

**Das SCIDHu-Tiermodell als Beispiel für eine
diskordante xenogene Transplantationssituation:
Untersuchungen zur Rolle humaner T-Lymphozyten
in der Abstoßungsreaktion**

Dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Thomas Ebensen

geboren am 27. Dezember 1965 in Gehrden

2000

Referent: Prof. Dr. W. Müller

Korreferent: Prof. Dr. M. Martin

Tag der Promotion: 14. November 2000

meiner Familie

Zusammenfassung

Die limitierende Versorgung von menschlichen Organen für die Transplantation und die Möglichkeiten der xenogenen Transplantation von tierischen Geweben führt zu einem erhöhten Interesse an dieser alternativen Organtransplantation. Zu diesem Zeitpunkt ist jedoch noch sehr wenig über die Mechanismen, die der zellulären Abstoßung zu Grunde liegen, bekannt, im besonderen die Rolle der T-Zellen bei der Abstoßung von diskordantem Gewebe. Bisher existieren nur wenige Tiermodelle, wie das SCIDHu-Mausmodell, die eine Untersuchung der xenogenen Abstoßungsreaktion durch humanen T-Zellen und deren Mechanismen über Speziesgrenzen hinweg detailliert erlauben. Die immun-defizienten *scid*-Mäuse sind nicht fähig allo- oder xenogene Transplantate abzustößen, so daß diese Versuchstiere für die Untersuchung von diskordanten Transplantationssituationen, dem spezifischen Homing oder der xenogenen Immunantwort humaner peripherer Blut Lymphozyten (PBL) genutzt werden können. Die *scid*-Mutation beeinflusst jedoch nicht die natürliche Immunität der Mäuse, so daß sie auch weiterhin NK-Zellen, Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen besitzen. Um ein erhöhtes Überleben der humanen PBL zu gewährleisten, wurde das murine natürliche Immunsystem der Versuchstiere supprimiert. Diese Konditionierung erfolgte durch eine subletale Bestrahlung und einer Behandlung mit einem anti-murinen NK-Zellserum 24h vor Versuchsbeginn.

Die intraperitoneale Injektion von 5×10^7 CD4⁺ T-Zellen induzierte eine letale xenogene Graft-versus-Host-Erkrankung (xGvHD) in allen konditionierten *scid*-Mäusen. Die Versuchstiere entwickelten dabei schwere pathologische Veränderungen in Leber, Lunge, Milz und Lymphknoten und starben innerhalb von 2 bis 4 Wochen. Die wiedergewonnenen humanen T-Zellen waren dabei durch die Expression der CD45R0⁺ Isoform des aktivierten Status gekennzeichnet. Dies warf die Frage auf, ob dieses Ergebnis aufgrund einer spezifischen Aktivierung der naiven T-Zellen in den Versuchstieren oder durch prädominantes Überleben schon im Donor aktiviert vorliegender T-Zellen erfolgte. Um diese Frage zu beantworten, haben wir die Fähigkeit von isolierten naiven CD4⁺CD45RA⁺ und aktivierten CD4⁺CD45R0⁺ humanen T-Zellpopulationen untersucht, eine letale xGvHD zu induzieren. Die Inokulation der naiven humanen T-Zellen in die *scid*-Versuchstiere (n=13) führte zur Ausprägung der typischen xGvH-Symptomatik, wobei diese innerhalb von 2 bis 3 Wochen starben. Die Kontrollgruppen, die mit einer vergleichbaren Zahl von unseparierten PBL (n=10) oder CD8-depletierten T-Zellen (n=5) inokuliert wurden, entwickelten in einem Zeitraum von 2 bis 4 Wochen eine letale xGvHD. Die Analyse des T-Zell-Rezeptor Repertoires dieser in der Maus aktivierten humanen T-Zellen zeigte eine oligoklonale Expansion in den murinen Organen. Die Untersuchung der V β CDR3 Spektratypen reflektierte eine deutlich eingeschränkte Diversität des TCR Repertoires. Dagegen entwickelten *scid*-Versuchstiere, die mit CD4⁺CD45R0⁺ T-Zellen inokuliert wurden (n=7), keine xGvH-Symptome und wurden nach 5-6 Wochen analysiert. Diese im Spender aktivierten T-Zellen scheinen somit keine Rolle bei der Auslösung der Erkrankung zu spielen. Die in der Maus neu-aktivierten humanen T-Zellen waren durch die Expression eines T_H1-typischen Zytokinprofils (IFN γ , IL-2, TNF α) und CD95L gekennzeichnet. Der Vergleich des Verlaufs der xGvHD in *scid*-Mäusen mit verschiedenen Mutationen (ICAM1, P-Selektin and *Fas*^{lpr}) mit den normalen *scid*-Mäusen nach Inokulation humaner CD4⁺ T-Zellen belegte, daß molekulare Interaktionen über Speziesgrenzen hinweg erfolgen und dabei einen starken Effekt auf die humane T-Zellreaktivität nehmen können.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die xGvHD durch naive humane CD4⁺CD45RA⁺ T-Zellen, die in der Maus neu-aktiviert werden, ausgelöst wird. Während der Antigenpräsentation zwischen humanen T-Zellen und murinen APC müssen die murinen Zellen eine adäquate Stimulation erhalten, um so kostimulierend auf die Proliferation der humanen T-Zellen in den murinen Lymphknoten zu wirken. Nach der Proliferation und der Differenzierung induzieren diese neu-aktivierten humanen T-Zellen die letale xGvHD in den *scid*-Versuchstieren. Darüberhinaus wurde gezeigt, daß auch über Speziesgrenzen hinweg funktionelle Ligand/Rezeptor-Interaktionen vorliegen, die eine essentielle Rolle bei der Vermittlung der Abstoßungsreaktion spielen. Das SCIDHu-Tiermodell ist somit ein wertvolles Instrument bei der Analyse der Xenoreaktivität humaner Lymphozyten gegen diskordantes Gewebe.

Stichworte: SCIDHu, Graft-versus-Host-Reaktion, xenogene T-Zell-Immunantwort

Abstract

Due to the limited supply of human organs for transplantation, the feasibility of xenogeneic transplantation of animal organs into humans is becoming of increasing interest as an alternative to human organ transplantation. At present little is known about the mechanisms underlying the cellular rejection and in particular the role of T cells with respect to rejection of discordant xenogeneic tissue. Only a few animal models exist, like the SCIDhu mouse model, which allow to study the human xenogeneic rejection and the mechanisms of rejection across species barriers in detail. Severe combined immuno-deficient (SCID) mice are unable to reject either allogeneic or xenogeneic grafts due to the lack of functional lymphocytes, therefore they are used to investigate the engraftment, homing and responses of human peripheral blood lymphocytes (Hu-PBL). However, the SCID mutation does not affect the natural immunity, and SCID mice retain natural killer (NK) cells, macrophages, granulocyte compartment and dendritic cells (DC). Therefore the mice were pretreated one day prior to injection with radiation and anti-murine NK cells sera (antiASGM1) to suppress the endogenous innate immunity and thus achieve a high level engraftment of Hu-PBL.

The intra-peritoneal injection of 5×10^7 CD4⁺ human T cells into conditioned SCID mice induced a lethal xenogeneic Graft-versus-Host-Disease (xGvHD). These animals developed severe pathological changes in liver, lung, spleen and lymph nodes and died within 2 to 4 weeks. The majority of the recovered human T cells expressed the CD45 isoform pattern RA⁺RO⁺ indicative of a previously activated/primed state. This raises the question whether this reflects the sensitization during the development of the xGvH-disease in the mouse or predominant survival of xenoreactive CD4⁺ T cells already primed to antigens in the human cell donor. To address this question, we have analysed the capability of isolated naive CD4⁺CD45RA⁺ and activated CD4⁺CD45RO⁺ T cell populations to induce the xenogeneic GvHD. Mice injected with naive human T cells (n=13) developed the typical symptoms of the xGvHD and died within 2 to 3 weeks. Animals of the control group, injected with an equivalent number of CD4⁺ T cells in a suspension of unseparated Hu-PBL (n=10) or CD8-depleted T cells (n=5) developed a lethal xGvHD within 2 to 4 weeks. The analysis of the TCR-Repertoire of these primed T cells demonstrated an oligoclonal heterogeneity in all murine organs. The profiles of the V β CDR3 Spectratypes showed a restricted diversity. In contrast, mice injected with CD4⁺CD45RO⁺ T cells, memory T cells, (n=7) did not develop any symptoms of a xGvH-Disease and were sacrificed for analysis 5 to 6 weeks after inoculation. These T cells appear to play no role in disease development. Furthermore the human T cells activated in the animals showed the expression of a T_H1-typical profile of cytokines (IFN γ , IL-2, TNF α) and CD95L. The course of the xGvHD after inoculation of CD4⁺ human T cells in SCID mice with various mutations (ICAM1, P-selectin and Fas^{lpr}) in comparison with normal SCID mice demonstrated that molecular interactions can occur across wide species differences with a marked functional effect on human T cell reactivity.

These results demonstrate that the xGvHD is caused by the sensitization of naive CD4⁺CD45RA⁺ T-cells which are newly primed in the mouse recipient. During the antigen presentation between human T cells and murine APC, the murine cells receive adequate stimulation to produce sufficient costimulatory signals to allow proliferation of the human T cells in the murine lymph node. Subsequent to proliferation and differentiation these activated human T-cells induced a lethal xGvHD in SCID mice. Furthermore this study demonstrates that there are functional ligand/receptor-interactions across species barriers which play an essential role in the mediation of graft rejection. In summary, the SCID mouse model proved to be extremely valuable tool for analysing the xenoreactivity of human lymphocytes against discordant tissues.

Key words: SCIDhu, xenogeneic Graft-versus-Host-Disease, T-cell xenoresponses

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Die diskordante Xenotransplantation	1
1.1.1 Hyperakute Xeno-Abstoßungsreaktion	2
1.1.2 Verzögerte vaskularisierte Xeno-Abstoßungsreaktion	2
1.1.3 T-Zell-vermittelte Xeno-Abstoßungsreaktion	3
1.1.4 Chronische Abstoßungsreaktion	4
1.2 Übersicht der an einer Abwehrreaktion beteiligten Immunzellen	4
1.2.1 Angeborene Immunität	4
1.2.2 Adaptive Immunität	5
1.3 Übersicht der Interaktionen bei der Antigen-Präsentation und der Aktivierung von Zellen	6
1.4 Das SCIDHu-Tiermodell	9
1.5 Untersuchung von xenoreaktiven humanen T-Zellen	11
1.6 Apoptose und Nekrose	15
1.7 Murine ICAM1-, P-Selektin- und <i>Fas</i>^{lpr}-Mutanten	17
1.8 Fragestellung dieser Arbeit	20
2 Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Versuchstierzucht	23
2.1.2 Bakterien	25
2.1.3 Vektor	25
2.1.4 Medien	26
2.1.5 Antikörper	26
2.1.6 Humane Lymphozyten	30
2.1.7 Zelllinien	31
2.1.8 Radioaktive Isotope	32
2.1.9 Primer	32

2.1.10	Lösungen / Puffer	34
2.1.11	Enzyme, Seren, Kits und Chemikalien.....	37
2.1.12	Verbrauchsmaterial	39
2.1.13	Geräte	39
2.1.14	Computerprogramme.....	41
2.2	Methoden.....	41
2.2.1	Isolation genomischer DNA	41
2.2.2	Genotypisierung der <i>SCID/ICAM1</i> - und <i>SCID/Fas^{lpr}</i> -Mutanten mittels Polymerase-Ketten-Reaktion.....	42
2.2.3	Genotypisierung der <i>SCID/P-Selektin</i> -KO-Mutanten mittels Southern Hybridisierung	43
2.2.4	Nachweis des murinen IgG/IgM-Titers der Mauszüchten	49
2.2.5	Markierung humaner Effektorzellen durch Fluorescein Isothiocyanat	50
2.2.6	Proliferationstest.....	51
2.2.7	Inokulationsverfahren.....	52
2.2.8	Isolierung der humanen Effektor- und Stimulatorzellen.....	53
2.2.9	Isolierung von lymphoiden Zellen aus humanem Blut mittels Depletion.....	55
2.2.10	Zytotoxizitätstestung	58
2.2.11	Stimulation von CD2 ⁺ T-Zellen	62
2.2.12	Immunfärbungen	63
2.2.13	Durchflußzytometrische Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen	68
2.2.14	Nachweis der humanen Effektormolekülexpression.....	69
2.2.15	TCR V β -Repertoire-Analyse.....	72
2.2.16	Übersicht der durchgeführten Untersuchungen.....	73
3	Ergebnisse.....	75
3.1	Charakterisierung der <i>scid</i>-Maus vor und nach Inokulation humaner Zellen	75
3.2	Induktion einer letalen Graft-versus-Host-Erkrankung durch Inokulation humaner Lymphozyten	78
3.2.1	Charakterisierung des Aktivierungsstatus humaner Zellen nach Inokulation..	84
3.3	Analyse des T-Zellrezeptor Vβ-Repertoires humaner T-Zellen	91
3.3.1	Allgemeine und individuelle Veränderungen des TCR V β -Repertoires.....	93
3.3.2	Zeitabhängige Veränderungen des TCR V β -Repertoires.....	94

3.4 Charakterisierung des xenoreaktiven Potentials funktionell unterschiedlicher T-Zell-Subpopulationen.....	96
3.4.1 Ausbildung einer xenogenen Graft-versus-Host Erkrankung durch humane CD2 ⁺ T-Zellen	96
3.4.2 Induktion einer xGvHD nach Inokulation humaner CD4 ⁺ T-Zellen	99
3.4.3 Fehlende Ausbildung einer xGvHD nach Inokulation humaner CD8 ⁺ T-Zellen	101
3.4.4 Induktion einer letal verlaufenden xGvHD durch humane naive CD4 ⁺ CD45RA ⁺ T-Zellen	103
3.4.5 Fehlende Induktion einer xGvHD durch schon im Blutspender aktivierte CD4 ⁺ CD45R0 ⁺ T-Zellen.....	108
3.4.6 Induktion der xGvHD nach seriellem Transfer von <i>in vivo</i> aktivierten humanen CD4 ⁺ CD45R0 ⁺ T-Zellen	114
3.4.7 Resümee der Depletionsstudien humaner Zellen bei der Induktion der xGvHD.....	119
3.5 Charakterisierung des Aktivierungs- und Differenzierungsstatus humaner Effektorzellen nach Ausbildung der xGvHD.....	120
3.5.1 Expression von Aktivierungsmarkern, wie IL-2-Rezeptor, TNF- α und IFN- γ in xenoreaktiven humanen T-Zellen	120
3.5.2 Effektormechanismen humaner T-Zellen bei der Induktion der xGvHD.....	124
3.5.3 Nachweis der CD95L-Expression humaner T-Zellen.....	125
3.5.4 Charakterisierung einer <i>SCID/Fas^{lpr}</i> -Mutante	127
3.5.5 Induktion der letalen xGvHD in <i>SCID/Fas^{lpr}</i> -Mutanten nach Inokulation humaner CD4 ⁺ T-Zellen.....	134
3.5.6 Resümee der Expression humaner Effektormoleküle xenoreaktiver humaner T-Zellen.....	136
3.6 Aktivierung humaner CD2⁺ T-Zellen durch IL-2 Stimulation und Kokultur mit murinen Fibroblasten	137
3.7 Wirkung des Expressionsverlustes muriner Adhäsionsmoleküle bei der Induktion der xGvHD.....	141
3.7.1 Induktion muriner Adhäsionsmoleküle nach Inokulation humaner T-Zellen.	141
3.7.2 Nachweis einer <i>de novo</i> ICAM1-Synthese muriner Hepatozyten nach Inokulation humaner T-Zellen	141

3.7.3	Charakterisierung der ICAM1-KO-Mutante	143
3.7.4	Induktion der letalen xGvHD in <i>SCID/ICAM1</i> -KO-Mutanten nach Inokulation humaner CD4 ⁺ T-Zellen.....	145
3.7.5	Charakterisierung der <i>SCID/P-Selektin</i> -KO-Mutante	151
3.7.6	Induktion der letalen xGvHD in der <i>SCID/P-Selektin</i> -KO-Mutante nach Inokulation humaner CD4 ⁺ T-Zellen.....	153
3.7.7	Resümee der Auswirkungen muriner KO-Mutationen auf die Ausbildung der xGvHD.....	155
4	Diskussion	157
4.1	Modell eines dreiphasigen Verlaufs der Induktion der xGvHD durch humane xenoreaktive CD4 ⁺ T-Zellen	158
4.2	Wirkung von murinen Abwehrmechanismen gegen humane Donorzellen	160
4.3	Reaktionen der humanen Immunzellen gegen xenogenes murines Gewebe.....	164
4.4	Charakterisierung der xenoreaktiven humanen T-Zellen.....	169
4.5	Expression von humanen Effektormolekülen nach Induktion der xGvHD.....	173
4.5.1	Zytokinmuster xenoreaktiver humaner T-Zellen	173
4.5.2	Wirkung der humanen CD95Ligand-Expression.....	176
4.5.3	Wirkung der murinen <i>Fas^{lpr}</i> -Mutation	177
4.6	Gerichtete Migration humaner Lymphozyten im SCIDHu-Tiermodell	178
4.7	Interaktionen muriner Adhäsionsmoleküle mit Rezeptoren humaner T-Zellen	180
4.7.1	Wirkung der murinen ICAM1-KO-Mutation.....	181
4.7.2	Wirkung der murinen P-Selektin-KO-Mutation.....	184
4.8	Schlußfolgerungen.....	187
4.9	Ausblick.....	187
5	Zusammenfassung	189
6	Literaturverzeichnis	191
7	Lebenslauf.....	209
8	Bisherige wissenschaftliche Tätigkeit	211

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AP	Alkaline Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxydisulfat
antiASGM1	anti Asialo GM1 (gegen murine NK-Zellen gerichtet)
bp	Basenpaare
BrdU	5'-Brom 2'-Desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Internationale Einteilung der Zelloberflächenmarker (cluster of differentiation)
CDR	Komplementaritäts-determinierende Region (complementary determining region)
CD95	Apoptoseinduzierender Rezeptor (Fas / APO-1)
CD95L	Ligand des CD95 Rezeptors
Ci	Curie
cpm	Zählimpulse pro Minute (counts per minute)
ConA	Concanavalin A
d	Tag
Da	Dalton
DAB	3,3 Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamin-tetra-acetat
ELISA	Enzym-gekoppelte Immunadsorptionsbestimmung (enzyme linked immunosorbent assay)
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	Durchflußzytometer (fluorescence-activated cell scanner)
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL-1	Fluoreszenz 1 (Grünfluoreszenz)
FL-2	Fluoreszenz 2 (Rotfluoreszenz)
Fw	Vorwärts Primer (forward)
FSC	Vorwärts-Streulichteigenschaften von Zellen (forward scatter)

Abkürzungsverzeichnis

g	Erdbeschleunigung
G α M	Ziege-anti-Maus Antikörper
h	Stunde
HLA	humaner Haupthistokompatibilitätskomplex
[³ H]-TdR	Tritium-markiertes Thymidin
hu	human
ICAM1	Interzelluläres Adhäsions Molekül 1
IFN- γ	Interferon gamma
I.E.	Internationale Einheit
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-2-R	α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25)
i.p.	intraperitoneal
KM	Kulturmedium
KO	knock-out- bzw. Verlustmutante
mAb	monoklonaler Antikörper
MACS	Magnetic Cell Sorting / Magnetische Zellsortierung
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
n.t.	nicht getestet
OD	Einheit optischer Dichte
PBL	Periphere Blut Lymphozyten
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphate Buffered Saline / Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumiodid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender Polymerasekettenreaktion
Rv	Reverse Primer
<i>scid</i>	schwerer kombinierter Immundefekt (severe combined immuno deficiency) der Maus
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sFasL	lösliche Form des CD95L (FasL / APO-1L)

SPF	spezifiziert-pathogenfreie Aufzuchtbedingungen von Mäusen
SRBC	Schaferythrozyten
SSC	Seitwärts-Streulichteigenschaften von Zellen (Side scatter)
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris Buffered Saline
TCR	T-Zellrezeptor
TdT	Terminal Desoxynucleotidyl Transferase
T _H 1	T-Helfer 1
T _H 2	T-Helfer 2
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
TRIS	Tris -(hydroxymethyl-) aminomethan
TUNEL	Enzymtest zum Nachweis von DNA Fragmentierung (TdT-mediated dUTP nick end labeling)
U	Unit / Einheit
(v/v)	Volumen pro Volumen
xGvHD	xenogene Graft-versus-Host Erkrankung
X mAb	kreuzvernetzter mAb

1 Einleitung

1.1 Die diskordante Xenotransplantation

Die Übertragung von Organen innerhalb einer Spezies wird als allogene Transplantation (von griech. allos = anders) bezeichnet. Anders als früher, ermöglicht die Immunsuppression auch Organe nicht-verwandter Menschen zu transplantieren. Mit dem steigenden Erfolg dieser Übertragungen hat auch die Zahl der möglichen Patienten zugenommen, so daß lange Wartezeiten für bestimmte Organe in Kauf genommen werden müssen. Um das Mißverhältnis aus fehlenden Organen und zunehmender Zahl von Patienten zu lösen, wird versucht, zusätzliche, geeignete Spender zu finden, um den erhöhten Organbedarf auszugleichen. Möglichkeiten ergeben sich hierbei durch die Übertragung von Organen zwischen konkordanten Spezies, wie zwischen Primaten und Mensch, oder diskordanten Spezies, wie z.B. Schwein und Mensch. Die Übertragung von Organen und Geweben anderer Spezies auf humane Empfänger wird als Xenotransplantation (von griech. xenos = fremd) bezeichnet.

Der Einsatz von Primaten als Organspender ist insofern fraglich, da durch die relativ nahe Verwandtschaft zum Menschen sich Pathogene aus Primaten, wie Bakterien oder Viren, durchaus direkt auf den Menschen auswirken können oder schon ausgewirkt haben (z.B. HIV). Darüberhinaus schränkt allein schon die reine Verfügbarkeit geeigneter Spendertiere die Möglichkeiten der Transplantation konkordanter Organe ein. Für das Spendertier Schwein spricht vor allem das Vorhandensein ausreichender Zahlen von Spendertieren, die frühe Fertilität, hohe Wurfgrößen, schnelles Wachstum und die Haltung dieser Tiere unter hygienisch einwandfreien Bedingungen (Pathogenfreie Zuchtbedingungen). Obwohl eine beträchtliche entwicklungsgeschichtliche Trennung zwischen Mensch und Schwein besteht, zeigen die porzinen Organe eine hohe Ähnlichkeit bei der Anatomie, der Physiologie, der Größe und des Gewichts im Vergleich zu menschlichen Organen. Bisher können jedoch keine Aussagen über die physiologische Wertigkeit dieser Schweineorgane, wie die Vereinbarkeit der Stoffwechsel-Produkte zwischen Mensch und Schwein, getroffen werden. Aus praktischen und ethischen Erwägungen werden zur Zeit Schweine als Organspender favorisiert. Vor der Übertragung von Organen und Geweben zwischen Spezies mit ausgeprägter phylogenetischer Distanz stehen jedoch zahlreiche immunologische Barrieren, die nachfolgend vorgestellt werden.

1.1.1 Hyperakute Xeno-Abstoßungsreaktion

Die hyperakute xenogene Abstoßungsreaktion, die durch natürlich vorkommende, xenoreaktive Antikörper und die Komplementkaskade vermittelt wird, stellt die erste immunologische Hürde einer erfolgreichen Übertragung von Organen im Menschen dar [1]/ [2]. Die Bindung dieser Antikörper an die im Empfänger nicht vorhandenen und daher als fremd erkannten Oberflächenmoleküle, wie z.B. an Galaktosyl-alpha-1-3-Galaktosyl-Zuckerresten beim Schwein, führt zur Aktivierung des Komplementsystems der Endothelzellen des Empfängers. Diese aktivierten Endothelien unterstützen wiederum die Koagulation und die Ausbildung von Thrombosen. Unter Mitwirkung von Antikörpern, NK-Zellen und Phagozyten kommt es zum Abtöten der erkannten körperfremden Zellen über die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC). Die hyperakute Abstoßungsreaktion erfolgt hierbei innerhalb von Minuten bis Stunden und führt in den vaskularisierten Spenderorganen zur Zerstörung der Gefäße, zu massiven Blutungen, zu Thrombosen und zur Ausbildung von Ödemen. Um diese erste Barriere der immunologischen Abwehr zu überwinden, gibt es mehrere Verfahren. Einerseits kann der Titer der natürlich vorkommenden xenoreaktiven Antikörper des Empfängers durch Plasmapherese vermindert und die Moleküle des Komplementsystems depletiert werden. Ein anderer Zugang mit dem Ziel, das xenogene Potential zu reduzieren, besteht in der Entwicklung von gentechnisch veränderten Organen. Als Beispiel wäre das gezielte Ausschalten (knock-out) des alpha-1-3-Galaktosyltransferase-Gens zu nennen. Gerichtete knock-out-Mutationen (Ausfallmutationen) sind ausschließlich im Tiermodell der Maus etablierte Verfahren. Weitere geeignete molekulare Zielstrukturen sind Regulatoren des humanen Komplementsystems, wie z.B. CD55 oder CD59. Die genetische Modifikation der Spendertiere mit der Expression dieser regulativen Moleküle auf den porzinen Zelloberflächen verhindert eine Komplementaktivierung und unterdrückt somit diese sehr früh auftretende Immunreaktion. Die unterschiedlichen Ansatzpunkte zur Überwindung der hyperakuten Abstoßungsreaktion werden weltweit untersucht.

1.1.2 Verzögerte vaskularisierte Xeno-Abstoßungsreaktion

Im Fall der Überwindung dieser frühen immunologischen Barriere erfolgt innerhalb kurzer Zeit (3-5 Tage) eine verzögerte Abstoßungsreaktion durch die Infiltration von aktivierten natürlichen Killerzellen (NK), Monozyten und B-Zellen des Empfängers [3]. Diese akute Entzündungsreaktion ist durch eine Aktivierung der Endothelzellen (Hochregulation von

multiplen pro-inflammatorischen Genen) des Transplantats mit der Ausbildung von Gerinnseln und komplexen Zytokinmustern gekennzeichnet. Reaktionen des Komplementsystems spielen bei dieser Aktivierung der Endothelien keine Rolle. Das aktivierte Endothel exprimiert neben pro-inflammatorischen Molekülen, wie ICAM1, E-Selektin und IL-1, auch Moleküle, die zur Hochregulation von Gerinnungs-Faktoren führen. Interessant ist, daß bei der Regulation vieler pro-inflammatorischer Gene der Transkriptionsfaktor NF- κ B beteiligt ist. Durch die Kontrolle der NF- κ B Expression im Transplantat könnte somit die Aktivierung der Endothelien vermindert werden. Bei schwacher Stimulation der Endothelzellen des Transplantats kann es zu einer zeitlich begrenzten Verträglichkeit kommen. Durch die Expression von anti-apoptotischen Genen, wie z.B. *bcl-2*, welche die Ausbildung einer verzögerten Abstoßungsreaktion vermindern, kann eine Akkomodation (zeitlich begrenzte Toleranz) erreicht werden.

1.1.3 T-Zell-vermittelte Xeno-Abstoßungsreaktion

Nach Tagen oder Wochen kann sich eine T-Zell-vermittelte Abstoßungsreaktion aufbauen. Die Mechanismen der zellulären Abstoßungsreaktion konnten bislang noch nicht intensiv untersucht werden, da die humorale und die verzögerte Immunantwort bisher der limitierende Faktor bei der Akzeptanz von Xenotransplantaten war. Aufgrund der trotz der Speziesdifferenz stattfindenden intakten Interaktionen von Rezeptor/Ligand-Bindungen wurde geschlossen, daß es keine fundamentalen Unterschiede im Verlauf einer zellulär vermittelten Immunität im Vergleich von allo- und xenogener Abstoßung gibt. Während die CD4⁺ T-Zellen unerlässlich für eine Ausbildung von Hautabstoßungsreaktionen sind, spielen CD8⁺ T-Zellen, NK-Zellen und B-Zellen dagegen nur eine untergeordnete Rolle. Die Präsentation von Antigenen und die damit verknüpfte Stimulation der T- und B-Zellen kann dabei direkt durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) des Empfängers oder indirekt über die APC des Donors erfolgen [2]/[4]. Die direkte Präsentation von Antigenen durch xenogene APC bedarf spezifischer Zellkontakte und Zellinteraktionen von TCR und MHC zwischen Mensch und Schwein. Neben einer direkten Antigenpräsentation durch APC müssen kostimulatorische Moleküle über die Speziesgrenzen hinweg effektiv wechselwirken, um eine T-Zell-vermittelte Abstoßungsreaktion erst zu ermöglichen (siehe auch Abschnitt 1.3). Herrlinger et al. konnten hierbei deutliche Wechselwirkungen zwischen humanen und porzinen Liganden und Rezeptoren, wie LFA1/ICAM1, CD4/MHC II und FasL/Fas, nachweisen [5]. Diese vorliegenden Interaktionen könnten mögliche Zielstrukturen darstellen, um Abstoßungsvorgänge zu verhindern. Transgene Spendertiere, bei denen das Gewebe durch

Deletion einzelner Gene oder durch eine permanente Expression von Schutzmolekülen (z.B.: CD95L) angepasst wird, könnten zu einer weiteren Verminderung einer xenoreaktiven Abstoßungsreaktion führen. Eine weitere wichtige Möglichkeit ist die Toleranzinduktion, bei der die Immunantwort des Empfängers dauerhaft unterdrückt wird, so daß hierdurch das fremde Gewebe geschützt wird.

1.1.4 Chronische Abstoßungsreaktion

Neuere Untersuchungen wecken zwar die Hoffnung, daß die Probleme der humoralen und der verzögerten Immunantwort in naher Zukunft überwunden werden können, weiterhin wird jedoch die nachfolgende T-Zell-vermittelte Abstoßungsreaktion eine sehr starke Barriere bei der Übertragung von xenogenen Geweben darstellen. Eine weitere immunologische Hürde stellt die chronische Abstoßungsreaktion dar, die selbst nach Jahren auftreten kann. Ursache der chronischen Abstoßungsreaktion sind entzündliche, vaskularisierte Läsionen im Transplantat. Mechanismen, die hierbei eine Rolle spielen, können in zwei Hauptgruppen unterteilt werden. Einerseits können alloreaktive Mechanismen, die mit der akuten Abstoßung assoziiert sind, wie Antikörper- und Komplementreaktion, und andererseits die Infiltration von reaktiven T-Zellen und Makrophagen zu einer chronischen Entzündungsreaktion im Transplantat führen.

Der Einsatz eines geeigneten Tiermodells könnte hierbei Möglichkeiten eröffnen, Molekülinteraktionen, die bei der zellulären Immunantwort eine Rolle spielen, *in vivo* zu untersuchen. Dabei müßte das eingesetzte Tiermodell gezielte Manipulationen (knock-out) erlauben (bislang nur in der Maus möglich), kurze Reproduktionszeiten besitzen und minimale Wechselwirkungen des xenogenen Empfänger-Immunsystems mit den Spenderzellen zeigen. Ferner sollte es aus praktischen Gründen im Kleintiermodell erfolgen. Das SCIDHu-Tiermodell erfüllte all diese Voraussetzungen.

1.2 Übersicht der an einer Abwehrreaktion beteiligten Immunzellen

1.2.1 Angeborene Immunität

Das Immunsystem schützt gegen eine Vielzahl von Mikroorganismen über unterschiedliche Wege. Dabei stellt die Haut die wichtigste physikalisch-chemische Barriere

als Schutz vor gefährlichen Substanzen dar. Die angeborene Immunität ist die erste Ebene der Abwehr gegen eingedrungene Mikroorganismen.

Lösliche, durch den Organismus zirkulierende Moleküle und Faktoren, wie die natürlichen Antikörper oder Serumproteine der Komplementkaskade, führen dabei durch Bindung an die Oberflächen der Eindringlinge über den klassischen oder alternativen Weg zu der Erkennung und Zerstörung von als „fremd“ erkannten Zellen. Zuerst werden die Keime durch residente Phagozyten aufgenommen. Daraufhin erfolgt der Aufbau einer akuten Entzündungsreaktion durch pro-inflammatorische Zytokine und das Komplementsystem. Durch den Körper zirkulierende Makrophagen und dendritische Zellen spielen bei der natürlichen Immunabwehr von extrazellulären Pathogenen (Bakterien) als Phagozyten und daneben als Antigen-präsentierende Zellen bei der Vermittlung der humoralen und zellulären Immunität eine entscheidende Rolle. Die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) der unspezifischen Immunabwehr erkennen und eliminieren Virus-infizierte Zellen. Weiterhin besitzen diese Zellen eine wichtige Funktion bei der Antikörper-abhängigen zellvermittelten Immunantwort (ADCC). All diese Schutzmechanismen bezeichnet man als angeborene Immunität.

1.2.2 Adaptive Immunität

Die spezifische, erworbene Immunität hingegen stellt einen Mechanismus dar, bei dem nach einer spezifischen Antigenerkennung Lymphozyten in der Lage sind, sich nach Aktivierung durch klonale Expansion zu vermehren und hierdurch eine verstärkte spezifische Immunabwehr aufzubauen. Ein weiteres wesentliches Merkmal dieser erworbenen Immunität ist das immunologische Gedächtnis, durch das nach wiederholtem Antigenkontakt eine sehr viel effizientere und schnellere, sekundäre Immunantwort erfolgen kann. Die spezifische Immunantwort kann dabei über zwei unterschiedliche Wege wirken. Die T-Lymphozyten vermittelte Immunität stellt eine Stufe des Immunsystems dar. Bei dieser zellvermittelten Immunantwort besitzen $CD4^+$ T-Helferzellen (T_H) und $CD8^+$ zytotoxische T-Lymphozyten die entscheidenden Funktionen. Die spezifisch Antigen-aktivierten $CD4^+$ T_H1 -Zellen lösen eine Immunantwort über Zytokinsekretion, wie z.B. $IFN-\gamma$, oder direkte Apoptoseinduktion durch CD95Ligand/CD95-Interaktion aus. Daneben können $CD4^+$ T_H2 -Zellen durch die Sekretion von Zytokinen sowohl die B-Zellen der spezifischen Immunität als auch die Makrophagen der unspezifischen Immunabwehr aktivieren. Die zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen spielen hingegen bei der Lyse von Pathogen-infizierten Körperzellen eine wichtige Rolle. Desweiteren erfolgt eine durch B-Zellen vermittelte humorale Immunantwort, bei der es zur

Sekretion von spezifisch Antigen-erkennenden Antikörpern kommt. Deren Anheftung an das Antigen führt zu einer erhöhten Phagozytose dieser als fremd erkannten Zellen.

Die Stärke eines Immunsystems ist in der Verknüpfung aller an der Immunreaktion beteiligter Zellen und Faktoren und in deren Regulation zu sehen. Alle Teilreaktionen einer Immunantwort beruhen dabei auf der Erkennung und Präsentation der Strukturen von Fremdgewebe und auf direkten Zell-Interaktionen zwischen T-Zellen, Antigen-präsentierenden Zellen (APC) und Endothelzellen. Darüberhinaus erfolgen Migrationen der beteiligten Zellen vom Ort einer Entzündung zu den peripheren Lymphknoten (Antigenpräsentation). Gleichzeitig kommt es zu zentralen Interaktionen in der Milz der Versuchstiere. Nachfolgend kommt es zu Proliferations- und Regulationsvorgängen der reaktiven Immunzellen.

1.3 Übersicht der Interaktionen bei der Antigen-Präsentation und der Aktivierung von Zellen

Durch die Übertragung von humanen Blutlymphozyten und Milzzellen aus Milzresektaten in *scid*-Mäuse liegen neben Antigen-präsentierenden Zellen (APC) des Empfängers auch APC des Spenders vor. Dieses diskordante Transplantationsmodell ermöglicht somit die Analyse der Reaktion humaner Immunzellen auf xenogene Antigene. Dies bedeutet, daß die Erkennung von Xeno-Antigenen durch humane T-Zellen entweder abhängig von der Präsentation durch Selbst-APC (human), durch xenogene murine APC oder durch beide erfolgen kann. Es können somit zwei getrennte Antigenpräsentations-Routen unterschieden werden. Die direkte Präsentation von murinen Antigenen erfolgt dabei durch die Antigen-präsentierenden Zellen des Empfängers (Maus), wie Makrophagen oder dendritische Zellen (DC). Die hierbei relevanten molekularen Strukturen sind die murinen MHC I- und MHC II-Moleküle.

Die indirekte Antigenpräsentation muriner Xenoantigene verläuft hingegen über APC des humanen Spenders. Dazu müssen die im Transplantat vorliegenden humanen APC die murinen Strukturen aufnehmen, aufbereiten und präsentieren. Die Präsentation übernehmen hierbei die humanen Makrophagen, Monozyten, DC oder B-Zellen (Abb. 1.1). Die Präsentation der murinen Peptide erfolgt durch humane MHC I- und MHC II-Moleküle. Die MHC I-Moleküle werden mit Peptiden zytoplasmatischer Proteine (endogene Peptide) beladen und nach Membranexpression den CD8⁺ T-Zellen präsentiert. Demgegenüber werden

exogene Peptide aus phagozytiertem Material von MHC II-Molekülen den $CD4^+$ T-Helfer Zellen präsentiert. Die Bindung und die Präsentation von Peptiden durch MHC-Moleküle auf den Oberflächen von spezialisierten APC sind ein kritisches Ereignis, welches bei der Initiierung, bei der Regulation und dem Fortbestehen einer Immunantwort von entscheidender Bedeutung ist [6]. Daneben können die APC auch einen großen Einfluß auf das Ergebnis der Differenzierung einer Immunantwort nehmen.

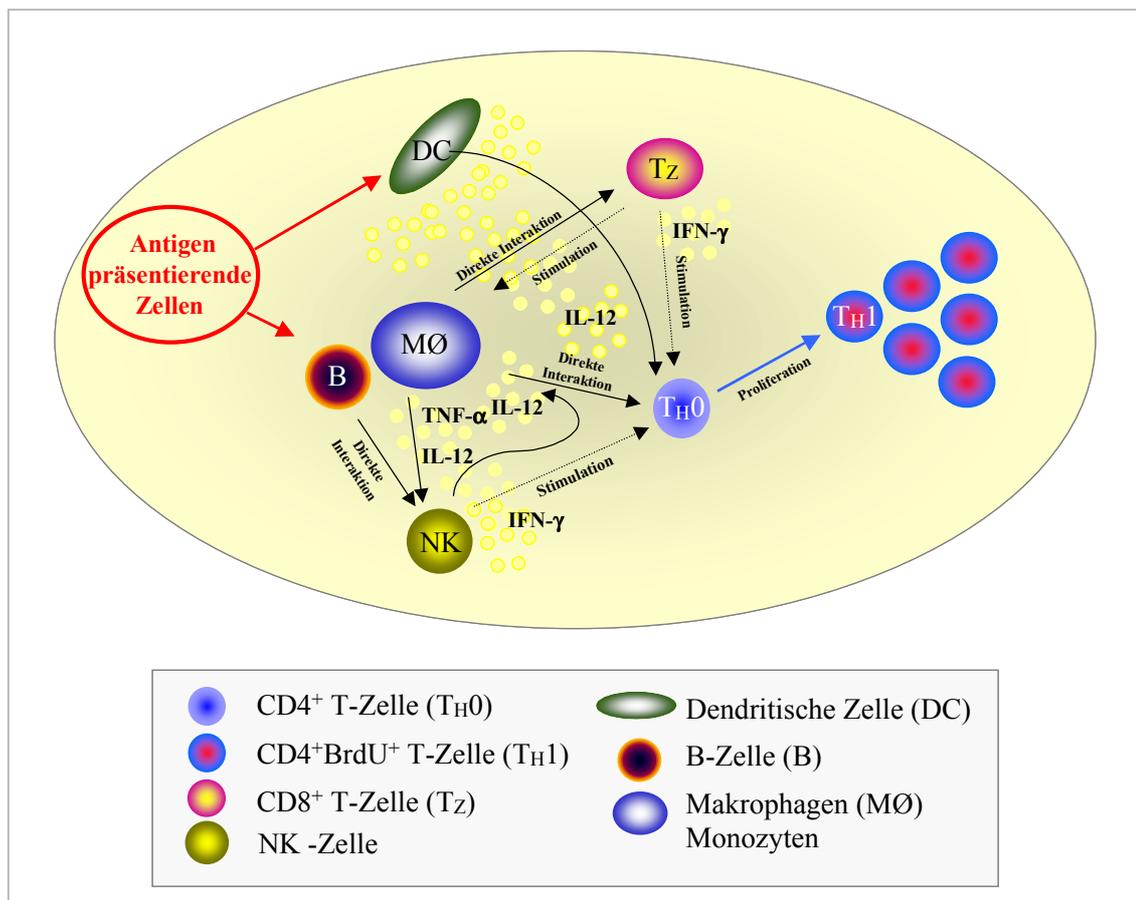


Abbildung 1.1: Übersicht von Wechselwirkungen Antigen-präsentierender Zellen und $CD4^+$ T-Zellen unter Mitwirkung eines spezifischen Zytokinmilieus. Makrophagen, dendritische Zellen (DC) und B-Zellen präsentieren Peptid-MHC-Komplexe, die direkt mit den T-Zellrezeptoren von $CD4^+$ T-Zellen (T_H) interagieren. Zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen (T_z) und NK-Zellen können einen stimulierenden Effekt durch die Sekretion spezifischer Zytokine, wie $IFN-\gamma$, einnehmen. Die Antigen-präsentierenden Zellen (APC) sind durch die Sekretion von Zytokinen, wie $IL-12$ und $TNF-\alpha$, gekennzeichnet. (Durchgezogene Pfeile zeigen eine direkte Interaktion zwischen den beteiligten Zellen und gepunktete Pfeile einen stimulierenden Effekt.)

Die Kinetik und die Expression von MHC II-Molekülen auf unterschiedlichen DC-Subsets stehen dabei in direktem Zusammenhang mit der funktionellen Ausrichtung der primären Immunantwort naiver T-Zellen [7]. Unterschiedliche Zytokinfaktoren üben einen starken

Einfluß auf die Differenzierungsvorgänge der $CD4^+$ T_H0 -Zellen aus und führen zu T_H1 - oder T_H2 -dominierten Immunantworten [8, 9]. Die dendritischen Zellen sind im Vergleich zu B-Zellen und Monozyten besonders wirksam bei der Präsentation und bei der Aktivierung von naiven T-Zellen. Die APC nehmen das Antigen am Ort der Entzündungsreaktion auf und wandern in die sekundären lymphatischen peripheren Organe, wie Lymphknoten und Milz, um dort die antigenen Peptide den zirkulierenden Lymphozyten zu präsentieren. Reife dendritische Zellen sind dabei durch die Expression von CD4, CD33, ICAM1, CD80, CD58 und durch die Expression von MHC I- und MHC II-Molekülen gekennzeichnet. Daneben zeichnen sich die dendritischen Zellen durch eine hohe Motilität vom Ort der Entzündung in die Lymphknoten aus.

Reife T-Lymphozyten exprimieren auf ihren Zelloberflächen einen spezifischen T-Zellrezeptor (TCR) und das für die T-Zellaktivierung wichtige kostimulatorische Molekül CD28. Sowohl $CD4^+$ T-Helferzellen als auch zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen exprimieren während der Reifung im Thymus nur eine TCR-Spezifität. Diese reifen T-Lymphozyten werden auch als naive T-Zellen bezeichnet, da sie noch nicht mit ihrem spezifischen Antigen Kontakt aufgenommen haben. Dieser Antigenkontakt wird durch APC vermittelt (siehe Abbildung 1.1). Während des Kontakts zwischen naiver T-Zelle und APC kommt es zu umfassenden Rezeptor/Ligand-Bindungen. Die naiven T-Zellen exprimieren neben dem spezifischen T-Zellrezeptor das kostimulatorische CD28, CD2, LFA1 sowie entweder CD4 oder CD8.

Mit Ausnahme der Superantigene können T-Zellen mit ihren spezifischen TCR nur Antigen im Kontext mit MHC-Molekülen erkennen. Dabei bindet und identifiziert ein spezifischer T-Zellrezeptorkomplex (TCR) einen spezifischen Peptid-MHC-Komplex auf der Zelloberfläche von aktivierten APC. Zu einer effizienten T-Zellaktivierung führt ein sekundäres kostimulatorisches Signal über weitere Rezeptoren der T-Zelle. Die kostimulatorischen Moleküle, wie CD80 und CD86, sorgen hierbei durch die Bindung an die Rezeptoren CD28 bzw. CTLA-4 für ein potentes Immunsignal. Daneben wirken auch Adhäsionsmoleküle, wie ICAM1, -2 und -3 oder LFA3, auf den Oberflächen von aktivierten APC als kostimulatorische Faktoren. Diese Moleküle interagieren mit LFA1 und CD2 auf den Zelloberflächen von T-Zellen. Die Kostimulation von T-Zellen durch die ICAM1/LFA1 Bindung erfolgt unabhängig von der CD86/CD28 Interaktion und kann daher einen direkten synergetischen Effekt auf die T-Zellantwort bewirken [10].

Die Antigenaktivierung von T-Zellen bewirkt zweierlei. Zum einen führt die einsetzende Teilung der aktivierten T-Zellen zu einer klonalen Expansion Antigen-spezifischer T-Zellklone, zum anderen kommt es zu einer Differenzierung der T-Zellen und damit zur Ausbildung einer Immunantwort gegen Antigene bzw. gegen das als „fremd“ erkannte Gewebe. Während dieser Vorgänge entwickelt sich aus der kleinen naiven T-Zelle eine Antigen-aktivierte stark blastoide T-Zelle mit hoher DNA-Syntheseaktivität. Neben diesen morphologischen Änderungen erfolgt bei dem Wechsel von der naiven, ruhenden T-Zelle zur aktivierten, stimulierten T-Zelle eine Änderung in der Expression von Molekülen, die insbesondere für die Adhäsion an den Endothelien verantwortlich sind. Eines dieser Moleküle, dessen verschiedene Isoformen für die Unterscheidung von naiven und memory/aktivierten T-Zellen herangezogen werden kann, ist CD45, das auf allen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird. Während naive T-Zellen die Isoform CD45RA⁺ exprimieren, zeichnen sich memory/aktivierte T-Zellen durch die Expression der Isoform CD45RO⁺ aus. Der Wechsel der Expression der CD45 Isoform von CD4⁺ T-Zellen korreliert dabei direkt mit Zellaktivierung und Proliferation [11].

1.4 Das SCIDHu-Tiermodell

Das *scid*-Tiermodell ermöglicht *in vivo* Untersuchungen der Abstoßungsreaktionen der humanen Immunzellen gegen xenogenes murines Gewebe. Grundlage für die Untersuchungen ist der C.B-17-*scid*-Mausstamm. Diese Tiere besitzen aufgrund eines genetischen Defektes keine ausdifferenzierten T- und B-Zellen und können daher z.B. übertragene Immunzellen anderer Spezies nicht abstoßen. Eine Manifestation dieser autosomal rezessiven Erkrankung ist das Fehlen der Rekombination der Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Gene aufgrund einer Mutation im Rekombinasesystem auf Chromosom 16 [12-14]. Zwar kann eine störende Einflußnahme durch murine Antikörper weitgehend ausgeschlossen werden; es wurden jedoch in einzelnen Versuchstieren immer wieder funktionstüchtige B-Zellen über den Immunglobulintiter nachgewiesen und dementsprechend auch geringe Zahlen muriner CD3⁺ T-Zellen durchflußzytometrisch beobachtet [15-17]. Carroll et al. zeigten, daß der Verlust von B-Zellen nicht in allen *scid*-Mäusen einer Population vorliegt, sondern C.B-17-*scid*-Mäuse mit zunehmendem Alter (erst nach 12 Monaten) sehr wohl funktionelle T- und B-Zellen ausbilden und damit natürlich auch murine Antikörper („Leakyness“) vorliegen können [16]. Aufgrund dieser Ergebnisse müssen alle Versuchstiere auf das Fehlen muriner IgG und IgM-Antikörper überprüft werden, um mögliche störende Einflußnahmen muriner T- und B-Zellen

gegen Donorzellen ausschließen zu können. Für die Experimente werden deshalb nur Mäuse genutzt, die einen IgG/IgM-Titer von weniger als 1-10 µg/ml aufweisen (Normalwert: BALB/c: 400µg/ml) und damit keine differenzierten B-Zellen besitzen. Ferner werden die Mäuse durchflußzytometrisch auf das Vorhandensein muriner CD3⁺ T-Zellen überprüft. Nur die immundefizienten Versuchstiere („non-leaky“) erfüllen die Voraussetzung für die Inokulationsexperimente.

Für die Kreuzungen werden nur *scid*-Mäuse eingesetzt, die einen IgG/IgM-Titer von weniger als 2 µg/ml aufweisen. Durch das Fehlen der T- und B-Zellen zeigen die *scid*-Versuchstiere große Veränderungen in der Ausbildung der lymphatischen Gewebe und Organe. Kennzeichnend für die immundefizienten *scid*-Versuchstiere ist der veränderte Aufbau von Thymus (keine Unterteilung in äußere Rindenschicht und Medulla) und Milz. Darüberhinaus werden kaum mesenteriale und axiliare Lymphknoten gefunden, allenfalls liegen diese rudimentär vor, ohne strukturellen Aufbau in rote und weiße Pulpa [18]. Einige Arbeitsgruppen etablierten ein humanes Immunsystem in den Versuchstieren und wiesen eine rege Migration humaner Zellen in murine lymphatische Gewebe nach [19, 20]. Funktionell kompetente humane Zellen wurden über einen Zeitraum von mehreren Monaten in den *scid*-Versuchstieren beobachtet [21]. Ferner wurde bei unbehandelten *scid*-Versuchstieren die Ausbildung einer xenogenen Graft-versus-Host Erkrankung beobachtet [18]/[22]. Andere Arbeitsgruppen beobachteten hingegen nur am Applikationsort persistierende humane Zellen, die in einem anergen stabilen Zustand vorlagen [23]/[24].

Diese sehr starken Unterschiede bei der Etablierung humaner Zellen können sehr wahrscheinlich durch die in den C.B-17-*scid*-Mäusen weiterhin vorliegenden Barriere der unspezifischen Immunität des Wirts erklärt werden. Da die *scid*-Mutation keinen Einfluß auf die Zellen der myeloischen Reihe, wie Makrophagen, Granulozyten und natürlichen Killerzellen nimmt, erfolgt durch diese murinen Abwehrzellen der natürlichen Immunität eine gegen die transplantierten Donorzellen gerichtete unspezifische Immunreaktion. Darüberhinaus wurde im Vergleich zum Wildtyp ein erhöhter relativer Anteil der Zellen der myeloischen Reihe und der murinen natürlichen Killerzellen in den *scid*-Versuchstieren beobachtet. Die Vorbehandlung der *scid*-Versuchstiere durch eine einmalige Zugabe des antiASGM-1 Antikörpers und eine subletale Bestrahlung (3 Gy) 24 h vor der Inokulation humaner Zellen führte zu einer *in vivo* Depletion der murinen NK-Zellen [25]/[26]¹.

¹ Protokoll nach Dessureault [26]

Nur dieses Tiermodell erlaubt bislang die Herstellung von Ausfallmutanten (KO-Mutationen) bzw. deren Einkreuzung innerhalb relativ kurzer Zeiträume (2 bis 3 Jahre). Mit diesem Modell könnte gezielt der Einfluß von knock-out-Mutationen muriner Oberflächenmoleküle auf die Interaktion humaner Lymphozyten mit murinen Zellen sowohl *in vivo* als auch im Rahmen von Zellkulturversuchen untersucht werden. Die aus den murinen Geweben, wie Lunge, Milz, Blut, Lymphknoten und Knochenmark nach Ausbildung der zellulär vermittelten xenogenen Graft-versus-Host Erkrankung (xGvHD) wiedergewonnenen, humanen Immunzellen, erlauben eine direkte Untersuchung von xenoreaktiven T-Zellen. Um Veränderungen im Expressionsmuster spezifischer Oberflächenmarker oder Veränderungen der humanen Zytokinexpression zu untersuchen, werden mögliche Aktivierungsvorgänge über Markermoleküle, wie CD25-Rezeptor, CD45 oder IFN- γ , untersucht.

1.5 Untersuchung von xenoreaktiven humanen T-Zellen

Die zellulär vermittelte Abstoßungsreaktion bietet die Möglichkeit zur Untersuchung von Antigen-aktivierten, xenogenen humanen T-Zellen. In dem *in vivo* SCIDHu-Tiermodell kann es dabei zu direkten Wechselwirkungen zwischen den humanen T-Zellen und den Antigen-präsentierenden Zellen des Empfängers, zu indirekten Präsentationen durch die APC des Donors oder zu einer Kombination der beiden Präsentationsrouten kommen. Um mögliche Aktivierungsvorgänge der humanen T-Zellen zu untersuchen, können der Wechsel der CD45 Expression humaner Immunzellen nach Antigenkontakt, die induzierte Expression von CD25-Rezeptor und MHC II-Molekülen sowie morphologische Änderungen dieser Effektorzellen genutzt werden. Weiterhin können mögliche Proliferationsvorgänge humaner Zellen durch FITC-Markierungen oder durch den Einbau von BrdU während der S1-Phase des Zellzyklusses belegt werden.

Die Unterscheidung funktioneller Subpopulationen von T-Zellen über die Expression der CD45-Isoform wird dabei durch mAb, die spezifisch entweder die CD45RA⁺- oder die CD45R0⁺-Isoform erkennen, ermöglicht [27, 28]. Die CD45-Expression der T-Zellen erlaubt somit eine Unterscheidung von ruhenden naiven CD45RA⁺ T-Zellen und stimulierten CD45R0⁺ T-Zellen. Verschiedene Arbeitsgruppen nutzten den CD45 Marker für *in vitro* Untersuchungen des Immungedächtnisses und wiesen eine reversible Expression der CD45RA⁺-Isoform auf aktivierten CD45R0⁺Zellen nach [29, 30]. Diese Antikörper können weiterhin auch für die Trennung von einzelnen T-Zellsubpopulationen genutzt werden, um die humanen Immunzellen zu identifizieren, die für die zelluläre Abstoßungsreaktion

ursächlich verantwortlich sind. Die separierten, angereicherten humanen Zellsubpopulationen können genutzt werden, um Wirkungen und Funktionen dieser Zellen bei der Ausbildung der xenogenen Graft-versus-Host-Reaktion im SCIDHu-Tiermodell zu untersuchen.

Die Arbeitsgruppe Westermann et al. zeigte im allogenen Tiermodell der Ratte, daß es keinerlei Unterschiede bei der Migration von naiven und aktivierten T-Zellen durch die Organe gibt [31]. Bode et al. zeigten ferner, daß die Anhäufung von T-Zellen in bestimmten Geweben vielmehr aus einer präferentiellen Proliferation und reduzierter Apoptose erfolgte, als über eine gerichtete Einwanderung [32]. Als Grund wird eine unterschiedliche Adhäsion der Zellen diskutiert, die durch die Expression von verschiedenen Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren erklärt wird. Diese können zu einem veränderten Wanderungsverhalten bzw. Filtrierungsereignis in den Lymphknoten führen, durch die es zu einer Anreicherung naiver T-Zellen kommen kann.

Die Adhäsion von Lymphozyten an Endothelzellen wird über Selektine und Integrine vermittelt und ermöglicht eine Transmigration ins lymphatische und ins entzündliche Gewebe. Für eine gerichtete Migration dieser Zellen in verschiedene lymphatische und nicht-lymphatische Gewebe gibt es fundamentale Prinzipien. Einerseits kann es z.B. durch die Interaktionen von T-Zellen und Neutrophilen mit den Endothelzellen zu zellspezifischen Einwanderungen einzelner Zellpopulationen kommen. Eine differentielle Migration von naiven und Antigen-stimulierten T-Zellen kann andererseits durch Homing-Rezeptoren, wie L-Selektin- oder Chemokin-Rezeptoren, vermittelt werden. Aktivierte T-Zellen zeigen zudem eine hohe Präferenz zu Geweben, in denen die Antigen-Stimulation erfolgte bzw. ein entzündliches Ereignis vorlag [33].

Von dem vorhandenen peripheren Repertoire an TCR V β -Spezifitäten reagieren 1 - 10% der T-Zellen gegen allogene und nur ca. 1 - 3% gegen xenogene MHC-Moleküle [34]. Die Beeinflussung des TCR Repertoires durch Xenoantigene, nach Übertragung humaner T-Zellen in ein murines immundefizientes Milieu, beruht darauf, daß die humanen Immunzellen mit den Xenoantigenen des Empfängers interagieren und dadurch stimuliert werden. Aufgrund dieser Vorgänge sollte es bei Übereinstimmung mit den Befunden aus allogenen Tiermodellen zur Expansion von humanen T-Zellen mit einem bestimmten TCR kommen. Diese Veränderung in der Zusammensetzung der T-Zellpopulation kann durch die Analyse der Längendiversität der CDR3-Region des T-Zellrezeptors der humanen T-Zellen untersucht werden. Die CDR3-Region wird aus variablen Elementen, Diversitätselementen und junktionalen Elementen gebildet. Eine zusätzliche Diversifikation wird durch das

Einbringen nicht genetisch festgelegter N-Nukleotide zwischen V β und D β sowie D β und J β erreicht.

Batten et al. zeigte durch *in vitro* Experimente, daß Variabilitäten in der Ausprägung der Immunantwort sehr wahrscheinlich durch Unterschiede bei der Interaktion von T-Zell-Korezeptor CD4 und dem xenogenen MHC II-Liganden zu erklären sind [35]. Zusätzlich nehmen Zytokine einen sehr starken Einfluß auf die Ausrichtung der Immunreaktion. Aus naiven T_{H0} CD4⁺ T-Zellen differenzierte T_{H1}- und T_{H2}-Zellen können dabei aufgrund ihrer Zytokinsekretion unterschieden werden (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Die Wirkung von Zytokinen auf die Differenzierung von T- und B-Zellen (nach [36])

Zytokine	T-Zellquelle	Effekt auf	
		B-Zellen	T-Zellen
Interleukin-2	T _{H0} , T _{H1}	Wachstum	Wachstum
Interferon-γ	T _{H1}	Differenzierung	Inhibierung T _{H2}
TNF-α	T _{H1} , wenige T _{H2}	-	-
Interleukin-4	T _{H2}	Aktivierung, Wachstum MHC II \uparrow	Wachstum, Überleben
Interleukin-10	T _{H1} , T _{R1} ?	MHC II \uparrow , ?	Inhibierung T _{H1} , ?

\uparrow = verstärkte Induktion der Expression

Die vorgestellten Zytokine besitzen multiple Aktivitäten und wirken in einem Zytokin-Netzwerk auf unterschiedliche Zelltypen. Weiterhin sind einige T_{H1}-Zellen durch eine CD95Ligand-Expression gekennzeichnet. Die T_{H0} Zellen, als Vorläuferzellen der T_{H1}- und T_{H2}-Helferzellen, sezernieren sowohl IL-2, IFN- γ als auch IL-4 Zytokine. Die simplifizierende Einteilung in T_{H1}- und T_{H2}-Helferzellen wird jedoch dadurch limitiert, daß einige T-Zellen, wie die T_{R1}-Zellen (R für Regulation), durch eine sehr umfangreiche Zytokinsekretion von IL-2, IL-4 und IL-10 gekennzeichnet sind. Sehr wahrscheinlich besitzen diese Zellen eine regulative, unterstützende Wirkung auf andere T-Zellen.

Die T_{H1}-Zellen sind dabei durch die Sekretion von Interleukin 2, TNF- α , TNF- β und IFN- γ gekennzeichnet und spielen als Effektoren bei der über Phagozyten vermittelten Immunantwort eine Rolle. Die CD4⁺ T_{H2}-Zellen hingegen sind durch die Sekretion von IL-4, IL-13, IL-10 und IL-5 gekennzeichnet. Diese Zellen stimulieren die IgE und IgG1 Antikörperproduktion, wirken also auf B-Zellen. Gleichfalls kommt es über die Sekretion von IL-5 und IL-10 zu einer Inhibition der Funktion der Makrophagen [37]. Zusätzlich können

diese T-Zellsubpopulationen durch eine differierende Expression von Oberflächenmarkern unterteilt werden. Die CD4⁺ T_H1-Zellen exprimieren während ihrer Differenzierung CD26, membranständiges IFN- γ , Lymphozyten-Aktivierungs-Gen-3 (LAG3) und Chemokin-Rezeptoren, wie CCR5 und CXCR3. Die T_H2-assoziierten Moleküle sind L-Selektin, CD30 und die Chemokinrezeptoren CCR3, CCR4 und CCR8. Zahlreiche Erkrankungen können auf eine durch diese unterscheidbaren T_H1- oder T_H2-Zellsubpopulationen vermittelte Ursache zurückgeführt werden. Die T_H1 dominierten Immunreaktionen spielen sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von organspezifischen Autoimmunerkrankungen, der akuten Allotransplantatabstoßung und einigen chronischen Entzündungserkrankungen. Demgegenüber führen T_H2 vermittelte Immunreaktionen zu einem reduzierten Schutz vor intrazellulären Pathogenen, zur Ausbildung chronischer Graft-versus-Host-Erkrankungen (GvHD) sowie einigen systemischen Autoimmunerkrankungen und Allergien [9, 38].

Die Ausbildung der xenogenen GvHD im SCIDHu-Tiermodell wird möglicherweise durch humane T_H2 CD4⁺ T-Zellen vermittelt, wie von Wren et al. gezeigt [39]. Der Nachweis natürlich vorkommender, xenospezifischer T-Zell-Immunität des Menschen gegen Antigene des Schweins, allein durch den Verzehr von Schweinefleisch, zeigte, daß diese über IFN- γ ⁺ T-Zellen vermittelte Immunantwort durchaus eine weitere Barriere für die Xenotransplantation darstellt [40].

Eine direkte Erkennung von murinen Zellen durch humane NK-Zellen kann im Gegensatz zu den T-Zellen ohne vorherige Aktivierung oder Immunisierung ablaufen. Die NK-Zellen nutzen dabei verschiedene zytolytische Mechanismen, wie die Apoptoseinduktion über CD95L, die sekretorische Lyse über Granzyme und Perforine oder die Antikörper-abhängige Zytolyse (ADCC). Um zu klären, welche Rolle die humanen NK-Zellen der genutzten Inokula bei der Erkennung muriner Gewebe spielten, wurden durchflußzytometrische Analysen durchgeführt. Hierbei wurde deutlich, daß die *in vivo* Depletion muriner NK-Zellen durch den antiASGM1-Antikörper nicht nur die murinen Zellen eliminierte, vielmehr wurde gezeigt, daß dieser Antikörper auch eine gegen humane NK-Zellen gerichtete Kreuzreaktivität besaß. In dem eingesetzten SCIDHu-Tiermodell konnte somit keine direkte Abstoßung muriner Gewebe durch humane NK-Zellen erfolgen und bildete damit auch nicht die Basisreaktion der xGvHD. Die Übertragung von aktivierten humanen NK-Zellen kann jedoch zur Ausbildung akuter GvHD-ähnlicher Läsionen in den Versuchstieren führen, wobei die von den NK-Zellen sezernierten Zytokine eine zentrale Rolle bei der Pathogenese dieser Erkrankung spielen [41].

1.6 Apoptose und Nekrose

Die Aktivierung von Antigen-spezifischen T-Zellen durch ihre Antigenrezeptoren resultiert in Blastenbildung und einem exponentiellen Ansteigen der Zellzahlen durch Zellteilung. Nach der klonalen Expansion der aktivierten T-Zellen folgt letztlich ihre Differenzierung zu Effektorzellen. Im Anschluß an eine erfolgreiche Immunantwort werden die aktivierten Effektorzellen nicht mehr benötigt und stellen nun ihrerseits eine Gefahr für den Organismus dar. Über die Auslösung des Programmierten Zelltodes (Apoptose) bei den nicht mehr benötigten Effektorzellen erfolgt eine Regulation der Immunantwort. Der Mechanismus zur Induktion der Apoptose könnte auch bei der Ausbildung der xGvHD eine zentrale Rolle spielen [42].

Der Begriff Apoptose stammt aus dem Griechischen und beschreibt das Herabfallen der Blätter von Bäumen (*apó* bedeutet weg, *ptósis* bedeutet fallen). Apoptose wird als ein Vorgang definiert, in dessen Verlauf Zellen scheinbar kochen (*boiling*) und sich kleine, membranumschlossene Bläschen von der sterbenden Zelle abschnüren. Am Ende dieses Prozesses steht das Verklumpen der Zellreste. Die apoptotischen Bläschen und Zellreste werden schnell von benachbarten Zellen oder Makrophagen phagozytiert. Dadurch wird eine Entzündungsreaktion in Geweben mit apoptotischen Zellen verhindert. Weitere Analysen zeigen, daß es zu einer Kondensation der DNA in apoptotischen Zellen kommt und diese DNA fragmentiert wird. Bei diesem Prozeß wird die DNA nach der Chromatinkondensation zwischen den Nukleosomen zerschnitten, welches zu distinkten Fragmentgrößen führt, die dem Vielfachen von 186bp entsprechen. Einer der wichtigsten Mechanismen zur Ausbildung der Apoptose ist die Interaktion von FasLigand (CD95L) mit dem Rezeptormolekül Fas (CD95). Der meist membrangebundene FasLigand ist ein Mitglied der TNF-Familie. Das Fas Rezeptormolekül gehört dementsprechend zur Familie der TNF-Rezeptoren. Die Ausbildung der Apoptose erfolgt dabei durch die Aktivierung von Cystein-Proteasen, sogenannten Caspasen, die als Kaskade letztendlich eine DNase aktivieren, welche im Zellkern die DNA in die charakteristischen 186bp Fragmente schneidet. Apoptotische Zellen exprimieren zudem Phosphatidylserine an der Membranoberfläche, ein Zeichen für den Verlust der Asymmetrie der Phospholipidmembran. Die Exposition von Phosphatidylserinen an der Zelloberfläche wirkt chemotaktisch auf Makrophagen und unterstützt die schnelle Phagozytose der toten Zellen.

Neben der Apoptose kann es zur Ausbildung von Nekrose, einem Zerfall von Zellen, kommen. Hierbei spielen physikalische oder chemische Noxen, wie bei Sauerstoff- und

Nährstoffmangel, Läsionen durch Antikörper und Komplement oder aber Reaktionen auf Toxine, eine Rolle. Nekrotische Zellen schwellen im Gegensatz zu apoptotischen Zellen an, lysieren und geben Bestandteile des Zytoplasmas und des Zellkerns an das interzelluläre Milieu ab. Eine Folge dieser Lyse ist eine Entzündungsreaktion. Im Rahmen dieser Reaktion wird das abgestorbene Gewebe durch Phagozytose abgebaut und eine Wundheilung ermöglicht. Nekrose war für lange Zeit die einzige bekannte Form von Zelltod. In der Tabelle 1.2 sind die wichtigsten Unterschiede zwischen Nekrose und Apoptose gegenübergestellt.

Tabelle 1.2: Die Kennzeichen von Nekrose und Apoptose

	Nekrose	Apoptose
Ursache	Unterversorgung der Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen	Molekulare Interaktion über Rezeptor-Ligand Bindung
Histologischer Nachweis	Zerstörung ganzer Zellverbände Zellen schwellen an Zellorganellen werden zerstört	Tod einzelner Zellen Chromatinkondensation Bildung apoptotischer Bläschen
DNA-Fragmentierung	Zufällige Fragmentgrößen	DNA-Leiter (Fragmente n x 186bp)
Plasmamembran	Lyse	Intakte Membran, jedoch Bildung von Abschnürungen
Folgen	Entzündung	Keine Entzündung

Die Induktion von Apoptose über den CD95L/CD95-Mechanismus besitzt eine wichtige Funktion bei akuten Entzündungsreaktionen. Dabei scheint die Anwesenheit des löslichen CD95L-Faktors schon ausreichend für die Auslösung der Apoptose. Iwasaki et al. und andere zeigten, daß die Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) im allogenen Tiermodell sehr stark mit diesen CD95L/CD95-Interaktionen assoziiert ist [43]/[44]. Die Inokulation der Donorzellen führte in den Empfängerzellen zur Apoptose. Neben der Auslösung der Apoptose über die CD95L/CD95-Interaktion kann die Sekretion von zytotoxischen Lymphokinen durch CD4⁺ T-Zellklone zu einer Zellkontakt-unabhängigen, indirekten Auslösung der Apoptose führen [45]. Untersuchungen der Arbeitsgruppe Yi et al. belegten, daß die zellvermittelte Zytotoxizität von humanen CD4⁺ T-Zellen gegen porcines Gewebe prädominant durch Apoptose unter Mitwirkung der CD95L/CD95-Interaktion ausgelöst wird [42].

Diese Ergebnisse deuten auf eine direkt vermittelte Zytotoxizität xenoreaktiver CD4⁺ T-Zellen bei der zellulär-vermittelten Xenotransplantatabstoßung.

1.7 Murine ICAM1-, P-Selektin- und *Fas*^{lpr}-Mutanten

Die molekularen Interaktionen zwischen humanen Effektorzellen und murinen Zellen in diesem Tiermodell erlauben die Untersuchung von Molekülsystemen, die bei der Ausbildung der xGvHD eine Rolle spielen könnten. Dabei kann über den Einsatz unterschiedlicher muriner Ausfallmutanten die spezifische Interaktion von humanen Liganden und deren murinen Rezeptoren untersucht werden. Über den Einsatz von CD95 Mutanten könnte die Rolle der CD95L/CD95-Interaktionen bei der Ausbildung der xGvHD direkt untersucht werden. Hierfür bieten sich Stämme an, die aufgrund zweier Mutationen in den Genen Fas (Mutantenallel: *lpr*) und FasL (Mutantenallel: *gld*) keine Expression dieser Gene zeigen. Zahlreiche Arbeitsgruppen haben die Funktion und die Rolle der CD95L/CD95-Interaktionen bei der homeostatischen Regulation der klonalen Expansion von Lymphozyten untersucht [46, 47]. Die Arbeitsgruppe von Den Brink et al. zeigte überraschenderweise, daß *Fas*^{lpr}-Mäuse für eine GvHD empfänglicher wurden [48]. Wie in Abbildung 1.2A) dargestellt, könnte durch den Einsatz der *SCID/Fas*^{lpr} Mutante im Vergleich zum Wildtyp untersucht werden, ob die über CD95L/CD95-vermittelte Apoptose eine Rolle bei der zellulär vermittelten Abstoßungsreaktion im SCIDHu Tiermodell spielt.

Auf den Endothelzellen exprimierte Adhäsionsmoleküle sind bei der Vermittlung von Zell-Interaktionen und somit auch bei der Migration von Lymphozyten von entscheidender Bedeutung. Einige dieser Moleküle werden konstitutiv, andere erst durch chemotaktische oder pro-inflammatorische Stimuli hochreguliert. Ein grundlegender Mechanismus bei der Interaktion von Lymphozyten und Endothelzellen ist die Wechselwirkung von CD11/CD18 mit interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAM1, ICAM2) der Immunglobulin Superfamilie. Weitere wichtige Interaktionen werden über Selektin-Liganden (PSGL1) und deren Rezeptoren, wie P-Selektin, vermittelt. Dabei unterstützt die P-Selektin-vermittelte Bindung das sogenannte „rolling“ der Lymphozyten. Durch die Bindung LFA1/ICAM1 kommt es zu einer weiteren Verstärkung und Stabilisierung der Anheftung der Lymphozyten an das Endothel, wie in Abbildung 1.2B) schematisch dargestellt [49]. Diese LFA1/ICAM1 Interaktionen besitzen eine unterstützende Funktion bei der Antigenpräsentation im Zuge der Wechselwirkung der Bindung von APC und naiven Lymphozyten. Zahlreiche Arbeitsgruppen setzen die Möglichkeit des gezielten Ausschaltens von einzelnen Genen (knock-out) im

murinen Tiermodell ein. Über die Auswirkungen dieser Ausfallmutationen der verschiedenen Adhäsionsmoleküle auf die Migration von Zellen und auf die Ausbildung von Krankheiten bestehen teils kontroverse Ansichten, wie nachfolgende Befunde belegen.

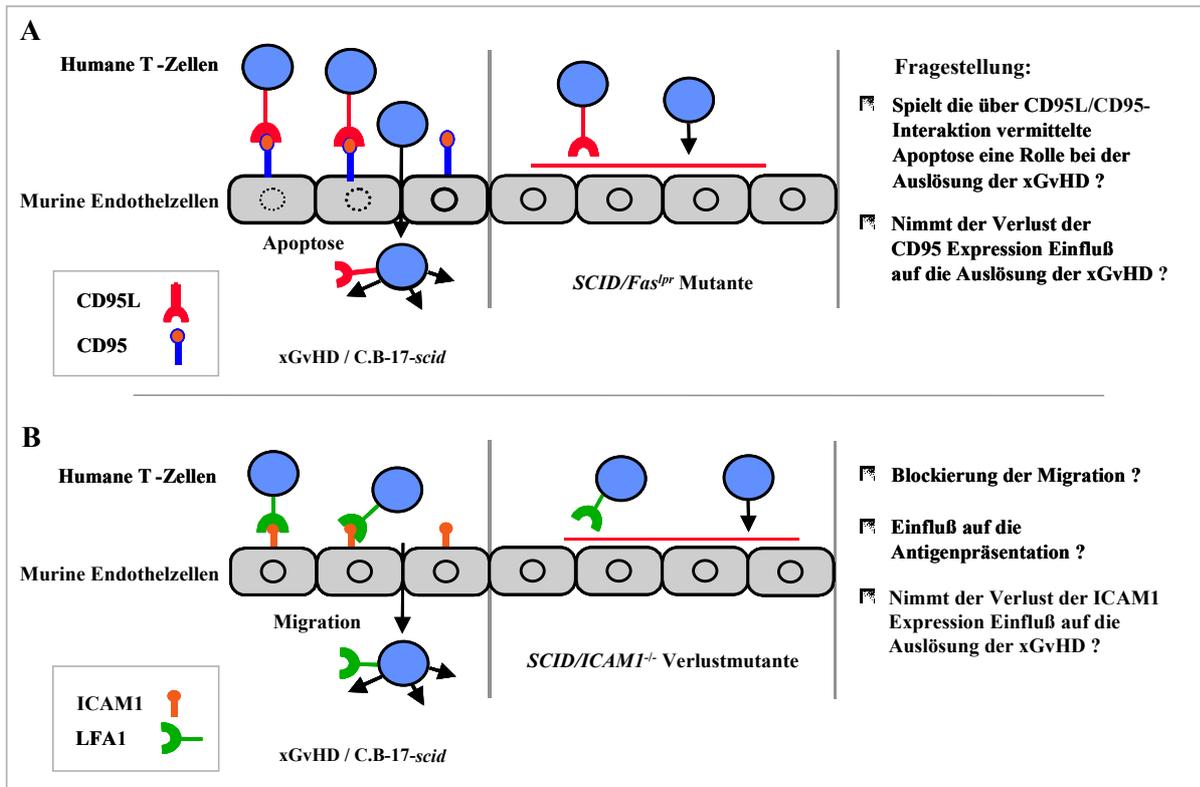


Abbildung 1.2: Der Einfluß einzelner muriner Moleküle bei der Ausbildung der xGvHD könnte über den Vergleich des Verlaufes der Erkrankung von transgenen ICAM1 (CD54), P-Selektin (CD62P) und Fas (CD95) Mutanten im Vergleich zum Wildtyp bestimmt werden. A) Der Verlust der murinen Fas (CD95) Rezeptorexpression könnte dabei einen direkten Einfluß auf die über den CD95Liganden vermittelte Apoptose nehmen, falls diese Interaktion bei der Ausbildung der xGvHD von Bedeutung wäre. B) Das Adhäsionsmolekül ICAM1 könnte als Oberflächenmolekül sowohl Einfluß auf die Adhäsion von Lymphozyten an Endothelien als auch bei Prozessen der Antigenpräsentation nehmen. Weiterhin könnte der Einfluß der P-Selektin Verlustmutation auf aktivierten Endothelien untersucht werden. Die oben aufgeführten Fragestellungen werden in Abschnitt 1.8 erläutert.

Durch Arbeiten von Bullard et al. wurde belegt, daß bei P-Selektin/ICAM1-Doppelmutanten die akute Emigration von Neutrophilen in die Peritonealhöhle im Vergleich zum Wildtyp komplett fehlt [50]. Desweiteren zeigt diese Arbeitsgruppe, daß die ICAM1 Ausfallmutante weit weniger empfänglich für eine Kollagen-induzierte Arthritis ist [51]. Weiterhin wird von Sligh et al. belegt, daß die entzündliche Immunantwort in ICAM1-Ausfallmutanten abgeschwächt erfolgt [52]. Arbeiten von Xu et al. deuten auf einen direkten Einfluß des Verlustes der differentiellen ICAM1-Expression auf den Verlauf von

unterschiedlichen Erkrankungen [53]. Demgegenüber wurde gezeigt, daß die fehlende Expression von ICAM1 oder P-Selektin keinen Einfluß auf die allo- oder xenogene Transplantatabstoßung nimmt [54]. Ebenso zeigen Arbeiten von Butini et al., daß sowohl ICAM1 als auch ICAM2 als Gegenpart von LFA1 fungieren, so daß unter Umständen der Verlust der ICAM1-Expression durch die Bindung mit dem homologen ICAM2 ersetzt werden kann [55, 56]. Weiterhin wird von der Arbeitsgruppe King et al. gezeigt, daß in der ICAM1-Ausfallmutante neue Isoformen des murinen Interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 durch alternatives RNA Splicing generiert werden [57]. Durch Arbeiten von Warrens et al. wurde gezeigt, daß eine Kreuzspezies-Kompatibilität von ICAM1 und dem Liganden (LFA1) zwischen Mensch und Schwein besteht und somit eine Interaktion über Speziesgrenzen hinweg erfolgen kann [61-63]. Die Erstellung von ICAM1/*Fas*^{lpr}-Doppelmutanten durch Kreuzungen von Bullard et al. zeigte, daß die ICAM1-Ausfallmutation zu einem verstärkten Überleben der normalerweise früh sterbenden *Fas*^{lpr}-Mäusen führt [58].

Anhand der P-Selektin Ausfallmutation könnte untersucht werden, welchen Einfluß eine fehlende Expression des murinen P-Selektins bei der Ausbildung der xGvHD besitzt. Auch hier kommt es zur kontroversen Diskussion. Die Befunde von Austrup et al. zeigen für Selektine eine selektive Wirkung bei der Einwanderung von T_H1- und T_H2-Zellen [59]. Dabei vermitteln P- und E-Selektin eine verstärkte Einwanderung von T_H1-Zellen in entzündliches Gewebe. Im Gegensatz hierzu belegt die Arbeitsgruppe Wong et al., daß die Selektine nur eine minimale Rolle bei der Migration von Lymphozyten in entzündetes Lebergewebe spielen [60].

Die sehr stark differierenden Ergebnisse beruhen sehr wahrscheinlich auf dem Einsatz unterschiedlicher Tiermodelle und unterschiedlicher Protokolle zur Konditionierung der Versuchstiere. Außerdem können die *in vitro* Ergebnisse der Arbeitsgruppen durch ⁵¹Cr-Freisetzungstests nicht ohne weiteres auf *in vivo* Tiermodelle übertragen werden. Durch den Einsatz des SCIDHu-Tiermodells könnten Effekte, die sowohl bei *in vivo*- und *in vitro*-Modellen einen negativen Einfluß besitzen (Immunsystem des Empfängers, Milieubedingungen), weitestgehend ausgeschlossen werden. Die xenogene Graft-versus-Host-Erkrankung (xGvHD) im SCIDHu-Tiermodell ermöglicht dabei, die Rolle einzelner molekularer Interaktionen (ICAM1, P-Selektin) in einem komplexen pathogenetischen System zu untersuchen.

1.8 Fragestellung dieser Arbeit

Das *scid*-Tiermodell ermöglicht die Analyse von Transplantationsabstoßungsreaktionen humaner Zellen gegen murines Gewebe durch die Ausbildung einer xenogenen Graft-versus-Host-Erkrankung (xGvHD). Bisher wurde beschrieben, daß humane CD4⁺ T-Zellen, anti-murine Antikörper und Lymphokine die xGvHD induzierten [64, 65]. Weiterhin entwickelten humane CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen eine Reaktivität gegen murines Gewebe [41, 66-68]. Die Charakterisierung der Zytokinprofile der xenoreaktiven CD4⁺ T-Zellen von Wren et al. zeigte dabei eine Prädominanz von T_H2-Zellen [39]. Befunde von Coppola et al. zeigten hingegen eine präferentielle Aktivierung von CD4⁺ T_H1-Zellen bei gleichzeitiger Herunterregulierung der T_H2-Zellen [69]. Die teils konträren Befunde erfordern eine weitere Aufklärung der Frage, welche humanen Zellen zwingend erforderlich sind, um eine xenogene Abstoßungsreaktion im SCIDHu-Tiermodell auszulösen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung xenoreaktiver humaner T-Zellen und deren Mechanismen bei der T-Zell-vermittelten Abstoßung gegen xenogenes Gewebe.

Darüberhinaus soll durch das Einbringen von KO-Mutationen einzelner muriner Adhäsionsmoleküle auf den genetischen Hintergrund der C.B-17-*scid*-Mäuse untersucht werden, ob der Verlust von Interaktionen zwischen humanen Liganden und murinen Rezeptoren in der frühen Induktionsphase einen direkten Einfluß auf die Ausbildung der xGvHD besitzt. Durch Kreuzungen erstellte homozygote Mäusestämme der einzelnen Verlustmutanten erlauben dabei eine direkte Kontrolle durch die Bewertung des Verlaufs der xGvHD in den heterozygoten Geschwistertieren. Die Herstellung von murinen Zellkulturen (Fibroblasten) ermöglicht durch ⁵¹Cr-Freisetzungstests eine *in vitro* Testung der diskordant murinen Gewebe der Ausfallmutanten sowie eine Untersuchung ihrer Wirkung und Interaktionen auf xenoreaktive humane T-Zellen. Zur Klärung dieser Problemstellungen werden durchflußzytometrische, immunhistologische, molekularbiologische und biochemische Methoden genutzt.

Die Aufgaben und Fragestellungen im einzelnen:

1. Durch das Modell der xenogenen Abstoßungsreaktion humaner T-Zellen im *scid*-Tiermodell soll geklärt werden, welche humane Lymphozytensubpopulation eine entscheidende Funktion bei der Induktion der xGvHD besitzt.

Hierbei stehen folgende Teilaspekte im Vordergrund:

- Die Etablierung des SCIDHu-Tiermodells
- Untersuchung einzelner humaner T-Zellsubpopulationen
- Analyse der Diversität der an der Abstoßung beteiligten humanen T-Zellen durch die Untersuchung des T-Zellrezeptor V β -Repertoires
- Die Rolle von Apoptose und Proliferation bei der Vermittlung der zellulären Immunreaktion

2. Durch welche Aktivierungs- und Differenzierungsmarker sind die xenoreaktiven humanen Lymphozyten in der späten Effektorphase gekennzeichnet?

Hierbei stehen folgende Teilaspekte im Vordergrund:

- Untersuchung der Expression von T_H1- und T_H2-spezifischen Zytokinen nach Ausbildung der Erkrankung
- Vergleich der Oberflächenexpression spezifischer Aktivierungsmarker von humanen Zellen vor und nach Ausbildung der xGvHD
- Führt die Interaktion von humanen CD95Liganden und des murinen CD95Rezeptors zur Apoptose?

3. Führt die Inokulation humaner T-Zellen zur Aktivierung der murinen Endothelien mit einer spezifischen Expression von Adhäsionsmolekülen (Integrine und Selektine) in der frühen Induktionsphase der xGvHD?

