

Monoklonale Antikörper zur Modulation der humanen T-Zellreaktivität gegen porcines Xenoantigen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr.rer.nat

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biol. Tanja Bedke

geboren am 11.11.1974, in Westerstede

2006

Referent: Prof. Dr. W. Müller

Korreferent: Prof. Dr. R. Schwinzer

Tag der Promotion: 14.07.2006

Abstract

Human T cells can effectively be activated by porcine antigen presenting cells (APC) *in vitro* reflecting functional interactions between porcine MHC molecules and the human T cell receptor (“signal 1” of T cell activation) and also between porcine and human costimulatory molecules (“signal 2” of T cell activation). Blocking of these interactions by porcine-specific monoclonal antibodies (mAb) should selectively reduce the reactivity of recipient T cells to the xenograft without affecting responses directed to nominal antigens. To evaluate this concept, influences of mAb to pig stimulatory cells on their capacity to activate human T cells *in vitro* were studied.

Blocking of „signal 1“ inducing interactions by mAb directed to porcine MHC class-II molecules and “signal 2” by anti-porcine CD40 and CD80/86 mAb resulted in significantly reduced human anti-porcine T cell responses. The tested mAb had no effect on human T cell activation induced by alloantigen or mitogens. Since porcine MHC class-II, CD40, and CD80/86 molecules were expressed on typical APCs (e.g. B cells, monocytes) but also on endothelial cells, usage of these mAb for immunomodulation might be limited. Therefore, mAb directed to pig CD45 molecules, that are exclusively expressed on leukocytes, were tested for their capacity to reduce human anti porcine T cell reactivity. Binding of CD45RA mAb induced intracellular signalling processes in pig stimulatory cells and reduced expression of MHC class-II and CD40 molecules. Human T cell proliferation was reduced by 50 % after stimulation by anti-CD45RA mAb-treated stimulatory cells, and was accompanied by significant reduced production of Th1 cytokines IFN- γ und TNF- α .

These data suggest that mAb to porcine CD45 molecules might be interesting reagents for the modulation of human anti-porcine T cell responses without affecting the endothelium of the graft. Since tolerogenic T cell responses are often associated with reduced levels of Th1 cytokines, CD45 mAb-treated porcine APCs may promote tolerogenic T cell responses after pig to human xenotransplantation.

Keywords: xenotransplantation, T cell activation, immunomodulation, CD45

Zusammenfassung

Humane T-Zellen lassen sich *in vitro* effektiv durch antigenpräsentierende Zellen (APC) des Schweins aktivieren. Dies weist darauf hin, daß funktionelle Interaktionen sowohl zwischen porcinen MHC Molekülen und dem humanen T-Zell-Rezeptor („Signal 1“ der T-Zellaktivierung) als auch zwischen porcinen kostimulatorischen Molekülen (z.B. CD40, CD80/86) und den zugehörigen Liganden auf humanen T-Zellen („Signal 2“ der T-Zellaktivierung) möglich sind. Die Blockade dieser Interaktionen mittels Spezies-spezifischer monoklonaler Antikörper (mAk) gegen die porcinen Moleküle sollte im Falle einer klinischen Xenotransplantation selektiv die T-Zellreaktivität des Empfängers gegen das Transplantat vermindern, ohne dessen Reaktion gegen nominelles Antigen zu beeinträchtigen. Um dieses Konzept modellhaft zu überprüfen, wurde untersucht, welche Auswirkungen die Bindung anti-porziner Antikörper an Stimulatorzellen des Schweins auf deren Fähigkeit hat, humane T-Zellen *in vitro* zu aktivieren.

Eine Blockade von „Signal 1“-erzeugenden Interaktionen durch mAk gegen porcine MHC Klasse-II Moleküle und von „Signal 2“-liefernden Bindungen durch anti-porcine CD40 und CD80/86 mAk führte zu einer markanten Verminderung der humanen T-Zellreaktivität gegen porcines Xenoantigen. T-Zellreaktionen gegen Alloantigen und Mitogene wurden durch diese Reagenzien nicht beeinträchtigt. Da porcine MHC Klasse-II, CD40 und CD80/86 Moleküle nicht nur auf typischen APCs (z.B. B-Zellen, Monozyten) sondern auch auf Endothelzellen nachgewiesen wurden, sind sie als Zielstrukturen für eine Antikörper-vermittelte Immunmodulation nur bedingt geeignet. Es wurden daher ebenfalls die Wirkungen von Antikörpern gegen porcine CD45 Moleküle getestet, die ausschließlich auf Leukozyten exprimiert werden. Die Bindung insbesondere von CD45RA mAk an porcine Stimulatorzellen löste intrazelluläre Signalprozesse aus und reduzierte die Expressionsdichte von MHC Klasse-II und CD40 Molekülen. Humane T-Zellen reagierten auf anti-CD45 mAk-behandelte Stimulatorzellen mit bis zu 50 % reduzierter Proliferation, die mit einer stark verminderten Produktion der Th1 Zytokine IFN- γ und TNF- α einherging.

Aus diesen Daten wird der Schluß gezogen, daß sich CD45 Antikörper für eine Immunmodulation der humanen anti-porzinen T-Zellreaktivität eignen könnten, ohne daß es zur Schädigung des Transplantatendothels kommen sollte. Da tolerogene T-Zellantworten häufig von einer verminderten Th1 Zytokinproduktion begleitet werden, ist darüber hinaus zu diskutieren, ob CD45 mAk-behandelte porcine APCs die Induktion tolerogener T-Zellantworten fördern können.

Schlafworte: Xenotransplantation, T-Zellaktivierung, Immunmodulation, CD45

Inhaltsverzeichnis

ABSTRACT.....	I
ZUSAMMENFASSUNG.....	II
INHALTSVERZEICHNIS.....	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 PROBLEMSTELLUNG	1
1.2 ABSTOßUNGSMECHANISMEN NACH EINER XENOTRANSPLANTATION.....	3
1.3 T-ZELL-VERMITTELTE IMMUNITÄT NACH XENOTRANSPLANTATION	6
1.3.1 Der direkte Weg der T-Zellaktivierung.....	7
1.3.2 Der indirekte Weg der T-Zellaktivierung	8
1.4 MECHANISMEN ZUR INDUKTION VON TRANSPLANTAT-TOLERANZ	9
1.5 ANTIKÖRPER-VERMITTELTE INDUKTION VON TOLERANZ NACH TRANSPLANTATION....	11
1.5.1 Induktion von Toleranz nach Blockade kostimulatorischer Rezeptor:Ligand Interaktionen	11
1.5.2 Induktion von Toleranz nach Manipulation von CD45 Molekülen.....	13
2 MATERIALIEN	16
2.1 CHEMIKALIEN.....	16
2.2 GERÄTE	19
2.3 VERBRAUCHSMATERIAL	20
2.4 KITS UND SUBSTRATE.....	22
2.5 ANTIKÖRPER.....	22
2.5.1 human-spezifische Antikörper	22
2.5.2 porzin-spezifische Antikörper	24
2.5.3 kreuzreaktive Antikörper und Reagenzien.....	28
2.5.4 Ratten-spezifische Antikörper	29
2.5.5 Sekundärantikörper und -reagenzien	29
3 METHODEN	32
3.1 ZELLEN UND MEDIEN	32
3.1.1 Zellen	32
3.1.2 Medien und Kultivierungsbedingungen	32
3.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität	33
3.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	33

3.2	ISOLIERUNG VON ZELLPOPULATIONEN.....	34
3.2.1	Isolierung humaner peripherer Blut-Leukozyten aus Leukotrap®-Filtern	34
3.2.2	Ficoll-Separation mononukleärer Zellen aus Spenderblut.....	34
3.2.3	Isolierung humaner T-Lymphozyten aus PBMC mittels magnetischer Zellsortierung (MACS).....	35
3.2.4	Isolierung primärer Endothelzellen des Schweins	36
3.3	HERSTELLUNG UND MARKIERUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER	37
3.3.1	Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Hybridom-Kulturüberständen	37
3.3.2	Proteinbestimmung nach Bradford	38
3.3.3	Floureszei- und Biotinmarkierung aufgereinigter monoklonaler Antikörper	38
3.4	STIMULATION VON LYMPHOZYTEN.....	40
3.4.1	Antikörper-Beladung von Schweinelymphozyten	40
3.4.2	Gemischte Lymphozytenkultur (MLC)	41
3.5	BESTIMMUNG DER PROLIFERATION	41
3.6	NACHWEIS VON ZYTOTOXISCHEN EFFEKTORZELLEN MITTELS ⁵¹ CR-FREISETZUNGSTESTS.....	42
3.7	DURCHFLUßZYTOMETRISCHE ANALYTIK.....	43
3.7.1	Ein-Farbfluoreszenzanalyse	44
3.7.2	Zwei-Farbfluoreszenzanalyse	44
3.7.3	Bestimmung der Zytokinkonzentration aus dem Kulturüberstand	45
3.7.4	Messung des intrazellulären Ca ²⁺ -Spiegels	46
3.8	IMMUNHISTOLOGISCHE FÄRBUNG VON ZELLOBERFLÄCHENMOLEKÜLEN IN GEFRIERSCHNITTEN	47
3.9	INDUKTION HOMOTYPISCHER LYMPHOZYTENAGGREGATE.....	48
3.10	LYSE VON SCHWEINELYMPHOZYTEN	49
3.11	POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE UNTER DENATURIERENDEN BEDINGUNGEN MIT SDS (SDS-PAGE).....	50
3.12	WESTERNBLOT	51
3.12.1	Proteintransfer auf eine Polyvenylenfluorid-Membran (PVDF-Membran).	51
3.12.2	Proteinnachweis mittels Ponceau-S-Lösung.....	51
3.12.3	Proteinnachweis mittels verstärkter Chemilumineszenz-Reaktion (ECL)	52
3.12.4	„Strippen“ der PVDF-Membran	53
3.13	ANALYSE DER GENEXPRESSION	54
3.13.2	Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (PCR)	55
3.13.3	Auftrennung von cDNA-Fragmenten durch Agarosegel-Elektrophorese	58
3.14	STATISTIK.....	59

