweis und entsprechende Programme zur Eliminierung dieser Viren entwickelt. Im Januar 2022 wurde in Baltimore das Herz eines 10-fach modifizierten Schweins auf einen Patienten übertragen, dabei wurde ein neues Immunsuppressivum eingesetzt. Der Patient überlebte 2 Monate

mit dem Schweineherz, was als Erfolg eingestuft werden kann. Allerdings wurde dabei ein Schweinevirus übertragen, das mit hoher Wahrscheinlichkeit zum Tod des Patienten beitrug. Bei Anwendung optimaler Testmethoden kann eine derartige Übertragung jedoch problemlos vermieden und die Überlebensdauer des Organs verlängert werden.

Xenotransplantation: Immunological and infectiological barriers – what has been overcome, what remains to be done?

The shortage of human donor organs led to the development of xenotransplantation; pigs were selected as donor animals for several reasons. Two main hurdles must be overcome before xenotransplantation becomes a common form of therapy: immunological rejection, especially hyperacute rejection; and the potential transmission of zoonotic porcine microorganisms, where zoonotic means capable of causing disease in the recipient. To overcome rejection, genetically modified pigs have been bred, in which genes from the pig have been knocked out or genes from humans have been introduced. In preclinical studies with non-human primates, considerable survival times of cells and organs from such genetically modified animals have been achieved, for example of islet cells for the treatment of diabetes and of kidneys and hearts. To prevent transmission of porcine microorganisms, especially viruses, to the recipient, sensitive methods for detection of these viruses and appropriate elimination programs

Denner J. Xenotransplantation: Immunologische und infektiologische Barrieren – Was wurde überwunden, was ist noch zu tun?. Nieren- und Hochdruckkrankheiten. 2023; 52: 199-204.
DOI 10.5414/NHX02289

citation

Korrespondenzadresse: Dr. Joachim Denner, Institut für Virologie, Freie Universität Berlin, Robert von Ostertag-Straße 7, 14163 Berlin, Joachim.Denner@fu-berlin.de



Der Mangel an humanen Organen für die Transplantation hat zur Entwicklung der Xenotransplantation geführt

have been developed. In January 2022, the heart of a 10-fold genetically modified pig was transferred to a patient in Baltimore, using a new immunosuppressant. The patient survived 2 months with the pig heart, which can be considered a success. However, a porcine virus was transmitted in the process, which most likely contributed to the patient's death. However, with the use of optimal testing methods, such transmission can be easily avoided and the survival of the organ can be prolonged.

Einführung

In Deutschland warten 11.000 Patienten auf eine Nierentransplantation. Im Jahre 2021 wurden jedoch nur 1.517 Nierentransplantationen mit Organen Verstorbener und 475 Lebendspenden realisiert [1]. Aufgrund eines solchen Mangels an Spendernieren, aber auch anderen Organen, wurde in den letzten Jahrzehnten die Xenotransplantation entwickelt. Die Xenotransplantation könnte auch eine wichtige Rolle bei der Behandlung des Diabetes spielen. Trotz der erfolgreichen Therapie mit Insulin (früher einmal vom Schwein gewonnen) kommt es öfter zu späten Komplikationen aufgrund ungenügender Compliance der Patienten. Durch die Applikation von Schweine-Inselzellen könnten derartige Komplikationen vermieden werden.

Schweine wurden als Spendertiere gewählt, da sie eine ähnliche Physiologie haben, günstig zu halten sind, kurze Tragezeiten und viele Nachkommen haben, sie lassen sich leicht klonieren und gentechnisch modifizieren. Inzwischen wurden für verschiedene Schweinetransplantate be-

achtliche Überlebenszeiten in nicht-humanen Primaten beobachtet (Tab. 1).

Die Verwendung von Schweineorganen hätte eine Reihe von Vorteilen: unbegrenzte Verfügbarkeit, Entnahme der Organe exakt zum Zeitpunkt der Transplantation, keine Vorschädigung aufgrund von Transport, Zwischenlagerung, Unterbrechung der Blutversorgung oder Unfälleinflüsse, optimale Vorbereitung der Organempfänger auf die Transplantation, keine Not- und Nachtoperationen wie bei der Allotransplantation.