Hierbei stehen folgende Teilaspekte im Vordergrund:

- Der Einfluß von KO-Mutationen auf das xenoreaktive Potential von unstimulierten und *in vitro* stimulierten xenoreaktiven humanen CD2⁺ T-Zellen soll durch ⁵¹Cr-Freisetzungstests untersucht werden
- Nimmt der Prozeß der Adhäsion humaner T-Zellen an murine Endothelzellen, der über ICAM1 und P-Selektin vermittelt wird bzw. der Verlust dieser Moleküle, einen Einfluß auf den Verlauf der xGvHD?

Die vorliegende Dissertation wurde im Rahmen des B12-Projektes des Sonderforschungsbereiches 265 „Immunreaktionen und Pathomechanismen bei Organtransplantation“ der Medizinischen Hochschule Hannover durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstierzucht

Alle durchgeführten *in vivo* Tierversuche wurden von der Bezirksregierung mit der Tierschutzvorhaben-Nr. TS 94/705 und 99/152 genehmigt. Die zielgerichtete Veränderung eines endogenen Gens mittels homologer Rekombination (sequenzspezifischer Austausch) wird als "gene targeting" bezeichnet. Zuchtkerne der genutzten *ICAM1*-, *P-Selektin*-knock-out-Mutanten und der *Fas^{lpr}*-Mutante wurden uns von Dr. A. L. Beaudet (Howard Hughes Medical Institute / Houston) bzw. vom Fraunhofer Institut zur Verfügung gestellt und durch Kreuzungen auf den C.B-17-*scid*-Hintergrund überführt.

2.1.1.1 C57BL/6J, C.B-17-*scid*

Für die *in vivo* Untersuchungen wurden C.B-17-*scid*-Mäuse im Alter von 8-12 Wochen eingesetzt. Die C.B-17-*scid*-Versuchstiere stammen aus einem Zuchtkern, der von M. Bosma, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia (USA), zur Verfügung gestellt wurde. Die Versuchstiere wurden nach der hygienischen Sanierung in das Zentrale Tierlabor überführt und unter SPF-Bedingungen gehalten. Für unsere Versuche wurden nur C.B-17-*scid*-Mäuse genutzt, die einen IgG/IgM-Titer von weniger als <10 µg/ml aufwiesen. Als Kontrollen diente in einigen Versuchen der BALB/c-Wildtyp mit übereinstimmendem genetischen Hintergrund (MHC-Haplotyp: H2^d). Durch Kreuzungen wurden die genutzten Ausfallmutanten auf den genetischen BALB/c-Hintergrund (H2^d) des kongenen C.B-17-*scid*-Stamms überführt. Aus Gründen der Vereinfachung wurde die Bezeichnung der C57BL/6J, C.B-17-*scid*-Versuchstiere mit *SCID* bzw. *scid* abgekürzt. Es wurden nur homozygote *scid/scid*-Versuchstiere eingesetzt.

2.1.1.2 C57BL/6J-*scid-Icam1^{tm1Bay}*

Die mittels homologer Rekombination erstellten ICAM1-Mutanten (C57BL6/J-Hintergrund) wurden uns von Dr. A. L. Beaudet (Howard Hughes Medical Institute /Houston) zur Verfügung gestellt [52]. Es handelt sich hierbei um einen partiellen knock-out, so daß eine Bildung funktioneller ICAM1-Isoformen nicht ausgeschlossen werden konnte [57].

Zum Zeitpunkt der Etablierung dieser C57BL/6J-*scid-Icam1^{tm1Bay}*-KO-Zucht konnte nur diese ICAM1-Mutation genutzt werden. Durch Kreuzungen wurde diese ICAM1-KO-Mutation auf den genetischen BALB/c-Hintergrund der *scid*-Mäuse übertragen. Für die Inokulationsversuche wurden nur Versuchstiere im Alter von 8-12 Wochen genutzt, bei denen eine vollständige Genotypisierung mittels PCR (Abschnitt 2.2.2) und eine Bestimmung des IgG/IgM-Titers (ELISA) vorlag. Aus Gründen der Vereinfachung wurde die Bezeichnung C57BL/6J-*scid-Icam1^{tm1Bay}*-Mutante mit *SCID/ICAM1* oder alternativ mit *ICAM1* abgekürzt. Die Benennung des homo- und heterozygoten Genotyps der *SCID/ICAM1*-Versuchstiere wurde nur im Zusammenhang mit der *Icam1^{tm1Bay}*-Mutation verwendet. Inzwischen liegt eine weitere ICAM1-KO-Mutante (B6.129S4-*Icam1^{tm1Jcgr}*) vor, bei der keine funktionellen Isoformen exprimiert werden [53].

2.1.1.3 C57BL/6J-*scid-Selp^{tm1Bay}*

Die mittels homologer Rekombination erstellten P-Selektin-KO-Mutanten wurden uns von Dr. A. L. Beudet (Howard Hughes Medical Institute / Houston) zur Verfügung gestellt. Auch bei dieser Tierzucht wurde die P-Selektin-Mutation mittels Kreuzung auf den BALB/c-Hintergrund der *scid*-Versuchstiere übertragen. Zur Unterscheidung von Wildtyp und Mutante erfolgte eine Genotypisierung mittels Southern Hybridisierung (Abschnitt 2.2.3). Aus Gründen der Vereinfachung wurde die Bezeichnung C57BL/6J-*scid-Selp^{tm1Bay}*-Ausfallmutante mit *SCID/P-Selektin* abgekürzt. Die Benennung des homo- und heterozygoten Genotyps der *SCID/P-Selektin*-Versuchstiere wurde nur in Bezug zur *Selp^{tm1Bay}*-Mutation genutzt.

2.1.1.4 B6,MRL-*scid-Fas^{lpr}*

Die vom Fraunhofer Institut (Hannover) zur Verfügung gestellte CD95-Mutante (*MRL-Fas^{lpr}*) wurde durch Kreuzungen auf den genetischen BALB/c-Hintergrund der *scid*-Mäuse übertragen. Während der Entwicklungsphase dieser Zucht wurde neben der Bestimmung der murinen IgG/IgM-Titer auch der Anteil muriner CD3⁺ T-Zellen durchflußzytometrisch analysiert. Nach Etablierung der *scid*-Mutation in dieser Zucht wurde nur noch der IgG/IgM-Titer mittels ELISA bestimmt. Die Genotypisierung dieser Versuchstiere erfolgte mittels PCR-Reaktion (Abschnitt 2.2.2) mit einer eindeutigen Unterscheidung von Wildtyp und homozygoter *Fas^{lpr}*-Mutante. Aus Gründen der Vereinfachung wurde die Bezeichnung B6,MRL-*scid-Fas^{lpr}*-Mutante mit *SCID/Fas^{lpr}* oder mit *Fas^{lpr}* abgekürzt. Die Benennung des

homo- und heterozygoten Genotyps der *SCID/FAS^{lpr}*-Versuchstiere wurde nur im Zusammenhang mit der *Fas^{lpr}*-Mutation genutzt.

2.1.1.5 C57BL/6J-*scid-Icam1^{tm1Bay}-Selp^{tm1Bay}*

Die C57BL/6J-*scid-Icam1^{tm1Bay}-Selp^{tm1Bay}*-KO-Mutante wurde durch die Kreuzung der *SCID/P-Selektin*- und der *SCID/ICAM1*-KO-Mutanten erzeugt. Hierbei wurden im Vorfeld der Versuche alle eingesetzten Zuchttiere genotypisiert und nur Tiere genutzt, die einen IgG/IgM-Titer von weniger als <10 µg/ml im ELISA aufwiesen. Aus Gründen der Vereinfachung wurde die Bezeichnung C57BL/6J-*scid-Icam1^{tm1Bay}-Selp^{tm1Bay}*-KO-Mutante mit *SCID/ICAM1/P-Selektin* abgekürzt.

2.1.1.6 B6,MRL-*scid-Icam1^{tm1Bay}-Fas^{lpr}*

Diese Zuchtlinie wurde durch die Verpaarung der *SCID/ICAM1^{tm1Bay}* und der *SCID/Fas^{lpr}*-Mutante gewonnen. Die eingesetzten Zuchttiere wurden mittels PCR genotypisiert und im ELISA auf die Anwesenheit muriner Antikörper (sogenannte Leakyness) untersucht. Aus Gründen der Vereinfachung wurde die Bezeichnung B6,MRL-*scid-Icam1^{tm1Bay}-Fas^{lpr}*-Mutante mit *SCID/ICAM1/Fas^{lpr}* abgekürzt.

2.1.2 Bakterien

2.1.2.1 Bakterienstamm *E.coli* K12 (HB101)

Dieser HB101-Stamm ist ein Hybrid aus *E.coli* K12 und *E.coli* B und wird als Rezipient der Transformation genutzt. Dieser Stamm ist als sehr guter Empfänger bei der Anreicherung und Reinigung von Plasmiden bekannt. Der HB101-Stamm wurde zuerst von Bolivar et al. beschrieben [70].

2.1.3 Vektor

2.1.3.1 pBluescript II SK (+/-)

Der pBluescript II SK Phage hat eine Größe von 2961bp. Er trägt neben dem lacZ Gen (861-938bp) ein Ampicillinresistenzgen (1975-2832bp) und eine multiple Cloning site (MCS). Der Vektor mit integrierter P-Selektin DNA wurde von R. Bosse zur Verfügung gestellt (1995, Persönliche Mitteilung). Nach einem Verdau mit HindIII entsteht unter anderem ein 500bp

großes Fragment, welches zur Genotypisierung der *SCID/P-Selektin*-Ausfallmutante genutzt werden kann.

2.1.4 Medien

Um den kultivierten Zellen alle nötigen Wachstumsfaktoren zuzuführen, wurde den Medien Hitze-inaktiviertes (30 min / 56°C) fötales Kälberserum (Sigma, München) in einer Endkonzentration von 10% zugesetzt. Weiterhin wurden 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Seromed) und 4 mM Glutamin (Biochrom KG) zugegeben.

2.1.4.1 RPMI 1640

Das RPMI 1640 Medium (Biochrom KG) ist für zahlreiche Säugetierzellen geeignet und wurde für die Kultivierung humaner Zellkulturen genutzt. Dem Medium wurde FCS, Penicillin/Streptomycin und Glutamin zugegeben.

2.1.4.2 Dulbecco Medium

Das Dulbecco Medium (ICN) eignet sich besonders gut zur Züchtung von Lymphozyten- und Gewebszellkulturen (hier: murine Fibroblasten). Dulbecco Medium enthält als Puffersubstanz Natriumcarbonat. Dem Medium wurde FCS, Penicillin/Streptomycin und Glutamin zugesetzt.

2.1.4.3 Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)

DMEM (GibcoBRL) wurde zur Kultivierung von murinen embryonalen Fibroblasten eingesetzt. Dem Medium wurde FCS, Penicillin/Streptomycin und Glutamin zugesetzt. 1.750 µl einer β-Mercaptoethanol Lösung wurde DMEM für die murine Fibroblastenzucht zugesetzt.

2.1.4.4 TC199

TC199 ist ein mit Hepes gepuffertes Medium, dessen pH-Wert im offenen System bei normaler Luftzufuhr konstant bleibt. Es eignet sich daher besonders gut zur Aufbereitung und Aufbewahrung von Gewebs- und Zellmaterial.

2.1.5 Antikörper

Die in dieser Arbeit eingesetzten Antikörper sind in den folgenden Tabellen sowohl für die Immunhistologie (IH) als auch für die Durchflußzytometrie (FACS) zusammengefaßt.

2.1.5.1 Primäre Antikörper

Die Spezifität, die Herkunft (Spezies), der Isotyp (bei mAb) und die Quelle (Firma bzw. Herkunftslabor) der genutzten Antikörper sind in der nachfolgenden Tabelle 2.1 dargestellt. Zusätzlich gezeigt sind die Reaktivitäten der Antikörper gegen Mensch oder Maus. Die im Rahmen dieser Arbeit genutzten Antikörper sind folgendermaßen aufgeführt:

Nr. / Antikörperbezeichnung entspricht weitestgehend der Spezifität / Herkunft (Spezies) / Isotyp (bei mAb) / Verwendungszweck in dieser Arbeit und Quelle (Firma bzw. Herkunftslabor)

Tabelle 2.1: Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit genutzten primären Antikörper

Nr.	Antikörper	Herkunft (Spezies)	Klon	Ig Subklasse Isotyp	Methode	Bezugs- quelle
anti-Human						
1	CD 3	Maus	Cris-7	IgG2a	FACS	Dianova
2	CD 3	Maus	UCHT-1	IgG1	IH	Immunotech
3	CD 3	Maus	SK7	IgG1	FACS	BD
4	CD 4	Maus	13B8.2	IgG1 κ	IH	Immunotech
5	CD 4	Maus	DD42	IgG1	FACS	Dianova
6	CD 8	Maus	SK1	IgG1	FACS	BD
7	CD 8	Maus	B9:11	IgG1	IH	Immunotech
8	CD 8	Maus	ASH	IgM	FACS	Dianova
9	CD 14	Maus	TÜK4	IgG2a	IH	DAKO
10	CD 14	Maus	UCHM-1	IgG2a	FACS	Dianova
11	CD 19	Maus	SJ25-C1	IgG1	FACS	Dianova
12	CD 20	Maus	L26	IgG2a	IH	DAKO
13	CD25	Maus	Tu69	IgG1	FACS	Dianova
14	CD25	Maus	ACT-1	IgG1	IH	DAKO
15	CD25	Maus	2A3	IgG1	FACS	BD
16	CD 45LCA	Maus	RVS-1	IgG1	FACS	Dianova
17	CD 45LCA	Maus	2B11/PD7/26	IgG1	IH	DAKO
18	CD 45LCA	Maus	F10-89-4	IgG2a	FACS	Dianova
19	CD 45RA	Maus	F8-11-13	IgG1	FACS	Dianova
20	CD 45RA	Maus	MEM56	IgG2b	Zellkultur	

Material und Methoden

21	CD 45RA	Maus	4KB5	IgG1	IH	DAKO
22	CD 45RA	Maus	L48	IgG1	FACS	BD
23	CD 45R0	Maus	OPD4	IgG1	IH	DAKO
24	CD 45R0	Maus	UCHL1	IgG2a	IH	Camon
25	CD 56	Maus	MEM188	IgG2a	FACS	Dianova
26	CD 62L	Maus	Mel-14	IgG2a, κ	MACS	Miltenyi
27	CD 62L	Maus	FMC46	IgG2b	FACS	Dianova
28	CD 62E	Maus	1.2B6	IgG1	FACS	Dianova
29	CD 95L	Maus	NOK-1	IgG1	FACS	Pharmingen
30	CD 95L	Maus	DX2	IgG1	IH	DAKO
31	CD 69	Maus	FN50	IgG1	IH	DAKO
32	HLA DR	Maus	L243	IgG2a	FACS	BD
33	HLA KI.I	Maus	W6/32-HL	IgG2a	FACS	Dianova
34	HLA KI.II	Maus	DDII	IgG1	FACS	Dianova
35	HLA KI.II	Maus	BRA-FB6	IgG2b	FACS	Dianova
36	HLA KI.II	Maus	IQU9	IgG2a	FACS	Dianova
37	Ki-67	Maus	Ki-67	IgG1	IH	DAKO
38	IL-1α	Maus	28-9	IgG1, κ	FACS	Pharmingen
39	TNF-α	Maus	MAb11	IgG1	FACS	Pharmingen

Nr.	Antikörper	Herkunft (Spezies)	Klon	Ig Subklasse Isotyp	Methode	Bezugs- quelle
anti-Maus						
40	anti ASGM1	Kaninchen	Antiserum	polyklonal	<i>in vivo</i> Depletion	WAKO
41	CD 3	Ratte	KT3	IgG2a	FACS	Serotec
42	CD 4	Ratte	RM4-5	IgG2a, κ	FACS	Pharmingen
43	CD 8	Ratte	53-6.7	IgG2a, κ	FACS	Pharmingen
44	CD 45LCA	Ratte	30-F11	IgG2b, κ	FACS	Pharmingen
45	CD 45LCA	Ratte	YW 62.3	IgG2b	FACS	Serotec
46	CD 54	Ratte	KAT-1	IgG2a	FACS	Serotec
47	CD 54	Hamster	3E2	IgG	IH	Pharmingen
48	CD 62P	Ratte	RB40.34	IgG1, λ	FACS	Pharmingen
49	Ki-67	Kaninchen	Antiserum	polyklonal	FACS	Pharmingen
50	CD 95	Hamster	Jo2	polyklonal	FACS	Dianova
51	CD 95L	Ratte	A11	IgM	FACS	Alexis

52	Makrophagen	Ratte	F4/80	IgG2b	FACS	Serotec
53	Ly-6G	Ratte	RB6-8C5	IgG2b, κ	FACS	Pharmingen

Je nach Verwendungszweck wurden für die Immunhistologie (IH) unkonjugierte und für die Durchflußzytometrie (FACS) mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE) direkt-markierte Primärantikörper eingesetzt. Die eingesetzten Verdünnungen richteten sich nach den Empfehlungen der Hersteller.

2.1.5.2 Sekundäre Antikörper

Für die immunhistologischen Färbungen wurden vorwiegend mit Peroxidase oder alkalischer Phosphatase konjugierte Sekundär-Antikörper eingesetzt, wie in der nachfolgenden Tabelle 2.2 dargestellt.

Tabelle 2.2: Auflistung der mit Peroxidase oder alkalischer Phosphatase direkt-markierten sekundären Nachweisantikörper

Nr.	Antikörper	Herkunft (Spezies)	Markierung	Ig-Subklasse Isotyp	Bezugsquelle Firma
54	Ratten IgG (H⁺L)	Ziege	HRPeroxidase	-	Camon
55	Ratten IgM, μ	Ziege	Peroxidase	-	Dianova
56	Ratten IgG	Ziege	Peroxidase	-	Dianova
57	Kaninchen IgG	Maus	Alkalische Phosphatase	-	Dianova
58	Maus IgG, Fcγ	Ziege	Peroxidase	-	Dianova
59	Maus IgG, Fcγ	Ziege	Alkalische Phosphatase	-	Dianova
60	Maus IgG	Ziege	Peroxidase	-	Dianova
61	Maus IgG (H⁺L)	Ziege	Isotypkontrolle	polyklonal	Coulter
62	Maus IgG⁺IgM	Ziege	DTAF/F(ab') ₂	-	Dianova

Die eingesetzten Verdünnungen der Sekundär-Antikörper richteten sich nach den Empfehlungen der Hersteller.

2.1.5.3 Antikörper für ELISA- und *in vitro* Panning-Methoden

Weiterhin wurden zum Nachweis muriner Antikörper (Leakyness) bzw. zur Bestimmung des murinen IgG/IgM-Titers (Abschnitt 2.2.4) der murinen Zuchten nachfolgende Antikörper (Nr. 63-65) eingesetzt.

Tabelle 2.3: Auflistung der zur Bestimmung des murinen IgG/IgM-Titers mittels ELISA-Messungen eingesetzten Antikörper

Nr.	Antikörper	Herkunft (Spezies)	Klon / Markierung	Ig-Subklasse Isotyp	Bezugsquelle Firma
63	Maus IgG/IgM	Ziege	Beschichtung	polyklonal	Immunotech
64	Maus IgG/IgM	Ziege	Peroxidase	polyklonal	Immunotech
65	Maus IgG(H ⁺ L)	Ziege	Panning	-	Immunotech

Der Antikörper Nr. 63 wurde in einer Verdünnung von 1:800 eingesetzt, der enzymgekoppelte Antikörper Nr. 64 in einer Verdünnung von 1:8000.

Die Antikörper Nr. 66-68 wurden im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Panning-Studien genutzt, wie in Abschnitt 2.2.9.1 beschrieben.

Tabelle 2.4: Antikörper für *in vitro* Depletionsstudien (Panning)

Nr.	Antikörper	Herkunft (Spezies)	Klon / Markierung	Ig-Subklasse Isotyp	Bezugsquelle Firma
66	Human IgG (Pan)	Maus	84A	IgG1 κ	Immunotech
67	Human IgG	Human	Standard	IgG	Dianova
68	Human IgG	Ziege	Peroxidase	-	Dianova

Der GαM-Antikörper Nr. 68 wurde in PBS (10 µg/ml) verdünnt und für das *in vitro* Panning eingesetzt.

2.1.6 Humane Lymphozyten

2.1.6.1 Periphere Blut-Lymphozyten (PBL)

Humane periphere Lymphozyten des Bluts wurden aus Buffy-Coats, die von der Blutbank der MHH zur Verfügung gestellt wurden, mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen, wie in Abschnitt 2.2.7.1 beschrieben. Die humanen Lymphozyten wurden als Bande oberhalb der Ficollschicht sichtbar (Interphase), vorsichtig pipettiert und in TC199 zweimal gewaschen (200 xg / 10 min). Nach Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität standen die Zellen für die Inokulationsexperimente zur Verfügung.

2.1.6.2 Humane Lymphozyten aus Operationsresektaten

Weiterhin standen Operationsresektate der humanen Milz zur Verfügung. Das Gewebe wurde in TC199 gegeben und in kleine Stücke zerschnitten, um im Anschluß daran die Kapsel von

den Milzstücken zu entfernen. Die Gewebestücke wurden nun durch ein Metallsieb gedrückt, gewaschen und die Zellsuspension schließlich über Watte gefiltert, um so große Zellaggregate zu entfernen. Die Milzzellen wurden zweimal in TC199 gewaschen und danach über einen Ficollgradienten aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.2.7.1). Die Interphase (Lymphozytenring über dem Ficoll) wurde vorsichtig pipettiert und zweimal mit TC199 gewaschen. Nach der Zellzahlbestimmung wurden die Zellen in TC199 / 5% FCS aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur in Zellkulturflaschen gelagert.

2.1.7 Zelllinien

2.1.7.1 Jurkat-Zellen

Die humanen leukämischen Jurkat-Zellen (T-Zelllinie) wurden aus den peripheren Blut Lymphozyten eines Patienten isoliert. Die Kultivierung der Jurkat-Zellen erfolgte in RPMI1640 / 10% FCS / 4 mM L-Glutamin / 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂-Begasung.

2.1.7.2 293 Zellen

Die eingesetzten Transfektanten der humanen, embryonalen 293-Nierenzelllinie wurden mit dem Adenovirus Typ 5 (Ad 5) transformiert. Die fibroblastenartigen Zellen wuchsen als Zellrasen und wurden in RPMI 1640 mit 10% FCS / 4 mM L-Glutamin / 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin kultiviert. Für die Inokulations- und Proliferations-Versuche wurden die Zellen mit PBS mit 0,02% EDTA vom Boden der Kulturflaschen abgelöst und vereinzelt. Die genutzten Transfektanten 2B12 und pcDNA der 293-Zelllinie wurden von Dr. H. Dulat zur Verfügung gestellt [71].

2.1.7.3 Fibroblasten-Zelllinien

Für die *in vitro* Zytotoxizitäts-Versuche wurden von den Mausstämmen Fibroblastenzellkulturen hergestellt. Hierbei wurden nur homozygote *SCID/ICAM1*-, *SCID/Fas^{lpr}*-, *SCID/P-Selektin*-, *SCID/ICAM1/P-Selektin*- und *SCID/ICAM1/Fas^{lpr}*-Mutanten genutzt. Nach der Genotypisierung wurden homozygote Verpaarungen angesetzt. Nach 15-20 Tagen wurden die hochträchtigen Weibchen mittels Diethylether narkotisiert und mittels Genickbruch getötet. Die murinen Föten wurden entnommen und verarbeitet. Als Kulturmedium wurde DMEM, dem 10% FCS, 4 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 50

µg/ml Streptomycin zugegen wurde, eingesetzt. Die Kultivierung der Fibroblasten erfolgte bei 37°C und bei 10% CO₂-Begasung.

2.1.8 Radioaktive Isotope

2.1.8.1 [⁵¹CrO₄] Chrom (Zytotoxizitätstest)

Na₂ [⁵¹CrO₄] (100µCi / 5 x 10⁶ Zielzellen) Amersham Buchler, NEN

2.1.8.2 [5-³H] Thymidin (Proliferations-Test)

[Methyl-³H]-Thymidin (2,0Ci / mmol) DuPont, NEN

2.1.8.3 [α³²P] dATP (Southern-Hybridisierung)

[α³²P]-dATP (3000Ci / mmol; 10mCi / ml) Amersham Buchler, NEN

2.1.9 Primer

Die ICAM1-Gen spezifischen Oligo-Primer ICAM017, ICAM018 und ICAM019 wurden von der Firma Pharmacia Biotech hergestellt. Die spezifischen *Fas*^{lpr} PCR-Primer F1, R1 und R2 wurden von der Carl Roth GmbH & Co. hergestellt.

Tabelle 2.5: Auflistung der genutzten Maus-spezifischen PCR-Primer mit den dazugehörigen Oligonukleotid-Sequenzen

Bezeichnung der Primer	Sequenz (Orientierung 5' - 3')	Anzahl der
ICAM 017 ¹	CTG - AGC - CAG - CTG - GAG - GTC - TCG	21
ICAM 018 ¹	GAG - CGG - CAG - AGC - AAA - AGA - AGC	21
ICAM 019 ¹	AGG - ACA - GCA - AGG - GGG - AGG - ATT	21
<i>Fas</i> ^{lpr} F1 ²	GTA - AAT - AAT - TGT - GCT - TCG - TCA - G	22
<i>Fas</i> ^{lpr} R1 ²	TAG - AAA - GGT - GCA - CGG - GTG - TG	20
<i>Fas</i> ^{lpr} R2 ²	CAA - ATC - TAG - GCA - TTA - ACA - GTG	21

¹ Dr. A. L. Beaudet et al. (Howard Hughes Medical Institute /Houston)[52] ² Persönliche Mitteilung: Fraunhofer Institut, Hannover

Tabelle 2.6: Auflistung der eingesetzten human-spezifischen PCR-Primer mit den dazugehörigen Oligonukleotid-Sequenzen

Bezeichnung der Primer	Sequenz (Orientierung 5' - 3')	Anzahl der Basen
GAPDH (Fw)	ACC-ACA-GTC-CAT-GCC-ATC-AC	20
GAPDH (Rv) ¹	ATG-TCG-TTG-TCC-CAC-CAC-CT	20
CD95L (Fw)	CAG-CTC-TTC-CAC-CTA-CAG-AAG-G	22
CD95L (Rv) ²	AGA-TTC-CTC-AAA-ATT-GAC-CAG-AGA-GAG	27
CD95 (Fw)	TTT-TCT-TCC-AAA-TGC-AGA-AGA	21
CD95 (Rv) ³	TTC-CTT-TCT-CTT-CAC-CCA-AAC	21
TNF- α (Fw)	CTC-AGC-CTC-TTC-TCC-TTC-C	19
TNF- α (Rv) ⁴	GCA-GAG-AGG-AGG-TTG-ACC-T	19
Interferon- γ (Fw)	ATG-AAA-TAT-ACA-AGT-TAT-ATC-TTG-GCT-TT	29
Interferon- γ (Rv) ⁵	GAT-GCT-CTT-CGA-CCT-CGA-AAC-AGC-AT	26
IL-2-Rezeptor (Fw)	GAA-TTT-ATC-ATT-TCG-TGG-TGG-GGC-A	25
IL-2-Rezeptor (Rv) ⁶	TCT-TCT-ACT-CTT-CTT-CTG-TCT-CCG	24
Interleukin-2 (Fw)	ATG-TAC-AGG-ATG-CAA-CTC-CTG-TCT-TG	26
Interleukin-2 (Rv) ⁷	TCA-AGT-CAG-TGT-TGA-GAT-GAT-GCT-TTG	27
Interleukin-4 (Fw)	ATG-GGT-CTC-ACC-TCC-CAA-CTG-CT	23
Interleukin-4 (Rv) ⁸	CGA-ACA-CTT-TGA-ATA-TTT-CTC-TCT-CAT	27
Interleukin-10 (Fw)	AAG-GCA-TGC-ACA-GCT-CAG-CAC-T	22
Interleukin-10 (Rv) ⁹	TCC-TAG-AGT-CTA-TAG-AGT-CGC-CA	23
CD69 (Fw)	GGG-TCT-GAC-AAG-TGT-GTT-TT	20
CD69 (Rv) ¹⁰	TGC-CAC-ATC-ACA-TAT-TGC-AC	20
TGF- β (FW)	AAG-TGG-ATC-CAC-GAG-CCC-AA	20
TGF- β (RV) ¹¹	GCT-GCA-CTT-GCA-GGA-GCG-CAC	21
Interleukin-1 α (FW)	CAA-GGA-GAG-CAT-GGT-GGT-AGT-AGC-AAC-CAA-CG	32
Interleukin-1 α (RV) ¹²	TAG-TGC-CGT-GAG-TTT-CCC-AGA-AGA-AGA-GGA-GG	32
Aldolase A (FW)	TTC-CAT-CAG-ACA-CTC-TAC-CAG-AAG-G	25
Aldolase A (RV) ¹³	ACC-ATG-TTG-GGC-TTC-AGC-AAG-G	22

Literaturangabe: ^{1/4}Farges et al. [72] ²Takahashi et al. [73] ^{3/13}Persönliche Mitteilung: Dr. H. Dulat, Dr. U. Kyas, MHH Hannover, Transplantationslabor ^{5/7/8/12}Orscheshek et al. [74] ⁶Alzona et al. [75] ^{9/11}Luscher et al. [76] ¹⁰Boles et al. [77]

Als Positivkontrolle der RT-Reaktion diente das konstitutiv exprimierte humane GAPDH-Gen. Die Primer amplifizierten einen 452 bp langen Abschnitt der humanen GAPDH-cDNA.

In der PCR konnten für dieses Primerpaar Annealingtemperaturen von 55 bis 65°C frei gewählt werden.

2.1.10 Lösungen / Puffer

Die angegebenen Lösungen und Puffer wurden alle, wenn nicht anders angegeben, mit H₂O (bidest) angesetzt.

Agarosegelelektrophorese

Auftragspuffer:	0,25 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylencyanol
	15 %	Ficoll (Typ 400)
TAE-Puffer: (50×Stammlösung / 1l)	242 g	Tris
	57,1 ml	Eisessig
	100 ml	0.5M EDTA pH8.0
TBE-Puffer: (10× Stammlösung / 1l)	108 g	Tris
	55 g	Natriumborat
	40 ml	0.5 M EDTA pH8.0

Blotting-Verfahren

Denaturierungslösung:	0.5 M	NaOH
	1,5 M	NaCl
Depurinisierungslösung:	0,25 M	HCl
Hybridisierungspuffer:	50 %	Formamid, deionisiert
	2 ×	SSC (pH 7.0)
	1 %	Sarcosyl
	4 mM	EDTA (pH 8.0)
	0.12 M	Kaliumphosphatpuffer (pH 6.8)
	4 ×	Denhardts-Lösung
Neutralisationslösung:	3 M	Natriumazetat pH 5.5
50x Denhardts-Lösung : (500 ml/Lagerung bei -20°C)	5 g	Ficoll Paque [®] Plus
	5 g	Polyvinylpyrolidon
	5 g	BSA (Fraktion V)
20 × SSC (1l.): (pH 7.0)	175,3 g	NaCl
	88,2 g	Na-Citrat

Durchflußzytometrie

FACS-Erythrozytenlyse-	8,34 g	NH ₄ CL
Reagenz: (pH7,6)/(1l.)	1,09 g	KHCO ₃
	1 %	EDTA
Trypanblau/PBS-Lösung:	0,16 %	Trypanblau
Waschpuffer:	2 % (v/v)	Fötale Kälber Serum
	0,02 % (v/v)	Natriumazid
	1000 ml	PBS

Enzym-gekoppelte Immunadsorptionsbestimmung (ELISA)

Natriumazetat-Puffer:	1,605 g	Natriumazetat
(pH 5,5/1l.)		
Citrat-Phosphat-Puffer:	7,3 g	Citrat
(pH 5,0/1l.)	23,87 g	NaH ₂ PO ₄
Citrat-Phosphat-Puffer	2 Tabletten	1,2-Phenine Diamine
/OPD:	10 ml	Citrat-Phosphat-Puffer

Die BSA-Lösung wurde zum Absättigen unspezifischer Proteinbindungen auch in der Immunhistologie genutzt.

Rinderserumalbuminlösung:	100 mg	BSA
(BSA)	10 ml	PBS

Immunhistologie

Tris-Puffer TBS (1l.):	6,1 g	Tris-HCl
(pH 7,6)	9 g	NaCl

Isolation genomischer DNA

SDS/Isolationspuffer:	50 mM	Tris/HCl
(pH 8,0)	100 mM	EDTA
	100 mM	NaCl
	1 %	SDS
jeweils frische Zugabe von:	0,5 mg/ml	Proteinase K

Mini / Midi-Präparation

Lösung I:	50 mM	Glucose
(Lagerung bei 4°C)	25 mM	Tris-HCl/pH 7,6
	10 mM	EDTA

Lösung II:	1 %	SDS
(frisch ansetzen)	0,2 N	NaOH
Lösung III:	3 M	Kaliumacetat
(pH 4,8)	1,8 M	Ameisensäure
Lösung IV:	7,5 M	Ammonium-Acetat (Lagerung bei -20°C)

Substrate

Fast Blue:	2 mg	Naphtol AS-MX-phosphat
Sigma F3378	0,2 ml	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
	9,8 ml	0,1M Trispuffer (pH8,2)
	0,01 ml	1M Levamisole
	5 mg	Fast Blue TR
Fast Red:	2 mg	Naphtol AS-MX-phosphat
Sigma F4648	in 0,2 ml	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
	9,8 ml	0,1M Trispuffer (pH8,2)
	0,01 ml	1M Levamisole
	10 mg	Fast Red TR
3-Amino-9-Ethylcarbazol:	4 mg	AEC
	1 ml	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
	14 ml	0,1M Azetatpuffer (pH5,2)
	0,15 ml	3% H ₂ O ₂
3,3 Diaminobenzidin-	6 mg	DAB
tetrahydrochlorid:	10 ml	0,05M Trispuffer (pH7,6)
	0,1 ml	3% H ₂ O ₂

Southern Hybridisierung

Hybridisierungspuffer:	5 ×	SSC (pH 7.0)
	5 ×	Denhardts-Lösung
	50 mM	Natriumphosphatpuffer (pH 6.5)
	0.1 %	SDS
	50 %	Formamid, deionisiert
	25 µg/ml	fragmentierte, denaturierte Lachssperma-DNA
TE-Puffer:	10 mM	Tris-HCl (pH 8.0)
(pH 8.0)	1 mM	EDTA (pH 8.0)

Transformation

LB-Medium (1l):	10 g	Bacto Trypton
(Luria-Bertoni)	5 g	Hefeextrakt
(pH 7,0)	10 g	NaCl
	500 µl	50 mg/ml Ampicillin-Stammlösung
Ampicillin-Platten:	500 ml	LB-Medium
(Ansatz für 10 Platten)	7,5 g/l	Bacto-Agar (1,5%)
	50 mg/ml	Ampicillin-Stammlösung

Zellkultur

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) ist eine isotone Salzlösung ohne Nährstoffzusätze und wird als Waschmedium eingesetzt.

PBS:	8 g	NaCl
(pH 7.4/11.)	0,2 g	KCl
	1,44 g	Na ₂ HPO ₄
	0,24 g	KH ₂ PO ₄
Trypsin/PBS-Lösung:	450 ml	PBS (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)
(1:250)	50 ml	2,5% Trypsin-Lösung
EDTA/PBS-Lösung:	500 ml	PBS (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)
(10 mM)	1 ml	0,5M EDTA-Lösung
β-Mercaptoethanol-Lösung:	10 µl	β-Mercaptoethanol
	500 ml	DMEM/PS/Glutamin/10% FCS

Zellstimulation

Concanavallin (Con A):	1 mg	Concanavallin je 1 ml PBS
Phytohämagglutinin (PHA):	1 mg PHA	je 1 ml PBS

Zellmarkierung

Fluorescein Isothiocyanat:	1 mg	FITC je 1 ml PBS
-----------------------------------	------	------------------

2.1.11 Enzyme, Seren, Kits und Chemikalien

Agarose NA	Pharmacia/Sigma
Agarose, low melting	USB
Ampicillin	Boehringer Mannheim

Bacta Agar	Difco
Bacto Tryptone	Difco
β -Mercaptoethanol (β -ME)	Merck
Betaplate Scint	Wallac
Bromphenolblau	Fluka
Diethylether	Merck

DNA-Längenstandard

λ /HindIII	Stratagene
ϕ X174/HaeIII	Stratagene
DNase	Boehringer Mannheim
Dextransulfat	Pharmacia
EDTA	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Fast Blue TR	Sigma
Fast Red TR	Sigma
Ficoll Paque [®] PLUS (Dichte 1,007)	Pharmacia Biotech
Fluorescein Isothiocyanat (FITC)	Sigma
Formamid	Riedel de Haen
GeneClean Kit	Dianova
Hefe-Extrakt	Difco
Levamisole	Sigma
Lysozym	Boehringer Mannheim
Kanamycin	Sigma
Naphtol AS-MX-phosphat	Sigma
Nick-Translationskit	Boehringer Mannheim
Normales Maus Serum	Dianova
Normales Ziegen Serum	Dianova
Nucleobond DNA-Isolierungskit	Macherey-Nagel
Penicillin/Streptomycin	Seromed
Phytohämagglutinin (PHA)	Sigma
Polyethylenglykol (PEG) 6000	Serva
Proteinase K	Merck

Restriktionsendonukleasen

EcoRV	Stratagene / AGS
-------	------------------

HindIII	Stratagene / AGS
RNase A	Boehringer Mannheim
RNeasy Kit	Qiagen
Rinderserumalbumin (BSA, Fraktion V)	Serva
Sephadex G50	Pharmacia
TA-Cloning Kit	Invitrogen
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Stratagene, Qiagen, Sigma
Test-Neuraminidase	Behring
Triton X100	Merck
Trypsin-Lösung (2,5%)	Seromed
Xylencyanol	Fluka

2.1.12 Verbrauchsmaterial

Filterpapier GB003 580×600 mm	Schleicher & Schuell
Glaswatte, silanisiert	Serva
Mikrotiterplatten F96	Nunc
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schuell
0.2 ml PCR-Reaktionsgefäße	Biozym
1.5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
Röntgenfilme 18×24 cm	Amersham
Zentrifugenröhrchen 2095 (15 ml) / 2070 (50 ml)	Falcon

2.1.13 Geräte

Elektrophoresekammern	
11×14 cm (24 cm Elektrodenabstand)	BRL
20×24 cm (35 cm Elektrodenabstand)	BRL
Filmentwicklung	Optimax Röntgenfilm Entwickler
KB-Kamera AE-1 Programm	Canon
Handmonitor	Berthold
Hybridisierungsinkubator Typ 7601	GFL
Mikrowelle	Sharp
PCR-Gerät 9600	Perkin-Elmer
pH-Meter	Knick
Röntgenkassetten 18×24 cm	Fa. Bode

Röntgenkassetten 30×40 cm	Fa. Bode
Schüttelwasserbad Typ 1083	GFL
Sofortbildkamera MP4	Polaroid
Spannungsversorgung EPS 500/400	Pharmacia
Spannungsversorgung EPS 3000/150	Pharmacia
Spektralphotometer Ultospec II	Pharmacia
Tisch-Universalschüttler	Braun
UV-Transilluminator (302 nm)	Bachofer
Verstärkerfolien 18×24 cm	DuPont
Verstärkerfolien 30×40 cm	DuPont
<u>Zentrifugen</u>	
Biofuge 15	Heraeus
Kryofuge 6-4S	Heraeus
Kühlzentrifuge RC5C	Sorvall
Minifuge GL	Heraeus
Ultrazentrifuge L7-55	Beckman
Varifuge 3,2RS	Heraeus
Imaging Plate BAS-MP/2040S	Fuji-Photo-Film
Phospho-Imager BAS 1000	Fuji-Film
Eraser	Raytest
Eagle Eye II Photo System	Stratagene
1450 MicroBeta Liquid Scintillation & Luminescence Counter	EG&G Wallac
FACScan und FACStar (Durchflußzytometer)	Becton Dickinson
Magnetischer Zellseparator	
Vario MACS	Miltenyi Biotec
1205 Betaplate, Szintillationsmeßgerät: ³ H-Thymidin	LKB Wallac
1450 Betaplate Trilux Szintillationsmeßgerät: ⁵¹ Chrom	EGG & Wallac
Lamin-Air, Sterilwerkbank	Heraeus

2.1.14 Computerprogramme

Die durchflußzytometrisch ermittelten Daten wurden mit dem Programm PCLysis von Becton Dickinson (Version 1.0 für Windows 3.1) und WinMDI (Version 2.8) ausgewertet.

Die graphische Verarbeitung der Daten erfolgte mit den Programmen MS Excel und MS PowerPoint 2000 sowie SPSS für Windows95. Die Textverarbeitung erfolgte mit dem Programm Microsoft Word 2000 und Adobe Acrobat Version 4.0.

Die Berechnung von Mittelwerten mit Standardabweichungen erfolgte mit den Programmen MS Excel 2000 und SPSS.

Zur Durchführung der Signifikanztests und zur Ermittlung der Korrelationskoeffizienten wurde das Programm SPSS für Windows95, Version 9.0 (SPSS Inc., Chicago), genutzt. Als Grundlage der statistischen Auswertung der Überlebensdaten der verschiedenen Versuchstiergruppen fungierte hierbei der Wilcoxon-Test für die Untersuchung von Paardifferenzen.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation genomischer DNA

Die Versuchstiere (Alter: 6-8 Wochen) wurden mittels Diethylether betäubt, um sie einerseits zu kennzeichnen (Ohrmarkierung), und andererseits, um Gewebematerial für die Genotypisierung der Versuchstiere zu entnehmen. Zusätzlich wurden ca. 20 µl Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus mittels Kapillare entnommen und für die ELISA-Analyse eingesetzt. Das Gewebematerial wurde in 750 µl SDS/Isolationspuffer aufgenommen und über Nacht bei 56°C inkubiert (Abschnitt 2.1.10). Im Anschluß wurden die Proben mittels Eppendorf-Mixer für 5 min geschüttelt. Nach der Zugabe von 250 µl konzentrierter NaCl-Lösung (6M) wurden die Proben wiederum für 5 min geschüttelt. Nach einer 5minütigen Zentrifugation bei 15.000 xg wurden 750 µl der Interphase in ein mit 500 µl Isopropanol gefülltes Eppendorfgefäß überführt und für 2 min geschüttelt. Durch die Zugabe des Isopropanols fiel die genomische DNA aus und wurde als weiße fädige Struktur sichtbar. Die DNA-Proben wurden nun kurz zentrifugiert (2 min /15.000 xg), das entstandene DNA-Pellet vorsichtig vom Überstand befreit und mit 1,5 ml eiskaltem 70% Ethanol gewaschen (Zentrifugation: 2 min 15.000 xg). Der Überstand wurde wiederum vollständig entfernt. Das getrocknete DNA-Pellet wurde im Anschluß daran in ca. 200-250 µl autoklaviertem H₂O bei 37°C für 2 Stunden gelöst und stand anschließend für die Genotypisierung zur Verfügung.

2.2.2 Genotypisierung der *SCID/ICAM1*- und *SCID/Fas^{lpr}*- Mutanten mittels Polymerase-Ketten-Reaktion

Um das Ereignis der homologen Rekombination nachzuweisen, mußten die eingesetzten PCR-Primer zur Amplifikation von unterschiedlich großen Fragmenten der Sequenzen von Wildtypallel und inaktiviertem Mutantenallel führen.

2.2.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die PCR-Analyse der genomischen DNA der *SCID/ICAM1*-KO-Mutanten erfolgte mit den Primerpaaren ICAM017-019 (Abschnitt 2.1.9) unter optimierten Reaktionsbedingungen. Das Reaktionsvolumen betrug 25 µl. Das PCR-Protokoll wurde erstmals 1994 von E.T. Sandberg (Persönliche Mitteilung) beschrieben. Das von uns genutzte Protokoll wurde leicht modifiziert. Die PCR-Analyse der genomischen DNA der *SCID/Fas^{lpr}*-Mutanten erfolgte mit den *Fas^{lpr}*-Primerpaaren F1/R1 und F1/R2 unter den von Singer et al. beschriebenen Reaktionsbedingungen [47]. Das angegebene PCR-Protokoll wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls modifiziert, in dem alle drei Primer in einem Ansatz genutzt wurden. Das Reaktionsvolumen betrug 25 µl.

Reaktionsansatz:	5 µl	genomische DNA
(auf Eis)	14,1 µl	steriles ddH ₂ O
	2,5 µl	10 x PCR-Puffer (Qiagen)
	2,5 µl	Primer-Mix ICAM (1 µg je Primer)
	0,5 µl	Mischung der dNTP's (200 µM)
	0,4 µl	Qiagen Taq-Polymerase (2 Units)

Die Amplifikation der murinen ICAM1 spezifischen DNA erfolgte nach einer 5minütigen Denaturierung der DNA bei 94°C während 30 PCR-Zyklen, bestehend aus einer Denaturierung für 30 Sekunden bei 94°C, der Annealingreaktion für 40 Sekunden bei einer Temperatur von 60°C sowie einer Extension bei 72°C für 45 Sekunden. Abschließend wurden die Produkte nochmals für 5 Minuten bei 72°C verlängert und die Reaktion durch eine Abkühlung auf 4°C gestoppt. Die Amplifikation der murinen Fas (CD95) spezifischen DNA erfolgte nach einer 3minütigen Denaturierung der DNA bei 94°C während 40 PCR-Zyklen, bestehend aus einer Denaturierung für 15 Sekunden bei 94°C, dem Annealing für 1 min bei einer Temperatur von 55°C sowie einer Extension bei 72°C für 2 Minuten. Abschließend wurden die Produkte nochmals für 7 Minuten bei 72°C verlängert und die Reaktion dann auf 4°C herabgekühlt.

2.2.2.2 Gelelektrophoretische Auftrennung

Für die Auftrennung der *ICAMI*-PCR- (*ICAMI*⁺ Wildtyp: 178bp / *ICAMI*^{-/-}: 150bp) und der *Fas*^{lpr}-PCR-Produkte (*Fas*⁺ Wildtyp: 184bp / *Fas*^{lpr}: 212bp) wurden 2%ige TAE-Agarosegele genutzt. Den Gelen wurde zum Nachweis der DNA der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 5 ng/ml zugefügt. Die maximale Trennstrecke dieser Gele betrug 14 cm. Die PCR-Proben und die dazugehörigen Positiv- und Negativkontrollen (Wasserprobe) wurden 1:1 mit dem Auftragspuffer gemischt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 1 h. Die elektrophoretische Auftrennung wurde mit dem Eagle Eye II Photo System dokumentiert.

2.2.3 Genotypisierung der *SCID/P-Selektin*-KO-Mutanten mittels Southern Hybridisierung

2.2.3.1 DNA-Sonde

Der Plasmid-Vektor pBluescript II SK mit der murinen P-Selektin Sequenz wurde von Dr. R. Bosse 1995 vom Max Planck Institut für Immunbiologie (Freiburg) zur Verfügung gestellt. Nach einer Verdauung mit dem Restriktionsenzym HindIII erhielt man ein 500bp großes DNA-Fragment, welches als Hybridisierungssonde eingesetzt werden konnte. Die murine genomische DNA wurde zuvor mit dem Restriktionsenzym EcoRV über Nacht verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt. Die P-Selektin DNA-Sonde hybridisierte bei 3,9kb mit dem Wildtypallel und bei 13.8kb mit dem knock-out Allel der *SCID/P-Selektin*-KO-Mutante. Heterozygote Versuchstiere waren durch den Nachweis beider Banden gekennzeichnet.

2.2.3.2 Transformation von *E.coli*-Bakterienstamm

0,3 - 0,5 ng des Plasmid-Vektors pBluescript II SK (P-Selektin-Insert) wurden auf eine Lösung von 200 µl der kompetenten Zellen des Bakterienstamms *E.coli* K12/HB101 gegeben und für 25 min auf Eis und anschließend für 3 min bei 43 °C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 1 ml LB-Medium/Ampicillin in die Reaktionsgefäße der kompetenten Zellen und eine Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur. Für weitere 30 Minuten wurden die Zellen bei 37°C geschüttelt, um anschließend in unterschiedlichen Verdünnungen auf vorbereitete Ampicillin-Platten über Nacht bei 37°C inkubiert zu werden. Im Anschluß an diese Inkubation wurden einzelne *E.coli* K12/HB101 Kolonien gepickt und in 3 ml LB-Medium

resuspendiert. Die ausgewählten Bakterienkulturen wurden über Nacht bei 37°C geschüttelt und am folgenden Tag mittels Mini-Präparation kontrolliert.

2.2.3.3 Mini-Präparation der Plasmid DNA

Ein Volumen von 1,5 ml der über Nacht gewachsenen *E.coli* K12 Bakterienkultur wurde in Eppendorfgefäße überführt und bei 20.120 xg für 20 sek zentrifugiert. Die restlichen 1,5 ml der Bakterienkulturen wurden bei 4°C gelagert. Nach dem Dekantieren des Überstands wurden die Bakterienpellets in 100 µl Lösung I (Abschnitt 2.1.10, Lösungen und Puffer) resuspendiert, geschüttelt und für 5 min auf Eis inkubiert. Im Anschluß erfolgte die Zugabe von 200 µl Lösung II (vorsichtig schwenken) mit einer 5minütigen Inkubation auf Eis. Nach der Zugabe von 150 µl der Lösung III (vorsichtig schwenken) und einer 5minütigen Inkubation auf Eis folgte eine Zentrifugation bei 20.120 xg für 2 min. Der Überstand wurde in neue Eppendorfgefäße überführt und nach anschließender Zugabe von 200 µl Isopropanol vorsichtig geschwenkt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 20.120 xg für 2 min. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das verbleibende DNA-Pellet in 50 µl TE-Puffer resuspendiert. Durch die Zugabe von 23 µl Lösung IV (7,5 M Ammonium Acetat / Lagerung -20°C) und 150 µl absolutem Ethanol (-20°C) kam es zur Fällung der DNA. Die Fällung erfolgte bei -20°C für 30 min mit anschließender Zentrifugation bei 20.120 xg für 2 Minuten. Nach Abnahme des Überstandes wurde das verbleibende DNA-Pellet in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

2.2.3.4 Restriktionsverdau der Plasmid-DNA

Die gelöste Plasmid-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym HindIII verdaut. Der nachfolgend beschriebene Restriktionsansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der verdauten Plasmid DNA bei 100 V für 1 h. Neben vektorspezifischen Banden wurde das spezifische P-Selektin-Fragment (500bp) gefunden.

Restriktionsansatz:	25 µl	Plasmid DNA
	3 µl	10 x Enzympuffer (Stratagene/AGS)
	1 µl	RNaseA
	1 µl	Hind III (25 Units/Stratagene)
	ad30 µl	ddH ₂ O

Dem Nachweis im kleinen Maßstab folgte ein vergrößerter Ansatz, um so ausreichende Konzentrationen der P-Selektin-Sonde zu erhalten.

2.2.3.5 Midi-Präparation der Plasmid-DNA

Die Präparation von größeren Mengen extrachromosomaler DNA aus Bakterien erfolgte mit Hilfe des Nucleobond DNA-Isolierungskits der Fa. Macherey-Nagel. Nach der alkalischen Lyse wurde die extrachromosomale DNA nicht durch Isopropanol ausgefällt, sondern in einer Säulenchromatographie über eine Silikamatrix aufgereinigt.

Positive Klone des *E.coli* K12/ HB101-Stammes wurden über Nacht 10 ml-Vorkulturen in LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum aufgezogen. Von diesen wurden dann 500 ml-Hauptkulturen angeimpft, die ebenfalls über Nacht (37°C / Schüttler 120rpm) angezogen wurden. Die Bakteriensuspensionen wurden in Zentrifugen-Röhrchen überführt (125 ml pro Ansatz) und für 15 min bei 5.838 xg zentrifugiert. Dabei war zu beachten, daß der GSA Rotor (Rotor 10) und die Zentrifuge vorgekühlt (4°C) waren. Anschließend wurde der Überstand dekantiert. Die sichtbaren Pellets wurden in je 12 ml der Lösung S1 resuspendiert, durch die Zugabe von 12 ml der Lösung S2 komplettiert, sechs- bis achtmal aufgeschüttelt und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 12 ml der Lösung S3 wurde solange aufgeschüttelt, bis eine homogene Lösung entstand, die für 5 min auf Eis inkubiert wurde. Im Anschluß daran wurde dieser Lösungsansatz bei 12.000 xg für 40 min bei einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Nach Equilibrierung der Nucleobond-AX500 Säulen mit je 5 ml der Lösung N2 wurde der Überstand (ohne Verunreinigungen) auf die Säule aufgetragen. Anschließend erfolgte das zweimalige Waschen mit je 2 x 12 ml der Lösung N3 und die Elution der Plasmid-DNA mittels zweimaliger Zugabe von je 6 ml der Lösung N5. Die Präzipitation der Plasmid-DNA erfolgte nun mittels Isopropanol Zugabe (0,7-0,8 Vol. auf 12 ml der Lösung N5) und einer 30minütigen Inkubation bei Raumtemperatur (ca. 20°C). Nach einer Zentrifugation (15.000 xg für 30 min bei 4°C), einem Waschschriff mit vorgekühltem Ethanol (70%) und einem weiteren Zentrifugationsschritt (15.000 xg für 10 min bei 4°C) wurden die DNA-Pellets getrocknet und im Anschluß daran in 200 µl ddH₂O aufgenommen. Es folgte ein Verdau der DNA mit dem Restriktionsenzym HindIII im größeren Maßstab (100 µl DNA / 50 µl Wasser / 18 µl 10 x Puffer / 15 µl HindIII (25 Units / µl)) für 3 Stunden bei 37°C.

2.2.3.6 Präparative Agarosegelelektrophorese

Für die Isolierung einzelner Restriktionsfragmente oder PCR-Produkte wurde die DNA über eine präparative Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Hierfür wurden in der Regel 0.8%ige low-melting-TAE-Agarosegele eingesetzt. Den Gelen wurde zum Nachweis der DNA der

Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 5 ng/ml zugefügt. Die maximale Trennstrecke dieser Gele lag bei 14 cm. Die Elektrophorese erfolgte dabei für 2-3 h bei 50 V. Nach der Elektrophorese wurden die gewünschten Banden auf dem UV-Transilluminator aus dem Gel ausgeschnitten.

2.2.3.7 Gene Clean

Zur Anreicherung der 500bp P-Selektin-Banden wurde das Gene Clean Kit der Fa. Dianova genutzt. Die aus dem Gel ausgeschnittenen DNA-Banden wurden in Eppendorfgefäße überführt und mit 1200 µl Natriumjodid (NaI) für 5 Minuten bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Daran schloß sich die Zugabe von 5 µl Glasmilch, bei der 1 µl Glasmilch ungefähr 1 µg DNA entsprach, an. Während der 5 minütigen Inkubation bei RT banden die DNA-Fragmente an die Glasmilch. Nach einer Zentrifugation bei 20.120 xg für 5 sek wurde der Überstand in neue Eppendorfgefäße überführt. Das Glasmilchpellet wurde mit 500 µl NewWash gewaschen und anschließend zentrifugiert (20.120 xg / 5 sek). Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Im Anschluß daran wurde das Glasmilchpellet in Wasser (20 µl) aufgenommen und für 5 min bei 50°C inkubiert. Während dieser Inkubation kam es zur Elution der DNA. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (20.120 xg / 30 sek). Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurde das Glasmilchpellet nochmals in Wasser aufgenommen, um restliche DNA-Fragmente zu eluieren. Danach erfolgte die Bestimmung der DNA-Konzentration.

2.2.3.8 Restriktionsverdau genomischer DNA

Die murine genomische DNA aus Gewebeproben der *SCID/P-Selektin*- und der *SCID/ICAM1/P-Selektin*-KO-Mutantenzuchten wurde durch die Zugabe des Restriktions-Enzyms EcoRV fragmentiert. Der unten aufgeführte Restriktionsansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

Restriktionsansatz:	59 µl	DNA
(Volumen: 70 µl)	7 µl	10 x Enzym-Puffer (AGS/Stratagene)
	4 µl	EcoRV (20 Units / µl)

Die analytische Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten erfolgte abhängig von der Länge der zu trennenden Fragmente in Gelen mit unterschiedlichen Agarosekonzentrationen. Für die Auftrennung von Restriktionsfragmenten genomischer DNA wurden TAE-Agarosegele (1%) verwendet. Als Längenstandard wurden die λ /HindIII-Fragmente genutzt. Die Fotodokumentation erfolgte mit dem Eagle Eye II Photo System.

2.2.3.9 Kapillar-Transfer der murinen DNA-Fragmente

Die Übertragung von gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmenten auf Nitrozellulosemembranen wurde erstmals von Southern et al. beschrieben (1975). Durch eine Behandlung des Gels für 20 Minuten mit 0,25 M HCl bei Raumtemperatur wurde die DNA partiell depuriniert, so daß die Übertragung größerer DNA-Fragmente auf die Nitrozellulose-Membran erleichtert wurde. Die Denaturierung der DNA erfolgte während einer 45minütigen Inkubation des Gels in 0.5 M NaOH / 1.5 M NaCl. Anschließend wurde das Gel für 60 Minuten in 3 M Natriumazetat-Lösung (pH 5.5) neutralisiert. Die eingesetzten Lösungen wurden in der Regel zweimal eingesetzt. Während der Inkubationsphasen wurde die Transferapparatur vorbereitet. Zwei mit $20 \times$ SSC (pH 7.0) mit Transferpuffer gefüllte Schalen dienten als Pufferreservoir. Darüber wurde eine Glasscheibe mit einem in das Reservoir hineinreichenden, mit Transferpuffer getränkten Whatman-Filterpapier als Pufferbrücke (40x20cm) gelegt. Luftblasen zwischen Glasplatte und Filterpapier wurden mit einer Glaspipette herausgedrückt. Auf diese Pufferbrücke wurde das fertig vorbereitete Gel luftblasenfrei mit der Unterseite nach oben gelegt und an allen Seiten mit Frischhaltefolie abgedichtet, um nur einen gerichteten Pufferstrom durch das Gel durchzulassen. Auf das Gel wurde nun ebenfalls luftblasenfrei eine zuvor beschriftete und in ddH₂O eingeweichte Nitrocellulosemembran (\varnothing 0,45µm, 20 x 20 cm) gelegt. Die Geltaschen wurden auf der Membran deutlich gekennzeichnet, um so einen Vergleich der Autoradiografien mit den Gelfotos zu ermöglichen. Anschließend wurden drei ddH₂O-getränkte Lagen Whatman-Filterpapier (20 x 20 cm) auf die markierte Nitrocellulosemembran gelegt. Hierauf folgte ein Stapel saugfähigen Papiers. Die Transferapparatur wurde mit einer Glasplatte sowie einem kleinen Gewicht beschwert und durch Folien vor Verdunstung geschützt. Der Transfer erfolgte mindestens über einen Zeitraum von 16 Stunden. Anschließend wurde die Membran zur Entfernung von Agaroseresten kurz in $2 \times$ SSC auf dem Schüttler gewaschen. Die zwischen Filterpapier getrocknete NC-Membran wurde im Anschluß für 2 Stunden bei 80°C gebacken, um so die DNA auf dem Membranfilter zu fixieren.

2.2.3.10 Nick Translation

Die erstmals von Rigby et al. beschriebene Methode der Nick Translation beruhte auf einer Eigenschaft der DNaseI, die bei niedrigen Enzymkonzentrationen und in Anwesenheit von Mg²⁺-Ionen in einem doppelsträngigen DNA-Substrat an statistisch verteilten Stellen des Einzelstrangs sogenannte „nicks“ erzeugte (1977). Ein zweites Enzym, die *E.coli* DNA-

Polymerase I, konnte ausgehend von diesen „nicks“ in 5'→3'-Richtung einen neuen DNA-Strang synthetisieren, der zum intakten, ersten Strang komplementär war. Hierbei wurden die Nukleotide in Syntheserichtung durch die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase I entfernt und dann durch die Aktivität der Polymerase wieder ersetzt. Als Substrat angebotene, radioaktiv oder chemisch markierte Desoxyribonukleosidtriphosphate wurden in den neusynthetisierten Strang eingebaut. Für die Hybridisierung genomischer Southern Blots wurde die P-Selektin DNA-Sonde genutzt. Nach einer zweieinhalbstündigen Inkubation bei 15°C wurde die Reaktion mit 80 µl TE-Puffer pH 8.0 versetzt und die nicht eingebauten Nukleotide über eine Gelfiltration mit Sephadex G-50 abgetrennt. Die Einbaueffizienz der radioaktiv markierten Nukleotide an den neusynthetisierten DNA-Strang wurde über einen Handmonitor abgeschätzt. Anschließend wurde die Sonde direkt nach der Denaturierung in den Hybridisierungs-Ansatz gegeben.

Nick Translationsansatz:	100 ng	DNA-Sonde (P-Selektin)
(auf Eis)	2 µl	10 x Reaktionspuffer (Boehringer)
	3 µl	Mischung der unmarkierten dNTP's dCTP/dGTP/dTTP (jedes 0.13 mM)
	3 µl	30 µCi [α^{32} P]dATP
	9 µl	ddH ₂ O
	2 µl	Enzymgemisch (DNA Polymerase I / DNase I in 50% Glycerin)

2.2.3.11 Southern Hybridisierung

Die einzusetzenden Hybridisierungsrollerflaschen wurden vor Gebrauch für 30 min mit VE-Wasser gewaschen. Die Nitrocellulosemembran wurde währenddessen in 2 × SSC eingeweicht und anschließend in die nun mit 2 × SSC gefüllten Hybridisierungsrollerflaschen überführt. Nach dem Andrücken des Filters an die Wandung der Flasche wurde die Lösung vorsichtig entfernt und durch 20 ml einer auf 68°C temperierten Hybridisierungslösung (Abschnitt 2.1.10) ersetzt. Die Reaktionsgefäße wurden nun mit einem Silikonstopfen verschlossen und die Filter für 3 bis 4 Stunden bei 68°C im Hybridisierungsrollerschrank prähybridisiert. Kurz vor Ende der Prähybridisierung wurden die radioaktiv markierte DNA-Sonde und die Lachsspermien DNA zur Absättigung unspezifischer Bindungen durch Erhitzen auf 95°C (10 min) mit anschließender 10minütiger Inkubation auf Eis denaturiert. Danach wurde der Prähybridisierungsmix entnommen und durch frische Hybridisierungslösung (68°C) ersetzt. Die denaturierte markierte P-Selektin DNA-Sonde und

die denaturierte Lachsspermien DNA wurden zu der Hybridisierungslösung in die Rollerflasche pipettiert und die Hybridisierung bei 68°C für mindestens 16 Stunden durchgeführt. Vor dem Waschen des Filters wurde die Hybridisierungslösung in den [$\alpha^{32}\text{P}$]-Flüssigabfall abgegossen und der Filter in der Rollerflasche mit 50-100 ml Waschlösung ($2 \times \text{SSC} / 0,1\% \text{ SDS}$) für 20 min bei 68°C im Hybridisierungssofen gespült. Die Waschlösung wurde wiederum in den flüssigen [$\alpha^{32}\text{P}$]-Abfall gegeben und durch 50 bis 100 ml $1 \times \text{SSC} / 0,1\% \text{ SDS}$ ersetzt und neuerlich für 20 min bei 68°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Zwischen den einzelnen Waschschrritten erfolgte mit einem Handmonitor die Kontrolle der noch auf dem Filter gebundenen Radioaktivität sowie der Radioaktivität in der Waschlösung, um die Stringenz der folgenden Waschschrritte entsprechend anpassen zu können. Bei zu starken Signalen wurde ein weiterer Waschschrritt mit 50 bis 100 ml $0,5 \times \text{SSC} / 0,1\% \text{ SDS}$ durchgeführt. Die Filter wurden anschließend bei Raumtemperatur (RT) getrocknet, auf ein 20 x 20 cm Whatman-Filterpapier gegeben und in Haushaltsfolie eingewickelt. Die getrockneten Filter wurden in eine Expositionskassette gegeben, mit einer kurz zuvor gelöschten Imaging-Platte (BAS-MP / 2040S / 20 x 40 cm) belegt und mit der Verstärkerfolie abgedeckt. Nach einer 180minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Imaging-Platte entnommen und im Phospho-Imager entwickelt. Die Auswertung erfolgte mit der Software BasRead/TINA der Firma Fuji. Anschließend wurde zusätzlich eine Autoradiografie erstellt. Dabei wurden getrocknete Nitrozellulosemembranen in eine Expositionskassette gegeben und bei -80°C autoradiographiert. Die Expositionsdauer richtete sich an der Stärke der Signale aus und lag durchschnittlich bei 3 Tagen. Die Filme wurden in einem Röntgenfilm-Entwickler von Optimax entwickelt.

2.2.4 Nachweis des murinen IgG/IgM-Titers der Mauseuchten

2.2.4.1 Serumgewinnung

Zur Gewinnung des Serums wurden die Versuchstiere mittels Diethylether narkotisiert. Durch Einsatz einer 20 μl Kapillare wurden aus dem retroorbitalen Venenplexus ca. 50 μl Blut entnommen und bei 4°C für 1 h gekühlt. Nach einer 5minütigen Zentrifugation bei 268 xg wurde das Serum im Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Lagerung der Seren bis zur Bestimmung des IgG/IgM-Titers erfolgte bei -20°C.

2.2.4.2 Bestimmung des murinen IgG/IgM-Titers mittels ELISA

Zum Nachweis der murinen Immunglobuline IgG und IgM in den Seren der C.B-17-*scid*-Versuchstiere wurde die ELISA-Technik genutzt. Die Maxisorb Mikrotiterplatten wurden hierbei mit dem Beschichtungsantikörper anti Maus IgG/IgM in einer Verdünnung von 1:800 über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit ELISA-Waschpuffer wurden die Platten mit 50 µl BSA-Lösung für 20 min inkubiert, um so unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Im Anschluß daran wurden die Mikrotiterplatten nochmals (2x) mit Waschpuffer gespült. Die Platten wurden nun mit je 50 µl des Standards bzw. der verdünnten Seren in Duplikaten beladen und für 90 min bei Raumtemperatur in einer abgedunkelten Feuchtkammer inkubiert. Danach wurde der Überstand der Mikrotiterplatten abgeschlagen und die Platten dreimal mit Waschpuffer gespült. Der Peroxidase-gekoppelte Nachweis-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1 : 8000 in die Kavitäten der Mikrotiterplatten gegeben und für 90 min bei Raumtemperatur in einer abgedunkelten Feuchtkammer inkubiert. Nach dreimaligem Spülen mit Waschmedium wurde die frisch angesetzte Chromogenlösung in die einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatten gegeben und für 5-10 min bei RT inkubiert. Während dieses Zeitraums kam es zu einer Farbentwicklung, die durch die Zugabe von 100 µl 1 M H₂SO₄-Lösung gestoppt werden konnte. Die Extinktion wurde unmittelbar im Anschluß photometrisch bei 492 nm ermittelt. Aus den Werten der mitgeführten Standardproben bzw. der daraus resultierenden Eichkurve wurde die Konzentration der murinen IgG/IgM errechnet. Die Bestimmung des murinen IgG/IgM-Titers erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Versuchstierkunde der MHH.

2.2.5 Markierung humaner Effektorzellen durch Fluorescein Isothiocyanat (FITC)

2.2.5.1 FITC-Markierung humaner Effektorzellen

Vor der Zugabe der FITC-Stammlösung zu den zu markierenden Zellen wurde ein Zentrifugationsschritt zur Abtrennung von ungelösten Bestandteilen wiederholt. Die humane Lymphozytensuspension wurde anschließend auf 4×10^7 Zellen pro ml eingestellt und durch die Zugabe von 60 µl je ml FITC-Stammlösung für 15 min bei 37°C inkubiert. Die markierten humanen Zellen wurden im Anschluß dreimal intensiv gewaschen (200 xg / 10 min). Zum Nachweis der Markierungseffizienz folgte eine durchflußzytometrische Messung bei 490 nm. Der Nachweis der an der Zelloberfläche gebunden vorliegenden FITC-Moleküle konnte für

maximal 7-9 Tage erfolgen, da sonst die FITC-Intensität von der Gewebe-Autofluoreszenz übertroffen worden wäre. Die Methode der FITC-Markierung wurde von Samlowski et al. beschrieben [78].

2.2.5.2 Durchflußzytometrischer Nachweis der FITC-Markierung zu bestimmten Zeitpunkten

Bei diesem Versuch stand nicht die Ausbildung der xGvH-Erkrankung im Vordergrund, sondern die Entwicklung der humanen Effektorzellen zu festgesetzten Zeitpunkten. Hierfür wurden 4-5 Versuchstiere mit der gleichen Anzahl CD4⁺ Zellen desselben Spenders inokuliert und nach 24 h, 72 h, 5, 7, 9, 11 Tagen und nach Ausbildung der xGvHD untersucht. Die Rückgewinnung richtete sich nach dem beschriebenen Protokoll (Abschnitt 2.2.8). Da die humanen Effektorzellen jedoch FITC-markiert waren, erfolgte bei der durchflußzytometrischen Analyse der Nachweis der humanen Zellen nur mittels Zugabe PE-markierter Antikörper.

2.2.6 Proliferationstest

Die Proliferation von Zellen kann über die Inkorporation von [³H]-Thymidin in die DNA gemessen werden. Das exogene, Tritium-markierte Thymidin wird dabei von Zellen während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut. Die inkorporierte Aktivität wird mit einem Betaplate Szintillationszähler (Wallac) bestimmt.

2.2.6.1 Zellstimulation humaner Effektorzellen durch PHA, ConA, Fluorescein-Isothiocyanat und IL-2

Durch Dichtegradientenzentrifugation, *in vitro* Panning und MACS angereicherte humane periphere Blut-Lymphozyten wurden auf eine Konzentration von 3×10^6 pro ml Kulturmedium eingestellt. Anschließend wurden 10^5 T-Zellen in 200 µl Kulturmedium 3fach in die Rundboden-Mikrotiterplatten gegeben. Die Stimulation der humanen Lymphozyten erfolgte durch Zugabe von je 50 µl Phytohämagglutinin (PHA) aus *Phaseolus vulgaris* in einer Konzentration von 1 µg/ml oder durch Zugabe von Concanavallin (Con A) in einer Konzentration von 0,5 µg/ml. Als Kontrolle diente die Zugabe von 50 µl Kulturmedium. Nach 72 h wurde den Zellen 50 µl [³H]Thymidin zugegeben. Die Proben wurden 24 h später aus dem Brutschrank entnommen und bei -20°C gelagert. Durch Hinweise in der Literatur war bekannt, daß die Markierung durch Fluorescein-Isothiocyanat einen nachweisbaren

Einfluß als Kostimulator auf das Proliferationsverhalten der markierten Zellen nahm. Deshalb wurde der kostimulatorische Effekt der FITC-Markierung ebenfalls in dem SCIDHu-Tiermodell untersucht. Fluorescein Isothiocyanat (FITC) wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in PBS gelöst. Die FITC-Moleküle lagerten sich an die Oberflächenproteine der zu markierenden Zellen an. Damit standen markierte humane Lymphozyten für Untersuchungen im xenogenen Mausmodell zur Verfügung. Das Proliferationsverhalten von FITC-markierten humanen Effektorzellen im Vergleich zu unmarkierten Zellen des gleichen Spenders wurde untersucht.

2.2.6.2 Messung des inkorporierten [³H]Thymidins

Das Prinzip des Proliferationstests der humanen Lymphozyten erfolgte über den Einbau von im Überschuß vorhandenem [³H] markierten Thymidin in die DNA von lebenden Zellen. Der Nachweis erfolgte dabei indirekt über die DNA-Neusynthese und korrelierte dabei mit dem Proliferationsverhalten der eingesetzten Zellen. Bei diesem Prozeß wurden die Zellen mit destilliertem Wasser osmotisch aufgeschlossen und die Lysate mit einer Vakuumpumpe durch eine Glasfasermatte gesaugt. Die chromosomale DNA der Zellen blieb an der Glasfasermatrix der Filtermatte haften. Die Aktivität des eingebauten [³H]-TdR der Proben wurde nach dem Trocknen der Matte, dem Einschweißen in einer Plastikhülle und der Zugabe von 10 ml Flüssigkeits-Szintillations-Analysator (LKB Beta-Plate) über die Zählimpulse pro Minute (cpm) bestimmt. Für Stimulationsansätze wurden die Mittelwerte der cpm aus drei Einzelansätzen genutzt. Über den Vergleich der spontanen Proliferation (Medium-Kontrolle) mit der über ConA-, PHA- und FITC-induzierten Stimulation wurde auf das Proliferationspotential der humanen Lymphozyten geschlossen.

2.2.7 Inokulationsverfahren

2.2.7.1 Intraperitoneale Inokulation humaner Lymphozyten in C.B-17-*scid* und Ausfallmutanten

Durch eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll (Ficoll-Paque[®] PLUS / Pharmacia Biotech) wurden periphere mononukleäre Lymphozyten (PBL) aus menschlichem Blut, das von der Blutbank der MHH in Form von Buffy Coats zur Verfügung gestellt wurde, und aus Operationsresektaten der Milz isoliert. Die humanen Zellen wurden mit dem Antigerinnungsfaktor Liquemin (1 ml/Na-Heparin/500 I.E.) versetzt, mit TC199 verdünnt und auf ca. 120 ml aufgefüllt. Für die Dichtegradientenzentrifugation wurden jeweils 10 ml Ficoll

in 50 ml Röhrchen mit dem Blut-Mediumgemisch überschichtet. Nach einer Zentrifugation (400 xg, 30 min, RT) wurde die Interphase, in der sich die PBMC befanden, abgenommen und zweimal mit TC199 gewaschen (200 xg / 10 min). Nach dieser Ficoll-Separation wurden die humanen Lymphozyten durchflußzytometrisch analysiert. Anschließend wurde die Zellzahl und die Vitalität der Zellen bestimmt und auf eine Konzentration von 5×10^7 CD4⁺/ml eingestellt. Die 24 h früher vorbereiteten Versuchstiere (Abschnitt 2.2.9.2) erhielten während der Narkose eine intraperitoneale Injektion der humanen Lymphozyten. Die Versuchstiere wurden täglich kontrolliert (Gewicht), um so bei Ausbildung der xGvH-Erkrankung eine schnellstmögliche, schmerzfreie Tötung zu gewährleisten.

2.2.8 Isolierung der humanen Effektor- und Stimulatorzellen

Die xGvH-erkrankten Versuchstiere wurden mittels Diethylether narkotisiert und nach der Herzpunktion durch Genickbruch schmerzfrei getötet. Im Anschluß daran folgte die Rückgewinnung der humanen Effektorzellen aus den verschiedenen murinen Zielorganen.

2.2.8.1 Rückgewinnung aus murinem Blut

Den narkotisierten Mäusen wurde mittels Herzpunktion zwischen 300 μ l - 1 ml Blut entnommen. Das Blut wurde sofort mit Heparin bzw. Liquemin versetzt, um eine Gerinnung zu verhindern. Nach einer Zentrifugation (200 xg / 10 min) wurde das Serum abgenommen und bei -20 C aufbewahrt, um so später Proben für weitere Western-Blot- und ELISA-Analysen zu haben. Das Zellsediment wurde anschließend in 5-10 ml Erythrozytenlyse-reagenz resuspendiert, mit 1 ml FCS unterschichtet und im Anschluß daran zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort verworfen und durch 15 ml TC199 ersetzt. Die Zellen wurden nochmals gewaschen und standen nach der Zellzahl- und der Vitalitätsbestimmung für anschließende Untersuchungen zur Verfügung.

2.2.8.2 Rückgewinnung aus muriner Bauchhöhle

Aus den getöteten Versuchstieren wurden anschließend die humanen Lymphozyten mittels Bauchh hlenlavage wiedergewonnen. Hierbei wurden zweimal je 5 ml eiskalter PBS-Lösung in die Bauchhöhle injiziert. Die mit PBS prall gef llte Bauchhöhle wurde mehrmals vorsichtig massiert. Danach wurden die abgelösten humanen Lymphozyten und murinen Zellen vorsichtig wieder abgesaugt und in ein 15 ml Falcon überführt. Nach zweimaligem Waschen mit TC199 (200 xg / 10 min) wurden Zellzahl und Zellvitalität bestimmt.

2.2.8.3 Rückgewinnung der humanen Effektorzellen aus verschiedenen murinen Zielorganen der Bauchhöhle

Nach Entfernung der Bauchhaut wurden Milz, Leber, Niere und Mesenterial-Lymphknoten freipräpariert und in TC199 überführt. Anschließend wurden die Organe mit einer Schere grob zerkleinert, um im Anschluß daran mit einem Stempel vorsichtig durch ein Metallsieb gedrückt zu werden. Die vereinzelt Zellen wurden anschließend zweimal mit TC199 gewaschen (200 xg / 10 min). Gegebenenfalls wurden die murinen Zellen zuvor sedimentiert und in 10 ml Hämolysepuffer aufgenommen. Nach den Waschschritten wurde wiederum die Zellzahl bestimmt. Daneben wurden jedoch von allen Organen Proben für immunhistologische Färbungen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren (-80°C). Gegebenenfalls wurden von den Einzelzellsuspensionen Zytospinpräparate hergestellt.

2.2.8.4 Rückgewinnung humaner Effektorzellen aus verschiedenen murinen Zielorganen des Brustkorbs

Nach der Öffnung des Brustkorbs wurden die Lungenflügel, das Herz und das Thymus-assoziierte Gewebe freipräpariert. Der Hauptanteil der einzelnen Zielorgane wurde in TC199 grob zerkleinert und vorsichtig mit einem Stempel durch ein Metallsieb gedrückt. Nach zweimaligem Waschen mit TC199 (200 xg / 10 min) wurden Zellzahl und Zellvitalität bestimmt. Zusätzlich wurden Proben aller untersuchten Organe für immunhistologische Färbungen entnommen und bei -80°C gelagert.

2.2.8.5 Rückgewinnung aus murinem Knochenmark

Zur Gewinnung muriner und humaner Zellen aus dem Knochenmark wurden die Hinterläufe der xGvH-erkrankten Versuchstiere von Haut und Muskelgewebe befreit. Die Knochen wurden anschließend an den Epiphysen abgetrennt und in TC199 überführt. Danach wurden die Knochen mit Hilfe einer Spritze und einer 0,04 mm Kanüle mehrmals durchgespült. Zellaggregate wurden durch mehrmaliges vorsichtiges Aufziehen der Spritze weiter vereinzelt. Im Anschluß daran folgte eine Erythrozytenlyse mittels 10 ml Hämolysepuffer (Unterschichtung mit 1 ml FCS). Nach einem Zentrifugationsschritt (200 xg / 10 min) wurden die Zellen in TC199 resuspendiert und die Zellzahl und Zellvitalität bestimmt.

2.2.9 Isolierung von lymphoiden Zellen aus humanem Blut mittels Depletion

2.2.9.1 Isolierung von T-Zellsubpopulationen durch Panning

Zur Auftrennung von T-Zellen in einzelne Subpopulationen wurde die Panning-Technik verwendet, welche eine negative Selektion (Depletion) von Zellgruppen ermöglichte. Nach Inkubation mit Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenmarker wurden die Antikörpermarkierten Zellsubpopulationen an eine mit Sekundärantikörpern beschichtete Plastikschaale gebunden. Die unmarkierten Zellsubpopulationen sedimentierten zwar ebenfalls auf dem Schalenboden, wurden aber durch vorsichtiges Schwenken der Schale wieder resuspendiert. Zur Beschichtung mit Sekundärantikörpern wurden die Kulturschalen (\varnothing 90 mm) mit 30 ml einer Ziege-anti-Maus Ig (G α M)-Verdünnung (10 μ g/ml) über Nacht bei 4°C inkubiert, danach zweimal mit PBS und einmal mit PBS / 1% FCS gewaschen. Aus den T-Zellpopulationen wurden CD4⁺ bzw. CD8⁺ oder deren CD45RA⁺ bzw. CD45R0⁺ Subpopulationen angereichert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit den entsprechenden mAb bei einer Konzentration von 1 μ g mAb/10⁷ Zellen/ml in TC199 / 10% FCS für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit TC199 gewaschen und in einer Konzentration von 3 x 10⁶ Zellen/ml in PBS / 5% FCS aufgenommen. 12,5 ml dieser Zellsuspension wurden auf je eine der mit G α M-beschichteten Plastikschaalen gegeben und für 2 h bei 4°C inkubiert. Nach vorsichtigem Schwenken der Schalen wurde der Überstand und damit die unmarkierten T-Zellpopulationen abgenommen. Nach zweimaligem Waschen (Kulturmedium) wurden die Zellzahl und die Zellvitalität bestimmt. Die Separation der Zellpopulationen wurde durchflußzytometrisch überprüft. Die Anreicherung lag in der Regel bei über 95%. Darüberhinaus wurde häufig eine gleichzeitige positive *in vivo*-Depletion (mAb: AICD8.1) humaner CD8⁺ T-Zellen in den Versuchstieren vorgenommen.

2.2.9.2 Konditionierung der Versuchstiere

Um einen möglichen Einfluß muriner Immunzellen auf die humanen T-Zellen zu verringern bzw. auszuschließen, wurden die murinen natürlichen Killerzellen depletiert. Für die Tierversuche wurden nur genotypisierte Versuchstiere im Alter von 6-10 Wochen genutzt, die keine Ausbildung muriner IgG's oder IgM's zeigten. Die Versuchstiere wurden 24 h vor der Inokulation durch eine subletale Bestrahlung (3Gy) und einer einmaligen intraperitonealen Injektion von 100 μ l des antiASGM1-Antikörpers (1:5 in PBS verdünnt) vorbehandelt [25].

Durch die Zugabe dieses Antikörpers erfolgte in den Versuchstieren eine *in vivo* Depletion muriner NK-Zellen.

2.2.9.3 Anreicherung von CD2⁺ humanen T-Zellen mittels Schafserythrozyten-Rosettierung

Bei dieser Methode wurde die Bildung von Rosetten zwischen einer Subpopulation von humanen Lymphozyten und Schafserythrozyten (SRBC) genutzt, um so CD2⁺ (E⁺) humane T-Zellen von B-Zellen und Monozyten (CD2⁻) zu trennen. Im ersten Schritt wurde das Schafsblut in TC199 aufgenommen und zweimal gewaschen (200 xg / 10 min). Anschließend wurden 300 µl des Sediments (5 x 10⁹ SRBC-Zellen) entnommen und mit 100 µl Neuraminidase und 4,6 ml TC199 komplettiert und für 30 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach zwei Waschschrritten wurden die SRBC in 50 ml TC199 aufgenommen und resuspendiert. Im Anschluß daran wurden die peripheren Blut-Lymphozyten (PBL) über einen Ficollgradienten separiert. Nach der Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität wurden die Zellen in TC199 mit 10% FCS aufgenommen und auf eine Konzentration von 6,67 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Je 1 ml der Neuraminidase behandelten SRBC wurden nun mit 9 ml der Lymphozyten-Suspension in einem 50 ml Falcon vermischt. Nach einer 10minütigen Inkubation im Wasserbad bei 37°C wurden die Zellen für 15 min zentrifugiert (200 xg). Es folgte eine 30minütige Inkubation auf Eis bei 4°C. Das Sediment aus SRBC und PBL wurde anschließend resuspendiert und mit 10 ml FICOLL unterschichtet. Nach einer 30minütigen Zentrifugation (400 xg) befanden sich die CD2⁺ (E⁺) T-Zellen mit den SRBC im Sediment, während sich die CD2⁻ (E⁻) Zellen in einem schmalen Band oberhalb der Ficollschicht befanden. Die B-Zellen und Monozyten wurden nun entnommen und zweimal gewaschen. Nach Absaugen des restlichen Überstands wurde das Sediment in 10 ml Erythrozytenlylysereagenz (NH₄Cl) resuspendiert und für kurze Zeit bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Lyse der SRBC wurde phänotypisch durch die Klärung der Lösung sichtbar. Es folgte zweimaliges Waschen mit TC199 (200 xg / 10 min). Nach der Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität standen die CD2⁺ (E⁺) humanen T-Zellen für *in vivo* und *in vitro* Versuche zur Verfügung.