4	ERGEBNISSE	60
4.1	INDUKTION DER T-ZELLAKTIVIERUNG DURCH HUMANE UND PORZINE LYMPHOZYTEN .	60
4.1.1	Proliferation humaner T-Zellen nach allogener und xenogener Stimulation .	60
4.1.2	Analyse von Effektorfunktionen nach T-Zellstimulation durch Xenoantigen .	65
4.1.2.1	Zytokinexpression nach allogener und xenogener Stimulation	65
4.1.2.2	Bildung zytotoxischer Effektorzellen	67
4.2	CHARAKTERISIERUNG VON T-ZELLANTWORTEN NACH EINER ANTIKÖRPER- VERMITTELTEN BLOCKADE PORZINER ZELLOBERFLÄCHENMOLEKÜLE	69
4.2.1	Reaktionsmuster der Reagenzien auf porzinen und humanen Lymphozyten	69
4.2.2	Antikörper-vermittelte Blockade von „Signal 1“-erzeugenden Interaktionen.	70
4.2.3	Antikörper-vermittelte Blockade von „Signal 2“-erzeugenden Interaktionen.	74
4.2.4	Expressionsmuster immunmodulatorisch interessanter Zielmoleküle auf porzinen Endothelzellen	75
4.3	IMMUNMODULATION XENOGENER T-ZELLANTWORTEN DURCH PORZIN-SPEZIFISCHE CD45 ANTIKÖRPER.....	78
4.3.1	Reaktionsmuster von anti-porzinen CD45 Antikörpern auf porzinen und humanen Lymphozyten	78
4.3.2	Modulation der Proliferation durch porzin-spezifische CD45 Antikörper.....	81
4.3.3	CD45 Antikörper-vermittelte Regulation der humanen Zytokinproduktion....	88
4.4	CD45RA MAK-VERMITTELTE MODULATION DER STIMULATORISCHEN KAPAZITÄT PORZINER LYMPHOZYTEN	92
4.4.1	Einfluß von MIL13 auf die Induktion früher Aktivierungsprozesse in porzinen Lymphozyten	92
4.4.2	Einfluß von MIL13 auf die Expression porziner Zelloberflächenmoleküle	97
5	DISKUSSION	104
5.1	INDUKTION HUMANER T-ZELLANTWORTEN DURCH PORZINES XENOANTIGEN	105
5.2	MODULATION HUMANER T-ZELLANTWORTEN DURCH ANTIKÖRPER GEGEN PORZINE ZELLOBERFLÄCHENMOLEKÜLE.....	108
5.3	WIRKMECHANISMEN DES PORZIN-SPEZIFISCHEN CD45RA ANTIKÖRPERS MIL13...	114
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	122
7	LITERATUR	124
	BISHERIGE WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT.....	136
	LEBENS LAUF.....	139
	DANKSAGUNG.....	140

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
APC	antigenpräsentierende Zellen (<i>antigen presenting cell</i>)
APS	Ammoniumperoxydisulfat
bio	biotinyliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
$[Ca^{2+}]_i$	Konzentration freier Ca^{2+} -Ionen im Cytosol
CD	exprimierte Differenzierungsstruktur auf Zellen (<i>Cluster of Differentiation</i>)
Ci	Curie
ConA	Concanavalin A
cpm	counts per minute/ Zählimpuls pro Minute
d	Tag (day)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
et al.	und andere
FACS	Durchflußzytometer (<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>)
Fc	leicht zu kristallisierendes Antikörperfragment (<i>fragment cristallizable</i>)
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fluo-3	Fluo-3-Acetoxymethylester
g	Erdbeschleunigung (<i>gravity</i>)
G α M	Ziege anti-Maus Antikörper (<i>goat anti-mouse</i>)
h	Stunde (<i>hour</i>)
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure

HLA	humaner Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>human leukocyte antigen</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
KM	Kulturmedium
log	Logarithmus
MACS	Magnetische Zellsortierung (<i>Magnetic Cell Sorting</i>)
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NMS	normales Mausserum
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytoämagglutinin
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription mit anschließender Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
[³ H]-TdR	Tritiummarkiertes Thymidin

Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TcR	T-Zellrezeptor
U	Unit/Einheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
V	Volt
w/v	Masse/Volumen
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

Der Mangel an geeigneten Spenderorganen stellt ein bedeutendes Hindernis für die Weiterentwicklung der klinischen Transplantation dar. Diese Problematik könnte durch die Verwendung tierischer anstatt menschlicher Organe überwunden werden, wobei das Schwein aus verschiedenen Gründen als die am besten geeignete Spenderspezies angesehen wird. Aufgrund der vielfältigen immunologischen Hürden, die in einer derartigen diskordanten Spezieskombination zu überwinden sind, galt die Xenotransplantation lange Zeit als nicht realisierbar. Insbesondere durch den Einsatz molekularbiologischer Techniken haben sich jedoch Lösungsansätze ergeben, die zu einer neuen Einschätzung der Situation geführt haben. So scheint z.B. die hyperakute Abstoßung durch die transgene Expression von humanen Komplement-Regulatorenmolekülen wie CD55 oder CD59 überwindbar zu sein (1). Auch die akut-vaskuläre Abstoßung, bei der die Aktivierung von Endothelzellen durch Monozyten und NK-Zellen eine Schlüsselrolle spielt, dürfte durch das Einschleusen von protektiven Genen in Endothelzellen beherrschbar sein (2, 3). Damit treten zunehmend Fragen zu den Mechanismen der zellulären Abstoßungsreaktionen von porcinem Gewebe durch humane T-Zellen und die Möglichkeiten ihrer Kontrolle in den Vordergrund.

Es ist bekannt, daß porcine antigenpräsentierende Zellen (APCs) in der Lage sind, humane T-Zellen direkt zu aktivieren (4, 5). Entsprechend finden funktionelle Interaktionen zwischen dem humanen T-Zellrezeptor und porcinen MHC-Molekülen statt, die das „Signal 1“ der humanen T-Zellaktivierung liefern. Ferner erhalten die humanen T-Zellen ihr kostimulatorisches „Signal 2“ über funktionstüchtige Interaktionen der humanen CD28 und CD154 (CD40L) Moleküle mit den Liganden CD80/86 und CD40 auf der Seite der porcinen APCs, das für die vollständige Aktivierung der T-Zellen notwendig ist.

Ein Konzept zur Vermeidung der humanen anti-porcinen T-Zellaktivierung und zur Verhinderung der Transplantatabstoßung ist die Inhibition der kostimulatorischen

Signale durch die Blockade der entsprechenden Rezeptor:Ligand Interaktionen. In verschiedenen Tiermodellen der Allotransplantation konnte durch eine Antikörper-vermittelte Blockade kostimulatorischer CD28:CD80/86 sowie CD154:CD40 Interaktionen das Transplantatüberleben verlängert und sogar eine Transplantattoleranz erzeugt werden (6). Vor dem Hintergrund, daß diese Interaktionen in der Spezieskombination von Schwein auf Mensch ebenfalls funktionell sind, sollte eine Blockade der entsprechenden kostimulatorischen Signale auch die humane anti-porzine T-Zellaktivierung verhindern können. Im Gegensatz zur Allotransplantation bestünde nach der Xenotransplantation darüber hinaus die einzigartige Möglichkeit monoklonale Antikörper zu verabreichen, die selektiv gegen kostimulatorische Moleküle des Schweins gerichtet sind. Folglich wäre eine Immunsuppression denkbar, bei der ausschließlich T-Zellreaktionen des Empfängers gegen das Xenotransplantat verhindert werden, ohne Immunantworten des Empfängers gegen nominelles Antigen zu beeinträchtigen.