Immunologische Barrieren

Eine Besonderheit der Abstoßung bei der Xenotransplantation ist die hyperakute Abstoßung (Hyperacute rejection; HAR), die bei der Allotransplantation nicht auftritt und die auf der Existenz von präformierten Antikörpern gegen bestimmte Zuckerreste auf Bakterien beruht. Diese Zuckerreste befinden sich auch auf Zellen des Schweins, und durch die Bindung der präformierten Antikörper an Endothelzellen des transplantierten Organs wird das Komplementsystem des Menschen aktiviert, was zu einer schnellen Zerstörung des Schweineorgans führt. Eine hyperakute Abstoßung wird auch in seltenen Fällen bei Allotransplantationen, vor allem bei Nierentransplantationen beobachtet. Sie beruhen zum Beispiel auf Antikörpern des ABO-Blutgruppensystems und führen in kürzester Zeit nach der Transplantation zu großen lebensbedrohlichen Gerinnungsreaktionen im Blutkreislauf.

Die HAR bei der Xenotransplantation kann durch zwei Strategien erfolgreich verhindert werden. Erstens durch Knock-out von Genen des Schweins für Enzyme, die diese Zuckerreste auf die Zellen bringen, zum anderen durch das Einbringen von menschlichen Genen des Komplementsystems, sodass die humanen Komplementfaktoren auf den Schweinezellen exprimiert werden und die HAR verhindert wird (Tab. 2).

Auch die anderen Formen der Abstoßung können durch transgene Modifikationen verhindert werden (Tab. 3). Details der gentechnischen Modifikationen, die nicht nur die Abstoßung des Schweineorgans verhindern, sondern auch zu einer verbesserten Funktionalität beitragen sollen, sowie Aspekte der behördlichen Regulation und

Tab. 1. Überlebenszeiten von Schweinetransplantaten in nicht-humanen Primaten. Übersicht siehe [19].

Schweinetransplantat	Längste Überlebenszeit (Tage)
Inselzellen	950
Herz, heterotop	945
Herz, orthotop	195
Niere	499
Neuronen	549
Hornhaut	511
Leber	29
Lunge	10

Tab. 2. Gentechnische Modifikationen von Schweinen zur Verhinderung einer hyperakuten Abstoßung [2].

Deletion der Zuckerreste auf den Schweinezellen	Abkürzung
α -1,3-Galactosyltransferase Knock-out	GGTA1-KO
Cytidinemonophosphat-N-Acetylneuramininsäure Hydroxylase Knock-out	CMAH-KO
β -1,4-N-Acetyl-galactosaminyl transferase 2 Knock-out	B4GALNT2-KO
Komplementregulierung durch Expression humaner Komplementregulatorgene	
Humanes Membran Cofactor Protein, transgen	CD46, MCP
Humaner Decay Accelerating Factor, transgen	CD55, DAF
Humanes Protectin, Membran-Inhibitor für Reaktive Lysis, transgen	CD59, MIRL
Humanes Komplementregulator-Protein C1 Inhibitor, transgen	hC1INH

Tab. 3. Weitere gentechnische Modifikationen von Schweinen zur Verhinderung einer Abstoßung [2].

Regulation der Koagulation durch die Expression humaner Koagulatorgene	Abkürzung
Humanes Thrombomodulin	hTM
Humaner Endothelial Protein C Rezeptor	hEPCR
Humaner Tissue factor pathway inhibitor	hTFPI
Humane Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1	hCD39
Humane Ecto-5'-nucleotidase	hCD73
Prävention der zellvermittelten Abstoßung, T-Zellen	
Humanes LEA29Y	LEA29Y
Humanes CTLA4-Ig	CTLA4-Ig
SLA Klasse 1, Knock-out	SLA_KO
Humanes programmed cell death 1 ligand 1	PD-L1
Prävention der zellvermittelten Abstoßung, NK-Zellen und Makrophagen	
HLA-E/humanes b2-Microglobulin	HLA-E/b2M
Human signal regulatory protein alpha	hCD47
Expression anti-inflammatorischer Proteine/Knock-out pro-inflammatorischer Proteine	
Humanes Tumor necrosis factor α -induziertes Protein 3	A-20
Humane Hämoxigenase 1	hHO

Gentechnische Modifikationen der Spenderschweine vermindern das Risiko der Abstoßung der transplantierten Organe

ethischen Akzeptanz, die hier nicht behandelt werden, sind in verschiedenen Übersichtsarbeiten dargestellt [2, 3, 4, 5].