2.2.9.4 Depletion humaner CD8⁺ Zellen *in vitro* mit CD8.1 Antikörper

Humane Lymphozyten wurden mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation angereichert. Nach der Zellzahlbestimmung wurden Ausgangsproben für die Durchflußzytometrie (1 x 10⁶ Zellen), die Mitogenstimulation (1x10⁶ Zellen) und die TCR Vβ-Repertoire-Analyse (1 x 10⁷

Zellen) entnommen. Mit G α M-Antikörpern beschichtete Petrischalen (10 μ g/ml) wurden zweimal mit PBS gespült. Inzwischen wurden die humanen Zellen in TC199 mit 5% FCS auf 5×10^7 Zellen/ml eingestellt. Es folgte die Zugabe des anti-CD8⁺ Antikörpers (10 μ g/ml) mit einer 30minütigen Inkubation auf Eis bei 4°C. Danach wurden die Zellen zweimal gewaschen, um so ungebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden die humanen Zellen auf eine Konzentration von 3×10^7 Zellen pro 12,5 ml PBS / 5% FCS eingestellt. Nun wurden 12,5 ml Zellsuspension auf die Petrischalen für das *in vitro* Panning gegeben. Die markierten CD8⁺ T-Zellen wurden durch die G α M-Antikörper, die an der Plastikoberfläche gebunden vorlagen, erkannt und dadurch immobilisiert. Nach einer Inkubation von 2 h bei 4°C wurden die Petrischalen vorsichtig geschwenkt. Die unmarkierten Zellen verblieben im Überstand und konnten somit ohne Beeinträchtigung für die Inokulationsversuche genutzt werden. Im Anschluß wurde der Zellüberstand abgenommen, in 50 ml Falconröhrchen übertragen und zweimal in TC199 gewaschen. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität. Die depletierten humanen Zellen wurden anschließend durchflußzytometrisch analysiert. Wiederum wurden Proben für die Mitogenstimulation (1×10^6 Zellen) und für die Analyse des TCR V β -Repertoires (1×10^7 Zellen) abgenommen und bei -80°C gelagert. Durch Zugabe weiterer Antikörper, die entweder die CD45 Isoform R0⁺ (mAb UCHL-1) oder die CD45 Isoform RA⁺ (mAb MEM56) erkannten, konnte eine Anreicherung unmarkierter CD4⁺CD45RA⁺ bzw. CD4⁺CD45R0⁺ T-Zellsubpopulationen erreicht werden. Im Vergleich der FACS- und Proliferationsdaten mit denen der Ausgangszellzusammensetzung wurde die Effizienz der Separation ermittelt.

2.2.9.5 CD8⁺ Depletion *in vivo* durch Antikörperbehandlung

Da bei der *in vitro* Panning-Technik ein sehr hoher Zellverlust (bis 70%) durch unspezifische Bindung auftrat, sollte eine *in vivo* Depletion der humanen CD8⁺ T-Zellen in den Versuchstieren dahingehend untersucht werden, ob diese Methode zu einer weiteren Verringerung des CD8⁺ T-Zellanteils führte. Hierfür wurden mit einem anti-CD8⁺ Antikörper (20 μ l entsprach einer Konzentration von 10 μ g) markierte humane Lymphozyten (5×10^7 CD4⁺ Zellen) für die Inokulation der Mäuse genutzt. Es folgte eine weitere intraperitoneale Injektion von 10 μ g des Antikörpers 72 h nach der Inokulation der humanen Zellen. Durch den Vergleich der durchflußzytometrischen Messungen der Ausgangsprobe (Tag 0) mit den Proben bei Ausbildung der xGvH-Erkrankung konnte die Effizienz der *in vivo* Depletion bestimmt werden.

2.2.9.6 Isolierung von CD4⁺ Zellen durch magnetische Zellsortierung

Grundlage dieser Methode ist die spezifische Bindung von Microbeads gekoppelten Antikörpern an Oberflächenstrukturen der Zielzellen. Die Antikörper-markierten Zielzellen werden anschließend durch das Magnetfeld des MACS-Separators gegeben. Dabei werden markierte Zielzellen im Magnetfeld zurückgehalten, während unmarkierte Zellen ungehindert durchfließen. Diese Methode erlaubt ebenso wie die Panning-Technik eine Anreicherung unmarkierter humaner Zellen. Dies ist von entscheidender Bedeutung für alle *in vivo* Experimente, da so unspezifische *in vivo* Depletionen verhindert werden.

Eine Einzelzellsuspension humaner Effektorzellen wurde auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen / 90 μ l PBS (pH 7,2) eingestellt. Anschließend wurden 10 μ l des Microbead-konjugierten Antikörpers auf die Zellen gegeben und für 15 min bei 6-12°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit dem 10-20fachen des Volumens der Markierung gewaschen (200 \times g / 10 min), um ungebunden vorliegende Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Selektionssäule (AS, BS) in das Magnetfeld eingeführt und gespült. Nach Zugabe der markierten Zellsuspension erfolgte eine positive Selektion der Microbead-markierten humanen Zellen im Magnetfeld. Durch Zugabe desselben Volumens von PBS wurden die unmarkierten Zellen aus der Säule ausgewaschen. Danach wurde die Säule dreimal mit 1-3 ml PBS gespült. Anschließend wurde die Selektionssäule aus dem Magnetfeld genommen und die positiven Microbead-markierten humanen Zellen aufgefangen. Die Effizienz dieser Sortierung wurde sowohl histologisch als auch durchflußzytometrisch kontrolliert.

2.2.10 Zytotoxizitätstestung

Zur Testung der zytolytischen Aktivität von humanen Effektorzellen bzw. der Schutzwirkung von Ausfallmutationen bei Zielzellen vor der Zytolyse durch die humanen Effektorzellen wurde der ⁵¹Cr-Freisetzungstest verwendet. Entsprechend des zu analysierenden Mechanismus wurden Effektor- und Zielzellen gewählt. Mit diesem *in vitro* Test konnte das xenoreaktive Potential humaner Lymphozyten (Effektorzellen) gegen murine Fibroblasten (Zielzellen) bestimmt werden. Durch die Zerstörung der ⁵¹Chrom-markierten Zielzellen wurden radioaktiv markierte ⁵¹Cr-Moleküle freigesetzt. Die Menge an freigesetzter Aktivität war dabei proportional zu dem zytotoxischen Potential der humanen Effektorzellen.

2.2.10.1 Herstellung der murinen Fibroblastenzellkulturen

Nach der Verpaarung von homozygoten *SCID/ICAM1*-, *SCID/P-Selektin*- und *SCID/Fas^{lpr}*-Mutanten wurden die Mäuse am Tag 3-5 voneinander getrennt. Die Tragzeit der Mäuse liegt bei ca. 21 ± 2 Tagen. Die hochträchtigen Weibchen (1-2 Tage vor dem Wurf) wurden mit Diethylether getötet. Anschließend wurde die Maus mittels Nadeln auf der Bearbeitungsfläche fixiert, das Abdomen geöffnet und die Föten aus dem Bauchraum entnommen und in TC199-Puffer überführt. Im Anschluß daran wurden die Extremitäten und die Eingeweide der Föten entfernt. Das verbleibende Zellmaterial wurde zerschnitten, zerzupft und in TC199-Puffer inkubiert. Die Mauszellen wurden nun in 20 ml PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) / 0,025% Trypsin überführt und für 10 min bei 37°C mittels Magnetrührer vereinzelt. Die murinen Fibroblasten wurden anschließend in 2 getrennten Chargen mit 2 unterschiedlichen Lösungen (A/B) aufgearbeitet. Die Überstände aus murinen Fibroblasten (15 ml) wurden jeweils in mit 1 ml FCS vorgelegten Falconröhrchen überführt und mit ca. 25 ml TC199 aufgefüllt. Die im Becherglas verbliebenen murinen Fibroblasten wurden wiederum mit PBS / 0,025% Trypsin (20 ml) aufgefüllt und für weitere 10 min bei 37°C gerührt. Diese Arbeitsschritte wurden insgesamt sechsmal wiederholt, so daß insgesamt 2 x 6 Fibroblastenproben vorlagen. Die Fibroblasten wurden anschließend zentrifugiert (200 xg / 10 min), die Überstände verworfen, die entstandenen Zellpellets wurden in 20-30 ml DMEM / PS / Glut / 5% FCS resuspendiert. Im Anschluß daran wurden diese in Gewebekulturflaschen überführt und bei 37°C in einem 10% CO₂-Brutschrank inkubiert.

2.2.10.2 Lagerung muriner Fibroblasten-Zellkulturen

Die adhärennten murinen Fibroblasten wurden mittels PBS / 0,25% Trypsin-Lösung von der Plastikoberfläche abgelöst und zweimal in TC199 gewaschen (200 xg / 10 min). Zum Einfrieren wurden 10^7 Zellen/ml Kulturmedium mit 20% FCS auf Eis gekühlt, mit einem gleich großen Aliquot von 20% DMSO in Kulturmedium mit 20% FCS versetzt (\Rightarrow final 5×10^6 Zellen/ml Kulturmedium mit 20% FCS und 10% DMSO) und in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden in einem auf 4°C vorgekühlten Behälter mit einem Isopropanol/Butanol-Gemisch über Nacht bei -80°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen zur längeren Lagerung in ein Dewargefäß mit flüssigem Stickstoff überführt. Im Anschluß daran erfolgte eine dauerhafte Lagerung in flüssigem Stickstoff. Zur Überwachung wurden in regelmäßigen Abständen Auftaukontrollen vorgenommen. Die in den Kryoröhrchen tiefgefrorenen murinen Fibroblasten wurden immer in flüssigem Stickstoff

transportiert. Anschließend wurden die Ampullen kurz in warmem Wasser angetaut und sofort in 15 ml Falconröhrchen, in denen TC199 / 10% FCS vorgelegt war, überführt. Dadurch wurde das im Einfriermedium enthaltene DMSO sofort verdünnt. Die Fibroblasten wurden anschließend nochmals gewaschen (200 xg / 10 min). Danach erfolgte eine Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung mit der Aussaat der murinen Zellen in einer Konzentration von $1-2 \times 10^6$ Zellen/10 ml Kulturmedium DMEM / PS / Glutamin / 5% FCS in großen Kulturflaschen. Mikroskopische Kontrollen erfolgten täglich bzw. bei Medienwechsel.

2.2.10.3 Nachweis des zytotoxischen Potentials der humanen Effektorzellen durch ^{51}Cr -Freisetzungstests

Dieses Testsystem beruht auf der Tatsache, daß ^{51}Cr bei der Inkubation von geeigneten Zellen mit einer radioaktiven Natriumchromatlösung ($\text{Na}_2[^{51}\text{Cr}]\text{O}_4$) an Membranproteine bindet. Durchlaufen so markierte Zellen einen apoptotischen Prozeß, verlieren sie ihre Membranintegrität und geben Membranvesikel an den Überstand ab. Aus der detektierten Radioaktivität des Überstands läßt sich die spezifische Lyse der eingesetzten Zielzellen errechnen.

Nach dem Entfernen der DMEM Kulturüberstände wurden die adhärenenten murinen Fibroblasten mit 30 ml 10 mM EDTA / PBS für 15 min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Fibroblasten wurden in 50 ml Falcons überführt und zweimal mit TC199-Puffer gewaschen (200 xg / 10 min), um so an der Oberfläche gebundenes FCS aus dem Kulturmedium zu entfernen. Die Gewebekulturflaschen wurden nun wieder mit DMEM befüllt und weiterhin bei 37°C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Nach einer Zellzahlbestimmung wurden die abgelösten Fibroblasten auf eine Zellzahl 2×10^6 Zellen / 300 µl TC199 eingestellt und resuspendiert. Danach erfolgte die Zugabe von 100 µCi ^{51}Cr mit einer 60minütigen Inkubation bei 37°C. Nach 30 min wurden die Zellsuspensionen durch vorsichtiges Schütteln resuspendiert. Nach dem Markierungsvorgang wurden die Zellen zweimal mit TC199 / 5% FCS gewaschen, um ungebundenes ^{51}Cr mittels FCS zu entfernen. Anschließend erfolgte wiederum eine Zellzahlbestimmung. Die Fibroblasten wurden danach mit DMEM / 5% FCS auf eine Konzentration 1×10^5 Zellen pro 96er Well eingestellt und standen damit für den Zytotoxizitätstest zur Verfügung.

2.2.10.4 Bestimmung des zytotoxischen Potentials humaner T-Zellen gegen murine Fibroblasten

Als Effektorzellen wurden unstimulierte, PHA-stimulierte und IL-2 aktivierte humane CD2⁺ T-Zellen eingesetzt. Als zusätzliche Kontrolle standen darüberhinaus humane CD95L⁺ 2B12- und CD95L⁻ pcDNA-Nierentumorzellen zur Verfügung, um so eine mögliche spezifische Wirkung der Apoptoseinduktion durch die CD95L/CD95-Interaktion im xenogenen Tiermodell näher zu untersuchen. Durch eine Zentrifugation (200 xg / 10 min) wurden die vereinzelt Zellen sedimentiert. Nach der Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität wurde eine Verdünnungsreihe der humanen Effektorzellen in DMEM / HEPES (7,5 ml HEPES auf 500 ml DMEM) vorgenommen, um so eine Kinetik der Lyse der murinen Zielzellen zu erlauben. Durch die Zugabe von je 100 µl einer Verdünnungsreihe mit abnehmender Konzentration der Effektorzellen (0,5 x 10⁶, 0,25 x 10⁶, 0,125 x 10⁶, 0,06 x 10⁶ Zellen) zu den vorgelegten 50 µl der murinen Zielzellen (10.000 Zellen) lagen die Zellen in einem Verhältnis von 50:1, 25:1, 12,5:1 und 6:1 vor. Es wurden jeweils 3 Proben pro Verdünnung eingesetzt, um so eventuelle Meßschwankungen durch Mittelwertbestimmung zu korrigieren. Die humanen Effektorzellen wurden mittels kurzer Zentrifugation auf die Targetzellen abgesenkt und die Ansätze anschließend für 4 h bei 37°C und 5% CO₂ Begasung inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen kurz aufgerüttelt (1 min) und kurz anzentrifugiert. Im Anschluß wurde durch die Zugabe von 50 µl einer 2% TritonX100 je Well (6 Wells) der Wert der Maximallyse ermittelt. Danach wurde die Platte wiederum aufgeschüttelt und anzentrifugiert. Im Anschluß daran wurden jeweils 25 µl der Überstände aus den 96er Wells entnommen und in eine gekennzeichnete Rundboden-Mikrotiterplatte, in der je 150 µl β-Szintillatorflüssigkeit vorlagen, überführt. Die restlichen Zellen wurden anschließend über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ Begasung inkubiert und nach einer zwanzigstündigen Inkubation nochmals untersucht. Die Rundbodenplatte (Überstände + β-Szintillatorflüssigkeit) wurde mit einer Folie abgeklebt, für 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt und danach gemessen. Durch den Vergleich von Spontanlyse (natürliche Freisetzung von ⁵¹Cr im Medium) und Maximallyse (50 µl einer 2% TritonX100 / H₂O Lösung) mit den spezifischen Lysewerten der humanen Lymphozyten und der CD95L⁺ 2B12-Zellen wurde die spezifische Freisetzung der ⁵¹Cr-Moleküle und damit das xenoreaktive, lytische Potential der humanen Zellen gegen die unterschiedlichen murinen Zielzellen ermittelt. Als Zielzellen fungierten murine Fibroblasten (C.B-17-*scid*, *SCID/Fas^{lpr}*-, *SCID/ICAM1*- und *SCID/ICAM1/Fas^{lpr}*-Mutanten) und Jurkat-Zellen.

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{(\text{cpm}_{\text{exp}} - \text{cpm}_{\text{spontan}})}{(\text{cpm}_{\text{max}} - \text{cpm}_{\text{spontan}})} \times 100$$

Der Wert cpm_{exp} der in den Ansätzen gemessenen Isotop-Freisetzung entsprach der durch die Effektorzellen induzierten Lyse der murinen Zielzellen. Die maximale ^{51}Cr -Freisetzung (cpm_{max}) entsprach der Aktivität des Überstands aus Ansätzen, in denen die Zielzellen durch das Detergenz TritonX100 vollständig lysiert wurden. Zur Bestimmung der Spontanfreisetzung ($\text{cpm}_{\text{spontan}}$) wurde der Überstand aus Ansätzen gemessen, in denen die Zielzellen nur mit Kulturmedium inkubiert wurden. Es wurden nur solche Versuche ausgewertet, in denen die Spontanfreisetzung bei maximal 20% der Maximallyse lag.

2.2.11 Stimulation von CD2^+ T-Zellen

Aus Buffy-coats isolierte CD2^+ T-Zellen wurden, abhängig von der Fragestellung, mit unterschiedlichen Reagenzien oder Fibroblasten stimuliert. Um die Zellen spezifisch mit Xenoantigenen zu aktivieren, wurden sie mit bestrahlten *scid*-Fibroblasten für 7 bis 21 Tage bei 37°C inkubiert. Für eine polyklonale Aktivierung der T-Zellen wurden diese in Anwesenheit von humanem IL-2 kultiviert.

2.2.11.1 Erzeugung von xenoreaktiven humanen CD2^+ T-Zellen

Für eine *in vitro* Aktivierung von humanen CD2^+ T-Zellen wurden xenogene murine Fibroblasten als Stimulatorzellen eingesetzt. Die murinen Fibroblasten wurden zweimal mit TC199 gewaschen. Für die *in vitro* Aktivierung von humanen T-Zellen wurden nur bestrahlte *scid*-Fibroblasten eingesetzt. Diese wurden von einer γ -Strahlenquelle mit einer Energie von 100 Gy bestrahlt. Nach erneutem Waschen wurden diese Zellen auf 2×10^6 Zellen/ml Kulturmedium eingestellt. Die isolierten humanen T-Zellen wurden auf eine entsprechende Konzentration eingestellt. Für die Kultur wurden die beiden Zelltypen in einem Verhältnis von 1 : 10 gemischt und in aufrecht stehenden 25 cm^2 Gewebekulturflaschen mit und ohne IL-2 Zugabe (20 U/ml) für sieben Tage im Brutschrank inkubiert. Nach drei bis vier Tagen wurde 1 ml der Kultur für eine durchflußzytometrische Analyse der humanen Zellen entnommen. Anschließend wurde frisches Kulturmedium mit IL-2 zugesetzt. Obwohl die Fibroblasten mit einer sehr hohen Dosis bestrahlt wurden, befanden sich nach 7 Tagen in der Fraktion der lebenden Zellen nur noch wenige murine Fibroblasten. Ansätze über einen

längeren Zeitraum (21 Tage) benötigten daher eine mehrmalige Zugabe von bestrahlten murinen Fibroblasten.

2.2.11.2 Aktivierung von schon im Spender aktivierten CD2⁺ T-Zellen

Zur Aktivierung von humanen Memory T-Zellen wurde IL-2 als Stimulus eingesetzt. Die CD2⁺ T-Zellen wurden für diese unspezifische Aktivierung in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml Kulturmedium eingesetzt. Das IL-2 wurde dabei in einer Konzentration von 20 U/ml supplementiert. Wie im vorherigen Abschnitt dargestellt, wurde wiederum ein Aliquot der humanen Zellen nach drei bis vier Tagen abgenommen und durch frisches Kulturmedium mit den entsprechenden Supplementen ersetzt, um danach durchflußzytometrisch analysiert zu werden. Wurden die aktivierten Zellen für weitere Zellkulturexperimente benötigt, erfolgte eine Isolierung der humanen Zellen aus diesen Kulturen durch eine Dichtegradientenzentrifugation. Insgesamt wurden die humanen CD2⁺ T-Zellen für maximal 21 Tage kultiviert, wobei bei jedem Medienwechsel IL-2 zugesetzt wurde.

2.2.12 Immunfärbungen

Zur Zelltypisierung von humanen Lymphozyten wurden im Rahmen dieses Projektes sowohl durchflußzytometrische als auch immunhistologische Färbungen (Morphologie) durchgeführt. Immunhistologische Färbungen muriner Gewebe mit monoklonalen Antikörpern (mAb) gegen humane Zellen erlauben Aussagen über Lymphozytensubpopulationen, Reifungs-, Aktivierungsstadien und Verteilungsmuster dieser Zellen. Der Nachweis der Primärantikörper erfolgte über mit Enzymen oder Fluorochrom-markierte Sekundär-Antikörper, die spezifisch an den Nachweisantikörper banden.

2.2.12.1 Anfertigung von Kryostatschnitten

Aus den SCIDHu-Versuchstieren entnommene Organproben wurden sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Überführung der Organproben zum Kryostaten erfolgte in flüssigem Stickstoff. Nach einer 10minütigen Inkubation im Kryostaten wurden die Organproben mit dem Einbettungsmedium (Tissue Tech, wasserlöslich) auf einer Unterlage fixiert und in die Vorrichtung am Messerblock eingespannt. Nach Vorbereitung der Objektträger wurden von den Organen jeweils 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Kryostatschnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.12.2 Anfertigung von Paraffinschnitten

Alternativ zur Anfertigung von Kryostatschnitten wurden aus den SCIDHu-Versuchstieren entnommene Organe in Formalin (5%) fixiert und für 24 h bei RT gelagert. Die fixierten Organe wurden 4 h gewässert, um anschließend über eine Alkoholreihe (2 x 1 h 70% Alkohol / 2 x 1 h 96% Alkohol/ 2 x 1 h 100% Alkohol/ 3 h Methylbenzoat/ 12 h Methylbenzoat) entwässert und durch Paraffin (6 h Paraffin/12 h Paraffin) ersetzt zu werden. Im Anschluß daran wurden die Organe in erwärmtes (maximal 60°C) Paraffin eingebettet. Nach Erkalten des Paraffinblockes wurden 4-7 µm dicke Schnitte bei Raumtemperatur angefertigt. Die Lagerung erfolgte abgedunkelt (Aluminiumfolie) bei Raumtemperatur.

2.2.12.3 Anfertigung von Zytospinpräparaten

Zur Herstellung von Zytospinpräparaten wurden Einzelzellsuspensionen der murinen Zielorgane der xGvH-erkrankten Versuchstiere genutzt. Die Proben wurden auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden 100 µl (2×10^5 Zellen) mit einer Zytospinzentrifuge (Zentrifugation: 800 rpm / 10 min) auf entfettete Objektträger gegeben und bei Raumtemperatur für mehrere Stunden getrocknet. Die Zytospinpräparate wurden anschließend in Aluminiumfolie verpackt und bei -20°C gelagert.

2.2.12.4 Trypanblau Vitalitätsfärbung

Die Grundlage dieser Färbung ist die fehlende Einlagerung des eindiffundierten Trypanblaufarbstoffes in den lebenden Zellen, da diese in der Lage sind, den Farbstoff wieder auszuscheiden und somit keine Blaufärbung zeigen.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Kammer. Zur Bestimmung der Zellvitalität der humanen Effektorzellen der Einzellzellsuspensionen wurden 50 µl der Zellen mit 50 µl Trypanblau (0,16%) vermischt. Im Gegensatz zu den lebenden Zellen schollen die toten Zellen durch das eindringende extrazelluläre Wasser an und zeigten eine deutliche blaue Färbung. Durch den Vergleich von lebenden zu toten Zellen wurde die Zellvitalität bestimmt.

2.2.12.5 Apoptosefärbung

Grundlage dieser Methode ist die DNA-Fragmentierung in apoptotischen Zellen. Die entstandenen nukleosomalen DNA-Fragmente werden durch die Terminal Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT-Enzym) erkannt. Das TdT-Enzym katalysiert den Einbau Digoxigenin-

markierter Nukleotide an die fragmentierte DNA. Der Nachweis der Apoptose erfolgt dann mittels anti-Digoxigenin-Antikörper, der mit dem Reporterenzym Peroxidase konjugiert ist.

Für die Apoptosefärbungen wurde das *in situ* Apoptose Detektions Kit (ApopTag Plus) von ONCOR genutzt. Alternativ wurde das *in situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein der Firma Boehringer eingesetzt. Hierbei erfolgt der Nachweis der DNA-Fragmentierung über einen Fluorescein Isothiocyanat gekoppelten Antikörper.

Die Kryostatschnitte wurden in neutral gepuffertem 10% Formalin für 10 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Kryostatschnitte zweimal mit 1 x PBS (pH 7,4) für je 5 min gewaschen. Ein Postfixierungsschritt in Ethanol/Essigsäure in einem Verhältnis von 2:1 für 5 min bei -20°C mit zweimaligem Waschen in PBS folgte. Als Positivkontrolle wurde ein mit DNaseI (100 ng/ml) vorbehandeltes (10 min bei 37°C) Präparat eingesetzt. Die endogene Peroxidaseaktivität wurde mittels 2% H₂O₂ / PBS für 5 min bei RT blockiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS erfolgte die direkte Zugabe von einem Tropfen Equilibrations-Puffer mit einer 10-15 sek Inkubation. Bei jedem Inkubationsschritt wurde das Präparat mit einem Plastik-Deckgläschen vorsichtig abgedeckt (geringere Volumina). Nach dem Entfernen des Equilibrations-Puffers erfolgte die Zugabe von 54 µl TdT-Enzympuffer (32 µl TdT-Enzym in 76 µl Reaktions-Puffer verdünnen) mit einer 1stündigen Inkubation bei 37°C in einer Feuchtkammer. Die Präparate wurden anschließend für 10 min bei RT in Stop-/Waschpuffer (1 ml Stop/Waschpuffer mit 34 ml Dest. Wasser verdünnen) gegeben. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die direkte Zugabe von zwei Tropfen Peroxidase-gekoppelten anti-Digoxigenin-Antikörper mit einer 30minütigen Inkubation bei RT in einer Feuchtkammer. Die Präparate wurden wiederum gewaschen und mit dem AEC-Substrat (500 µl AEC-Lösung in 7,5 ml 0,1 M NaAc (pH 5,2) lösen und mit 7,5 µl H₂O₂ komplettieren) für 10-20 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit VE-Wasser erfolgte die Gegenfärbung in Hämalaun. Die Präparate wurden zum Abschluß mit dem wässrigen Medium Kaiser's Glycerin-Gelatine eingebettet.

2.2.12.6 Immunhistologische Färbungen

Die immunhistologischen Färbungen wurden vorwiegend auf Kryostatschnitten verschiedener muriner Organe xGvH-erkrankter Versuchstiere durchgeführt. Die tiefgefrorenen Präparate wurden für 10 min in Aceton fixiert. Nach einer kurzen Phase, während der die Kryostatpräparate trockneten, wurden unspezifische Bindungen durch die Zugabe von GαM-Serum (1:10 in PBS verdünnt) oder alternativ durch BSA für 10 min / RT blockiert. Der

Primärantikörper (Dianova / Pharmingen) wurde anschließend in PBS auf die vom Hersteller empfohlene Verdünnung eingestellt. 50 bis 100 µl des Antikörpers wurden auf die Präparate gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Präparate zweimal in PBS gewaschen. Danach wurden die Objektträger vorsichtig getrocknet, ohne dabei das Gewebe zu beschädigen und austrocknen zu lassen. Die Zugabe von 50 bis 100 µl des sekundären enzymmarkierten Antikörpers erfolgte wiederum in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung (Dianova) für eine Dauer von einer Stunde bei RT in einer Feuchtkammer.

2.2.12.7 Nachweis mittels alkalischer Phosphatase

Bei dieser Färbemethode werden aus löslichen Phenolen und Diazoniumsalzen (Chromogen) unlösliche Azo-Farbstoffe gebildet. Zur Blockierung der endogenen alkalischen Phosphatase-Aktivität einiger Leukozyten in den Präparaten wurde 1 mM Levamisole (Sigma) der Substratlösung zugefügt. Der mit der alkalischen Phosphatase markierte Sekundärantikörper (Dianova) wurde für eine Stunde bei RT auf den Präparaten inkubiert. Nach zweimaligem Spülen mit PBS (jeweils 10 min) wurden die Präparate mit dem gefilterten, frisch angesetzten Fast Red Substrat für 5-20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Präparate mit destilliertem Wasser gespült und für 2 min in Hämalaun gegengefärbt. Weitere Spülschritte in VE-Wasser folgten. Die Präparate wurden anschließend in einem wässrigen Medium (Kaiser's Glycerin Gelatine) eingebettet.

2.2.12.8 Nachweis mittels Peroxidase

Die Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität wurde durch eine 10minütige Inkubation der Präparate in PBS / 2% H₂O₂ nach der Fixierung in Aceton erreicht. Nach der Inkubation des Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers wurden auf die mit PBS gespülten Präparate die AEC- oder DAB-Chromogenlösungen (Abschnitt 2.1.10, Substrate) gegeben. Die Präparate wurden anschließend für 5-15 Minuten mit der AEC-Lösung inkubiert und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Es folgte eine Gegenfärbung mit Hämalaun und das Einbetten mit Kaiser's Glycerin Gelatine. Alternativ wurden die Präparate mit einer DAB-Lösung für 3-10 Minuten inkubiert.

2.2.12.9 Nachweis proliferierender Zellen mittels BrdU-Einbau

Mit humanen Lymphozyten inokulierte C.B-17-*scid*-Versuchstiere erhielten nach der Diagnose einer letalen xGvHD-Reaktion 2 Stunden vor Rückgewinnung der humanen

Lymphozyten eine intraperitoneale Injektion von 1 mg BrdU (in 1 ml PBS gelöst / lichtempfindlich). Während dieser 2 Stunden konnten proliferierende Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklusses befanden, das BrdU in die DNA einbauen. Mit dieser Methode wurden proliferierende Zellen durchflußzytometrisch oder immunhistologisch nachgewiesen. Die intraperitoneale Injektion von 1 ml PBS / 1 mg BrdU nahm dabei keinen Einfluß auf das Migrationsverhalten humaner oder muriner Zellen. Der Nachweis des BrdU-Einbaus erfolgte auf Kryostatschnitten der murinen Zielgewebe zu verschiedenen festgelegten Zeitpunkten (Tag 3, 5, 7, 9, 11) und nach Ausbildung der xGvHD. Zur Unterscheidung von humanen und murinen Zellen wurden die humanen Zellen zusätzlich durch eine antiCD45LCA Färbung markiert. Proliferierende humane Zellen zeigten somit eine Doppelfärbung. Mögliche proliferierende murine Zellen wurden hingegen durch eine Rotfärbung des Zellkerns detektiert. Ruhende humane CD45⁺Zellen zeigten demgegenüber nur eine einfache Blaufärbung.

Die Fixierung der Kryostatschnitte erfolgte bei -20°C für 10 min mit einer -20°C gekühlten Aceton/Methanol-Mischung (1:1). Danach wurden diese mehrmals mit T-TBS gespült. Der anti-human CD45Antikörper wurde anschließend für 30 min auf das Präparat gegeben und bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Spülen in T-TBS wurden die Präparate mit dem Sekundärantikörper (alkalische Phosphatase) wiederum für 30 min in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach dem Spülen der Präparate (T-TBS) wurde das Fast Blue Substrat auf die Präparate gegeben und für maximal 30 min inkubiert. Nach dieser primären Färbung wurden die Präparate gründlich gespült. Anschließend erfolgte eine 30minütige Fixierung in 70% Ethanol mit Trocknung (ü.N./Ventilator 30 min). Die folgenden Schritte dienten der Denaturierung der Präparate. 190 ml Formamid (70°C) wurden mit 10 ml NaOH für genau 8 min in einem Wasserbad inkubiert. Die Präparate wurden anschließend für exakt 30 sek in diese Lösung getaucht. Im Anschluß daran folgte ein kurzer Spülgang in warmem T-TBS (70°C) und eine Inkubation in Formamid / 5% Trinatriumcitrat (0,15 mol) für 15 Minuten. Danach wurde die Reaktion mit eiskaltem T-TBS (10 min) gestoppt. Es folgte eine Fixierung der Präparate in 1% Formaldehyd (30 min / RT) und für 10 min in 0,2% Glutaraldehyd. Anschließend wurde der anti-BrdU-Antikörper auf die Präparate gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Im weiteren erfolgte der Nachweis des gebunden vorliegenden Primärantikörpers nach Spülen in T-TBS durch den Einsatz eines mit alkalischer Phosphatase konjugierten Sekundär-Antikörpers (30 min) mit anschließender Fast Red Substratfärbung. Die immunhistologischen Doppelfärbungen erfolgten in Zusammenarbeit mit der Abteilung für funktionelle und angewandte Anatomie der MHH.

2.2.13 Durchflußzytometrische Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen auf der Grundlage von Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften. Die Bindung spezifischer monoklonaler fluoreszenzmarkierter Antikörper an bestimmte Oberflächenstrukturen der Zellen erlauben den Nachweis von spezifischen Lymphozytenmarkern, anhand derer die Differenzierung, Reifung und Aktivierung dieser Zellen erkannt werden. Die durchflußzytometrischen FACS-Analysen erlauben somit einerseits den Nachweis möglicher Aktivierungsvorgänge humaner Zellen gegen diskordant murines Gewebe und andererseits eine sehr genaue Aufteilung in unterschiedliche Subpopulationen humaner Zellen, wie z.B. in aktivierte und unstimulierte Zellen.

2.2.13.1 Zweifarbenfluoreszenz

Die Expression von Oberflächenmolekülen des Inokulums (Tag 0) und aus xGvH-erkrankten Versuchstieren wiedergewonnenen humanen Effektorzellen wurde durchflußzytometrisch analysiert. Die humanen Zellen wurden hierfür mit direkt-markierten oder indirekt-markierten mAb (über Zweitreagenz) gefärbt. Es wurden $1 - 5 \times 10^6$ Zellen pro Ansatz in Rundbodenmikrotiterplatten gefärbt. Nach zweimaligem Waschen (Zentrifugation: 200 xg, 1 min, 4°C / Waschmedium: PBS + 0,5% BSA + 0,1% NaN₃) wurden die Zellen mit 20 µl Intraglobin (humanes ImmunglobulinG 10 mg/ml) resuspendiert und für 1 min unter Schütteln inkubiert. Das Intraglobin wurde dabei zum Abblocken von unspezifischen Antikörperbindungen an den Fc-Rezeptorbindungsstellen der Zellen verwendet. Zu dieser Zellsuspension wurde im Anschluß der spezifische mAb in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration pipettiert. Es folgte eine 15-30minütige Inkubation der abgedunkelten Ansätze auf Eis. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Proben im FACS-Waschmedium aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Die Messung erfolgte mit FACScan oder FACStar-Geräten. Mit dem Programm Consort30 und WinMDI (Version 2.8) wurden die erhaltenen Färbungen analysiert und ausgewertet.

2.2.14 Nachweis der humanen Effektormolekülexpression

2.2.14.1 Isolierung der Gesamt-Zell-mRNA nach Chomczynski

Die Gesamt-RNA Isolierung aus den wiedergewonnenen humanen Effektorzellen wurde nach der von Chomczynski et al. beschriebenen Methode durchgeführt (1987, *Analytical Biochemistry*, 162, 156). Alternativ erfolgte die mRNA-Isolation mit Hilfe des RNeasy Kits der Firma Qiagen gemäß Anleitung des Herstellers. Die Lagerung der mRNA erfolgte bei -80°C . Die Konzentration der mRNA wurde photometrisch durch die Extinktion bei 260 und 280 nm bestimmt. Dafür wurden 5 μl der mRNA 1:250 verdünnt und das Extinktionsspektrum zwischen 240-300 nm aufgenommen. Die Extinktion bei 260 nm ergibt die vorliegende RNA-Konzentration. Die Reinheit bzw. Verunreinigung der Proben wird aus dem Quotienten der Extinktionen von 260 zu 280 nm ermittelt.

2.2.14.2 Isolierung der Gesamt-Zell-mRNA mittels Tripure™ Isolationsreagenz

Die Tripure Reagenz erlaubte die Isolation von Gesamt RNA, DNA und Protein in einem Schritt. Diese Methode wurde in Anlehnung an die von Chomczynski beschriebene Isolationsmethode entwickelt und konnte sowohl für sehr geringe als auch für hohe Zellmengen genutzt werden. Während der Homogenisation bzw. Lyse der Proben wurden die Zellen durch die Zugabe von 500 μl Tripure Reagenz lysiert. Gleichzeitig wurden endogene Nukleasen denaturiert. Dieser Vorgang schützte die Integrität von RNA und DNA in den Proben. Nach der Zugabe von 200 μl Chloroform wurden die Proben sehr gut vermischt, 1 bis 5 min inkubiert, um anschließend zentrifugiert (12000 xg / 15 min) zu werden. Nach diesem Zentrifugationsschritt teilte sich die Lösung in drei Phasen. Die obere wässrige, farblose Phase enthielt die mRNA, die weißliche Interphase die DNA und die untere Schicht die rote organische Proteinphase. DNA und Protein der Inter- und der unteren Phase wurden entweder gelagert oder mittels Alkohol-Präzipitation wiedergewonnen. Nach dem vorsichtigen Abnehmen der oberen Phase und der Übertragung in ein vorbereitetes Eppendorfgefäß erfolgte nach Durchmischung mit 700 μl Isopropanol eine Präzipitation der RNA der farblosen Phase. Durch die Zugabe von Glykogen (1 μl / 350 μl Isopropanol) zu dem Isopropanol wurde eine verstärkte Fällung der RNA erreicht. Die Fällung erfolgte entweder für 5 – 10 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei -20°C . Nach einer weiteren Zentrifugation (12000 xg / 15 min) wurde der Überstand verworfen. Am Boden der eingesetzten Eppendorfgefäße zeigten sich deutliche RNA-Pellets. Nach dem Waschen dieser

Pellets mit eiskaltem 70% Ethanol (2x) und einmaligem Waschen mit absolutem Ethanol wurden die Pellets in RNase-freiem DEPC-Wasser aufgenommen und standen nach dem Umschreiben in cDNA für die weiteren Untersuchungen zur Verfügung.

2.2.14.3 Herstellung von cDNA-Proben mittels RT-PCR

Für die Amplifikation der mRNA-Transkripte mittels PCR mußte die Gesamt-Zell-mRNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Die Synthese erfolgte dabei durch das Reverse Transkriptase Enzym (Stratagene) in einem 50 µl Reaktionsansatz. Die cDNA-Synthese erfolgte nach Erhitzung der Gesamt-mRNA auf 95°C für 5 Minuten (Denaturierung) mit anschließender sofortiger Abkühlung auf Eis. Die RNA-Proben lagen nun einzelsträngig vor. Nach Zugabe der anderen Bestandteile des Reaktionsansatzes erfolgte der Start der cDNA-Synthese durch Zugabe der Reversen Transkriptase. Nach der einstündigen Inkubation bei 37°C wurde die Reverse Transkriptase durch eine 5minütige Inkubation bei 95°C inaktiviert.

Reaktionsansatz RT-PCR:	5 µg	Gesamt mRNA (in H ₂ O gelöst)
	3-5 µl	10 x cDNA-Puffer
	1 µl	Hexanukleotidpriming-Gemisch
	3 µl	dNTP's (je 10 mM)
	2 µl	Reverse Transkriptase (Stratagene)
	ad30-50 µl	ddH ₂ O

Um eine Kontamination durch DNA während der Polymerase-Ketten-Reaktion zu minimieren bzw. zu eliminieren, wurden die Proben mit 8-Methoxy-Psoralen (bindet an doppelsträngigen Nukleinsäuren) und langwelligem UV Licht (366 nm) vorbehandelt, wie von Meier et al. beschrieben [79].

2.2.14.4 Nachweis der spezifischen Expression von humanen CD95L, CD95, und verschiedenen Zytokinen mittels PCR

Für die PCR wurden Taq-Polymerasen von Qiagen und Stratagene eingesetzt. Das Enzym wird aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert und zeichnet sich durch hohe Temperaturbeständigkeit aus. Die cDNA wurde mit den jeweiligen spezifischen Primerpaaren untersucht. Die Sequenzen der Primer (Abschnitt 2.1.15) und der daraus resultierenden PCR-Produkte können aus Tabelle 2.5 und 2.7 entnommen werden. Die eingesetzten Primerpaare (sense/antisense) amplifizierten in der PCR humanspezifische Fragmente und zeigten keine Kreuzreaktivität mit murinen Sequenzen.

Tabelle 2.7: Auflistung der Primer, der humanspezifischen Amplifikationsprodukte und der jeweils eingesetzten Annealingtemperatur

Primerpaar	Amplifikationsprodukt	Annealingtemperatur
	in bp	in °C
GAPDH	452	55 bis 65
CD95Ligand	510	55 bis 59
Fas / CD95	292	59
TNF- α	421	60
Interferon- γ	501	60
Interleukin-2-Rezeptor	370	60 bis 62
Interleukin-2	462	60 bis 62
Interleukin-4	455	60 bis 62
CD69	800	55 ^a
Interleukin-10	575	60 bis 62
TGF- β	175	60 bis 62
Interleukin-1 α	380	60 bis 62
Aldolase A	464	55 bis 70

^a Protokoll nach Boles et al. [77], CD69 sense (RBC151) CD69 antisense (RBC130))

Es wurden je 5 μ l RT-Ansatz (Template) zu 25 μ l PCR-Mastermix pipettiert und zur Reaktion in einen Thermocycler überführt. Nach dem raschen Abkühlen auf 4°C erfolgte eine Auftrennung der entstandenen PCR-Fragmente in einem TAE-Agarosegel (2%).

Programm: 5 min Denaturierung bei 95°C
 30 Zyklen mit jeweils 1 min 95°C (Schmelzen der DNA)
 1 min Annealing bei 56-65°C je nach Primerpaar
 1 min 72°C (DNA-Polymerisation)
 5 min Polymerisation bei 72°C

Als Positivkontrolle für die CD95/CD95Ligand Expression wurde die cDNA humaner Transfektanten 293h95L (2B12), die von Schwitzer et al. erstellt wurden, genutzt [71]/[80]. Die 2B12-Zelllinie zeichnet sich durch eine stabile, erhöhte Expression des humanen CD95Liganden aus. Eine CD95L⁻ Transfektante (pcDNA) stand als Negativkontrolle zur Verfügung.

2.2.15 TCR V β -Repertoire-Analyse

Die humanen T-Zellen zeichnen sich durch die Expression des T-Zellrezeptors (TCR) mit einer spezifischen funktionellen Reaktivität gegen MHC-Moleküle, die prozessierte Antigene (Peptide) spezifischer Länge präsentieren, aus. Das TCR-Molekül ist ein Heterodimer und setzt sich aus einer α - und β -Kette oder einer δ - und γ -Kette zusammen. Die Ligandenspezifität wird dabei durch die am Aufbau der Ketten beteiligten Gensegmente determiniert. Das genutzte diskordante SCIDHu-Tiermodell ermöglicht die Untersuchung der Veränderung des TCR V β -Repertoires xenoreaktiver T-Zellen in verschiedenen Organen der Versuchstiere.

Aus xGvH-erkrankten Versuchstieren wurden die humanen Effektorzellen wiedergewonnen. Nach der Isolierung der Gesamt-mRNA (Abschnitt: 2.2.14.1) und der Umschreibung der mRNA in cDNA (Absatz: 2.2.14.3) wurden TCR V β -spezifische Primersequenzen genutzt, um Veränderungen, z.B. Expansionen von bestimmten T-Zellen mit einem bestimmten TCR-Molekül, nachzuweisen. Die TCR V β -Repertoire-Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. J. Hundrieser (Transplantationslabor der MHH).

2.2.15.1 PCR mit V β spezifischen Primern

Die Amplifikation der V β cDNA erfolgte durch den Einsatz von V β -spezifischen Oligonukleotidsequenzen aus 20 bekannten V β -Familien. Die V β -familienspezifischen Primer wurden basierend auf von Choi et al. [81], von Porcelli et al. [82] und von Ferradini et al. [83] beschriebenen Sequenzen konstruiert. Für die Analyse des TCR V β -Repertoires wurde die cDNA mit den anderen PCR-Komponenten zusammengeführt. Die V β -familienspezifischen Primer wurden in den PCR-Gefäßen aufgeteilt. Die Amplifikation der V β -Transkripte erfolgte über 25 Zyklen. Unter diesen Bedingungen war die Menge der verschiedenen TCR V β -Amplifikationsprodukte proportional zu den im Ansatz vorliegenden V β -spezifischen mRNA-Transkripten. Die Differenzierung der V β -Familien erfolgte über die V β -spezifischen, stromaufwärts bindenden Primer. Gleichzeitig wurde in jedem Ansatz mit C α -spezifischen Primern ein Fragment des konstanten Bereichs der TCR α -Kette ko-amplifiziert. Nach der Applikation der Amplifikationsprodukte auf Nylonmembranen mittels einer Dot-Blot Vorrichtung wurden Duplikate mit radioaktiv markierten invarianten Oligonukleotidsequenzen der α - und β -Kette hybridisiert. Die nach dem stringenten Waschen verbleibende Radioaktivität wurde mit Hilfe eines Phospho-Imagers detektiert. Für die Bestimmung der

relativen Expression wurde für jeden Ansatz die V β -gebundene Radioaktivität für die C α -gebundene Radioaktivität normalisiert.

2.2.15.2 Analyse der CDR3 Längendiversität

Die Darstellung der CDR3 Längendiversität, auch Spektratypen genannt, erfolgte mit dem Ausgangsmaterial der nach 25 Amplifikationszyklen generierten V β PCR-Fragmente, die durch eine Reamplifikation markiert wurden. Hierzu wurde der stromabwärts bindende Primer mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP und Polynukleotidkinase endmarkiert. Jeder 10 μl umfassende Ansatz enthielt 2 μl der V β Amplifikationsprodukte, radioaktiv markierte Primer ($1-2 \times 10^4$ cpm) sowie die übrigen PCR-Komponenten. Nach 5 Amplifikationszyklen wurden die markierten PCR-Produkte hitzedenaturiert und in einem Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Hierbei wurden die V β -(N) $_n$ -D β (N) $_m$ -J β C β Produkte separiert. Die resultierenden Spektratyp-Muster zeigten bis zu 8 distinkte Banden mit einem Längenunterschied von 3bp bzw. einer Aminosäure an.

2.2.16 Übersicht der durchgeführten Untersuchungen

Die Ausbildung der xenogenen Graft-versus-Host-Erkrankung wurde genutzt, um die Xenoreaktivität einzelner humaner T-Zellsubpopulationen bei der T-Zell-vermittelten Abstoßungsreaktion zu analysieren. Die folgende Übersicht der verschiedenen Untersuchungsebenen soll hierbei die Bedeutung der einzelnen *in vivo* und *in vitro* Testsysteme aufzeigen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durchflußzytometrische und immunhistologische Analysen der humanen T-Zellen im Verlauf der xGvHD durchgeführt, also zu Zeitpunkten, an denen keine phänotypischen Merkmale der Immunreaktion beobachtet wurden. Darüberhinaus wurde in dieser frühen Induktionsphase die Expression von murinen Adhäsionsmolekülen, wie ICAM1 und P-Selektin, analysiert. Nach Ausbildung der xGvHD und der Ausprägung typischer Krankheitssymptome wurden die xenoreaktiven humanen T-Zellen aus verschiedenen murinen Kompartimenten wiedergewonnen und durchflußzytometrisch und immunhistologisch untersucht. Dabei stand besonders die Expressionsanalyse von Molekülen der späten Effektorphase, wie Zytokinen, CD95L und CD95, im Vordergrund. Durch den Einsatz von *SCID/ICAM1*-, *SCID/P-Selektin*-KO-Mutanten und *SCID/Fas^{lpr}*-Mutanten konnte der Einfluß dieser Moleküle und deren Verlust auf die Induktion der Abstoßungsreaktion

sowohl durch *in vivo*-Testungen als auch durch *in vitro* ^{51}Cr -Freisetzungstests untersucht werden. Ein Schema der durchzuführenden Arbeiten ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

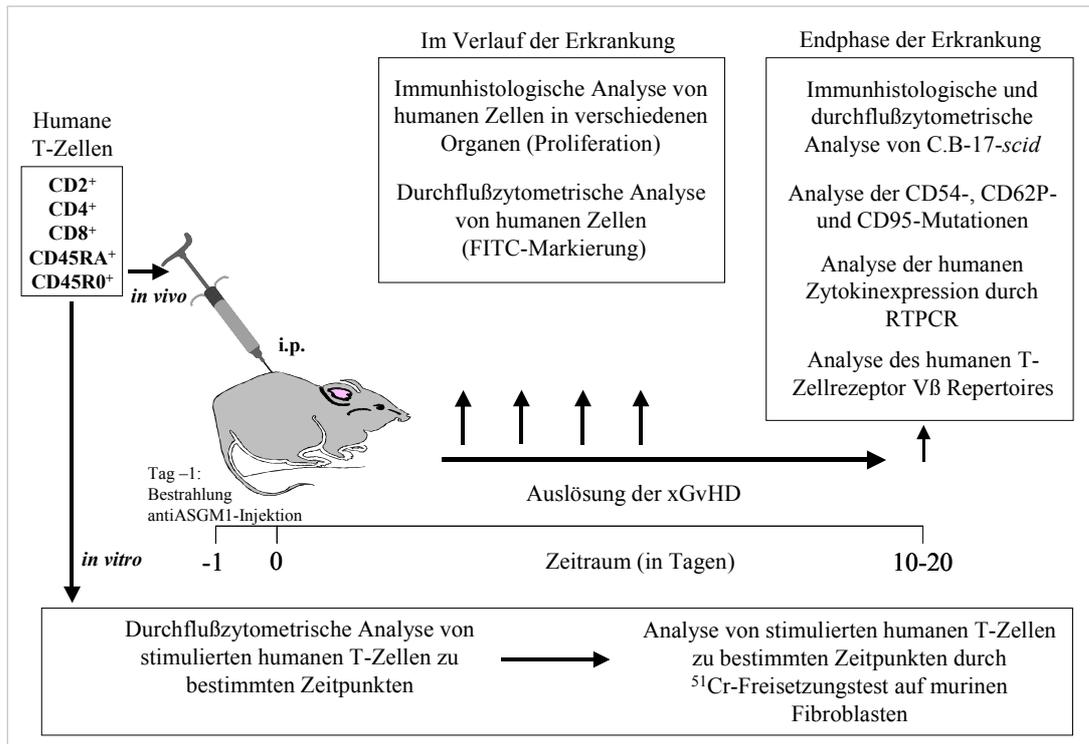


Abbildung 2.1: Übersichtsschema der *in vivo* und *in vitro* Experimente

Das C.B-17-*scid*-Tiermodell ist die Grundlage der Inokulationsexperimente mit den humanen T-Zellen. Darüberhinaus geben murine Fibroblasten von *scid*-knock-out-Mutanten zusätzlich die Möglichkeit, Interaktionen humaner und muriner Moleküle durch *in vitro* Experimente zu untersuchen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der *scid*-Maus vor und nach Inokulation humaner Zellen

Die *scid*-Versuchstiere wurden vor den Experimenten auf den erfüllten Status der Immundefizienz überprüft. Hierbei wurde der IgM/IgG-Titer der *scid*-Mäuse als Kriterium genutzt, diese in immundefiziente Versuchstiere (non-leaky) und Versuchstiere mit Antikörperexpression (leaky) einzuteilen. Für die Inokulationsexperimente mit humanen Lymphozyten wurden nur immundefiziente *scid*-Mäuse in einem Alter von 6-12 Wochen eingesetzt. Die C.B-17-*scid*-Versuchstiere wurden 24 h vor der intraperitonealen Injektion von 5×10^7 CD4⁺ humanen T-Zellen mit antiASGM1 und einer subletalen Bestrahlung (3Gy) vorbehandelt. Die Bestrahlung führte bei den verbliebenen murinen Abwehrzellen zu einer Verringerung des Teilungspotentials ohne die Stammzellen des Knochenmarks zu zerstören.

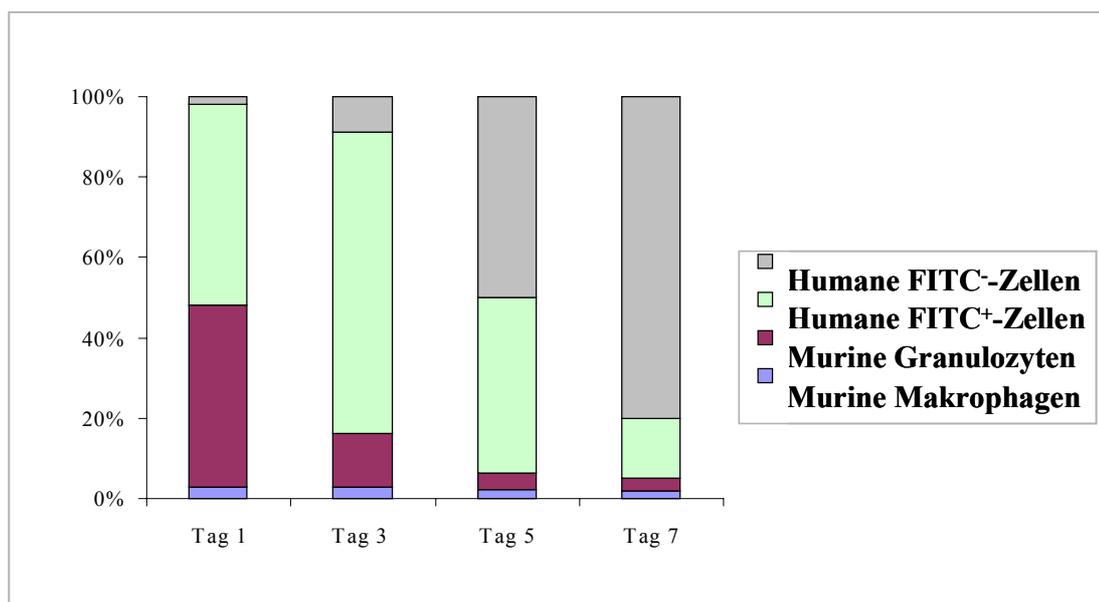


Abbildung 3.1: Nach der intraperitonealen Inokulation humaner Lymphozyten wurde innerhalb von 24 h eine verstärkte Migration muriner Granulozyten an den Applikationsort beobachtet. Im Verlauf von 7 Tagen fiel der relative Anteil der murinen Granulozyten (Antikörper Ly6G) von über 40% auf knapp 3% am Tag 7. Der Anteil muriner Makrophagen (Antikörper F4/80) blieb über den Untersuchungszeitraum am Applikationsort beständig bei 2-3%. Während der relative Anteil unmarkierter humaner Zellen im Verlauf von 7 Tagen stieg, fiel der Anteil der inokulierten humanen FITC⁺ Zellen. (Schematische Darstellung durchflußzytometrischer Messungen)

Die Zugabe des anti-Maus NK-Zellantikörpers (antiASGM1) führte zu einer *in vivo* Depletion der murinen NK-Zellen durch Komplement-Lyse. In den *scid*-Versuchstieren lagen danach noch Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen der unspezifischen murinen Immunabwehr vor, die einen Einfluß auf die inokulierten humanen Zellen nehmen konnten. Nach der intraperitonealen Injektion von 5×10^7 CD4⁺ humanen T-Zellen wurde innerhalb von 24 h eine verstärkte Migration muriner Granulozyten an den Applikationsort beobachtet (Abbildung 3.1). Im Verlauf der xenogenen Graft-versus-Host-Erkrankung (xGvHD) fiel der relative Anteil dieser murinen Abwehrzellen in der Bauchhöhle jedoch von 50% auf knapp 3% ab, während der Anteil unmarkierter humaner Zellen in diesem Zeitrahmen auf über 80% anstieg (Abbildungen 3.1 und 3.7).

Um die Frage zu klären, ob neben der Anreicherung aktivierter humaner Zellen in den murinen Lymphknoten in diesen lymphatischen Geweben auch eine Aktivierung muriner Zellen, wie Makrophagen, dendritische Zellen oder Endothelzellen zu beobachten war, wurden immunhistologische Untersuchungen zu verschiedenen standardisierten Zeitpunkten nach Inokulation humaner Zellen durchgeführt. Als kennzeichnendes Markermolekül für Aktivierungsvorgänge wurde die Expression des murinen ICAM1 hierbei untersucht. Die Mesenterial-Lymphknoten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 5, 7, 11) und bei Ausbildung der xGvHD (Tag 13) aus den *scid*-Versuchstieren entnommen und immunhistologisch gefärbt (Abbildungen 3.2 und 3.8D,F).

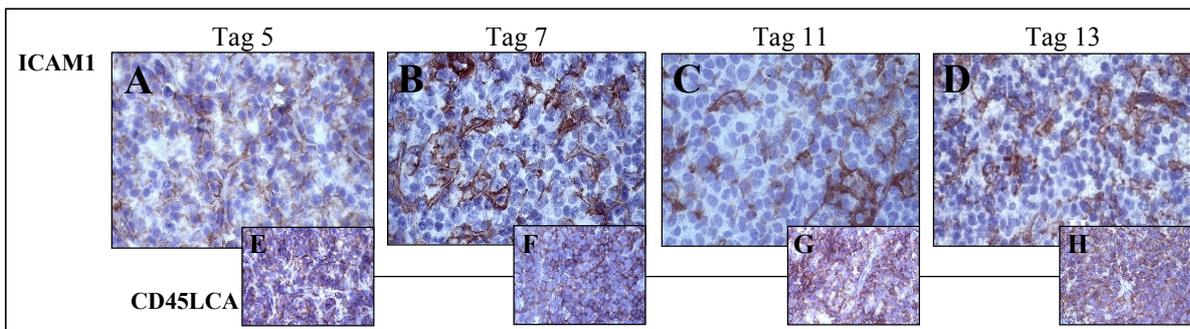


Abbildung 3.2: Immunhistologische Färbung ICAM1⁺ muriner Zellen nach Inokulation humaner Zellen führte zum Nachweis muriner dendritischer Zellen in den Mesenterial-Lymphknoten im gesamten Verlauf der xGvHD. A-D) Murine ICAM1-Färbung durch Ratte-anti-Maus mAb in den Mesenterial-Lymphknoten im Verlauf der xGvHD. Eine Verstärkung des Signals wies auf eine Erhöhung der ICAM1-Expression hin, die besonders deutlich am Tag 7 nach Inokulation ausgeprägt war (B). E-H) Es wurde in allen Präparaten eine starke Infiltration humaner CD45LCA⁺ Zellen mittels anti-Human CD45 mAb nachgewiesen. (Vergrößerung: 312,5x)

Der Nachweis der humanen $CD45LCA^+$ Zellen in den untersuchten Kryostatschnitten zeigte, daß innerhalb von 5 Tagen nach Inokulation eine starke Einwanderung der humanen Zellen erfolgte (Abbildung 3.2 E). Im Verlauf der xGvHD wurde ein gleichbleibend hoher Anteil (Abbildung 3.2 F-H) der humanen Zellen nachgewiesen. Die $ICAM1^+$ -Färbung (Abbildung 3.2 A-D) wies in allen Präparaten einen relativ gleichbleibenden Anteil muriner Zellen nach. Nach 7 Tagen wurde jedoch zusätzlich durch die erhöhte Intensität der Färbung eine deutliche Zunahme der murinen $ICAM1$ -Expression festgestellt. Aufgrund der Morphologie der $ICAM1^+$ murinen Zellen lag es nahe, daß es sich um dendritische Zellen (DC) handelte. Diese Zellen besitzen bei der Präsentation von Antigenen und bei der Aktivierung von T-Zellen eine entscheidende Rolle. Ob diese murinen APC den humanen T-Zellen murine Antigene präsentierten, konnte nicht abschließend geklärt werden.

Die Ausbildung der xenogenen Graft-versus-Host-Erkrankung (xGvHD) in den *scid*-Versuchstieren war mit typischen Allgemeinerscheinungen verbunden. Nach der Vorbehandlung der Versuchstiere (subletale Bestrahlung 3 Gy/antiASGM1-Zugabe) und der Injektion humaner Lymphozyten wurde zunächst bei allen Mäusen ein starker Gewichtsverlust beobachtet. Eine Erklärung hierfür stellt sehr wahrscheinlich eine akute Entzündungsreaktion innerhalb der ersten Tage am Applikationsort dar, bei der die murinen Granulozyten eine wichtige Rolle spielten (Abbildung 3.1).

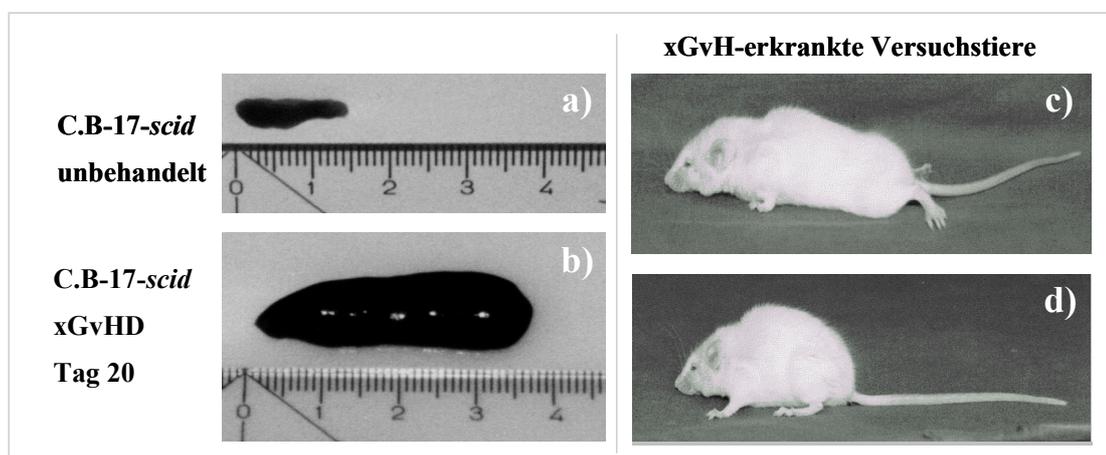


Abbildung 3.3: Nach Ausbildung der xGvHD durch die Inokulation der humanen Lymphozyten zeigten alle *scid*-Versuchstiere eine Splenomegalie und deutliche Runting-Symptome. Die Inokulation von 5×10^7 humanen $CD4^+$ T-Zellen induzierte in den *scid*-Versuchstieren eine letal verlaufende xGvHD. Im Vergleich zu unbehandelten Mäusen (a) zeigten xGvH-erkrankte Versuchstiere (c und d) nach 20 Tagen neben den charakteristischen Symptomen eine deutliche Milzvergrößerung (b).

Hinweise für diese Reaktion wurden phänotypisch über Rötungen und Schwellungen im Bauchraum von Versuchstieren, die zu frühen Zeitpunkten analysiert wurden, beobachtet. Im Verlauf der xGvHD entwickelten die Versuchstiere innerhalb von 2 bis 3 Wochen weitere typische Krankheitssymptome einer Auszehrung (Kachexie) durch verminderte Nahrungsaufnahme, die auch als Runting-Symptome bezeichnet werden. Phänotypische Merkmale hierbei waren gesträubtes Haarkleid, Buckelbildung und deutlicher Gewichtsverlust (Abbildung 3.3c,d). Darüberhinaus zeigten die Versuchstiere in dieser späten Phase der xGvHD alle Merkmale einer Kachexie, die zuerst durch heftiges Muskelzittern (Hypothermie) und später mit Teilnahmslosigkeit und flacher, oberflächlicher und unregelmäßiger Atmung einherging. Makroskopisch wurde in allen Versuchstieren eine Vergrößerung der Milz (Splenomegalie) gefunden (Abbildung 3.3b). Dabei fielen häufig schon makroskopisch sichtbare, mehrere 1-5 mm große Schwellungen oder Knötchen auf, die sehr wahrscheinlich Kolonien blutbildender Zellen entsprachen und als Begleiterscheinung der Kachexie auftraten. Eine Ursache für die Entwicklung dieser Kolonien war in der subletalen Bestrahlung zu sehen, die zu einer begrenzten Beschädigung der hämatopoetischen murinen Organe führte. Im Vergleich zu allogenen Transplantationssystemen wurden in diesem Tiermodell keine pathologischen Veränderungen des Darmtraktes oder der Haut als prominente Symptome beobachtet.

3.2 Induktion einer letalen Graft-versus-Host-Erkrankung durch Inokulation humaner Lymphozyten

Zunächst sollte die Frage untersucht werden, ob die aus Blutspenderproben, sogenannten Buffy-coats, und Milzzellen gewonnenen humanen peripheren Blut-Lymphozyten (PBL) in der Lage waren, eine Immunreaktion gegen murines Gewebe in den *scid*-Versuchstieren zu induzieren. Hierfür wurden die humanen Lymphozyten von den Erythrozyten durch eine Dichtegradientenzentrifugation getrennt.

Die Inokulation der humanen Blut-Lymphozyten löste in den *scid*-Mäusen eine xenogene Graft-versus-Host-Erkrankung (xGvHD) mit den schon beschriebenen phänotypischen Merkmalen aus. Die C.B-17-*scid*-Versuchstiere entwickelten diese charakteristische Krankheits-Symptomatik in allen durchgeführten Experimenten. Die ersten typischen Anzeichen einer xGvHD manifestierten sich nach 8 bis 10 Tagen. Die erkrankten

Versuchstiere wurden nach Ausbildung einer xGvH-Erkrankung (Beobachtungszeitraum von 8-30 Tagen) in Ether narkotisiert und getötet. Die wiedergewonnenen humanen Zellen wurden in Zellsuspensionen durchflußzytometrisch analysiert. Zusätzlich wurden die humanen Zellen und deren Verteilungsmuster im murinen Gewebe immunhistologisch untersucht.

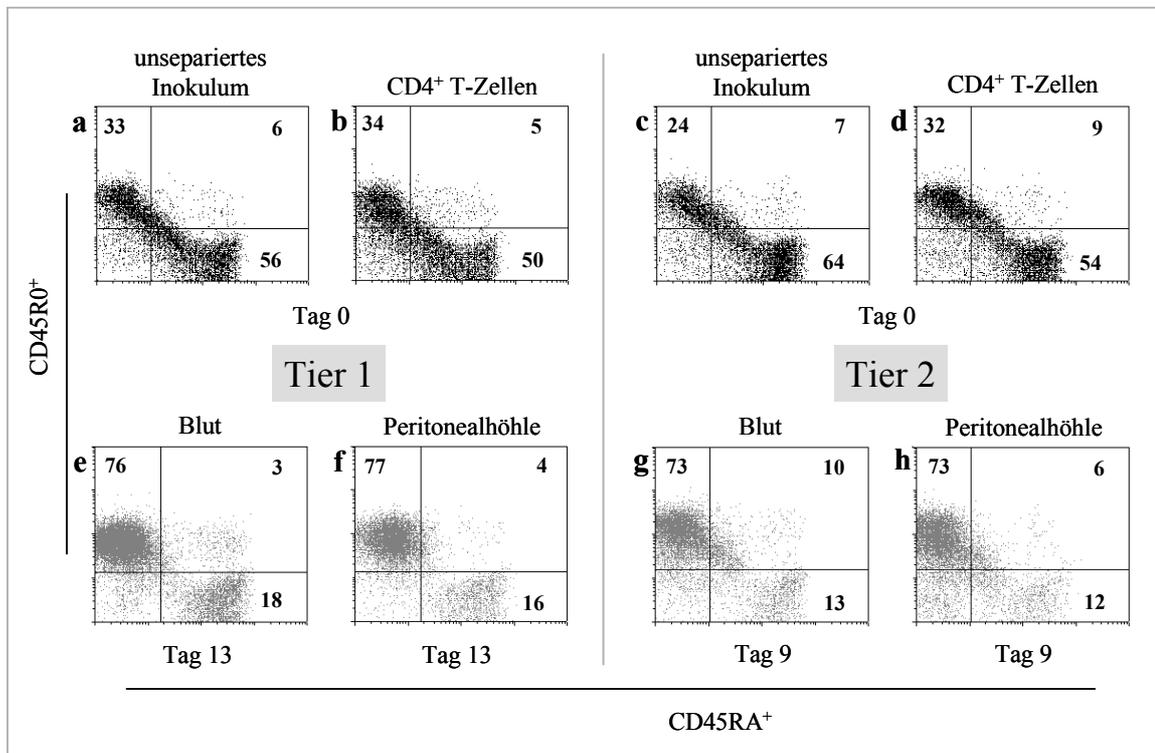


Abbildung 3.4: Anreicherung aktivierter humaner CD45R0⁺ Zellen im Blut und Bauchhöhle xGvH-erkrankter *scid*-Versuchstiere. Die Inokulation von 5×10^7 CD4⁺ humanen Zellen löste in den Versuchstieren nach 9 bzw. 13 Tagen eine xenogene Graft-versus-Host-Erkrankung aus. Die aus dem Blut (e, g) und der Peritonealhöhle (f, h) der Versuchstiere wiedergewonnenen humanen Effektorzellen zeigten im Vergleich zu den eingesetzten Inokula (a bis d) einen Wechsel der CD45-Isoformexpression von CD45RA⁺ zu CD45R0⁺. In den Quadranten sind die prozentualen Anteile der humanen CD45RA⁺, CD45R0⁺ und doppelt-positiven Zellen vermerkt.

In den xGvH-erkrankten *scid*-Versuchstieren wurden hohe Anteile aktivierter humaner CD45R0⁺ Zellen in allen untersuchten Organen, wie Leber, Milz, Lunge und Lymphknoten, nachgewiesen. Im Blut und Peritonealhöhle der Versuchstiere waren über 70% der Lymphozyten durch eine CD45R0⁺ Expression gekennzeichnet (Abbildung 3.4e-h). Neben dem durchflußzytometrischen Nachweis humaner Zellen in den erstellten Einzelzellsuspensionen verschiedener Organe, wurden starke Infiltrationen humaner Zellen in den Geweben der Leber, Niere und Lunge auch immunhistologisch nachgewiesen (Abbildung 3.8A). Weiterhin wurden starke Infiltrationen humaner Zellen und im Vergleich zu

unbehandelten Versuchstieren eine Größenzunahme in die lymphatischen sekundären Gewebe, wie Milz und mesenterialen und axiliaren Lymphknoten, nachgewiesen (Abbildungen 3.2 E-H, 3.7 und 3.8D). Die humanen Zellen zeigten neben einer verstärkten Anheftung an die Gefäßwände eine gleichmäßige Verteilung im gesamten Gewebe der untersuchten Organe.

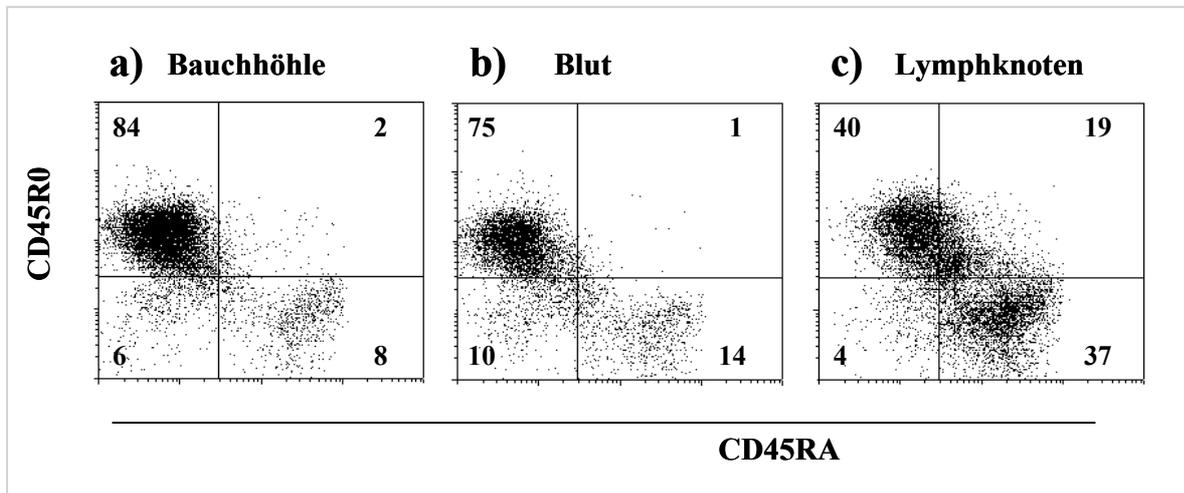


Abbildung 3.5: Exemplarische Darstellung der differentiellen Expression der CD45-Isoformen in verschiedenen murinen Organen. Das Versuchstier, aus dem die Proben stammten, zeigte zum Zeitpunkt der Organentnahme (Tag 12) eine deutlich ausgeprägte xGvHD. Ein erhöhter Anteil von CD45RA⁺ und doppelt-positiven CD45RA⁺R0⁺ Zellen im Vergleich zur Peritonealhöhle und dem Blut wurde in den Lymphknoten nachgewiesen. In den Quadranten sind die prozentualen Anteile der humanen CD45RA⁺, CD45R0⁺ und doppelt-positiven Zellen vermerkt.

Durch den Vergleich der Expressionsmuster einzelner Markermoleküle, wie der CD45-Isoform, der wiedergewonnenen humanen Zellen konnten einzelne humane Zellsubpopulationen untersucht werden. Bei der Untersuchung verschiedener Organe der *scid*-Versuchstiere zeigten sich in lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben verschieden hohe relative Anteile humaner CD45RA⁺ Zellen (Abbildung 3.5). Die Unterschiede im Verteilungsmuster von CD45RA⁺ und CD45R0⁺ Zellen wurden dabei in der überwiegenden Anzahl der *scid*-Versuchstiere beobachtet. Der Nachweis eines erhöhten Anteils naiver humaner CD45RA⁺ Zellen in den lymphatischen Geweben bei Ausbildung der xGvHD konnte zu einem Teil durch eingewanderte B-Zellen erklärt werden. Die B-Zellen waren dabei durch eine sehr hohe Expression der CD45RA⁺-Isoform gekennzeichnet (Abbildung 3.9). Weitere Untersuchungen zeigten in allen untersuchten Kompartimenten der Versuchstiere (n=15) innerhalb von maximal 20 Tagen eine Anreicherung aktivierter T-Zellen mit einem Wechsel der CD45 Isoformexpression von CD45RA⁺ zu CD45R0⁺, wie durch FITC-Markierungsexperimente belegt wurde (Abbildungen 3.4 und 3.6). Im Vergleich zu den nicht-

lymphatischen Geweben, wie Lunge und Peritonealhöhle, wurde in murinen Lymphknoten ein höherer Anteil von $CD45RA^+$ (2,5fach) und $CD45RA^+R0^+$ humaner Zellen nachgewiesen. Bei diesen Zellen handelte es sich sowohl um B-Zellen als auch um naive T-Zellen (Abbildung 3.9).

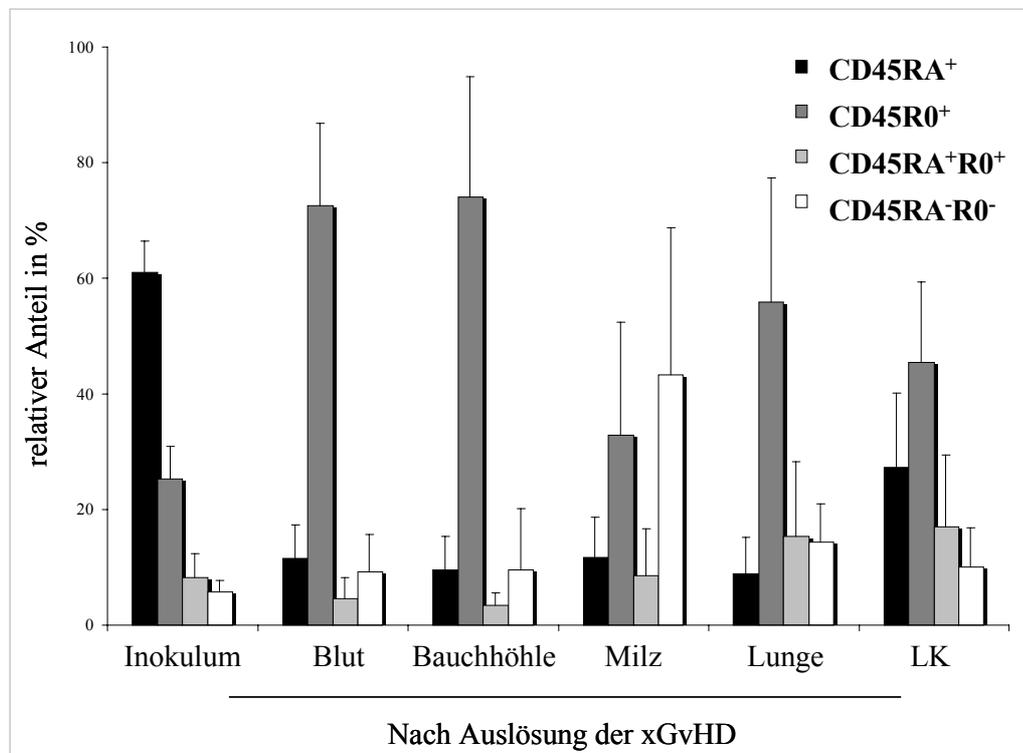


Abbildung 3.6: Präferentielle Verteilung der aktivierten humanen $CD45R0^+$ Zellen im Vergleich mit den Inokula in lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben xGvH-erkrankter *scid*-Versuchstiere (n=15). Es wurden Unterschiede im Verteilungsmuster von naiven $CD45RA^+$ und aktivierten $CD45R0^+$ Zellen in den untersuchten Organen xGvH-erkrankter Versuchstiere nachgewiesen. Die wiedergewonnenen humanen Zellen wurden durchflußzytometrisch analysiert. Die Zellen wurden mit $CD45RA$ - und $CD45R0$ -Antikörpern nachgewiesen. Alle Versuchstiere (n=15) erkrankten innerhalb von 20 Tagen. (Schematische Darstellung durchflußzytometrischer Messungen)

Der hohe, relative Anteil $CD45RA^+R0^-$ Zellen in den untersuchten Milzen der *scid*-Versuchstiere konnte durch starke Proliferationsvorgänge muriner Granulozyten erklärt werden (Abbildung 3.13, am Beispiel der Milz). Die differentielle Verteilung der humanen Zellen in den verschiedenen murinen Organen der *scid*-Versuchstiere war besonders ausgeprägt zwischen den aus Peritonealhöhlen und Mesenterial-Lymphknoten wiedergewonnenen humanen T-Zellen (Abbildungen 3.4, 3.5 und 3.7). Weitere Erklärungen für diese Unterschiede im Verteilungsmuster der humanen Zellen könnten auch in Proliferationsvorgängen und dem Tod einzelner Subpopulationen liegen.

Das Verhältnis von humanen B-Zellen zu T-Zellen von 1 : 4 in den Mesenterial-Lymphknoten und von 1 : 40 in der Bauchhöhle und dem Blut zeigte, daß die humanen B-Zellen, ebenso wie die naiven T-Zellen, durch eine präferentielle Einwanderung, durch eine filtrierende Wirkung der lymphatischen Gewebe oder durch Proliferationsvorgänge angereichert wurden.

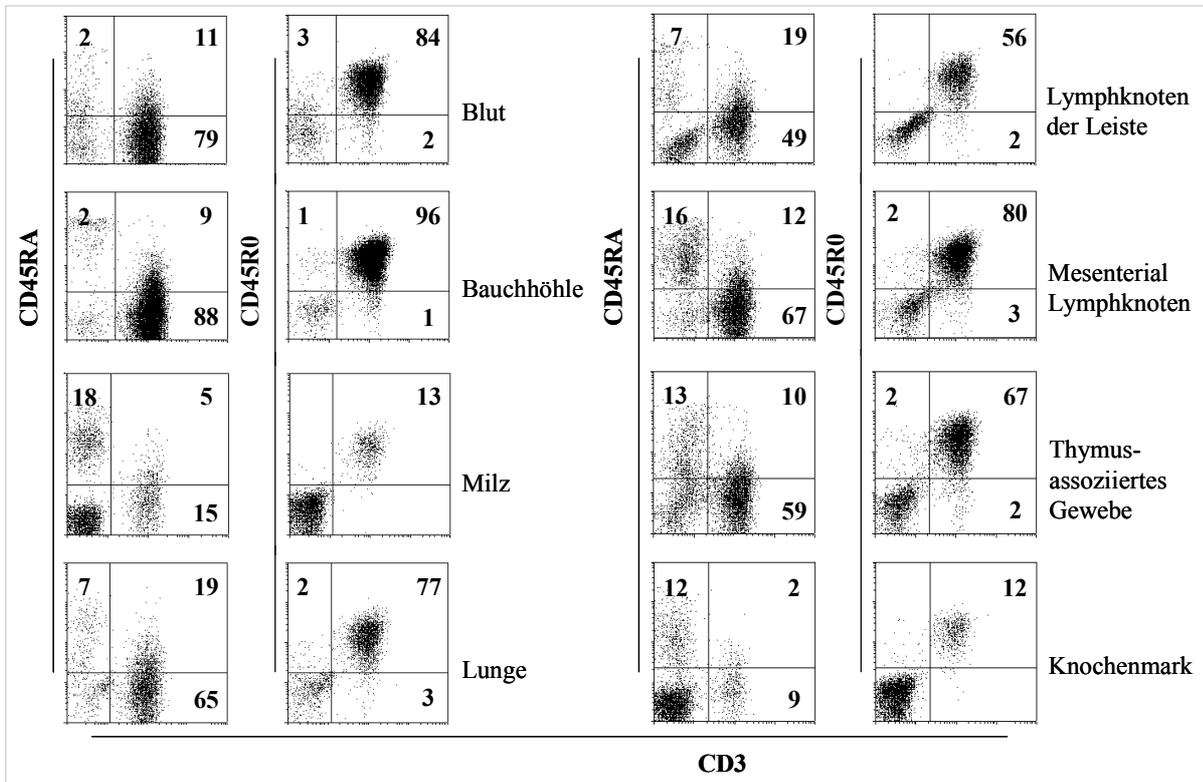


Abbildung 3.7: Analyse humaner T-Zellen aus verschiedenen Zielorganen eines xGvH-erkrankten *scid*-Versuchstiers nach 15 Tagen zeigte in allen Organen eine erhöhte Expression der CD45R0⁺-Isoform. In allen untersuchten Kompartimenten wurde gezeigt, daß die CD45R0⁺ Zellen fast ausschließlich durch eine CD3⁺ Expression gekennzeichnet waren. Bei den vorwiegend in den lymphatischen Organen gezeigten CD3⁺CD45RA⁺ Zellen handelte es sich um B-Zellen. Das C.B-17-*scid*-Versuchstier zeigte zum Zeitpunkt der Rückgewinnung (Tag 15) der humanen Zellen ausgeprägte xGvH-Krankheitssymptome. In den Quadranten sind die prozentualen Anteile der humanen CD3⁺CD45RA⁺, CD3⁺CD45R0⁺ und doppelt-positiven Zellen vermerkt.

Ob die in die murinen Organe migrierten humanen Zellen durch einen aktivierten Status gekennzeichnet waren, sollte zusätzlich zu den durchflußzytometrischen Analysen auch durch die Expression des IL-2 Rezeptors (CD25-Rezeptor) immunhistologisch in Leber und Mesenterial-Lymphknoten xGvH-erkrankter *scid*-Versuchstiere untersucht werden. Wie aus Abbildung 3.8 ersichtlich, wurden sehr deutliche Infiltrationen und Migrationen humaner CD45LCA⁺ Zellen an den Gefäßwänden der Leber (Abbildung 3.8A) sowie im gesamten Gewebe der Mesenterial-Lymphknoten (Abbildung 3.8D) gefunden. Im Vergleich hierzu

zeigte sich bei der Anfärbung der CD25⁺ Zellen, daß nur einige Zellen durch eine IL-2-Rezeptorexpression gekennzeichnet waren (Abbildung 3.8B/E).