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit das modulatorische Potential porzin-spezifischer monoklonaler Antikörper (mAk) gegen verschiedene porzine Zelloberflächenmoleküle im Rahmen der *in vitro* Aktivierung humaner T-Zellen durch porzine periphere Blutlymphozyten (pPBMC) zu charakterisieren. Auf diese Weise sollte Aufschluß über die Effektivität einer Organ-spezifischen Manipulation humaner anti-porziner T-Zellaktivierungsprozesse gewonnen werden. Folgende Teilaspekte waren dabei von Interesse:

1. Charakterisierung der Reaktionsmuster humaner T-Zellen nach *in vitro* Stimulation mit Xenoantigen vom Schwein.
Es wurde gefragt, in welchem Umfang es zur Proliferation kommt, welche Zytokine produziert werden und ob es zur Ausbildung zytotoxischer Effektorfunktionen kommt.
2. Identifikation von porzinen Zielmolekülen, die für eine Antikörper-vermittelte Inhibition der humanen anti-porzinen T-Zellreaktivität geeignet sind.

Hierzu wurde untersucht, ob die Behandlung von porzinen Stimulatorzellen mit Antikörpern gegen MHC Klasse-I und -II, CD40, CD80/86 und CD45 Moleküle einen Einfluß auf deren Fähigkeit hat, humane T-Zellen zu aktivieren.

3. Analyse der Wirkmechanismen von Antikörpern, die sich für die Modulation der humanen anti-porzinen T-Zellreaktion als besonders geeignet herausgestellt haben.

Es wurde gefragt, ob die Bindung von Antikörpern an die porzinen Stimulatorzellen Konsequenzen auf molekularer und auf zellulärer Ebene hat.

Das Forschungsgebiet der Xenotransplantation erfährt derzeit einen schnellen Wissenszuwachs. Im Folgenden wird ein Überblick über den derzeitigen Kenntnisstand der zu erwartenden xenogenen Abstoßungsreaktionen und den Möglichkeiten zur Überwindung dieser gegeben, wobei der Schwerpunkt dieser Darstellung auf den Mechanismen der xenogenen T-Zellaktivierung und deren Manipulation liegt.

1.2 Abstoßungsmechanismen nach einer Xenotransplantation

Bereits seit Beginn des 20. Jahrhunderts werden Versuche unternommen, Organe zwischen unterschiedlichen Spezies zu transplantieren. Dabei zeigte sich, daß die Abstoßungsreaktionen in Abhängigkeit der gewählten Spezieskombination unterschiedlich stark ausfallen. Vor diesem Hintergrund schlug Calne eine Einteilung in konkordante (z.B. Ratte nach Maus) und diskordante (z.B. Schwein nach Mensch) Spezieskombinationen vor (7). Nach einer Xenotransplantation zwischen konkordanten Spezies wird ein Organ in einem zeitlichen Rahmen abgestoßen, der der Abstoßung eines allogenen Transplantates in einem nicht sensibilisierten Empfänger entspricht. Nach einer Xenotransplantation zwischen diskordanten Spezies treten deutlich stärkere Abstoßungsreaktionen auf, die mit denen eines sensibilisierten Organempfängers nach einer Allotransplantation vergleichbar sind. Diese deutlich stärkeren Reaktionen werden durch xenoreaktive präformierte Antikörper des Empfängers induziert, die gegen Antigene des Spenders gerichtet sind. Bei diesen Antigenen handelt es sich um

Zuckerstrukturen, insbesondere um das Disaccharid Galactosyl- $\alpha(1,3)$ -Galactose (Gal- $\alpha(1,3)$ -Gal). Dieses Molekül wird durch das Enzym $\alpha(1,3)$ -Galactosyltransferase gebildet und gebunden an porcine Adhäsionsmoleküle und andere Glykoproteine unter anderem auf porcinen Endothelzellen exprimiert (8, 9). Den „Alte Welt“ Affen und den Menschen ist die $\alpha(1,3)$ -Galactosyltransferaseaktivität dagegen aufgrund einer Mutation im Leseraster verloren gegangen und liegt als Pseudogen vor (10, 11). Humane T-Zell-unabhängige B-1-B-Zellen produzieren nach ihrer Konfrontation mit Darmbakterien, die das Gal- $\alpha(1,3)$ -Gal Epitop ebenfalls exprimieren, kontinuierlich präformierte Antikörper (12). Nach einer Xenotransplantation vaskularisierter Organe binden diese präformierten Antikörper an die Endothelzellen des Transplantates und es kommt zur Typ-1 Aktivierung dieser Zellen, die mit der Auflösung des endothelialen Verbundes einhergeht (13). Den wichtigsten Mediator der hyperakuten Abstoßung nach der Bindung der präformierten Antikörper an das Endothel stellt die Aktivierung der Komplementkaskade des Empfängers dar, die durch die porcinen Komplementregulatoren (CD46, CD55 und CD59) nicht effektiv inhibiert werden kann (14, 15). Letztendlich kommt es auf diese Weise innerhalb weniger Minuten nach der Transplantation zur Lyse der porcinen Endothelzellen und zur Zerstörung des vaskularisierten Xenotransplantates.

In den letzten Jahren wurden vielversprechende Strategien zur Überwindung der hyperakuten Organabstoßung entwickelt, die auf der Absorption der präformierten Antikörper durch Affinitätschromatographie oder durch das nicht immunogene Polymer GAS (16, 17) und der Inhibition der Komplementaktivierung des Organempfängers durch die transgene Expression humaner Komplementregulatoren auf dem porcinen Gewebe beruht (1). Mittlerweile ist es außerdem gelungen, Schweine mit einem *knock-out* in dem Gen für die $\alpha(1,3)$ -Galactosyltransferase zu generieren. In ersten *in vivo* Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Herzen und Nieren dieser Schweine, die das Gal- $\alpha(1,3)$ -Gal Epitop nicht exprimieren, nach einer klinisch anwendbaren Immunsuppression, im Primaten nicht hyperakut abgestoßen werden (18-20).

Kann die hyperakute Abstoßung überwunden werden, kommt es innerhalb weniger Tage zur akut-vaskulären Abstoßung des xenogenen vaskularisierten Organs. Hier spielt die Komplement-unabhängige porcine Endothelzellaktivierung (Typ-2 Aktivierung)

eine entscheidende Rolle, die durch die Synthese und Expression verschiedener Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle und kostimulatorischer Moleküle der Endothelzellen charakterisiert ist (21, 22). An das aktivierte Endothel können NK-Zellen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten des Empfängers binden und in das Transplantat transmigrieren. Die NK-Zellen und Monozyten können das porcine Endothel darüber hinaus aber auch direkt lysieren. Die Ursache hierfür sind molekulare Inkompatibilitäten zwischen den killerhemmenden Rezeptoren der humanen NK-Zellen und porcinen MHC Klasse-I Molekülen bei funktionellen Interaktionen zwischen den humanen killeraktivierenden Rezeptoren und ihren Liganden auf den porcinen Endothelzellen (23). Durch das Ausbleiben des inhibitorischen Signals können die NK-Zellen ihr zytotoxisches Potential entfalten, woraufhin sie ihre Zielzellen spezifisch über den Perforin/Granzym B Pfad lysieren (24). Außerdem können humane NK-Zellen und Monozyten porcine Endothelzellen über die Antikörper-abhängige Zytotoxizität (ADCC) lysieren, da die B-Zellen des Empfängers im Rahmen der akut-vaskulären Abstoßungsreaktion vermehrt xenoreaktive IgG Antikörper sezernieren, die an Gal- α (1,3)-Gal Epitope oder andere porcine Zelloberflächenantigene binden (25, 26).

Zur Überwindung der akut-vaskulären Organabstoßung ist es wichtig, das porcine Transplantat vor einem Angriff durch humane NK-Zellen zu schützen. Durch das Einschleusen verschiedener humaner HLA-Moleküle (HLA-Cw3, -E, oder -G) in porcine Endothelzellen konnte *in vitro* eine partielle Reduktion der humanen NK-Zell-Rezeptor-vermittelten Lyse dieser Zellen beobachtet werden (27-29). Derzeit wird überprüft, ob die Inhibition der NK-Zell-Rezeptor-vermittelten Lyse porciner Zielzellen durch die Herstellung transgener porciner Endothelzellen, die mehrere der wirksamen humanen HLA exprimieren, weiter gesteigert werden kann. Um die ADCC zu verhindern wird es dagegen notwendig sein, die Konzentration von xenoreaktiven IgG Antikörpern zu reduzieren, die an Zelloberflächenstrukturen auf porcinen Endothelzellen binden. Erste *in vitro* Untersuchungen mit Endothelzellen von α (1,3)-Galactosyltransferase *knock-out* Schweinen zeigen, daß diese Zellen, an die die anti-Gal- α (1,3)-Gal mAk nicht binden können, weniger effektiv von humanen NK-Zellen über die ADCC lysiert werden (30). Die NK-Zell-Rezeptor-vermittelte Lyse der Endothelzellen konnte in diesem Modell allerdings nicht verhindert werden.