Derzeit ist noch unklar, wie viele und welche gentechnischen Modifikationen notwendig sind. Präklinische Studien mit nicht-humanen Primaten wurden erfolgreich mit Organen mit drei Modifikationen [6], aber auch mit 10 Modifikationen [7] durchgeführt. Bei der ersten Transplantation eines Schweinherzen in einen Patienten in Baltimore wurde das Organ eines Schweins mit 10 Modifikationen verwendet [8]. Bereits vor der erfolgreichen Transplantation dieses Schweineherzens wurden Schweinenieren in hirntote Patienten transplantiert [9, 10]. Am Langone Transplant Institute der New Yorker Universität wurde eine Schweineniere außerhalb des Körpers für 54 Stunden mit dem Blutkreislauf eines hirntoten Patienten verbunden. Die Niere von einem Tier mit einer einzigen gentechnischen Modifikation, ein

Knock-out der α -1,3-Galactosyltransferase (Gal-KO oder GGTA1-KO), funktionierte, produzierte Urin und es gab keine Anzeichen einer Abstoßung. Zuvor wurden an der Universität von Alabama in Birmingham nach bilateraler Nephrektomie zwei Schweinenieren transplantiert. Die Nieren kamen von einem Tier mit 10 gentechnischen Modifikationen, sie überlebten 74 Stunden und es wurden Anzeichen einer thrombotischen Angiopathie, einer akuten tubulären Nekrose und einer leichten Thrombose beobachtet, aber keine Abstoßung. Ob die thrombotische Angiopathie nicht doch ein Zeichen einer anlaufenden humoralen Abstoßung oder das Ergebnis der Präsenz des porcinen Cytomegalovirus (siehe unten) war, ist noch unklar. Wenn auch Transplantationen in Hirntote kritisch zu betrachten sind, vor allem die extrem kurze extrakorporale Zeit, hat die Transplantation beider Nieren unter üblichen Bedingungen zumin-

Bei der Verwendung von Schweineorganen kommt es auf deren optimale Größe an

dest den Vorteil, dass durch Üben intra- und postoperative Komplikationen, wie sie bei der Herztransplantation auftraten, zukünftig vermieden werden können.

Zusätzlich zur immunologischen Abstoßung spielt auch die Größe des transplantierten Organs eine wichtige Rolle [11]. Das ist besonders offensichtlich bei der Verwendung von Pavianen mit einem Körpergewicht von 10 – 30 kg in präklinischen Studien, während Schweine ein Gewicht von 100 – 125 kg erreichen. Die Schweineherzen wachsen in den Rezipienten, als ob sie sich im Schwein befänden. Eine Lösung ist die Verwendung von Herzen des mittelgroßen Auckland Island Schweins, das etwa die Größe eines Erwachsenen erreicht, eine andere die Verwendung von gentechnisch veränderten Schweinen, bei denen das Gen des Wachstumsfaktors ausgeknockt wurde [12]. Minipigs wie das Göttinger Minipig wären wiederum zu klein, um als Organspender für den Menschen zu dienen.

Infektiologische Barrieren

Die mögliche Übertragung von Mikroorganismen, vor allem von Viren des Schweins auf den Empfänger, stellt eine wichtige Hürde bei der Xenotransplantation dar. Es darf jedoch nicht vergessen werden, dass auch bei der Allotransplantation Viren vom Spender auf den Empfänger übertragen wurden, darunter humane Herpesviren wie das humane Cytomegalovirus (HCMV), das Epstein-Barr-Virus (EBV), und das Herpes simplex-Virus (HSV) sowie Hepatitis B- und C-Viren, das Tollwutvirus und das humane Immundefizienzvirus 1 (HIV-1). Wenn es gelänge, alle potenziellen zoonotischen (zoonotisch bedeutet krankheitshervorrufend im Empfänger) Viren beim Schwein zu eliminieren, könnte die Xenotransplantation sicherer sein als die heutige Allotransplantation.