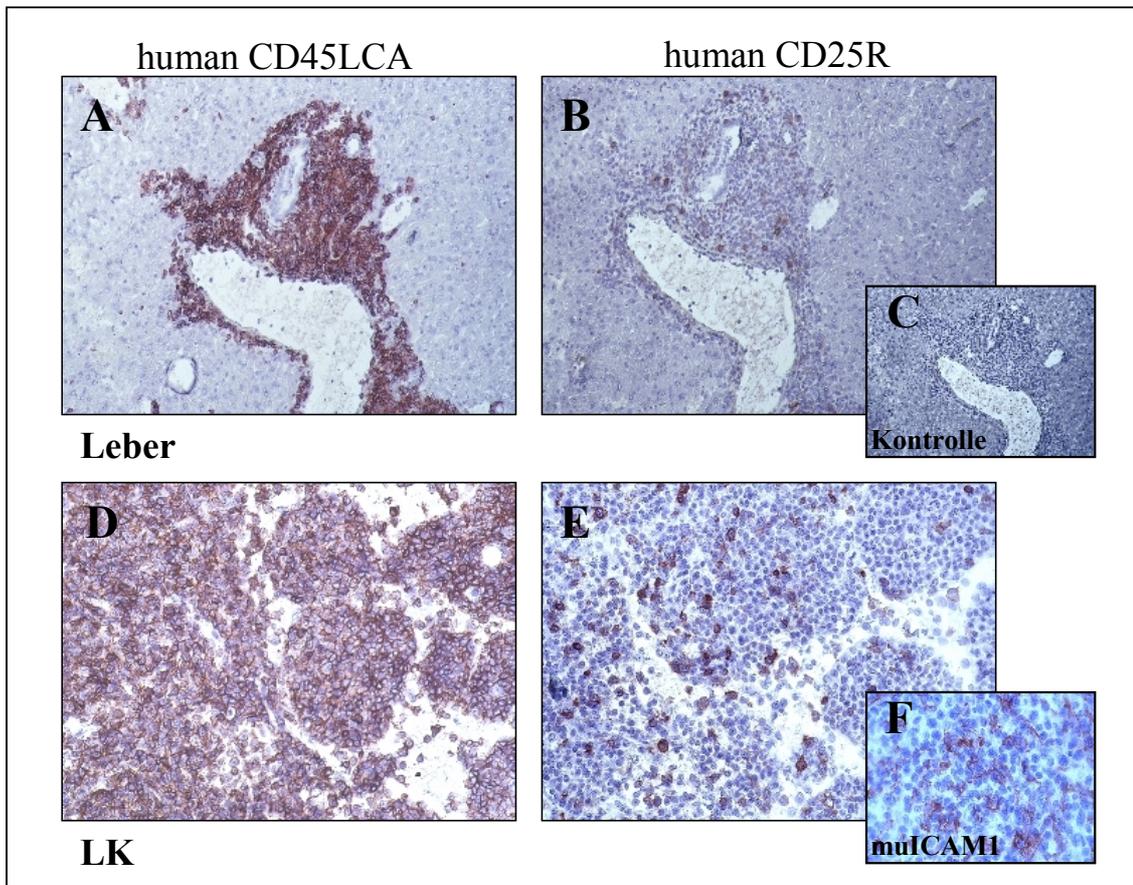


Abbildung 3.8: Immunhistologische Färbungen zeigten infiltrierte humane CD45LCA⁺ und CD25⁺ Zellen in Leber und Mesenterial-Lymphknoten aus xGvH-erkrankten *scid*-Versuchstieren. A bis C) Kryostatquerschnitte einer Leber 13 Tage nach Inokulation humaner CD4⁺ T-Zellen. Starke Infiltrationen humaner CD45LCA⁺ Zellen wurden vorwiegend an den Gefäßwänden der Leber beobachtet (A). Nicht alle humanen Zellen zeigten einen aktivierten Status über die CD25 Rezeptorexpression an (B). Die Kontrollfärbung wies keine unspezifischen Bindungen des sekundären Antikörpers nach (C). D bis F) Kryostatquerschnitte der Mesenterial-Lymphknoten. In den Lymphknoten dieses Versuchstiers wurden nahezu nur humane CD45LCA⁺ Zellen nachgewiesen (D). Hier wurde darüberhinaus eine verstärkte CD25Rezeptor-Expression humaner Zellen gefunden (E). Durch eine anti-Maus ICAM1-Färbung wurden zusätzlich auch murine dendritische Zellen in den Lymphknoten beobachtet (F). (Vergrößerung: 125x)

Da die Versuchstiere typische Symptome der xGvHD aufwiesen (Tag 13), lag es nahe, daß die krankheitsbedingten starken Aktivierungsvorgänge (CD25-Rezeptor-Expression) der humanen Zellen gegen murine Antigene zu diesem Zeitpunkt schon erfolgt waren. Die Untersuchung der Proliferation humaner Zellen zu bestimmten Zeitpunkten zeigte, daß es jedoch nach Ausprägung der xGvHD-Symptomatik weiterhin zu starken Zellteilungen kam (Abbildung 3.13).

Die vorliegenden Befunde belegten, daß es im Vergleich mit den Inokula (Abbildung 3.21) zu einer deutlichen Veränderung der Zusammensetzung und der Verhältnisse einzelner Zellsubpopulationen zueinander in den Organen nach Injektion in die C.B-17-*scid*-Versuchstiere kam. Durch die immunhistologischen Färbungen wurde ferner belegt, daß es im Verlauf der Erkrankung zu starken Migrationen humaner Zellen in die murinen Organe kam und daß diese durch Aktivierungsprozesse gekennzeichnet waren (Abbildungen 3.8 und 3.13). Die Injektion von humanen Lymphozyten induzierte in fast allen *scid*-Versuchstieren die xGvHD. Um die Frage zu untersuchen, zu welchem Zeitpunkt eine spezifische Aktivierung dieser humanen Zellen erfolgte, wurden die Versuchstiere zu standardisierten Zeitpunkten nach Inokulation analysiert.

3.2.1 Charakterisierung des Aktivierungsstatus humaner Zellen nach Inokulation

Um die Frage zu untersuchen, ob es zu Veränderungen im Proliferationsverhalten humaner Effektorzellen nach intraperitonealer Injektion in *scid*-Versuchstiere während der frühen Phase einer xGvHD (Tag 1 bis 7) kam, wurden die humanen Zellen mit Fluorescein markiert. Die FITC-Markierung ermöglichte die Untersuchung stabil-markierter Zellen im Verlauf einer xenogenen Abstoßungsreaktion humaner Effektorzellen gegen murines Gewebe [78]. Dabei nahmen die FITC-Moleküle bei dieser Markierungsmethode nur einen minimalen Einfluß als Ko-Stimulatoren.

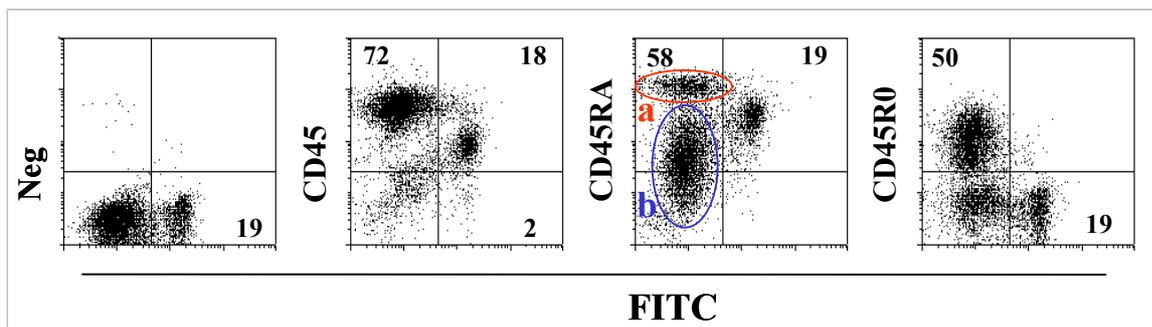


Abbildung 3.9: Die humanen Zellen aus der Peritonealhöhle eines *scid*-Versuchstiers zeigten nach 5 Tagen einen hohen Verlust (72%) der FITC⁺-Markierung. Die humanen Zellen wurden nach 5 Tagen am Applikationsort (Peritonealhöhle) der C.B-17-*scid*-Versuchstiere wiedergewonnen. Diese zeigten einen hohen Verlust der FITC Oberflächenmarkierung bei gleichzeitiger Zunahme der CD45R0⁺ Isoformexpression. Knapp 20% der ursprünglich markierten Zellen zeigten weiterhin eine stabile FITC⁺ Oberflächenmarkierung und dadurch indirekt eine sehr geringe Teilungsaktivität. In den Quadranten sind die prozentualen Anteile der humanen CD45RA⁺ (B-Zellen (a) und naive T-Zellen (b)), CD45R0⁺ (aktivierte T-Zellen), CD45⁺ und doppelt-positiven Zellen vermerkt.

Der Nachweis der an der Zelloberfläche humaner Zellen gebunden vorliegenden FITC-Moleküle erfolgte für maximal 7-11 Tage. Danach fiel die Intensität der FITC-Markierung unter die Nachweisgrenze und wurde von der Gewebeautofluoreszenz überdeckt. Die FITC-markierten humanen Zellen eines Spenders wurden mit gleichen Zellzahlen von jeweils 5×10^7 CD4⁺ T-Zellen in 4 bis 5 *scid*-Versuchstiere intraperitoneal injiziert und nach 24 h, 72 h, 5, 7 oder 11 Tagen bzw. nach Ausbildung der xGvHD aus unterschiedlichen Organen wiedergewonnen.

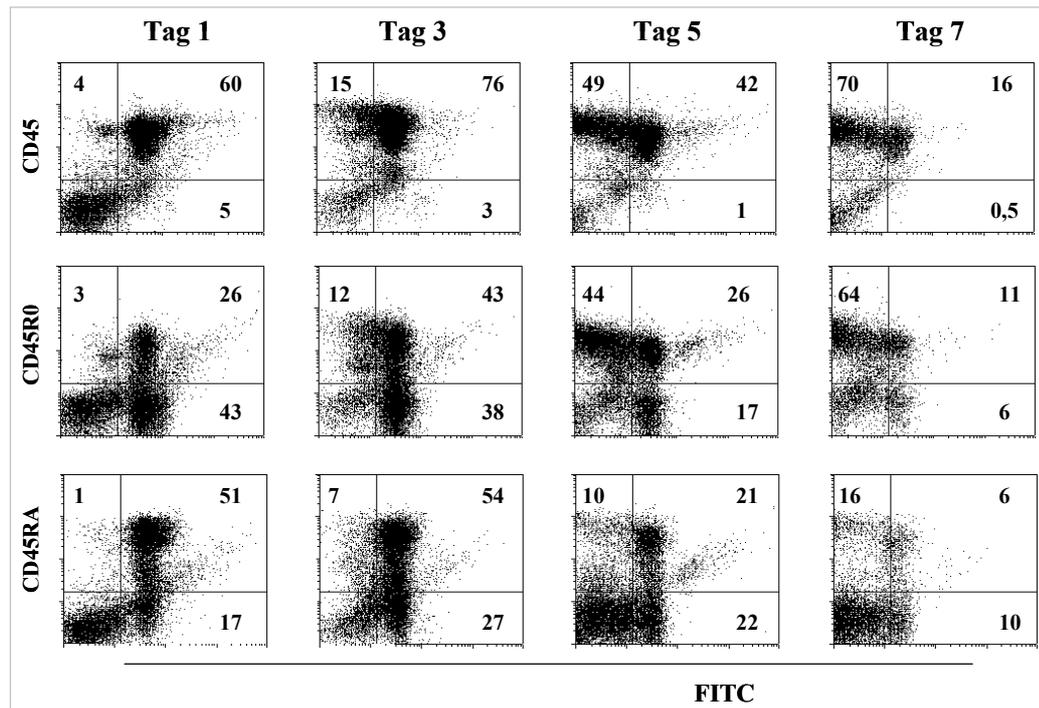


Abbildung 3.10: Die aus der Peritonealhöhle wiedergewonnenen humanen Zellen wiesen indirekt über die Abschwächung der Intensität der FITC-Markierung auf ein hohes Proliferationspotential innerhalb von 7 Tagen. Exemplarische Darstellung humaner Zellen, die mit CD45, CD45RA und CD45R0 mAb (PE-markiert) gefärbt wurden. Die FITC-markierten unseparierten humanen Zellen aus einem Spender wurden in C.B-17-*scid*-Versuchstiere (n=4) injiziert und zu bestimmten Zeitpunkten aus der Bauchhöhle wiedergewonnen. In den Quadranten sind die prozentualen Anteile der humanen FITC⁺CD45RA⁺, FITC⁺CD45R0⁺, FITC⁺CD45⁺ und einfach-positiven Zellen vermerkt.

Um bei diesen Experimenten Unterschiede durch den heterogenen genetischen Hintergrund und den Einfluß des Alters der Versuchstiere (verschiedene Ausgangsgewichte) zu minimieren, wurden nur gleichaltrige Wurfgeschwister als Versuchstiere eingesetzt. Zu den festgelegten Zeitpunkten wurden die *scid*-Versuchstiere analysiert. In allen Experimenten (n=5) wurden die wiedergewonnenen humanen Zellen der einzelnen untersuchten Organe nach Bestimmung der Zellzahl durchflußzytometrisch und immunhistologisch untersucht. Im Verlauf der xGvH-Erkrankung erhöhte sich der Anteil an FITC⁻/CD45LCA⁺ humanen Zellen

von 4% nach 24 h auf über 70% nach 5 Tagen (Abbildungen 3.9 und 3.10). Der steigende Anteil von CD45R0⁺ humanen Zellen mit einer gleichzeitigen Abschwächung der Intensität der FITC-Fluoreszenz deutete auf ein erhöhtes Teilungspotential dieser Zellen. Zwar wurden über Tag 7 hinaus weiterhin FITC-markierte humane Zellen in der Peritonealhöhle der Versuchstiere nachgewiesen, jedoch sank der Anteil dieser Zellen im weiteren Verlauf der Abstoßungsreaktion. Von den sich schnell teilenden FITC⁻ humanen Zellen zeigte die Mehrzahl eine Expression der CD45R0⁺-Isoform. Der Anteil der FITC-markierten, im Spender aktiviert vorliegenden CD45R0⁺ Zellen, veränderte sich hingegen bis zum Tag 5 kaum. Demgegenüber fiel der relative Anteil der ruhenden Zellen mit Expression der CD45RA⁺ Isoform in allen Versuchen (n=5), wie exemplarisch in Abbildung 3.10 gezeigt (Abnahme von 52% auf 22%). Weitere 16% der Zellen exprimierten zwar weiterhin die CD45RA⁺-Isoform, bei diesen Zellen handelte es sich jedoch hauptsächlich um CD19⁺ B-Zellen (Abbildung 3.11).

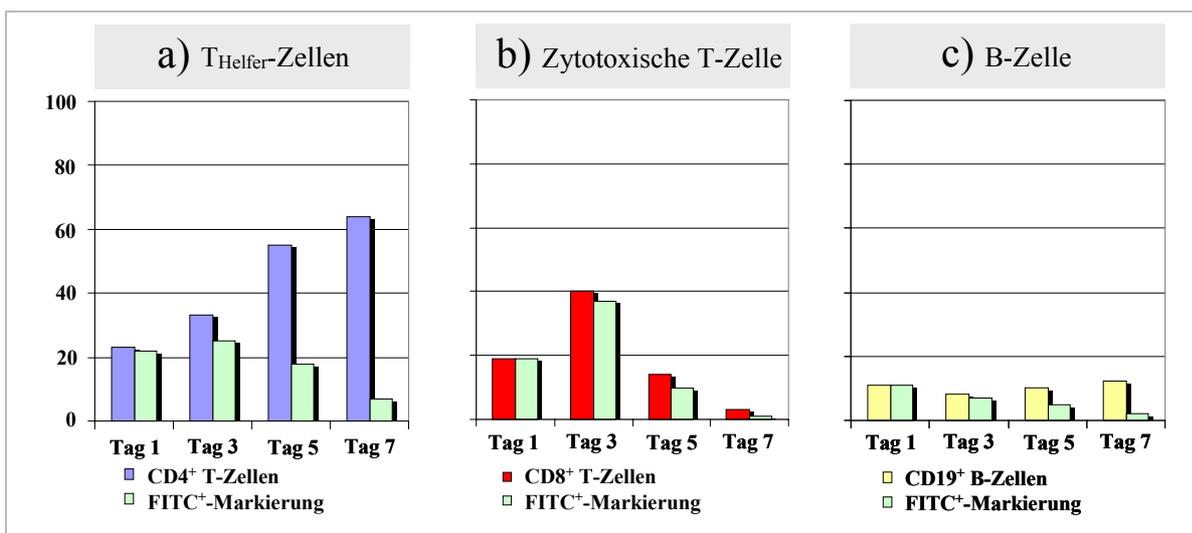


Abbildung 3.11: FACS-Analyse FITC⁺ humaner Zellen aus der Peritonealhöhle von *scid*-Versuchstieren (n=4) nach 24 h, 72 h, 5 und 7 Tagen. Die humanen Zellen wurden mit CD4, CD19 und CD8 mAb gefärbt. Die Inokulation der *in vivo* FITC-markierten unseparierten humanen Zellen zeigte in den C.B-17-*scid*-Versuchstieren (n=5) eine Expansion der CD4⁺ T-Zellsubpopulation von 22 auf über 60% nach 7 Tagen. Daneben zeigten die CD19⁺ B-Zellen einen Verlust der FITC-Markierung. Entgegen der Erwartung erfolgte die Depletion der humanen CD8⁺ T-Zellen in den Versuchstieren nicht innerhalb weniger Stunden, sondern fiel innerhalb von 7 Tagen auf knapp 2% ab. Desweiteren wurden ruhende FITC⁺ humane Zellen nachgewiesen. (Schematische Darstellung durchflußzytometrischer Messungen)

Diese Befunde zeigten, daß das xenoreaktive Potential in erster Linie durch die in den Spendern ruhenden naiven CD45RA⁺ T-Zellen vermittelt wurde. In weiteren Experimenten wurden jedoch sowohl aktivierte (11%) als auch ruhende (6%) humane Zellen nachgewiesen,

die keine Teilungsaktivität (Beibehaltung der FITC-Markierung) aufzeigten. Während der Anteil der CD4⁺ T-Zellen im Verlauf der xGvHD innerhalb von 7 Tagen auf über 60% stieg, fiel der Anteil der CD8⁺ T-Zellen deutlich ab (2%). Der Anteil der B-Zellen mit ca. 10% veränderte sich im Verlauf der Erkrankung nicht. Mit dem Verlust der FITC-Markierung der humanen CD19⁺ B-Zellen wurde jedoch belegt, daß sich diese Zellen im murinen Milieu teilten und somit zumindest eine unterstützende Funktion bei der Abstoßungsreaktion besitzen konnten.

Neben einer gleichmäßigen Expansion der CD4⁺ T-Zellen von 22 auf über 60% der Lymphozyten fiel die Gesamtzellzahl bis zum Tag 7 deutlich ab, wie aus Abbildung 3.12 ersichtlich. Die Auswertung der Versuche (n=5) zeigte bis zum Tag 5 eine deutliche Verminderung der Zellzahlen in den Peritonealhöhlen der Versuchstiere (Abbildung 3.12b). Nach einem Zeitraum von 5-7 Tagen wurde ein Ansteigen der Zellzahlen in allen untersuchten Kompartimenten beobachtet. Der Nachweis einer Verminderung der humanen Zellzahlen zum Ende der xGvH-Erkrankung könnte möglicherweise durch eine spezifische Auswanderung humaner Zellen in die anderen Zielorgane der erkrankten *scid*-Mäuse erklärt werden. Die Vermittlung der xenogenen Abstoßungsreaktion erfolgte nur durch einen geringen Anteil der humanen T-Zellen mit einer Spezifität gegen murine Antigene. Dieses wurde durch weitere durchflußzytometrische Befunde belegt, die zeigten, daß diese FITC⁻ CD4⁺CD45R0⁺ humanen T-Zellen möglicherweise im murinen Milieu aktiviert wurden (Abbildungen 3.8 und 3.10). Ein besonders starkes Ansteigen der Zellzahlen der CD4⁺ T-Zellen wurde erst ab Tag 7 in der Milz der Versuchstiere gefunden (Abbildung 3.12a). Die schon im vorherigen Abschnitt beschriebenen starken Migrationsprozesse humaner Zellen in die sekundären lymphatischen Gewebe wurden auch in diesen Versuchen beobachtet (Abbildung 3.12c). Die Verminderung der murinen Zellzahlen im Knochenmark wurde sehr wahrscheinlich in erster Linie durch die subletale Bestrahlung (3 Gy) verursacht (Abbildung 3.12d). Jedoch kam es im Verlauf der xGvHD zu einem erneuten Ansteigen der Zellzahlen. Eine Ursache hierfür könnten die infiltrierenden humanen Zellen sein, die über spezieübergreifende Zytokinsignale die Kompensationsvorgänge muriner Zellen der myeloischen Reihe unterstützten.

Die *scid*-Versuchstiere verloren in den ersten Tagen stark an Gewicht, erholten sich jedoch ab Tag 4 wieder deutlich. Ein Grund für diesen zwischenzeitlichen Gewichtsverlust lag sehr wahrscheinlich einerseits in der Vorbehandlung (subletale Bestrahlung) und andererseits im Ablauf einer akuten Entzündungsreaktion in der Bauchhöhle, die möglicherweise durch die murinen Zellen der unspezifischen Immunität verursacht wurde.

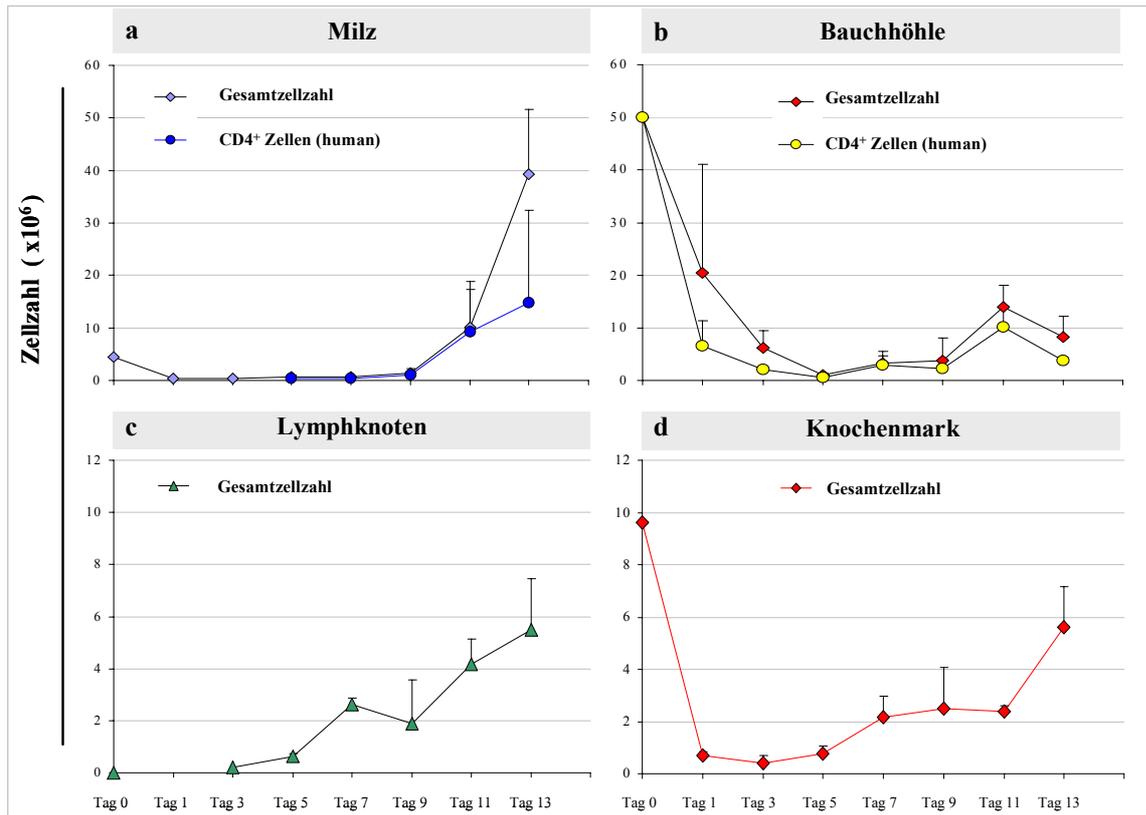


Abbildung 3.12: Statistische Auswertung der Zellzahlentwicklung der humanen CD4⁺ T-Zellen im Vergleich mit der Gesamtzellzahl in verschiedenen murinen Kompartimenten. Nach der Inokulation von FITC-markierten humanen Zellen in C.B-17-*scid*-Versuchstiere (n=30) wurden diese zu standardisierten Zeitpunkten getötet und die humanen Zellen aus Milz (a), Bauchhöhle (b), Lymphknoten (c) und Knochenmark (d) wiedergewonnen. Je ein Versuchstier der Versuchsgruppen (n=6) wurde erst zum Zeitpunkt einer fortgeschrittenen xGvHD (Tag 13) analysiert. a) Der Anteil der humanen CD4⁺ T-Zellsubpopulation stieg im Verlauf der xGvH-Erkrankung mit der Ausbildung einer Milzvergrößerung stark an. b) Sowohl die Zellzahl als auch der Anteil humaner CD4⁺ Zellen sank bis zum Tag 7 ab, um anschließend bis zur Auslösung der xGvHD wieder anzusteigen. c) Die murinen Lymphknoten zeigten eine stetige Zellzahl- und Größenzunahme durch infiltrierende humane Zellen. d) Die Vorbehandlung der *scid*-Versuchstiere (Bestrahlung) führte zu einer abnehmenden murinen Zellzahl im Knochenmark, um im Verlauf der xGvH-Erkrankung durch zunehmende Besiedlung humaner CD4⁺ Zellen wieder anzusteigen.

Nach dieser Reaktion wurde jedoch eine Normalisierung sowohl des Gewichts als auch im Verhalten der Versuchstiere beobachtet. Ab Tag 7 wurde eine gegenläufige Entwicklung, bei der die Versuchstiere durch einen fortschreitenden Gewichtsverlust und charakteristische Krankheitssymptome gekennzeichnet waren, eingeleitet (Abbildungen 3.20 und 3.22). Gleichzeitig wurde ein Ansteigen der humanen Zellzahlen in den verschiedenen untersuchten Kompartimenten beobachtet. Zudem deutete eine ebenfalls stark erhöhte Expression des Aktivierungsmarkers HLA DR (MHC Klasse II) auf starke Aktivierungs- und Proliferationsvorgänge der humanen Zellen (Daten nicht gezeigt). Diese Befunde

unterstützten die Hypothese, daß die Erkennung muriner Xeno-Antigene nur über eine Aktivierung der humanen CD4⁺ T-Zellen führte. Die Expression von HLA DR und der Wechsel der CD45-Isoform von RA⁺ zu R0⁺ Zellen zu frühen Zeitpunkten (72 h) waren charakteristische Kennzeichen einer ablaufenden T-Zell-Aktivierung.

Es stellte sich daher die Frage, ob die eingewanderten humanen Zellen in den verschiedenen murinen Organen ein verstärktes Teilungspotential zeigten. Um diese Frage zu untersuchen, wurden den *scid*-Versuchstieren zu standardisierten Zeitpunkten 2 h vor der Analyse BrdU injiziert. Der Einbau von BrdU in die DNA erfolgte dabei nur in Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklusses befanden. Zur Unterscheidung von murinen und humanen Zellen wurden die humanen CD45LCA⁺ Zellen zusätzlich markiert. Die immunhistologischen Färbungen von Leber, Milz und Lymphknoten zeigten nach einem Zeitraum von 3 bis 5 Tagen sehr wenige doppelt-positive humane Zellen. Ab Tag 7 wurden in den murinen Lymphknoten und einigen Bereichen der Milzen verstärkte humane proliferierende Zellinfiltrate nachgewiesen (Abbildung 3.13). Demgegenüber wurden in den untersuchten Lebern wenige proliferierende, humane Zellen an und um die Gefäße angefärbt. Während am Tag 11 und 13 in den Lymphknoten viele CD45⁺, jedoch weniger BrdU⁺ humane Zellen gefunden wurden, erfolgten währenddessen starke Proliferationsvorgänge in Leber und Milz der Versuchstiere, die bis zur Ausbildung der letalen xGvHD anhielten. Starke Infiltrationen humaner Zellen erfolgten zu diesem Zeitpunkt auch in das gefäßumgebende Gewebe von Leber, Lunge und Milz.

Die überaus schnelle Abschwächung der Intensität der FITC-Oberflächenmarkierung humaner Zellen und der immunhistologische Nachweis stark proliferierender humaner Zellen in den verschiedenen murinen Geweben zeigte, daß die humanen Zellen im Verlauf der xGvHD starke Aktivierungs- und Proliferationsprozesse durchliefen. Durch die Bestimmung der humanen Gesamtzellzahlen wurde deutlich, daß nur relativ wenige der injizierten humanen Zellen ein xenoreaktives Potential besaßen, um nach der Besiedlung der murinen Zielorgane, wie Leber und Milz, zu proliferieren (Abbildung 3.12). Sehr wahrscheinlich erfolgte zu Beginn eine gerichtete Migration humaner Zellen in die murinen Lymphknoten, an deren Ende es nach der Aktivierung zu einer Differenzierung der humanen Zellen kam. Im weiteren Verlauf der Abstoßungsreaktion erfolgte dann eine Besiedlung der murinen Zielorgane, wie Leber, Milz und Lunge. In den späten Stadien der Erkrankung (ab Tag 9) kam es zu einem Ansteigen der humanen Zellzahlen, wobei diese ebenfalls durch ein starkes Proliferationspotential gekennzeichnet waren. Weiterhin wurde durch die Versuche mit den FITC-markierten humanen Zellen deutlich, daß die CD4⁺ T-Zellen bei der xGvHD eine

entscheidende Rolle spielten, da nur diese Zellsubpopulation ein starkes Ansteigen der relativen Zellzahlen zeigte.

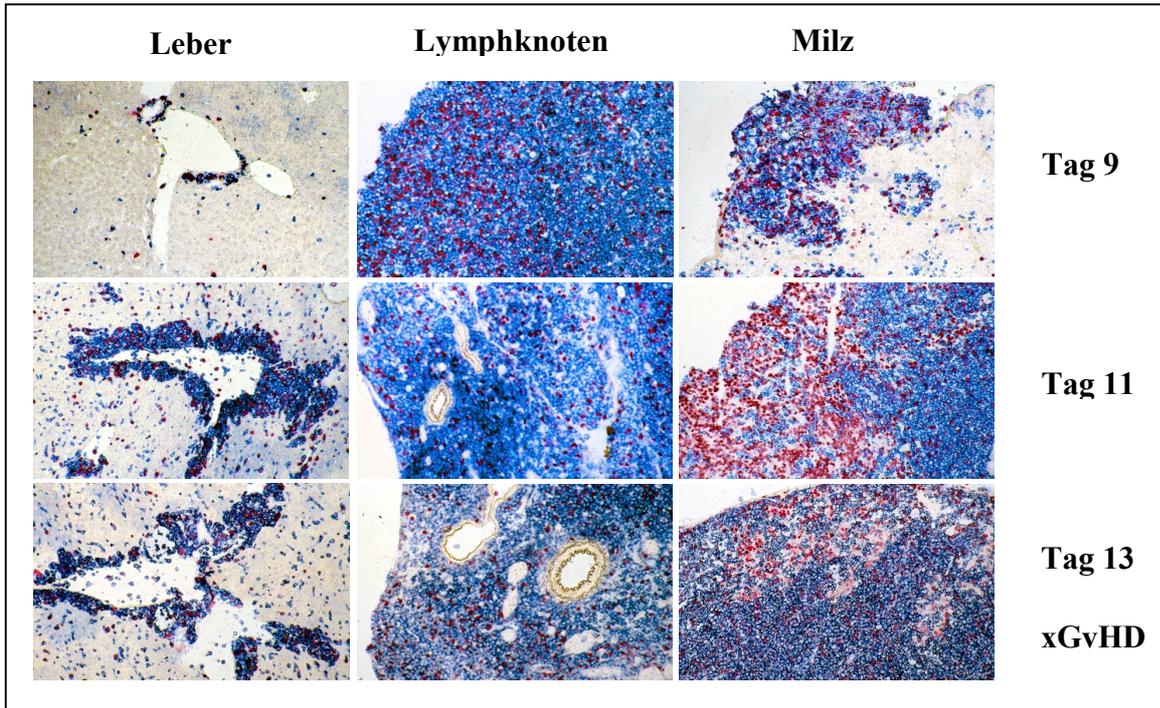


Abbildung 3.13: Immunhistologische Färbung von humanen CD45⁺ Zellen in Leber, Lymphknoten und Milz. Der Einbau von 5'-Brom 2'-Desoxyuridin reflektierte das hohe Teilungspotential humaner Zellen. Die infiltrierenden humanen CD45⁺ Zellen wurden mittels CD45 mAb detektiert. Die *scid*-Versuchstiere wurden am Tag 9, 11 und nach Ausbildung der xGvH-Erkrankung (Tag 13) getötet. Unstimulierte humane CD45⁺ Zellen zeigten nur eine Blaufärbung. Proliferierende humane Zellen hingegen wurden über die Inkorporation von BrdU mit einer zusätzlichen Rotfärbung des Zellkerns detektiert. Zusätzlich wurden murine proliferierende Zellen des Wirts gefärbt, wie in der Milz am Tag 11 deutlich gezeigt. Die humanen CD45⁺ Zellen zeigten eine zeitabhängige Infiltration und Proliferation in Leber und Milz. Dagegen wurden in den murinen Lymphknoten sehr viel früher (Tag 9) starke Infiltrationen und Differenzierungs- bzw. Proliferationsvorgänge humaner Zellen nachgewiesen.

Um die Frage zu untersuchen, welchen klonalen Hintergrund die T-Zell-vermittelte Abstoßungsreaktion im SCIDHu-Tiermodell besaß, wurde das T-Zellrezeptor V β -Repertoire der humanen Zellen analysiert. Bei der Vermittlung der xGvHD könnten dabei überlappende Spezifitäten der T-Zellrezeptor oder Superantigeneffekte eine Rolle spielen.

3.3 Analyse des T-Zellrezeptor V β -Repertoires humaner T-Zellen

Die CDR3-Analyse verdeutlichte indirekt die Selektion des verwendeten T-Zellrepertoires der xenoreaktiven T-Zellen in der murinen Umgebung und höchstwahrscheinlich auch bei der Ausbildung der xGvHD. Wie in den vorangegangenen Untersuchungen gezeigt, entwickelten ungefähr 1×10^6 der injizierten humanen Zellen ab Tag 5 bis 7 ein xenoreaktives Potential und zeigten starke Proliferationen und steigende Zellzahlen in verschiedenen murinen Organen (Abschnitt 3.2 / Abbildung 3.11). Belege für diese Reaktivität waren zum einen der Expressionswechsel der CD45-Isoform, hohes Teilungspotential, steigende humane Zellzahlen in allen murinen Organen und letztendlich die Ausbildung der xGvHD. Für die Analyse der Diversität der gegen murine Antigene gerichteten T-Zellpopulation wurde eine TCR V β -Repertoire-Analyse² durchgeführt. Mit diesem Verfahren können Fragen zur klonalen Zusammensetzung der wiedergewonnenen humanen T-Zellen bearbeitet werden. Hierbei ist auch die Frage von Bedeutung, ob die T-Zellantwort oligo- oder polyklonal war.

Aus den *scid*-Versuchstieren wurden zum Zeitpunkt der Krankheitsmanifestation die *in vivo* aktivierten humanen Zellen wiedergewonnen. Anschließend erfolgte die mRNA-Isolation, Synthese der cDNA und Vervielfältigung der TCR V β -Ketten unter Verwendung von V β -spezifischen Primern. Die primären Amplifikationsprodukte wurden anschließend in einer „run-off Reaktion“ mit Hilfe eines radioaktiv markierten, im C β Bereich bindenden, Primer markiert [81, 82, 83].

Die Komplementaritäts-determinierende-Region 3 (CDR3) stellt den Bereich des T-Zellrezeptors (TCR) dar, der vorwiegend das von MHC-Molekülen präsentierte Peptid erkennt. Diese CDR3-Region ist hinsichtlich ihrer Länge und ihrer Sequenz außerordentlich variabel. Die Auftrennung dieser Fragmente in einem hochauflösenden Polyacrylamidgel führt zur Darstellung von jeweils 6-8 diskreten Banden, bei der die benachbarten Banden eine Längendifferenz von je drei Nukleotiden aufweisen. Eine Übersicht über das Vorgehen bei der Analyse der T-Zell-Rezeptor Diversität mittels Spekatyping ist in Abbildung 3.14 dargestellt. Die CDR3-Spektratypen einer normalen, unstimulierten T-Zellpopulation zeigen eine Gaußsche Verteilung hinsichtlich der Bandenintensitäten zu der Peakhöhe und der dazugehörigen Fläche (Abb.3.14a).

² Übersichtsartikel von Pannetier et al. [34]

Zunehmende Schwärzungsintensität und damit Zunahme in der Peakhöhe sind Ausdruck von T-Zellexpansionen mit einer definierten Länge der CDR3-Region (siehe Abb.3.14b).

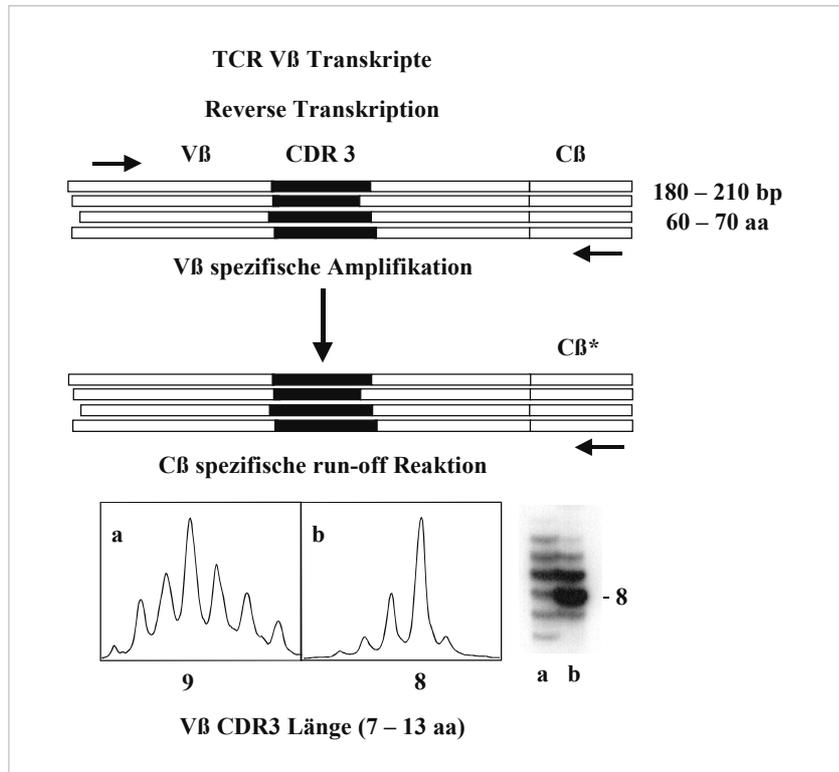


Abbildung 3.14: Grundlage der CDR3-Längendiversität und Schema der CDR3-Spektroskopie. Bedingt durch die am Aufbau der T-Zellrezeptorketten beteiligten genetisch kodierten Sequenzelemente (V β , D β und J β) und dem zusätzlichen Einbringen nicht kodierter Nukleotide durch die Terminale Transferase resultieren erhebliche Längendifferenzen in der Komplementaritäts-determinierenden-Region 3 Domäne (CDR3). Die T-Zellrezeptor V β -Transkripte wurden mittels RT-PCR transkribiert und durch Nutzung von V β - und C β -spezifischen Primern amplifiziert. Um eine höhere Auflösung der amplifizierten Fragmente zu erhalten, wurde eine run-off Reaktion unter Verwendung radioaktiv markierter, im C β Bereich bindenden, Primern durchgeführt. Nach einer elektrophoretischen Auftrennung der amplifizierten Fragmente auf einem hochauflösenden Polyacrylamidgel wurden die Peaks des entstandenen CDR3-Bandenmusters durch eine nachfolgende Computeranalyse analysiert. Dadurch wurde es möglich, die Größe in Aminosäuren und damit die Fläche der CDR3-Fragmente zu berechnen.

- a) Das Bandenmuster, der CDR3 Spekatyp, und die densitometrische Auswertung von unstimulierten humanen T-Zellen. Charakteristisch ist das Gaußsche Verteilungsmuster.
- b) Exemplarisch ist die Expansion einer nicht näher charakterisierten Zahl von T-Zellen gegenüber einem polyklonalen Hintergrund dargestellt. Die Expansionen äußern sich in einer deutlich höheren Schwärzungsintensität und damit in der Zunahme mehrerer Peaks. Die expandierten T-Zellen weisen eine aus 8 Aminosäuren (aa) zusammengesetzte CDR3-Region auf.

3.3.1 Allgemeine und individuelle Veränderungen des TCR V β -Repertoires

Nach der Inokulation der *scid*-Mäuse mit humanen T-Zellen kommt es zunächst zu einer deutlichen Verringerung der Zahl humaner Zellen und anschließend zur Expansion humaner Zellen in verschiedenen Kompartimenten der Versuchstiere (Abschnitt 3.2 / Abbildung 3.12). Dieser dynamische Prozeß ist gekennzeichnet durch die Selektion von Lymphozyten bzw. Lymphozyten-Subpopulationen in der xenogenen Umgebung. Abhängig welcher Art der Selektionsprozeß ist (Migration, Expansion und Zelltod), kann es entweder durch ein breites Spektrum oder durch eine eingeschränkte Zahl von T-Zellklonen zu einer Besiedlung der murinen Organe kommen.

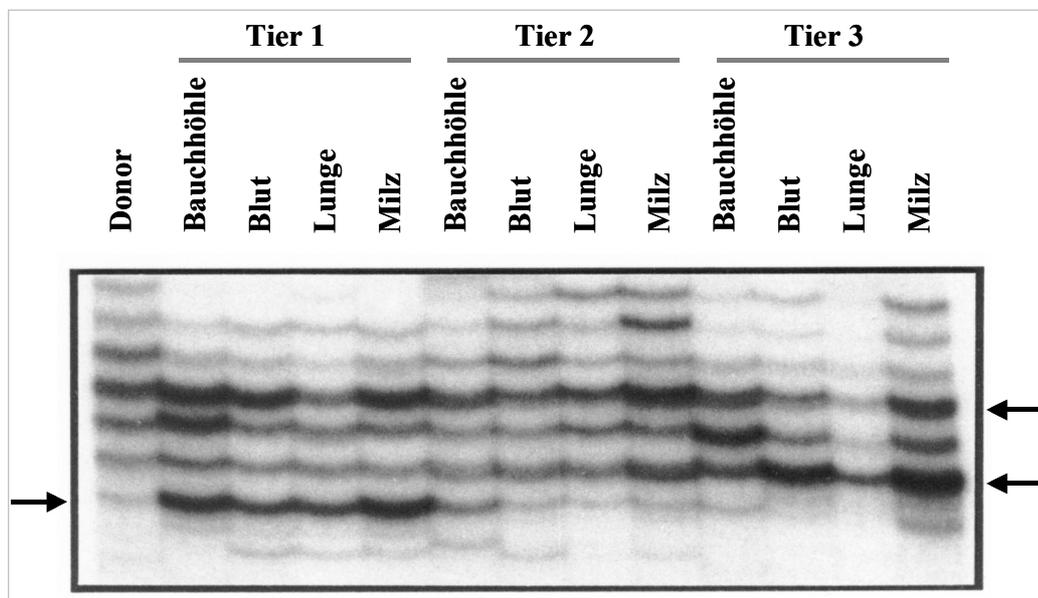


Abbildung 3.15: CDR3-Spektratypen der Familie V β 24 humaner CD4⁺ T-Zellen nach Wiedergewinnung aus xGvH-erkrankten *scid*-Versuchstieren. Die Versuchstiere (n=3) wurden mit humanen Lymphozyten eines Spenders inokuliert und manifestierten am Tag 18 die xGvH-Erkrankung.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden Versuchstiere (n=3) mit humanen CD4⁺ T-Zellen eines Spenders inokuliert. Nach Auslösung der xGvHD in den *scid*-Mäusen, am Tag 18 nach Inokulation, wurden die wiedergewonnenen humanen Lymphozyten analysiert. Bei der Analyse des TCR V β -Repertoires humaner Zellen aus xGvH-erkrankten *scid*-Versuchstieren wurden Expansionen in den Spektratypen der V β -Familien 3, 5.2, 22, 23 und 24 gefunden. Dabei wurden moderate organspezifische Differenzen beobachtet. Exemplarisch ist das Ergebnis der TCR V β -Repertoire-Analyse der Familie V β 24 dokumentiert (Abbildung 3.15). Die V β 24 Spektratypen der humanen T-Zellen aus den erkrankten Versuchstieren zeigten, daß

die murinen Organe durch ein eher breites Spektrum verschiedener T-Zellen mit unterschiedlichen T-Zellrezeptoren besiedelt wurden.

Der Vergleich der CDR3-Spektratypen der humanen T-Zellen aus den untersuchten Kompartimenten der drei *scid*-Wurfgeschwister zeigte zudem geringe tierspezifische Differenzen. Neben übereinstimmenden Expansionen, die in jedem Kompartiment gefunden wurden, traten auch individuelle Expansionen auf. Es bildeten sich individuelle Unterschiede des T-Zellrezeptor-Repertoires zwischen den Geschwistertieren bei gleichzeitiger Ausbildung einer xGvH-Erkrankung aus. Da jedes individuelle Versuchstier zwar ein gleich großes Inokulum erhalten hatte, könnte eine nicht vollkommen identische Zusammensetzung der xenoreaktiven Subpopulationen eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede sein.

3.3.2 Zeitabhängige Veränderungen des TCR V β -Repertoires

Im Rahmen dieser Untersuchungen, bei der die Versuchstiere Inokula desselben Spenders erhielten, wurden bei einigen Experimenten Abweichungen in der Zeitspanne bis zur Manifestation der xGvHD beobachtet. Diese Heterogenitäten im Überleben der Versuchstiere gaben die Möglichkeit, Effekte des TCR V β -Repertoires humaner T-Zellen in Abhängigkeit von der Verweildauer in den murinen Organismen zu untersuchen. Diese teilweise erheblichen Differenzen im zeitlichen Verlauf bis zur Ausprägung der xGvHD waren jedoch eher die Ausnahme.

In einem Experiment erkrankten die Versuchstiere (Tier 1 bis 3) 14, 22 und 39 Tage nach Inokulation, in einem zweiten Experiment (Tier 4 und 5) wurde die xGvHD nach 13 bzw. 29 Tagen beobachtet. Die Untersuchung der CDR3-Spektratypen humaner T-Zellen aus erkrankten *scid*-Versuchstieren ergab eine deutliche Zeitabhängigkeit hinsichtlich der Veränderungen des T-Zellrezeptor V β -Repertoires. In Abbildung 3.16 sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten dokumentiert. Im Vergleich mit den Inokula waren deutliche Restriktionen der CDR3 Spektratypen der erst nach 39 bzw. 29 Tagen erkrankten Versuchstiere (Tier 3 und 5) zu erkennen. Neben ausgeprägten Expansionen in allen untersuchten murinen Organen, mit gleicher CDR3-Länge, wurden auch organspezifische Differenzen beobachtet. Die CDR3-Spektratypisierung erlaubte jedoch keine Rückschlüsse auf die Zellzahl der T-Zellklone, die durch das CDR3-Bandenmuster repräsentiert wurden. Die innerhalb von 22 Tagen erkrankten Versuchstiere (Tiere 1, 2 und 4) zeigten im Vergleich zu den Tieren 3 und 5 eher marginale Expansionen der CDR3 Spektratypen auf.

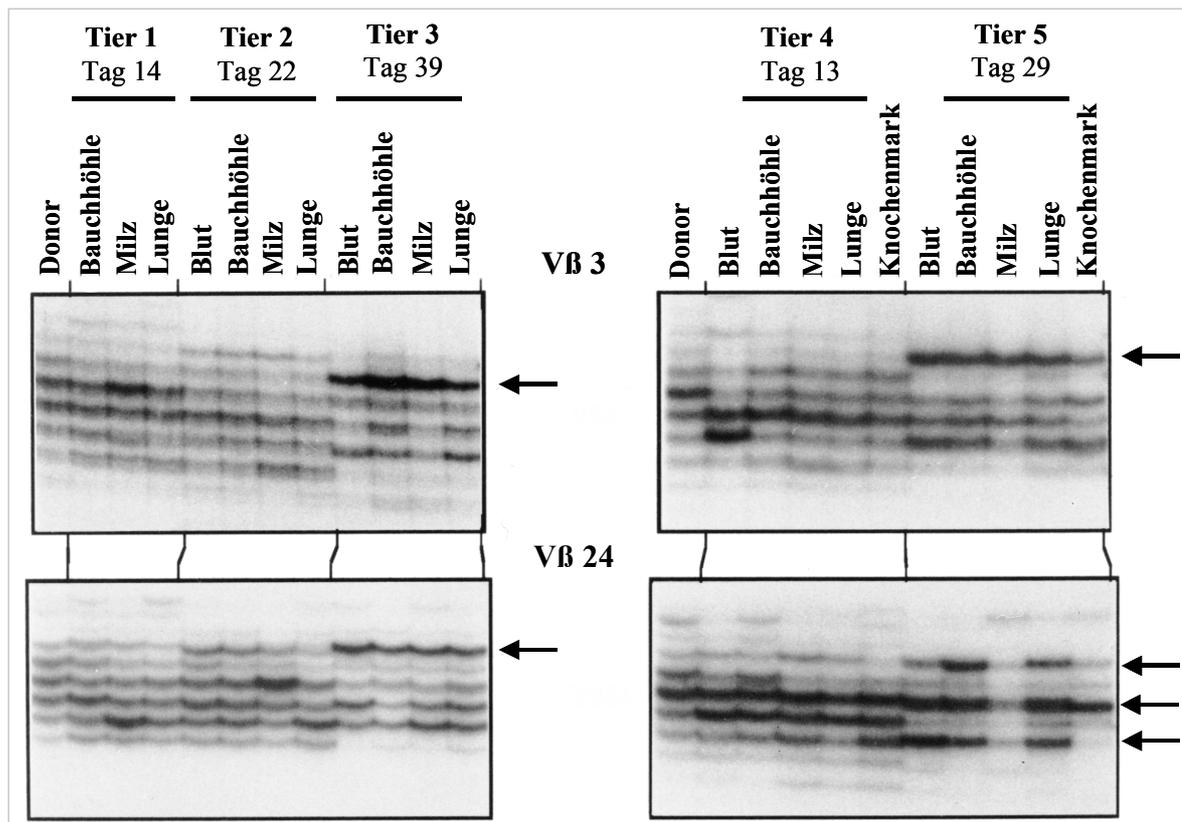


Abbildung 3.16: Zeitabhängige Veränderungen des TCR V β -Repertoires der Familie V β 3 und V β 24 nach Wiedergewinnung der humanen T-Zellen. In einem Experiment erkrankten die *scid*-Mäuse (n=3) nach 14, 22 und 39 Tagen, in einem zweiten Experiment nach 13 bzw. 29 Tagen. Ausgeprägte Expansionen wurden in den Versuchstieren 3 und 5 mit einem verlängerten Überleben (>29 Tage) beobachtet.

Durch diese Versuche (n=2) wurde eine zeitliche Abhängigkeit der Diversität der CDR3-Spektratypen der humanen T-Zellen bis zur Ausbildung der xGvHD belegt. Zusätzlich wurde jedoch durch den Vergleich der Bandenmuster der Geschwistertiere klar, daß es schon bei der Inokulation der humanen T-Zellen zu Unterschieden in der Zusammensetzung der xenoreaktiven T-Zellsubpopulation kommen kann. Weitere Analysen zur Frage der zeitlichen Abhängigkeit in Bezug auf die Ausprägung der Spezifität der humanen T-Zellen erfolgten durch den seriellen Transfer von *in vivo* aktivierten humanen T-Zellen aus xGvH-erkrankten Versuchstieren in sekundäre Empfänger (Abschnitt 3.4.6).

3.4 Charakterisierung des xenoreaktiven Potentials funktionell unterschiedlicher T-Zell-Subpopulationen

Mit dem Nachweis, daß humane Zellen in den *scid*-Versuchstieren eine letale xGvH-Erkrankung induzierten, sollte nun untersucht werden, welche Zellsubpopulation hierfür ursächlich verantwortlich war. Desweiteren sollte geklärt werden, welche Effektormechanismen bei den schweren Gewebeschädigungen eine Rolle spielten. Die xGvHD könnte dabei humoral über B-Zellen oder zellulär über T-Zellen vermittelt werden. Der Nachweis von xenoreaktiven humanen IgG-Antikörpern deutete auf eine funktionelle Differenzierung der humanen B-Zellen [18]. Der stetige Anstieg des Anteils der CD4⁺ T-Zellschubpopulation im Verlauf der xGvHD deutete auf eine vorwiegend durch T-Zellen vermittelte Ausbildung der xGvHD. Jedoch konnte nicht ausgeschlossen werden, daß ferner die humanen B-Zellen in Kombination mit den T-Zellen die Basis einer Abstoßungsreaktion von xenogenem murinen Gewebe bildeten. Darüberhinaus könnten die B-Zellen eine ebenso wichtige Rolle bei der Antigenpräsentation einnehmen. Dabei könnten sie durch die Präsentation muriner Antigene einen stimulierenden, aktivierenden Einfluß auf die CD4⁺ T-Zellen nehmen. Zur Klärung dieser Frage wurden die humanen Zellen unter Verwendung der Rosetten-, der Panning-Technik, der magnetischen Zellseparation (MACS), der *in vivo* Depletion oder durch eine Kombination dieser Methoden in verschiedene Subpopulationen aufgetrennt. Zum Nachweis der Xenoreaktivität wurde das Potential der einzelnen humanen Zellschubpopulationen bei der Induktion der xGvHD untersucht.

3.4.1 Ausbildung einer xenogenen Graft-versus-Host Erkrankung durch humane CD2⁺ T-Zellen

Die Auftrennung der humanen Zellen in die CD2⁺ T-Zellschubpopulation und CD2⁻ Zellschubpopulation ermöglichte die Untersuchung der Frage, welche humanen Zellschubpopulationen an der Auslösung der xenogenen Graft-versus-Host-Erkrankung beteiligt waren.

Durch eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque[®]PLUS (Pharmacia Biotech) wurden periphere mononukleäre Zellen (PBMC = Lymphozyten und Monozyten) aus menschlichem Blut isoliert. Für die Separation von T- und B-Zellen aus dieser Zellschubpopulation wurde die Rosettentechnik mit Schafserythrozyten (SRBC) angewandt. Die Rosettenbildung wurde durch die Bindung von SRBC an das humane CD2 Antigen ermöglicht. Da das CD2-Molekül von allen T-Zellen, nicht aber von B-Lymphozyten und Monozyten, an der

Zelloberfläche exprimiert wird und diese Rosetten durch eine erneute Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll isoliert werden können, ist es möglich, T-Zellen von anderen mononukleären Zellen des Blutes zu trennen (Abschnitt 2.2.9).

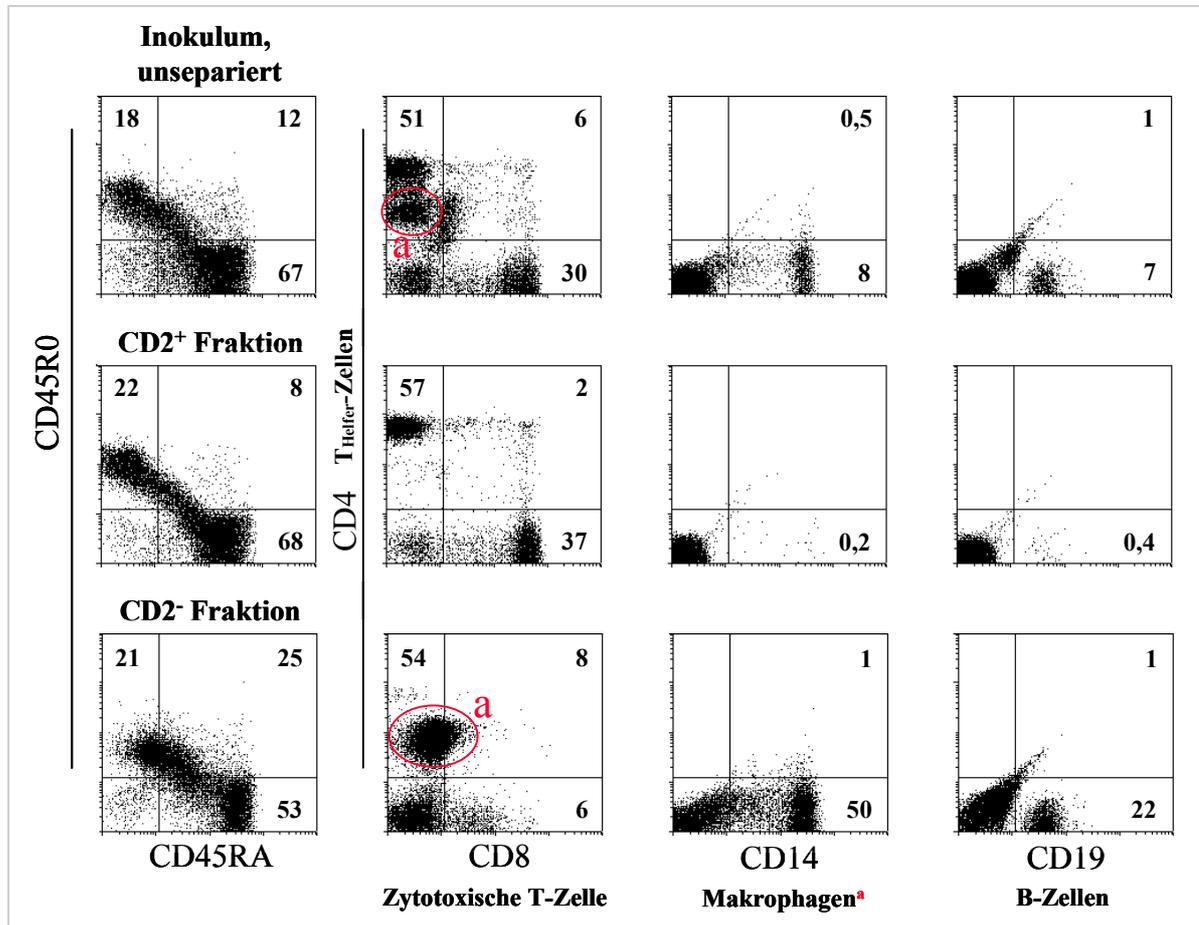


Abbildung 3.17: Die Schafserythroyten-Rosettierung führte zu einer Anreicherung humaner $CD2^+$ T-Zellen bei fast vollständiger Depletion von B-Zellen und Makrophagen. Die Trennung von $CD2^+$ T-Zellen und $CD2^-$ Zellen mittels Schafserythroyten-Rosettierung führte zu einer Anreicherung von Makrophagen ($CD14^+$), Monozyten und B-Zellen ($CD19^+$) in der $CD2^-$ -Fraktion und von $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen in der $CD2^+$ -Fraktion. Die Makrophagen zeichneten sich darüberhinaus über eine schwache $CD4$ -Expression aus (Kreismarkierung: a)). In den Quadranten sind die prozentualen Anteile der humanen $CD45R0^+$, $CD45RA^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$, $CD14^+$ und doppelt-positiven Zellen vermerkt.

Eine Anreicherung humaner T-Zellen der $CD2^+$ -Fraktion führte zu einer fast kompletten Depletion von B-Zellen und Monozyten bzw. Makrophagen (Abbildung 3.17). Dagegen zeigte die $CD2^-$ -Fraktion nur noch geringe Anteile von humanen T-Zellen bei gleichzeitiger Anreicherung des B-Zell- und Monozyten/Makrophagen-Anteils von 7% auf über 20% und von 8% auf über 50%. Der hohe Anteil $CD4^+$ Zellen in der $CD2^-$ -Fraktion wird durch die $CD4^+$ -Expression der humanen Makrophagen und Monozyten erklärt.

Die CD2⁺-Zellen lösten in allen Versuchstieren (n=9) eine letale xGvHD aus. Die unseparierten humanen Zellen lösten in Übereinstimmung mit der CD2⁺-Fraktion in den Versuchstieren eine letale xGvHD in 4 von 5 Versuchen aus. Demgegenüber induzierten die humanen CD2⁻-Zellen in 4 von 5 Versuchen keine xGvHD. Die *scid*-Versuchstiere zeigten ein deutliches Überleben von mehr als 20 Tagen (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Induktion einer letalen xGvHD durch Inokulation von unseparierten und CD2⁺ T-Zellen in *scid*-Versuchstieren^{1) 2)}

Experiment Nr.	Anzahl Versuchstiere	Ausbildung einer letalen xGvHD nach Inokulation (in Tagen)		
		Zellen, unsepariert	CD2 ⁺ Zellen	CD2 ⁻ Zellen
1	3	Nein (50 ^a)	12	Nein (50 ^a)
2	3	10	10	Nein (25 ^a)
3	3	13	13	Nein (22 ^a)
4	2	11	11	Nein (7 ^b)
5	3	9	11	Nein (38 ^a)
6	1	-	19	-
7	3	-	5, 5, 11	-

^a Versuchstiere entwickelten keine xGvHD-Symptomatik ^b Versuchstier entwickelte keine xGvHD-Symptome, verstarb jedoch nach 7 Tagen ¹⁾ 5×10^7 separierte humane CD2⁻-Zellen (B-Zellen, Makrophagen, Monozyten) lösten keine xGvHD in den Versuchstieren (n=5) aus. ²⁾ Die Inokulation von 5×10^7 CD2⁺-T-Zellen führte zur Induktion einer letalen xGvH-Erkrankung in allen Versuchstieren (n=9).

Ob die humanen B-Zellen, als Antigen-präsentierende Zellen, bei der xenogenen Abstoßungsreaktion eine Funktion übernehmen, konnte nicht ausgeschlossen werden. Der deutlich verringerte Anteil der CD4⁺ T-Zellen der CD2⁻-Fraktion induzierte keine Erkrankung, so daß eine Limitierung der Ausbildung einer xGvHD allein durch die Zellzahl der injizierten humanen Zellen erfolgte. Dies unterstützt die Hypothese, daß nur sehr wenige humane T-Zellen eine Xenoreaktivität besaßen. Die CD2⁺ T-Zellen waren bei der Induktion einer letalen Graft-versus-Host-Reaktion in den *scid*-Mäusen unverzichtbar. Die in früheren Versuchen in den lymphatischen Geweben detektierten humanen HLA DR⁺/CD3⁻ Zellen verwiesen zwar auf eine mögliche Funktion der B-Zellen als APC, die neuen Befunde unterstützten hingegen, daß es sich bei der xGvHD um eine T-Zell-vermittelte Immunreaktion handelte.

3.4.2 Induktion einer xGvHD nach Inokulation humaner CD4⁺ T-Zellen

Um die Frage zu untersuchen, welche humane T-Zellsubpopulation die Basis für die Induktion der xGvHD bildete, wurden die T-Zellen separiert. Zur Auftrennung der T-Zellen in Subpopulationen wurde die Panning-Technik verwendet, welche zu einer Depletion der Antikörper-markierten Subpopulation (negative Selektion) führte.

- 1) Die ersten CD4⁺ T-Zellanreicherungen erfolgten durch eine Panning-Methode, bei der CD8⁺ T-Zellen mit Antikörpern markiert wurden, um durch die Bindung an mit Ziegen-Anti-Maus Antikörper-beschichteten Petrischalen immobilisiert zu werden.
- 2) Da die *in vitro* Panning-Methode immer zu einem Verlust von Effektorzellen führte, wurde der CD8-Antikörper (CD8.1) zusätzlich in die Versuchstiere intraperitoneal injiziert. Die humanen Zellen wurden somit vor und nach der Inokulation mit dem Antikörper behandelt. Nach 72 h erhielten die Versuchstiere eine weitere Injektion des Antikörpers. Diese *in vivo* Behandlung führte in den Versuchstieren zu einer fast kompletten Depletion der CD8⁺ T-Zellen innerhalb weniger Tage. In der überwiegenden Anzahl der Experimente wurde in den aus verschiedenen murinen Zielorganen der xGvH-erkrankten Versuchstieren wiedergewonnenen humanen Zellen aufgrund der *in vivo* Depletion ein Anteil von weniger als 1% an CD8⁺ Zellen gefunden.
- 3) Erst durch die magnetische Zellseparation wurde der Anteil der CD8⁺ T-Zellen von 15 bis 31% in den unbehandelten Inokula auf unter 0,5% gesenkt (Abbildung 3.18d-f). In allen Versuchen (n=12) wurde eine fast vollständige Depletion der CD8⁺ T-Zellsubpopulation erreicht.

In allen Experimenten wurde jedoch eine Erhöhung des Anteils der CD4⁺ T-Zellen im Vergleich mit dem unbehandelten Inokula (37-54%) von 54 bis über 70% beobachtet. Die magnetische Zellseparation (MACS) führte somit zu hochreinen T-Zellpopulationen. Die im Eluat enthaltenen humanen CD4⁺ T-Lymphozyten standen somit ohne störende Antikörper-Markierung für die *in vivo* Versuche zur Verfügung. Die Anreicherung der humanen CD4⁺ T-Lymphozyten durch die Depletion der zytotoxischen T-Zellen führte in allen Versuchen (n=12) zu einer relativen Erhöhung des CD4⁺ Anteils auf bis zu 72%. Wie aus Abbildung 3.18d-f ersichtlich, wurde die sehr hohe Reinheit der gewünschten T-Zellsubpopulationen über durchflußzytometrische Analysen bestätigt. Die Depletionstechniken (Panning und MACS) führten jedoch zu starken Verlusten von unmarkierten humanen T-Zellen (bis 50%),

so daß hierdurch nur kleine Versuchstiergruppen mit humanen T-Zellen inokuliert werden konnten.

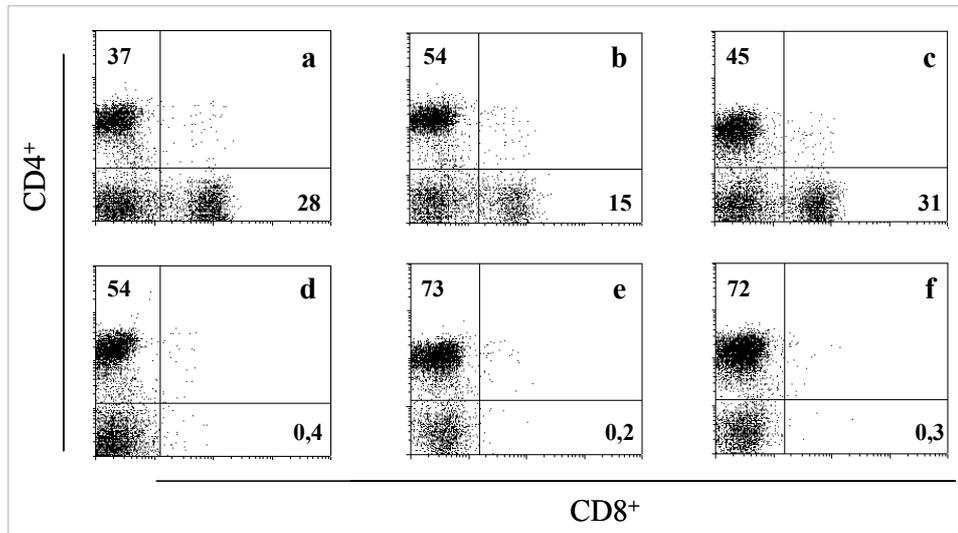


Abbildung 3.18: Durchflußzytometrische Analysen belegten, daß die magnetische Zellseparation zu hochreinen humanen CD4⁺ T-Zellsubpopulationen führte. Die humanen Zellen wurden mit direktmarkierten anti-CD4 und anti-CD8 mAb angefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. Im Vergleich zu unseparierten humanen Zellen (a-c) wurde durch die CD8⁺ Depletion (d-f) mit Hilfe der magnetischen Zellseparation (MACS) in allen Versuchen (n=12) eine Verringerung des Anteils der zytotoxischen T-Zellen von 15-30% auf unter 0,5% erreicht. Die intraperitoneale Injektion der humanen CD4⁺ T-Zellen induzierte in allen Versuchstieren eine letale Graft-versus-Host-Erkrankung. In den Quadranten sind die prozentualen Anteile der humanen CD4⁺ und CD8⁺ Zellen vermerkt.

Die Inokulation der isolierten CD4⁺ T-Zellen in die C.B-17-*scid*-Versuchstiere löste in 32 von 34 Experimenten eine letale xenogene Graft-versus-Host-Erkrankung aus. Die Kontrolltiere, die mit unseparierten T-Zellen inokuliert wurden, entwickelten bei 65 von 66 Versuchen eine xGvHD (Tabelle 3.2). Der Verlust der CD8⁺ T-Zellen hatte also keinen Einfluß, da in über 95% der Versuche weiterhin eine letale xGvHD ausgelöst wurde. Damit wurde gezeigt, daß die humanen zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen der CD2⁺ Subpopulation nicht für die Induktion dieser Erkrankung verantwortlich waren. Die Inokulation dieser hochreinen 5×10^7 CD4⁺ humanen T-Zellen löste innerhalb von 13 Tagen in den C.B-17-*scid*-Versuchstieren in 11 von 12 Versuchen eine letale xGvHD aus. Die unseparierten humanen Zellen induzierten in allen Kontrolltieren einen übereinstimmenden Verlauf der Erkrankung (Tabelle 3.2). Mit diesen Ergebnissen wurde belegt, daß die humanen CD4⁺ T-Zellen für die Ausbildung dieser letal verlaufenden Abstoßungsreaktion verantwortlich waren.

Tabelle 3.2: Induktion einer letalen xGvHD in *scid*-Versuchstieren durch die Inokulation humaner CD4⁺T-Zellen ^{1) 2)}

Anzahl Experimente	Anzahl Versuchstiere	Ausbildung einer letalen xGvHD nach Inokulation (in Tagen)	
		Zellen, unsepariert	CD4 ⁺ T-Zellen
66	66	65 / 66	-
34	34	-	32 / 34

¹⁾ Die Inokulation von jeweils 5×10^7 CD4⁺ humanen Lymphozyten induzierte eine letal verlaufende Graft-versus-Host-Erkrankung bei 32 von 34 Versuchstieren. ²⁾ Die Versuchstiere der Kontrollgruppe, die mit unseparierten, humanen Zellen inokuliert wurden, zeigten dementsprechend in 65 von 66 Versuchen die Ausbildung einer xGvHD.

Da einige Arbeitsgruppen, wie Gress et al. und de Kroon et al., ein xenoreaktives Potential humaner CD8⁺ T-Zellen beobachteten, sollte die Frage untersucht werden, ob die CD8⁺ T-Zellen auch ohne Mitwirkung der CD4⁺ T-Zellen eine letale xGvHD induzierten oder ebenso wie die B-Zellen nur eine CD4⁺ T-Zell-unterstützende Funktion im SCIDHu-Tiermodell besaßen [84, 66]. Diese Fragestellung sollte über die Inokulation von angereicherten CD8⁺ T-Zellen untersucht werden.

3.4.3 Fehlende Ausbildung einer xGvHD nach Inokulation humaner CD8⁺ T-Zellen

Durch die Depletion der CD4⁺ T-Zellen wurde in allen Versuchen eine Anreicherung der CD8⁺ T-Zellen von 20% auf fast 50% erreicht (Abbildung 3.19). Die Inokulation von isolierten CD8⁺ humanen T-Zellen (Depletion der CD4⁺ T-Zellen) löste in keinem der Versuche (n=8) eine letale xenogene Graft-versus-Host-Erkrankung in den *scid*-Mäusen aus. Zwar wurden auch bei den mit CD8⁺ T-Zellen inokulierten Versuchstieren (n=8) Schwankungen bei der Gewichtsentwicklung nachgewiesen, jedoch wurden während des gesamten Beobachtungszeitraums (68 Tage) keine charakteristischen xGvHD-Symptome beobachtet (Abbildung 3.20). Diese Befunde belegten, daß die humanen CD8⁺ T-Zellen bei dieser xGvHD Abstoßungsreaktion keine ursächliche Rolle spielten. Sie nahmen ebenso wie Monozyten, Makrophagen und B-Zellen allenfalls eine unterstützende Funktion wahr.

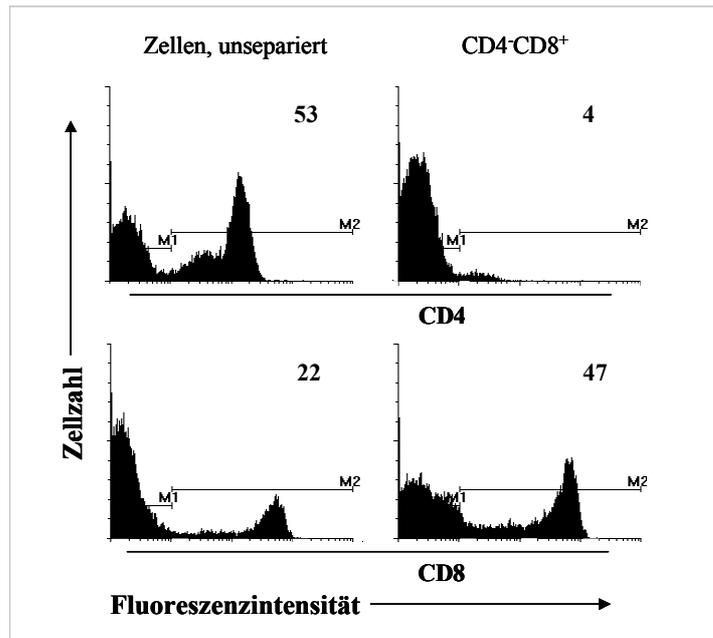


Abbildung 3.19: Die Depletion der CD4⁺ T-Zellen mittels Panning führte zur Anreicherung humaner zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen. Die humanen Zellen wurden mit direktmarkierten CD4 und CD8 mAb angefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. In den durchgeführten Versuchen wurden Anreicherungen der CD8⁺ T-Zellen von 20% auf knapp 50% erreicht. In dem Bereich M2 sind die prozentualen Anteile der humanen CD4⁺ und CD8⁺ Zellen vermerkt.

Die Isolierung von CD8⁺ T-Zellen durch die Panning-Technik führte nicht zu komplett aufgereinigten Subpopulationen. Die geringen Anteile von CD4⁺ T-Zellen (4%) nahmen jedoch keinen Einfluß auf die Auslösung der xGvHD, da die angereicherten CD8⁺ T-Zellen nicht in der Lage waren, eine letale xGvHD bzw. eine typische Krankheitssymptomatik auszulösen.

Im vorherigen Abschnitt 3.4.2 wurde jedoch gezeigt, daß die humanen CD4⁺ T-Zellen in der überwiegenden Anzahl der Versuche (32 von 34) das xenoreaktive Potential besaßen, eine letale Abstoßungsreaktion in den *scid*-Versuchstieren (n=34) auszulösen. Mit den Versuchsbefunden einer nicht induzierten xGvHD nach Inokulation humaner CD8⁺ T-Zellen wurde die Frage aufgeworfen, welche Subpopulation der CD4⁺ T-Zellen für die Induktion der Erkrankung verantwortlich war. Einerseits könnten die ruhenden, naiven humanen CD4⁺CD45RA⁺ T-Zellen und andererseits die schon im Spender aktiviert vorliegenden CD4⁺CD45RO⁺ T-Zellen für die Ausbildung der Erkrankung verantwortlich sein.

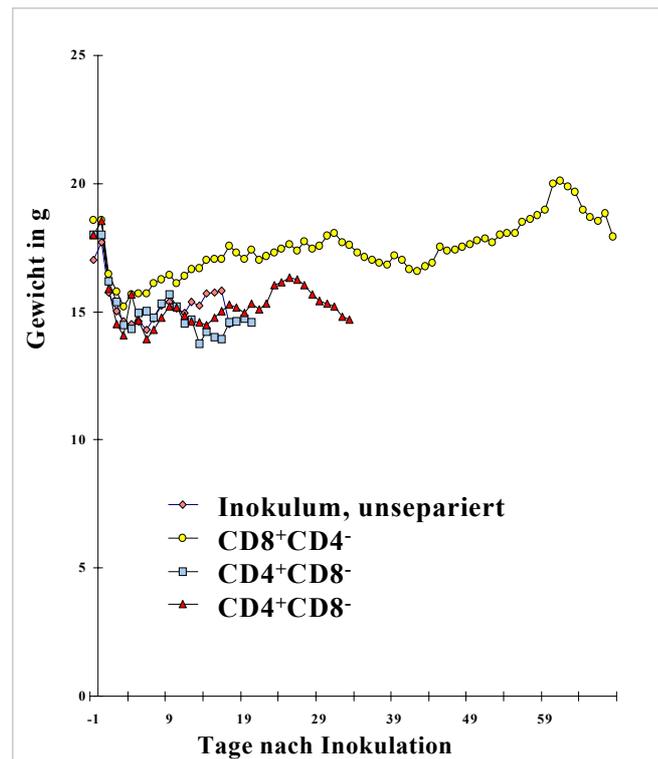


Abbildung 3.20: Exemplarische Darstellung der Entwicklung des Körpergewichts von *scid*-Versuchstieren nach Inokulation von unseparierten, CD4⁺ (n=2) und CD8⁺ humanen T-Zellen eines Spenders. Die Inokulation von je 5×10^7 unseparierten und CD4⁺ T-Zellen induzierte innerhalb von 17, 20 bzw. 33 Tagen eine letale xGvHD in den Versuchstieren. Im Gegensatz hierzu löste die Inokulation von 5×10^7 CD8⁺ humanen T-Zellen innerhalb von 68 Tagen keine xGvHD-Symptomatik in den *scid*-Mäusen aus.

3.4.4 Induktion einer letal verlaufenden xGvHD durch humane naive CD4⁺ CD45RA⁺ T-Zellen

Die humanen CD4⁺ T-Zellen induzierten in den eingesetzten C.B-17-*scid*-Versuchstieren eine letal verlaufende xGvHD. Daraus ergab sich die Frage, ob diese Erkrankung durch murine Antigene, die von MHC II-Molekülen präsentiert werden müssten, und damit durch *in vivo* aktivierte T-Zellen oder durch im Spender bereits aktiviert vorliegende CD45RO⁺ T-Zellen in den Versuchstieren ausgelöst wurde. Auf der Basis der Expression der CD45-Isoform sollte geklärt werden, ob die im Inokulum vorliegenden aktivierten CD45RA⁺RO⁺ Zellen selektiv in der murinen Umgebung überlebten und bei der Induktion der xenogenen Graft-versus-Host-Reaktion von Bedeutung waren. Die ruhenden CD45RA⁺RO⁻ T-Zellen sollten dahingehend analysiert werden, ob sie im murinen Milieu spezifisch Xeno-Antigene erkannten und durch diese aktiviert wurden.

Eine Voraussetzung für die Induktion der letalen xGvHD durch naive Zellen war somit die Erkennung von murinen Antigenen, die einen stimulierenden und aktivierenden Einfluß auf die naiven humanen T-Zellen ausübten. Mit der Entfernung der aktivierten $CD45RA^+R0^+$ Memory T-Zellen (schon im Spender erfolgter Antigen-Kontakt) konnte die Frage, ob die naiven, ruhenden $CD4^+CD45RA^+R0^-$ T-Zellen die Basis der xenoreaktiven Ausgangspopulation bildeten, untersucht werden.

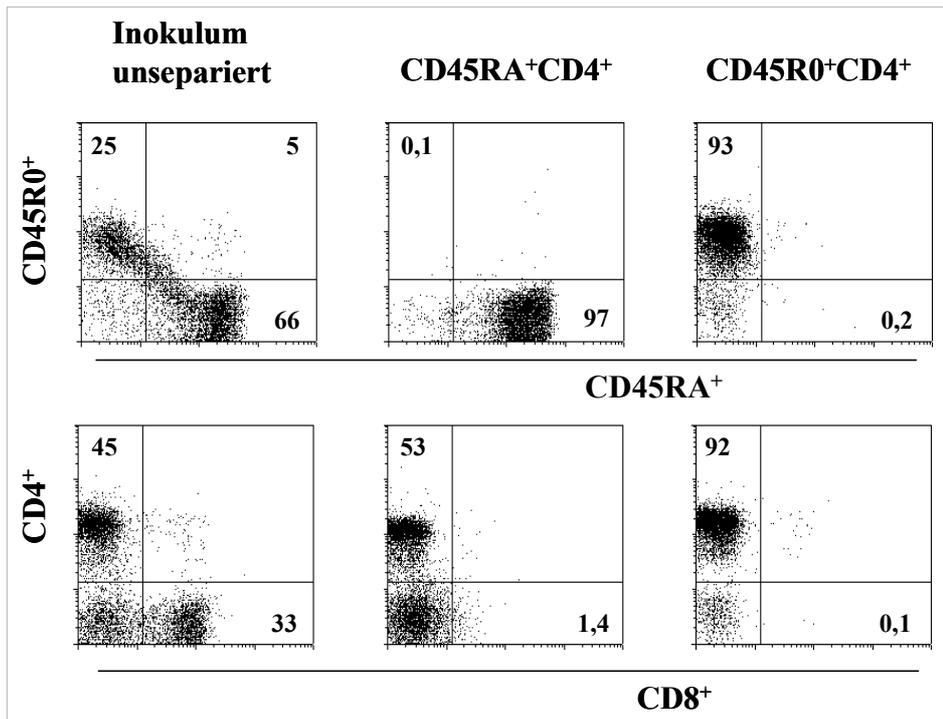


Abbildung 3.21: Effiziente Anreicherung humaner naiver $CD4^+CD45RA^+$ und $CD4^+CD45R0^+$ Memory T-Zellen mittels magnetischer Zellseparation. Gleichzeitig erfolgte eine Depletion der humanen $CD8^+$ T-Zellen. Gezeigt ist eine Anreicherung der humanen Zellen unter Verwendung von Microbead-gekoppelten CD8, CD45RA und CD45R0 mAb durch die magnetische Zellseparation (MACS). Die anschließende durchflußzytometrische Analyse erfolgte, um die unterschiedlichen T-Zellsubpopulationen für die Induktion einer xenogenen GvHD in *scid*-Mäusen zu erhalten. In den Quadranten sind die prozentualen Anteile der humanen $CD45R0^+$, $CD45RA^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ und doppelt-positiven Zellen vermerkt.

Durch die schon beschriebene Panning-Methode kam es nur zu einer unzureichenden Selektion von $CD45RA^+R0^-$ Zellen. Mit dieser Methode wurde zwar eine Anreicherung ruhender, naiver $CD45RA^+$ T-Zellen von 60% auf über 90% erreicht, allerdings verblieben geringe Anteile doppelt-positiver $CD45RA^+R0^+$ Zellen in den Inokula. Die über die Panning-Technik isolierten $CD4^+CD45RA^+$ T-Lymphozyten induzierten innerhalb von 14 Tagen in den Versuchstieren (n=3) eine letal verlaufende xGvH-Erkrankung (Tabelle 3.3).

Die CD4⁺CD45RA⁺ T-Zellen trugen somit sehr wahrscheinlich das xenoreaktive Potential, um in den *scid*-Versuchstieren eine Erkrankung zu induzieren.

Tabelle 3.3: Vergleichbares Potential humaner CD4⁺CD45RA⁺ und unseparierter T-Zellen bei der Auslösung einer letalen xGvHD¹⁾

Experiment Nr.	Anzahl Versuchstiere	Ausbildung einer letalen xGvHD nach Inokulation humaner Zellen (in Tagen)	
		Zellen, unsepariert	CD4 ⁺ CD45RA ⁺
1	3	13, 13	15
2	2	12	22
3	2	30	9
4	2	Nein (32 ^a)	9
5	3	18, 25	18
6	2	11	11
7	2	10	12
8	2	17	16
9	2	9	9
10	2	12	12
11	2	15	15
12	2	17	17
13	2	7	7

¹⁾ Die Inokulation naiver humaner CD4⁺CD45RA⁺ T-Zellen (2×10^7) induzierte in allen Versuchen (n=13) eine letal verlaufende xGvH-Erkrankung. Die Kontrollgruppe wurde mit je 5×10^7 CD4⁺ T-Zellen inokuliert und induzierte in 12 von 13 Versuchen eine letale xGvHD. ^a Dieses *scid*-Versuchstier entwickelte keine xGvHD-Symptomatik.