Sind die hyperakute und akut-vaskuläre Abstoßung beherrschbar, werden starke zelluläre Immunantworten erwartet, die zur vollständigen Zerstörung des Transplantates führen. Derzeit ist wenig über die Mechanismen der zellulären Abstoßungsprozesse nach einer Xenotransplantation porziner vaskularisierter Organe in Primaten bekannt, da die Organe noch vor der Ausbildung der T-Effektorzellen des Empfängers abgestoßen werden. Aus Kleintiermodellen resultieren Einblicke hinsichtlich der Mechanismen, wie xenogene Organe zellulär abgestoßen werden könnten. Nach der Xenotransplantation von porzinen Inselzellen in Mäuse konnte eine starke Infiltration von Makrophagen, Neutrophilen, Eosinophilen, NK-Zellen und T-Zellen des Empfängers und eine vermehrte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine in das abgestoßene Transplantat beobachtet werden (31, 32). Für Untersuchungen der zellulären humanen Abstoßung von porzinem Gewebe wurden immundefiziente RAG^{-/-} Mäuse (*recombinase-activating gene-deficient*) herangezogen, die weder T-Zellen noch B-Zellen besitzen. Diese Tiere wurden mit humanen Lymphozyten rekonstituiert, die *ex vivo* mit porzinem Xenoantigen aktiviert worden waren. Mit Hilfe dieses Modells konnte gezeigt werden, daß aktivierte humane CD4⁺ T-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Induktion der zellulären Abstoßung porziner Inselzellen und Hauttransplantate spielen (33, 34). Im Folgenden wird auf die Mechanismen und die Manipulation der T-Zell-vermittelten Abstoßungsreaktionen fokussiert werden.

1.3 T-Zell-vermittelte Immunität nach Xenotransplantation

Für eine vollständige T-Zellaktivierung werden zwei Signale benötigt, ein Antigen-spezifisches Signal über den T-Zellrezeptor-MHC-Peptid-Komplex („Signal 1“) sowie ein kostimulatorisches Antigen-unabhängiges Signal („Signal 2“), das unter anderem über CD28 und CD154 auf den T-Zellen und ihren Liganden CD80/86 und CD40 auf den APCs induziert wird. Nach einer Transplantation können die T-Zellen des Empfängers diese Signale auf zwei Wegen erhalten, dem direkten und dem indirekten Weg der T-Zellaktivierung. Der direkte Weg beruht auf funktionsfähigen Interaktionen zwischen „Signal 1“- und „Signal 2“-induzierenden Molekülen der T-Zellen des Empfängers und ihrem Liganden auf den APCs des Spenders. Die Aktivierung der T-Zellen auf dem

indirekten Weg wird dagegen durch prozessiertes Spender-Antigen auf Selbst-MHC Molekülen des Empfängers induziert. *In vitro* Untersuchungen zeigten, daß sich humane CD4⁺ T-Zellen sowohl auf dem direkten als auch auf dem indirekten Weg sehr effektiv durch porzines Xenoantigen aktivieren lassen (5).

1.3.1 Der direkte Weg der T-Zellaktivierung

Nach der Migration der antigenpräsentierenden Zellen des Spenders aus dem Transplantat zu den lymphatischen Geweben des Empfängers, findet die T-Zellaktivierung auf dem direkten Weg in den peripheren Lymphknoten statt. Hier werden sehr wahrscheinlich xenoreaktive T-Zellen und T-Gedächtniszellen aktiviert, wie bei der direkten Präsentation von Alloantigen (35).

Aufgrund der phylogenetischen Unterschiede zwischen Mensch und Schwein galt es lange Zeit als unwahrscheinlich, daß humane T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen des Schweins auf dem direkten Weg aktiviert werden können. Mit Hilfe von gemischten Lymphozytenkulturen konnte jedoch *in vitro* gezeigt werden, daß die Stimulation humaner T-Zellen durch porzine APCs starke T-Zellantworten auf dem direkten Weg der Antigenpräsentation induziert (5). Folglich sollten die „Signal 1“- und „Signal 2“-liefernden Interaktionen zwischen den humanen T-Zellen und den antigenpräsentierenden Zellen des Schweins funktionsfähig sein. Durch die Transfektion porziner CD40, CD80 oder CD86 Moleküle in COS Zellen und humane Fibroblasten konnte gezeigt werden, daß diese porzinen Moleküle funktionsfähige kostimulatorische Interaktionen mit humanen CD154 oder CD28 Molekülen eingehen, die mit einer effektiven Aktivierung der humanen T-Zellen *in vitro* verbunden sind (4, 36, 37). Neben der wirksamen Kostimulation wurden mittlerweile eine Vielzahl weiterer Rezeptor:Ligand Interaktionen identifiziert, die zwischen Mensch und Schwein funktionstüchtig sind. So können eine Reihe von humanen Adhäsionsmolekülen mit ihren Liganden auf den porzinen Zellen interagieren, wie CD2:CD58, LFA-1:ICAM-1 sowie ICAM-2:LFA-1 und auf diese Weise zur humanen T-Zellaktivierung beitragen (38).

Diese funktionstüchtigen Interaktionen zwischen humanen und porzinen Rezeptor:Ligand Interaktionen lassen es zu, daß porzine antigenpräsentierende Zellen humane T-Zellen effektiv auf dem direkten Weg der Antigenpräsentation aktivieren. So zeigten *in vitro* Untersuchungen mit aktivierten porzinen dendritischen Zellen (DCs), die in hoher Dichte MHC Klasse-II, CD40 und CD86 Moleküle exprimieren, daß diese Zellen in der Lage sind, humane CD4⁺ T-Zellen effektiv zu aktivieren (39). Nach einer Xenotransplantation vaskularisierter Organe können darüber hinaus porzine Endothelzellen (ECs) als antigenpräsentierende Zellen dienen. So exprimieren aktivierte ECs MHC Moleküle, kostimulatorische CD40 und CD80/CD86 Moleküle sowie die Liganden für humanes LFA-1 und CD2 und weisen somit ein stimulatorisches Potential auf (40-43).

1.3.2 Der indirekte Weg der T-Zellaktivierung

Die T-Zellaktivierung über den indirekten Weg der Antigenpräsentation spielt nach dem Austausch der Spender APCs im transplantierten Organ durch die APCs des Empfängers eine entscheidende Rolle. Nach der Infiltration der APCs des Empfängers in das transplantierte Organ nehmen sie dort Antigen auf, prozessieren es und präsentieren es schließlich auf ihren MHC Klasse-II Molekülen. Anschließend wandern sie in die Lymphknoten ein, wo sie vorwiegend naive CD4⁺ T-Zellen des Empfängers aktivieren.

Nach einer Allotransplantation dienen ausschließlich Peptide von prozessierten MHC Molekülen des Spenders als Antigen zur Stimulation der T-Zellen über den indirekten Weg. In einem Xenotransplantat steht, aufgrund einer Vielzahl inkompatibler Moleküle, deutlich mehr Antigen zur Verfügung, das prozessiert und über die Selbst-MHC Moleküle präsentiert wird. Deshalb werden nach einer Xenotransplantation porziner Organe in den Menschen deutlich stärkere T-Zellantworten über die indirekte Antigenpräsentation erwartet als nach einer Allotransplantation (8). Diese Überlegung wird durch *in vitro* Analysen unterstützt, bei denen die xenogene Aktivierung humaner T-Zellen auf dem indirekten Weg der Antigenpräsentation deutlich stärker ausfiel als

nach einer allogenen Stimulation der T-Zellen (39). Auch *in vivo* konnte bei einem Vergleich der T-Zellaktivierung auf dem indirekten Weg nach einer Transplantation von Gewebe zwischen diskordanten Spezies und konkordanten Spezies gezeigt werden, daß die Menge des Xenoantigens, das von den APCs des Empfängers prozessiert und präsentiert wird, die Stärke der T-Zellaktivierung beeinflusst. So fielen die T-Zellantworten nach der Transplantation zwischen diskordanten Spezies stärker aus als zwischen konkordanten Spezies (44).

1.4 Mechanismen zur Induktion von Transplantat-Toleranz

Es ist wahrscheinlich, daß die zelluläre Abstoßung nach einer Transplantation von Schweineorganen in den Menschen, aufgrund der erwarteten Stärke der T-Zellreaktion, durch eine herkömmliche pharmakologische Immunsuppression nicht beherrschbar sein wird. Deshalb ist es von Interesse, spezifische Methoden zur Manipulation Organspezifischer T-Zellantworten zu entwickeln. Dabei gilt die Induktion von T-Zelltoleranz gegenüber dem Transplantat als besonders erstrebenswert. Als Toleranz wird eine fehlende Immunantwort gegen einzelne Antigene bei normaler Immunkompetenz bezeichnet. Dabei handelt es sich um einen natürlich vorkommenden Mechanismus, der zum Ziel hat, autoreaktive Thymozyten im Thymus (zentrale Toleranz) und potentiell autoreaktive reife T-Zellen in den lymphatischen Geweben (periphere Toleranz) zu entfernen bzw. zu inaktivieren. Nach einer Transplantation besteht die Möglichkeit, T-Zelltoleranz gegenüber dem transplantierten Gewebe künstlich zu induzieren. Dazu stehen verschiedene Mechanismen zur Verfügung, die sich zwischen einer Allotransplantation und einer Xenotransplantation nicht signifikant unterscheiden sollten, da sich die zellulären Abstoßungsreaktionen nach Allo- und Xenotransplantation in ihrem Verlauf ähneln (45).