Derzeit sind zwei zoonotische Schweineviren bekannt, ob andere Schweineviren ebenfalls Erkrankungen im menschlichen Empfänger hervorrufen können, ist derzeit noch unbekannt. Ein Virus ist das Hepatitis E-Virus (HEV), das auch bereits jetzt durch unzureichend gegartes Schweinefleisch oder einfachen Kontakt übertragen wird. Eine Infektion mit HEV verläuft gewöhnlich asymptomatisch, bei Immunsupprimierten kann

es zu einem chronischen Verlauf und bei Patienten mit Vorschädigung der Leber zu schweren Leberschäden kommen [13]. Das zweite Virus ist das porcine Cytomegalovirus (PCMV), ein Herpesvirus. Allerdings ist der Name dieses Virus irreführend, es ist ein porcines Roseolovirus (PRV) und enger verwandt mit den humanen Herpesviren 6 und 7 (HHV-6, HHV-7) als mit dem HCMV. Da der offizielle Name Suides Betaherpesvirus 2 (SuBHV2) nur selten benutzt wird, verwende ich den Begriff PCMV/PRV. Es ist schon länger bekannt, dass PCMV/PRV die Lebensdauer von Schweineherzen oder Schweineieren in nicht-humanen Primaten drastisch reduziert (Übersicht siehe [14]). PCMV/PRV wurde auch auf den Patienten in Baltimore übertragen [8] und hat neben anderen Faktoren wie die Verabreichung einer Präparation von intravenösem Immunglobulin (IVIG), wie multiplen Vorerkrankungen und chirurgische intra- und postoperative Komplikationen, zum Tod des Patienten beigetragen [10, 15, 16]. Die klinischen Symptome, die beim Patienten beobachtet wurden, ähneln denen, die auch bei Pavianen nach Transplantation PCMV/PRV-positiver Schweineherzen beschrieben wurden [17]. Das Virus konnte nur übertragen werden, weil bei der Untersuchung des Spenderschweins nicht die richtige Methode angewandt wurde. PCMV/PRV kann wie alle Herpesviren in Latenz gehen, das heißt, es ist mit bestimmten Methoden nicht mehr nachweisbar. Bei Anwendung der richtigen Methode kann das Virus leicht nachgewiesen werden. Frühes Absetzen der Ferkel (Aufziehen ohne Muttermilch) [18] oder andere Methoden wie Kaiserschnitt oder Embryotransfer sind geeignet, das Virus aus der Schweinepopulation zu eliminieren. Diese Strategien können auch für andere Schweineviren angewandt werden.

Nicht geeignet sind diese Methoden für die porcinen endogenen Retroviren (PERVs), da sie im Genom der Schweine integriert sind. PERV-A und PERV-B sind im Genom aller Schweine vorhanden, oft bis zu 60 Kopien, und sie können Zellen des Menschen und anderer Spezies infizieren [19]. Da diese Viren Zellen des Menschen in vitro, in der Zellkultur, infizieren können, stellen sie ein Risiko für die Xenotransplantation dar. Retroviren sind dafür bekannt, dass sie wie HIV-1 Immunschwächen oder wie die mit den PERVs eng verwandten Katzenleukämieviren, Mausleukämieviren

Um die Übertragung von zoonotischen Mikroorganismen des Schweins auf den Rezipienten zu verhindern, müssen sensitive Nachweismethoden und entsprechende Eliminierungsprotokolle angewendet werden