Da jedoch mit der Panning-Technik die doppelt-positiven CD45RA⁺R0⁺Zellen nicht komplett entfernt wurden, mußte weiterhin von einer zumindest unterstützenden Wirkung dieser im Spender aktiviert vorliegenden T-Zellen bei der Induktion der xGvH-Erkrankung ausgegangen werden. Durch den Einsatz der magnetischen Zellseparation konnten die vorliegenden Befunde überprüft werden. Die mittels MACS angereicherten T-Zellfraktionen zeigten im Vergleich mit der Panning-Technik eine sehr viel höhere Reinheit. Wie aus Abbildung 3.21 ersichtlich, kam es zu einer Anreicherung von bis zu 97% der humanen

CD4⁺CD45RA⁺ T-Zellen bei gleichzeitiger kompletter Depletion von CD4⁺CD45R0⁺ T-Zellen auf unter 0,5%. In allen Experimenten (n=10) zeigten die durchflußzytometrischen Analysen eine gleichbleibende Reinheit.

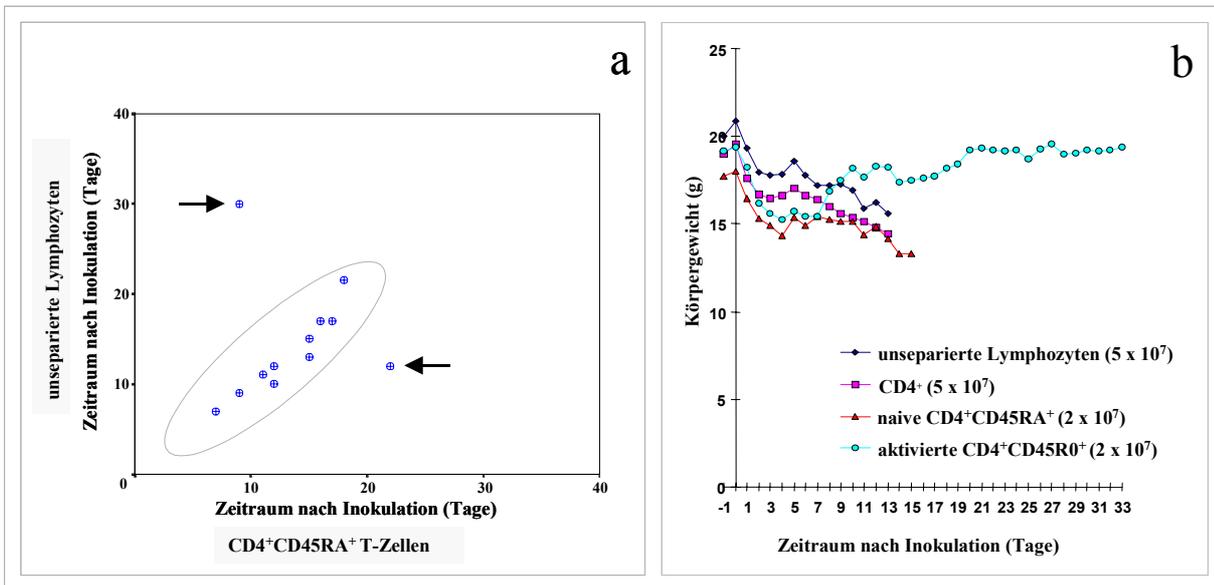


Abbildung 3.22: Korrelation von unseparierten und CD4⁺CD45RA⁺ T-Zellen bei der Induktion der xGvHD und exemplarische Darstellung der Entwicklung des Körpergewichts von *scid*-Versuchstieren nach Inokulation mit humanen T-Zellen. a) Der Korrelationskoeffizient ($r = 0,155$) war ein Beleg dafür, daß die naiven humanen T-Zellen in Übereinstimmung mit unseparierten humanen T-Zellen im gleichen Zeitrahmen eine letale xGvHD in den *scid*-Versuchstieren auslösten, wie auch aus dem Streudiagramm ersichtlich. Mit Pfeilen wurden die maximalen Überlebenszeiten gekennzeichnet. b) Eine charakteristische Gewichtsentwicklung von mit humanen T-Zellen inokulierten *scid*-Versuchstieren. Sowohl unseparierte, CD4⁺ als auch CD4⁺CD45RA⁺ T-Zellen induzierten eine letal verlaufende xGvHD. Die im Spender aktiviert vorliegenden CD45R0⁺CD4⁺ T-Zellen lösten hingegen keine xGvH-Erkrankung im *scid*-Versuchstier aus. Die eingesetzten humanen Inokula sind in Klammern angegeben.

Sogar die doppelt-positiven CD45RA⁺R0⁺ Zellen wurden durch die magnetische Separation (MACS) komplett entfernt, so daß nur noch naive T-Zellen und wenige CD45RA⁺ B-Zellen in diesen Proben vorlagen (Abbildung 3.21). Da die humanen B-Zellen der CD2⁻ Fraktion allenfalls eine unterstützende Wirkung als APC bei der Induktion der Erkrankung besaßen, konnte die Wirkung dieser Zellpopulation zunächst vernachlässigt werden (Abschnitt 3.4.1). Ebenso wie bei der CD8⁺ Depletion zeigte sich ein gewisser Verlust von unmarkierten Zellen in den Separationssäulen. Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine unspezifische Bindungskapazität der eingesetzten Depletionssäulen darstellen. Im Vergleich mit den eingesetzten Zellkonzentrationen (2×10^8 Zellen) wurden nur zwischen 20-30% (2 bis 4×10^7 Zellen) der Zellen wiedergewonnen.

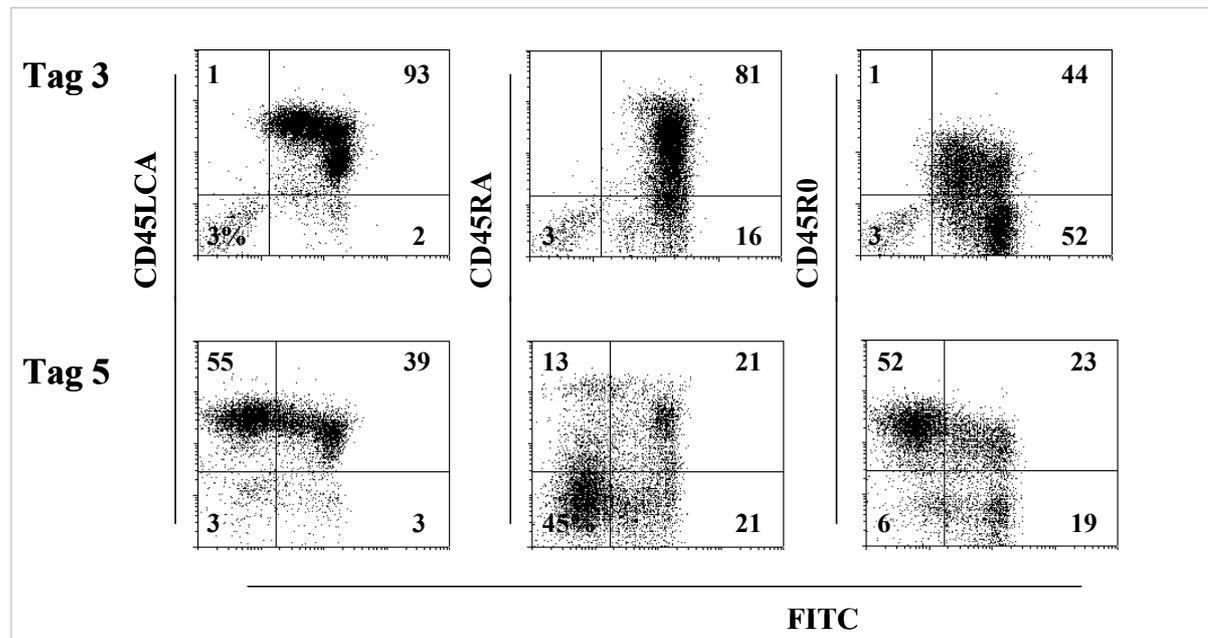


Abbildung 3.23: Die naiven FITC-markierten $CD4^+CD45RA^+$ humanen T-Zellen zeigten innerhalb von 5 Tagen ein hohes Proliferationspotential über die Abschwächung der Intensität der FITC-Markierung bei gleichzeitiger Erhöhung der $CD45R0^+$ -Expression auf. Die humanen Effektorzellen wurden an den Tagen 3 und 5 aus den Peritonealhöhlen wiedergewonnen, mit einem CD45 mAb angefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. Schon 3 Tage nach Inokulation zeigten 44% der injizierten naiven T-Zellsubpopulation eine einsetzende $CD45R0^+$ Isoformexpression. Nach 5 Tagen zeigten über 50% der humanen T-Zellen eine $CD45R0^+$ Isoformexpression bei gleichzeitigem Verlust der FITC Oberflächenmarkierung. In den Quadranten sind die prozentualen Anteile der FITC⁺ markierten humanen $CD45R0^+$, $CD45RA^+$, $CD45^+$ und einfach-positiven Zellen vermerkt.

Die Inokulation von 2×10^7 naiven humanen $CD4^+CD45RA^+$ T-Zellen induzierte in allen Versuchen (n=10) in den C.B-17-*scid*-Versuchstieren eine letal verlaufende xGvHD innerhalb von 34 Tagen (Tabelle 3.3). Die Inokulation von 5×10^7 $CD4^+$ oder unseparierten humanen Zellen induzierte in 14 von 15 Kontroll-Versuchstieren eine letale xGvHD. Wie aus Abbildung 3.22b ersichtlich, entwickelten innerhalb von 17 Tagen die mit unseparierten, $CD4^+$ und naiven $CD4^+CD45RA^+$ humanen T-Zellen inokulierten *scid*-Versuchstiere einer Versuchsgruppe eine letale xGvHD mit charakteristischer Gewichtsentwicklung. Die im Spender aktiviert vorliegenden $CD4^+CD45R0^+$ Memory T-Zellen induzierten demgegenüber keine Abstoßungsreaktion in den Versuchstieren (n=7). Die Inokulation von FITC-markierten angereicherten $CD4^+CD45RA^+$ T-Zellen zeigte nach Rückgewinnung aus den murinen Zielorganen am Tag 3 und 5 (hier: Bauchhöhle) einen deutlichen Wechsel der Expression der CD45-Isoform von RA^+ zu $R0^+$ Zellen von über 75% und damit eine Aktivierung der naiven T-Zellen zu Effektorzellen (Abbildung 3.23). Diese humanen T-Zellen verloren durch

schnelle Zellteilungsvorgänge die stabile FITC-Oberflächenmarkierung bei gleichzeitiger verstärkter Expression des Aktivierungsmarkers CD45R0⁺. Ein relativer Anteil von 23% der wiedergewonnenen humanen Zellen zeigte weiterhin eine stabile FITC-Markierung und damit eine fehlende Aktivierung dieser naiven T-Zellen. Neben den aktivierten FITC⁻ T-Zellen wurden jedoch auch FITC⁻CD45RA⁺ B-Zellen in der Peritonealhöhle nachgewiesen. Diese Zellen spielten sehr wahrscheinlich eine Rolle bei der Antigen-Präsentation oder bei einer im Hintergrund verlaufenden humoralen Immunantwort. Die Ermittlung des Pearson-Korrelationskoeffizienten ($r = 0,155$) zeigte deutlich, daß die naive humane T-Zellsubpopulation (CD4⁺CD45RA⁺) bei der Erkennung und Zerstörung von Fremdgewebe die entscheidende Rolle spielt (Abbildung 3.22a).

Diese Befunde vergrößerten die Hinweise starker Aktivierungsvorgänge humaner Zellen aufgrund der Präsentation muriner Antigene. Die Ergebnisse der Depletionsstudien von B-Zellen (Abschnitt 3.4.1) und CD8⁺ T-Zellen (Abschnitt 3.4.3) machten deutlich, daß diese Zellsubpopulationen eine allenfalls unterstützende Funktion bei der Ausbildung der xGvHD durch xenoreaktive CD4⁺CD45RA⁺ T-Zellen besitzen konnten. Eine störende Einflußnahme durch nicht ausreichend separierte Zell-Subpopulationen wurde durch den Einsatz der magnetischen Separation ausgeschlossen. Diese neuen Befunde können möglicherweise eine Grundlage für neue Therapieansätze im Bereich der Xenotransplantation bilden.

3.4.5 Fehlende Induktion einer xGvHD durch schon im Blutspender aktivierte CD4⁺CD45R0⁺ T-Zellen

Da die angereicherten naiven CD4⁺CD45RA⁺ Zellen in den inokulierten Versuchstieren eine xenogene Graft-versus-Host-Erkrankung auslösten, sollte die Frage untersucht werden, ob die Anreicherung bereits im Spender aktivierter CD4⁺CD45R0⁺ Memory T-Zellen einen Einfluß auf den Verlauf der Erkrankung in den Mäusen nehmen konnte und diese damit ein xenoreaktives Potential besaßen. Die Separation dieser T-Zellsubpopulation wurde wiederum durch Einsatz von Microbead-konjugierten Antikörpern gegen CD8⁺ T-Lymphozyten und CD45RA⁺ Zellen erreicht. Die Trennung der humanen T-Zellen durch die magnetische Separation führte zu sehr reinen CD4⁺CD45R0⁺ T-Zellsubpopulationen (Abbildungen 3.21 und 3.24). Der relative Anteil der CD45R0⁺ T-Lymphozyten erhöhte sich in allen durchgeführten Versuchen (n=7) auf über 90% (Abbildung 3.24c,d). Durchflußzytometrische Untersuchungen zeigten nur noch vereinzelte CD45RA⁺ Zellen (Anteil unter 0,2%), wie in Abbildung 3.24 dargestellt.

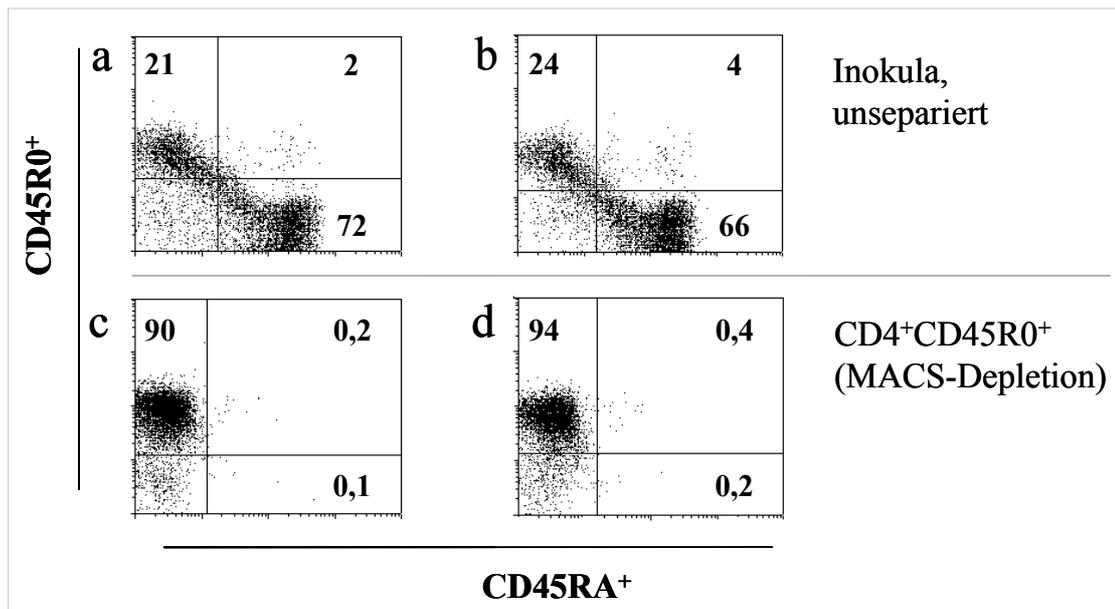


Abbildung 3.24: Anreicherung von bereits im Spender aktivierten humanen $CD4^+CD45R0^+$ Memory T-Zellen mittels magnetischer Zellseparation (MACS). Die Anreicherung der im Spender aktivierten T-Zellsubpopulation mittels MACS (c und d) führte in allen durchgeführten Experimenten (n=7) im Vergleich zu den unseparierten Zellen (a und b) zu einer Erhöhung des Anteils der $CD45R0^+$ T-Zellen von 20% auf über 90%. Die Depletion der naiven $CD45RA^+$ und doppelt-positiven humanen Zellen führte zum Absinken der relativen Anteile von über 70% auf unter 0,6%. Im Vergleich mit der Panning-Methode entstanden hochreine $CD4^+$ T-Zellsubpopulationen mit spezifischer $CD45R0^+$ Isoformexpression. Die Inokulation der angereicherten humanen Zellen führte in den C.B-17-*scid*-Versuchstieren (n=7) zu keiner Induktion einer xGvHD innerhalb des Untersuchungszeitraums. In den Quadranten sind die prozentualen Anteile der humanen $CD45R0^+$, $CD45RA^+$ und doppelt-positiven Zellen vermerkt.

Im Vergleich zu den Inokula mit einem Anteil naiver $CD45RA^+$ Zellen von ungefähr 70% zeigte sich nach der magnetischen Separation eine auf über 90% angereicherte $CD45R0^+$ T-Zellsubpopulation bei gleichzeitigem fast komplettem Fehlen (relative Anteile unter 0,6%) aller doppelt-positiver Übergangsstadien (Abbildung 3.24a,b). Der Einsatz des $CD45RA^+$ Microbead-konjugierten Antikörpers führte zu einer gleichzeitigen Depletion aller humanen B-Zellen. Da die Depletion weiterhin zu einem unspezifischen Verlust von unmarkierten Zellen führte, wurden im Vergleich mit den Inokula (2×10^8 Zellen) nur noch knapp 10% der Zellen (2×10^7) wiedergewonnen. Durch den hohen Verlust von Zellen konnten daher nur wenige Experimente (n=7) durchgeführt werden.

Die aktivierten humanen T-Zellen könnten einerseits gemeinsame Strukturen von in beiden Spezies vorkommenden Antigenen erkennen. Andererseits könnte durch überlappende Spezifitäten der humanen T-Zellrezeptoren eine Expansion dieser T-Zellklone induziert

werden. In den vorliegenden Versuchen (n=7) wurden die CD8⁺ und die CD45RA⁺ Zellsubpopulationen komplett depletiert, um so das xenoreaktive Potential der humanen CD4⁺CD45R0⁺ T-Zellen zu untersuchen. Die angereicherten CD4⁺CD45R0⁺ T-Zellsubpopulationen lösten in den Versuchstieren (n=7) keine xGvHD aus (Tabelle 3.4). Es wurden in einem Beobachtungszeitraum von 26 bis 51 Tagen keine Krankheitssymptome einer xGvHD beobachtet. Bei der durchflußzytometrischen Untersuchung der isolierten murinen Organe wurden nur sehr geringe Zahlen humaner CD4⁺CD45R0⁺ T-Zellen gefunden.

Tabelle 3.4: Unterschiedliches Potential humaner CD4⁺CD45R0⁺ und unseparierter T-Zellen bei der Induktion der letalen xGvHD in *scid*-Versuchstieren

Experiment Nr.	Anzahl Versuchstiere	Ausbildung einer letalen xGvHD nach Inokulation (in Tagen)	
		Zellen, unsepariert	CD4 ⁺ CD45R0 ⁺
1	3	13, 13	Nein (33 ^a)
2	2	12	Nein (41 ^a)
3	2	30	Nein (51 ^a)
4	2	Nein (32 ^a)	Nein (32 ^a)
5	2	9	Nein (48 ^a)
6	2	26	Nein (26 ^a)
7	2	34	Nein (34 ^a)

^a Die *scid*-Versuchstiere entwickelten keine xGvHD-Symptomatik und wurden zu den in den Klammern angegebenen Zeitpunkten untersucht. Die Inokulation von 2×10^7 im Spender aktiviert vorliegenden CD4⁺CD45R0⁺ T-Zellen führte in allen Versuchen (n=7) zu keiner Induktion einer xGvHD. In 7 von 8 Versuchstieren der Kontrollgruppe entwickelte sich nach der Inokulation von jeweils 5×10^7 CD4⁺ T-Zellen eine letale xGvH-Erkrankung.

Die mit unbehandelten T-Zellen inokulierten Kontrolltiere entwickelten innerhalb von 30 Tagen eine Graft-versus-Host-Erkrankung in 6 von 7 Versuchen (Tabelle 3.4). Dadurch wurde deutlich, daß die unseparierten humanen T-Zellen der Spender durchaus in der Lage waren, eine xGvHD auszulösen.

Die humanen CD4⁺CD45RA⁺ und unseparierten T-Zellen induzierten in den *scid*-Versuchstieren eine xGvHD mit charakteristischen Runting-Symptomen. Die Inokulation humaner CD4⁺CD45R0⁺ T-Zellen in die Versuchstiere führte zu keinerlei Symptomen einer

xGvHD. Der charakteristische Verlauf der Gewichtsentwicklung der eingesetzten C.B-17-*scid*-Versuchstiere nach Inokulation angereicherter naiver $CD4^+CD45RA^+$, angereicherter aktivierter $CD4^+CD45R0^+$, $CD4^+$ angereicherter und unseparierter humaner Zellen wurde in Abbildung 3.21 dargestellt. Demgegenüber lösten die humanen $CD4^+CD45R0^+$ T-Zellen in den *scid*-Versuchstieren keine xGvHD mit typischen Krankheitssymptomen aus. Da jedoch auch nach langen Zeiträumen humane T-Zellen in verschiedenen Organen der Mäuse gefunden wurden, stellte sich die Frage, ob diese im Spender aktiviert vorliegenden humanen Zellen ($CD4^+CD45R0^+$) durch ein eingeschränktes T-Zellrezeptor $V\beta$ -Repertoire gekennzeichnet waren.

3.4.5.1 Eingeschränktes TCR $V\beta$ -Repertoire nach Inokulation humaner $CD4^+CD45R0^+$ T-Zellen

Die injizierten humanen $CD4^+CD45R0^+$ T-Zellen lösten in den *scid*-Versuchstieren keine xGvHD aus. Ob diese Zellen jedoch nur für einen kurzen Zeitraum in den Versuchstieren überleben oder ob einige T-Zellklone in der murinen Umgebung proliferierten und in der Lage waren, eine xGvHD auszulösen, war nicht klar. Zur Beantwortung dieser Frage wurden die humanen Zellen aus den nicht erkrankten Versuchstieren (n=7) wiedergewonnen, durchflußzytometrisch untersucht und CDR3-Spektratypisierungen vorgenommen.

In allen murinen Organen der Versuchstiere wurden sehr geringe Zellzahlen humaner $CD45^+$ T-Zellen gefunden (Abbildung 3.25). Nur Milz und Bauchhöhle bildeten hierbei die einzigen Ausnahmen mit Zellzahlen deutlich über 1×10^6 Zellen. Der relative Anteil humaner $CD45^+$ T-Zellen lag 33 Tage nach Inokulation zwischen 12% (Knochenmark) und 61% (Peritonealhöhle). Diese humanen $CD4^+CD45R0^+$ T-Zellen besaßen wahrscheinlich ein deutlich geringeres xenoreaktives Potential, da es nicht zur Auslösung der xGvHD kam. Um Aufschluß über die klonale Zusammensetzung zu erhalten, wurden die humanen T-Zellen auch hinsichtlich ihrer CDR3 Spektratypen charakterisiert. Zusätzlich wurden die CDR3-Spektratypen von humanen unseparierten und $CD4^+$ T-Zellen desselben Spenders untersucht. Die unseparierten sowie die $CD4^+$ T-Zellen lösten dabei innerhalb von 11 Tagen eine xGvHD in den Versuchstieren aus.

Der Vergleich der $V\beta 21$ Spektratypen der Inokula und der humanen T-Zellen aus verschiedenen Organen xGvH-erkrankter Versuchstiere zeigte keine markanten Unterschiede (Abbildung 3.26). Die mit unseparierten Zellen inokulierte Maus zeigte nur geringe Differenzen in den Spektratypen der Familien $V\beta 21$ und $V\beta 24$. In der mit humanen $CD4^+$

T-Zellen inokulierten *scid*-Maus wurden für die Spektratypen der Familie V β 24 deutliche Expansionen beobachtet.

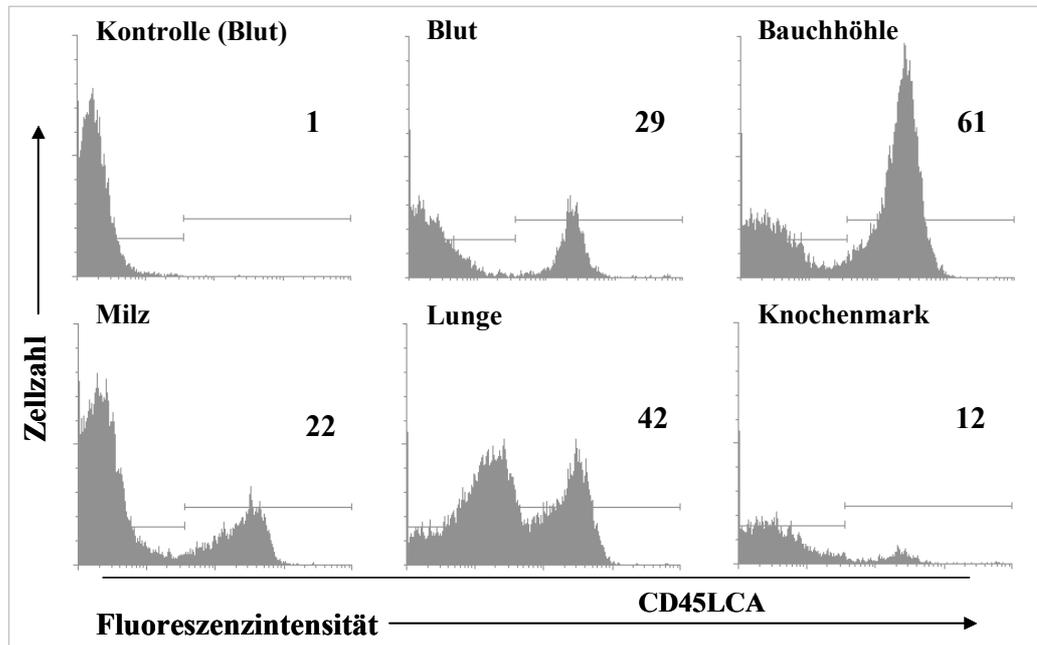


Abbildung 3.25: Die humanen bereits im Spender aktivierten CD4⁺CD45R0⁺ Memory T-Zellen (CD45⁺) lagen auch nach 33 Tagen in verschiedenen Kompartimenten einer *scid*-Maus vor. In allen untersuchten Organen wurden humane CD45⁺ Zellen nachgewiesen. Die Zellzahlbestimmung zeigte einen erhöhten Anteil humaner Zellen in der Milz (4×10^6 Zellen). Die Zahlen geben den Anteil der humanen CD45LCA⁺ Zellen wieder. Das Versuchstier zeigte zum Zeitpunkt der Untersuchung keine xGvHD-Symptome. Die angegebenen Zahlen zeigen den prozentualen Anteil humaner CD45⁺ Zellen.

Die Spektratypen der humanen CD4⁺CD45R0⁺ T-Zellen zeigten für die Familien V β 21 und V β 24 sehr eingeschränkte Muster. In allen untersuchten Organen der Familie V β 24 war dies auffallend sichtbar (Abbildung 3.26). Dies ist besonders interessant, da aus den murinen Organen zum Teil erheblich unterschiedliche, absolute Zellzahlen humaner T-Zellen, wie aus Knochenmark ($0,02 \times 10^6$) und Milz ($4,2 \times 10^6$), wiedergewonnen wurden. Die resultierenden CDR3-Bandenmuster reflektierten das Überleben von wenigen humanen T-Zellen. Über deren Xenoreaktivität konnte mit dem Verfahren der Spektratyp-Analyse keine einwandfreie Aussage gegeben werden.

Durch diese Versuche wurde deutlich, daß im Spender aktiviert vorliegende humane T-Zellen in der murinen Umgebung durchaus überleben konnten. Möglicherweise waren sie auch in der Lage zu proliferieren. Die starken Expansionen der schon im Spender aktivierten T-Zellen könnten die überlappenden Spezifitäten der humanen T-Zellrezeptoren, die sowohl in der Milz als auch in anderen murinen Organen stattfanden, reflektieren. Diese

„xenoreaktiven“ humanen T-Zellen lösten jedoch keine xGvHD in den Versuchstieren aus. Eine Ursache hierfür könnte die geringe Zellzahl der injizierten humanen Zellen sein, da ein Großteil der im Spender aktivierten humanen T-Zellen durch Absterben zu einer weiteren Verringerung der Zellzahl führte. Die Zahl der humanen Zellen erreichte dabei nicht den Schwellenwert, der sehr wahrscheinlich den limitierenden Faktor bei der Ausbildung einer Erkrankung darstellte.

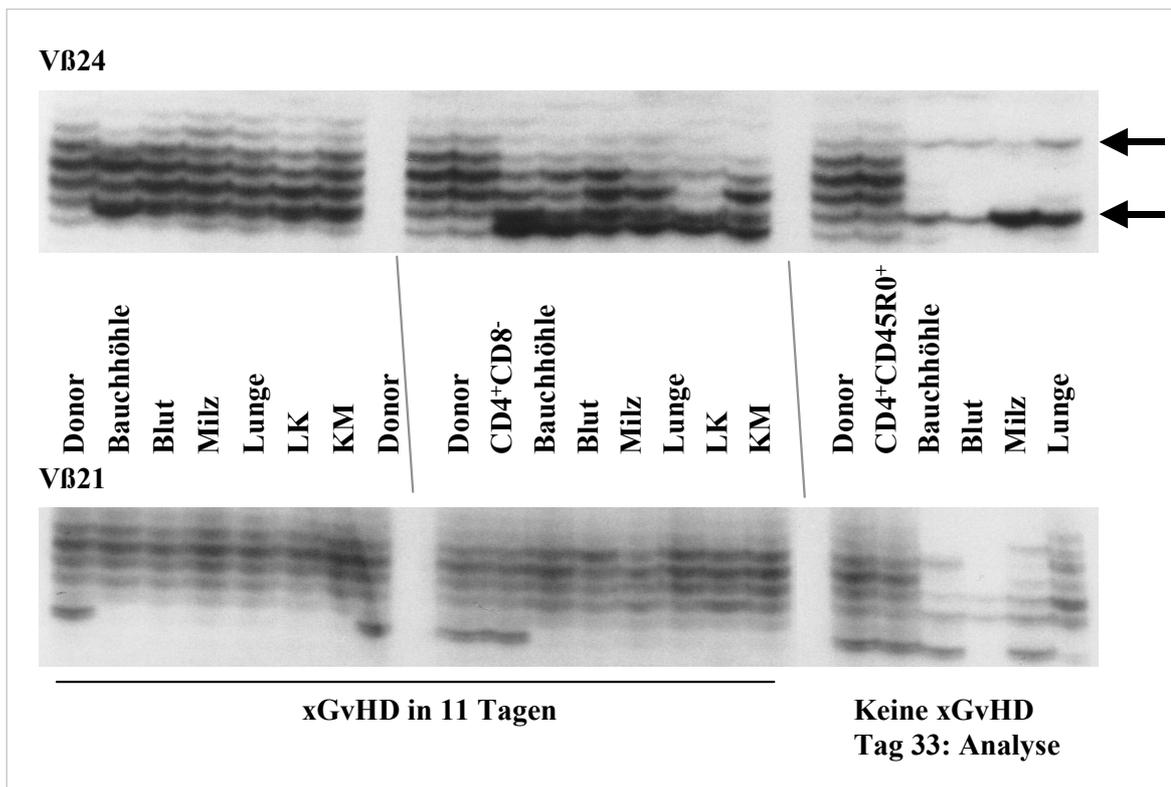


Abbildung 3.26: Analyse der CDR3 Spektratypen der Familien VB24 und VB21 von humanen, im Spender aktivierten, $CD4^+CD45R0^+$ T-Zellen nach Wiedergewinnung aus nicht erkrankten *scid*-Mäusen. Die *scid*-Versuchstiere wurden mit jeweils 5×10^7 unseparierten und $CD4^+$ T-Zellen inokuliert und zeigten innerhalb von 11 Tagen Krankheitssymptome einer xGvHD. Die Inokulation von 2×10^7 $CD4^+CD45R0^+$ T-Zellen löste nach 33 Tagen keine Erkrankung aus.

Da neben naiven T-Zellen auch bereits im Spender aktivierte humane T-Zellen ein geringes Proliferationspotential in der murinen Umgebung besaßen, stellte sich die Frage, ob die durch die murinen Antigene aktivierten humanen Effektor T-Zellen auch nach Rückgewinnung weiterhin in der Lage waren, xenogenes Gewebe zu erkennen und zu zerstören. Diese Fragestellung war auch insofern sehr interessant, da die Arbeitsgruppe Tary-Lehmann et al. beobachtete, daß die humanen Zellen nach Wiedergewinnung aus *scid*-Versuchstieren in einem anergen Zustand vorlagen [24].

3.4.6 Induktion der xGvHD nach seriellem Transfer von *in vivo* aktivierten humanen CD4⁺CD45R0⁺ T-Zellen

Ob die in der Maus neu aktivierten humanen T-Zellen das xenoreaktive Potential besaßen, um weiterhin murine Gewebe abzustößen, sollte durch den seriellen Transfer dieser CD4⁺CD45R0⁺ Effektorzellen aus xGvH-erkrankten Primärempfängern in Sekundärempfänger untersucht werden. Die aus verschiedenen Organen erkrankter C.B-17-*scid*-Versuchstiere wiedergewonnenen humanen Zellen zeigten eine hohe Variabilität der absoluten Zellzahlen. Die Inokulation von weniger als 2×10^7 CD4⁺ T-Zellen aus einem Primärempfänger induzierte in den Sekundärempfängern (1:1 Übertragung) keine xGvH-Erkrankung. Die aus verschiedenen murinen Kompartimenten wiedergewonnenen *in vivo* aktivierten humanen T-Zellen reichten also nicht aus, um eine Erkrankung auszulösen.

Aufgrund dieser Befunde wurde es erforderlich, die humanen Zellen mehrerer Primärempfänger zu sammeln. Um genügend hohe Zellzahlen für die Induktion der xGvHD einsetzen zu können, wurden die humanen Zellen eines Spenders aus mehreren Primärempfängern wiedergewonnen und als Pool in die Sekundärempfänger injiziert. Bei Auftreten typischer Krankheitssymptome einer xGvHD im gleichen Zeitrahmen wurden die humanen Zellen eines Blutspenders aus verschiedenen Organen der Primärempfänger wiedergewonnen. Nach der Bestimmung der Zellzahlen und der Zellvitalität wurden die gesammelten humanen Zellen durchflußzytometrisch untersucht.

Der serielle Transfer von $2-5 \times 10^7$ CD4⁺ Zellen in sekundäre Empfängertiere löste in allen Sekundärempfängern eine letal verlaufende Graft-versus-Host-Erkrankung aus (Tabelle 3.5). Die aus *scid*-Primärempfängern gewonnenen *in vivo* aktivierten humanen Zellen besaßen also weiterhin ein xenoreaktives Potential um murines Gewebe zu schädigen und innerhalb kurzer Zeit ($\bar{x}=10 \pm 6.8$) eine xGvHD zu induzieren. Die sekundären Empfängertiere (n=15) entwickelten dabei die typischen Symptome einer xGvHD signifikant früher als die primären Empfängertiere, wie durch den Wilcoxon-Test gezeigt wurde ($p = 0,009$). Die aus erkrankten Sekundärempfängern wiedergewonnenen humanen Zellen zeigten im Vergleich zu denen der Primärempfänger zusätzlich eine verstärkte Infiltration in verschiedene murine Organe, wie hier exemplarisch am Beispiel einer Milz dargestellt (Abbildung 3.27).

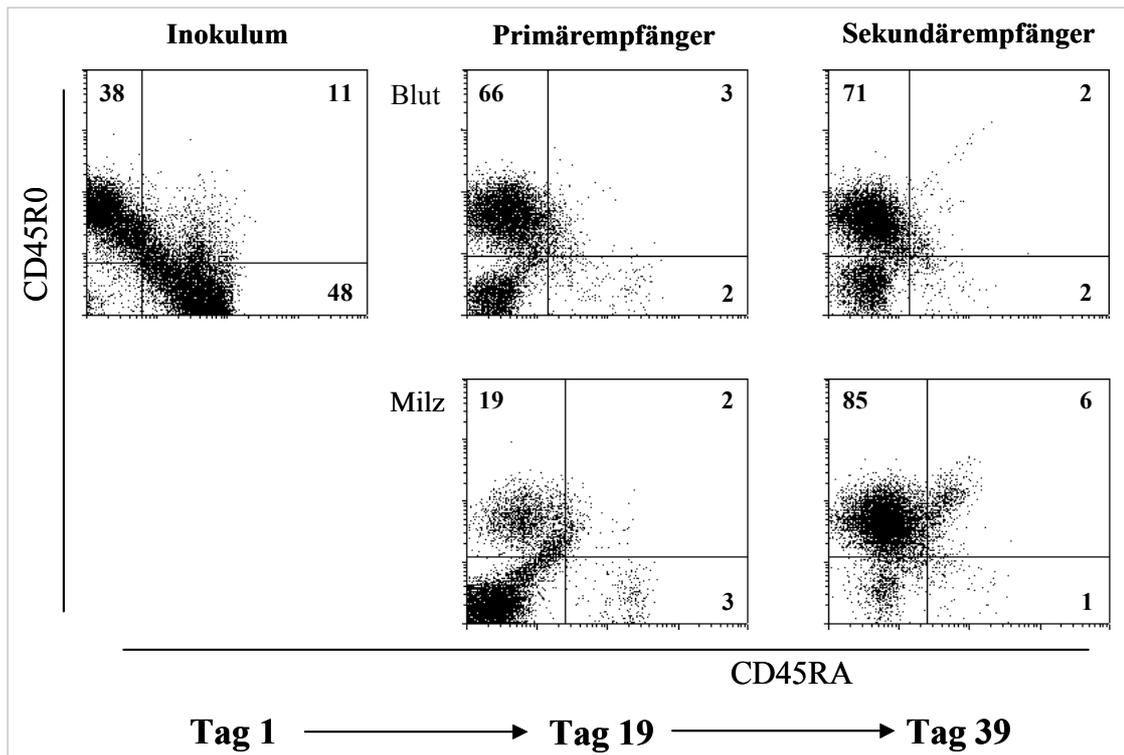


Abbildung 3.27: Relative Anreicherung wiedergewonnener humaner T-Zellen aus einem xGvH-erkrankten sekundären *scid*-Empfängertier im Vergleich zum erkrankten Primärempfänger. Die Inokulation von 5×10^7 humanen $CD4^+$ T-Zellen induzierte innerhalb von 19 Tagen in den Primärempfängern (n=2) eine letale xGvHD. Die Injektion von 3×10^7 dieser aus Primärempfängern wiedergewonnenen *in vivo* aktivierten humanen $CD4^+$ T-Zellen löste im Sekundärempfänger nach weiteren 20 Tagen eine xGvHD aus. Die *in vivo* aktivierten humanen Zellen aus Primärempfängern (Tag 39) infiltrierten dabei verstärkt in die murinen Gewebe der Sekundärempfänger. Der relative Anteil $CD45R0^+$ humaner Zellen in den Milzen stieg von knapp 20% im Primärempfänger auf über 85% im Sekundärempfänger. In den Quadranten sind die prozentualen Anteile der humanen $CD45R0^+$, $CD45RA^+$ und doppelt-positiven Zellen vermerkt. (Exemplarische Darstellung von Experiment Nr. 13)

Da gleichzeitig in den Bauchhöhlen dieser Versuchstiere sehr wenige humane Zellen wiedergefunden wurden, migrierten die *in vivo* aktivierten humanen Zellen innerhalb kürzerer Zeit in die verschiedenen murinen Organe. Die Inokulation von $1-2 \times 10^7$ $CD4^+$ Zellen in die sekundären Empfängertiere (n=4) führte zu keiner Ausbildung der Erkrankung (Daten nicht gezeigt). Hieraus folgte, daß ein entscheidendes Kriterium für einen erfolgreichen seriellen Transfer und für die Induktion der xGvHD die eingesetzte humane Zellzahl war. Darüberhinaus wurde deutlich, daß die in der Maus neu aktivierten humanen T-Zellen nicht in einem anergen Zustand vorlagen, sondern weiterhin durch eine hohe Xenoreaktivität gekennzeichnet waren.

Tabelle 3.5: Der serielle Transfer *in vivo* aktivierter humaner CD4⁺ T-Zellen aus erkrankten Primärempfängern induzierte in Sekundärempfängern eine letale xGvHD ¹⁾

Experiment Nr.	Anzahl Primär-Empfänger	Zeitpunkt der T-Zell-Wiedergewinnung ^a	Anzahl Sekundär-Empfänger	Ausbildung einer xGvHD (in Tagen)
1	3	14	2	3, 7
2	3	10	1	10
3	5	18	1	5
4	5	15	1	11
5	5	15	1	11
6	3	10	1	10
7	3	15	1	7
8	4	12	1	6
9	4	8	1	7
10	4	13	1	4
11	2	10	1	8
12	3	10	1	30
13	2	19	1	20
14	3	12	1	11

^a Tage nach Inokulation humaner T-Zellen, variables Auftreten der xGvHD-Symptomatik. In zwei Versuchen verstarb je 1 Versuchstier 24h vor Wiedergewinnung mit typischer Krankheitssymptomatik.

¹⁾Die *scid*-Versuchstiere wurden mit $2-5 \times 10^7$ CD4⁺ humanen CD4⁺ T-Zellen inokuliert.

Da für die ersten Experimente eine Mischung humaner Zellen aus verschiedenen murinen Zielorganen genutzt wurde, stellte sich die Frage, ob die Zusammensetzung der *in vivo* aktivierten humanen Zellen einen Einfluß auf die Induktion dieser Erkrankung nahm. Um dies zu testen, wurden die aktivierten humanen Zellen aus Proben einzelner Organe der Primärempfängertiere (Milz, Lymphknoten, Lunge) gesammelt. Diese wurden im Anschluß in Sekundärempfänger injiziert. Je nach Herkunftsorgan lösten die humanen Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten eine letale xGvHD aus.

Der serielle Transfer humaner Zellen aus den Milzen der Primärempfänger induzierte innerhalb von 15 Tagen eine letal verlaufende Graft-versus-Host-Erkrankung (Tabelle 3.6). Der serielle Transfer der *in vivo* aktivierten humanen Zellen aus Lunge und Lymphknoten

löste eine letale xGvH-Erkrankung erst nach 30 bzw. 40 Tagen aus. Die Zweitempfänger entwickelten dabei immer charakteristische Runting-Symptome.

Table 3.6: Effektorenpool humaner *in vivo* aktivierter Zellen aus muriner Milz, Lunge und Lymphknoten primärer Empfänger induzierte in Sekundärempfängern eine letale xGvHD ¹⁾

Anzahl Erst-Empfänger	Zeitpunkt der T-Zell-Wiedergewinnung ^a	Organpool der <i>in vivo</i> aktivierten T-Zellen	Anzahl Sekundär-Empfänger	Ausbildung einer xGvHD (in Tagen)
4	15	Milz	1	15
4	15	Lunge	1	30
4	15	Lymphknoten	1	40

^a Tage nach Inokulation, variabel abhängig vom Auftreten der xGvHD-Symptomatik. ¹⁾ Die *scid*-Versuchstiere wurden mit je 3×10^7 CD4⁺ humanen CD4⁺ T-Zellen aus verschiedenen Organen erkrankter Primärempfänger inokuliert.

Die vorliegenden Befunde zeigten, daß die *in vivo* aktivierten humanen CD4⁺CD45R0⁺ T-Zellen aus erkrankten Primärempfängern diese Erkrankung auch in sekundären Versuchstieren auslösten. Ebenso waren auch *in vivo* aktivierte CD4⁺CD45R0⁺ T-Zellen aus einzelnen Organen der Primärempfänger in der Lage, eine xGvHD auszulösen. Auf die Induktion der xGvHD nahm die Zellzahl der injizierten humanen Zellen einen entscheidenden Einfluß. Zu geringe (unter 2×10^7 Zellen/Versuchstier) Zellzahlen lösten keine xGvHD in den Sekundärempfängern aus.

Mit dem Befund, daß die *in vivo* aktivierten humanen Zellen nach seriellem Transfer in Sekundärempfängern auch eine letale xGvHD auslösen konnten, wurde die Frage aufgeworfen, ob der Transfer dieser xenoreaktiven Zellen zu einer weiteren Einschränkung der Diversität des TCR V β -Repertoires der humanen Zellen führte.

3.4.6.1 Veränderung des TCR V β -Repertoires nach seriellem Transfer in sekundäre Empfängertiere

Um zu klären, ob es zu weiteren Expansionen xenoreaktiver T-Zellklone nach dem Transfer in Sekundärempfänger kommt, wurden die CDR3 Spektratypen der wiedergewonnenen humanen Zellen von primären und sekundären Empfängern miteinander verglichen. Um genügend hohe Zellzahlen für die Induktion der xGvHD einsetzen zu können,

wurden wiederum aus mehreren Primärempfängern die humanen Zellen wiedergewonnen und als Pool in die Sekundärempfänger injiziert.

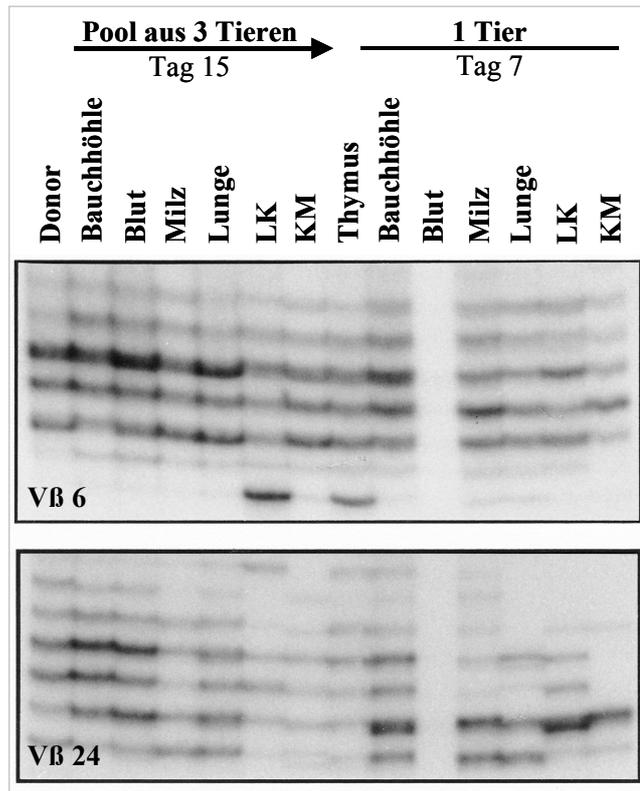


Abbildung 3.28: Analyse der CDR3 Spektratypen der Familien VB6 und VB24 von *in vivo* aktivierten humanen $CD4^+CD45R0^+$ T-Zellen nach Wiedergewinnung aus primären und sekundären *scid*-Empfängertieren (Experiment Nr. 7 aus Tabelle 3.5). Alle *scid*-Versuchstiere zeigten eine ausgeprägte xGvHD. Die primären Versuchstiere (n=3) wurden am Tag 15 nach Manifestation der xGvHD analysiert. Die aus Primärempfängern wiedergewonnenen humanen Zellen induzierten innerhalb von 7 Tagen eine xGvHD in dem Sekundärempfänger (n=1).

Der Vergleich der CDR3-Spektratypen der primären und sekundären Empfänger mit dem Inokulum (Donor) zeigte eine erhebliche Verminderung der Diversität des T-Zell-Rezeptor-Repertoires (Abbildung 3.28). In den untersuchten wiedergewonnenen humanen Zellen aus verschiedenen murinen Organen wurden einige spezifische Banden beobachtet, die im Vergleich zu dem Inokulum sehr viel stärker ausgebildet waren. Zusätzlich wurden auch organspezifische Unterschiede im TCR-Repertoire gefunden. Als Ursache für diese Einschränkungen bei den CDR3-Spektratypen kamen schnelleres Absterben sehr vieler T-Zellklone oder verstärkte Expansionen xenoreaktiver T-Zellklone in Betracht. Im Vergleich zu den Primärempfängern wurde in den Sekundärempfängern nach Inokulation eine verstärkte Migration der humanen T-Zellen beobachtet. Die gezielte Einwanderung *in vivo* aktivierter humaner T-Zellen in die einzelnen murinen Organe induzierte in der überwiegenden Anzahl

der Versuche (10 von 14) eine xGvHD. Insgesamt zeigten diese Daten, daß es im Verlauf der Graft-versus-Host-Erkrankung zu ausgeprägten Expansionen offensichtlich xenoreaktiver T-Zellklone kam. In allen Versuchen (n=14) wurde darüberhinaus eine ausgeprägte Expansion einzelner V β -Familien gefunden, wie hier am Beispiel der V β 6 und V β 24 des Experiments Nr. 7 gezeigt (V β 3, 21 und 23 nicht dargestellt).

3.4.7 Resümee der Depletionsstudien humaner Zellen bei der Induktion der xGvHD

Die Ergebnisse der Depletionsstudien zeigten, daß die naiven humanen CD4⁺CD45RA⁺ T-Zellen die letale xGvHD in der Maus auslösten, wie aus Tabelle 3.7 ersichtlich.

Tabelle 3.7: Effekt von humanen T-Zellen und einzelnen Subpopulationen bei der Ausbildung der letalen xenogenen Graft-versus-Host-Erkrankung (xGvHD)

Humane Zellen		Zellzahl	Induktion einer letalen xGvHD in den <i>scid</i> -Versuchstieren ¹	
1. CD2 ⁺ und CD2 ⁻	unseparierte Zellen	5 x 10 ⁷	Ja (n=65)	
2. CD2 ⁺	CD4 ⁺ und CD8 ⁺	5 x 10 ⁷	Ja (n=9)	-
3. CD2 ⁻	M ϕ / Monozyten / B-Zellen*	5 x 10 ⁷	-	Nein (n=5)
4. CD4 ⁺	CD45RA ⁺ und CD45R0 ⁺	5 x 10 ⁷	Ja (n=32)	-
5. CD8 ⁺	CD45RA ⁺ und CD45R0 ⁺	5 x 10 ⁷	-	Nein (n=8)
6. CD4 ⁺ CD45RA ⁺	naive ruhende Zellen	2 x 10 ⁷	Ja (n=14)	-
7. CD4 ⁺ CD45R0 ⁺	im Spender aktiviert	2 x 10 ⁷	-	Nein (n=6)
8. CD4 ⁺ CD45R0 ⁺	in Primärempfänger aktiviert	>2 x 10 ⁷	Ja (n=15)	-
9. CD4 ⁺ CD45R0 ⁺	in Primärempfänger aktiviert	<2 x 10 ⁷	-	Nein (n=4)

1.-7. Primärempfänger / 8. und 9. Sekundärempfänger ¹ Anzahl der Versuchstiere in Klammern angegeben. *Zellen könnten eine unterstützende Funktion bei der Ausbildung der xGvHD besitzen. (Grau unterlegt sind die xGvHD auslösenden humanen Zellsubpopulationen.)

Dementsprechend führte die Inokulation *in vivo* aktivierter humaner CD4⁺ T-Zellen aus xGvH-erkrankten Versuchstieren in den Sekundärempfängern zur Ausbildung der xGvHD. Allerdings zeigten die Befunde des seriellen Transfers dabei eine Korrelation zwischen

injizierter Zellzahl humaner CD4⁺ T-Zellen und der Ausprägung dieser Erkrankung. Demgegenüber lösten die humanen CD8⁺, die im Spender aktivierten CD4⁺CD45R0⁺ T-Zellen und die CD2⁻ Zellen, wie Makrophagen, Monozyten und B-Zellen, keine xGvHD in den *scid*-Versuchstieren aus.

3.5 Charakterisierung des Aktivierungs- und Differenzierungsstatus humaner Effektorzellen nach Ausbildung der xGvHD

Da die humanen T-Zellen nach Wiedergewinnung aus xGvH-erkrankten *scid*-Versuchstieren durch spezifische Aktivierungs- und Differenzierungsprozesse gekennzeichnet waren, sollte die Frage, ob die humanen T-Zellen in der späten Effektorphase durch die Expression von spezifischen Zytokinen und Apoptose-induzierenden Molekülen gekennzeichnet waren, untersucht werden. Hierfür wurden aus unterschiedlichen Kompartimenten xGvH-erkrankter *scid*-Versuchstiere die humanen CD4⁺ T-Zellen wiedergewonnen und die mRNA-Expression verschiedener humaner Moleküle, nach dem Umschreiben in cDNA, mittels human-spezifischer Primer amplifiziert und analysiert (siehe Abschnitt 2.1.9 und 2.2.14).

3.5.1 Expression von Aktivierungsmarkern, wie IL-2-Rezeptor, TNF- α und IFN- γ in xenoreaktiven humanen T-Zellen

Die humanen CD4⁺ T-Zellen spielten die entscheidende Rolle bei der Induktion der xenogenen Graft-versus-Host-Reaktion in den *scid*-Versuchstieren. Um die Frage zu klären, ob die aus xGvH-erkrankten Versuchstieren wiedergewonnenen, xenoreaktiven humanen CD4⁺ T-Zellen durch eine besondere Effektormolekülexpression gekennzeichnet waren, wurde die mRNA-Expression dieser Zellen auf das Vorhandensein von T_H0 Vorläuferzell-, T_H1- oder T_H2-spezifischen Transkripten untersucht (Abbildung 3.29).

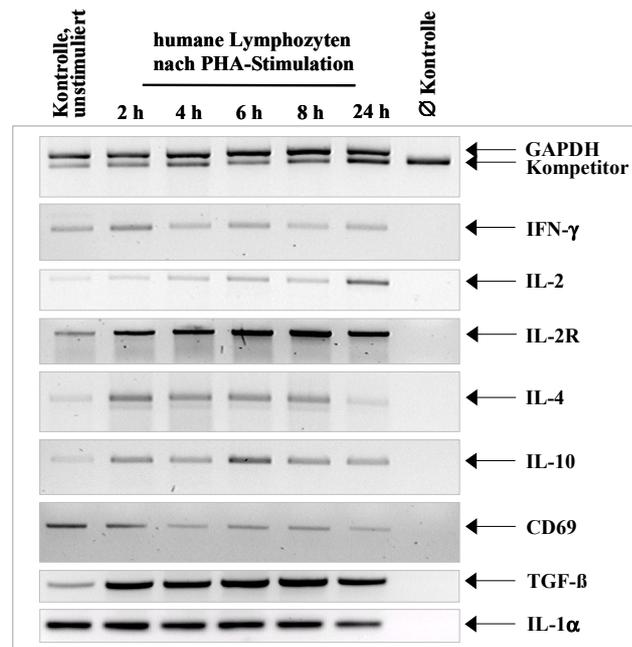


Abbildung 3.29: Semiquantitative RT-PCR von PHA-stimulierten humanen CD2⁺ T-Zellen wies eine erhöhte Expression von IL-2, IFN- γ , IL-2-R, IL-4, TGF- β , IL-1 α und IL-10 nach. Die RT-Reaktion wurde mit isolierter Gesamt-RNA aus Zellsaten humaner CD2⁺ T-Zellen durchgeführt. Die Proben wurden zu bestimmten Zeitpunkten (2 bis 24 h) nach Stimulation durch PHA abgenommen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der erstellten PCR-Fragmente auf einem Agarosegel (2%) ist invertiert dargestellt. Die amplifizierten Fragmente besaßen folgende Längen: ein 501bp langes Fragment der IFN- γ -, ein 462bp langes Fragment der IL-2-, ein 370bp langes Fragment der IL-2-R-, ein 455bp langes Fragment der IL-4-, ein 575bp langes Fragment der IL-10-, ein 800bp langes Fragment der CD69-, ein 175bp langes Fragment der TGF- β - und ein 380bp langes Fragment der IL-1 α -cDNA. Als Positivkontrolle der RT-Reaktion erfolgte die Amplifikation eines 452bp langen Abschnitts der GAPDH cDNA als konstitutiv exprimiertes Gen (Housekeeping Gene). Zusätzlich wurde bei der Kontrolle ein Kompetitor mit eingesetzt, der zur Amplifikation eines 380bp Fragments führte. (PCR-Protokolle: siehe Abschnitt 2.1.9 und 2.2.14.4)

Um den Einfluß einer möglichen spezifischen humanen Zytokinexpression zu untersuchen, wurden die aus xGvH-erkrankten Versuchstieren wiedergewonnenen humanen T-Zellen analysiert. Mit der semiquantitativen RT-PCR wurde die Expression verschiedener humaner mRNA-Transkripte bestimmt. Hierfür mußten in einem ersten Schritt die Protokolle für den spezifischen Nachweis einzelner humaner Zytokine etabliert werden. Als Positivkontrollen dieser Vorversuche dienten humane CD2⁺ T-Zellen, die mit Phytohämagglutinin (PHA) unspezifisch aktiviert wurden. PHA ist ein pflanzliches Mitogen, welches die polyklonale Proliferation humaner T-Zellen stimuliert. Die humanen CD2⁺ T-Zellen zeigten nach dieser Stimulation innerhalb von 2 bis 8 Stunden eine T_{H1}- und T_{H2}-typische RNA-Expression.

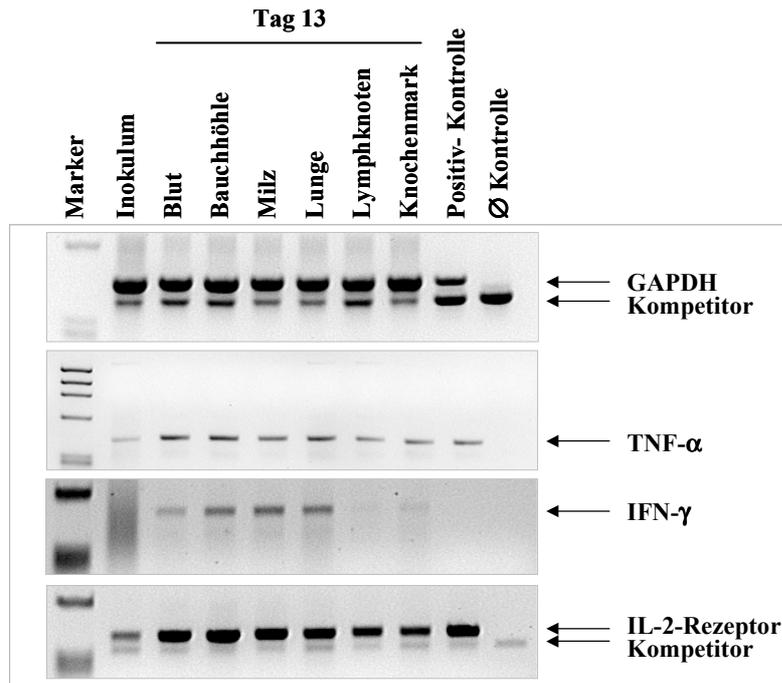


Abbildung 3.30: Semiquantitative RT-PCR von humanen unseparierten T-Zellen aus Organen eines xGvH-erkrankten *scid*-Versuchstiers zeigte im Vergleich mit dem Inokulum eine induzierte Expression von TNF- α , IFN- γ , IL-2-Rezeptor und GAPDH. Die Versuchstiere wurden mit unseparierten humanen Zellen inokuliert und zeigten zum Zeitpunkt der Wiedergewinnung (Tag 13) eine deutliche xGvHD-Symptomatik. Die RT-Reaktion wurde mit isolierter Gesamt-RNA aus Zellysaten aus verschiedenen Organen des xGvH-erkrankten *scid*-Versuchstiers durchgeführt. Invertierte Darstellung der gelelektrophoretischen Auftrennung der erstellten PCR-Fragmente auf einem Agarosegel (2%), um so die amplifizierte Banden deutlicher darzustellen. Die exemplarisch dargestellte PCR ist eine Reaktion mit 35 Reaktionszyklen. Als Positivkontrolle der RT-Reaktion wurden Primer für einen 452bp langen Abschnitt der GAPDH cDNA als konstitutiv exprimiertes Gen (Housekeeping Gene) gewählt. Zusätzlich wurde bei der Kontrolle ein Kompetitor eingesetzt, der zur Amplifikation eines 380bp Fragments führte. Unterhalb der IL-2-Rezeptorbande wurde eine spezifische Bandenbildung des Kompetitors beobachtet.

Eine T_H1 -typische RNA-Expression von IFN- γ , IL-2 und IL-2-Rezeptor sowie IL-1 α , wurde über den gesamten Untersuchungszeitraum (24 h) gefunden. Der als Aktivierungsmarker fungierende IL-2-Rezeptor zeigte ein Maximum der RNA-Expression nach 6 bis 8 Stunden. Ferner wurde eine verstärkte RNA-Expression des anti-inflammatorischen TGF- β beobachtet. Aufgrund dieser Befunde konnte nun die spezifische Expression von Zytokinen der aus xGvH-erkrankten C.B-17-*scid*-Versuchstieren wiedergewonnenen humanen CD4⁺ T-Zellen untersucht werden. In allen untersuchten Proben aus xGvH-erkrankten Versuchstieren zeigten die humanen Zellen eine stark erhöhte Expression der IL-2-Rezeptor-, TNF- α - und IFN- γ -Transkripte (Abbildung 3.30).

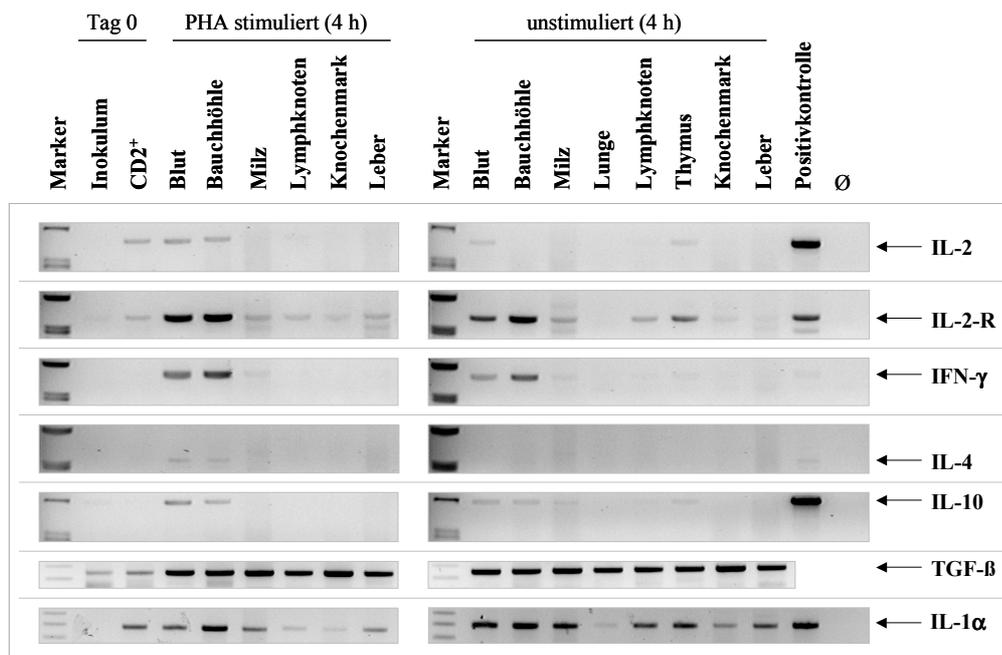


Abbildung 3.31: Semiquantitative RT-PCR von humanen T-Zellen aus Organen eines xGvH-erkrankten *scid*-Versuchstiers zeigte im Vergleich zu unstimulierten Zellen nach PHA-Stimulation kaum Unterschiede in der Expression von IL-2, IL-10, IFN- γ , IL-2-R, TGF- β und IL-1 α . Demgegenüber wurde eine Induktion der IL-4 Expression beobachtet. Die Versuchstiere wurden mit unseparierten humanen Zellen inokuliert und zeigten nach 13 Tagen eine deutliche xGvHD. Die wiedergewonnenen humanen T-Zellen wurden zusätzlich für 4 h mit PHA stimuliert. Die geringe Zellzahl der aus dem Thymus-assoziierten Gewebe wiedergewonnenen humanen Zellen reichte nicht für die PHA-Stimulationsversuche aus. Die RT-Reaktion wurde mit isolierter Gesamt-RNA aus humanen Zellysaten verschiedener Organe des xGvH-erkrankten *scid*-Versuchstiers und aus PHA stimulierten humanen T-Zellen durchgeführt. Invertierte Darstellung der gelelektrophoretischen Auftrennung der erstellten PCR-Fragmente auf einem Agarosegel (2%), um so die amplifizierten Banden deutlicher darzustellen.

Stimulationsversuche der wiedergewonnenen humanen Zellen mittels PHA sollten die vorliegenden Befunde nochmals genauer beleuchten, um so das Vorhandensein von humanen T_H2-Zellen oder deren Verlust zu belegen. Hierfür wurden humane T-Zellen aus verschiedenen Organen xGvH-erkrankter *scid*-Versuchstiere mittels PHA stimuliert und für mindestens 4 h inkubiert. Die Untersuchungen zeigten, daß die unspezifische Stimulation nur zu einer geringen Induktion der IL-4-Expression führte. Demgegenüber wurde jedoch eine erhöhte Expression der Transkripte von IFN- γ , IL-2 und IL-10 nachgewiesen (Abbildung 3.31). Dabei war bemerkenswert, daß es kaum Unterschiede in der Ausprägung des Expressionsmusters von IL-1 α , IFN- γ , IL-2-Rezeptor und TGF- β zwischen nachträglich PHA-stimulierten und nur in der Maus stimulierten humanen T-Zellen gab. Dies war ein Hinweis dafür, daß die Zellen zum Zeitpunkt der Wiedergewinnung aus den murinen

Organen, also ohne *in vitro* Stimulation, eine erhöhte Expression von T_H1-spezifischen Zytokinen, wie IFN- γ , IL-2 und IL-2-Rezeptor, aufwiesen. Durch den Nachweis einer durch PHA induzierten Expression von IL-4 wurde deutlich, daß auch T_H2 Zellen in den Versuchstieren vorlagen.

Durch Befunde von Vallee et al. wurde in einem xenogenen *in vitro* Mensch-Schwein-Modell gezeigt, daß IL-10 möglicherweise eine Funktion bei der Unterdrückung der Lymphozyten-Aktivierung gegen xenogenes Gewebe besaß [85]. Der Nachweis einer erhöhten IL-10 RNA Expression der humanen T-Zellen sowohl in unstimulierten als auch in PHA-stimulierten Zellen deutete auch in diesem Tiermodell auf eine Funktion dieses Zytokins hin. Da jedoch trotz der Expression von IL-10 und TGF- β weiterhin eine letale xGvHD ausgelöst wurde, besaßen diese Zytokine somit möglicherweise keine ausreichende anti-inflammatorische Wirkung im *in vivo* SCIDHu Tiermodell. Ein zusätzlicher Einfluß auf die über humane Zytokine vermittelte Modulation der Immunreaktion konnte durch Wechselwirkungen von murinen Zytokinen mit humanen T-Zellen nicht ausgeschlossen werden. Im Vergleich mit den Inokula traten sehr starke Unterschiede im Expressionsniveau der untersuchten Zytokine auf. Diese Befunde wiesen auf eine zellulär T_H1-vermittelte Abstoßungsreaktion hin. Da jedoch die Expression von IL-4 sehr schnell innerhalb von 4 bis 6 h erfolgte, konnte nicht ausgeschlossen werden, daß eine T_H2-spezifische Expression im Hintergrund vorlag.

3.5.2 Effektormechanismen humaner T-Zellen bei der Induktion der xGvHD

Um die Frage zu untersuchen, welcher Effektormechanismus für die Gewebeschädigung durch die humane naive CD4⁺CD45RA⁺ T-Zellsubpopulation bei der Ausbildung der xGvHD in den *scid*-Versuchstieren eine entscheidende Rolle spielt, wurden verschiedene Effektormoleküle untersucht. Die Schädigung murinen Gewebes durch humane T-Zellen könnte dabei sowohl über die Sekretion von Zytokinen mit zytotoxischer Wirkung als auch über eine stark erhöhte Expression des CD95Liganden erfolgen. Ebenso wie bei dem LFA1/ICAM1-System wurden zwischen humanen und murinen CD95L/CD95 außerordentlich hohe Sequenzhomologien gefunden. Über eine mögliche Interaktion zwischen humanen CD95L und den murinen CD95 (Fas) könnte in den CD95⁺ murinen Zellen eine Apoptose und damit Gewebeschädigung ausgelöst werden. Die Bindung von CD95L/CD95 würde dabei zur Aktivierung von einer Serie von Cystein-Proteasen, den

sogenannten Caspasen, führen. Die Aktivierung von DNasen mittels Caspasen führt schließlich zur Fragmentierung der DNA im Zellkern (200bp Fragmente) und somit zum Zelltod der Zelle.

Um die Frage zu klären, ob diese apoptotischen Vorgänge bei der xGvHD eine Rolle spielten, wurden zum einen in der murinen Umgebung sensibilisierte humane Zellen auf eine mögliche CD95Ligand-Expression mittels spezifischer RT-PCR überprüft und zum anderen die murinen Zellen auf DNA Fragmentierung und Ausbildung einer DNA-Leiter mittels immunhistologischer Färbungen (TdT-Enzym) untersucht.

3.5.3 Nachweis der CD95L-Expression humaner T-Zellen

Nach der Induktion der Graft-versus-Host-Erkrankung durch unseparierte und CD4⁺CD8⁻ humane T-Zellen in den *scid*-Versuchstieren innerhalb von 11 Tagen wurden diese aus verschiedenen murinen Organen wiedergewonnen. Aus den Zellysaten wurde die Gesamt-mRNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Um die Amplifikation der humanen CD95L cDNA zu überprüfen, wurden Proben der humanen embryonalen 293-Zelllinie genutzt. Dabei wurden zwei Transfektanten der 293-Zelllinie eingesetzt. Die pcDNA-Zellen zeichneten sich durch einen Verlust des humanen CD95Liganden aus. Die 2B12-Zellen waren durch eine erhöhte CD95Ligand-Expression gekennzeichnet. Die Transfektanten dieser Zelllinie wurden von Dulat et al. beschrieben [71].

Die CD95L RT-PCR amplifizierte ein 510bp langes Fragment der CD95L cDNA. In den untersuchten Versuchstieren wurde eine hohe Expression des humanen CD95Liganden im Blut, in der Peritonealhöhle und in der Milz nachgewiesen (Abbildung 3.32). In Lunge und Knochenmark zeigte sich eine deutlich schwächere Expression. Dabei spielte es keine Rolle, ob die *scid*-Versuchstiere mit unseparierten oder CD4⁺ T-Zellen inokuliert wurden. Proben aus den Lymphknoten der Versuchstiere zeigten keine Amplifikation von CD95L. Der Nachweis von CD95L⁺ humanen Zellen deutete ebenso wie die immunhistologischen und durchflußzytometrischen Analysen darauf hin, daß es zu einer gerichteten Einwanderung humaner Zellen in bestimmte murine Kompartimente kam. Der Einsatz einer Multiplex PCR wies eine Expression der humanen CD95 und GAPDH mRNA in allen Proben gleichmäßig nach. Die humanen Zellen aus allen untersuchten murinen Organen wiesen auf eine humane CD95 Expression (292 bp großes PCR-Fragment).

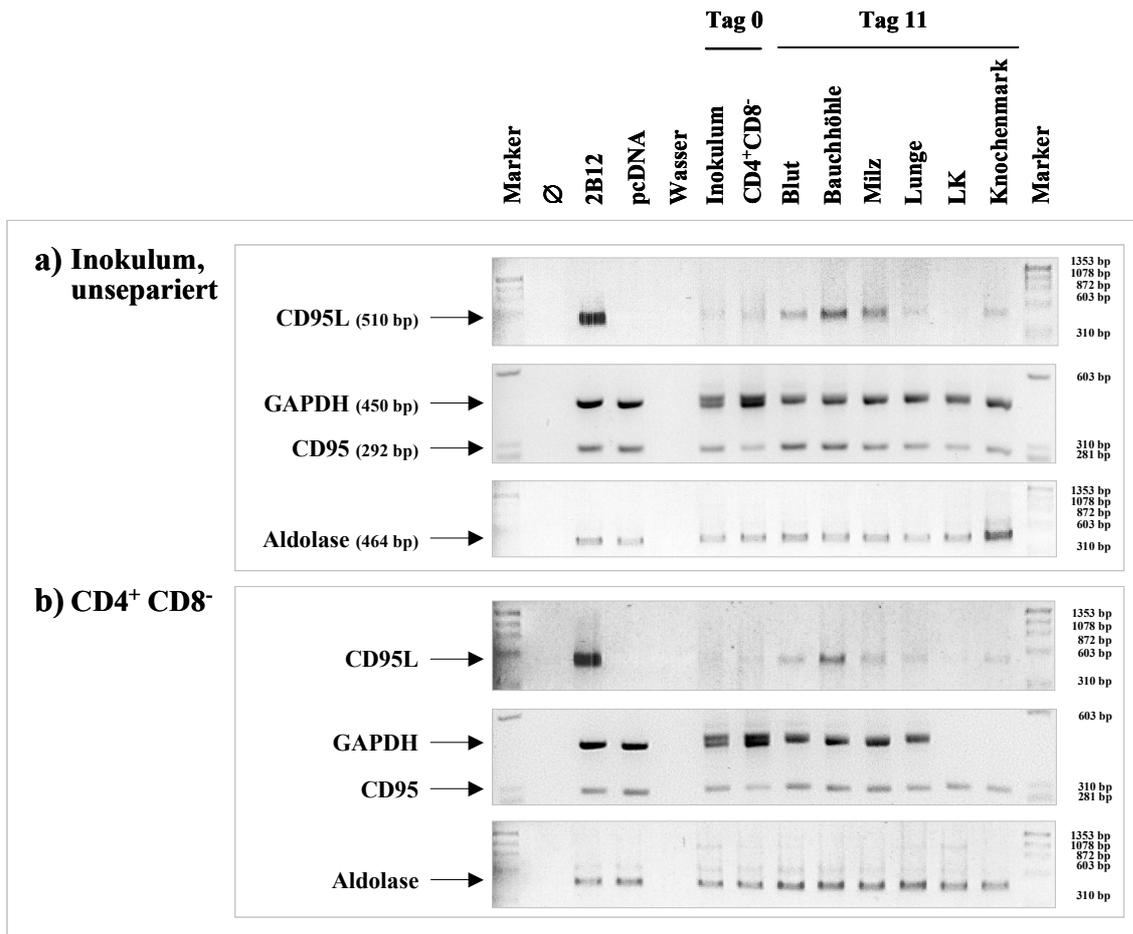


Abbildung 3.32: RT-PCR von Gesamt-RNA humaner unseparierter und CD4⁺ T-Zellen aus Organen xGvH-erkrankter *scid*-Versuchstiere zeigte eine erhöhte Expression von CD95L, CD95, Aldolase und GAPDH. a) Versuchstier 1 wurde mit unseparierten humanen Zellen inokuliert und zeigte eine deutliche xGvHD-Symptomatik nach 11 Tagen. b) Versuchstier 2 wurde mit CD4⁺CD8⁻ T-Zellen des gleichen Spenders inokuliert und entwickelte innerhalb von 11 Tagen eine xGvHD. Als interne Kontrollen der spezifischen Amplifikation des humanen CD95-Liganden wurden cDNA-Proben von Transfektanten einer humanen embryonalen Nierenzelllinie genutzt. Die RT-Reaktion wurde mit isolierter Gesamt-RNA aus Zellysaten aus verschiedenen Organen an xGvH-erkrankten *scid*-Versuchstieren (Tag 11) durchgeführt. Die exemplarisch dargestellte PCR ist eine Reaktion mit 35 Reaktionszyklen. Mit Hilfe der CD95-spezifischen Primer wurde ein 292 bp langes Fragment amplifiziert. Als Positivkontrollen der RT-Reaktion wurden Primer für ein 464 bp langes Fragment des Aldolase A-Gens und eines 452 bp langen Abschnittes des konstitutiv exprimierten GAPDH-Gens (Housekeeping Gene) gewählt. (Invertierte Darstellung der gelelektrophoretischen Auftrennung der erstellten PCR-Fragmente auf einem 2%igen Agarosegel).

Die fehlende CD95L-Expression der humanen Zellen in den murinen Lymphknoten war deshalb spezifisch und konnte nicht durch fehlende humane cDNA erklärt werden. In allen untersuchten Organen wurde ebenfalls eine gleichmäßige GAPDH Expression über die Amplifikation eines 452 bp langen Fragments beobachtet. Hiermit wurde deutlich, daß in

allen Proben aus den xGvH-erkrankten Versuchstieren am Tag 11 relativ übereinstimmende Anteile humaner cDNA vorlagen. Die Kontrollen zeigten bei der 2B12-Transfektante eine sehr hohe Amplifikation der CD95L, CD95 und GAPDH cDNA. Wie erwartet, zeigte die pcDNA Transfektante demgegenüber keine Bildung eines CD95L Amplifikationsprodukts, jedoch eine mit der 2B12-Transfektante vergleichbare Expression von CD95 und GAPDH. Als weitere Kontrollen wurde mit den cDNA-Proben eine RT-PCR des Aldolase A und GAPDH Gens durchgeführt. Die konstitutiv exprimierten Aldolase A- und GAPDH-Fragmente zeigten in allen eingesetzten cDNA-Proben eine gleichmäßige Amplifikation. Eine weitere interne Kontrolle der Multiplex PCR von CD95 und GAPDH zeigte eine spezifische Amplifikation des humanen CD95 ohne Signalverluste, wie in Abbildung 3.32b) dargestellt.

Der Nachweis einer im Vergleich zum Inokulum erhöhten und einer im murinen Milieu der C.B-17-*scid*-Maus induzierten CD95L-Expression führte zu der Frage, ob der Verlust dieser Bindungsinteraktionen einen Einfluß auf den Verlauf der xGvHD nehmen konnte. Weiterhin sollte die Frage untersucht werden, ob das CD95L/CD95-System nur Spezies-spezifisch erfolgte oder auch zur Induktion der Apoptose in CD95⁺ murinen Zellen führte. Für diese Untersuchungen wurden *SCID/Fas^{lpr}*-Versuchstiere genutzt, die CD95-defizient waren.

3.5.4 Charakterisierung einer *SCID/Fas^{lpr}* -Mutante

Der Nachweis einer erhöhten Expression des CD95Liganden in humanen unseparierten und angereicherten CD4⁺ T-Zellen nach der Inokulation in *scid*-Versuchstiere zeigte, daß der Effektormechanismus CD95L/CD95 eine wichtige Rolle bei der zellulären Abstoßung im SCIDHu-Tiermodell spielen könnte. Diese Befunde führten zu der Frage, ob der Verlust der murinen CD95-Expression durch eine Mutation (*Fas^{lpr}*) zu einem Schutz der murinen Organe führte. Hierfür mußte durch Kreuzungen die MRL-*Fas^{lpr}*-Mutation auf den genetischen Hintergrund der C.B-17-*scid*-Versuchstiere übertragen werden. Der Einfluß der CD95-Expression auf die Induktion und den Verlauf der xGvHD in einem *in vivo* Tiermodell sollte über den Verlust der Molekülexpression untersucht werden. Die vom Fraunhofer Institut (Hannover) zur Verfügung gestellte MRL-*Fas^{lpr}* (CD95)-Mutante ergab nach Etablierung einer homozygoten Zucht die Möglichkeit, den Verlust der CD95 Molekülexpression bzw. der CD95Ligand/CD95-Interaktion und deren Auswirkung auf die Ausbildung der xGvHD näher zu untersuchen. Zur Unterscheidung von homozygoten, heterozygoten Mutanten und dem Wildtyp, wurde eine PCR mit spezifischen Primern durchgeführt, wie in Abbildung 3.33 dargestellt.

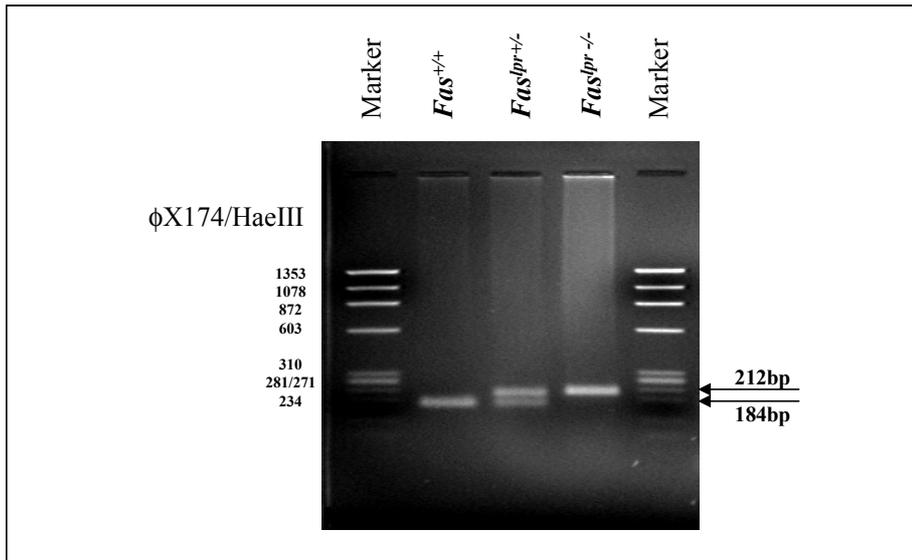


Abbildung 3.33: Unterscheidung von Wildtyp und homozygoter *SCID/Fas^{pr}*-Versuchstiere nach gelelektrophoretischer Auftrennung der amplifizierten CD95-PCR-Fragmente auf einem TAE-Agarosegel (2%) durch unterschiedliche Längen. Das eingesetzte PCR-Protokoll ließ eine eindeutige Genotypisierung zu. Das Wildtyp-Allel wurde durch ein 184 bp PCR-Fragment nachgewiesen. Das Fragment des mutierten Allels zeigte demgegenüber eine Größe von 212 bp.

Die schon in Abschnitt 3.5.3 eingesetzten 293-Transfektanten zeichneten sich durch die Expression von CD95L (2B12) bzw. den Verlust (pcDNA) aus, wie von Dulat et al. belegt wurde [71]. Die Inokulation von $1-3 \times 10^7$ humanen CD95L⁺ 2B12-Nierentumorzellen induzierte in allen vorbehandelten (subletale Bestrahlung/antiASGM1 Injektion) *scid*-Versuchstieren (n=14) eine letal verlaufende Erkrankung, die mit gestäubtem Fell und Gewichtsverlust einhergehend, innerhalb sehr kurzer Zeit (Tag 2-6) zum Tode führte, wie Vorversuche signifikant zeigten (Tabelle 3.8). Demgegenüber löste die Inokulation von 2×10^7 pcDNA-Zellen in den Versuchstieren keine (n=10) schnell verlaufende Erkrankung aus. Allerdings wurde in diesen *scid*-Versuchstieren nach einem längeren Inkubationszeitraum (2-3 Wochen) die Entwicklung von Tumoren der pcDNA-Zellen in den Bauchhöhlen beobachtet. Die über CD95L/CD95-Interaktion induzierte Apoptose führt dabei zu einer DNA Fragmentierung in den Zellen. Der immunhistologische Nachweis der entstandenen nukleosomalen DNA Fragmente der apoptotischen murinen Hepatozyten wurde durch die Terminale Desoxynucleotidyl Transferase (TdT-Enzym) erbracht, welche den Einbau Digoxigenin-markierter Nukleotide an die fragmentierte DNA katalysiert. Die Inokulation von 2B12-Zellen löste im gesamten Lebergewebe die Apoptose muriner Zellen aus (Abbildung 3.34A).