Die Eliminierung von T-Zellen, die eine Spezifität für Transplantatantigene aufweisen, durch klonale Deletion spielt eine Schlüsselrolle bei der Induktion zentraler und peripherer Toleranz. Reaktive T-Zellen werden vor allem durch die Induktion von Apoptose deletiert. Vor diesem Hintergrund bietet die transgene Expression humaner

Moleküle der TNF-Familie auf dem porzinen Gewebe, wie TRAIL, die die Empfindlichkeit aktivierter T-Zellen für die Induktion von Apoptose steigern können, die Möglichkeit reaktive T-Zellen des Empfängers zu eliminieren (46, 47).

Die T-Zellanergie spielt bei der Induktion der peripheren Toleranz ebenfalls eine wichtige Rolle. Sie wird induziert, wenn T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor stimuliert werden, ohne ein kostimulatorisches Signal zu erhalten. Treffen diese T-Zellen erneut auf das gleiche Antigen werden sie funktionell inaktiviert und verlieren so ihre Fähigkeit zu proliferieren und IL-2 zu produzieren (48, 49). T-Zellanergie kann nach einer Blockade kostimulatorischer Rezeptor:Ligand Interaktionen durch Antikörper oder lösliche Liganden induziert werden (50).

Nach der Induktion der T-Zelltoleranz gegenüber dem Transplantat ist es notwendig, diese aufrechtzuerhalten. Dazu ist eine aktive Suppression der Immunantworten erforderlich, die durch regulatorische $CD4^+CD25^+$ T-Zellen (T_{reg}) vermittelt werden könnte. Aktivierte T_{regs} können Immunantworten von T-Effektorzellen aktiv unterdrücken, indem sie entweder direkt auf die T-Zellen einwirken oder die stimulatorische Kapazität von APCs modulieren (51). Außerdem sind sie in der Lage T-Effektorzellen in einen regulatorischen T-Zell-Phänotyp zu überführen. Dieser Mechanismus setzt die Präsentation unterschiedlicher Antigene auf derselben APC voraus und wird als „linked immunosuppression“ bezeichnet (52). Darüber hinaus ist es möglich, das suppressive Potential von T_{regs} in naive Empfänger zu transferieren (infektiöse Toleranz) (53, 54). Somit könnte eine *ex vivo* Expansion von Antigen-spezifischen T_{regs} des Organempfängers zur Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber dem Transplantat beitragen.

Bei den dargestellten Mechanismen spielen Zytokine eine bedeutende Rolle. In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Induktion von Toleranz mit einer Veränderung des Gleichgewichtes der Th1/Th2 Zytokinproduktion zugunsten von Th2 Zytokinen verbunden ist („immune deviation“) (55, 56).

1.5 Antikörper-vermittelte Induktion von Toleranz nach Transplantation

Die Möglichkeit monoklonale Antikörper zur Induktion von Toleranz nach einer Transplantation einzusetzen, wird seit vielen Jahren intensiv diskutiert. Dieser Therapieansatz ist spezifischer als die Gabe konventioneller Immunsuppressiva, da durch die Verabreichung von Antikörpern gegen bestimmte Zelloberflächenmoleküle die Möglichkeit einer selektiven Manipulation von Immunantworten durch einzelne Lymphozytenpopulationen besteht. Verschiedene Antikörper werden derzeit intensiv auf ihre Fähigkeit untersucht, das Transplantatüberleben in Klein- und Großtiermodellen zu verlängern oder befinden sich bereits in der klinischen Anwendung, wie der anti-humane CD3 mAk OKT3 (57). Im Folgenden soll ein Überblick über einen möglichen therapeutischen Einsatz von Antikörpern gegen CD40 und CD80/86 Moleküle sowie gegen CD45 Moleküle gegeben werden.

1.5.1 Induktion von Toleranz nach Blockade kostimulatorischer Rezeptor:Ligand Interaktionen

Die Blockade kostimulatorischer Rezeptor:Ligand-Interaktionen stellt eine attraktive Strategie zur Manipulation zellulärer Immunreaktionen nach einer Organtransplantation dar. Im Fokus steht hier die Antikörper-vermittelte Blockade von CD28:CD80/86 und CD40:CD154 Interaktionen, die eine vollständige Aktivierung von T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen verhindert. Fehlen diese Signale, können die T-Zellen in Anwesenheit eines funktionellen TcR:MHC-Signals in einen anergen Zustand überführt werden. Wie bereits erwähnt, stellt dieser Mechanismus eine Möglichkeit zur Toleranzinduktion nach Transplantation dar.

In Kleintiermodellen der Allotransplantation konnte gezeigt werden, daß die Blockade von CD80 und CD86 Molekülen durch spezifische Antikörper oder durch das Fusionsprotein CTLA-4-Ig, das aus der extrazellulären Domäne des kostimulatorischen T-Zellmoleküls CTLA-4 und dem konstanten Bereich eines Immunglobulins besteht, mit

einer deutlichen Verlängerung des Überlebens unterschiedlicher allogener Organe verbunden ist (58-60). Die Antikörper-vermittelte Blockade von CD154 Molekülen konnte das Überleben allogener Nieren und Herzen in Klein- und Großtiermodellen ebenfalls deutlich verlängern (6, 61). Im Primatenmodell kamen Kirk et al. (62, 63) durch den direkten Vergleich beider Strategien zu dem Schluß, daß eine einfache Therapie mit Antikörpern gegen CD154 Molekülen, im Gegensatz zu einer Therapie mit CTLA-4-Ig bzw. CD80 und CD86 Antikörpern, das Langzeitüberleben allogener Nieren induzieren kann. In diesem Modell konnte das Organüberleben nach der Blockade beider kostimulatorischer Signale im Vergleich zu der alleinigen Blockade der CD154:CD40 Interaktionen nicht weiter verlängert werden. In allogenen Kleintiermodellen wurde dagegen ausschließlich durch eine Antikörpertherapie, bei der sowohl die CD28:CD80/86 als auch die CD40:CD154 Interaktionen blockiert wurden, Toleranz gegenüber dem Transplantat erzielt (64-66).

In der Xenotransplantation bietet sich, im Gegensatz zur Allotransplantation, die Möglichkeit, die Antikörper-vermittelte Blockade der kostimulatorischen Moleküle auf den antigenpräsentierenden Zellen des Spenders und Empfängers getrennt voneinander zu analysieren. In den meisten derzeit untersuchten xenogenen Transplantationsmodellen wurde die T-Zellaktivierung durch die Bindung von Antikörpern an CD154 Moleküle der T-Zellen des Empfängers alleine oder in Kombination mit Antikörpern gegen CD80/86 Moleküle des Empfängers inhibiert. In Mausmodellen konnte auf diese Weise das Überleben humaner oder porziner Inselzellen deutlich verlängert werden (67, 68). Ferner konnte die akut-vaskuläre Abstoßung von Herzen und Nieren aus $\alpha(1,3)$ -Gal *knock-out* Schweinen mittlerweile in ersten Primatenmodellen in Anwesenheit eines kreuzreaktiven humanen CD154 Antikörpers in Kombination mit klinisch einsetzbaren Dosen Immunsuppressiva verhindert werden (69). Mit der Frage, welchen Einfluß die kostimulatorische Blockade der CD28:CD86 Interaktionen, durch Antikörper gegen CD86 Moleküle auf den APCs Spenders, auf die T-Zellaktivierung hat, beschäftigten sich Rogers et al. (70). Sie konnten in einem xenogenen Mausmodell das Überleben porziner Inselzellen durch eine derartige Organ-spezifische Immunsuppression erfolgreich verlängern. Dazu immunisierten sie zunächst Mäuse mit einem porzinen OVA-CD86-Peptid. Nachdem sie

zeigen konnten, daß die Mäuse Antikörper gegen porcine CD86 Moleküle produzierten, wurden porcine Inselzellen in die Mäuse, unter die Nierenkapsel, transplantiert. Diese Transplantate wurden in Abhängigkeit der Höhe des Antikörpertiters von den Mäusen akzeptiert.

1.5.2 Induktion von Toleranz nach Manipulation von CD45 Molekülen

CD45 ist eine Proteintyrosinphosphatase, die auf allen Leukozyten exprimiert wird. Durch alternatives Spleißen variabler Exons werden unterschiedliche CD45 Isoformen generiert, die sich ausschließlich in der extrazellulären Domäne unterscheiden. Beim Menschen können aus den drei variablen Exons A, B und C fünf CD45 Isoformen generiert werden. In verschiedenen anderen Spezies, wie adulten Schweinen, werden dagegen nur drei CD45 Isoformen exprimiert, die aus den Exons A und C hervorgehen (71). Allen Spezies ist jedoch gemeinsam, daß sie CD45 Moleküle, in Abhängigkeit ihres Aktivierungs- und Differenzierungsgrades, in komplexen Mustern aus unterschiedlichen Isoformen exprimieren. So werden auf ruhenden Zellen hochmolekulare CD45 Isoformen detektiert, die im Verlauf von Aktivierungsprozessen durch die niedermolekulare CD45R0 Isoform ersetzt werden, der die variablen Exons fehlen (72). Diese phänotypische Entwicklung geht mit einer Reihe funktioneller Veränderungen einher. CD45R0⁺ T-Zellen produzieren z.B. ein umfangreicheres Zytokinmuster als CD45RA⁺ Zellen und reagieren stärker auf eine T-Zell-Rezeptor-vermittelte Stimulation (73, 74). Im humanen Immunsystem konnte außerdem eine enge Assoziation zwischen einer Dysregulation der CD45 Isoform Expression und veränderten T-Zellreaktionen in Verbindung mit verschiedenen Erkrankungen festgestellt werden (75, 76). Dies deutet darauf hin, daß CD45 Moleküle eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Immunprozessen spielen und machen diese Moleküle zu einem attraktiven Ziel für eine Immunmanipulation. So wurden bereits CD45 Inhibitoren und monoklonale Antikörper gegen CD45 Moleküle zur Therapie von Autoimmunerkrankungen und Krebs eingesetzt (77).