oder das Koalaretrovirus Immunschwächen und Tumore hervorrufen. PERV-C ist nicht bei allen Schweinen zu finden, und es kann nur Schweinezellen infizieren. Bei einigen Schweinen wurden Rekombinationen zwischen PERV-A und PERV-C gefunden, die PERV-A/C Rekombinanten können humane Zellen infizieren und weisen höhere Replikationstiter auf. Diese Befunde zeigen, dass PERVs aktiv im lebendigen Schwein replizieren. In den ersten klinischen Studien, in denen Schweine-Inselzellen zur Behandlung der Diabetes transplantiert wurden, konnte keine Übertragung von PERV auf die Empfänger beobachtet werden [20, 21]. Diesen ungeachtet wurden inzwischen mehrere Strategien entwickelt, wie die Übertragung von PERVs bei der Xenotransplantation verhindert werden kann. Zu diesen Strategien gehören die Selektion von PERV-C-negativen Schweine, um die Entstehung hochtitriger rekombinanter PERV-A/C zu verhindern, Impfstoffe auf der Basis neutralisierender Antikörper gegen die Hüllproteine von PERV, Hemmung der Expression von PERV mittels RNA-Interferenz und Inaktivierung integrierter PERVs mittels Zinkfinger-nuclease oder CRISPR/Cas [19]. Mit der letzten Methode wurden alle integrierten PERVs in embryonalen Fibroblasten inaktiviert, die Zellen wurden für einen somatischen Zelltransfer verwendet, die Oocyten wurden in Leihmütter überführt und auf diese Art wurden gesunde Ferkel gewonnen [22]. Allerdings ist noch unklar, ob eine Inaktivierung mit CRISPR/Cas notwendig ist, da in allen bisher durchgeführten präklinischen und klinischen Xenotransplantationen kein PERV übertragen wurde [23].

Fazit

Die präklinischen und klinischen Studien und die Forschungen zur Immunologie und Virussicherheit der letzten Jahre haben die Xenotransplantation einen bedeutenden Schritt näher zur klinischen Anwendung gebracht. Eine der wichtigsten Lehren aus der ersten Transplantation eines gentechnisch modifizierten Schweineherzens in einen Patienten in Baltimore ist, dass neben entsprechenden Donorschweinen, neu entwickelten Immunsuppressiva und hervorragenden Chirurgen, die Virussicherheit ausschlagge-

bend für eine erfolgreiche Xenotransplantation ist. Die Testung der Donorschweine muss mit Tests der höchsten Qualität und mit Strategien erfolgen, die auch latente Viren erfassen.

Interessenkonflikt

Es bestehen keine Interessenkonflikte des Autors.

Literatur

- [1] *Eurotransplant*. Annual Report 2021. https://www.eurotransplant.org/wp-content/uploads/2022/06/Annual-Report-2021_LR.pdf (aufgerufen am 29. November 2022).
- [2] Kemter E, Denner J, Wolf E. Will Genetic Engineering Carry Xenotransplantation of Pig Islets to the Clinic? *Curr Diab Rep*. 2018; 18: 103.
- [3] Reichart B, Längin M, Denner J, Schwinzer R, Cowan PJ, Wolf E. Pathways to Clinical Cardiac Xenotransplantation. *Transplantation*. 2021; 105: 1930-1943.
- [4] Reichart B, Cooper DKC, Längin M, Tönjes RR, Pierson RN III, Wolf E. Cardiac xenotransplantation – concept to clinic. *Cardiovasc Res*. 2022; 3: cvac180.
- [5] Sykes M, Sachs DH. Progress in xenotransplantation: overcoming immune barriers. *Nat Rev Nephrol*. 2022; 18: 745-761.
- [6] Längin M, Mayr T, Reichart B, Michel S, Buchholz S, Guethoff S, Dashkevich A, Baehr A, Egerer S, Bauer A, Mihalj M, Panelli A, Issl L, Ying J, Fresch AK, Buttgereit I, Mokolke M, Radan J, Werner F, Lutzmann I, et al. Consistent success in life-supporting porcine cardiac xenotransplantation. *Nature*. 2018; 564: 430-433.
- [7] Mohiuddin MM, Goerlich CE, Singh AK, Zhang T, Tatarov I, Lewis B, Sentz F, Hershfeld A, Braileanu G, Odonkor P, Strauss E, Williams B, Burke A, Hittman J, Bhutta A, Tabatabai A, Gupta A, Vaught T, Sorrells L, Kuravi K, et al. Progressive genetic modifications of porcine cardiac xenografts extend survival to 9 months. *Xenotransplantation*. 2022; 29: e12744.
- [8] Griffith BP, Goerlich CE, Singh AK, Rothblatt M, Lau CL, Shah A, Lorber M, Grazioli A, Saharia KK, Hong SN, Joseph SM, Ayares D, Mohiuddin MM. Genetically Modified Porcine-to-Human Cardiac Xenotransplantation. *N Engl J Med*. 2022; 387: 35-44.
- [9] Montgomery RA, Stern JM, Lonze BE, Tatapudi VS, Mangiola M, Wu M, Weldon E, Lawson N, Deterville C, Dieter RA, Sullivan B, Boulton G, Parent B, Piper G, Sommer P, Cawthon S, Duggan E, Ayares D, Dandro A, Fazio-Kroll A, et al. Results of Two Cases of Pig-to-Human Kidney Xenotransplantation. *N Engl J Med*. 2022; 386: 1889-1898.
- [10] Denner J, Schuurman HJ. Early testing of porcine organ xenotransplantation products in humans:

- Microbial safety as illustrated for porcine cytomegalovirus. *Xenotransplantation*. 2022; 29: e12783.
- [11] Denner J, Reichart B, Längin M. Does size matter? *Xenotransplantation*. 2018; 25: e12383.
- [12] Hinrichs A, Riedel EO, Klymiuk N, Blutke A, Kemter E, Längin M, Dahlhoff M, Keßler B, Kurome M, Zakhartchenko V, Jemiller EM, Ayares D, Bidlingmaier M, Flenkenthaler F, Hrabě de Angelis M, Arnold GJ, Reichart B, Fröhlich T, Wolf E. Growth hormone receptor knockout to reduce the size of donor pigs for preclinical xenotransplantation studies. *Xenotransplantation*. 2021; 28: e12664.
- [13] Denner J. Xenotransplantation and Hepatitis E virus. *Xenotransplantation*. 2015; 22: 167-173.
- [14] Denner J. Reduction of the survival time of pig xenotransplants by porcine cytomegalovirus. *Virology*. 2018; 15: 171.
- [15] Cooper DKC, Yamamoto T, Hara H, Pierson RN III. The first clinical pig heart transplant: Was IVIg or pig cytomegalovirus detrimental to the outcome? *Xenotransplantation*. 2022; 29: e12771.
- [16] Denner J. The porcine cytomegalovirus (PCMV) will not stop xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2022; 29: e12763.
- [17] Denner J, Längin M, Reichart B, Krüger L, Fiebig U, Mokolke M, Radan J, Mayr T, Milusev A, Luther F, Sorvillo N, Rieben R, Brenner P, Walz C, Wolf E, Roshani B, Stahl-Hennig C, Abicht JM. Impact of porcine cytomegalovirus on long-term orthotopic cardiac xenotransplant survival. *Sci Rep*. 2020; 10: 17531.
- [18] Egerer S, Fiebig U, Kessler B, Zakhartchenko V, Kurome M, Reichart B, Kupatt C, Klymiuk N, Wolf E, Denner J, Bähr A. Early weaning completely eliminates porcine cytomegalovirus from a newly established pig donor facility for xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2018; 25: e12449.
- [19] Denner J. Porcine Endogenous Retroviruses and Xenotransplantation, 2021. *Viruses*. 2021; 13: 2156.
- [20] Wynyard S, Nathu D, Garkavenko O, Denner J, Elliott R. Microbiological safety of the first clinical pig islet xenotransplantation trial in New Zealand. *Xenotransplantation*. 2014; 21: 309-323.
- [21] Morozov VA, Wynyard S, Matsumoto S, Abalovich A, Denner J, Elliott R. No PERV transmission during a clinical trial of pig islet cell transplantation. *Virus Res*. 2017; 227: 34-40.
- [22] Niu D, Wei HJ, Lin L, George H, Wang T, Lee IH, Zhao HY, Wang Y, Kan Y, Shrock E, Lesho E, Wang G, Luo Y, Qing Y, Jiao D, Zhao H, Zhou X, Wang S, Wei H, Güell M, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science*. 2017; 357: 1303-1307.
- [23] Scobie L, Denner J, Schuurman HJ. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9, editorial commentary. *Xenotransplantation*. 2017; 24: e12363.