Tabelle 3.8: Überlebenszeiten von C.B-17-*scid*-Versuchstieren nach Inokulation von humanen 2B12- und pcDNA-Nierentumorzellen

Experiment Nr.	Anzahl Versuchstiere	Ausbildung einer letalen Erkrankung nach Inokulation in C.B-17- <i>scid</i> -Versuchstiere (in Tagen)	
		2B12 (CD95L ⁺)	pcDNA
1	5	2, 2, 3	Nein >22, Nein >22
2	7	5, 6, 6, 6	Nein 6 ^a , Nein 6 ^a , Nein >15
3	2	5	Nein 5 ^a
4	4	2, 5	Nein 5 ^a , Nein >22
5	3	2, 3	Nein >19
6	3	2, 3	Nein >25

^a Versuchstiere zeigten zu diesem Zeitpunkt keinerlei Anzeichen einer Erkrankung und wurden analysiert. Den *scid*-Versuchstieren wurden je 2×10^7 2B12- oder pcDNA-Nierentumorzellen intraperitoneal injiziert.

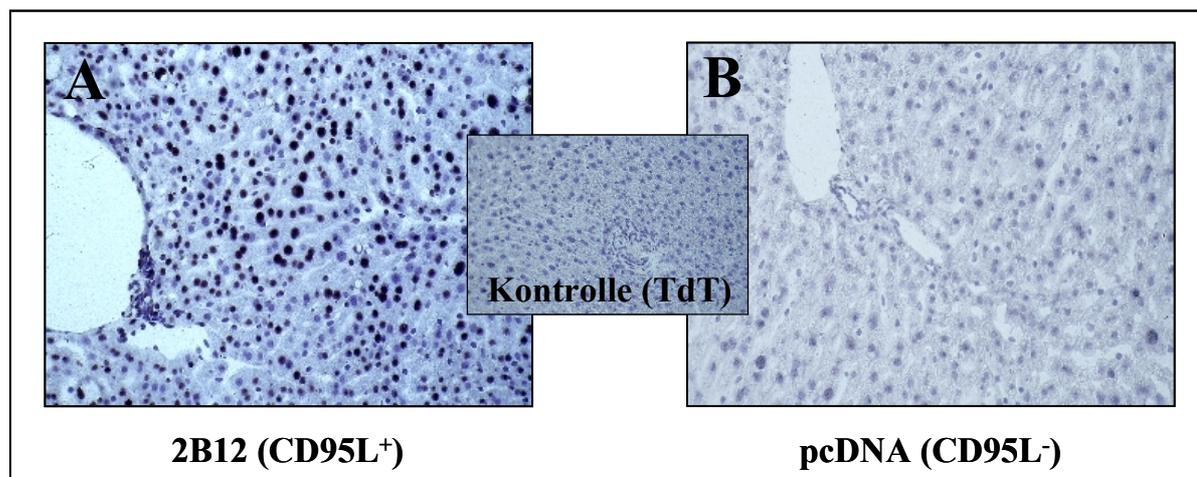


Abbildung 3.34: Die Inokulation von humanen CD95L⁺ 2B12-Nierentumorzellen induzierte in der Leber der eingesetzten Versuchstiere Apoptose. A) Die Inokulation humaner 2B12-Zellen induzierte Apoptose innerhalb von 3 Tagen in der Leber der Versuchstiere. Die apoptotischen Zellen wurden durch den Nachweis der DNA-Fragmentierung (nukleosomale DNA Fragmente) mittels Terminaler Desoxynucleotidyl Transferase (TdT-Enzym) detektiert. B) Die Inokulation von humanen CD95L⁻ pcDNA Nierentumorzellen zeigte keinerlei apoptotische Zellen in der murinen Leber. Die TdT-Kontrollfärbung zeigte keine unspezifischen Färbungen des anti-BrdU Antikörpers. (Vergrößerung: 125x)

Wie erwartet, zeigte demgegenüber das Lebergewebe der mit pcDNA-Zellen inokulierten Versuchstiere keine apoptotischen murinen Zellen (Abbildung 3.34B). Die Kontrollfärbung zeigte keine unspezifischen Bindungen des Nachweisantikörpers. Um den Einfluß der

subletalen Bestrahlung und der antiASGM1 Injektion 24 h vor der Inokulation der humanen Nierentumorzellen zu untersuchen, wurden unbehandelte *scid*-Versuchstiere mit 2×10^7 2B12-Zellen (n=5) oder pcDNA-Zellen (n=3) inokuliert.

Tabelle 3.9: Überlebenszeiten von nicht konditionierten *scid*- und BALB/c-Versuchstieren nach Inokulation von 2×10^7 2B12- oder pcDNA-Zellen

Experiment Nr.	Anzahl Versuchstiere	Ausbildung einer letalen Erkrankung nach Inokulation in C.B-17- <i>scid</i> -Versuchstiere (in Tagen)	
		2B12 (CD95L ⁺)	pcDNA
7 ^a	2 ^c	7 ^b , Nein >22	-
8 ^a	3 ^c	Nein >20	Nein >20, >20
9 ^a	3 ^d	8 ^b , Nein >20	Nein >20

^a Versuchstiere erhielten im Vergleich zu den anderen Versuchen 24 h vor der Inokulation keine Vorbehandlung (subletale Bestrahlung und antiASGM-1 Injektion) der humanen Nierentumorzellen. ^b Die Versuchstiere zeigten zu diesem Zeitpunkt deutliche Anzeichen einer Erkrankung und wurden analysiert.

^c *SCID/Fas*⁺ ^d BALB/c Wildtyp

Es zeigte sich, daß die 2B12-Zellen in 3 von 5 Versuchstieren keine Erkrankung induzierten, wie in Tabelle 3.9 (Experimente 7-9) dargestellt. Die CD95Ligand-Expression der 2B12-Zellen reichte alleine nicht aus, diese Zellen gegen das angeborene Immunsystem der *scid*-Versuchstiere zu schützen. Immunhistologische Analysen belegten, daß in den untersuchten Organen der Versuchstiere keinerlei infiltrierende 2B12-Nierentumorzellen vorlagen. Die pcDNA-Nierentumorzellen führten innerhalb des Beobachtungszeitraums zu keiner Ausbildung von Tumoren. Diese Ergebnisse zeigten, daß die Vorbehandlung der Versuchstiere entscheidend für ein verstärktes Überleben der humanen Zellen im murinen Milieu war. Um festzustellen, ob die Induktion der letalen Erkrankung zweifelsfrei auf die Expression des humanen CD95Liganden der 2B12-Zellen zurückzuführen war, wurden homozygote CD95⁻ *SCID/Fas*^{lpr}-Mutanten mit diesen Zellen inokuliert. Die homozygoten *SCID/Fas*^{lpr}-Mutanten (n=3) entwickelten innerhalb von 20 Tagen keine letale Erkrankung (Tabelle 3.10 und Abbildung 3.35). Die inokulierten pcDNA-Zellen lösten keine letale Erkrankung aus, führten jedoch in allen nicht vorzeitig analysierten, konditionierten *scid*-Versuchstieren (n=7) zur Ausbildung von Tumoren.

Tabelle 3.10: Überlebenszeiten von homozygoten *SCID/Fas^{lpr}*-Versuchstieren nach Inokulation von 2B12- oder pcDNA-Zellen

Experiment Nr.	Anzahl Versuchstiere	Ausbildung einer letalen Erkrankung nach Inokulation in <i>SCID/Fas^{lpr}</i> -Versuchstieren (in Tagen)	
		2B12 (CD95L ⁺)	pcDNA
10	4 ^a	Nein >20	Nein >20
		Nein >20	
		Nein >20	

Die intraperitoneale Injektion von 2×10^7 2B12- oder pcDNA-Zellen in die *SCID/Fas^{lpr}*-Versuchstiere zeigte keine Anzeichen einer Erkrankung.

Die Induktion einer letalen Erkrankung in den *scid*-Versuchstieren durch die CD95L⁺ 2B12-Zellen und eine fehlende Ausbildung in den homozygoten *SCID/Fas^{lpr}*-Versuchstieren zeigte, daß die alleinige CD95Ligand/CD95 Interaktion ausreichte, um den Tod der Versuchstiere zu induzieren. Wenn diese Interaktion eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der xGvHD spielte, sollte das Fehlen der CD95-Expression die homozygoten Mutanten vor einer möglichen durch humane CD95Ligand-vermittelten Erkrankung schützen.

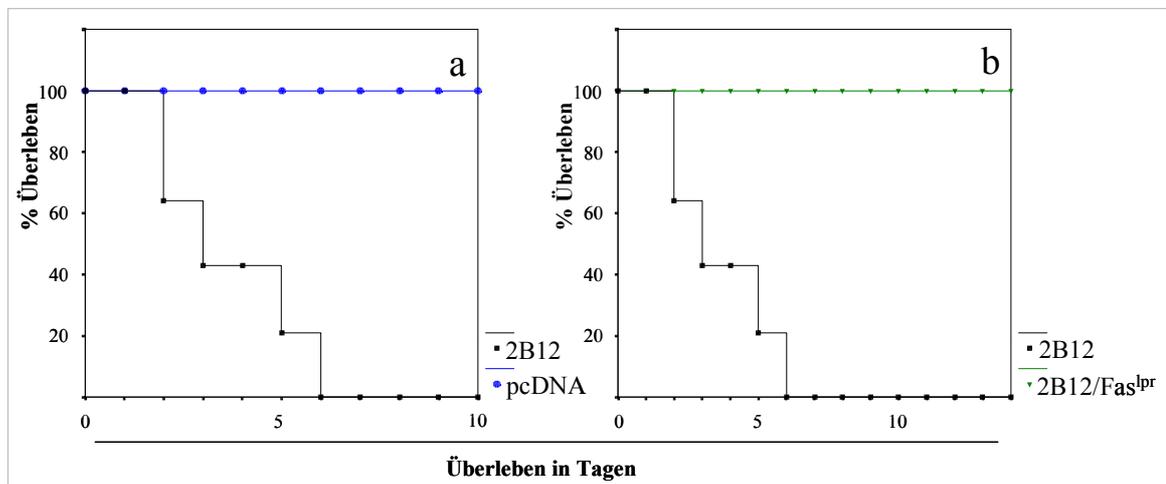


Abbildung 3.35: Die homozygoten *SCID/Fas^{lpr}*-Mutanten zeigten im Gegensatz zum Wildtyp nach Inokulation humaner CD95L⁺ 2B12-Zellen keine letale Erkrankung. a) Die Inokulation von 2×10^7 2B12-Zellen führte in den Experimenten (n=6) bei allen C.B-17-*scid*- Versuchstieren (n=14) zum Tode. Im Gegensatz hierzu entwickelten mit pcDNA Zellen inokulierte Mäuse keine Erkrankung. b) Die homozygoten *SCID/Fas^{lpr}*-Versuchstiere (n=3) zeigten im Vergleich zum Wildtyp nach Inokulation von 2×10^7 2B12-Zellen keine Krankheitssymptome.

Diese Versuche machten deutlich, daß die starken Interaktionen zwischen humanen CD95Ligand und murinen CD95 über Speziesgrenzen hinweg erfolgten. Um die speziesübergreifenden CD95L/CD95-Interaktionen näher zu untersuchen, erfolgten ^{51}Cr -Freisetzungstests. Als Effektoren wurden mit IL-2 stimulierte humane CD2^+ T-Zellen und die CD95L^+ 2B12-Nierentumorzellen (Kontrollen) genutzt. Als Targetzellen fungierten die humanen Jurkat-Zellen und die murinen Fibroblasten des Wildtyps, die $\text{SCID}/\text{Fas}^{\text{Ipr}}$ - und $\text{SCID}/\text{ICAM1}/\text{Fas}^{\text{Ipr}}$ -Mutanten.

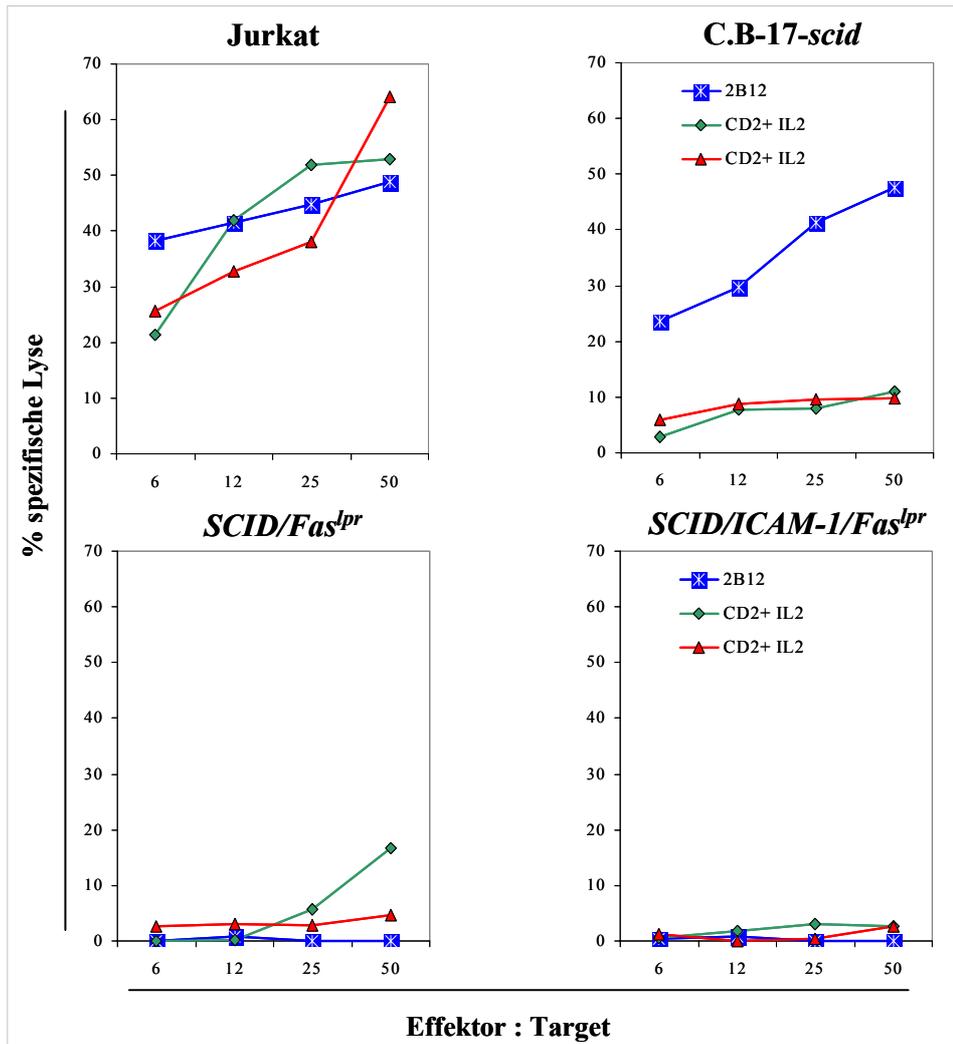


Abbildung 3.36: ^{51}Cr -Freisetzungstest mit Jurkat und murinen Fibroblasten als Target- und IL-2 kultivierten CD2^+ T-Zellen und CD95L^+ 2B12-Nierentumorzellen als Effektorzellen zeigte eine speziesübergreifende CD95L/CD95-Interaktion. Humane CD2^+ T-Zellen wurden 6 Tage in Anwesenheit von IL-2 (20 U/ml) kultiviert und als Effektorzellen in ^{51}Cr -Freisetzungstests zur Lyse der ^{51}Cr -markierten murinen Fibroblasten des *scid*-Wildtyps, der $\text{SCID}/\text{Fas}^{\text{Ipr}}$ -, $\text{SCID}/\text{ICAM1}/\text{Fas}^{\text{Ipr}}$ -Mutanten und Jurkat Zellen eingesetzt. Zusätzlich wurden CD95L^+ 2B12-Nierentumorzellen als Effektoren gegen die Zielzellen titriert. Die spezifische Lyse wurde nach Standardprotokoll (4 h) bestimmt und gegen das Effektor/Target Verhältnis aufgetragen.

Zunächst wurden die IL-2-stimulierten humanen CD2⁺ T-Zellen untersucht, ob diese ein zytotoxisches Potential zur Zerstörung von Jurkat Zellen besaßen. Der in Abbildung 3.36 dargestellte ⁵¹Cr-Freisetzungstest zeigte, daß die mit IL-2 kultivierten CD2⁺ T-Zellen ebenso wie die CD95L⁺ 2B12-Zellen ein starkes reaktives Potential besaßen und Jurkat Zellen in Abhängigkeit des Effektor/Target Verhältnisses lysierten. Die humanen CD2⁺ Effektorzellen zeigten im Vergleich mit den CD95L⁺ 2B12-Zellen übereinstimmende Werte von 50 bis 60% bei der Lyse der Jurkat Zielzellen. Starke Unterschiede wurden jedoch bei der Lyse der *scid*-Fibroblasten nachgewiesen. Die CD95L⁺ 2B12-Effektorzellen besaßen ein hohes lytisches Potential von knapp 50%. Dagegen sank das lytische Potential der IL-2 stimulierten T-Zellen auf einen Wert von knapp 10%. Es wurde deutlich, daß das lytische Potential der humanen CD2⁺ T-Zellen gegen murine ICAM1⁻ Zielzellen (ICAM1-Ausfallmutation) nicht ausreichte, um eine spezifische Lyse der *SCID/ICAM1/Fas^{lpr}*-Fibroblasten zu induzieren (Abbildung 3.46). Die Zytolyse der CD95⁻ Zielzellen der *SCID/Fas^{lpr}*-Fibroblasten zeigte im Gegensatz hierzu eine spezifische Lyse durch humane CD2⁺ T-Zellen (Abbildung 3.36 und 3.46). Durch diese Ergebnisse wurde belegt, daß humane T-Zellen in der Lage waren, über einen vom CD95Ligand unabhängigen Weg, xenogene murine Zellen zu lysieren. Übereinstimmende Befunde dieser unabhängigen Lyse wurden in weiteren ⁵¹Cr-Freisetzungstests beobachtet (Abbildungen 3.39 und 3.46). Hierdurch wurde deutlich, daß der Verlust der murinen CD95- und ICAM1-Expression einen gewissen Schutz vor dem lytischen Potential humaner T-Zellen gewährte. Da die Bedeutung dieser Interaktion jedoch noch nicht in einem *in vivo* Tiermodell untersucht wurde, stellte sich die Frage, inwieweit Apoptose-induzierende Mechanismen bei der Ausbildung der xGvHD im xenogenen Tiermodell eine Rolle spielten. Die CD95Ligand-Expression führte zur Lyse von xenogenen Zellen, konnte aber von bisher unbekanntem Mechanismen ersetzt werden.

Möglicherweise könnte die Freisetzung von löslichen CD95Ligand-Molekülen eine wichtige Rolle bei der Induktion der sehr frühen Erkrankungen (Tag 2 und 3 nach Inokulation) in den Versuchstieren einnehmen. Das Fehlen humaner 2B12-Nierentumorzellen in den Lebergeweben der Versuchstiere bei gleichzeitiger Ausbildung von Apoptose wies ebenso auf lösliche Faktoren hin. Die Analyse von Seren erkrankter *scid*-Versuchstiere mittels Western-Blot (Daten nicht gezeigt) konnte bisher keinen weiteren Aufschluß über die Wirkung von löslichen CD95Ligand-Molekülen bei der Auslösung von Apoptose in empfindlichen CD95⁺ murinen Zellen geben.

Die Untersuchungen zeigten, daß die Inokulation humaner CD95L⁺ 2B12-Zellen in homozygote *SCID/Fas^{lpr}*-Mutanten keine letale Erkrankung auslöste, so daß die fehlende

murine CD95-Expression eine gewisse Schutzfunktion ausübte. Ob die homozygoten *SCID/Fas^{lpr}*-Mutanten einen ähnlichen Schutz vor der Induktion der xGvHD nach Inokulation humaner CD4⁺ T-Zellen besaßen, sollte über *in vivo* Tests untersucht werden.

3.5.5 Induktion der letalen xGvHD in *SCID/Fas^{lpr}*-Mutanten nach Inokulation humaner CD4⁺ T-Zellen

Es stellte sich somit die Frage, ob die homozygoten *SCID/Fas^{lpr}*-Versuchstiere, im Vergleich mit den heterozygoten Geschwistertieren und dem Wildtyp, einen Vorteil im Überleben besaßen. Hierfür wurden die konditionierten Versuchstiere mit 5×10^7 CD4⁺ humanen T-Zellen inokuliert.

In allen Versuchen wurde bei den Mäusen eine hohe Variabilität des Verlaufs der xGvHD beobachtet. Die heterozygoten *SCID/Fas^{lpr}*-Versuchstiere (n=17) zeigten innerhalb von 20 Tagen eine deutliche Krankheitssymptomatik. Die *scid*-Wildtypgeschwister (n=7) entwickelten eine xGvHD innerhalb von 31 Tagen in 6 von 7 Versuchstieren (Tabelle 3.11).

Tabelle 3.11: Überlebenszeiten von homo- und heterozygoten *SCID/Fas^{lpr}*-Versuchstieren und C.B-17-*scid/scid* nach Inokulation humaner CD4⁺ T-Zellen

Experiment Nr.	Anzahl Versuchstiere	Ausbildung einer letalen xGvH-Erkrankung nach Inokulation in <i>scid/scid</i> (in Tagen)		
		<i>Fas⁺/Fas⁺</i> (n=7)	<i>Fas⁺/Fas^{lpr}</i> (n=17)	<i>Fas^{lpr}/Fas^{lpr}</i> (n=14)
1	4	31	12	21, Nein >40
2	8	17, 19, 21	13, 19	14, 21, Nein >40
3	5	31, Nein >40	13	21, Nein >40
4	5		14, 15, 19	19, 28
5	6		10, 13, 13, 16	14, 14
6	3		13, 16	20
7	3	14	12, 12, 15	12
8	2		14	14

Die Inokulation von 4×10^7 CD4⁺ humanen T-Zellen induzierte in fast allen Versuchstieren die letale xGvHD.

Bei den eingesetzten homozygoten *SCID/Fas^{lpr}*-Versuchstieren (n=14) wurde in 11 von 14 Mäusen eine Ausbildung der letalen xGvHD nachgewiesen. Einige homozygote Versuchstiere

aus den ersten Versuchsgruppen zeigten im Vergleich zu den heterozygoten Geschwistertieren ein verlängertes Überleben (Tabelle 3.11). Die hohe Variabilität im Überleben der homozygoten Versuchstiere könnte zum einen durch eine mögliche Differenzierung muriner B-Zellen (Leakiness) oder wahrscheinlicher durch Fehler bei der Inokulation erklärt werden. Um zu einer Klärung zu gelangen, wurden weitere Versuchsgruppen angesetzt. Auch hier zeigten sich Unterschiede in den Überlebenszeiten der homo- und heterozygoten *SCID/Fas^{lpr}*-Versuchstiere. Die statistische Auswertung der in Tabelle 3.11 aufgeführten Daten zeigte, daß die homozygoten *Fas^{lpr}/Fas^{lpr}*-Versuchstiere im Vergleich zu den heterozygoten Geschwistern (*Fas⁺/Fas^{lpr}*) signifikant später eine letale xGvHD entwickelten ($p = 0,023$). Der Vergleich mit dem Wildtyp (*Fas⁺/Fas⁺*) belegte jedoch, daß keine signifikante Verlängerung im Überleben der homozygoten Versuchstiere vorlag ($p = 0,09$).

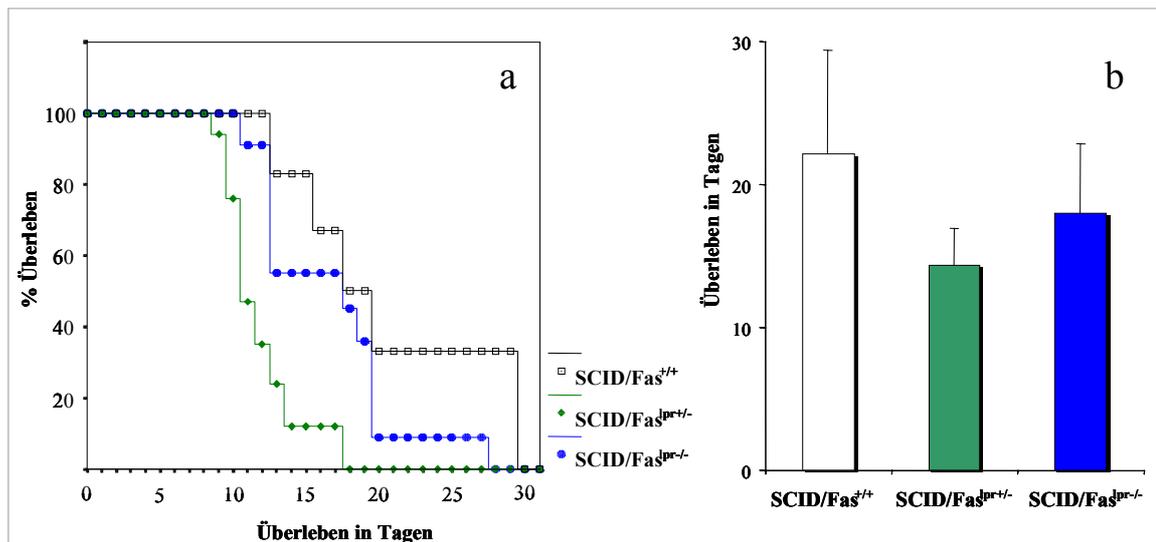


Abbildung 3.37: Die Überlebensdaten der homo- und heterozygoten *SCID/Fas^{lpr}*-Mutanten zeigten nach Inokulation humaner $CD4^+$ T-Zellen im Vergleich zum Wildtyp keine Unterschiede. a) / b) Die Inokulation von 5×10^7 $CD4^+$ T-Zellen induzierte in den Experimenten ($n=8$) bei 27 von 34 homo- und heterozygoten *SCID/Fas^{lpr}*-Versuchstieren eine letale xGvHD. Die homozygoten *SCID/Fas^{lpr}*-Verlustmutanten ($n=11$) zeigten dabei im Vergleich mit den heterozygoten Geschwistertieren ($n=17$) und mit dem Wildtyp ($n=6$) keine Unterschiede in der Ausbildung der xGvHD. Die CD95-Mutation nahm somit keinen Einfluß auf die Ausbildung einer xGvH-Erkrankung.

Diese Ergebnisse zeigten, daß der Verlust der murinen CD95-Expression nicht unbedingt zu einem verlängerten Überleben führen muß, da in 10 von 14 Versuchstieren eine letale xGvHD innerhalb von 21 Tagen ausgelöst wurde. Die Überlebenszeiten zeigten deutlich, daß der Verlust der murinen CD95 keinen wesentlichen Einfluß auf die Induktion der letalen xGvHD

besaß (Abbildung 3.37). Der Ansatzpunkt für weiterführende Untersuchungen scheint vielmehr in einer Kombination mehrerer muriner Moleküle zu liegen, um so für einen effektiven Schutz der murinen Gewebe gegen die humanen Effektorzellen zu sorgen. Mögliche Ziele hierfür könnten ICAM2, ICAM3 oder L-Selektin sein. Der gleichzeitige Verlust der membranständigen murinen ICAM1- und der CD95-Expression könnte zu einem sehr effektiven Schutz vor xenoreaktiven Zellen führen. Die homozygoten *SCID/ICAM1/Fas^{lpr}*-Mutanten besaßen gegenüber den *SCID/Fas^{lpr}*-Mutanten einen deutlichen Vorteil im Überleben und bei der Zucht (größere Würfe). Diese Ergebnisse stimmten auch mit Befunden von Bullard et al. überein [58]. Insofern kann der Verlust der Expression mehrerer muriner Moleküle unter Umständen zu einem Überlebensvorteil, wie bei den *SCID/ICAM1/Fas^{lpr}*-Mutanten, führen.

3.5.6 Resümee der Expression humaner Effektormoleküle xenoreaktiver humaner T-Zellen

Die aus verschiedenen Kompartimenten xGvH-erkrankter *scid*-Versuchstiere wiedergewonnenen humanen CD4⁺ T-Zellen zeigten im Vergleich zu unstimulierten humanen T-Zellen desselben Spenders (vor Injektion) eine verstärkte Expression T_H1-typischer Zytokine, wie IL-2, IFN- γ und TNF- α (Tabelle 3.12).

Daneben wurde eine erhöhte Expression des Aktivierungsmarkers IL-2-R und von IL-10 beobachtet. Der Befund, daß selbst eine unspezifische PHA-Stimulation der wiedergewonnenen humanen T-Zellen zu keiner weiteren Erhöhung der Signalstärke von IFN- γ und IL-2-R führte, belegte, daß die humanen T-Zellen bei Manifestation der Erkrankung voll aktiviert waren. Die wiedergewonnenen humanen CD4⁺ T-Zellen waren darüberhinaus durch eine induzierte CD95Ligand-Expression gekennzeichnet. Weiterhin wurde die Expression von IL-1- α und TGF- β mRNA-Transkripten beobachtet und als weiterer Beleg einer ablaufenden Entzündungsreaktion betrachtet.

Da das Fehlen der CD95L/CD95-Interaktion keinen Einfluß auf die Ausprägung der xGvHD hatte, wie durch *in vivo* Inokulationsexperimente mit den homozygoten *SCID/Fas^{lpr}*-Versuchstieren gezeigt, müssen andere, bisher unbekannte Effektormechanismen für die Ausbildung der xGvHD verantwortlich sein.

Tabelle 3.12: Zytokin-Expression humaner T-Zellen vor und nach Auslösung der xGvHD in den *scid*-Versuchstieren¹

Humane Zellen	CD95L	CD95	Zytokin-Expression humaner CD4 ⁺ T-Zellen						
			GAPDH	IL-2	IFN- γ	IL-2-R	TNF- α	IL-4 ²	IL-10
Unsepariertes Inokulum ^{a)}	-	++	+++	-	+	+	+	-	-
CD4 ⁺ ^{a)}	+	++	+++	+	-	+	+	-	-
CD4 ⁺ ^{b)}	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	-	++

(+++ starkes Signal, + schwaches Signal, - kein Signal) ^{a)} vor Inokulation ^{b)} nach Inokulation

¹ Die humanen T-Zellen wurden aus den Peritonealhöhlen xGvH-erkrankter *scid*-Versuchstiere wiedergewonnen. ² Nach unspezifischer Stimulation durch PHA (4 h) wurde eine schwache IL-4-Expression beobachtet.

3.6 Aktivierung humaner CD2⁺ T-Zellen durch IL-2 Stimulation und Kokultur mit murinen Fibroblasten

Zur Übertragung der *in vivo* Ergebnisse in ein weniger komplexes *in vitro* Modell und zur Klärung möglicher Bindungsinteraktionen zwischen murinen und humanen Molekülen wurde das lytische Potential humaner CD2⁺ T-Zellen gegen diskordant murines Gewebe untersucht. Dabei wurden Fibroblasten-Zellkulturen von verschiedenen murinen Mutanten wie ICAM1 und *Fas*^{lpr} hergestellt, die möglicherweise eine Schutzfunktion vor der xenogenen GvHD durch humane CD4⁺ T-Zellen gewährten. Die Kulturen mußten zuerst dahingehend überprüft werden, ob diese tatsächlich durch den Verlust der Expression von spezifischen murinen Rezeptoren, wie CD95 und ICAM1, gekennzeichnet waren. Um die Modulation einer Immunantwort von humanen CD2⁺ T-Zellen gegen murine Fibroblasten in Abhängigkeit der CD95 und ICAM1 Expression beurteilen zu können, wurde deshalb zunächst untersucht, ob diese in der Lage waren, eine xenogene T-Zell-Immunantwort der humanen Zellen gegen murines Gewebe auszulösen.

Diese Überprüfung der murinen Fibroblasten umfaßte nach einer Genotypisierung auch eine immunhistologische und durchflußzytometrische Analyse. Zuerst wurde der stimulierende Einfluß von humanen IL-2 und bestrahlten murinen Fibroblasten auf die Aktivierung der humanen CD2⁺ T-Zellen über die Expression des IL-2-Rezeptors

durchflußzytometrisch zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Dabei zeigte sich, daß bereits die Stimulation von T-Zellen mit bestrahlten murinen Fibroblasten zu einer Induktion der IL-2-Rezeptorexpression (33%) in der humanen T-Zellpopulation führte (Abbildung 3.38).

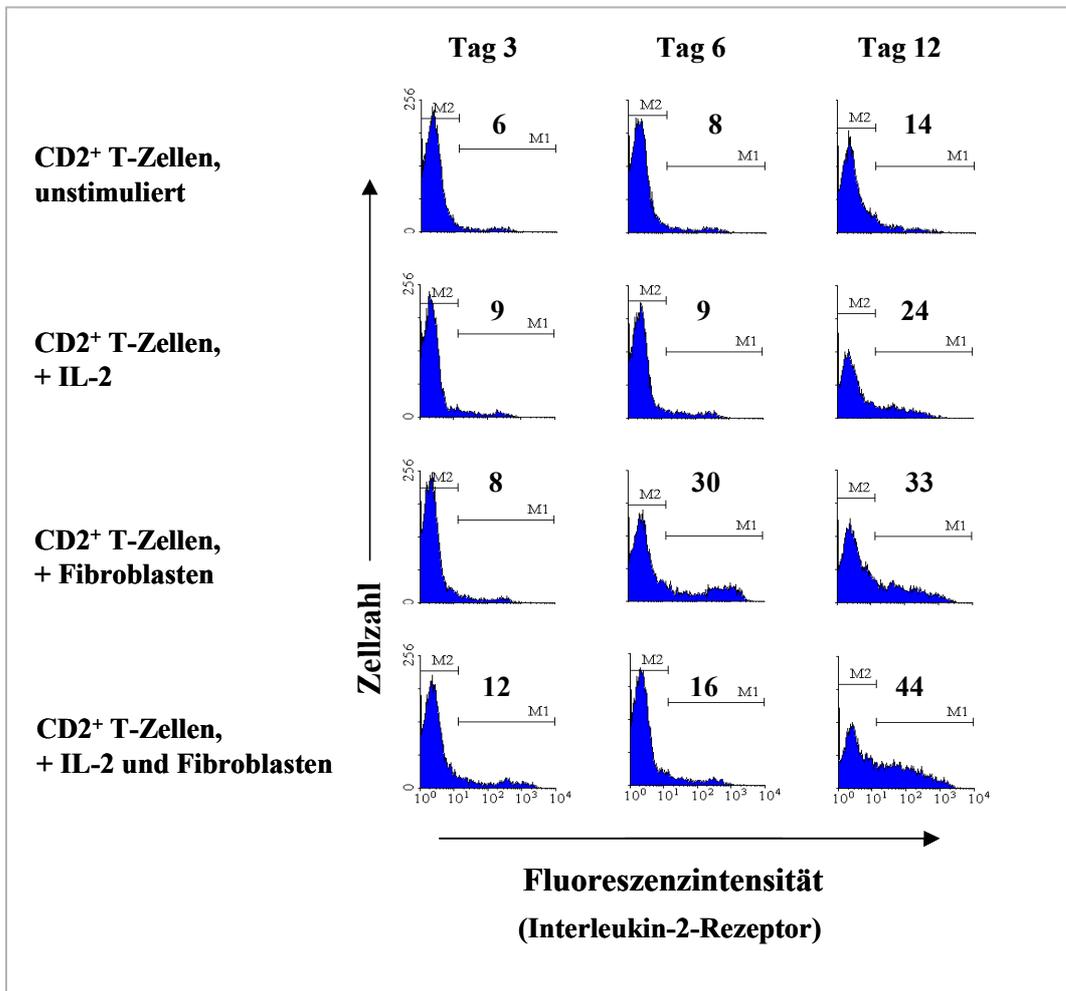


Abbildung 3.38: FACS-Analyse von IL-2 / *scid*-Fibroblasten stimulierten humanen CD2⁺ T-Zellen zeigten eine stetige Erhöhung der IL-2-Rezeptorexpression (CD25). Als Effektoren wurden humane CD2⁺ T-Zellen nach Stimulation mit bestrahlten murinen C.B-17-*scid*-Fibroblasten, in Anwesenheit von IL-2 und Fibroblasten kokultiviert, eingesetzt. Anschließend wurden die humanen Zellen mit einem direktmarkierten CD25 mAb gefärbt. Die FACS-Analyse der IL-2-Rezeptorexpression auf den kultivierten humanen T-Zellen ist in Histogrammen dargestellt. In dem Bereich M1 sind die prozentualen Anteile der humanen CD25⁺ (IL-2-Rezeptor⁺) Zellen vermerkt.

Die Kokultur von murinen und humanen Zellen mit der Zugabe des Wachstumsfaktors IL-2 führte zu einer weiteren Verstärkung der IL-2-Rezeptorexpression auf 44%. Die Wechselwirkung muriner Rezeptoren mit humanen Liganden besaß somit eine unterstützende Funktion bei der Aktivierung der humanen T-Zellen. Dagegen zeigten nur 24% der mit IL-2 stimulierten humanen T-Zellen eine IL-2-R-Expression, die nur unwesentlich höher lag als

bei unstimulierten Zellen (14%). Ob die durch murine Fibroblasten aktivierten humanen T-Zellen ein lytisches Potential gegen murine xenogene Gewebe entwickelten, sollte durch ^{51}Cr -Freisetzungstests untersucht werden.

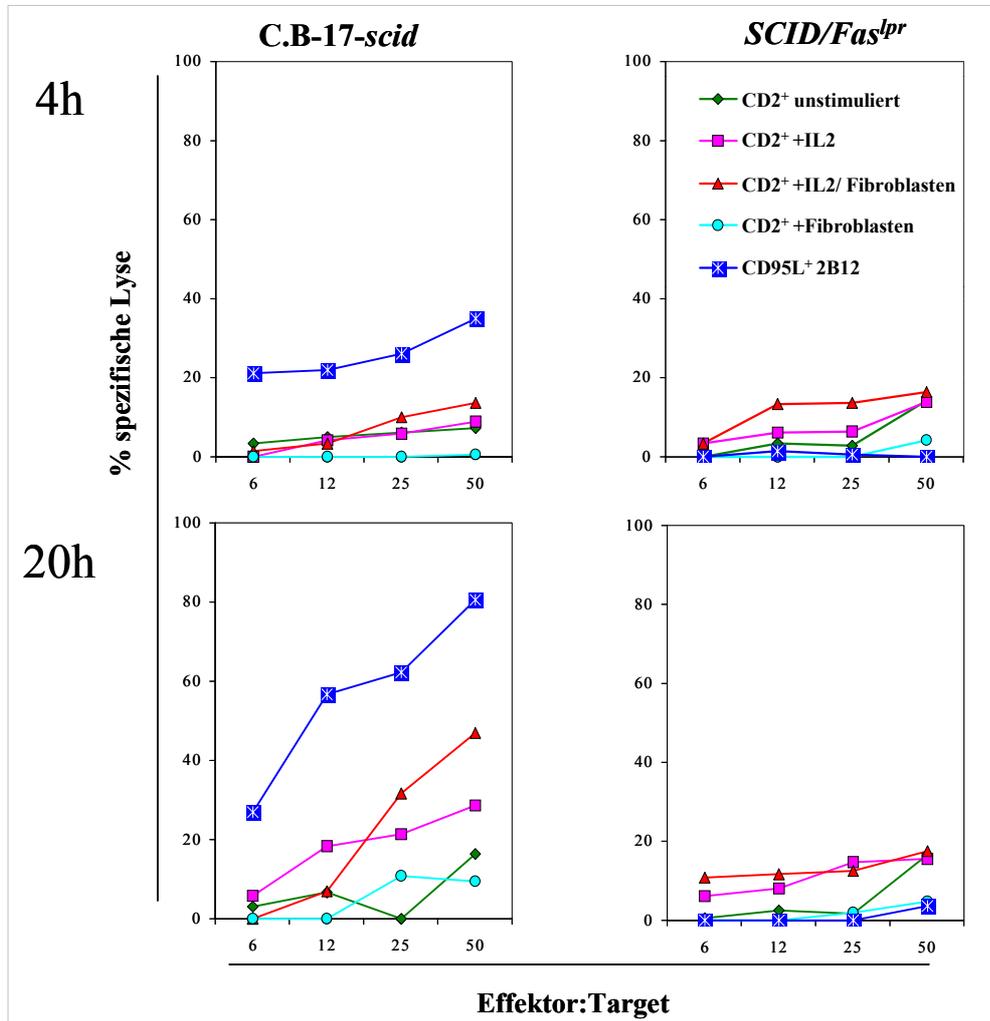


Abbildung 3.39: ^{51}Cr -Freisetzungstest von humanen CD2^+ T-Zellen, die mit murinen Fibroblasten und IL-2 stimuliert wurden, zeigten ein erhöhtes lytisches Potential gegen *scid*-Fibroblasten. Humane CD2^+ T-Zellen wurden für 14 Tage mit bestrahlten C.B-17-*scid*-Fibroblasten, mit und ohne IL-2 und unstimuliert kultiviert. Das zytotoxische Potential der CD2^+ Effektorzellen führte zur Lyse der ^{51}Cr -markierten Fibroblasten des Wildtyps (C.B-17-*scid*) und der *SCID/Fas^{lpr}*-Ausfallmutante. Die spezifische Lyse wurde nach Standardprotokoll nach 4 h (obere Reihe) und 20 h (untere Reihe) bestimmt und gegen das Effektor/Target Verhältnis aufgetragen. Als Kontrolle wurden humane CD95L^+ 2B12-Nierentumorzellen eingesetzt.

Als Zielzellen wurden hierbei murine Fibroblasten von C.B-17-*scid/scid* und *SCID/Fas^{lpr}*-Mutante eingesetzt. Als Effektoren wurden unstimulierte, mit IL-2 stimulierte, mit IL-2 und bestrahlten Fibroblasten des Wildtyps und nur mit Fibroblasten stimulierte T-Zellen eingesetzt. Die Stimulation der humanen T-Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 14 Tagen.

Wie in Abbildung 3.39 dargestellt, führten die mit bestrahlten murinen Fibroblasten und IL-2 aktivierten T-Zellen zu einer Lyse von murinen *scid*-Fibroblasten und in einem geringeren Maße auch zur Lyse von *SCID/Fas^{lpr}*-Fibroblasten. Diese CD2⁺ T-Zellen waren in der Lage, über 40% der *scid*-Fibroblasten nach 20 h, in Abhängigkeit vom Effektor/Target Verhältnis, zu lysieren. Die nur mit IL-2 stimulierten humanen Effektorzellen zeigten im Vergleich zu den mit Fibroblasten und IL-2 kokultivierten humanen T-Zellen ein deutlich geringeres lytisches Potential von 30%. Die unstimulierten oder nur mit murinen Fibroblasten stimulierten humanen T-Zellen besaßen ein noch geringeres lytisches Potential. Durch den Einsatz der CD95L⁺ 2B12-Nierentumorzellen wurden innerhalb von 4 h knapp 40% und nach 20 h über 80% der *scid*-Fibroblasten lysiert. Als Kontrolle der spezifischen CD95L/CD95-Wechselwirkung wurden zusätzlich Fibroblasten der *SCID/Fas^{lpr}*-Mutante als Targetzellen eingesetzt. Durch das Fehlen der murinen CD95Rezeptorexpression kam es zu keiner Interaktion zwischen humanen Effektoren und murinen Zielzellen, so daß die 2B12-Effektorzellen diese ⁵¹Cr-markierten *SCID/Fas^{lpr}*-Fibroblasten nicht lysierten. Die humanen CD2⁺ T-Zellen zeigten dementsprechend ebenso ein geringeres lytisches Potential von unter 20% sowohl nach 4 h als auch nach 20 h. Dieser Befund belegte, daß eine verstärkte Lyse der *scid*-Fibroblasten in erster Linie durch die CD95L/CD95-Interaktion erfolgte. Ferner zeigten diese Ergebnisse, daß es zu spezifischen Wechselwirkungen zwischen humanen Liganden und deren murinen Rezeptoren über Speziesgrenzen hinweg kam. Die Fibroblasten zeichneten sich durch die Expression spezifischer Moleküle, wie CD95, bzw. deren Verlust (*SCID/Fas^{lpr}*) aus und stellten somit hervorragende Zielstrukturen für die Untersuchung von molekularen Interaktionen dar. Weiterhin wurde gezeigt, daß der Verlust von einzelnen murinen Oberflächenmolekülen zu sehr unterschiedlichen Modulationen der Immunantwort humaner T-Zellen führte. Die Analyse muriner Fibroblasten von Ausfallmutanten ermöglichte somit Untersuchungen von murinen Zielstrukturen, die bei der xenogenen Abstoßungsreaktion im SCIDHu-Tiermodell eine Rolle spielten.

3.7 Wirkung des Expressionsverlustes muriner Adhäsionsmoleküle bei der Induktion der xGvHD

Durch die gerichtete Mutagenese erzeugte murine Verlustmutanten erlaubten, die Auswirkung einer fehlenden Expression muriner Oberflächenmoleküle mit der Ausbildung der xGvHD zu korrelieren. Hierbei stellten murine Adhäsionsmoleküle, die während der Induktionsphase wirkten, und Moleküle der Effektorphase, wie CD95, sehr gute Ziele dar. Hierfür mußte allerdings zuerst untersucht werden, ob die injizierten humanen T-Zellen die Expression muriner Adhäsionsmoleküle, wie ICAM1 und P-Selektin, induzierten.

3.7.1 Induktion muriner Adhäsionsmoleküle nach Inokulation humaner T-Zellen

Die Vermittlung von Adhäsion an den Endothelien und die Migration von Lymphozyten bei entzündlichen Prozessen wird von vielen Molekülen gefördert. Das Transmembranprotein ICAM1 (CD54), ein Immunglobulin-ähnliches Molekül mit 5 Ig-Domänen und einer relativen Masse von 80-110 kDa, stellt eines dieser wichtigen Moleküle dar. Es besitzt neben wichtigen Funktionen bei der Adhäsion und der Migration von Lymphozyten auch eine akzessorische Funktion bei der Antigenpräsentation und somit bei der Induktion von T-Zellantworten. Als Ligand von ICAM1 fungiert das β_2 Integrin LFA1, welches von T-Lymphozyten exprimiert wird. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen humanen und murinen ICAM1 und den hierbei besonders hochkonservierten Bereichen der LFA1/ICAM1-Interaktion konnte zunächst nicht definitiv auf Interaktionen über Speziesgrenzen hinweg geschlossen werden.

3.7.2 Nachweis einer *de novo* ICAM1-Synthese muriner Hepatozyten nach Inokulation humaner T-Zellen

Die zellulär vermittelte Abstoßungsreaktion humaner $CD4^+CD45RA^+$ T-Zellen gegen diskordantes murines Gewebe führte zu der Frage, ob diese zellulären Wechselwirkungen die Expression muriner Oberflächenmoleküle induziert. Mit dem Nachweis stark infiltrierender humaner T-Zellen an Gefäßen und umliegenden Geweben von Leber, Milz, Lunge und Niere sollten immunhistologische Färbungen die Expression des murinen ICAM1-Moleküls untersuchen. Eine erhöhte murine ICAM1-Expression wurde in allen untersuchten Organen der mit humanen T-Zellen inokulierten und an xGvH-erkrankten *scid*-Versuchstiere beobachtet.

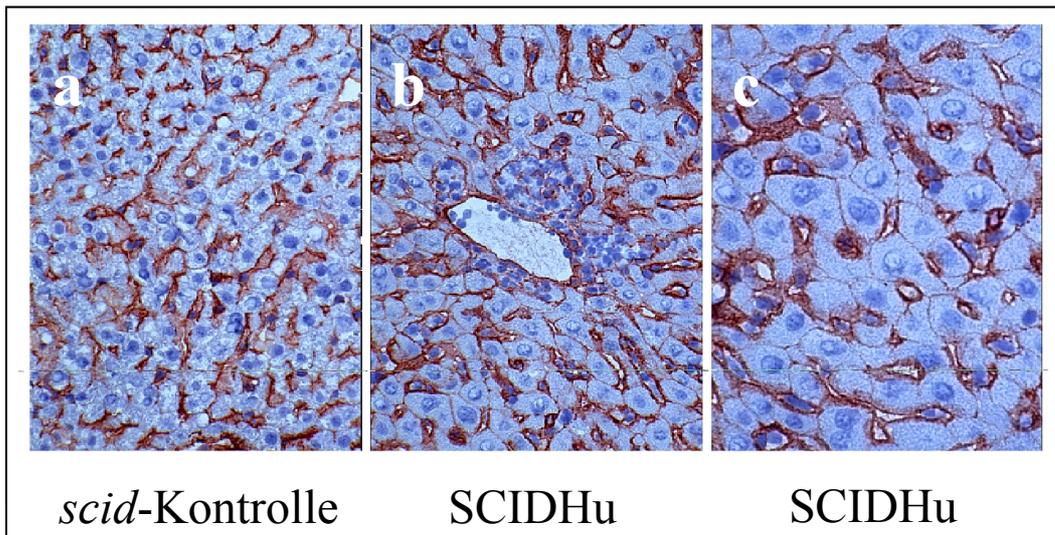


Abbildung 3.40: Immunhistologische Färbung von Lebergewebe einer unbehandelten und einer mit humanen T-Zellen inokulierten *scid*-Maus zeigte eine *de novo* ICAM1-Expression der murinen Hepatozyten. Die an der Zelloberfläche exprimierten murinen ICAM1-Moleküle wurden mit einem anti-Maus CD54 mAb detektiert. Im Gegensatz zu unbehandelten *scid*-Versuchstieren (a) zeigten die Hepatozyten einer SCIDHu-Maus (b und c) eine deutliche Färbung der Zellwände und somit eine *de novo* ICAM1-Expression an. (a und b: Vergrößerung 200x, c: Vergrößerung 312,5x)

Im Vergleich hierzu wurden unbehandelte C.B-17-*scid*-Mäuse untersucht (Abbildung 3.40). Ein sehr deutlicher Beleg für die zellulären Wechselwirkungen zwischen den humanen T-Zellen und den murinen Geweben wurde durch den Nachweis der ICAM1-Expression im Lebergewebe erbracht. Die normalerweise ICAM1⁻ murinen Hepatozyten zeigten auf den Zelloberflächen eine sehr starke Expression dieses Moleküls. Diese *de novo* ICAM1-Synthese der Hepatozyten belegte, daß es im Verlauf der xGvHD zu einer Stimulation der murinen ICAM1-Expression kam. Immunhistologische Färbungen mit Isotypkontrollen zeigten keine unspezifischen Bindungen mit den untersuchten Geweben. Diese ersten Befunde belegten, daß die humanen T-Zellen in den *scid*-Versuchstieren die murine ICAM1-Expression im Verlauf der xGvHD induzierten. Der Verlust der membranständigen murinen ICAM1-Expression und damit das Fehlen der ICAM1/LFA1-Interaktion könnte daher einen Einfluß auf die xGvHD, z.B. durch Störungen bei der Antigenpräsentation (direkte Route) bzw. bei der Adhäsion humaner Zellen an murinen Endothelien, nehmen. Um dies zu untersuchen, wurde die ICAM1-Ausfallmutation auf den *scid*-Hintergrund gekreuzt.

3.7.3 Charakterisierung der ICAM1-KO-Mutante

Um mögliche Interaktionen zwischen humanen Effektorzellen und xenogenen murinen Geweben zu untersuchen, wurden verschiedene murine knock-out-Mutationen durch Kreuzungen auf den genetischen BALB/c-Hintergrund der C.B-17-*scid*-Mäuse überführt (heterogener Hintergrund). Dadurch konnte der Ausfall bzw. die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle mit der Ausbildung der Graft-versus-Host-Erkrankung im SCIDHu-Tiermodell in Zusammenhang gebracht werden. Die Inokulation humaner T-Zellen führte zu einer Hochregulation des murinen Interzellularen-Adhäsions-Moleküls1 (ICAM1/CD54). Durch den Einsatz einer ICAM1-Defekt-Mutante konnte der Einfluß der LFA1/ICAM1-Interaktion bei der Auslösung der xGvHD untersucht werden.

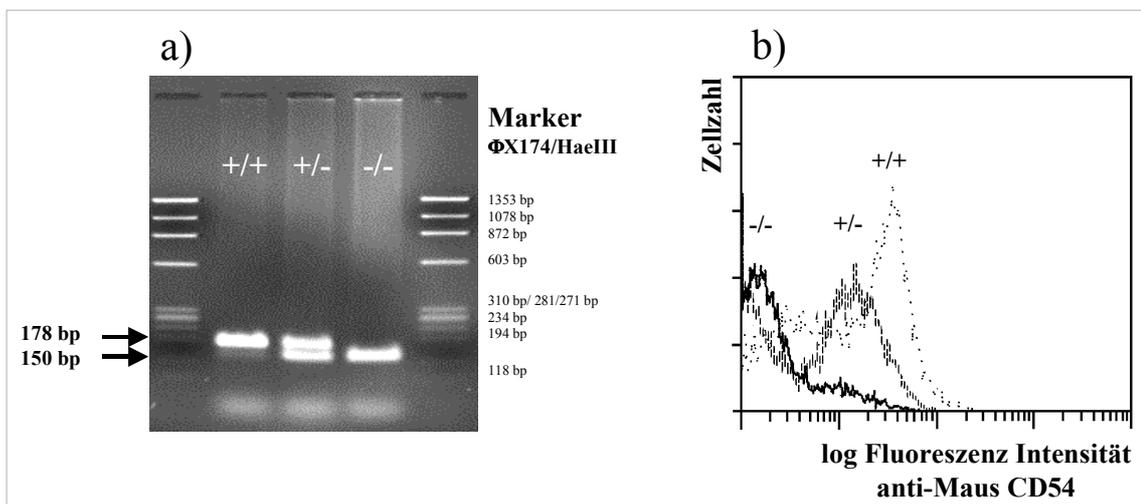


Abbildung 3.41: Genotypisierung der *SCID/ICAM1*-KO-Mutanten mittels PCR und FACS-Analyse muriner Milzzellen dieser KO-Mutante zeigten den Verlust der ICAM1-Expression. a) Durch den Einsatz der PCR konnten die Versuchstiere genotypisiert werden. Die Amplifikation von spezifischen PCR-Fragmenten ließ eine einwandfreie Unterscheidung von Wildtyp- und ICAM1-Ausfallmutante zu. b) Der Nachweis des ICAM1-Moleküls erfolgte durch einen FITC-markierten anti-Maus CD54 Antikörper. Die FACS-Analyse der murinen ICAM1-Expression auf Milzzellen des Wildtyps (^{+/+}), der heterozygoten (^{+/-}) und der homozygoten (^{-/-}) *SCID/ICAM1*-KO-Mutanten führte zu übereinstimmenden Ergebnissen. Die heterozygoten *SCID/ICAM1*-KO-Mutanten zeigten im Vergleich mit dem Wildtyp (hier: BALB/c) eine nur unwesentlich schwächere ICAM1-Expression auf. Demgegenüber wurde auf den Milzzellen der homozygoten Verlustmutante keine ICAM1-Expression nachgewiesen.

Die Genotypisierung der *SCID/ICAM1*-Versuchstiere erfolgte mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Der Einsatz unterschiedlicher Primerpaare führte dabei zu einer eindeutigen Unterscheidung von Wildtypallel (178 bp großes PCR-Fragment) und Mutantenallel (150 bp großes PCR-Fragment). Das PCR-Protokoll (Sandberg, 1994, Persönliche Mitteilung)

ermöglichte somit eine eindeutige Genotypisierung der untersuchten Ausfallmutanten (Abbildung 3.41a). Die ICAM1-KO-Mutation zeigte auf der Ebene der Proteinexpression ein übereinstimmendes Expressionsschema (Abbildung 3.41b). Hierzu wurden Einzelzell-suspensionen verschiedener Organe des Wildtyps, der homo- und heterozygoten *SCID/ICAM1*-KO-Mutanten durchflußzytometrisch analysiert.

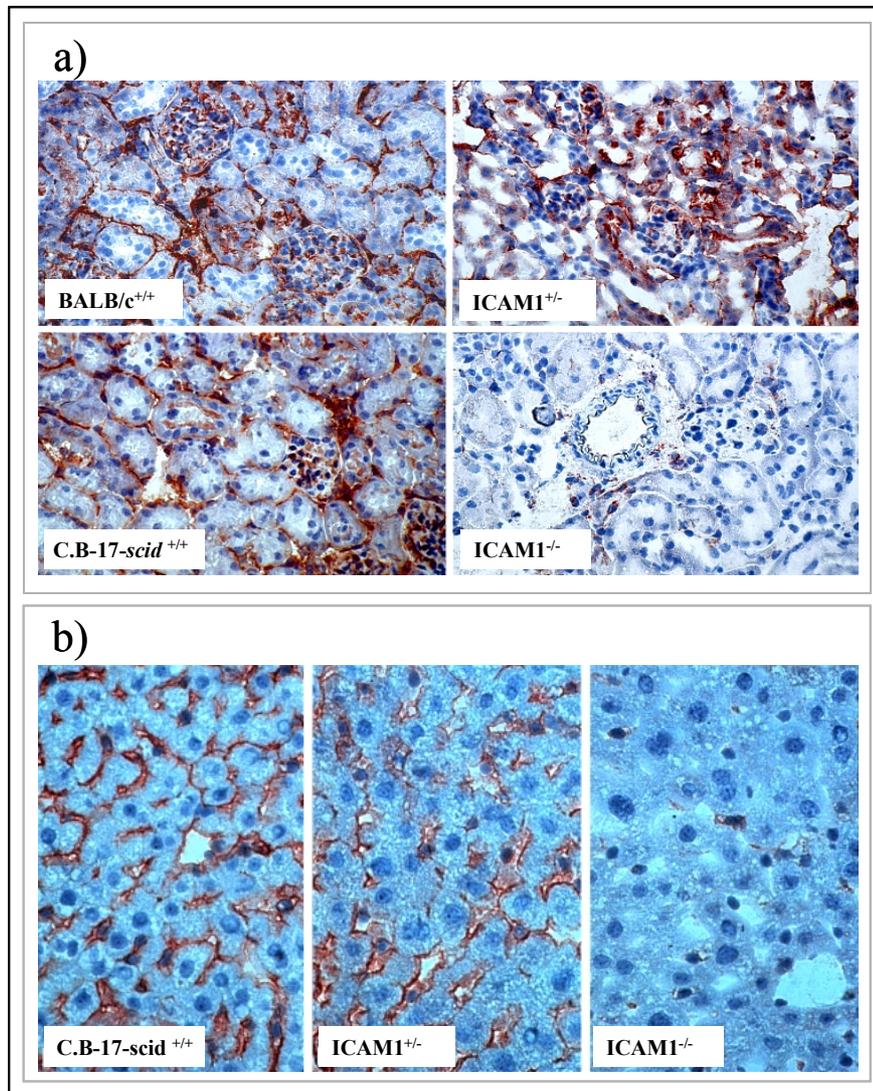


Abbildung 3.42: Immunhistologische Färbungen der Leber und Niere von C.B-17-scid, BALB/c sowie hetero- und homozygoten *SCID/ICAM1*-KO-Mutanten belegten den Verlust der murinen ICAM1-Expression. Die murinen ICAM1-Moleküle wurden mit einem unmarkierten Ratte-anti-Maus Antikörper markiert und anschließend mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper nachgewiesen. a) Auf den Gefrierschnitten der homozygoten ICAM1-Verlustmutanten wurden keine spezifischen Bindungen des CD54-Antikörpers nachgewiesen. Demgegenüber zeigten BALB/c-, C.B-17-scid-Wildtyp und die heterozygote *SCID/ICAM1*-KO-Mutante deutliche Färbungen der murinen ICAM1-Moleküle. b) Auf den Gefrierschnitten der Leber wurden übereinstimmende Ergebnisse beobachtet. (a/b: Vergrößerung 312,5x)

Zwischen Wildtyp^(+/+) und heterozygoter KO-Mutante^(+/-) wurde ein starker Unterschied in der Intensität bei der Ausprägung der ICAM1-Expression nachgewiesen. Dieser Befund erklärt sich möglicherweise über einen Gendosis-Effekt. Die homozygote Mutante zeigte hingegen einen deutlichen Verlust der ICAM1-Expression auf den Zelloberflächen der untersuchten Organe (Abbildung 3.42b). Neben der durchflußzytometrischen Analyse erfolgte auch eine immunhistologische Bewertung der murinen ICAM1-Expression auf unterschiedlichen Geweben. Gefrierschnitte der Leber und der Milz von unbehandeltem Wildtyp und heterozygoter Verlustmutante zeigten bei der ICAM1-Expression kaum Intensitätsunterschiede. Demgegenüber wurde in den untersuchten Geweben der homozygoten Verlustmutante keine membranständige ICAM1-Expression nachgewiesen, wie immunhistologische Färbungen belegten (Abbildungen 3.41a) und b)). Die Isotypkontrollen zeigten keine unspezifischen Bindungen auf den untersuchten Gefrierschnitten aus Leber und Niere. Durch Untersuchungen von King et al. und van Den Engel et al. wurde jedoch gezeigt, daß die eingesetzten *SCID/ICAM1*-KO-Mutanten durchaus in der Lage waren, lösliche ICAM1-Isoformen zu exprimieren. Aufgrund dieser Befunde konnte nicht ausgeschlossen werden, daß diese verkürzten ICAM-1-Isoformen einen Einfluß auf die Auslösung der xGvHD nahmen [57, 150].

3.7.4 Induktion der letalen xGvHD in *SCID/ICAM1*-KO-Mutanten nach Inokulation humaner CD4⁺ T-Zellen

Um den Verlust der murinen ICAM1-Proteinexpression und dessen Einfluß auf den Verlauf der Graft-versus-Host-Erkrankung nach Inokulation humaner Zellen zu untersuchen, wurden die durch homologe Rekombination erstellten ICAM1-KO-Mutanten durch Kreuzungen auf den Hintergrund der C.B-17-*scid*-Versuchstiere übertragen. Es stellte sich die Frage, ob der Verlust der membranständigen ICAM1-Expression zu einer Hemmung der Migrationsprozesse humaner T-Lymphozyten und damit zu einem effektiven Schutz vor der zellulär vermittelten xGvHD führte. Ferner sollte untersucht werden, welchen Einfluß die löslichen ICAM1-Isoformen bei der Ausbildung der Erkrankung besaßen.

Die *scid/scid-Icam1^{tm1Bay}/+*-Wurfgeschwister (heterozygote *SCID/ICAM1*) wurden als Kontrollen eingesetzt. Die Inokulation humaner CD4⁺ Zellen induzierte in den hetero- und homozygoten Geschwistertieren der ICAM1-KO-Mutanten eine letale xGvHD. Die Erkrankung der *scid/scid-Icam1^{tm1Bay}/Icam1^{tm1Bay}*-Geschwister (homozygote *SCID/ICAM1*) zeigte im Vergleich zum ICAM1-Wildtyp einen milderen Verlauf mit schwächer

ausgeprägtem Gewichtsverlust, Buckelbildung und apathischem Verhalten. Jedoch wurde weiterhin die letale xGvHD ausgelöst. Immunhistologische Färbungen der murinen Zielorgane von homo- und heterozygoten ICAM1-Versuchstieren zeigten starke Infiltrationen humaner Zellen, wie sie schon beim ICAM1-Wildtyp, der C.B-17-*scid*-Maus, gefunden wurden. Die humanen Zellen wurden vorwiegend an den Gefäßen und verteilt im umliegenden Gewebe nachgewiesen. Starke Unterschiede zeigten sich nur bei homo- und heterozygoten Versuchstieren, die trotz übereinstimmender Inokula zu verschiedenen Zeitpunkten erkrankten (Abbildung 3.43).

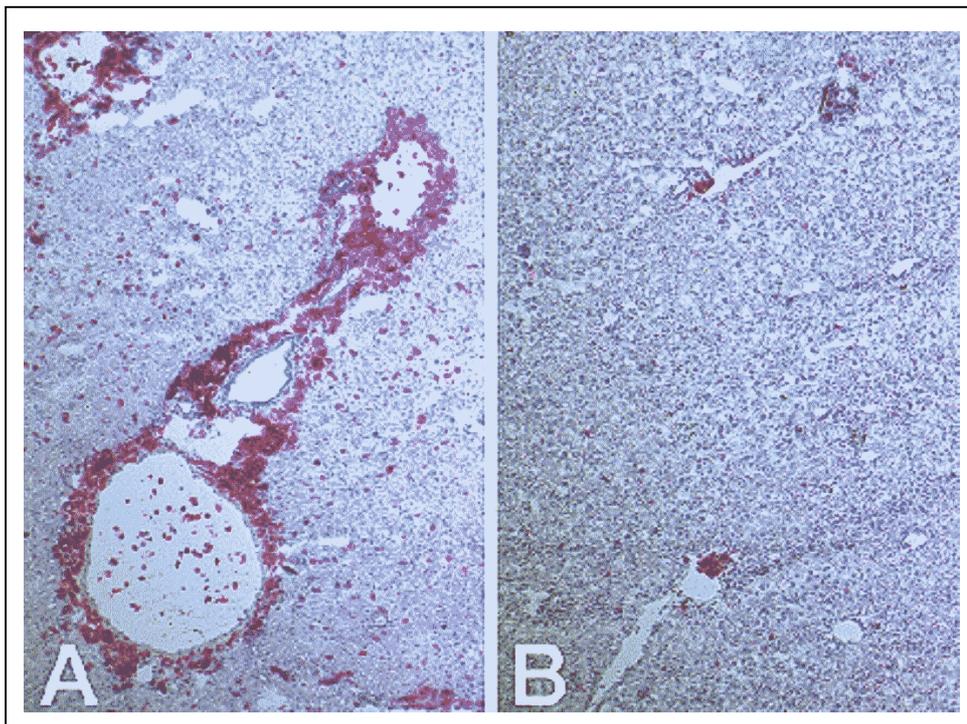


Abbildung 3.43: Immunhistologische Färbung der Leber eines heterozygoten Versuchstiers zeigte im Vergleich zum homozygoten *SCID/ICAM1*-Geschwistertier eine verstärkte Infiltration humaner $CD45^+$ Zellen. Die Inokulation von 5×10^7 $CD4^+$ humanen Zellen eines Spenders führte innerhalb von 15 Tagen zur Ausbildung einer xGvH-Erkrankung im heterozygoten Versuchstier. Im homozygoten Geschwistertier wurde innerhalb von 58 Tagen eine letale xGvHD induziert. Die humanen Zellen wurden mit einem anti-Human $CD45$ Antikörper detektiert. A) Der Gefrierschnitt der Leber eines heterozygoten *ICAM1*-Versuchstiers wies starke Infiltrationen humaner $CD45^+$ Zellen auf. B) Demgegenüber wurden im Gefrierschnitt der Leber eines homozygoten *SCID/ICAM1*-Geschwistertiers nur wenige humane $CD45^+$ Zellinfiltrate gefunden. (Vergrößerung 125 x)

Der Nachweis humaner Zellen im Gewebe der Leber einer heterozygoten *SCID/ICAM1*-KO-Mutante am Tag 15 zeigte sehr starke Infiltrationen um die Gefäße sowie im umgebenden Gewebe. Demgegenüber wurden in der Leber des homozygoten Geschwistertiers am Tag 58 nur wenige humane Zellen an den Gefäßen nachgewiesen.

Tabelle 3.13: Überlebensdaten von homozygoten *scid/scid-Icam1^{tm1Bay}/Icam1^{tm1Bay}-* bzw. heterozygoten *scid/scid-Icam1^{tm1Bay}/+*-Versuchstieren nach Inokulation humaner CD4⁺ T-Zellen ¹⁾²⁾

Experiment Nr.	Anzahl Versuchstiere	Ausbildung einer letalen xGvHD nach Inokulation in C.B-17- <i>scid</i> (in Tagen)	
		<i>Icam1^{tm1Bay}/+</i>	<i>Icam1^{tm1Bay}/Icam1^{tm1Bay}</i>
1	5	13	10, 17, >22, >22
2	6	8, 8, 8	13, 16, 16
3	5	10, 14, 16	10, 14
4	3	9	9, 12
5	5	9, 13	10, 10, 11
6	5	9	9, 12, 14, 18
7	6	9, 11, 13	9, 10, 16
8	5	10, 11, 15	9, 10
9	5	12	10, 11, 14, 14
10	3	14	13, 20
11	4	17	16, 17, 24
12	6	12, 12	13, 13, 16, >40
13	5	12, 13	8, >40, >40
14	5	12, 23	10, 11, 12
15	3	15	29, 29
16	6	11, 13, 15	>40, >40, >40
17	4	10, 14	9, 14
18 ³⁾	5	>40, >40	>38, >40, >40

Die Inokulation von jeweils 5×10^7 CD4⁺ humanen T-Zellen induzierte in der überwiegenden Zahl der Versuche sowohl in homozygoten als auch in heterozygoten *SCID/ICAM1*-KO-Mutanten eine letale xGvHD. ¹⁾ In 17 von 18 Versuchen zeigten die homozygoten *SCID/ICAM1*-KO-Mutanten (n=52) eine geringe Schutzfunktion durch den Verlust der membranständigen ICAM1-Expression. ²⁾ Die heterozygoten Versuchstiere (n=34) entwickelten in fast allen Versuchen (17 von 18) eine letale xGvHD in einem Zeitraum von weniger als 20 Tagen. ³⁾ Versuch 18 wurde nicht ausgewertet, da keine humanen Zellen nachgewiesen werden konnten.

Ein übereinstimmendes Verteilungsmuster humaner Zellen wurde auch in den anderen Organen, wie Niere und Lunge, beobachtet. Beim Vergleich homo- und heterozygoter

SCID/ICAM1-Geschwistertiere, die zum gleichen Zeitpunkt getötet wurden, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Verteilungsmuster der humanen Lymphozyten in den murinen Zielorganen. Die Überlebensdaten der Versuchstiere zeigten in fast allen Experimenten (n=18) eine sehr hohe Variabilität, wie in der Tabelle 3.13 dargestellt. Die heterozygoten Versuchstiere entwickelten eine letale Graft-versus-Host-Reaktion in einem Zeitraum von 9 bis 40 Tagen nach Inokulation humaner CD4⁺ Zellen. Insgesamt wurde in 30 Experimenten mit 124 Versuchstieren sowohl in homo- als auch heterozygoten Versuchstieren (*ICAM1*^{+/-}, n=56 / *ICAM1*^{-/-}, n=68) die letale Graft-versus-Host-Erkrankung durch humane CD4⁺ Zellen induziert. Neben einer hohen Variabilität im Überleben der homo- als auch der heterozygoten *ICAM1*-KO-Mutanten wurde jedoch eine Verlängerung im Überleben der homozygoten *SCID/ICAM1*-Mutanten beobachtet (Abbildung 3.44 und Tabelle 3.13).

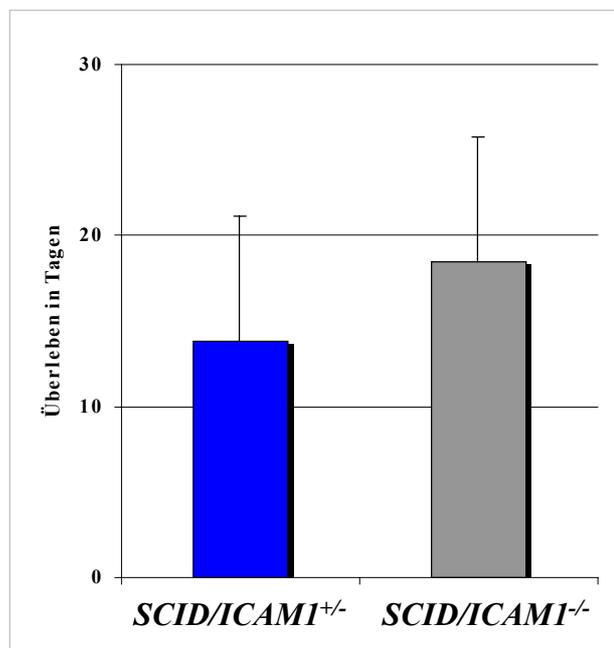


Abbildung 3.44: Die homozygoten *SCID/ICAM1*-KO-Mutanten zeigten nach Inokulation humaner CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu den heterozygoten Geschwistertieren ein um durchschnittlich 4 Tage verlängertes Überleben. Die Inokulation von 5 x 10⁷ CD4⁺ T-Zellen induzierte in zahlreichen Experimenten (n=18) in homo- und heterozygoten *SCID/ICAM1*-Versuchstieren eine letale xGvHD. Die homozygoten *SCID/ICAM1*-Mutanten (n=52) zeigten dabei im Vergleich mit den heterozygoten Geschwistertieren (n=34) ein verlängertes Überleben. Die *ICAM1*-Mutation besaß jedoch nur eine geringe lebensverlängernde Schutzfunktion. Auch in diesen Versuchstieren wurde eine xGvH-Erkrankung ausgelöst, allerdings etwa 4 Tage später.

Die heterozygoten *SCID/ICAM1*-Versuchstiere (n=34) zeigten dabei eine durchschnittliche Überlebenszeit von 14 Tagen. Die homozygoten Geschwistertiere (n=52) zeigten

demgegenüber eine durchschnittliche Überlebenszeit von 18 Tagen (Abbildung 3.44 und 3.45). Durch den Vergleich dieser Daten wurde deutlich, daß nur ein Unterschied von 4 Tagen im Überleben der homozygoten *SCID/ICAM1*-Versuchstiere vorlag. Dieser relativ geringe Unterschied im Überleben lag im Bereich der Standardabweichungen von 7 bzw. 11 Tagen. Die statistische Auswertung belegte zwar sehr starke Tendenzen einer späteren Auslösung der xGvHD bei den homozygoten *Icam1^{tm1Bay}/Icam1^{tm1Bay}*-Versuchstieren, jedoch wurde die Signifikanzgrenze ($p \leq 0,05$) mit $p = 0,056$ leicht überschritten. Der Verlust der murinen ICAM1-Expression nahm einen geringen Einfluß auf den Verlauf der xGvH-Erkrankung. Die geringen Unterschiede standen dabei mit einem mildereren Verlauf der xGvH-Erkrankung bei den homozygoten *SCID/ICAM1*-KO-Mutanten in Verbindung. Zwar wurden weiterhin vergleichbare Symptome, wie Gewichtsverlust, Buckelbildung und apathisches Verhalten des Wildtyps nachgewiesen, sie erfolgten jedoch erst später und abgemildert. Eine typische Entwicklung des Körpergewichts der eingesetzten Versuchstiere (Experiment 2 aus Tabelle 3.12) wurde in Abbildung 3.45b) dargestellt.

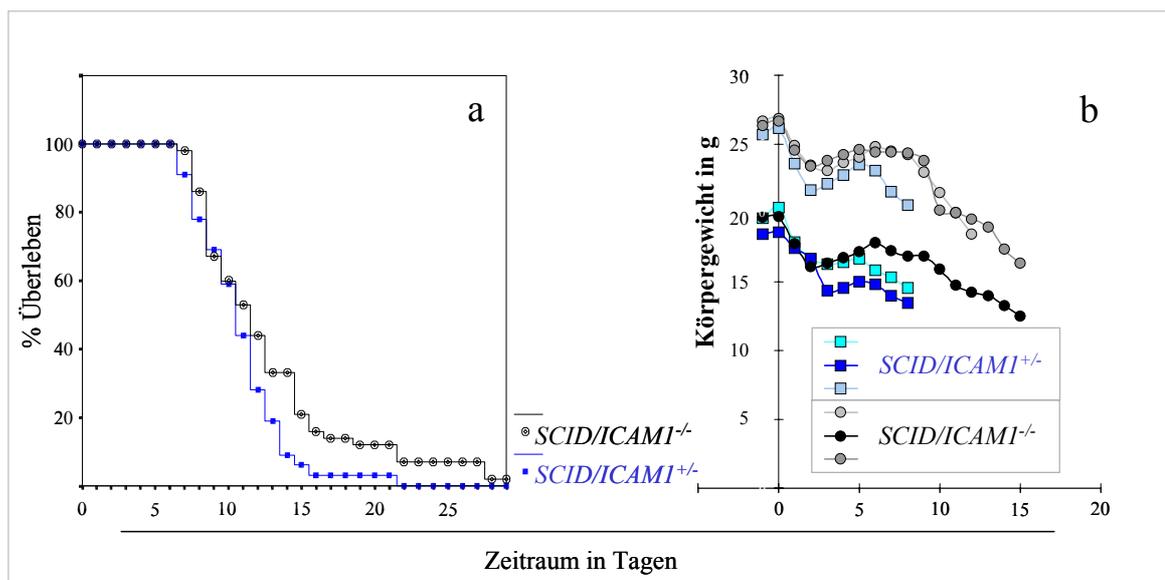


Abbildung 3.45: Die homozygoten *SCID/ICAM1*-Versuchstiere zeigten nach Inokulation humaner T-Zellen im Vergleich mit ihren heterozygoten Geschwistern ein verlängertes Überleben. a) Die Überlebensdaten von homo- und heterozygoten *ICAM1*-KO-Mutanten zeigten, daß die homozygoten *SCID/ICAM1*-Versuchstiere (n=43) im Vergleich zu den heterozygoten Geschwistertieren (n=32) in der Regel später an der xGvH-erkrankten. b) Entwicklung des Körpergewichts: Die homo- und heterozygoten *ICAM1*-KO-Mutanten entwickelten nach Injektion von 5×10^7 CD4⁺ humanen T-Zellen innerhalb von 16 Tagen eine letale xGvHD mit charakteristischer Symptomatik. Die heterozygoten *SCID/ICAM1*-Versuchstiere (n=3) verstarben jedoch sehr viel früher (Tag 8) im Vergleich zu den homozygoten Geschwistertieren (n=3), die nach 13 bzw. 16 Tagen verstarben.

Die Inokulation humaner CD4⁺ T-Zellen löste in den heterozygoten *SCID/ICAM1*-Versuchstieren (n=3) eine letal verlaufende xGvH-Erkrankung nach 8 Tagen aus. Die homozygoten *SCID/ICAM1*-Geschwistertiere (n=3) zeigten demgegenüber zu diesen Zeitpunkten keine Krankheitssymptomatik. Die Erkrankung wurde in den homozygoten Versuchstieren erst nach 13 bzw. 16 Tagen ausgelöst. Eine mögliche Erklärung für den abgeschwächten Verlauf bzw. für die zeitliche Verzögerung im Verlauf der xGvH-Erkrankung könnte darin bestehen, daß bisher noch unbekannt murine Oberflächenmoleküle den Verlust der ICAM1-Molekülexpression ersetzen. Diese Interaktion zwischen humanen und murinen Zellen war jedoch schwächer ausgeprägt, so daß es zu einer verzögerten Auslösung der xGvHD kam. Allerdings könnten die alternativ gespleißten ICAM1-Isoformen ebenfalls für den beobachteten Effekt mitverantwortlich sein.

Zusätzlich zu den *in vivo* Versuchen sollten deshalb *in vitro*-Experimente belegen, ob der geringe Vorteil der ICAM1-Ausfallmutation im Überleben nach Inokulation von humanen T-Zellen auch im ⁵¹Cr-Freisetzungstest nachgewiesen werden konnte. Da jedoch keine ausreichenden Zellzahlen *in vivo* aktivierter humaner T-Zellen aus xGvH-erkrankten Versuchstieren zu erhalten waren, mußten mit IL-2 und mit IL-2/Fibroblasten stimulierte CD2⁺ T-Zellen eingesetzt werden. Zur Bestimmung des Einflusses der ICAM1-KO-Mutation auf das lytische Potential humaner Effektorzellen wurden murine Fibroblasten des *scid*-Wildtyps, der *SCID/Fas^{lpr}*- und *SCID/ICAM1*-Mutanten als Targetzellen eingesetzt. Als Effektoren wurden *in vitro* stimulierte humane CD2⁺ T-Zellen eingesetzt. Als Kontrollen wurden die CD95L⁺ (2B12) und CD95L⁻ (pcDNA) Nierentumorzellen eingesetzt. Wie erwartet, wurden die murinen Fibroblasten nicht von den CD95L⁻ pcDNA Zellen lysiert (Abbildung 3.46). Die murinen Fibroblasten des Wildtyps und der *SCID/ICAM1*-KO-Mutante wurden weiterhin über eine CD95L/CD95-Interaktion sowohl nach 4 h (obere Reihe) als auch nach 20 h (untere Reihe) zerstört. Die CD95L⁺ 2B12-Zellen induzierten im Kontrollversuch keine Apoptose in den Fibroblasten der *SCID/Fas^{lpr}*-Mutante. Die mit IL-2 und murinen Fibroblasten über 25 Tage stimulierten humanen T-Zellen zeigten im Vergleich zu den nur mit IL-2 stimulierten Zellen ein verstärktes Potential bei der Lyse der *scid*-Fibroblasten von knapp 20% nach 4 h. Gleichzeitig wurden jedoch auch die Fibroblasten der *Fas^{lpr}*-Mutante nach 20 h erkannt und lysiert (über 20%). Im Vergleich hierzu wurden die murinen Fibroblasten der *SCID/ICAM1*-Ausfallmutante nicht lysiert (Abbildung 3.46 (rechte Spalte) und 3.36). Die Lyse der murinen Targetzellen war in diesem Versuch also nicht abhängig von einer murinen Expression des CD95Rezeptors, sehr wohl jedoch von dem Verlust der murinen ICAM1-Molekülexpression.

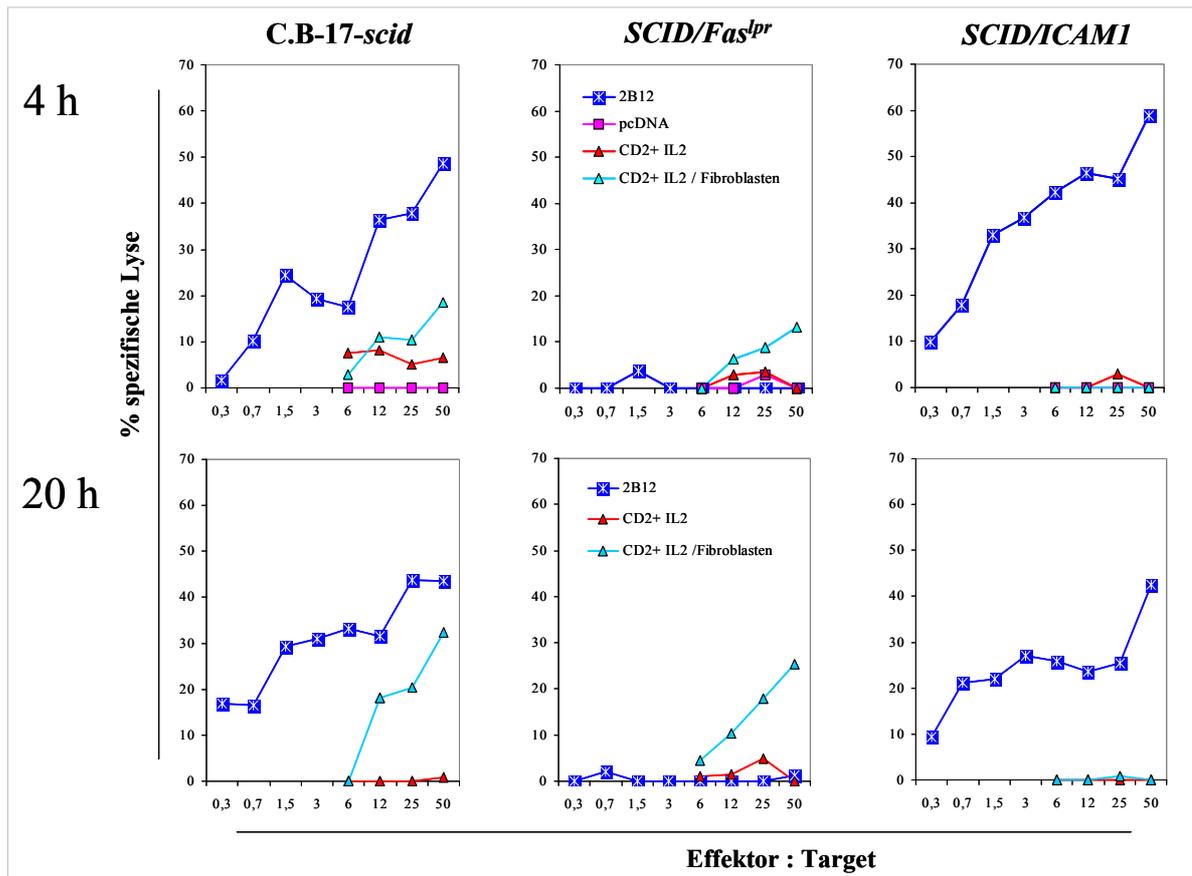


Abbildung 3.46: Murine ICAM1^{-/-}-Fibroblasten zeigten als Targetzellen ein verringertes xenoreaktives Potential bei der Lyse durch IL-2 kultivierte CD2⁺ T-Zellen. Die CD95L⁺ 2B12-Nierentumorzellen als Effektorzellen zeigten demgegenüber keine Unterschiede bei der Lyse dieser Zellen im ⁵¹Cr-Freisetzungstest. Humane CD2⁺ T-Zellen wurden 25 Tage in Anwesenheit von IL-2 (20 U/ml) und zusätzlich mit bestrahlten murinen Fibroblasten des Wildtyps kultiviert und als Effektorzellen in ⁵¹Cr-Freisetzungstests zur Lyse der ⁵¹Cr-markierten murinen Fibroblasten des *scid*-Wildtyps, der *SCID/Fas*^{Δpr}- und *SCID/ICAM1*-Mutanten eingesetzt. Zusätzlich wurden CD95L⁺ (2B12) und CD95L⁻ (pcDNA) Nierentumorzellen als Effektoren gegen die Zielzellen titriert. Die spezifische Lyse wurde nach Standardprotokoll nach 4 h (obere Reihe) und 20 h (untere Reihe) bestimmt und gegen das Effektor/Target Verhältnis aufgetragen.