In der Organtransplantation werden CD45 Moleküle ebenfalls als interessante Ziele für eine Antikörper-vermittelte Immunmanipulation zellulärer Abstoßungsreaktionen diskutiert. In Mausmodellen wurden Antikörper gegen die unterschiedlichen CD45 Isoformen auf ihre Kapazität untersucht, das Überleben allogener Organe zu verlängern. Dabei zeigte sich, daß der monoklonale Antikörper MB23G2, der ein Neuraminidase-sensitives Epitop auf CD45RB Molekülen detektiert, Toleranz gegenüber Nierentransplantaten induzieren konnte, sowie das Überleben von Inselzellen deutlich verlängerte (78-80). Untersuchungen zu den Wirkmechanismen dieses Antikörpers zeigten, daß die Bindung von MB23G2 an CD45RB Moleküle auf den CD4⁺ T-Zellen des Empfängers einen Shift in der CD45RB Expression von CD45RB^{high} nach CD45RB^{low} induziert, der mit der Induktion der CTLA-4 Expression in diesen Zellen einhergeht (81). Diese Induktion der CTLA-4 Expression spielt eine Schlüsselrolle bei der mAk-vermittelten Toleranzinduktion. So konnte das Überleben von allogenen Inselzellen in CTLA-4^{-/-} Mäusen durch die Verabreichung des CD45RB Antikörpers nicht verlängert werden (82). Es konnte kürzlich gezeigt werden, daß der Antikörper die CTLA-4 Expression bei den CD4⁺CD45RB^{low} T-Zellen transient induziert und durch weitere Gaben des Antikörpers nicht erneut induziert werden kann. Dies deutet darauf hin, daß die Wirkung des Antikörpers auf der Induktion eines regulatorischen CD4⁺ T-Zellphänotyps in der frühen Phase der zellulären Abstoßung beruht und eine langfristige Verabreichung nicht notwendig ist (83, 84).

In Kleintiermodellen der Xenotransplantation wurde der mAk MB23G2 inzwischen ebenfalls eingesetzt. In diesen Modellen bindet der Antikörper, wie in den allogenen Modellen an die CD45RB Moleküle der CD4⁺ T-Zellen des Empfängers. Auch nach der Xenotransplantation porziner Inselzellen in Mäuse war das Überleben der Transplantate mit einer verminderten Anzahl von CD45RB^{high} T-Zellen des Empfängers verbunden. Ferner konnte eine signifikante Reduktion der Th1- und Th2-Zytokinproduktion von CD4⁺ T-Zellen detektiert werden (85, 86). Das Überleben vaskularisierter Organe konnte in der Spezieskombination dagegen nur durch eine Kombination des CD45RB Antikörpers mit Cyclophosphamid verlängert werden (87). Diese kombinierte Verabreichung des Antikörpers mit einem B-Zell-Inhibitor ist nach einer Transplantation xenogener vaskularisierter Organe sehr wahrscheinlich notwendig, um die starken

humoralen Abstoßungsreaktionen zu verhindern, die nach einer Xenotransplantation auftreten. Dafür sprechen auch die Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Zhang (88), die nach der Herztransplantation von Ratte nach Maus mit einer Therapie des mAk MB23G2 und dem Immunsuppressivum LF15-0195 das Überleben von Rattenherzen in der Maus deutlich verlängern und dabei eine deutlich reduzierte Antikörperproduktion durch die B-Zellen des Empfängers nachweisen konnten.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Acrylamid, N,N'-Methylbisacrylamid (37,5:1)	Applichem, Darmstadt
Agarose, ultra rein	Gibco, Eggenheim
ϵ -Aminocapronsäure	Merck, Darmstadt
3-Amino-9-Carbazol (AEC)	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat (APS), p.a.	Sigma, Deisenhofen
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen
Biotin-x-NHS	Sigma, Deisenhofen
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	ICN Biochemicals, Cleveland, OH, USA
BSA	Serva, Heidelberg
n-Butanol	J. T. Baker, Deventer, NL
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Casein	BDH Laboratory Supplies, Poole, England
Chloroform, p.a.	J. T. Baker, Deventer, NL
Collagenase	Biochrom, Berlin
Comassie-Brilliant Blue	Serva, Heidelberg
D-Glucose	Sigma, Deisenhofen,
Dimethylformamid	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
dNTP	Promega, Mannheim
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Dulbecco's modification of Eagle's Medium (DMEM)	Cambrex, Vervies, Belgien
Endothelzell-Wachstumsfaktor (ECGF)	Roche Diagnostics, Mannheim
Essigsäure, p.a.	Merck, Darmstadt

Ethanol, p.a.	J. T. Baker, Deventer, NL
Ethylendiamintetraacetat (EDTA Tritriplex)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ficoll	Biochrom, Berlin
Fluo-3-AM	Molecular Probes, Leiden, NL
Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)	Sigma, Deisenhofen
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Fura-Red-AM	Molecular Probes, Leiden, NL
Glycerol	Merck, Darmstadt
Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Heparin (Liquemin [®])	Hoffmann-LaRoche
Hepes, p.a	Serva, Heidelberg
Hexanukleotide [pd(N) ₆]	Pharmacia, Freiburg
Immunglobulin G, human (Octagam [®])	Octapharm, Langenfeld
Interferon-γ (rekombinant porzin)	R&D Systems, Wiesbaden
Interleukin-2 (rekombinant human)	Hoffmann-La Roche (Cetus)
Ionomycin	Calbiochem, Schwalbach
Isopropanol, p.a.	Merck, Darmstadt
Jodacetamid (IAA)	Sigma, Deisenhofen
Kaisers-Glyceringelantine	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
L- Glutamin	Seromed, Berlin
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol, p.a.	J. T. Baker, Deventer, NL
Milchpulver, fettfrei	Bio-Rad, München
MW-Marker, prestained	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchromatlösung (Na ₂ [⁵¹ Cr]O ₄)	Amersham, Freiburg
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrochlorid	Merck, Darmstadt

Natriumhydrogencarbonat	J.T. Baker, Deventer, NL
Natriumvanadat	Sigma, Deisendorf
Normales Maus Serum (NMS)	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
NP-40	Sigma, Deisendorf
Penicillin	Seromed, Berlin
Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Phytohämagglutinin (PHA)	Wellcome, Isernhagen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
Ponceau-S-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Reverse Transkriptase	Stratagene, La Jolla, CA, USA
RPMI 1640 (GIBCO™)	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure	J.T. Baker, Deventer, NL
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Streptomycin	Seromed, Berlin
Szintillatorflüssigkeit	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Taq-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt
TC199	Flow, Meckenheim
Tetramethylethyldiamin (TEMED),p.a.	Sigma, Deisenhofen
Thymidin (³ H-Methyl-Thymidin)	NEN, Dreieich
Trifast™	peQLab, Erlangen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), p.a	Sigma, Deisenhofen
Triton x-100	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Tween20	Merck, Darmsatdt
Xylencyanolblau	Sigma, Deisenhofen
φX174 DNA-Marker	Stratagene, La Jolla, CA, USA

2.2 Geräte

Agarosegelelektrophoresekammer:

- Horizon 58 und Horizon 20-25	Gibco BRL, Karlsruhe
Äktaprime®	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Blotsapparatur (Multiphor II)	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Brutschrank (Cytoperm)	Heraeus, Hanau
Brutschrank	Sanyo, Bezug über Ewald, Bad Nenndorf
Durchflußzytometer (FACSCalibur®)	Becton Dickinson, Heidelberg
Eagle-eye	Stratagene, La Jolla, CA, USA
ELISA-Reader	Tecan, Zürich, Schweiz
Elektrophoresekammer (Mini-Protean II)	Bio-Rad, München
Flüssigkeits-Szintillations-Analysator	LKB Wallac, Turku, Finnland
Horizontalschüttler	GFL, Burgwedel
Magnetrührer (Typ MR 2002)	Heidolph, Bezug über Jürgens, Hannover

Pipetten:

- Pipette 0-20 µl	Abimed, Langenfeld
- Pipette 0-100 µl	Abimed, Langenfeld
- Pipette 0-200 µl	Abimed, Langenfeld
- Pipette 10-1000 µl	Abimed, Langenfeld

Spektralphotometer:

- Ultrospec II	Pharmacia, Uppsala, Schweden
- Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank (Lamin-Air®)	Heraeus, Hanau
Thermocycler (Gene Amp PCR System 9600)	Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA
Thermostat	Eppendorf, Hamburg
Western-Blot-Apparatur (Multiphor II®)	Pharmacia Freiburg
VarioMACS®	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Zellkernerntegerät	Inotech, Dottikon, Schweiz
<u>Zentrifugen:</u>	
- Biofuge 15	Heraeus, Hanau
- Cryofuge 6-4S	Heraeus, Hanau
- Kühlzentrifuge RC5C	Sorvall, Newton, IL, USA
- Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
- Varifuge	Heraeus, Hanau

2.3 Verbrauchsmaterial

Drei-Wege-Hahn (Diskofix®)	Braun, Meisungen
FACS-Röhrchen (Falcon™)	Becton Dickinson, Heidelberg
Filtermatte für Flüssigkeits-Szintillator	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
MACS-BS-Säule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS-LS-Säule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS-CS-Säule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Immobilon P-PVDF-Membran	Millipore, Schwalbach
Mikrotiterplatten, 96 Vertiefungen, Rundboden	Nunc, Wiesbaden
Mikrotiterplatten, 96 Vertiefungen, Flachboden	Nunc, Wiesbaden
Mikrotiterplatten, 96 Vertiefungen, flexibel	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Perfusorspritze	Braun, Meisungen
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilm	Hyperfilm-MP, Amersham
Sephadex PD-10 Säule	Amersham, Freiburg
UVette®	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturflaschen (250 ml)	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturflaschen (50 ml)	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

2.4 Kits und Substrate

CBA-Human Th1/Th2	Becton Dickinson, Heidelberg
ECL-Dura West Detection-Kit	Pierce, Bonn
PowerScript Reverse Transkriptase	CloneTech, Heidelberg

2.5 Antikörper

Die Informationen zu den verwendeten Antikörpern sind folgendermaßen gegliedert:

Bezeichnung des Antikörpers

- Spezifität
- Herkunft (Spezies)
- Isotyp (bei monoklonalen Antikörpern)
- Quelle (Firma, bzw. von wem zur Verfügung gestellt)
- Verwendung in dieser Arbeit

2.5.1 human-spezifische Antikörper

OKT3 (CD3)

- erkennt die CD3-Kette (21 kDa) des humanen TCR/CD3-Komplexes
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG_{2a}
- Ortho, Raritan, NY, USA
- verwendet zur Zellfärbung (FACS)

AICD8.1 (CD8)

- erkennt ein Epitop auf CD8 (32-34 kDa)
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG₁
- freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. S.C. Meuer, Institut für angewandte Immunologie, Heidelberg
- verwendet zur Zellfärbung (FACS) und zur Zellsortierung (MACS)

3C10 (CD14)

- erkennt ein Epitop auf dem CD14 Antigen (53-56 kDa)
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG_{2b}
- aufgereinigt aus der Kultur des B-Zell-Hybridoms 3C10
- verwendet zur Zellfärbung (FACS) und zur Zellsortierung (MACS)

CD25-PE

- erkennt Epitop B auf CD25 (55 kDa), der α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors
- monoklonaler Antikörper aus der Maus. Phycoerytrin-konjugiert
- IgG_{1k}
- Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
- verwendet zur Zellfärbung (FACS)

AICD45.2 (CD45.com)

- erkennt ein Epitop auf dem invariablen Gerüst des CD45, dieses Epitop erkennt alle CD45-Isoformen
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG₁
- Klon freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. S. C. Meuer, Institut für angewandte Immunologie, Heidelberg
- verwendet zur Zellfärbung (FACS) und zur immunhistologischen Färbung

T199 (CD56)

- erkennt ein Epitop auf dem CD56 Antigen (48 kDa)
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG₁
- freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. T. Pietsch, Bonn
- verwendet zur Zellfärbung (FACS) und zur Zellsortierung (MACS)

L243 (HLA-DR)

- erkennt eine Determinante des HLA-DR
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG_{2a}
- aufgereinigt aus der Kultur des B-Zell-Hybridoms L243 (ATCC)
- verwendet zur Zellfärbung (FACS) und zur Zellsortierung (MACS)

2.5.2 porzin-spezifische Antikörper

MIL13 (CD45RA)

- erkennt ein Epitop auf porzinen CD45RA Molekülen
- monoklonaler Antikörper aus der Maus, Kulturüberstand
- IgG₁
- ACRIS, Biermann
- verwendet zur Modulation der Proliferation und zur Zellfärbung (FACS)

3c3/9 (CD45RA)

- erkennt ein Epitop auf porzinen CD45RA Molekülen
- monoklonaler Antikörper aus der Maus, aufgereinigt
- IgG₁
- Pharmingen, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- verwendet zur Modulation der Proliferation und zur Zellfärbung (FACS)

K252.1E4 (CD45common)

- erkennt ein Epitop auf porcinen CD45 Molekülen
- monoklonaler Antikörper aus der Maus, Kulturüberstand
- IgG₁
- ACRIS, Biermann
- verwendet zur Modulation der Proliferation und zur Zellfärbung (FACS)

2A5 (CD45common)

- erkennt ein Epitop auf porcinen CD45 Molekülen
- monoklonaler Antikörper aus der Maus, aufgereinigt
- IgG₁
- Pharmingen, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- verwendet zur Modulation der Proliferation, zur Zellfärbung (FACS) und für immunhistologische Färbungen

MAC323 (CD45common)

- erkennt ein Epitop auf porcinen CD45 Molekülen
- monoklonaler Antikörper aus der Maus, aufgereinigt
- IgG_{2a}
- ACRIS, Biermann
- verwendet zur Modulation der Proliferation und zur Zellfärbung (FACS)

MIL15 (CD45RC)

- erkennt ein Epitop auf porcinen CD45RC Molekülen
- monoklonaler Antikörper aus der Maus, Kulturüberstand
- IgM
- ACRIS, Biermann
- verwendet zur Modulation der Proliferation und zur Zellfärbung (FACS)

3a56 (CD45RC)

- erkennt ein Epitop auf porcinen CD45RC Molekülen
- monoklonaler Antikörper aus der Maus, aufgereinigt
- IgG₁
- freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. R. A. Saalmüller, Wien
- verwendet zur Modulation der Proliferation und zur Zellfärbung (FACS)

74-11-10 (MHC Klasse-I)

- erkennt ein Epitop auf porcinen MHC Klasse-I Molekülen
- monoklonaler Antikörper aus der Maus, aufgereinigt
- IgG_{2a}
- freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. R. A. Saalmüller, Wien
- verwendet zur Modulation der Proliferation und zur Zellfärbung (FACS)

MSA3 (MHC Klasse-II)

- erkennt ein Epitop auf porcinen MHC Klasse-II Molekülen
- monoklonaler Antikörper aus der Maus, aufgereinigt
- IgG_{2b}
- freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. R. A. Saalmüller, Wien
- verwendet zur Modulation der Proliferation und zur Zellfärbung (FACS)

MIL17 (CD4)

- erkennt ein Epitop auf porcinen CD4 Molekülen
- monoklonaler Antikörper aus der Maus, Kulturüberstand
- IgG_{2b}
- ACRIS, Biermann
- verwendet zur Modulation der Proliferation und zur Zellfärbung (FACS)

MIL12 (CD8)

- erkennt ein Epitop auf porcinen CD8 Molekülen
- monoklonaler Antikörper aus der Maus, Kulturüberstand
- Ig_{2a}
- ACRIS, Biermann
- verwendet zur Modulation der Proliferation und zur Zellfärbung (FACS)

MIL2 (CD14)

- erkennt ein Epitop auf porcinen CD8 Molekülen
- monoklonaler Antikörper aus der Maus, Kulturüberstand
- IgG_{2b}
- ACRIS, Biermann
- verwendet zur Zellfärbung (FACS)

K139 3E1 (Ig leichte Kette)

- erkennt ein Epitop auf porcinen B-Zell-Rezeptor
- monoklonaler Antikörper aus der Maus, Kulturüberstand
- IgG₂
- ACRIS, Biermann
- verwendet zur Zellfärbung (FACS)

8E6 (CD3)

- erkennt ein Epitop auf porcinen B-Zell-Rezeptor
- monoklonaler Antikörper aus der Maus, Aszites
- IgG₁
- VMRD, Inc.
- verwendet zur Modulation der Proliferation

2.5.3 kreuzreaktive Antikörper und Reagenzien

G28-5 (CD40)

- erkennt ein Epitop des humanen und porcinen CD40
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG₁
- aufgereinigt aus der Kultur des B-Zell-Hybridoms (ATCC)
- verwendet zur Zellfärbung (FACS) und zur Modulation der humanen T-Zellproliferation

CTLA-4-Ig

- erkennt Determinanten des humanen und porcinen CD80 und CD86
- rekombinantes humanes Fusionsprotein aus dem humanen CTLA-4 und Ig
- IgG₁
- R&D Systems, Wiesbaden
- verwendet zur Zellfärbung (FACS) und zur Modulation der humanen T-Zellproliferation