Anscheinend benötigten die stimulierten humanen Zellen zur Lyse der murinen Fibroblasten eine LFA1/ICAM1-Interaktion. Die vorliegenden Daten zeigten, daß der Verlust der membranständigen murinen ICAM1-Expression einen verzögernden Einfluß auf den Krankheitsverlauf der xGvHD nahm.

3.7.5 Charakterisierung der P-Selektin-KO-Mutante

Die Selektine, die für das Homing von Lymphozyten sehr wichtig sind und sowohl auf den aktivierten Endothelien als auch auf den Lymphozyten exprimiert vorliegen, stellten ein

weiteres wichtiges Ziel der Untersuchungen dar. Selektine sind Oberflächenmoleküle, die Carbohydrate binden und bei der Interaktion von Lymphozyten und Endothelien bei entzündlichen Prozessen eine Rolle spielen. Die P-Selektin-Ausfallmutante ermöglichte dabei die Auswirkung einer fehlenden murinen P-Selektin-Expression auf den Verlauf der xGvHD zu untersuchen. Mit der von Dr. A. L. Beaudet zur Verfügung gestellten P-Selektin-KO-Mutante ergab sich die Möglichkeit, den Verlust des P-Selektin-Adhäsionsmoleküls im Krankheitsmodell der xGvHD zu analysieren.

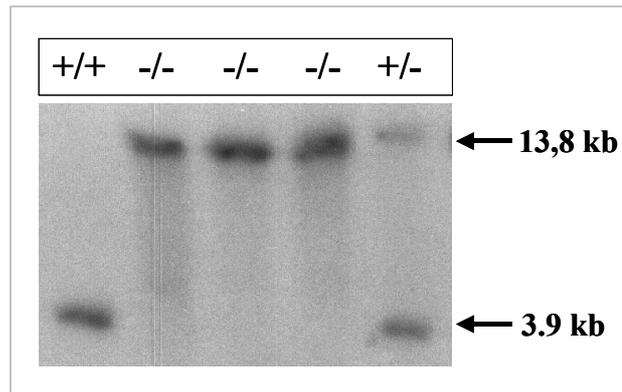


Abbildung 3.47: Die Southern Hybridisierung der EcoRV verdauten genomischen Maus DNA der *SCID/P-Selektin*-Zucht führte zu einer eindeutigen Unterscheidung von Wildtyp und KO-Mutante. Die EcoRV verdaut DNA der Versuchstiere wurde auf einem TAE Agarosegel (1%) für 72 h bei 18V aufgetrennt. Nach dem Kapillartransfer erfolgte eine 16stündige Hybridisierung mit der radioaktiv markierten P-Selektin DNA-Sonde. Der Nachweis der an der NC-Membran gebunden vorliegenden Sonde erfolgte mittels Phospho-Imager. Die Positivkontrolle C.B-17-*scid* zeigte eine deutliche Bande bei 3,9 kb. Demgegenüber wurde bei der homozygoten *Selp^{tm1Bay}/Selp^{tm1Bay}*-Verlustmutante, ebenso wie bei den heterozygoten *Selp^{tm1Bay}/+* KO-Mutanten, ein Fragment in Höhe von 13,8kb nachgewiesen.

Daher wurde die *Selp^{tm1Bay}*-KO-Mutation auf den genetischen Hintergrund der *scid*-Mäuse (BALB/c) übertragen. Die Genotypisierung erfolgte dabei über die Hybridisierung einer markierten P-Selektin DNA-Sonde an EcoRV verdauter genomischer DNA. Die von R. Bosse (MPI für Immunbiologie, 1995) zur Verfügung gestellte spezifische P-Selektin DNA-Sonde (500bp) hybridisierte bei den *scid/scid-Selp^{tm1Bay}/Selp^{tm1Bay}*-Verlustmutanten (homozygote *SCID/P-Selektin*) mit einem Fragment bei 13,8 kb und beim Wildtyp (+/+) mit einem Fragment bei 3,9 kb. Die *scid/scid-Selp^{tm1Bay}/+*-KO-Mutanten (heterozygote *SCID/P-Selektin*) trugen dementsprechend beide Signale (Abbildung 3.47). Durch die Southern Hybridisierung erfolgte somit eine eindeutige Genotypisierung der *SCID/P-Selektin*-Versuchstiere.

Der Verlust der P-Selektin Expression führte in den Versuchstieren ab einem Alter von 6-8 Monaten häufig zur Tumorbildung im Bereich der Augen und der Extremitäten. Häufig kam

es zur Bildung von Vorderlauf-einschließenden Tumoren. Diese soliden Tumore konnten stumpf vom Brustkorb abgelöst werden, waren nicht infiltrierend, zeigten kirsch kerngroße, zentrale, nekrotische Einschmelzungen und waren sehr wahrscheinlich gutartig. Neben der Anfälligkeit für die Entwicklung von Tumoren wurde bei älteren Mäusen (>6 Monate) ein verstärkter Haarausfall im Kopfbereich, den Flanken und dem Rücken beobachtet. Zusätzlich zeigte sich bei älteren unbehandelten Versuchstieren ein relativ hoher Anteil von Darmvorfällen. Über mögliche Ursachen für diese Häufung von Darmvorfällen bei diesen Zuchttieren kann nur spekuliert werden. Alle *SCID/P-Selektin*-Versuchstiere mit Tumorentwicklung oder Darmvorfällen wurden nicht für die *in vivo* Experimente genutzt, sondern sofort nach Diagnose schmerzlos getötet.

3.7.6 Induktion der letalen xGvHD in der *SCID/P-Selektin*-KO-Mutante nach Inokulation humaner CD4⁺ T-Zellen

Inwieweit der Verlust der P-Selektin-Expression homozygoter *SCID/P-Selektin*-KO-Mutanten einen Einfluß auf die Ausprägung der xGvHD besaß, sollte im Vergleich mit den als Kontrollen eingesetzten heterozygoten Wurfgeschwistern untersucht werden. Nach der Genotypisierung wurden die immundefizienten Mäuse im Alter von 6 bis 12 Wochen für die *in vivo* Untersuchungen genutzt.

Tabelle 3.14: Überlebenszeiten der homo- und heterozygoten *SCID/P-Selektin*-KO-Mutanten nach der Inokulation humaner CD4⁺ T-Zellen¹⁾

Experiment Nr.	Anzahl Versuchstiere	Ausbildung einer letalen xGvHD nach Inokulation (in Tagen)	
		<i>SCID/P-Selektin</i> ^{+/-}	<i>SCID/P-Selektin</i> ^{-/-}
1	4	10, 10	11, 15
2	5	12, 13, 14	8, 13
3	4	10, 14	9, 10
4	4	10, 12	8, 10
5	3	9, 9	9
6	4	10, 14	10, 14
7	4	10, 11	11, 12

¹⁾ Die Inokulation von 5×10^7 humanen CD4⁺ T-Zellen induzierte die letale xGvHD sowohl bei homozygoten als auch bei heterozygoten *SCID/P-Selektin*-Verlustmutanten.

Die Inokulation von 5×10^7 $CD4^+$ humanen Zellen löste in allen Versuchen ($n=7$) in den homo- und heterozygoten *SCID/P-Selektin*-Versuchstieren eine letale Graft-versus-Host-Erkrankung aus. Die heterozygoten Versuchstiere ($n=15$) entwickelten innerhalb von 9 bis 14 Tagen eine letale xGvHD mit typischer Runting-Symptomatik, wie Gewichtsverlust, Buckelbildung und apathischem Verhalten. Die homozygoten Verlustmutanten ($n=13$) zeigten einen übereinstimmenden Verlauf der Erkrankung innerhalb von 8 bis 15 Tagen (Tabelle 3.14). Die statistische Auswertung der vorliegenden Überlebensdaten zeigte, daß es keine signifikanten Unterschiede im Überleben der homo- und heterozygoten *Selp^{tm1Bay}*-KO-Mutanten nach Inokulation humaner $CD4^+$ T-Zellen gab ($p = 0,684$).

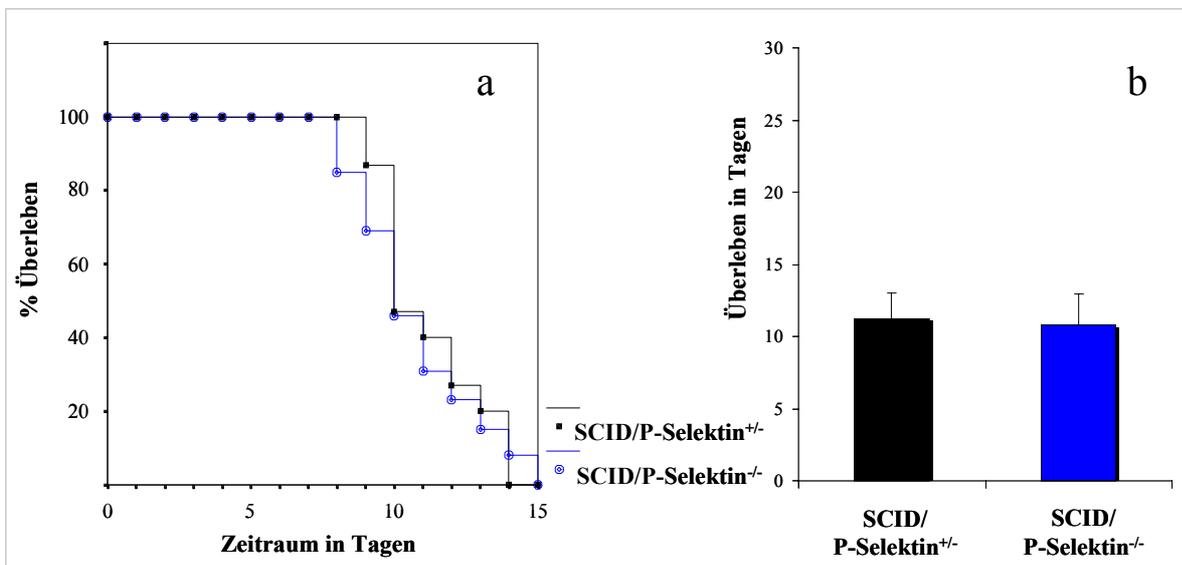


Abbildung 3.48: Die homozygoten *SCID/P-Selektin*-KO-Mutanten zeigten im Vergleich zu den heterozygoten Geschwistertieren nach Inokulation humaner $CD4^+$ T-Zellen keine Unterschiede beim Krankheitsverlauf der xGvH. a/b) Die Inokulation von 5×10^7 $CD4^+$ T-Zellen induzierte in allen Experimenten ($n=7$) in homo- und heterozygoten *SCID/P-Selektin*-Versuchstieren eine letale xGvHD. Die homozygoten *SCID/P-Selektin*-Mutanten ($n=13$) zeigten dabei im Vergleich mit den heterozygoten Geschwistertieren ($n=15$) keine Unterschiede im Überleben. Die P-Selektin-Verlustmutation nahm keinen Einfluß auf die Ausbildung einer xGvH-Erkrankung.

Die mittlere Überlebenszeit der heterozygoten *SCID/P-Selektin*-Versuchstiere von $11,2 \pm 1,8$ Tagen zeigte dabei keine Unterschiede im Vergleich zu den homozygoten Geschwistertieren mit einer mittleren Überlebenszeit von $10,8 \pm 2,2$ Tagen (Abbildung 3.48). Aufgrund der Befunde wurde deutlich, daß es keinerlei Unterschiede in der Ausprägung und im zeitlichen Verlauf der Erkrankung zwischen homo- und heterozygoten *SCID/P-Selektin*-Versuchstieren gab und daß der Verlust der murinen P-Selektin-Expression anscheinend

keinen wesentlichen Einfluß auf die durch die humanen Effektorzellen vermittelte Reaktion gegen xenogenes Gewebe nahm.

3.7.7 Resümee der Auswirkungen muriner KO-Mutationen auf die Ausbildung der xGvHD

Der Vergleich der Überlebensdaten von heterozygoten und homozygoten *SCID/P-Selektin*- und *SCID/Fas^{lpr}*-Mutanten zeigte, daß das Fehlen der murinen CD62P- und CD95-Expression keinen signifikanten Effekt auf die Induktion der xGvHD nahm (Tabelle 3.15).

Tabelle 3.15: Vergleich der *in vivo* Überlebensdaten und der *in vitro* Ergebnisse der ⁵¹Cr-Freisetzungstests der homozygoten KO-Mutanten mit Wildtyp und heterozygoten Geschwistertieren

KO- Mutante ^(-/-)	Ergebnisse der <i>in vitro</i> ⁵¹ Cr-Freisetzungstests	<i>in vivo</i> Überlebensvorteil der homozygoten KO-Mutante im Vergleich mit Wildtyp und heterozygoten Geschwistertieren
<i>SCID/ICAM1</i>	Schutz	Ja (n= 68)
<i>SCID/P-Selektin</i>	n.t.	Nein (n=13)
<i>SCID/Fas^{lpr}</i>	Schutz vor 2B12-Zellen (CD95L ⁺)	Ja ¹ (n=3)
	Keine Schutzwirkung vor Lyse durch CD2 ⁺	Nein (n=11)

¹ Verlust der murinen CD95-Expression schützte im Vergleich zum Wildtyp und den heterozygoten Geschwistern vor Erkrankung durch humane CD95L⁺ 2B12-Nierentumorzellen.

Demgegenüber führte der Verlust der murinen ICAM1-Expression im Vergleich zu den heterozygoten *SCID/ICAM1*-Geschwistertieren zu einem verlängerten Überleben von durchschnittlich 4 Tagen. Diese Wirkung wurde auch durch *in vitro* ⁵¹Cr-Freisetzungstests belegt.

Mit der C57BL/6J-*scid-Icam1^{tm1Bay}-Selp^{tm1Bay}*-KO-Mutante und der B6,MRL-*scid-Icam1^{tm1Bay}-Fas^{lpr}*-Mutante wurden bisher nur wenige Einzelversuche vorgenommen, so daß keine statistische Beurteilung des Einflusses eines kombinierten Verlustes der murinen ICAM1- und P-Selektin-Expression auf den Verlauf bzw. die Ausprägung der xGvHD möglich war. Weitere abschließende Versuche müssen erst noch erfolgen.

4 Diskussion

Die Transplantation von Geweben und Organen aus dem Spendertier Schwein³ auf den Menschen könnte den Mangel an Spenderorganen ausgleichen. Da eine solche Transplantation über Speziesgrenzen hinweg erfolgt, wird sie als Xenotransplantation bezeichnet. Ebenso wie bei der allogenen Transplantation stehen einer erfolgreichen Transplantation xenogener Organe zahlreiche immunologische Barrieren im Weg. Bei der Xenotransplantation kommt es jedoch zusätzlich zu einer Antikörper-vermittelten, hyperakuten Abstoßung.

Ziel dieser Arbeit war es, im SCIDHu-Tiermodell diejenigen humanen Immunzellen, die für die zellulären Abstoßungsvorgänge der xenogenen Graft-versus-Host-Erkrankung (xGvHD) verantwortlich sind, zu identifizieren und zu charakterisieren. Dieses Tiermodell wird als diskordant bezeichnet, da es zwischen Spender- und Empfängerspezies keine nahe verwandtschaftliche Beziehung gibt, wie z.B. zwischen Ratte und Maus (konkordante Transplantation). Die humanen Lymphozyten wurden in einzelne Subpopulationen separiert und auf ihre Fähigkeit untersucht, eine letale xGvHD in den *scid*-Versuchstieren auszulösen. Dieses Kreuzspeziessystem als Modell einer diskordanten xenogenen Transplantationssituation funktionierte und identifizierte die humanen CD4⁺ T-Zellen als Auslöser der xGvHD. Sie mussten, um aktiviert zu werden, mit murinen oder humanen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wechselwirken und damit mit anderen Oberflächenstrukturen, wie MHC- und Adhäsionsmolekülen, interagieren.

Mit dem Ziel, detaillierte Hinweise auf wichtige xenogene Oberflächenmoleküle bzw. Molekülsysteme zu erhalten, wurden murine KO-Mutanten eingesetzt. Über den Verlust von Molekülinteraktionen zwischen humanen und murinen Zellen sollte deren Rolle bei der Xenotransplantatabstoßung untersucht werden. Insbesondere für die Moleküle ICAM-1, P-Selektin und Fas wurden KO-Mutanten genutzt. Die Untersuchungen sollten in erster Linie in einem *in vivo* Tiermodell erfolgen. Die Analyse der immunologischen Abstoßungsvorgänge humaner Lymphozyten gegen murines Gewebe ermöglichte eine Identifizierung xenoreaktiver humaner Zellen und deren Wirkung auf Gewebe von Verlustmutanten im Vergleich zum Wildtyp.

³ Problematik der Spendertiere im Abschnitt 1.1 beschrieben

Das genutzte Tiermodell der immuninkompetenten C.B-17-*scid*-Maus ermöglichte dabei Untersuchungen zellulärer Abstoßungsreaktionen ohne Einflußnahme des spezifischen Immunsystems des Empfängertiers. In der folgenden Diskussion der Befunde wird zunächst darauf eingegangen, in welchem Umfang die murine Immunabwehr auf die injizierten humanen Zellen wirkte (Abschnitt 4.1), und ob Interaktionen zwischen humanen T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen erfolgen konnten (Abschnitt 4.2). Danach wird ein Block von Befunden besprochen, in denen die xenoreaktiven humanen Zellen identifiziert und charakterisiert werden (Abschnitt 4.3 bis 4.6). Abschließend werden die Auswirkungen von murinen Verlustmutationen verschiedener Effektormoleküle auf die Ausprägung der xGvHD diskutiert.

4.1 Modell eines dreiphasigen Verlaufs der Induktion der xGvHD durch humane xenoreaktive CD4⁺ T-Zellen

Die Arbeitshypothese zur Erklärung der zellulär vermittelten Abstoßungsreaktion im SCIDHu-Tiermodell geht von einem dreiphasigen Verlauf der *in vivo* Aktivierung xenoreaktiver humaner CD4⁺ T-Zellen aus. Nach der Konditionierung (Depletion der murinen NK-Zellen) der Versuchstiere konnten die verbliebenen Zellen der murinen Immunabwehr, wie Makrophagen und Granulozyten, in der ersten Phase (I.) nach der Injektion der humanen T-Zellen an den Applikationsort migrieren und dort eine eher stochastische Zerstörung humaner Zellen im Rahmen einer akuten Entzündungsreaktion bewirken (Abschnitt 4.2). Murine Makrophagen und dendritische Zellen nehmen am Applikationsort Antigene auf und migrieren in die Lymphknoten des Versuchstiers. In der sekundären Phase (II.) kommt es zur Antigenpräsentation durch die aktivierten APC, die zusätzlich durch eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM1, im Lymphknoten gekennzeichnet sind (Abschnitt 4.3). Durch die gerichtete Einwanderung naiver humaner T-Zellen in die murinen lymphatischen Gewebe kommt es zum Kontakt mit den APC des Spenders oder des Empfängers. Nach der Antigenpräsentation werden die humanen T-Zellen durch weitere kostimulatorische Signale aktiviert. In dieser letzten Phase (III.) sind die Antigen-aktivierten humanen T-Zellen einerseits durch ein starkes Proliferationspotential gekennzeichnet und müssen andererseits zur Migration ins murine Gewebe fähig sein. Nach diesen Vorgängen lösen die xenoreaktiven humanen T-Zellen eine letale xGvHD in den *scid*-Versuchstieren aus (siehe Abbildung 4.1). Die *in vivo* Aktivierung xenoreaktiver humaner T-Zellen wurde durch den Nachweis steigender humaner Zellzahlen in allen untersuchten Kompartimenten, durch

den Wechsel der Expression der CD45-Isoform von RA⁺ zu R0⁺, einer erhöhten IL-2-R-Expression und über den Einbau von BrdU in die DNA proliferierender Zellen belegt. Zusätzlich wurden die Expansionen einzelner humaner T-Zellklone in der murinen Umgebung über T-Zellrezeptor Vβ-Repertoire Analysen beobachtet (siehe Abschnitt 4.4).

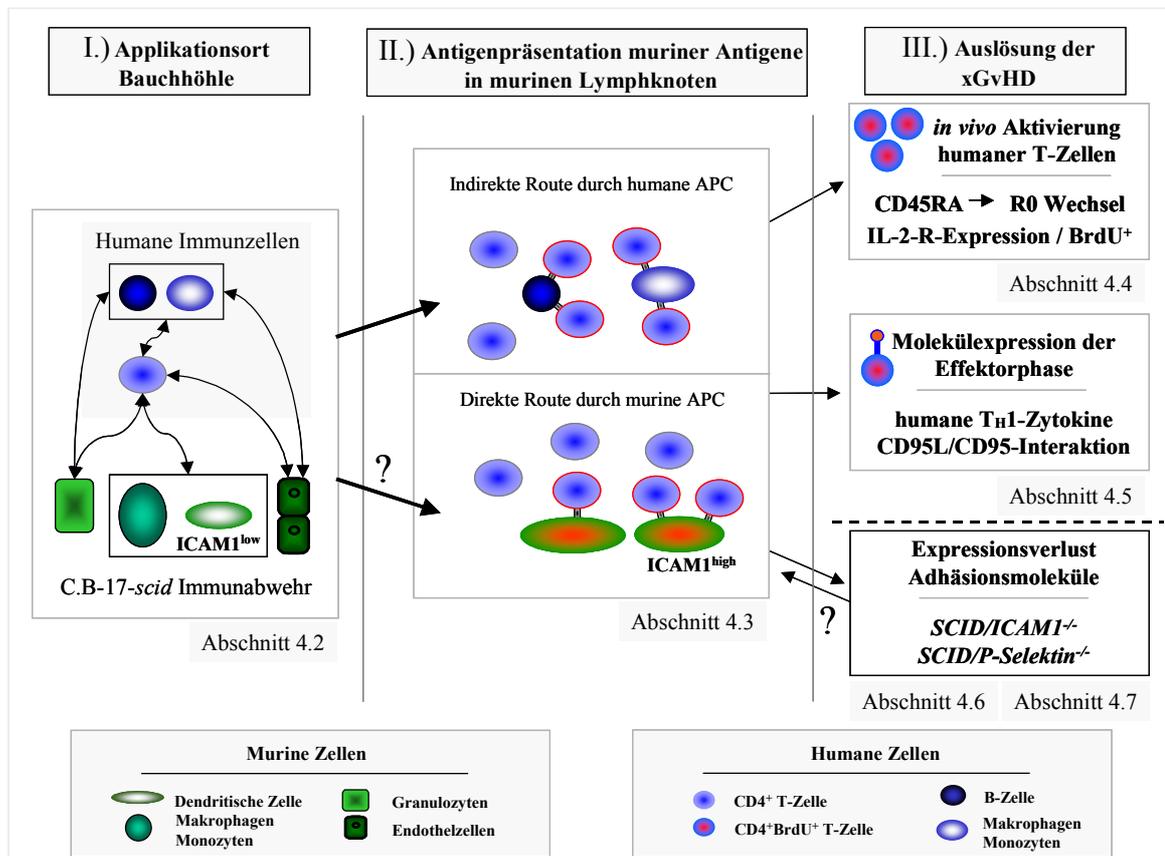


Abbildung 4.1: Modell der Aktivierung humaner CD4⁺CD45RA⁺ T-Zellen nach Inokulation in scid-Versuchstieren. Die murinen Zellen der Immunabwehr (Makrophagen und Granulozyten) treffen am Applikationsort auf die injizierten humanen T-Zellen und führen dort zu einer ungerichteten Zerstörung dieser Zellen (Phase I). Die murinen dendritischen Zellen nehmen Antigene auf, werden in der Bauchhöhle durch humane T-Zellen aktiviert, migrieren in die murinen Lymphknoten und sind dort durch eine erhöhte ICAM1-Expression gekennzeichnet (Phase II). Naive humane T- und B-Zellen wandern im Verlauf der xGvHD gerichtet in die lymphatischen Gewebe ein. Sowohl murine als auch humane APC präsentieren den humanen T-Zellen murine Antigene. Nach Erkennung dieser Antigene kommt es zur Aktivierung der humanen T-Zellen. Danach migrieren diese in verschiedene murine Gewebe und sind dort durch die Expression spezifischer Effektormoleküle gekennzeichnet (Phase III). Durch Einsatz von murinen ICAM1- und P-Selektin-Verlustmutanten kann der Effekt des Verlustes dieser murinen Moleküle in der Induktionsphase der xGvHD untersucht werden. (↔ Pfeile kennzeichnen mögliche Interaktionen zwischen Zellen des Empfängers und des Spenders.)

Die Charakterisierung der wiedergewonnenen humanen T-Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen des Inokulums ergab die Möglichkeit, die veränderte Expression von

humanen Effektormolekülen wie CD95L sowie von Zytokinen zu untersuchen (siehe Abschnitt 4.5). Um den Einfluß muriner Adhäsionsmoleküle auf die Migration humaner T-Zellen in der Induktionsphase der xGvHD zu untersuchen, wurden homozygote ICAM1- und P-Selektin-KO-Mutanten genutzt (siehe Abschnitt 4.6 und 4.7).

4.2 Wirkung von murinen Abwehrmechanismen gegen humane Donorzellen

Die C.B-17-*scid*-Versuchstiere sind durch das Fehlen ausdifferenzierter T- und B-Zellen aufgrund eines defekten V(D)J Rekombinase-Systems gekennzeichnet. Es kommt deshalb nicht zur Generierung antigen-spezifischer Rezeptoren der T- und B-Zellen, so daß keine adaptive zellulär-vermittelte Immunantwort erfolgen kann. Da keine murine Antikörper vorhanden sind, kann es auch nicht zu einer Komplementaktivierung über den klassischen Weg kommen. Das Komplementsystem kann jedoch auch über den alternativen Weg auf Xenotransplantate wirken [86]. Hierbei wird in einigen Spezieskombinationen die zelluläre Immunantwort durch die Komplementreaktion verstärkt. So zeigte van den Bogaerde et al. in einem konkordanten Tiermodell, daß es durch die Depletion des Komplements zu einem verlängerten Überleben des Xenotransplantats kam. Dagegen nahm die Depletion von T-Zellen keinen Einfluß auf die Xenotransplantatabstoßung [87]. Hierdurch wurde gezeigt, daß im Wesentlichen eine Antikörper-vermittelte Abstoßung erfolgte. Inwieweit die murine Komplementaktivierung über den alternativen Weg auch im SCIDHu-Tiermodell von Bedeutung ist, wurde nicht weitergehend untersucht.

Die C.B-17-*scid*-Versuchstiere besitzen eine natürliche angeborene Abwehr, an denen natürliche Killerzellen (NK), Makrophagen, Granulozyten und Faktoren der Komplementkaskade beteiligt sein können. Durch die Vorbehandlung mit dem antiASGM1-Antikörper wurden die murinen NK-Zellen *in vivo* depletiert. Andere Zellen der angeborenen Immunität, wie Monozyten, Makrophagen und Granulozyten, blieben jedoch erhalten, wie durch immunhistologische und durchflußzytometrische Untersuchungen nachgewiesen wurde (Abbildungen 3.13 und 3.1). Somit stellte sich die Frage, ob diese Zellen einen Einfluß auf das Überleben der inokulierten humanen T-Zellen nahmen und möglicherweise sogar ursächlich für den hohen Zellverlust humaner Zellen nach Inokulation in die *scid*-Versuchstiere verantwortlich waren.

Das durchflußzytometrisch nachgewiesene, vermehrte Auftreten muriner neutrophiler Granulozyten und Makrophagen am Ort der Injektion der humanen T-Zellen in der Peritonealhöhle ist Ausdruck einer akuten Entzündungsreaktion (Abbildung 3.1). Diese Zunahme muriner Zellen der myeloischen Reihe innerhalb von 24h am Applikationsort der humanen Zellen, mit einem fortschreitenden Absinken der Zellzahlen der murinen Granulozyten im weiteren Verlauf (3 Tage) der Entzündungsreaktion, wurde auch von Dr. Pohler beobachtet [18]. Als auslösende Ursachen kommen der peritoneale Reiz nach Inokulation humaner Zellen und die Injektion von vorgeschädigten und toten humanen Zellen in Betracht. Darüberhinaus können Veränderungen des Milieus, wie pH-Wert-Änderungen in der murinen Umgebung, zu einer Schädigung der injizierten humanen Zellen führen. Eine weitere wichtige Erklärung könnte die aufgrund der Aktivierung der murinen Endothelien erfolgte Sekretion von Zytokinen, durch die akute Entzündungsreaktion bzw. ursächlich durch die injizierten humanen Zellen, sein. In Betracht kommen entzündliche Zytokine, wie IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 und TNF- α , die speziesübergreifend wirken [88]. Die von den injizierten humanen T-Zellen sezernierten Zytokine könnten dabei als chemotaktische Faktoren und Zellaktivatoren auf die murinen Zellen wirken. Die humanen Zytokine, wie IL-1 und TNF- α , könnten vorwiegend eine Rolle bei der Aktivierung muriner Endothelzellen sowie als chemotaktische Faktoren mit Wirkung auf die murinen Phagozyten spielen (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Übersicht möglicher Interaktionen der an einer Entzündungsreaktion beteiligten humanen Zytokine im ScidHu-Tiermodell

Humane Zytokine	Wirkung auf murine Zellen				Wirkung auf humane CD4 ⁺ T-Zellen	Stimulation von
	Makrophagen	Monozyten	Neutrophile	Endothelien		
IL-1 ^{1/3}			Aktivierung	Aktivierung ²	Aktivierung	IL-2 \uparrow , IL-6 \uparrow IL-2-R \uparrow , IFN- γ \uparrow
IL-6 ^{1/3}			Chemotaxis	Aktivierung ²		AK-Bildung \uparrow
IL-8 ³					Chemotaxis Proliferation	Aktivierung NK-Zellen
TNF- α ³	Phagozytose-aktivität \uparrow		Chemotaxis	Aktivierung ² Permeabilität \uparrow	Proliferation	IL-1 \uparrow , IL-6 \uparrow , IFN- γ \uparrow

¹ Stimulation der Produktion von Akute-Phase-Proteine (APP) ² Erhöhte Expression von E-Selektin, VCAM1 und ICAM1 ³ Keine spezifische Spezies einschränkung

Tatsächlich wurde eine erhöhte Expression von TNF- α und IL-1 α der wiedergewonnenen humanen Zellen im Vergleich zu den Inokula beobachtet (Abbildungen 3.30 und 3.31). Die akute Entzündungsreaktion kann zu einer Aktivierung muriner Endothelzellen und Phagozyten führen, welche nun ihrerseits die Expression von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen hochregulieren. Sezernierte Zytokine, wie IL-1 oder IL-8, könnten dabei neben ihrem chemotaktischen Potential auch eine aktivierende Funktion auf Lymphozyten ausüben (Tabelle 4.1). Es stellte sich daher die Frage, in welchem Umfang murine Zytokine auch auf humane Zellen zu wirken vermögen. Die murinen Zytokine IL-1, IL-12, IL-7, IL-13 und TNF- α besitzen eine derartige spezieübergreifende Wirkung [88]. Dagegen wirken die murinen Zytokine IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, IL-18 und IFN- γ nicht über Speziesgrenzen hinweg auf menschliche Zellen [88]. Diese spezieübergreifende Wirkung muriner und humaner Zytokine nimmt daher sehr wahrscheinlich Einfluß auf die Ausbildung der xenogenen Graft-versus-Host-Erkrankung. Durch Arbeiten von Santini et al. wurde gezeigt, daß es innerhalb von 24 h nach Injektion humaner Zellen zu einer massiven Rekrutierung muriner Neutrophiler, die durch eine spezifische Expression muriner Zytokine, wie IL-1, IL-12 und TNF- α gekennzeichnet waren, in der Bauchhöhle kam [89].

Die beobachtete Anreicherung muriner Granulozyten und Makrophagen am Applikationsort (Peritonealhöhle) könnte die Verminderung der Zellzahlen der injizierten humanen T-Zellen erklären (Abbildung 3.12). Die akkumulierten Granulozyten können wahrscheinlich über Enzymfreisetzung die injizierten humanen Zellen zerstören und phagozytieren. Dabei könnten die murinen Phagozyten zu einer eher ungerichteten Zerstörung der humanen T-Zellen führen. Entsprechende Ergebnisse wurden von Santini et al. nachgewiesen, die ebenfalls eine frühe massive Anreicherung muriner Granulozyten als Hauptreaktion der murinen Abwehr gegen die humanen Zellen beobachteten [90]. Durch eine Antikörper-vermittelte *in vivo* Depletion der murinen Granulozyten wurde die durch sie vermittelte natürliche Immunabwehr soweit unterdrückt, daß es zu einem verstärkten Überleben der injizierten humanen Zellen kam. Untersuchungen von Lozupone et al. belegten, daß es nach einer Vorbehandlung der *scid*-Versuchstiere mit einem anti-Maus Granulozyten-Antikörper zu einem verstärkten Wachstum der inokulierten humanen Tumorzelllinien durch die Suppression der Empfänger Granulozyten-Reaktion kam [91].

Die murinen Abwehrmechanismen stellten bei Einsatz hoher Zellzahlen keinen limitierenden Faktor für die inokulierten humanen T-Zellen dar, da viele innerhalb kurzer Zeit über Migrationsprozesse in verschiedene Organe der Versuchstiere einwanderten (Tabelle

3.7). Das Ausmaß der Verminderung der humanen T-Zellen im Verlauf der ersten 5 bis 7 Tage nach Inokulation nahm dabei keinen Einfluß auf die Ausbildung der letalen xGvHD, da die überlebenden xenoreaktiven humanen T-Zellen in sekundäre lymphatische, murine Gewebe einwanderten und dort nach Antigenpräsentation aktiviert wurden und proliferierten (Abbildung 3.12b). Der überwiegende Anteil der humanen Gedächtnis- und Effektorzellen, die kein Antigen in der Maus erkannten, induzierten keine xGvHD. Durch die fehlende Stimulation oder durch die murine Abwehr starben diese Zellen mehrheitlich ab. Die Injektion von im Spender aktiviert vorliegenden CD45R0⁺ humanen T-Zellen zeigte jedoch, daß diese zwar keine letale xGvHD auslösten, sie jedoch durchaus im murinen Milieu über längere Zeiträume persistieren können. Diese langzeitüberlebenden T-Zellen verdeutlichten außerdem, daß die in die murine Zirkulation und in das Mausegewebe gewanderten humanen T-Zellen nicht eindeutig in unstimulierte, absterbende und xenoreaktive T-Zellen aufgeteilt werden konnten.

Die natürliche, unspezifische murine Immunabwehr könnte nicht nur eine destruktive, sondern auch eine instruktive Wirkung am Beginn der adaptiven Immunantwort durch xenoreaktive humane T-Zellen besitzen. Die Arbeitsgruppe Fearon et al. zeigte, daß die unspezifische Abwehr durchaus eine modulierende, induzierende Funktion bei der Aktivierung der Antigen Erkennungs-Rezeptoren und bei der Expression von kostimulatorischen Schlüssel-Molekülen und Zytokinen besaß. Die unspezifische Abwehr wirkte sich dabei auf die Ausrichtung der spezifischen Immunantwort aus [92]. Insofern könnten sowohl humane als auch murine Zytokine zu einer spezifischen Aktivierung der humanen T-Zellen führen. Dabei könnte die Anwesenheit von entzündlichen Zytokinen, wie IL-1 und TNF- α , als ein Signal fungieren, das vor der Gefahr einer Infektion warnt (Abbildung 3.31). Die Arbeitsgruppe Curtsinger et al. zeigte, daß das entzündliche Zytokin IL-1 als drittes Signal bei der Aktivierung von naiven T-Zellen durch Antigene und IL-2 fungiert [93]. Humanes TNF- α könnte dabei in hohen Konzentrationen zu unspezifischen, inflammatorischen Läsionen führen. Geringere TNF- α Konzentrationen könnten einen Einfluß auf die Immunzell-vermittelte Abstoßungsreaktion von xenogenen Geweben nehmen, wie von Kirkiles-Smith et al. gezeigt [94].

Einen weiteren Beleg von Interaktionen zwischen murinen und humanen Zellen stellt der Befund einer qualitativen Änderung der Zusammensetzung der murinen Zellen im Blut und in den Organen dar (Daten nicht gezeigt). Der vermehrte Zellverbrauch von murinen Zellen der myeloischen Reihe im Verlauf der xGvHD führte dabei zu einer kompensatorischen

Steigerung der Zellbildung im Knochenmark. Erklärungen für diese Kompensation könnten einerseits als Effekt der subletalen Bestrahlung betrachtet werden und andererseits auch in der Sekretion humaner Zytokine der CD4⁺ T-Zellen liegen, die indirekt zu einer Erhöhung des Anteils muriner myeloischer Zellen in Milz und Knochenmark führen könnte.

Aufgrund der beschriebenen Wechselwirkungen zwischen humanen und murinen Zellen sollte untersucht werden, ob es zu direkten Interaktionen muriner Antigen-präsentierender Zellen (APC) und injizierter humaner T-Lymphozyten kommt. Die murinen APC könnten dabei sowohl murine Antigene als auch menschliche Peptide präsentieren. Die Antigen-präsentation in der *scid*-Maus kann über murine dendritische Zellen (DC), Monozyten und Makrophagen erfolgen. Durch den immunhistologischen Nachweis einer erhöhten ICAM1-Expression auf den Oberflächen muriner dendritischer Zellen in den sekundären lymphatischen Geweben der Versuchstiere im Verlauf der xGvHD wurde ersichtlich, daß eine Reifung muriner APC (DC) nach Inokulation humaner Donorzellen erfolgte (Abbildung 3.7). Die hier beschriebenen Ergebnisse unterstützen somit das Konzept einer direkten Antigenpräsentation zwischen den APC des murinen Empfängers und der humanen Donorzellen. Diese direkte Interaktion zwischen T-Zellen und APC führt nicht zur Aktivierung der naiven T-Zellen, sondern stellt zusätzlich das entscheidende Signal für eine normale Reifung (Aktivierung) muriner dendritischer Zellen dar [95].

4.3 Reaktionen der humanen Immunzellen gegen xenogenes murines Gewebe

Die in dieser Arbeit durchgeführten Depletionsstudien humaner T-Zellen zeigten, daß die humanen CD4⁺ T-Zellen für die Induktion der letalen xGvHD im xenogenen SCIDHu-Tiermodell verantwortlich waren. Die Präsentation der murinen Antigene mußte über MHC II-Moleküle durch APC des Empfängers oder des Spenders mit dem T-Zellrezeptor der humanen CD4⁺ T-Zellen erfolgen. Eine direkte Interaktion wurde ebenso von Herrlinger et al. und Yamada et al. in einem Human-anti-Schwein-Modell gefunden. Diese Arbeitsgruppen zeigten, daß die Blockierung von MHC II und CD4 mittels Antikörper, also der Verlust der direkten Präsentationsroute, eine inhibierende Wirkung auf die Effektorzellen besaß [5, 96]. Ferner wiesen Satake et al. auf eine direkte Route bei der Aktivierung humaner T-Zellen durch porcine Stimulatorzellen und schlossen aus diesen Untersuchungen, daß es keine Unterschiede zwischen humanen T-Zell-vermittelten allo- und xeno-spezifischen Immunantworten gibt [97, 98]. Untersuchungen von Friedman et al. belegten ebenfalls, daß

die humanen CD4⁺ T-Zellen die Abstoßung von xenogenem porzinen Gewebe vermitteln [99]/[100].

Durch den Befund, daß die Depletion humaner B-Zellen und Makrophagen keinen entscheidenden Einfluß auf die Ausbildung der xGvHD nahm, wurde auf die Möglichkeit der direkten Präsentation muriner Antigene durch APC des Empfängers im SCIDHu-Tiermodell verwiesen (Tabelle 3.1). Die Grundlage der Antigenpräsentation zwischen naiven humanen T-Zellen und murinen APC wäre folglich eine direkte Bindung der an dieser Reaktion beteiligten Moleküle. Durch *in vitro* Befunde wurde deutlich, daß es zur Ausbildung eines trimolekularen TCR/Antigen/MHC-Komplexes zwischen humanen und murinen Zellen kommen kann [35]. Weiterhin wurde gezeigt, daß Bindungen zwischen dem murinen H-2A-Molekül und dem humanen CD4-Korezeptor, im Gegensatz zu den H-2E Molekülen, möglich sind. Eine weitere Voraussetzung der direkten Antigenpräsentation stellt die Vermittlung kostimulatorischer Signale muriner APC dar. Daß diese tatsächlich zwischen murinen CD80-Molekülen (B7.1) und humanen CD28-Rezeptoren erfolgen, wurde von Razi-Wolf et al. belegt [101]. Von besonderem Interesse war dabei, daß die CD80/CD28 Bindung mit der Ausprägung einer eher T_H1-spezifischen Immunantwort assoziiert ist [102]. Demgegenüber gehen Dorling und Lechler von eher ineffizienten speziesübergreifenden Interaktionen zwischen humanen CD4⁺ T-Zellen und murinen APC aufgrund fehlender Aktivierung der humanen T-Zellen durch die mangelnde Sekretion spezifischer Zytokine, wie IL-2, aus [103].

Der Nachweis einer Verringerung des lytischen Potentials humaner T-Zellen gegenüber murinen Fibroblasten der *SCID/ICAM1*-Ausfallmutante zeigte, daß eine kostimulatorische Interaktion zwischen LFA1 und ICAM1 speziesübergreifend erfolgen kann (Abbildungen 3.46 und 3.36). Die immunhistologischen Nachweise einer induzierten *de novo* ICAM1-Expression nach Inokulation humaner T-Zellen einerseits und reifer muriner ICAM1⁺ DC-Zellen in den sekundären lymphatischen Geweben andererseits, unterstützten den Befund von speziesübergreifenden Interaktionen (Abbildungen 3.40 und 3.7). Diese direkten Wechselwirkungen von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM1 und LFA1-Rezeptor, zwischen Spezies wurden ebenfalls in einem *in vitro* Mensch-Schwein-Modell belegt [5]. Aus Untersuchungen mit gemischten Lymphozyten Kulturen (MLC) wurde deutlich, daß humane T-Zellen direkt murine Antigene erkennen können, diese Reaktion jedoch von der Anwesenheit humaner Zytokine, wie IL-2, abhängig war [104]/[105]. Dagegen wurde von Benfield et al. durch *in vitro* MLC-Analysen gezeigt, daß die Aktivierung humaner T-Zellen durch murine APC eher an einer adäquaten Stimulation der murinen Zellen und damit an einer ungenügenden Expression von kostimulatorischen Signalen scheiterte [106]. Im

Vergleich zu diesen *in vitro*-Modellen könnte das *in vivo* SCIDHu-Tiermodell den Mangel an kostimulatorischen Signalen ausgleichen, da sowohl eine Aktivierung der murinen dendritischen Zellen als auch der xenoreaktiven humanen T-Zellen beobachtet wurde. In zahlreichen Untersuchungen wurden unterstützende Hinweise für die Interaktionen zwischen humanen T-Zellen und porcinen APC nachgewiesen, bei denen sowohl die direkte (durch xenogene APC) als auch die indirekte Erkennung von xenogenen Antigenen über humane APC vermittelt waren [5, 107-109]. Dabei wurde deutlich, daß Moleküliinteraktionen bei der Adhäsion, der Antigenpräsentation und der Aktivierung über Speziesgrenzen hinweg (Mensch-Schwein oder Mensch-Maus) weiterhin intakt vorliegen. Darüberhinaus wurde durch Befunde von Brocker et al. und Riberdy et al. gezeigt, daß CD4⁺ T-Zellen die periphere Expression von MHC II für ihre Entwicklung und Überleben benötigen. Somit könnten die MHC II⁺ dendritischen Zellen eine wichtige Wirkung auf die Langlebigkeit der Antigen-aktivierten CD4⁺ T-Zellen ausüben [110, 111].

Aufgrund dieser Befunde könnte die direkte Interaktion humaner T-Zellen und muriner APC eine weit wichtigere Funktion bei der Ausbildung der xGvHD einnehmen als bisher angenommen, da die murinen dendritischen Zellen durch die unspezifische Immunreaktion aktiviert werden konnten. Darüberhinaus könnten die humanen T-Zellen und die murinen APC in den lymphatischen Geweben ein besonderes Zytokinmilieu und eine räumliche Nähe mit den angereicherten naiven humanen T-Zellen aufbauen, die eine optimale Aktivierung xenoreaktiver humaner T_H1-artiger CD4⁺ T-Zellen erst ermöglichte. Eine besondere Bedeutung könnte dabei die Sekretion des murinen IL-12 der dendritischen Zellen einnehmen, da es speziesübergreifend auf die humanen Zellen wirkt. Belege für die Aktivierungsvorgänge humaner T-Zellen wurden durch immunhistologische und durchflußzytometrische Untersuchungen erbracht (Abbildungen 3.13 und 3.10). Durch die Antigenerkennung stimulierte humane CD4⁺ T-Zellen zeigten dabei eine verstärkte Proliferation in den sekundären lymphatischen Geweben. Im Anschluß daran migrierten die neu-aktivierten humanen Effektorzellen in die murinen Organe, wie Leber und Lunge, der Versuchstiere und proliferierten vor Ort (Abbildungen 3.8 und 3.13). Im Rahmen der xGvHD kam es also zu einer spezifischen Antigen-induzierten Stimulation menschlicher T-Zellen, die durch die Expression der CD45R0⁺ Isoform und CD25 gekennzeichnet waren (Abbildungen 3.7 und 3.8). Untersuchungen von Chitilian et al. zeigten in einem *in vivo* Maus-anti-Schwein-Tiermodell, daß in der Abwesenheit der indirekten Route weiterhin eine direkte Präsentation erfolgt, die zur Abstoßung führt. Dieser direkte Mechanismus konnte bei *in vitro*-Untersuchungen nicht beobachtet werden [112].

Die zellulär-vermittelte Immunreaktion der xGvHD wurde sehr wahrscheinlich durch humane B-Zellen und Makrophagen unterstützt, da diese APC indirekt murine Antigene präsentieren konnten. Die B-Zellen präsentierten dabei Peptidfragmente löslicher Antigene, die sie über Antigen-spezifische Immunglobulin-Rezeptoren und Multi-Lektin-Rezeptoren internalisierten (Endozytose) und über konstitutiv gebildete MHC II-Moleküle exprimierten. Die hohe Expression dieser Peptid/MHC II-Komplexe führte zur Bindung von Antigen-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen, die daraufhin durch kostimulatorische Signale der B-Zellen (CD80, CD86) partiell zur Differenzierung angeregt wurden. Im Vergleich zu dendritischen Zellen haben B-Zellen jedoch eine signifikant verringerte Kapazität bei der Stimulation von naiven T-Zellen [113-115]. Die Antigen-spezifischen B-Zellen besitzen deshalb sehr wahrscheinlich keine Funktion beim Priming der T-Zellantwort, sondern eher bei der Initiation der sekundären Immunantwort von schon im Spender aktiviert vorliegenden $CD4^+CD45R0^+$ T-Zellen [116, 117]. Gründe für diese nur partielle Aktivierung naiver T-Zellen liegen in der limitierenden Produktion von kostimulatorischen Signalen, wie IL-2, CD28 oder CD40Ligand, nach der Antigenpräsentation [118, 119]. Diese Signale sind jedoch für die T-Zellexpansion und das Überleben der in der Maus neu-aktivierten T-Zellen unbedingt erforderlich, wie auch durch Untersuchungen von Howland et al. gezeigt wurde [120].

Ausgehend von den Befunden, daß die humanen $CD2^+$ T-Zellen nach Depletion der humanen $CD2^-$ Zellen (B-Zellen, Makrophagen, Monozyten) weiterhin eine letale xGvHD auslösten, wurde deutlich, daß die Antigenpräsentation vorwiegend über die direkte Route erfolgen mußte (Abbildung 3.17 und Tabelle 3.1). Die Makrophagen können sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre phagozytierte Pathogene präsentieren, wobei diese Peptidfragmente auf beiden Klassen der MHC-Moleküle exprimiert vorliegen können. Aus xGvH-erkrankten Versuchstieren konnten jedoch keine humanen Makrophagen wiedergewonnen werden. Diese Befunde legten nahe, daß die humanen Makrophagen in der murinen Umgebung nicht überlebten und deshalb bei der Induktion der xGvHD eine eher unterstützende Rolle einnahmen.

Die immunhistologischen Befunde einer zeitlichen und organspezifischen Trennung der Proliferation humaner Zellen führte zu der Frage der Klonalität dieser Immunreaktion. Die Analyse humaner T-Zellen aus xGvH-erkrankten Versuchstieren zeigte, gemessen über CDR3-Spektratypen, sehr geringe Unterschiede in der Diversität des TCR V β -Repertoires (Abbildung 3.15). Hierbei konnte nicht ausgeschlossen werden, daß neben der ungerichteten

Zerstörung humaner Zellen durch die murine Abwehr weitere selektive Ereignisse auf die injizierten humanen Zellen wirkten.

Untersuchungen zur Quantifizierung des Umfangs anti-muriner T-Zellen innerhalb der humanen T-Zellpopulation belegten, daß sehr wahrscheinlich nur 1 bis 10% der T-Zellen Alloreaktivität und nur 1 bis 3% ein xenoreaktives Potential aufwiesen [35]. Bezogen auf das SCIDHu-Tiermodell würde dies bedeuten, daß innerhalb einer Zellpopulation von 5×10^7 $CD4^+$ T-Zellen nur $0,5$ bis $1,5 \times 10^6$ potentiell xenoreaktive $CD4^+$ T-Zellen vorlagen und diese an der Ausbildung der xGvHD in den Versuchstieren beteiligt waren. Da von einigen Arbeitsgruppen diskutiert worden war, ob die Expansionen der humanen Zellen vielleicht nur aufgrund eines Superantigeneffektes verursacht wurden, stellte sich daher die Frage, ob eine gemeinsame xenoreaktive Ausgangspopulation in den murinen Organen expandierte, oder ob nur wenige adäquat antigenerkennende T-Zellklone für die Ausbildung der Erkrankung verantwortlich waren [121]. Die Analysen des TCR V β -Repertoires der humanen Zellen zeigten durchgehend in allen Untersuchungen organspezifische Differenzen (Abbildung 3.15). Die CDR3-Bandenmuster schlossen eine unspezifische Aktivierung aller humanen T-Zellen durch murine Superantigene aus, da diese gleichermaßen auf alle T-Zellen gewirkt hätte und bei der Analyse der Spektratypen eine Gaußsche Verteilung im Bandenmuster zu beobachten gewesen wäre (Abbildung 3.14). Die überlappenden Spezifitäten des TCR reflektiert ein besonderes Vermögen der T-Zellen, wodurch mit einer geringen Zahl von humanen T-Zellen ein breites Spektrum von murinen Antigenen erkannt werden konnte. Hierdurch wird deutlich, daß sich die xenoreaktive humane T-Zellsubpopulation möglicherweise aus stark xenoreaktiven humanen T-Zellen und eher adäquat durch überlappende Spezifitäten reagierenden Zellen zusammensetzte. Ein Hinweis auf diese überlappenden Spezifitäten im SCIDHu-Tiermodell resultierte aus den Befunden der langzeitüberlebenden, nicht krankheitsauslösenden $CD4^+CD45R0^+$ T-Zellen (Abbildung 3.25). Hierbei könnten die überlappenden Spezifitäten gegen xenogene Antigene zu einer Expansion von schon im Spender aktivierten T-Zellklonen führen. Hinsichtlich der klonalen Zusammensetzung dieser expandierten CDR3-Spektratypen lassen sich jedoch keine exakten Rückschlüsse auf die Zellzahlen der humanen T-Zellen geben, die sich hinter dem Bandenmuster versteckten. Untersuchungen von Brouard et al. in einem Hamster/Ratten-Tiermodell zeigten jedoch, daß die Intensität und die Diversität der T-Zellantwort gegen Xenotransplantate im Vergleich zu Allotransplantaten *in vivo* sehr viel stärker ausgeprägt war [122].

Die Hinweise einer Interaktion zwischen murinen APC und humanen T-Zellen führten zu der Frage, ob die humanen Lymphozyten nach Aktivierung ein im Vergleich zum Inokulum

verändertes spezifisches Zytokinmuster aufzeigten. Die mittels RT-PCR nachgewiesene Expression der humanen Zytokine IFN- γ und TNF- α deutete dabei auf eine eher T_H1-orientierte Immunreaktion (Abbildung 3.31). Die Sekretion erhöhter Mengen von IL-1 und IL-12 durch reife DC, Makrophagen oder Granulozyten könnte hierbei zu einer Expansion der humanen T_H1-artigen CD4⁺ Effektorzellen geführt haben. Der Nachweis einer erhöhten Proliferation humaner CD4⁺ T-Zellen mit einem T_H1-typischen Zytokinmuster und der Nachweis einer erhöhten mRNA-Expression des CD95Ligand-Gens deutete auf einen möglichen Mechanismus bei der Ausbildung der xGvHD. Die Apoptose muriner Zellen könnte dabei durch xenoreaktive humane CD4⁺ T-Zellen über die CD95L/CD95-Bindung induziert werden (siehe Abschnitt 4.5.2).

4.4 Charakterisierung der xenoreaktiven humanen T-Zellen

Die Inokulation von humanen CD4⁺ T-Zellen führte in fast allen Versuchen innerhalb von 10 bis 30 Tagen zur Induktion einer letalen xGvHD in den C.B-17-*scid*- Versuchstieren (Tabelle 3.2 und 3.7).

Auf den zeitlichen Verlauf der xGvHD nahmen dabei verschiedene Faktoren einen direkten Einfluß. Hierbei ist die Korrelation der Zellzahl der inokulierten humanen T-Zellen mit dem zeitlichen Verlauf der xGvH-Erkrankung hervorzuheben. Auch das Alter der Donoren und Rezipienten, die Vorbehandlung der Versuchstiere und das Ausgangsgewicht hatten einen starken Einfluß auf den zeitlichen Verlauf und die Ausprägung der Erkrankung. Wie schon in Abschnitt 4.2 erwähnt, besaßen die Zellen der murinen Immunabwehr, wie Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen, einen erheblichen Einfluß auf die Ausprägung der zellulär-vermittelten Immunreaktion. Bedingt durch diese Faktoren kam es innerhalb von 7 Tagen nach intraperitonealer Injektion humaner T-Zellen zu einem massiven Verlust humaner Zellen (Abbildung 3.12). Die rapide Abnahme der humanen Zellen am Applikationsort (Peritonealhöhle) innerhalb weniger Tage wurde ebenfalls von Pohler beobachtet [18]. Zur Identifikation der xenoreaktiven humanen Zellsubpopulation, die für die Induktion der letalen xGvHD sorgten, wurden Depletionsstudien durchgeführt. In der Tabelle 3.7 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Durch diese Depletionsstudien wurde deutlich, daß das xenoreaktive Potential der humanen Zellen in der CD2⁺ T-Zellsubpopulation zu finden war. Durch die Inokulation von

CD2⁻ Zellen (Makrophagen, Monozyten und B-Zellen) wurde keine Erkrankung induziert (Tabelle 3.7). Allerdings zeigten durchflußzytometrische Analysen, daß die humanen B-Zellen weiterhin in der murinen Umgebung vorlagen, präferentiell in sekundären lymphatischen Geweben, und so zumindest eine unterstützende Funktion bei der Ausbildung der xGvHD einnehmen konnten. Durch Arbeiten von Carlsson et al. wurde gezeigt, daß die humanen B-Zellen in den *scid*-Versuchstieren mAb produzieren können [123]. Durch die Separation der humanen CD2⁺ T-Zellen in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurde deutlich, daß die Xenoreaktivität der CD4⁺ T-Zellen ausreichte, um in den Versuchstieren eine xGvHD zu induzieren (Abbildung 3.11). Im Gegensatz hierzu führte die Inokulation humaner CD8⁺ T-Zellen zu keiner Erkrankung. Dagegen zeigten Arbeiten von Gress et al., daß die CD8⁺ T-Zellen weiter in der Lage waren, z.B. Lungengewebe zerstören zu können [84]. Übereinstimmende Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigten ebenfalls, daß die CD8⁺ T-Zellen zwar in der murinen Umgebung überlebten, aber durch eine abgeschwächte Funktion gekennzeichnet waren [66]. Untersuchungen von Loudovaris et al. verdeutlichten, daß CD4⁺ T-Zellen in Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen und B-Zellen eine Zell-vermittelte Zerstörung von xenogenen Geweben induzierten [65].

Die Separation der CD4⁺ T-Zellsubpopulation in naive und schon im Spenderblut voraktivierte T-Zellen sollte untersuchen, ob der direkte Kontakt zwischen voraktivierten CD4⁺CD45R0⁺ und naiven CD4⁺CD45RA⁺ T-Zellen durch CD27/CD70-Interaktionen zu einer Aktivierung der naiven T-Zellen führte, und ob diese Interaktion eine Voraussetzung bei der Ausbildung der xGvHD bildete, wie von Agematsu et al. beobachtet [124]. Einen vergleichbaren kostimulatorischen Einfluß der naiven T-Zellantwort kann die Expression des CD86-Molekül von aktivierten CD4⁺CD45R0⁺ Effektorzellen einnehmen [125]. Falls diese Interaktionen wichtige Basisreaktionen bei der Aktivierung naiver T-Zellen darstellten, sollte die separierte naive T-Zellsubpopulation keine Erkrankung in den *scid*-Versuchstieren auslösen.

Die Inokulation von naiven CD4⁺CD45RA⁺ T-Zellen induzierte aber in allen Versuchen eine letale xGvHD. Die Auslösung der xGvHD zeigte dabei eine signifikante Korrelation ($r = 0,155$) mit der durch unseparierte humanen T-Zellen induzierten Erkrankung (Abbildung 3.22a). Dagegen lösten die humanen im Spender aktivierten CD4⁺CD45R0⁺ T-Zellen keine letale xGvHD aus. Im Gegensatz zu den naiven humanen T-Zellen besaßen also im Spender voraktivierte CD4⁺CD45R0⁺ T-Zellen eine geringere Xenoreaktivität, die nicht zur Induktion einer Erkrankung ausreichte. Diese Befunde zeigten, daß kein Superantigeneffekt die Grundlage der xGvHD bildete. Der Nachweis humaner CD4⁺CD45R0⁺ T-Zellen in allen

Organen auch nach einem Zeitraum von über 30 Tagen war ein Beleg für die Langlebigkeit von Memory T-Zellen (Abbildungen 3.25 und 3.26). Die Analyse des T-Zellrezeptor V β -Repertoires der aus nicht erkrankten scid-Versuchstieren wiedergewonnenen humanen CD4⁺CD45R0⁺ T-Zellen zeigte, daß es zu ausgeprägten Expansionen im CDR3-Bandenmuster kam. Eine Ursache hierfür könnte in der überlappenden Spezifität der aktivierten humanen T-Zellen liegen. Dabei würden gemeinsam erkannte exogene murine Antigene in der murinen Umgebung zu einer Stimulation der humanen T-Zellen führen. Darüberhinaus waren diese Daten ein Beleg dafür, daß die Interaktionen zwischen naiven und aktivierten T-Zellen zwar vorliegen konnten, diese auf den letalen Verlauf der xGvHD jedoch keinen Einfluß nahmen. Mit der Analyse des T-Zellrezeptor V β -Repertoires konnte weiterhin gezeigt werden, daß sich Expansionen von T-Zellklonen in der murinen Umgebung ereignet hatten. Dieses Ergebnis kann dahingehend gedeutet werden, daß entweder im Spender schon natürlich vorkommende xenoreaktive CD4⁺ T-Zellen vorlagen oder daß dieser Effekt auf gemeinsam erkannten Antigenen beruhte, die sowohl im humanen als auch im murinen Milieu vorlagen. Aufgrund der fehlenden Ausbildung einer letalen Erkrankung wurde jedoch belegt, daß diese T-Zellsubpopulation nicht die Basis für die xGvHD bildete und somit auch nur eine unterstützende Funktion, z.B. bei der Stimulation von APC und naiven T-Zellen, einnehmen konnte.

Demgegenüber zeigten die Untersuchungen der naiven humanen CD4⁺ T-Zellen einen direkten Zusammenhang zwischen der Ausbildung der Erkrankung und der Aktivierung der humanen T-Zellen im murinen Milieu. Es stellt sich somit die Frage, ob sich die naiven humanen T-Zellen durch ein besonderes Zytokinprofil oder durch die Expression von Adhäsionsmolekülen auszeichneten (Abschnitt 4.5). Eine weitere charakteristische Eigenschaft von voll aktivierten T-Zellen stellt der Nachweis einer blastoiden Morphologie dar. Diese kann durchflußzytometrisch über die, im Vergleich zu ruhenden T-Zellen, veränderten Vorwärts- und Seitwärts-Streulichteigenschaften der untersuchten Zellen nachgewiesen werden. Es zeigte sich, daß in allen Versuchen die Mehrzahl der injizierten humanen T-Zellen nach Ausbildung der xGvHD diese typischen Veränderungen der Morphologie im Vergleich zum Inokulum entwickelten. Durchflußzytometrische und immunhistologische Untersuchungen naiver humaner T-Zellen ergaben, daß es im Verlauf der xGvHD zu einem kennzeichnenden Wechsel der Expression der CD45-Isoform von RA⁺ zu R0⁺ kam. Der prozentuale Anteil dieser in der Maus neu-aktivierten CD45R0⁺ Zellen stieg dabei sehr schnell von 3% am Tag 3 auf über 60% am Tag 7 (Abbildungen 3.9 und 3.10). Dieser Phänotypshift gab somit einen weiteren Hinweis auf eine im murinen Milieu

ablaufende Aktivierung humaner T-Zellen. Durch den Nachweis einer erhöhten CD25-Expression, sowohl auf Ebene der Transkription als auch auf Ebene der Proteinexpression, wurden deutliche Kennzeichen einer ablaufenden Aktivierung humaner T-Zellen erbracht (Abbildungen 3.30, 3.31 und 3.8).

Ein weiteres Merkmal für die Aktivierung der humanen T-Zellen stellte der Nachweis starker Proliferationsvorgänge dar. Hierfür wurden die Versuchstiere vor der Rückgewinnung der humanen T-Zellen durch eine Injektion mit BrdU vor dem Töten vorbehandelt. Der Nachweis von proliferierenden Zellen erfolgte dabei nur in Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklusses befanden und dadurch BrdU in die DNA einbauten. Durch immunhistologische Doppelfärbungen mit anti-BrdU- und anti-human CD45LCA-Antikörpern wurde eine eindeutige Unterscheidung humaner proliferierender Zellen und muriner Zellen erreicht (Abbildung 3.13)⁴. Durchflußzytometrische Analysen erlaubten den Nachweis von Proliferationen humaner Zellen mittels der FITC-Markierung über einen Zeitraum von 10 Tagen nach Inokulation in die *scid*-Versuchstiere. Dabei wurde das Teilungspotential über den Verlust der FITC-Oberflächenmarkierung⁵ indirekt nachgewiesen. Der Einfluß der FITC-Moleküle als Ko-Stimulatoren war dabei zu vernachlässigen. Wie schon früher erwähnt, wurde ein Großteil der injizierten humanen Zellen in den ersten Tagen zerstört. Die durchflußzytometrische Analyse der überlebenden humanen Zellen zeigte am Applikationsort schon innerhalb von 24 h einen Verlust der Oberflächenmarkierung und damit ein hohes Teilungspotential (Abbildungen 3.10 und 3.11). Bei diesen Vorgängen kann es sich um spezifische Wechselwirkungen der humanen T-Zellen mit den verbliebenen murinen Makrophagen und Granulozyten handeln, da in dieser sehr frühen Phase eine verstärkte Einwanderung dieser murinen Zellen an den Applikationsort nachgewiesen wurde (Abbildung 3.1).

Da naive humane CD4⁺CD45RA⁺ T-Zellen die letale xGvHD auslösten, sollte abschließend untersucht werden, ob die in der murinen Umgebung neu-aktivierten CD4⁺CD45R0⁺ T-Zellen ein xenoreaktives Potential aufwiesen. Dabei konnte nicht ausgeschlossen werden, daß die Zellzahl der injizierten humanen Zellen erst ab einem bestimmten Schwellenwert die Erkrankung induzierten. Der entscheidende Einfluß der Zellzahl injizierter humaner Zellen auf die Ausbildung einer Erkrankung wurde insbesondere durch den seriellen Transfer von in Primärempfängern aktivierten CD4⁺CD45R0⁺ T-Zellen in

⁴ Protokoll von U. Bode [126]

Sekundärempfängertiere dokumentiert (Tabelle 3.7). Der serielle Transfer dieser in der Maus neu-aktivierten humanen T-Zellen sollte weiterhin klären, ob die durch das murine Milieu aktivierten humanen T-Zellen die Basis für eine zellulär vermittelte Abstoßung in Sekundärempfängern bildete. Zu diesem Zweck wurden aus xGvH-erkrankten Versuchstieren (Primärempfänger) die humanen T-Zellen wiedergewonnen und in Sekundärempfänger injiziert. In diesen Experimenten wurde eine deutliche Zellzahlabhängigkeit nachgewiesen. Die Inokulation von mehr als 2×10^7 CD4⁺ T-Zellen induzierte in allen Versuchen (n=15) eine letale xGvHD (Tabelle 3.7). Die Induktion der Erkrankung erfolgte dabei im Vergleich zu den Primärempfängern in einem signifikant kürzeren Zeitrahmen ($p = 0,009$). Dagegen löste die Injektion von weniger als 2×10^7 CD4⁺CD45R0⁺ T-Zellen keine Erkrankung aus (n=4). Ursache hierfür war sehr wahrscheinlich wiederum die unspezifische murine Immunabwehr. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde deutlich, daß die humanen T-Zellen in den Versuchstieren überleben und nach Aktivierung durch murine Antigene in der Lage waren, sowohl in Primär- als auch Sekundärempfängertieren eine letale xGvHD auszulösen. Damit wurde deutlich, daß die humanen T-Zellen nach Auslösung der xGvHD nicht in einem anergen Zustand verfielen.

4.5 Expression von humanen Effektormolekülen nach Induktion der xGvHD

4.5.1 Zytokinmuster xenoreaktiver humaner T-Zellen

Um die Frage zu untersuchen, inwieweit die humanen CD4⁺CD45RA⁺ T-Zellen durch ein spezifisches Zytokinprofil gekennzeichnet waren und eine Unterscheidung in T_H2-orientierte humorale Abwehr oder T_H1-orientierte zellulär-vermittelte Abwehr erlaubte, wurde untersucht, ob es im Verlauf der xGvH-Erkrankung zu einer gerichteten Differenzierung der humanen T_H0-Zellen in der murinen Umgebung kam.

Die CD4⁺ T_H1-Zellen sind durch die Expression von Interferon- γ , IL-2 und TNF- β gekennzeichnet. Die Ausschüttung von IFN- γ führt bei Entzündungsprozessen in erster Linie zu einer Aktivierung von Makrophagen und inhibiert die T_H2-vermittelte Immunabwehr. Dagegen exprimieren T_H2-Zellen vorwiegend IL-4 und IL-5, bewirken eine Aktivierung der

⁵ Protokoll nach Samlowski [78]

B-Zellen und führen damit zu einer Induktion der humoralen Immunantwort bei gleichzeitiger Inhibition der zellulär-vermittelten Immunabwehr. Die unterschiedlichen Zytokinfaktoren nehmen dabei starken Einfluß auf die Differenzierungs-Vorgänge der T_H0 -Zellen zu T_H1 - und T_H2 -dominierten Immunantworten [8, 9]. Die aktivierten T-Zellen exprimieren ein spezifisches Zytokinmuster, welches für die weitere Differenzierung in T_H1 und T_H2 und für die Proliferation von entscheidender Bedeutung ist. Eine ebenso wichtige Funktion und aktive Rolle als Schlüsselmodulatoren einer Immunreaktion nehmen die dendritischen Zellen ein. Die Entwicklung von T_H1 - und T_H2 -artigen $CD4^+$ T-Zellen wird dabei durch diskrete DC-Subpopulationen vermittelt [7]. Aufgrund bekannter T_H1 - und T_H2 -typischer Zytokinmuster sollte untersucht werden, ob die xenoreaktiven T-Zellen nach Ausbildung der xGvHD durch eine spezifische Zytokinexpression gekennzeichnet waren. Hierfür wurde die mRNA-Expression charakteristischer Zytokine humaner Zellen mit der semiquantitativen Reversen-Transkription Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) untersucht.

Die im Abschnitt 3.4.1 dargestellten Ergebnisse der Zytokinexpression injizierter humaner $CD4^+$ T-Zellen im Vergleich zu den Inokula sind in Tabelle 3.12 zusammengefaßt. Die Befunde belegten, daß die aus xGvH-erkrankten Versuchstieren wiedergewonnenen stimulierten humanen T-Zellen in erster Linie eine T_H1 -typische Molekülexpression aufwiesen (Abbildungen 3.29 bis 3.31). Im Vergleich zu den Inokula wurde eine erhöhte Expression von IFN- γ , Interleukin 2-Rezeptor, TNF- α , IL-1 α und IL-2 beobachtet, die selbst nach PHA-Stimulation nicht weiter verstärkt werden konnte. Diese humanen T-Zellen zeigten keine T_H2 -typische Expression von IL-4. Nach einer *in vitro* PHA-Stimulation (4 h) der wiedergewonnenen humanen T-Zellen wurden jedoch schwache Signale für IL-4 beobachtet (Abbildung 3.31). Weiterhin wurde eine verstärkte IL-10-Expression sowohl in unstimulierten als auch bei PHA-stimulierten humanen T-Zellen beobachtet (Abbildung 3.30). Hierbei ist darauf hinzuweisen, daß die T_R1 -Zellsubpopulation⁶ einen regulierenden Einfluß bei der T_H -Differenzierung ausübt und bisher nur eine T_H2 -unterstützende Funktion beschrieben wurde. Allerdings können die bekannten immunsuppressiven und anti-entzündlichen Effekte der IL-10- und TGF- β -Expression keinen Einfluß auf die über dendritische Zellen induzierte T_H1 -Proliferation nehmen [127]. Sehr interessant waren dabei Befunde von Iezzi et al.. Diese zeigten, daß in Anwesenheit von IL-12 eine kurze TCR-Stimulation zu einer effektiven T_H1 -Polarisierung führte [128, 129]. Dagegen erfolgte eine T_H2 -Differenzierung nur nach einer verlängerten TCR-Stimulation in Anwesenheit von IL-4 [128]. Damit wurde deutlich, daß die

⁶ R für Regulatorische Funktion

Dauer der TCR-Stimulation und darüberhinaus die Antigenendosis einen kritischen Einfluß auf die polarisierende Wirkung der Zytokine (IL-4 und IL-12) und damit auf die T-Zelleffektorfunktionen besaßen [130].

Anhand der vorliegenden Ergebnisse war es sehr wahrscheinlich, daß es sich bei der xenogenen Graft-versus-Host-Erkrankung im SCIDHu-Tiermodell um eine T_H1-vermittelte Abstoßungsreaktion handelte, bei der IFN- γ produzierende T_H1-Zellen zur Entwicklung einer zellulären Entzündungsreaktion führten. Bei dieser Reaktion nahmen sehr wahrscheinlich IL-12 produzierende dendritische Zellen einen direkten Einfluß auf die Entwicklung von IFN- γ ⁺ T_H1-Zellen und damit auf die zellulär-vermittelte Immunantwort [131]. Durch Arbeiten von Ria et al. wurde gezeigt, daß die T_H1-Zellen eine Antigen-abhängige IL-12-Sekretion der dendritischen Zellen induzieren, die IFN- γ -unabhängig über direkte Zellkontakte erfolgt [132]. Die Zellkontakte verlaufen dabei über Peptid/MHC II-TCR- und CD40/CD40Ligand-Interaktionen. Daß im SCIDHu-Tiermodell solche Interaktionen vorliegen können, wurde durch Experimente von Foy et al. belegt. Sie zeigten, daß durch die Blockade der CD40/CD40L-Interaktion eine Expansion von xenoreaktiven humanen T-Zellen inhibiert wurde [133]. Durch Arbeiten von Liu et al. in einem experimentellen Krankheitsmodell wurde ferner gezeigt, daß die Blockade der CD40/CD40L-Interaktion zu einer Herabregulierung der pro-inflammatorischen Zytokinsekretion führte und damit diese Wechselwirkung essentiell für die Ausbildung einer entzündlichen T_H1-Immunantwort war [134]. Befunde von Coppola et al. zeigten, daß nach der Inokulation humaner T-Zellen in *scid*-Mäusen die humanen T_H1-Lymphozyten präferentiell aktiviert werden, wogegen die T_H2-Funktion herunterreguliert wird [69].

Die T_H1-dominierten zellulären Immunantworten spielen in der Pathogenese von organspezifischen Autoimmunerkrankungen, der akuten Allotransplantatabstoßung und chronischen Entzündungsreaktionen eine Rolle [135]. T_H1-Zellen sind durch die Expression von typischen Molekülen, wie CD26, IFN- γ , IL-2-R, IL-2, TNF- β , LAG-3, CCR5 und CXCR3 gekennzeichnet. T_H2-vermittelte Immunreaktionen sind dagegen bei der Transplantationstoleranz und einigen systemischen Autoimmunerkrankungen von Bedeutung [9]. Dagegen exprimieren T_H2-Zellen vorwiegend CD62L, CD30, IL-4, IL-10, CCR3, CCR4, und CCR8 [37]. Die Expression einzelner Moleküle, wie CD30 oder LAG-3, während der Entwicklung von humanen naiven T-Zellen ist dabei unmittelbar abhängig von der Präsenz von IL-4 bzw. IFN- γ [136]. Aufgrund der nachgewiesenen spezifischen Zytokinmuster könnte die T_H1-typische Immunantwort durch Zugabe von T_H2-typischen Zytokinen, wie IL-4 oder

IL-5, zur Blockierung der T-Zellaktivierungsprogramme führen [137]. Hierbei würde der Mangel der IL-2- und IFN- γ -Expression einen beschränkenden Einfluß auf die Ausbildung der Immunantwort nehmen. Die Arbeitsgruppe Nickerson et al. unterstrich dabei, daß die Wirkung der Zytokine lokal begrenzt erfolgt, so daß gentechnisch veränderte Transplantate, die durch eine regulierende Zytokinexpression gekennzeichnet wären, systemische Effekte im Empfänger verhindern könnten.

Eine effiziente Migration von T-Zellen in entzündliches Gewebe erfolgt in erster Linie nur von T_H1-Zellen. Diese Einwanderungsreaktion konnte durch die Zugabe von anti-CD62P und anti-CD62E Antikörpern blockiert werden [59]. Damit wurde ersichtlich, daß Adhäsionsmechanismen bei der selektiven Auswahl von T_H-Untergruppen von Bedeutung sind. Bei der Regulierung von differentiellen Migrationen spielen also Adhäsionsfaktoren, Chemokine und das Funktionsprofil (Rezeptoren und Liganden) der Effektorenzellen eine zentrale Rolle (siehe Abschnitt 4.6).

4.5.2 Wirkung der humanen CD95Ligand-Expression

Der programmierte Zelltod (Apoptose), welcher unter anderem durch die CD95Ligand/CD95-Interaktion erfolgt, spielt bei der Lyse von infizierten Zellen im Immunsystem eine zentrale Rolle. Immunantworten werden dadurch begrenzt, daß nach Beseitigung eines Antigen-Stimulus ein Großteil der Antigen-reaktiven Lymphozyten, die durch eine klonale Expansion entstanden sind, durch Apoptose eliminiert werden. Es bleiben also nur die Zellen übrig, die in die Memory-Population übertreten und dem immunologischen Gedächtnis zuzuordnen sind. Die blastoiden „memory“ Effektorzellen zeigen neben morphologischen und phänotypischen Veränderungen auch eine abnehmende Teilungsaktivität. Die naiven und aktivierten humanen T-Zellen exprimieren CD95Ligand nicht konstitutiv, sondern erst nach Aktivierung durch Antigene [138].

Die Interaktion von humanem CD95Ligand mit dem murinen CD95Rezeptor spielte eine wichtige Rolle bei der Induktion der Apoptose von CD95⁺ murinen Zellen. Der immunhistologische Nachweis von apoptotischen Zellen der murinen Leber deutete auf eine CD95L/CD95-Wechselwirkung (Daten nicht gezeigt). Der Nachweis einer *de novo* ICAM1-Synthese muriner Hepatozyten nach Inokulation humaner T-Zellen wies auf eine Aktivierung muriner Zellen und damit indirekt auf eine induzierte Expression von CD95 (Abbildung 3.40). Eine weitere Voraussetzung für die Induktion der Apoptose stellte der Nachweis einer CD95Ligand Expression dar. Durch den semiquantitativen Nachweis der CD95L-Expression

humaner T-Zellen in allen untersuchten Organen, außer den Lymphknoten, xGvH-erkrankter Versuchstiere mittels RT-PCR wurde deutlich, daß dieser Mechanismus eine zentrale Funktion bei der Ausbildung der xGvHD spielen könnte (Abbildung 3.31 und Tabelle 3.12). Daneben müssen jedoch auch andere speziessübergreifend wirkende Mitglieder der TNF-Familie, wie TRAIL, Rantes oder TNF- α , für eine CD95-unabhängige Induktion des Zelltodes eine Rolle spielen [139]. Untersuchungen von Olack et al. an einem Schweine-Transplantatabstoßungsmodell in der *scid*-Maus belegten, daß wiedergewonnene xenoreaktive humane CD4⁺ T-Zellklone mit T_H0- oder T_H1-Zytokinprofilen in der Lage waren, Zytokine zu sezernieren, die zur Lyse von porzinen Zellen führten [140]. Eine Funktion des humanen IFN- γ bei der Induktion von Apoptose scheidet dabei aus, da es nicht speziessübergreifend wirkt [88].

4.5.3 Wirkung der murinen *Fas*^{lpr}-Mutation

Da die humanen xenoreaktiven T-Zellen durch eine CD95Ligand-Expression gekennzeichnet waren und darüberhinaus in den murinen Geweben apoptotische Zellen nachgewiesen wurden, stellte sich die Frage, ob die CD95L/CD95-Interaktion für die Ausbildung der xGvHD verantwortlich war. Durch Kreuzungen wurde die *Fas*^{lpr}-Mutation auf den genetischen Hintergrund von C.B-17-*scid* übertragen. Der Nachweis einer weiter vorliegenden Fas-Expression (10% der typischen Wildtyp Expression) in den MRL-*Fas*^{lpr}-Versuchstieren durch Mariani et al. warf die Frage auf, ob die eingesetzten Versuchstiere für diese Problemstellung genutzt werden konnten [141]. Sowohl *in vivo*- als auch *in vitro*-Testsysteme sollten daher prüfen, ob es tatsächlich zur Expression von CD95-Molekülen kam und diese weiterhin eine biologische Aktivität besaßen. Durch den Einsatz einer stabil exprimierenden huCD95L⁺ (2B12) und einer huCD95L⁻ Nierentumorzelllinie (pcDNA) konnte diese Fragestellung untersucht werden. Die Injektion von CD95L⁺ 2B12-Zellen führte sehr rasch zum Versterben der Versuchstiere (Tabelle 3.8). Durch immunhistologische Färbungen konnte gezeigt werden, daß es zur Induktion der Apoptose der murinen Hepatozyten kam (Abbildung 3.34A). Im Gegensatz dazu zeigten die homozygoten *SCID/Fas*^{lpr}-Mutanten ein verlängertes Überleben ohne Krankheitssymptomatik (Tabelle 3.10 und Abbildung 3.35). Die Injektion der humanen pcDNA-Nierentumorzellen löste keine letale Erkrankung oder Apoptose aus (Abbildung 3.34B). Die Versuchstiere entwickelten jedoch solide Tumore im Bauchraum. Das Fehlen funktioneller CD95-Rezeptoren auf den Zelloberflächen der *SCID/Fas*^{lpr}-Mutante wurde nach Inokulation von CD95L⁺ 2B12-Zellen deutlich belegt, da

diese Versuchstiere im Vergleich zu heterozygoten Geschwistern keinerlei Symptome einer Erkrankung zeigten.

Der Verlust der CD95L/CD95 Interaktion wurde ebenfalls durch *in vitro* ^{51}Cr -Freisetzungstests gezeigt (Abbildungen 3.36, 3.39 und 3.46). Im Gegensatz zu den 2B12-Zellen zeigten die humanen CD2^+ Effektorzellen gegen die *SCID/Fas^{lpr}*-Fibroblasten weiterhin ein hohes lytisches Potential. Die Inokulation humaner CD4^+ T-Zellen löste sowohl in homozygoten als auch heterozygoten *SCID/Fas^{lpr}*-Mutanten (Geschwistertiere) die letale xGvHD innerhalb von 2-4 Wochen aus (Tabelle 3.11). Der Verlust der CD95-Expression auf den murinen Zellen führte somit keineswegs zu einem signifikant verlängerten Überleben der *SCID/Fas^{lpr}*-Mutanten. Zwar wurde im Vergleich mit heterozygoten Geschwistern eine signifikant später einsetzende xGvHD mit $p = 0,023$ beobachtet, im Vergleich mit dem Wildtyp wurde dieses Ergebnis jedoch wieder relativiert ($p = 0,09$). Durch diese Befunde wurde deutlich, daß die CD95Ligand-induzierte Apoptose kein übergeordneter Mechanismus bei der Ausbildung der xGvHD war.

Immunhistologische Untersuchungen zeigten weiterhin apoptotische Zellen, so daß sehr wahrscheinlich eine CD95 unabhängige Interaktion, wie z.B. über TRAIL, zur Induktion des Zelltodes muriner CD95^- Zellen führt. Offen bleibt die Frage, welche Effektormechanismen humaner T-Zellen zur Zerstörung muriner Gewebe und schließlich zur Induktion der xGvHD führen. Ein sehr interessanter Aspekt stellt hierbei der Nachweis einer zellulär über CD4^+ T-Zellen vermittelten Zerstörung von xenogenem Gewebe in Abwesenheit von CD8^+ T- und B-Zellen dar [65]. Die CD4^+ T-Zellen zerstörten dabei xenogenes Gewebe, welches durch eine Zell-undurchlässige Membran geschützt war, so daß nur lösliche Faktoren, wie z.B. Zytokine ($\text{TNF-}\alpha$) oder reaktive Sauerstoffradikale, für die Gewebeerstörung in Frage kamen. Die Arbeitsgruppe Lucien et al. belegte sowohl in einem *in vivo* als auch einem *in vitro*-Modell, daß ein bisher unbekannter humaner Serumfaktor die Apoptose in xenogenem Gewebe induzierte [142].

4.6 Gerichtete Migration humaner Lymphozyten im SCIDHu-Tiermodell

Die Migration von Lymphozyten durch nahezu alle Kompartimente des Organismus ist eine charakteristische Eigenschaft dieser Immunzellen. Sowohl naive als auch antigen-stimulierte T-Zellen durchqueren das Blutssystem und die sekundären lymphatischen Organe.

Die naiven T-Lymphozyten exprimieren Selektine, Integrine und Chemokinrezeptoren, welche mittels Bindung an sogenannte Homing-Rezeptoren auf den Oberflächen der hochendothelialen Venolen (HEV) zu einer verstärkten Einwanderung ins sekundäre lymphatische Gewebe führen. Chemokine und deren Rezeptoren stellen die essentiellen Elemente dar, die eine Positionierung der T-Zellen und deren Partner bei der Antigenpräsentation und der anschließenden T_H-Differenzierung regulieren [143]. Nach der Migration in die lymphatischen Organe verlassen die naiven T-Zellen das Gewebe über die efferente Lymphe ins Blutssystem. Bevor die naiven T-Zellen die sekundären lymphatischen Organe verlassen, wandern diese Zellen zunächst in die T-Zellareale (Parakortex) und anschließend in den Kortex ein. Findet dabei eine Antigenerkennung zwischen naiver T-Zelle und APC (DC) statt, stellt der Lymphozyt seine Migration ein, und die Phase der Differenzierung (Proliferation) setzt ein. Mit der Aktivierung der T-Zelle kommt es zu einem Wechsel der Expression von Adhäsionsmolekülen. Der Wechsel dieser Expressionsmuster führt zu einem veränderten Migrationsverhalten dieser Effektorzellen, welches über Integrine vermittelt wird. Eine verminderte L-Selektin-Expression auf den Oberflächen aktivierter T-Zellen könnte eine Erklärung für eine verringerte Einwanderung der CD4⁺CD45R0⁺ T-Zellen in die sekundären lymphatischen Gewebe, wie Milz und Lymphknoten, sein. Die Vorgänge der Migration von Lymphozyten in alle Organe müssen dabei immer im Kontext von Ein- und Auswanderung, Proliferation, Apoptose und selektivem Überleben gesehen werden. Beobachtungen von spezifischen Anreicherungen in gewissen Geweben können durch eine verlangsamte Auswanderung, eine selektive Anreicherung, über Proliferation und durch die Apoptose der nicht beobachteten Zellen erklärt werden.

Die Analyse des T-Zellrezeptor V β -Repertoires (CDR3) gab die Möglichkeit, klonale Expansionsvorgänge einzelner T-Zellklone zu untersuchen. Die Expression von T-Zellklonen in allen Geweben deutete auf eine über spezifische Antigen-stimulierte Expansion mit anschließender Migration in die untersuchten Gewebe. Eine zufällige Besiedlung verschiedener Organe durch persistierende T-Zellen konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, da in mit CD4⁺CD45R0⁺ T-Zellen inokulierten Versuchstieren, auch nach längeren Zeiträumen, persistierende humane Zellen nachgewiesen wurden (Abbildungen 3.25 und 3.26). Die Besiedlung der murinen Lymphknoten durch humane CD4⁺CD45RA⁺ T-Zellen im frühen Verlauf der xGvHD (Tag 3) und der Nachweis aktivierter muriner dendritischer Zellen deuteten auf eine Interaktion von humanen und murinen Adhäsionsmolekülen hin. Diese Interaktionen führten möglicherweise zu einer verlangsamten Auswanderung und damit indirekt zu einer Anreicherung naiver humaner T-Zellen in den sekundären lymphatischen

Gewebe (Abbildungen 3.12, 3.2 und 3.8D/E). Eine weitere Erklärung für die verstärkte Einwanderung naiver humaner T-Zellen in die Mesenterial-Lymphknoten kann sehr wahrscheinlich über die Expression von Homingrezeptoren, wie L-Selektin, erklärt werden, die dafür sorgen, daß naive T-Zellen auf der Suche nach präsentierten Antigenen über die HEV in diese Gewebe einwandern. Naive T-Zellen sind dabei durch eine Expression der Chemokinrezeptoren CCR7 gekennzeichnet [144]. Diese Anreicherung naiver CD4⁺CD45RA⁺ T-Zellen wurde auch nach Induktion der xGvHD in den murinen Lymphknoten weiterhin beobachtet (Abbildungen 3.4 und 3.5). Allerdings wurde durch immunhistologische Färbungen belegt, daß ein Großteil dieser Zellen eine verringerte Teilungsaktivität besaß (Abbildung 3.12, Tag 13). Der Nachweis von proliferierenden CD4⁺CD45R0⁺ T-Zellen in lymphatischen Geweben könnte alternativ über die CCR7-Expression erklärt werden, die für eine gerichtete Einwanderung von T_H1-Zellen in lymphatische Gewebe sorgt und so erst effektive Immunantworten ermöglicht [145]. Hierbei könnten CCR7⁺ aktivierte T-Zellen mit überlappender Spezifität des TCR für eine effiziente Stimulation dendritischer Zellen sorgen, nach einer sekundären Stimulation durch murine Antigene aktiviert werden und in verschiedene Organe migrieren [144]. Diese Migrationen humaner T-Zellen zu den murinen lymphatischen Geweben, wie Lymphknoten und Thymus-assoziiertes Gewebe, wurden auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet [19, 146, 147]. Ein weiterer Beleg einer spezifischen Einwanderung der humanen Zellen in die Lymphknoten der Versuchstiere wurde durch Unterschiede im Muster der mRNA-Expression gefunden. Im Gegensatz zu den humanen Zellen aus anderen Kompartimenten, zeigten die humanen Zellen aus den Lymphknoten xGvH-erkrankter *scid*-Versuchstiere keine verstärkte CD95Ligand-Expression (Abbildung 3.32). Eine Erklärung für diesen Befund könnte das Vorliegen humaner naiver T-Zellen in den Lymphknoten sein, die bei Ausbildung der xGvHD dort unstimuliert vorlagen. Die Antigen-aktivierten humanen CD95L⁺ T-Zellen wandern hingegen in verschiedene Organe ein und führen vor Ort zu einer zellulär-vermittelten Abstoßungsreaktion.

4.7 Interaktionen muriner Adhäsionsmoleküle mit Rezeptoren humaner T-Zellen

Die ausdifferenzierten aktivierten T-Zellen eines spezifischen Klons werden auch Effektorzellen genannt. Diese Zellen sind besonders durch die Expression von Adhäsionsmolekülen, wie LFA1 und VLA-4, gekennzeichnet. Hierdurch erfolgt eine

verstärkte Interaktion mit den Endothelien, um so eine Diapedese in die Gewebe zu erlauben. Aus dieser verstärkten Interaktion der Antigen-stimulierten Effektorzellen mit dem Endothel läßt sich weiterhin die im Vergleich zu den naiven T-Zellen erhöhte Kapazität erklären, zu den Entzündungsherden zu migrieren. Die Interaktion von LFA1 mit dem Integrin ICAM1, die schon bei der Antigenpräsentation eine Rolle spielte, ist besonders entscheidend bei der Wechselwirkung mit dem aktivierten Endothel. Ferner spielen die Selektine als Adhäsions-Rezeptoren auf den Oberflächen der Endothelien bei der Vermittlung der Bindung von T-Zellen eine entscheidende Rolle.

Der Nachweis von Wirkungen zwischen humanen und murinen Oberflächenmolekülen, wie LFA1 und ICAM1, deutete auf Bindungsinteraktionen vieler Proteine über Speziesgrenzen hinweg. Dabei führten diese Wechselwirkungen zwischen humanen T-Zellen und murinen Endothelien zu einer *de novo* ICAM1-Synthese auf murinen Hepatozyten (Abbildung 3.40). Ob es sich hierbei um direkt über Zellkontakt vermittelte Reaktionen handelte oder eher lösliche Faktoren, wie IL-1 oder TNF- α , die zu dieser ICAM1-Proteinexpression führten, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend beantwortet werden. Daneben wurde eine Aktivierung der murinen Endothelien, wie den hochendothelialen Venolen (HEV), immunhistologisch nachgewiesen. Darüberhinaus wurde die Reifung muriner dendritischer Zellen durch eine stark erhöhte ICAM1-Expression beobachtet (Abbildung 3.7). Mit diesen Ergebnissen wurde belegt, daß es zu starken Interaktionen zwischen humanen Donorzellen und den murinen Empfängerzellen kommt. Entsprechende Ergebnisse zeigten, daß es bei chronischen Abstoßungsreaktionen (GvHD) im Mausmodell zu einer erhöhten ICAM1-Expression kommen kann, so daß ICAM1 sowohl als akzessorisches Molekül bei der Antigenpräsentation als auch bei der Bindung von Lymphozyten an Endothelien möglicherweise eine wichtige Rolle spielt [148].

4.7.1 Wirkung der murinen ICAM1-KO-Mutation

Neben den konstitutiv exprimierten ICAM2- und ICAM3-Molekülen gehört das ICAM1-Molekül zur ICAM-Familie [149]. Das über inflammatorische Zytokine induzierbare ICAM1-Molekül spielt bei der Adhäsion, der Migration von Lymphozyten und als akzessorisches Molekül bei der Antigenpräsentation eine wichtige Rolle. ICAM1 besitzt somit eine wichtige Funktion in der Induktionsphase von zellulären Immunantworten. Als Ligand des ICAM1-Transmembranproteins fungiert das β_2 Integrin LFA1 auf T-Lymphozyten und Monozyten (Mac1). Aufgrund der relativ hohen Sequenzhomologie zwischen humanen und murinen

ICAM1 und den hochkonservierten Bereichen der Bindungsstellen konnte auf eine Interaktion zwischen murinen ICAM1 und humanen LFA1 geschlossen werden.

Die *SCID/ICAM1*-Versuchstiere wurden dahingehend überprüft, ob die KO-Mutation im Exon5 des ICAM-1 Gens zu einem Verlust der Proteinexpression in allen Geweben führte. Mittels durchflußzytometrischer und immunhistologischer Färbungen wurden eventuelle ICAM1-Expressionen in verschiedenen Organen der homozygoten Ausfallmutanten im Vergleich zu heterozygoten Geschwistertieren und des Wildtyps (C.B-17-*scid* oder BALB/c) untersucht (Abbildungen 3.41 und 3.42). Die immunhistologischen und durchflußzytometrischen Untersuchungen zeigten einen kompletten Verlust der membranständigen ICAM1-Proteinexpression in allen untersuchten Kompartimenten der durch Kreuzungen auf den BALB/c-Hintergrund übertragenen Versuchstiere. Dennoch wurde durch Arbeiten von King et al. und van Den Engel et al. gezeigt, daß durch alternatives Splicing generierte zirkulierende ICAM1-Isoformen in Mäusen, die einen Verlust der membranständigen ICAM1-Expression aufwiesen, auftraten [57, 150]. Inwiefern diese zirkulierende ICAM1-Isoformen eine Rolle bei der verzögerten Auslösung der xGvHD nahmen, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Vor dem Einsatz der Versuchstiere in den Inokulationsexperimenten erfolgte eine Genotypisierung mittels PCR (Abbildung 3.41). Der Verlust der membranständigen ICAM1-Oberflächenexpression in den ICAM1-Verlustmutanten führte, wie von Sligh et al. beobachtet, zu einer Beeinträchtigung von Immunantworten bei Entzündungsreaktionen [52].

Der Einsatz dieser *SCID/ICAM1*-KO-Mutanten sollte die Frage untersuchen, ob der Verlust der murinen ICAM1-Expression Einfluß auf die Induktion einer letalen xGvHD durch humane T-Zellen nahm. Durch den Verlust der ICAM1-Expression in diesen Versuchstieren könnten sowohl Adhäsion als auch Antigenpräsentation beeinträchtigt sein. Die in Abschnitt 3.6 vorgestellten Daten zeigten (Tabellen 3.13 und 3.15), daß die homozygoten KO-Mutanten im Vergleich zu den heterozygoten Geschwistertieren tendenziell eine geringe Verlängerung im Überleben nach Inokulation humaner T-Zellen besaßen ($p = 0,056$). Die homozygoten *SCID/ICAM1*-KO-Mutanten überlebten durchschnittlich 4 Tage länger (Abbildungen 3.44 und 3.45). Immunhistologische Färbungen zeigten dabei keine Unterschiede bei der Besiedlung der unterschiedlichen Organe durch humane Zellen zwischen homo- und heterozygoten *SCID/ICAM1*-KO-Mutanten (Abbildung 3.43A). Bei den Untersuchungen von langzeitüberlebenden (>40 Tage) homozygoten Versuchstieren (n=8) wurden dagegen nur noch sehr geringe Infiltrationen humaner Zellen in den Organen gefunden (Abbildung 3.43B). Daß der Verlust der murinen ICAM1-Expression einen direkten Einfluß auf das lytische

Potential humaner T-Zellen nahm, konnte durch ^{51}Cr -Freisetzungstests belegt werden. Die mit *scid*-Fibroblasten und IL-2 *in vitro* stimulierten humanen CD2^+ T-Zellen konnten dabei zwar Fibroblasten des Wildtyps und der *SCID/Fas^{lpr}*-Mutante nach 4 h und 20 h lysieren, jedoch keine Fibroblasten, die durch eine ICAM1-KO-Mutation gekennzeichnet waren (Abbildungen 3.36 und 3.46). Ausgehend von diesen Befunden wurde deutlich, daß der Verlust der ICAM1-Expression zu einem nachweisbaren Schutz vor dem lytischen Potential humaner T-Zellen führte. Dieser Schutzeffekt wirkte jedoch nur für kurze Zeit, da die Versuchstiere ebenso wie die heterozygoten Geschwistertiere an einer letalen xGvHD erkrankten (Tabelle 3.13). Die Variabilität der Überlebenszeiten einzelner Versuchstiere innerhalb der Versuchsgruppen war sehr wahrscheinlich auf geringste Unterschiede im IgG und IgM-Antikörpertiter der Versuchstiere zurückzuführen. Abweichungen zwischen den einzelnen Versuchsgruppen waren aufgrund des heterogenen Hintergrundes der Versuchstiere erklärbar.

Im Vergleich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die einen deutlichen Effekt in der Verhinderung der Migration von Neutrophilen und Lymphozyten zu entzündlichen Geweben nachwiesen, zeigen die vorliegenden Daten dagegen nur einen relativ geringen Effekt auf die Induktion der xGvHD [50, 52, 151]. Eine anti-ICAM1-Therapie zur Verringerung der T-Zellaktivierung könnte zu einer verstärkten Migrationshemmung bei entzündlichen Prozessen führen, da eine Wechselwirkung zwischen ICAM1 und LFA1 blockiert würde [53]. Allerdings könnte eine modulierende Wirkung des Rest-Genoms einen Einfluß auf diesen Therapieansatz nehmen. Der Verlust von β 2-Integrinen spielt tatsächlich eine kritische Rolle bei der Stabilisierung der Bindung zwischen Immunzellen und Endothelien. Beim Rolling kommt es zu einer verzögerten zellulären Aktivierung der Immunzellen, wodurch diese Zellen erst eine feste Bindung an die Endothelzellen eingehen können (firm adhesion), wie von Kunkel et al. durch vergleichende Untersuchungen von Wildtyp und β 2-Integrin-KO-Mutanten gezeigt wurde [152].

Der Nachweis von ICAM1-Isoformen, die durch alternatives RNA-Splicing entstehen, könnte einen möglichen Grund für den nur geringen Einfluß der partiellen ICAM1-KO-Mutation auf die Ausprägung der xGvHD darstellen [57]. Zirkulierende Formen des ICAM1-Moleküls, in den Seren von Wildtyp-Versuchstieren und ICAM1-defizienten Mutanten, wie von van Den Engel et al. beobachtet, sollten nur einen sehr geringen Einfluß auf die Ausbildung der xGvHD nehmen [150]. Die Expression dieser zirkulierenden ICAM1-Moleküle wird dabei unabhängig von der membranständigen ICAM1-Expression reguliert. Durch den Einsatz der ICAM1-KO-Mutation (B6.129S4-*Icam1^{tm1Jcgr}*) könnte die Wirkung von ICAM1-Isoformen und deren Einfluß auf den Verlauf der xGvHD abschließend geklärt

werden, da es sich hierbei um eine komplette ICAM1-Mutation handelt, bei der keine ICAM1-Isoformen exprimiert werden [53].

Eine weitere Erklärung für die nur unwesentliche Verlängerung des Überlebens der homozygoten Verlustmutanten im Vergleich zu deren heterozygoten Geschwistertieren könnte auch in der Interaktion von ICAM2 und ICAM3, anderen Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie, liegen, da sie mit demselben Integrin-Rezeptor (LFA1) interagieren können [56]. Hierbei könnten die weiterhin in den *SCID/ICAM1*-KO-Mutanten exprimierten ICAM2- und ICAM3-Molekülen zu einem Großteil die Aufgaben und die Funktion von ICAM1 übernehmen, so daß ein Netzwerk von Proteinen der gleichen Molekülfamilie eventuelle Mutationen auffange. Grundlage hierbei wäre jedoch eine Wechselwirkung zwischen ICAM2 und ICAM3 mit dem humanen LFA1-Rezeptor. Durch Arbeiten (Transfektionsexperimente) von Xu et al. wurde gezeigt, daß eine funktionelle Konservierung der für die Bindung kritischen Bereiche von ICAM2 über Speziesgrenzen hinweg vorlag [153, 154]. Über mögliche Wechselwirkungen zwischen humanen LFA1 und murinen ICAM3 kann bisher nur spekuliert werden. Durch Arbeiten von de Fougerolles et al. wurde gezeigt, daß ICAM3 jedoch starke Homologien der für die Bindung kritischen Bereiche (fünf Ig-ähnliche Domänen) mit ICAM1 und ICAM2 aufweist [155]. Ein Hinweis für ein vorhandenes ICAM-Netzwerk, in dem der Expressionsverlust eines Moleküls durch Moleküle der gleichen Familie aufgefangen wird, wurde in einem HIV-Infektionsmodell beobachtet. Nur durch die Blockade aller Moleküle der ICAM-Familie (ICAM1 bis 3) wurde eine komplette Inhibition erzielt [55].

4.7.2 Wirkung der murinen P-Selektin-KO-Mutation

Die Selektine gehören einer Familie von Adhäsionsmolekülen an, die auf den Oberflächen von Lymphozyten und Endothelien exprimiert vorliegen. Dabei zeigen P-Selektin (CD62P), L-Selektin (CD62L) und E-Selektin (CD62E) ein unterschiedliches Expressionsmuster, welches eine direkte Auswirkung auf deren distinkte adhäsive Funktion nimmt. L-Selektin wird konstitutiv von allen Subpopulationen der Lymphozyten exprimiert, vermittelt die Bindung dieser Zellen an die hochendothelialen Venolen (HEV) und nimmt darüberhinaus Einfluß auf das „Rolling“ von Lymphozyten bei Entzündungsreaktionen. Die P- und E-Selektine werden hingegen auf aktivierten Endothelien exprimiert und sind für die Initiation der Bindung von Lymphozyten verantwortlich. Stocker et al. zeigte, daß die Expression von Selektinen auf porzinen Endothelzellen über Zytokine auch über Speziesgrenzen hinweg differentiell reguliert werden kann. Dabei induziert TNF- α und IL-1 α die E-Selektin

Expression, während IL-4 zu einem Ansteigen der P-Selektin Expression führt [156]. Alle Selektine zeigen eine hohe Sequenzhomologie, wobei die funktionellen Lektin- und EGF-Domänen hervorzuheben sind. Das P-Selektin-Molekül interagiert dabei mit dem auf Lymphozyten exprimierten P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1). Das CD62L kann hingegen mit zahlreichen Liganden, wie CD34, GlyCAM-1 und PSGL-1, interagieren. CD62E und CD62P erkennen Oligosaccharide auf den Oberflächenglykoproteinen zirkulierender Leukozyten.

Der Verlust der murinen P-Selektin-Expression der homozygoten Versuchstiere zeigte im Vergleich mit den heterozygoten Geschwistern keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,684$) bei der Induktion der Erkrankung, wie in den Tabellen 3.14 und 3.15 dargestellt (Abschnitt 3.6). Alle Versuchstiere entwickelten eine letale xGvHD innerhalb von 15 Tagen nach Injektion der humanen CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 3.48). Der Verlust der murinen P-Selektin Expression nahm auch keinen Einfluß auf das Migrationsverhalten humaner T-Zellen im murinen Milieu, wie durch immunhistologische Untersuchungen belegt wurde (Daten nicht gezeigt). Diese Befunde wurden durch Arbeiten unterstützt, die ebenso nur eine sehr geringe Auswirkung des P-Selektin-Expressionsverlustes auf die allo- bzw. xenogene Abstoßungsreaktion in einem Schwein-Maus-Tiermodell beobachteten [54]. Die Arbeitsgruppe Wong et al. wies ebenfalls eine übereinstimmende minimale Rolle der Selektine bei der Rekrutierung von Lymphozyten in entzündliche Lebergewebe nach [60].

Die durch Kreuzungen erstellten *SCID/ICAM1/P-Selektin*-KO-Mutanten zeigten in den bisher durchgeführten Endversuchen, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der *SCID/ICAM1*-Mutante im Abschnitt 3.6, einen eher geringen lebensverlängernden Einfluß auf die xGvH-erkrankten Versuchstiere, der sehr wahrscheinlich durch den Verlust der ICAM1-Expression erklärt werden kann. Aufgrund der wenigen Einzelversuche konnte keine abschließende Bewertung vorgenommen werden. Nur bei doppelt homozygoten *SCID/ICAM1/P-Selektin*-KO-Mutanten wurde eine gewisse Reduktion der Adhäsion von Lymphozyten beobachtet. Dadurch wurde gezeigt, daß die Selektine nicht den essentiellen Schritt bei der Rekrutierung von Lymphozyten darstellen. Weitere Befunde von Doerschuk et al. an einem Krankheitsmodell zeigten, daß die Verlustmutation von ICAM1 und P-Selektin nur unwesentlich die Einwanderung von Neutrophilen beeinflusst [157]. Im Gegensatz hierzu wurde gezeigt, daß der Verlust der P- und E-Selektin Expression sehr wohl zu einer eingeschränkten Bindung (Rolling und Firm Adhesion) von Lymphozyten an die CD62P- und CD62E negativen Endothelien führt [152, 158]. Die P-Selektin/ICAM1-Doppelmutanten wiesen organspezifische Unterschiede bei der Emigration von Neutrophilen auf. Einerseits

wurde die Emigration in die Bauchhöhle blockiert und andererseits jedoch eine Einwanderung ins Gewebe der Lunge nicht beeinflusst.

Untersuchungen von Steeber et al. zeigten ebenfalls, daß die Familien der Selektine und der β 2-Integrine synergetisch die optimale Bindung von Lymphozyten beim Rolling vermitteln und diese Wechselwirkung essentiell für den Aufbau einer effektiven Immunantwort war [159]. Darüberhinaus wurde belegt, daß neben der Bindung von Lymphozyten durch Selektine und Integrine eine direkte Bindung vom Lymphozyten an schon gebunden vorliegende Lymphozyten oder Granulozyten mittels L-Selektin vorkommt und diese Zellen dabei in einer charakteristischen Clusterbildung vorliegen [160]. Die Bindungsinteraktionen bei der Migration humaner T-Zellen an murinen Endothelien im SCIDHu-Tiermodell könnten somit den ungenügenden Einfluß des Verlustes der P-Selektin-Expression auf das Migrationsverhalten der humanen T-Zellen erklären.

Eine andere Deutung beinhaltet ein Selektin-Netzwerk, bei dem der Verlust eines einzelnen Selektins durch andere aufgefangen werden kann. Eine wichtige Grundlage wäre hierbei eine Bindung über gleiche Liganden. Daß diese überlappenden Interaktionen der Selektine tatsächlich vorliegen, wurde dadurch unterstützt, daß neben P-Selektin auch L-Selektin mit dem PSGL1-Liganden interagieren kann [161]. Desweiteren binden sowohl E-Selektin als auch P-Selektin an Oligosaccharide auf den Oberflächenglykoproteinen zirkulierender Leukozyten [36]. Weiterhin stellte sich die Frage, ob die CD62P/PSGL1-Wechselwirkung eine wichtige Funktion bei der Bindung humaner Zellen an den murinen Endothelien einnimmt. Durch Befunde von Moore et al. wurde gezeigt, daß der P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 für die Vermittlung der Bindung von humanen Neutrophilen an den P-Selektin⁺-Endothelien verantwortlich war [162]. Daß der Verlust der P-Selektinexpression durchaus von CD62E und CD62L aufgefangen werden konnte, wurde in einem Human-anti-Schwein-Modell belegt [163]. Hierbei wurde durch die kombinierte Blockade von L-Selektin, E-Selektin und PSGL1 mittels monoklonaler Antikörper eine fast komplette Verringerung der Adhäsion von Neutrophilen erreicht. Übereinstimmende Ergebnisse von Jung et al. zeigten, daß nur durch den Verlust aller Selektine eine signifikante Schwächung der Rekrutierung der Neutrophilen erfolgt, und jedes Einzelmitglied der Selektinfamilie bei der Rekrutierung Neutrophiler eine Rolle spielt [164]. Die Unterbrechung der Adhäsionskaskade durch die Blockade der Selektin-Familie könnte die Fähigkeit zur Infiltration xenogener Organe der Lymphozyten im Verlauf einer Abstoßungsreaktion unterdrücken, da die Endothelzellen das Hauptangriffsziel der humanen T-Zellen darstellen.

4.8 Schlußfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurde ein *in vivo* Kleintiermodell genutzt, um das xenoreaktive Potential humaner Zellen gegen xenogenes diskordantes Gewebe zu analysieren. In diesem Modell wurde gezeigt, daß nur die naiven humanen CD4⁺CD45RA⁺ T-Zellen ein xenoreaktives Potential besaßen, um in den *scid*-Versuchstieren eine letale xenogene Graft-versus-Host-Erkrankung auszulösen. Durch Arbeiten von Yi et al. mit einem Human-Schwein *in vitro*-Modell wurde ebenfalls gezeigt, daß die humanen CD4⁺ T-Zellen zu der Abstoßung von xenogenem Gewebe führten [42]. Durch die Untersuchung des TCR V β -Repertoires von unstimulierten und in der Maus aktivierten humanen Zellen wurde deutlich, daß es zu einer oligoklonalen Expansion der humanen T-Zellen in den murinen Zielorganen kam. Daneben wurde jedoch auch eine organspezifische, eine zeitliche und eine individuelle Abhängigkeit der Diversität der humanen T-Zellen beobachtet. Darüberhinaus wurde gezeigt, daß die humanen Effektorzellen eine T_H1-typische Differenzierung aufwiesen. Der Nachweis einer induzierten CD95Ligand-Expression der humanen Zellen deutete auf eine mögliche Induktion der Erkrankung durch Apoptose mittels CD95L/CD95-Interaktion. Im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen wurde durch den Einsatz einer *SCID/Fas^{lpr}*-Verlustmutante jedoch gezeigt, daß der Verlust der CD95L/CD95-Interaktion im Vergleich mit dem Wildtyp keinen Einfluß auf die Ausbildung der xGvHD nahm [42]. Daher bleibt weiterhin offen, über welche Effektormechanismen die xGvHD induziert wird. Einige sehr gute Kandidaten, wie TRAIL, könnten jedoch in der TNF-Familie zu finden sein [139, 165]. Die vorliegenden Ergebnisse belegten, daß die letale xGvHD nicht durch den Verlust einzelner muriner Adhäsionsmoleküle, wie ICAM1 und P-Selektin, unterbunden werden konnte.

4.9 Ausblick

Das SCIDHu-Tiermodell ermöglicht die Untersuchung von xenogenen, reaktiven Oberflächenstrukturen und deren Expressionsverlust auf die zellulär-vermittelte xGvHD. Durch die vorliegenden Befunde wurde deutlich, daß der Ausfall einzelner muriner Moleküle nur einen geringen Effekt auf die Abstoßungsreaktion nahm. Sehr wahrscheinlich könnte eine größere Wirkung durch das Fehlen von Molekülfamilien erreicht werden, so daß ein Expressionsverlust nicht durch Moleküle derselben Familie aufgefangen werden kann. Mögliche Zielstrukturen sind weiterhin Moleküle der Immunglobulin- und Selektin-Familie.

Durch den Befund, daß die xenoreaktiven humanen CD4⁺ T-Zellen eine T_H1-typische Differenzierung aufwiesen, ergeben sich neue Zielstrukturen. Einerseits könnte mit einer murinen MHC II-Verlustmutante untersucht werden, ob die sehr wahrscheinlich auftretende direkte Antigenpräsentation zwischen murinen APC und humanen T-Zellen erfolgt. Andererseits könnte damit der Verlust der polarisierenden IL-12 Zytokinexpression einen inhibierenden Einfluß auf die Stimulation der humanen T-Zellen nehmen.

Weitere wichtige murine Strukturen stellen Moleküle, wie L-Selektin oder CCR7 dar, die vermutlich für das Homing der humanen T-Zellen verantwortlich sind. Durch den Nachweis, daß der Verlust der CD95L/CD95-Interaktion keinen Einfluß auf den Verlauf der xGvHD nahm, bleibt weiterhin offen, über welchen Effektormechanismus eine Zellschädigung der murinen Gewebe erfolgt. Durch den Nachweis, daß sehr wahrscheinlich lösliche Faktoren hierfür verantwortlich sind, könnte das Zytokin TNF- α als Auslöser des Zelltodes fungieren [87]. Ein weiterer wichtiger Ansatzpunkt für zukünftige Forschungen wäre die Möglichkeit, über Chemokine, Chemokinantagonisten oder gegen Chemokinrezeptoren gerichtete Antikörper das Migrationsverhalten humaner Effektorzellen zu untersuchen [166]. Diesen Ansätzen ist gemeinsam die Verhinderung einer gerichteten Einwanderung in murine Lymphknoten, wodurch eine Stimulation der humanen Zellen beeinträchtigt würde. Ein sehr interessanter Ansatzpunkt für die Xenotransplantationserforschung stellt die Möglichkeit dar, die Reaktivität humaner Zellen gegen porcine Xenoantigene in einem modifizierten SCIDHu-Tiermodell zu untersuchen, wie von Sawada et al. gezeigt [167].

5 Zusammenfassung

Bei der Transplantation von Organen und Geweben über Speziesgrenzen hinweg, treten eine Reihe immunologischer Barrieren auf, die für eine Akzeptanz des Transplantates überwunden werden müssen. Hierzu zählen die hyperakute Abstoßung, die verzögerte, vaskularisierte Abstoßung und die T-Zell-vermittelte Abstoßung, die alle zu einer Zerstörung von Fremdgewebe führen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Tiermodell ausgewählt, in dem die T-Zell-vermittelte Abstoßungsreaktion isoliert von den anderen Ebenen untersucht werden konnte. Das diskordante SCIDHu-Tiermodell ermöglichte dabei *in vivo* Untersuchungen zellulärer Reaktionen humaner Immunzellen gegen xenogenes murines Gewebe. Aufgrund eines genetischen Defektes besitzt die C.B-17-*scid*-Maus keine ausdifferenzierten T- und B-Zellen. Vorhandene murine NK-Zellen müssen vorab durch eine Konditionierung entfernt werden, so daß allogene oder xenogene Gewebe oder Zellen weder durch angeborene noch durch spezifische Immunreaktionen abgestoßen werden können. Die inokulierten humanen Lymphozyten induzieren eine letale xenogene Graft-versus-Host-Erkrankung (xGvHD). Dadurch eignet sich dieses Tiermodell in besonderer Weise für die Analyse der Reaktivität humaner Lymphozyten gegen diskordantes Gewebe.

Verschiedene hochreine humane Lymphozyten-Subpopulationen ($CD2^+/CD2^-/CD4^+/CD8^+/CD4^+CD45RA^+$ und $CD4^+CD45R0^+$) wurden *scid*-Mäusen intraperitoneal injiziert. Nur Tiere, die ein $CD4^+$ T-Zell-Inokulum erhalten hatten, erkrankten und zeigten typische xGvHD-Symptome nach 2-4 Wochen, während mit $CD2^-$ humanen Zellen und $CD8^+$ T-Zellen inokulierte Versuchstiere nicht erkrankten. Nur naive humane $CD4^+CD45RA^+$ T-Zellen induzierten in den *scid*-Versuchstieren eine letale xGvHD, im Spender aktivierte memory $CD4^+CD45R0^+$ T-Zellen lösten keine Erkrankung aus. Begleitende durchflußzytometrische Untersuchungen humaner T-Zellen zu festgesetzten Zeitpunkten nach der Inokulation zeigten eine zunehmende Dominanz von T-Zellen mit dem Phänotyp $CD45R0^+$. Aus xGvH-erkrankten Versuchstieren wiedergewonnene humane T-Zellen induzierten in Sekundärempfängern die letale xGvHD in signifikant kürzerer Zeit ($p = 0,009$). Die Analyse des T-Zellrezeptor V β -Repertoires und der CDR3-Spektratypisierungen zeigte, daß die Besiedlung der murinen Organe durch oligoklonal expandierte humane T-Zellen erfolgte. Die Diversität dieser Zellen zeigte in einigen Tieren eine deutliche Organabhängigkeit. In Experimenten, in denen die Versuchstiere nach Inokulation humaner T-Zellen ungewöhnlich spät die Krankheit entwickelten, reflektierten die markanten Kontraktionen der CDR3-

Spektratypen deutlich eingeschränkte Diversitäten des T-Zell Repertoires. Mit immunhistologischen Verfahren wurden starke Proliferationen und Aktivierungsprozesse humaner T-Zellen in den verschiedenen murinen Geweben beobachtet.

Die aktivierten humanen T-Zellen zeigten ein T_H1-artiges Zytokinprofil (IL-2, IL-2-R, TNF- α , IFN- γ) und exprimierten den CD95Liganden. Durch den Einsatz homozygoter *SCID/Fas^{lpr}*-Versuchstiere konnte jedoch gezeigt werden, daß die von humanen CD4⁺ T-Zellen ausgelöste Gewebeschädigung bzw. die Lyse muriner Zielzellen nicht nur über die CD95L/CD95 Wechselwirkung vermittelt wurde, da auch diese Versuchstiere eine letale xGvHD entwickelten.

Die xenoreaktiven, naiven CD4⁺ T-Zellen, benutzten murine Adhäsionsmoleküle, insbesondere ICAM1, um eine xGvHD zu induzieren. Die Inokulation humaner CD4⁺ T-Zellen in homozygote *SCID/ICAM1*-KO-Mutanten löste zwar eine letale xGvHD aus, diese erfolgte im Vergleich mit ICAM1-heterozygoten Geschwistertieren jedoch durchschnittlich 4 Tage später. Diese tendenzielle „Schutzwirkung“ wurde auch in ⁵¹Cr-Freisetzungstests beobachtet. Die Untersuchungen an einer *SCID/P-Selektin*-KO-Mutante zeigte im Vergleich zu den heterozygoten Geschwistertieren kein signifikant verzögertes Auftreten der xGvHD.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß die Reaktivität gegen diskordantes Gewebe in diesem Modell der Maus vorwiegend über die naive humane CD4⁺CD45RA⁺ T-Zellsubpopulation vermittelt wird. Insbesondere die Antigenpräsentation durch xenogene murine APC nimmt dabei eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von humanen T-Zellen ein. Diese neu-aktivierten humanen T-Zellen lösen nach Proliferations- und Differenzierungsvorgängen die T-Zell-vermittelte xGvHD in den *scid*-Versuchstieren aus. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wird deutlich, daß bei der Transplantation von Geweben und Organen über Speziesgrenzen hinweg funktionelle Ligand/Rezeptor-Interaktionen vorliegen und diese bei der Vermittlung einer Abstoßungsreaktion von Bedeutung sind.

6 Literaturverzeichnis

1. Platt, J. L., and F. H. Bach. 1991. Discordant xenografting: challenges and controversies. *Curr Opin Immunol* 3:735.
2. Auchincloss, H., Jr., and D. H. Sachs. 1998. Xenogeneic transplantation. *Annu Rev Immunol* 16:433.
3. Bach, F. H. 1997. Some problems related to discordant xenografting. *Transplant Proc* 29:3009.
4. Moses, R. D., R. N. d. Pierson, H. J. Winn, and H. Auchincloss, Jr. 1990. Xenogeneic proliferation and lymphokine production are dependent on CD4+ helper T cells and self antigen-presenting cells in the mouse. *J Exp Med* 172:567.
5. Herrlinger, K. R., V. Eckstein, W. Muller-Ruchholtz, and K. Ulrichs. 1996. Human T-cell activation is mediate predominantly by direct recognition of porcine SLA and involves accessory molecule interaction of ICAM1/LFA 1 and CD2/LFA3. *Transplant Proc* 28:650.
6. Sette, A., and G. T. Nepom. 2000. Antigen recognition [editorial; comment]. *Curr Opin Immunol* 12:77.
7. Reid, S. D., G. Penna, and L. Adorini. 2000. The control of T cell responses by dendritic cell subsets [see comments]. *Curr Opin Immunol* 12:114.
8. O'Garra, A. 1998. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 8:275.
9. Romagnani, S. 1996. Th1 and Th2 in human diseases. *Clin Immunol Immunopathol* 80:225.
10. Kim, J. J., A. Tsai, L. K. Nottingham, L. Morrison, D. M. Cuning, J. Oh, D. J. Lee, K. Dang, T. Dentchev, A. A. Chalian, M. G. Agadjanyan, and D. B. Weiner. 1999. Intracellular adhesion molecule-1 modulates beta-chemokines and directly costimulates T cells in vivo. *J Clin Invest* 103:869.

11. Johannisson, A., and R. Festin. 1995. Phenotype transition of CD4⁺ T cells from CD45RA to CD45R0 is accompanied by cell activation and proliferation. *Cytometry* 19:343.
12. Bosma, G. C., M. T. Davisson, N. R. Ruetsch, H. O. Sweet, L. D. Shultz, and M. J. Bosma. 1989. The mouse mutation severe combined immune deficiency (scid) is on chromosome 16 [published erratum appears in *Immunogenetics* 1989;29(3):224]. *Immunogenetics* 29:54.
13. Bosma, M. J. 1989. The scid mutation: occurrence and effect. *Curr Top Microbiol Immunol* 152:3.
14. Bosma, M. J., and A. M. Carroll. 1991. The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol* 9:323.
15. Bosma, G. C., M. Fried, R. P. Custer, A. Carroll, D. M. Gibson, and M. J. Bosma. 1988. Evidence of functional lymphocytes in some (leaky) scid mice. *J Exp Med* 167:1016.
16. Carroll, A. M., R. R. Hardy, J. Petrini, and M. J. Bosma. 1989. T cell leakiness in scid mice. *Curr Top Microbiol Immunol* 152:117.
17. Carroll, A. M., R. R. Hardy, and M. J. Bosma. 1989. Occurrence of mature B (IgM⁺, B220⁺) and T (CD3⁺) lymphocytes in scid mice. *J Immunol* 143:1087.
18. Pohler, P. 1997. Aspekte der Xenoreaktivität in humanisierten *scid*-Mäusen. *Dissertation*.
19. Armstrong, N., F. Cigel, W. Borchering, R. Hong, and V. Malkovska. 1992. In vitro preactivated human T cells engraft in SCID mice and migrate to murine lymphoid tissues. *Clin Exp Immunol* 90:476.
20. Mosier, D. E., R. J. Gulizia, S. M. Baird, and D. B. Wilson. 1988. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* 335:256.
21. Krowka, J. F., S. Sarin, R. Namikawa, J. M. McCune, and H. Kaneshima. 1991. Human T cells in the SCID-hu mouse are phenotypically normal and functionally competent. *J Immunol* 146:3751.

22. Hoffmann-Fezer, G., C. Gall, U. Zengerle, B. Kranz, and S. Thierfelder. 1993. Immunohistology and immunocytology of human T-cell chimerism and graft-versus-host disease in SCID mice. *Blood* 81:3440.
23. Tary-Lehmann, M., and A. Saxon. 1992. Human mature T cells that are anergic in vivo prevail in SCID mice reconstituted with human peripheral blood. *J Exp Med* 175:503.
24. Tary-Lehmann, M., P. V. Lehmann, D. Schols, M. G. Roncarolo, and A. Saxon. 1994. Anti-SCID mouse reactivity shapes the human CD4⁺ T cell repertoire in hu-PBL-SCID chimeras. *J Exp Med* 180:1817.
25. Kasai, M., T. Yoneda, S. Habu, Y. Maruyama, K. Okumura, and T. Tokunaga. 1981. In vivo effect of anti-asialo GM1 antibody on natural killer activity. *Nature* 291:334.
26. Dessureault, S., B. Shpitz, J. Alloo, O. Rotstein, J. Sandhu, N. Hozumi, B. Fernandes, and S. Gallinger. 1997. Physiologic human T-cell responses to OKT3 in the human peripheral blood lymphocyte-severe combined immunodeficiency mouse model. *Transplantation* 64:811.
27. Beverley, P. C., A. Daser, C. A. Michie, and D. L. Wallace. 1992. Functional subsets of T cells defined by isoforms of CD45. *Biochem Soc Trans* 20:184.
28. Schwinzer, R., R. Siefken, R. A. Franklin, J. Saloga, K. Wonigeit, and E. W. Gelfand. 1994. Human CD45RA⁺ and CD45R0⁺ T cells exhibit similar CD3/T cell receptor-mediated transmembrane signaling capacities but differ in response to co-stimulatory signals. *Eur J Immunol* 24:1391.
29. Young, J. L., J. M. Ramage, J. S. Gaston, and P. C. Beverley. 1997. In vitro responses of human CD45R0^{bright}RA⁻ and CD45R0⁻RA^{bright} T cell subsets and their relationship to memory and naive T cells. *Eur J Immunol* 27:2383.
30. Bell, E. B., S. M. Sparshott, and C. Bunce. 1998. CD4⁺ T-cell memory, CD45R subsets and the persistence of antigen--a unifying concept. *Immunol Today* 19:60.
31. Westermann, J., and U. Bode. 1999. Distribution of activated T cells migrating through the body: a matter of life and death. *Immunol Today* 20:302.

32. Bode, U., K. Wonigeit, R. Pabst, and J. Westermann. 1997. The fate of activated T cells migrating through the body: rescue from apoptosis in the tissue of origin. *Eur J Immunol* 27:2087.
33. Shimizu, Y., W. Newman, Y. Tanaka, and S. Shaw. 1992. Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol Today* 13:106.
34. Pannetier, C., J. Even, and P. Kourilsky. 1995. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol Today* 16:176.
35. Batten, P., T. Heaton, S. Fuller-Espie, and R. I. Lechler. 1995. Human anti-mouse xenorecognition. Provision of noncognate interactions reveals plasticity of T cell repertoire. *J Immunol* 155:1057.
36. Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Capra, J.D. 1999. Immunobiology - The Immune System in Health and Disease, Fourth Edition. .
37. Annunziato, F., G. Galli, L. Cosmi, P. Romagnani, R. Manetti, E. Maggi, and S. Romagnani. 1998. Molecules associated with human Th1 or Th2 cells. *Eur Cytokine Netw* 9:12.
38. Romagnani, S. 1997. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 18:263.
39. Wren, S. M., S. C. Wang, N. L. Thai, B. Conrad, R. A. Hoffman, J. J. Fung, R. L. Simmons, and S. T. Ildstad. 1993. Evidence for early Th 2 T cell predominance in xenoreactivity. *Transplantation* 56:905.
40. Hartig, C. V., G. W. Haller, D. H. Sachs, S. Kuhlenschmidt, and P. S. Heeger. 2000. Naturally developing memory T cell xenoreactivity to swine antigens in human peripheral blood lymphocytes [In Process Citation]. *J Immunol* 164:2790.
41. Xun, C., S. A. Brown, C. D. Jennings, P. J. Henslee-Downey, and J. S. Thompson. 1993. Acute graft-versus-host-like disease induced by transplantation of human activated natural killer cells into SCID mice. *Transplantation* 56:409.
42. Yi, S., X. Feng, Y. Wang, T. W. Kay, and P. J. O'Connell. 1999. CD4+ cells play a major role in xenogeneic human anti-pig cytotoxicity through the Fas/Fas ligand lytic pathway. *Transplantation* 67:435.

43. Iwasaki, T., T. Hamano, K. Saheki, T. Kuroiwa, Y. Kataoka, Y. Takemoto, A. Ogata, A. Sugihara, N. Terada, J. Fujimoto, and E. Kakishita. 1999. Effect of graft-versus-host disease (GVHD) on host hematopoietic progenitor cells is mediated by Fas-Fas ligand interactions but this does not explain the effect of GVHD on donor cells. *Cell Immunol* 197:30.
44. Iwasaki, T., T. Hamano, K. Saheki, T. Kuroiwa, Y. Kataoka, Y. Takemoto, A. Ogata, J. Fujimoto, and E. Kakishita. 2000. Graft-versus-host-disease-associated donor cell engraftment in an F1 hybrid model is dependent upon the Fas pathway. *Immunology* 99:94.
45. Nishimura, M., S. Uchida, S. Mitsunaga, Y. Yahagi, K. Nakajima, K. Tadokoro, and T. Juji. 1997. Characterization of T-cell clones derived from peripheral blood lymphocytes of a patient with transfusion-associated graft-versus-host disease: Fas-mediated killing by CD4+ and CD8+ cytotoxic T-cell clones and tumor necrosis factor beta production by CD4+ T-cell clones. *Blood* 89:1440.
46. Nagata, S., and T. Suda. 1995. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today* 16:39.
47. Singer, G. G., A. C. Carrera, A. Marshak-Rothstein, C. Martinez, and A. K. Abbas. 1994. Apoptosis, Fas and systemic autoimmunity: the MRL-lpr/lpr model. *Curr Opin Immunol* 6:913.
48. van Den Brink, M. R., E. Moore, K. J. Horndasch, J. M. Crawford, J. Hoffman, G. F. Murphy, and S. J. Burakoff. 2000. Fas-deficient lpr mice are more susceptible to graft-versus-host disease. *J Immunol* 164:469.
49. Malik, A. B. 1993. Endothelial cell interactions and integrins. *New Horiz* 1:37.
50. Bullard, D. C., L. Qin, I. Lorenzo, W. M. Quinlin, N. A. Doyle, R. Bosse, D. Vestweber, C. M. Doerschuk, and A. L. Beaudet. 1995. P-selectin/ICAM-1 double mutant mice: acute emigration of neutrophils into the peritoneum is completely absent but is normal into pulmonary alveoli [see comments]. *J Clin Invest* 95:1782.
51. Bullard, D. C., L. A. Hurley, I. Lorenzo, L. M. Sly, A. L. Beaudet, and N. D. Staite. 1996. Reduced susceptibility to collagen-induced arthritis in mice deficient in intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* 157:3153.

52. Sligh, J. E., Jr., C. M. Ballantyne, S. S. Rich, H. K. Hawkins, C. W. Smith, A. Bradley, and A. L. Beaudet. 1993. Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8529.
53. Xu, H., J. A. Gonzalo, Y. St Pierre, I. R. Williams, T. S. Kupper, R. S. Cotran, T. A. Springer, and J. C. Gutierrez-Ramos. 1994. Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice. *J Exp Med* 180:95.
54. Sandberg, J. O., and O. Korsgren. 1997. Islet allo- and xenotransplantation in normal, intercellular adhesion molecule-1-deficient, and P selectin-deficient mice. *Transplantation* 64:584.
55. Butini, L., A. R. De Fougerolles, M. Vaccarezza, C. Graziosi, D. I. Cohen, M. Montroni, T. A. Springer, G. Pantaleo, and A. S. Fauci. 1994. Intercellular adhesion molecules (ICAM)-1 ICAM-2 and ICAM-3 function as counter-receptors for lymphocyte function-associated molecule 1 in human immunodeficiency virus-mediated syncytia formation. *Eur J Immunol* 24:2191.
56. Staunton, D. E., M. L. Dustin, and T. A. Springer. 1989. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 339:61.
57. King, P. D., E. T. Sandberg, A. Selvakumar, P. Fang, A. L. Beaudet, and B. Dupont. 1995. Novel isoforms of murine intercellular adhesion molecule-1 generated by alternative RNA splicing. *J Immunol* 154:6080.
58. Bullard, D. C., P. D. King, M. J. Hicks, B. Dupont, A. L. Beaudet, and K. B. Elkon. 1997. Intercellular adhesion molecule-1 deficiency protects MRL/MpJ-Fas(lpr) mice from early lethality. *J Immunol* 159:2058.
59. Austrup, F., D. Vestweber, E. Borges, M. Lohning, R. Brauer, U. Herz, H. Renz, R. Hallmann, A. Scheffold, A. Radbruch, and A. Hamann. 1997. P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature* 385:81.
60. Wong, J., B. Johnston, S. S. Lee, D. C. Bullard, C. W. Smith, A. L. Beaudet, and P. Kubes. 1997. A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature. *J Clin Invest* 99:2782.

61. Warrens, A. N., A. R. Simon, P. R. Theodore, D. H. Sachs, and M. Sykes. 1998. Function of porcine adhesion molecules in a human marrow microenvironment. *Transplantation* 66:252.
62. Warrens, A. N., A. R. Simon, P. R. Theodore, and M. Sykes. 1999. Human-porcine receptor-ligand compatibility within the immune system: relevance for xenotransplantation. *Xenotransplantation* 6:75.
63. Warrens, A. N., A. R. Simon, P. R. Theodore, D. H. Sachs, and M. Sykes. 2000. Cross-species compatibility of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) with its ligands. *Transplantation* 69:394.
64. Sandhu, J. S., R. Gorczynski, B. Shpitz, S. Gallinger, H. P. Nguyen, and N. Hozumi. 1995. A human model of xenogeneic graft-versus-host disease in SCID mice engrafted with human peripheral blood lymphocytes. *Transplantation* 60:179.
65. Loudovaris, T., T. E. Mandel, and B. Charlton. 1996. CD4+ T cell mediated destruction of xenografts within cell-impermeable membranes in the absence of CD8+ T cells and B cells. *Transplantation* 61:1678.
66. de Kroon, J. F., C. A. van Bergen, R. A. de Paus, H. C. Kluin-Nelemans, R. Willemze, and J. H. Falkenburg. 1997. Human cytotoxic CD8+ T-lymphocyte clones engraft in severe combined immunodeficient (SCID) mice but show diminished function. *J Immunother* 20:101.
67. Xun, C. Q., J. S. Thompson, C. D. Jennings, and S. A. Brown. 1995. The effect of human IL-2-activated natural killer and T cells on graft- versus-host disease and graft-versus-leukemia in SCID mice bearing human leukemic cells. *Transplantation* 60:821.
68. Blazar, B. R., P. A. Taylor, A. Panoskaltis-Mortari, S. K. Narula, S. R. Smith, M. G. Roncarolo, and D. A. Vallera. 1998. Interleukin-10 dose-dependent regulation of CD4+ and CD8+ T cell- mediated graft-versus-host disease. *Transplantation* 66:1220.
69. Coppola, V., A. Veronesi, S. Indraccolo, F. Calderazzo, M. Mion, S. Minuzzo, G. Esposito, D. Mauro, B. Silvestri, P. Gallo, P. Falagiani, A. Amadori, and L. Chieco-Bianchi. 1998. Lymphoproliferative disease in human peripheral blood mononuclear cell- injected SCID mice. IV. Differential activation of human Th1 and Th2 lymphocytes and influence of the atopic status on lymphoma development. *J Immunol* 160:2514.

70. Bolivar, F., and K. Backman. 1979. Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol* 68:245.
71. Schwinzer, R., Dulat, H. , Baars, W. , Wonigeit, K. 1999. CD95-Ligand als protektives Molekül zur Verhinderung von T-Zellvermittelter Zytolyse. *Tx Med* 11.:193 .
72. Farges, O., P. J. Morris, and M. J. Dallman. 1995. Spontaneous acceptance of rat liver allografts is associated with an early downregulation of intragraft interleukin-4 messenger RNA expression. *Hepatology* 21:767.
73. Takahashi, T., M. Tanaka, J. Inazawa, T. Abe, T. Suda, and S. Nagata. 1994. Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int Immunol* 6:1567.
74. Orscheschek, K., H. Merz, B. Schlegelberger, and A. C. Feller. 1994. An immortalized cell line with features of human follicular dendritic cells. Antigen and cytokine expression analysis. *Eur J Immunol* 24:2682.
75. Alzona, M., H. M. Jack, R. I. Fisher, and T. M. Ellis. 1994. CD30 defines a subset of activated human T cells that produce IFN-gamma and IL-5 and exhibit enhanced B cell helper activity. *J Immunol* 153:2861.
76. Luscher, U., L. Filgueira, A. Juretic, M. Zuber, N. J. Luscher, M. Heberer, and G. C. Spagnoli. 1994. The pattern of cytokine gene expression in freshly excised human metastatic melanoma suggests a state of reversible anergy of tumor-infiltrating lymphocytes. *Int J Cancer* 57:612.
77. Boles, K. S., R. Barten, P. R. Kumaresan, J. Trowsdale, and P. A. Mathew. 1999. Cloning of a new lectin-like receptor expressed on human NK cells. *Immunogenetics* 50:1.
78. Samlowski, W. E., B. A. Robertson, B. K. Draper, E. Prystas, and J. R. McGregor. 1991. Effects of supravital fluorochromes used to analyze the in vivo homing of murine lymphocytes on cellular function. *J Immunol Methods* 144:101.
79. Meier, A., D. H. Persing, M. Finken, and E. C. Bottger. 1993. Elimination of contaminating DNA within polymerase chain reaction reagents: implications for a general approach to detection of uncultured pathogens. *J Clin Microbiol* 31:646.

-
80. Dulat, H. J., von Grumbkow, C., Baars, W., Schröder, N., Wonigeit, K., Schwinzer, R. 2000. Downregulation of human alloimmune responses by genetically engineered expressin of CD95 ligand on stimulator and target cells. *submitted to Journal of Immunology*.
81. Choi, Y. W., B. Kotzin, L. Herron, J. Callahan, P. Marrack, and J. Kappler. 1989. Interaction of Staphylococcus aureus toxin "superantigens" with human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A 86:8941*.
82. Porcelli, S., C. E. Yockey, M. B. Brenner, and S. P. Balk. 1993. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J Exp Med 178:1*.
83. Ferradini, L., S. Roman-Roman, J. Azocar, H. Michalaki, F. Triebel, and T. Hercend. 1991. Studies on the human T cell receptor alpha/beta variable region genes. II. Identification of four additional V beta subfamilies. *Eur J Immunol 21:935*.
84. Gress, R. E., S. I. Katz, and P. J. Lucas. 1993. Human CD8+ xenoreactive T cells mediate tissue injury in vivo. *Transplantation 56:484*.
85. Vallee, I., J. M. Guillaumin, G. Thibault, Y. Gruel, Y. Lebranchu, P. Bardos, and H. Watier. 1998. Human T lymphocyte proliferative response to resting porcine endothelial cells results from an HLA-restricted, IL-10-sensitive, indirect presentation pathway but also depends on endothelial-specific costimulatory factors. *J Immunol 161:1652*.
86. Platt, J. L., and S. Saadi. 1999. The role of complement in transplantation. *Mol Immunol 36:965*.
87. van den Bogaerde, J., R. Aspinall, M. W. Wang, N. Cary, S. Lim, L. Wright, and D. White. 1991. Induction of long-term survival of hamster heart xenografts in rats. *Transplantation 52:15*.
88. Callard, R. E., Gearing, A. J. H. 1994. *The Cytokine Facts Book*. :261.
89. Santini, S. M., P. Rizza, M. A. Logozzi, P. Sestili, G. Gherardi, R. Lande, C. Lapenta, F. Belardelli, and S. Fais. 1995. The SCID mouse reaction to human peripheral blood mononuclear leukocyte engraftment. Neutrophil recruitment induced expression of a

- wide spectrum of murine cytokines and mouse leukopoiesis, including thymic differentiation. *Transplantation* 60:1306.
90. Santini, S. M., M. Spada, S. Parlato, M. Logozzi, C. Lapenta, E. Proietti, F. Belardelli, and S. Fais. 1998. Treatment of severe combined immunodeficiency mice with anti-murine granulocyte monoclonal antibody improves human leukocyte xenotransplantation. *Transplantation* 65:416.
91. Lozupone, F., F. Luciani, M. Venditti, L. Rivoltini, S. Pupa, G. Parmiani, F. Belardelli, and S. Fais. 2000. Murine granulocytes control human tumor growth in SCID mice. *Int J Cancer* 87:569.
92. Fearon, D. T., and R. M. Locksley. 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272:50.
93. Curtsinger, J. M., C. S. Schmidt, A. Mondino, D. C. Lins, R. M. Kedl, M. K. Jenkins, and M. F. Mescher. 1999. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 162:3256.
94. Kirkiles-Smith, N. C., D. A. Tereb, R. W. Kim, J. M. McNiff, J. S. Schechner, M. I. Lorber, J. S. Pober, and G. Tellides. 2000. Human TNF can induce nonspecific inflammatory and human immune-mediated microvascular injury of pig skin xenografts in immunodeficient mouse hosts. *J Immunol* 164:6601.
95. Shreedhar, V., A. M. Moodycliffe, S. E. Ullrich, C. Bucana, M. L. Kripke, and L. Flores-Romo. 1999. Dendritic cells require T cells for functional maturation in vivo. *Immunity* 11:625.
96. Yamada, K., D. H. Sachs, and H. DerSimonian. 1995. Human anti-porcine xenogeneic T cell response. Evidence for allelic specificity of mixed leukocyte reaction and for both direct and indirect pathways of recognition. *J Immunol* 155:5249.
97. Satake, M., Kawagishi, N., Möller, E. 1993. Direct recognition of pig MHC by human T-Lymphocytes. *2nd International Congress on Xenotransplantation, Cambridge (Abstract)*.
98. Satake, M., M. Kumagai-Braesch, N. Kawagishi, and E. Moller. 1994. Xenorecognition and xenoimmunity. *Pathol Biol (Paris)* 42:209.

99. Friedman, T., A. Shimizu, R. N. Smith, R. B. Colvin, J. D. Seebach, D. H. Sachs, and J. Iacomini. 1999. Human CD4⁺ T cells mediate rejection of porcine xenografts. *J Immunol* 162:5256.
100. Friedman, T., R. N. Smith, R. B. Colvin, and J. Iacomini. 1999. A critical role for human CD4⁺ T-cells in rejection of porcine islet cell xenografts. *Diabetes* 48:2340.
101. Razi-Wolf, Z., G. J. Freeman, F. Galvin, B. Benacerraf, L. Nadler, and H. Reiser. 1992. Expression and function of the murine B7 antigen, the major costimulatory molecule expressed by peritoneal exudate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4210.
102. Coccia, M. A., and P. Brams. 1998. High titer, prostate specific antigen-specific human IgG production by hu-PBL-SCID mice immunized with antigen-mouse IgG2a complex-pulsed autologous dendritic cells. *J Immunol* 161:5772.
103. Dorling, A., and R. I. Lechler. 1998. T cell-mediated xenograft rejection: specific tolerance is probably required for long term xenograft survival. *Xenotransplantation* 5:234.
104. Lucas, P. J., G. M. Shearer, S. Neudorf, and R. E. Gress. 1990. The human antimurine xenogeneic cytotoxic response. I. Dependence on responder antigen-presenting cells. *J Immunol* 144:4548.
105. Alter, B. J., and F. H. Bach. 1990. Cellular basis of the proliferative response of human T cells to mouse xenoantigens. *J Exp Med* 171:333.
106. Benfield, M. R., J. C. Witson, B. J. Alter, and F. H. Bach. 1993. Murine APC activation in the xenogeneic MLC. *Scand J Immunol* 38:130.
107. Dorling, A., R. Binns, and R. I. Lechler. 1996. Significant primary indirect human T-cell anti-pig xenoresponses observed using immature porcine dendritic cells and SLA-class II-negative endothelial cells. *Transplant Proc* 28:654.
108. Dorling, A., G. Lombardi, R. Binns, and R. I. Lechler. 1996. Detection of primary direct and indirect human anti-porcine T cell responses using a porcine dendritic cell population. *Eur J Immunol* 26:1378.
109. Dorling, A., R. Binns, and R. I. Lechler. 1996. Direct human T-cell anti-pig xenoresponses are vigorous but significantly weaker than direct alloresponses. *Transplant Proc* 28:653.

110. Brocker, T. 1997. Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J Exp Med* 186:1223.
111. Riberdy, J. M., E. Mostaghel, and C. Doyle. 1998. Disruption of the CD4-major histocompatibility complex class II interaction blocks the development of CD4(+) T cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4493.
112. Chitilian, H. V., T. M. Laufer, K. Stenger, S. Shea, and H. Auchincloss, Jr. 1998. The strength of cell-mediated xenograft rejection in the mouse is due to the CD4+ indirect response. *Xenotransplantation* 5:93.
113. Masten, B. J., and M. F. Lipscomb. 1999. Comparison of lung dendritic cells and B cells in stimulating naive antigen-specific T cells. *J Immunol* 162:1310.
114. Aloisi, F., F. Ria, S. Columba-Cabezas, H. Hess, G. Penna, and L. Adorini. 1999. Relative efficiency of microglia, astrocytes, dendritic cells and B cells in naive CD4+ T cell priming and Th1/Th2 cell restimulation. *Eur J Immunol* 29:2705.
115. Levin, D., S. Constant, T. Pasqualini, R. Flavell, and K. Bottomly. 1993. Role of dendritic cells in the priming of CD4+ T lymphocytes to peptide antigen in vivo. *J Immunol* 151:6742.
116. Chowdhury, M. G., K. Maeda, K. Yasutomo, Y. Maekawa, A. Furukawa, M. Azuma, H. Nagasawa, and K. Himeno. 1996. Antigen-specific B cells are required for the secondary response of T cells but not for their priming. *Eur J Immunol* 26:1628.
117. Epstein, M. M., F. Di Rosa, D. Jankovic, A. Sher, and P. Matzinger. 1995. Successful T cell priming in B cell-deficient mice. *J Exp Med* 182:915.
118. Croft, M., S. B. Joseph, and K. T. Miner. 1997. Partial activation of naive CD4 T cells and tolerance induction in response to peptide presented by resting B cells. *J Immunol* 159:3257.
119. Evans, D. E., M. W. Munks, J. M. Purkerson, and D. C. Parker. 2000. Resting B lymphocytes as APC for naive T lymphocytes: dependence on CD40 ligand/CD40. *J Immunol* 164:688.
120. Howland, K. C., L. J. Ausubel, C. A. London, and A. K. Abbas. 2000. The roles of CD28 and CD40 ligand in T cell activation and tolerance. *J Immunol* 164:4465.

121. Mancina, L., F. Mariani, M. Mattei, C. Montesano, R. Placido, V. Colizzi, A. Salerno, and A. Bellavia. 1994. Analysis of the adoptive transfer of delayed hypersensitivity and T cell repertoire in severe combined immunodeficiency mice reconstituted with human lymphocytes. *Folia Biol (Praha)* 40:411.
122. Brouard, S., B. Vanhove, K. Gagne, A. Neumann, P. Douillard, A. Moreau, C. Cuturi, and J. P. Souillou. 1999. T cell repertoire alterations of vascularized xenografts. *J Immunol* 162:3367.
123. Carlsson, R., C. Martensson, S. Kalliomaki, M. Ohlin, and C. A. Borrebaeck. 1992. Human peripheral blood lymphocytes transplanted into SCID mice constitute an in vivo culture system exhibiting several parameters found in a normal humoral immune response and are a source of immunocytes for the production of human monoclonal antibodies. *J Immunol* 148:1065.
124. Agematsu, K., T. Kobata, K. Sugita, T. Hirose, S. F. Schlossman, and C. Morimoto. 1995. Direct cellular communications between CD45RO and CD45RA T cell subsets via CD27/CD70. *J Immunol* 154:3627.
125. Jeannin, P., N. Herbault, Y. Delneste, G. Magistrelli, S. Lecoanet-Henchoz, G. Caron, J. P. Aubry, and J. Y. Bonnefoy. 1999. Human effector memory T cells express CD86: a functional role in naive T cell priming. *J Immunol* 162:2044.
126. Bode, U., C. Duda, F. Weidner, M. Rodriguez-Palmero, K. Wonigeit, R. Pabst, and J. Westermann. 1999. Activated T cells enter rat lymph nodes and Peyer's patches via high endothelial venules: survival by tissue-specific proliferation and preferential exit of CD8+ T cell progeny. *Eur J Immunol* 29:1487.
127. Macatonia, S. E., T. M. Doherty, S. C. Knight, and A. O'Garra. 1993. Differential effect of IL-10 on dendritic cell-induced T cell proliferation and IFN-gamma production. *J Immunol* 150:3755.
128. Iezzi, G., E. Scotet, D. Scheidegger, and A. Lanzavecchia. 1999. The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization. *Eur J Immunol* 29:4092.
129. Sasama, J., B. Vyas, M. Vukmanovic-Stejic, and D. M. Kemeny. 1998. Effect of IL-4, IFN-gamma and IL-12 on cytokine production from human CD45RA and CD45RO CD4 T cell precursors. *Int Arch Allergy Immunol* 117:255.

130. Tao, X., S. Constant, P. Jorritsma, and K. Bottomly. 1997. Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4⁺ T cell differentiation. *J Immunol* 159:5956.
131. Macatonia, S. E., N. A. Hosken, M. Litton, P. Vieira, C. S. Hsieh, J. A. Culpepper, M. Wysocka, G. Trinchieri, K. M. Murphy, and A. O'Garra. 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells. *J Immunol* 154:5071.
132. Ria, F., G. Penna, and L. Adorini. 1998. Th1 cells induce and Th2 inhibit antigen-dependent IL-12 secretion by dendritic cells. *Eur J Immunol* 28:2003.
133. Foy, T. M., M. McIlraith, S. R. Masters, J. J. Dunn, A. A. Rossini, L. D. Shultz, R. A. Hesselton, E. J. Wagar, P. E. Lipsky, R. J. Noelle, and D. L. Greiner. 1998. Blockade of CD40-CD154 interferes with human T cell engraftment in scid mice. *Cell Transplant* 7:25.
134. Liu, Z., K. Geboes, S. Colpaert, L. Overbergh, C. Mathieu, H. Heremans, M. de Boer, L. Boon, G. D'Haens, P. Rutgeerts, and J. L. Ceuppens. 2000. Prevention of experimental colitis in SCID mice reconstituted with CD45RB^{high} CD4⁺ T cells by blocking the CD40-CD154 interactions. *J Immunol* 164:6005.
135. Bonecchi, R., G. Bianchi, P. P. Bordignon, D. D'Ambrosio, R. Lang, A. Borsatti, S. Sozzani, P. Allavena, P. A. Gray, A. Mantovani, and F. Sinigaglia. 1998. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 187:129.
136. Annunziato, F., R. Manetti, L. Cosmi, G. Galli, C. H. Heusser, S. Romagnani, and E. Maggi. 1997. Opposite role for interleukin-4 and interferon-gamma on CD30 and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) expression by activated naive T cells. *Eur J Immunol* 27:2239.
137. Nickerson, P., J. Steiger, X. X. Zheng, A. W. Steele, W. Steurer, P. Roy-Chaudhury, and T. B. Strom. 1997. Manipulation of cytokine networks in transplantation: false hope or realistic opportunity for tolerance? *Transplantation* 63:489.
138. Varadhachary, A. S., and P. Salgame. 1998. CD95 mediated T cell apoptosis and its relevance to immune deviation. *Oncogene* 17:3271.

139. Baker, S. J., and E. P. Reddy. 1998. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily [In Process Citation]. *Oncogene 17:3261*.
140. Olack, B., P. Manna, A. Jaramillo, N. Steward, C. Swanson, D. Kaesberg, N. Poindexter, T. Howard, and T. Mohanakumar. 2000. Indirect recognition of porcine swine leukocyte Ag class I molecules expressed on islets by human CD4+ T lymphocytes. *J Immunol 165:1294*.
141. Mariani, S. M., B. Matiba, E. A. Armandola, and P. H. Krammer. 1994. The APO-1/Fas (CD95) receptor is expressed in homozygous MRL/lpr mice. *Eur J Immunol 24:3119*.
142. Lucien, J., M. Shimada, S. Watzka, M. Ogiwara, I. Brockhausen, J. Sandhu, and J. G. Coles. 2000. Human serum induces apoptosis of xenogenic cardiomyocytes in vivo and in vitro [In Process Citation]. *Xenotransplantation 7:21*.
143. Sallusto, F., A. Lanzavecchia, and C. R. Mackay. 1998. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today 19:568*.
144. Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions [see comments]. *Nature 401:708*.
145. Randolph, D. A., G. Huang, C. J. Carruthers, L. E. Bromley, and D. D. Chaplin. 1999. The role of CCR7 in TH1 and TH2 cell localization and delivery of B cell help in vivo. *Science 286:2159*.
146. Murphy, W. J., K. C. Conlon, T. J. Sayers, R. H. Wiltout, T. C. Back, J. R. Ortaldo, and D. L. Longo. 1993. Engraftment and activity of anti-CD3-activated human peripheral blood lymphocytes transferred into mice with severe combined immune deficiency. *J Immunol 150:3634*.
147. Olive, C., C. Cheung, and M. C. Falk. 1998. T cell engraftment in lymphoid tissues of human peripheral blood lymphocyte reconstituted SCID mice with or without prior activation of cells. *Immunol Cell Biol 76:520*.
148. Schiltz, P. M., R. C. Giorno, and H. N. Claman. 1994. Increased ICAM-1 expression in the early stages of murine chronic graft-versus-host disease. *Clin Immunol Immunopathol 71:136*.

149. Simmons, D. L. 1995. The role of ICAM expression in immunity and disease. *Cancer Surv* 24:141.
150. van Den Engel, N. K., E. Heidenthal, A. Vinke, H. Kolb, and S. Martin. 2000. Circulating forms of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in mice lacking membranous ICAM-1. *Blood* 95:1350.
151. Kunkel, E. J., U. Jung, D. C. Bullard, K. E. Norman, B. A. Wolitzky, D. Vestweber, A. L. Beaudet, and K. Ley. 1996. Absence of trauma-induced leukocyte rolling in mice deficient in both P- selectin and intercellular adhesion molecule 1. *J Exp Med* 183:57.
152. Kunkel, E. J., J. L. Dunne, and K. Ley. 2000. Leukocyte arrest during cytokine-dependent inflammation in vivo. *J Immunol* 164:3301.
153. Xu, H., I. L. Tong, A. R. De Fougères, and T. A. Springer. 1992. Isolation, characterization, and expression of mouse ICAM-2 complementary and genomic DNA. *J Immunol* 149:2650.
154. Xu, H., J. K. Bickford, E. Luther, C. Carpenito, F. Takei, and T. A. Springer. 1996. Characterization of murine intercellular adhesion molecule-2. *J Immunol* 156:4909.
155. de Fougères, A. R., L. B. Klickstein, and T. A. Springer. 1993. Cloning and expression of intercellular adhesion molecule 3 reveals strong homology to other immunoglobulin family counter-receptors for lymphocyte function-associated antigen 1. *J Exp Med* 177:1187.
156. Stocker, C. J., K. L. Sugars, O. A. Harari, R. C. Landis, B. J. Morley, and D. O. Haskard. 2000. TNF-alpha, IL-4, and IFN-gamma regulate differential expression of P- and E-selectin expression by porcine aortic endothelial cells. *J Immunol* 164:3309.
157. Doerschuk, C. M., W. M. Quinlan, N. A. Doyle, D. C. Bullard, D. Vestweber, M. L. Jones, F. Takei, P. A. Ward, and A. L. Beaudet. 1996. The role of P-selectin and ICAM-1 in acute lung injury as determined using blocking antibodies and mutant mice. *J Immunol* 157:4609.
158. Bullard, D. C., E. J. Kunkel, H. Kubo, M. J. Hicks, I. Lorenzo, N. A. Doyle, C. M. Doerschuk, K. Ley, and A. L. Beaudet. 1996. Infectious susceptibility and severe

- deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *J Exp Med* 183:2329.
159. Steeber, D. A., M. A. Campbell, A. Basit, K. Ley, and T. F. Tedder. 1998. Optimal selectin-mediated rolling of leukocytes during inflammation in vivo requires intercellular adhesion molecule-1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7562.
160. Kunkel, E. J., J. E. Chomas, and K. Ley. 1998. Role of primary and secondary capture for leukocyte accumulation in vivo. *Circ Res* 82:30.
161. Tu, L., A. Chen, M. D. Delahunty, K. L. Moore, S. R. Watson, R. P. McEver, and T. F. Tedder. 1996. L-selectin binds to P-selectin glycoprotein ligand-1 on leukocytes: interactions between the lectin, epidermal growth factor, and consensus repeat domains of the selectins determine ligand binding specificity. *J Immunol* 157:3995.
162. Moore, K. L., K. D. Patel, R. E. Bruehl, F. Li, D. A. Johnson, H. S. Lichenstein, R. D. Cummings, D. F. Bainton, and R. P. McEver. 1995. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol* 128:661.
163. Robinson, L. A., L. Tu, D. A. Steeber, O. Preis, J. L. Platt, and T. F. Tedder. 1998. The role of adhesion molecules in human leukocyte attachment to porcine vascular endothelium: implications for xenotransplantation. *J Immunol* 161:6931.
164. Jung, U., and K. Ley. 1999. Mice lacking two or all three selectins demonstrate overlapping and distinct functions for each selectin. *J Immunol* 162:6755.
165. Beyaert, R., and W. Fiers. 1994. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. What we do understand and what we do not. *FEBS Lett* 340:9.
166. Förster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Müller, I., Wolf, E., Lipp, M. 1999. CCR7 Coordinates the Primary Immune Response by Establishing Functional Microenvironments in Secondary Lymphoid Organs. *Cell* 99:23 .
167. Sawada, T., P. A. DellaPelle, J. D. Seebach, D. H. Sachs, R. B. Colvin, and J. Iacomini. 1997. Human cell-mediated rejection of porcine xenografts in an immunodeficient mouse model. *Transplantation* 63:1331.

7 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Ebensen, Thomas
geboren am	27.12.1965
in	Gehrden
Familienstand	ledig
Konfession	katholisch
Staatsangehörigkeit	deutsch
Name des Vaters	Werner Ebensen
Name der Mutter	Bärbel Ebensen, geb. Kastner

Schulbildung:

1972-1976	Eichendorffschule
1976-1985	St. Ursula Schule
14.06.1985	Abitur

Wehrdienst:

07.1985-09.1986	4. Panzerartilleriebataillon 35
-----------------	---------------------------------

Berufsausbildung und Tätigkeiten:

01.1987-01.1989	Kaufmann im Groß- und Außenhandel ES Scheckel Büroelektronik und Computersysteme
09.01.1989	Abschluß mit Auszeichnung
01.1989-09.1989	Vertriebsbeauftragter für Hard- und Software Lösungen
10.1991-10.1995	Studentische Hilfskraft bei der Interessengemeinschaft für norddeutsche Grundwasserwerke e.V.
06.1993-08.1993	Studienarbeit bei der Stadtwerke Hannover AG „Biofilmstrukturen in Einrichtungen der Trinkwasserinstallationen“

Studium:

- 10.1989-10.1991 Grundstudium im Fach Biologie mit dem Studienziel
Diplom an der Georg-August-Universität in Göttingen
- 16.10.1991 Vordiplom im Fach Biologie
- ab Oktober 1991 Hauptstudium
- Februar 1994 Diplomprüfung
- 02.1994-08.1994 Laborpraktikum im III. Zoologischen Institut für Entwicklungsbiologie
WS 94/95 Praktikumsbetreuung: Entwicklungsbiologisches Praktikum für
Fortgeschrittene I :
„Immunologische Charakterisierung von Kernproteinen“
- 09.1994-09.1995 Diplomarbeit im III Zoologischen Institut für Entwicklungsbiologie in
der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Großbach mit dem Thema:
„Untersuchungen zur Expression eines Suppressors der Positions-
Effekt-Variegation und eines sequenz-verwandten Gens während der
Entwicklung von *Drosophila melanogaster* mit spezifischen
Antikörpern“
- 09/1997 Projektleiterschein, Medizinische Hochschule Hannover
- 06.1996-6.2000 Anfertigung der Dissertation an der Medizinischen Hochschule
Hannover, Transplantationslabor der Klinik für Viszeral- und
Transplantationschirurgie unter Anleitung von Prof. Dr. U. Rüter,
Prof. Dr. H. J. Hedrich und Dr. K. Wonigeit
- 16.10.2000 Abgabe der Dissertation
- 14.11.2000 Tag der Promotion

Hannover, den 18.12.00

Thomas Ebensen

8 Bisherige wissenschaftliche Tätigkeit

Publizierte Abstracts:

Xenogeneic graft-versus-host-disease in the SCID-hu model. Reduced susceptibility of hosts lacking ICAM1 expression

T. Ebensen, B. Volkmann, H.J. Hedrich, U. Rüther and K. Wonigeit
Medizinische Hochschule Hannover, *Immunobiology*, Volume 197, Number 2-4, September 1997, 258

Human CD4⁺ T cells able to induce xenogeneic GvHD in *scid* mice are recruited from the CD45RA⁺R0⁻ subset

T. Ebensen, J. Hundrieser, H.J. Hedrich, U. Rüther and K. Wonigeit,
Medizinische Hochschule Hannover, *Immunobiology*, Volume 200, Number 3-5, September 1999, 482

Vorträge und Posterpräsentationen

Induktion einer letalen xenogenen GvH-Reaktion in der *scid*-Maus durch humane T-Zellen

K. Wonigeit, J. Hundrieser, T. Ebensen, U. Kyas, H.J. Hedrich und U. Rüther
Symposium Xenotransplantation, Schloß Rauischholzhausen, 24. und 25.03.1997 (Vortrag)

Xenogeneic graft-versus-host-disease in the SCID-hu model. Reduced susceptibility of hosts lacking ICAM1 expression

T. Ebensen, B. Volkmann, H.J. Hedrich, U. Rüther and K. Wonigeit
28th Annual meeting of the Deutsche Gesellschaft für Immunologie, September 24-27, 1997, Universität Würzburg (Vortrag / Poster)

Funktionsanalyse von ICAM1 in der Pathogenese der xenogenen GvH-Krankheit im SCIDHu-Modell

T. Ebensen, H.J. Hedrich, U. Rüther und K. Wonigeit
Kolloquium des Sonderforschungsbereiches „Immunreaktionen und Pathomechanismen bei Organtransplantation“ (SFB265), 1.12.1997 (Vortrag)

Diversity of the human T cell response to discordant xenoantigens of the mouse. Studies in a xenogeneic GvH model

J. Hundrieser, T. Ebensen, H.J. Hedrich, U. Rüther and K. Wonigeit
Current state and Perspectives of Organ Transplantation – A Symposium Dedicated to Rudolf Pichlmayr, SFB 265, Medizinische Hochschule, Hannover, 30.-31.03.1998 (Poster)

Xenogeneic Graft-versus-Host disease in *scid*-mice inoculated with human CD4⁺ T cells. Reduced susceptibility of ICAM1 deficient recipients

T. Ebensen, B. Volkmann, H.J. Hedrich, U. Rüther and K. Wonigeit

Current state and Perspectives of Organ Transplantation – A Symposium Dedicated to Rudolf Pichlmayr, SFB 265, Medizinische Hochschule, Hannover, 30.-31.03.1998 (Poster)

Xenogeneic GvH Disease in the human to mouse system. Studies on the diversity of the human reactive CD4⁺ T cell population

J. Hundrieser, T. Ebensen, H.J. Hedrich, U. Rüther and K. Wonigeit

17. World Congress of the Transplantation Society, Montreal, 12.-17.07.1998 (Poster)

Induktion einer xenogenen Graft-versus-Host-Erkrankung in C.B-17-*scid*-Mäusen durch Injektion naiver humaner CD4⁺ Lymphozyten

T. Ebensen, B. Volkmann, H.J. Hedrich, U. Rüther and K. Wonigeit

Symposium Xenotransplantation, Schloß Rauischholzhausen, 26. und 27. 09.1998 (Vortrag)

Diversität der humanen T-Zellantwort gegen diskordante Xenoantigene. Untersuchung im Modell der xenogenen GvH-Krankheit im System Mensch gegen Maus

J. Hundrieser, T. Ebensen, H.J. Hedrich, U. Rüther and K. Wonigeit

Symposium Xenotransplantation, Schloß Rauischholzhausen, 26. und 27.09.1998 (Vortrag)

Human CD4⁺ T cells able to induce xenogeneic GvHD in *scid* mice are recruited from the CD45RA⁺R0⁻ subset

T. Ebensen, J. Hundrieser, H.J. Hedrich, U. Rüther and K. Wonigeit

30th Annual meeting of the Deutsche Gesellschaft für Immunologie, 29.09.- 02.10.1999, Medizinische Hochschule, Hannover (Poster)

Induction of xenogeneic GvHD in *scid* mice by human T cells. Essential role of CD4⁺CD45RA⁺ T cells and analysis of clonal heterogeneity at the effector cell level

K. Wonigeit, T. Ebensen, J. Hundrieser, R. Schwitzer, H.J. Hedrich and U. Rüther

18. International Congress of the Transplantation Society, Rome, 27.08. – 01.09.2000 (Poster)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. J. Klempnauer danke ich für die Bereitstellung des ausgezeichnet ausgestatteten Arbeitsplatzes im Transplantationslabor der Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie und für die inhaltlich und arbeitstechnisch sehr interessante Fragestellung.

Herrn Prof. Dr. W. Müller möchte ich für die Bereitschaft, das Referat zu übernehmen und die hilfreiche Unterstützung danken.

Herrn Prof. Dr. M. Martin danke ich für die Übernahme des Korreferates und für die sehr nützlichen Anregungen zu konzeptionellen Fragestellungen dieser Arbeit. Seine Denkanstöße trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Für die Diskussionsbereitschaft über grundsätzliche Aspekte der Xenotransplantation und das Interesse bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich bei Herrn Dr. K. Wonigeit und Herrn Prof. Dr. U. Rüther bedanken. Bei Herrn Prof. Dr. H. J. Hedrich bedanke ich mich besonders herzlich für die engagierten Diskussionen und die stets weiterführende Kritik.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Herrn Dr. B. Bortfeldt, Herrn Dr. H. Aselmann und Frau A. Kiefeldt für ihren fachlichen Rat bei der praktischen Durchführung der Experimente und für die hilfreichen Diskussionen. Den Mitarbeitern des Transplantationslabors und dem Institut für Versuchstierkunde, allen voran Frau B. Volkmann und Herrn M. Meyer, möchte ich für ihre freundliche Unterstützung, die fundierten Ratschläge und die angenehme und motivierende Arbeitsatmosphäre danken.

Herrn Dr. J. Hundrieser danke ich besonders für die praktische Einführung in die RT-PCR-Technik und seine stete Diskussionsbereitschaft. Bei Herrn Dr. H. Dulat und Herrn Prof. Dr. R. Schwinzer möchte ich mich für die Bereitstellung der Transfektanten der 293Nierenzelllinie und für ihre Diskussionsbereitschaft bedanken. Mein Dank gilt außerdem Frau Dr. Bode und Prof. Dr. J. Westermann (Institut für Anatomie der MHH) für die methodische Unterstützung bei den immunhistologischen Zweifachfärbungen und die hilfreichen Diskussionen.

Weiterhin möchte ich mich bei meiner Familie, vor allem aber bei Inga und Marianne Paulsen bedanken, die durch ihre persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des B12-Projektes des Sonderforschungsbereiches 265 „Immunreaktionen und Pathomechanismen bei Organtransplantation“ an der Medizinischen Hochschule Hannover durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover eingereichte Dissertation mit dem Titel

Das SCIDHu-Tiermodell als Beispiel für eine
diskordante xenogene Transplantationssituation:
Untersuchungen zur Rolle humaner T-Lymphozyten
in der Abstoßungsreaktion

im Institut für Molekularbiologie, in der Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie und im Institut für Versuchstierkunde der Medizinischen Hochschule Hannover unter Leitung von Herrn Prof. Dr. U. Rüther, Herrn Dr. K. Wonigeit und Herrn Prof. Dr. H. J. Hedrich selbstständig ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner anderen in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch wurde diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Hannover, den