Anti-Phosphotyrosin-bio (4G10-bio)

- erkennt Phosphotyrosinreste (spezies-unspezifisch)
- monoklonaler Antikörper aus der Maus, biotinyliert
- IgG2_{bκ}
- Upstate Biotechnology Inc./ Biomol, Hamburg
- verwendet bei der verstärkten Chemilumineszenz-Reaktion (Western-Blot-Analyse)

Anti- α-Actin (AC-40)

- erkennt Epitope des humanen und porcinen α-Actins
- polyklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG₂
- Sigma, Deisenhofen
- verwendet bei der verstärkten Chemilumineszenz-Reaktion (Western-Blot-Analyse)

2.5.4 Ratten-spezifische Antikörper

R73 (TcR)

- Erkennt ein Epitop des T-Zell-Rezeptors der Ratte
- monoklonaler Antikörper aus der Maus
- IgG₁
- freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. K Wonigeit, Transplantationslabor, Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie, Medizinische Hochschule Hannover

verwendet als Kontrollantikörper zur Modulation der Proliferation

2.5.5 Sekundärantikörper und -reagenzien

Ziege anti-human-Antikörper (G α hum)

- erkennt Epitope auf den schweren und leichten Ketten der humanen-Immunglobuline IgG und IgM
- polyklonaler Antikörper aus der Ziege
- Dianova, Hamburg
- verwendet als Sekundärantikörper zur Zellfärbung (FACS)

Ziege anti-Maus-Antikörper (G α m)

- erkennt Epitope auf den schweren und leichten Ketten der Maus-Immunglobuline IgG und IgM
- polyklonaler Antikörper aus der Ziege
- Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
- Verwendet als Kreuzvernetzender Sekundärantikörper zum Ca²⁺-Flux

Ziege anti-Maus-FITC (G α M-FITC)

- erkennt Epitope auf den schweren und leichten Ketten der Maus-Immunglobuline IgG und IgM
- polyklonaler Antikörper aus der Ziege, Fluorescein-konjugiert
- Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
- verwendet als Sekundärantikörper zur Zellfärbung (FACS)

Ziege anti-Maus-IgG₁-FITC

- erkennt ein Epitop des Fc-Fragmentes des murinen IgG₁
- polyklonaler Antikörper aus der Ziege, Fluorescein-konjugiert
- Southern Biotechnology Associates Inc. Birmingham, Al, USA
- verwendet als Sekundärantikörper zur Zellfärbung (FACS)

Ziege anti-Maus-PE (G α M-PE)

- erkennt Epitope auf den schweren und leichten Ketten der Maus-Immunglobuline IgG und IgM
- polyklonaler Antikörper aus der Ziege, Phycoerytrin-konjugiert
- Becton Dickinson, Heidelberg
- verwendet als Sekundärantikörper zur Zellfärbung (FACS)

Ziege anti-Maus-Peroxidase (G α M-POD)

- erkennt Epitope auf den schweren und leichten Ketten der Maus-Immunglobuline IgG und IgM
- polyklonaler Antikörper aus der Ziege, Peroxidase konjugiert
- Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
- verwendet als Sekundärantikörper in der Westernblot-Analyse

Ziege anti-Maus-Beads (G α M-beads)

- erkennt Epitope auf den schweren und leichten Ketten aller Maus-Immunglobuline
- polyklonaler Antikörper aus der Ziege, mit Magnetpartikeln konjugiert
- Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
- verwendet zur Zellseparation mittels MACS

Strep-HRP

- erkennt Biotin-Strukturen
- Streptavidin, Peroxidase-konjugiert
- Pierce, Bonn
- verwendet als Sekundärreagenz in der Westernblot-Analyse

SA-PE

- erkennt Biotin-Strukturen
- Streptavidin, Phycoerytrin-konjugiert
- Becton Dickinson, Heidelberg
- verwendet als Sekundärantikörper zur Zellfärbung (FACS)

3 Methoden

3.1 Zellen und Medien

3.1.1 Zellen

Die im Rahmen dieser Arbeit vorliegenden Untersuchungen wurden mit humanen und porcinen Lymphozyten sowie porcinen Endothelzellen durchgeführt. Humane periphere Blutzellen gesunder Spender wurden aus Leukotrap[®]-Filtern der Blutbank der MHH gewonnen. Schweinelymphozyten wurden aus Vollblut und primäre Endothelzellen wurden aus Aortengewebe gesunder und unbehandelter Schweine der Deutschen Landrasse isoliert. Das Institut für Tierzucht und Tierverhalten der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) in Mariensee stellte freundlicherweise sowohl Schweineblut als auch Aortengewebe zur Verfügung. Schweineblut wurde außerdem von der Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie der MHH zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Medien und Kultivierungsbedingungen

Als Standardkulturmedium (KM) wurde RPMI 1640 mit 10 % inaktiviertem FCS, 50 U/ml Penicillin, 4 mM L-Glutamin und 50 µg/ml Streptomycin eingesetzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen mit 1×10^6 Zellen/ml KM bei 37°C und 5 % CO₂ Begasung im Brutschrank. Primäre Endothelzellen des Schweins wurden in „Dulbecco’s modification of Eagle’s Medium“ (DMEM) angereichert mit 10 % inaktiviertem FCS, 50 U/ml Penicillin, 4 mM L-Glutamin, 50 µg/ml Streptomycin sowie 60 µg/ml bovinem Endothelzell-Wachstumsfaktor (ECGF; aus Rinderhirn) bei 37°C und 10 % CO₂ Begasung kultiviert. Gewaschen und kurzzeitig aufbewahrt wurden die Zellen in Hepes-gepuffertem TC199, pH 7,3 oder in Phosphat-gepuffertem Kochsalzlösung (PBS), pH 7,2.

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität kultivierter und frisch separierter Zellen wurden 10 µl Zellsuspension 1:10 mit Trypanblau (0,16 % Trypanblau in 0,9 % NaCl) gemischt. Anschließend wurden die Zellen in einer Neubauerkammer ausgezählt. Die lebenden Zellen konnten den Farbstoff aktiv durch ihre Ionenkanäle ein- und ausschleusen, sie färbten sich nicht an. Tote und geschädigte Zellen waren dagegen nicht in der Lage das Trypanblau wieder auszuscheiden, sie färbten sich blau. Zur Bestimmung der Vitalität wurden die geschädigten, blau gefärbten Zellen von der Gesamtzellzahl abgezogen. Die Vitalität der Zellen lag durchschnittlich bei 90-95 %.

3.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Isolierte periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) und Endothelzellen des Schweins wurden bis zu ihrem Gebrauch bei -80°C gelagert. Dazu wurden die Zellen in eiskaltem Einfriermedium aufgenommen. Das Medium bestand aus RPMI oder TC199, angereichert mit 20 % inaktiviertem FCS und 10 % DMSO, das die Bildung von Eiskristallen in den Zellen verhindern sollte. Die PBMC wurden in Aliquots zu 1×10^7 Zellen/ml und die Endothelzellen zu 1×10^6 Zellen/ml in Glasampullen eingefroren. Das Auftauen von Zellsuspensionen erfolgte durch schnelle Erwärmung unter leichtem Schwenken der Glasampullen in einem 37°C warmen Wasserbad. Dann wurden die Zellen in 10 ml eiskaltem Auftaumedium (TC199 mit 20 % FCS) pipettiert, sofort zentrifugiert (200 x g, 10 min) und der Überstand wurde abgesaugt. Durch zwei weitere Waschschrte mit TC199 wurden Reste von DMSO, das sich im Einfriermedium befanden und toxisch für die Zellkultur ist, entfernt. Abschließend wurden 1×10^6 Zellen/ml in Kulturmedium aufgenommen und über Nacht im Brutschrank kultiviert, bevor sie in die Experimente eingesetzt wurden.

3.2 Isolierung von Zellpopulationen

3.2.1 Isolierung humaner peripherer Blut-Leukozyten aus Leukotrap®-Filtern

Humane periphere mononukleäre Blutzellen wurden aus Leukotrap®-Filtern gewonnen, die von der Blutbank der MHH zur Isolierung von Leukozyten aus Vollblutkonserven verwendet wurden. An den beiden Enden des Filters befand sich ein Schlauch. Durch einen Schlauch gelangte das Blut in Pfeilrichtung in den Filter und durch den anderen trat das filtrierte, von Leukozyten befreite Blut wieder aus dem Filter heraus. Die Leukozyten wurden entgegen der ursprünglichen Laufrichtung des Blutstroms wieder aus dem Leukotrap®-Filter herausgespült. An den Schlauch, durch den das Blut in den Filter eingetreten war, wurde eine ungefüllte 50 ml Perfusor-Spritze über einen Drei-Wege-Hahn befestigt. An der Austrittsstelle des Blutes wurde eine weitere Spritze über einen Drei-Wege-Hahn angeschlossen, die zuvor mit 50 ml PBS ohne Mg^{2+} und Ca^{2+} befüllt wurde. Nach dem Öffnen der Hähne wurde das PBS entgegen dem Blutstrom mit Druck durch den Filter gespült. Das erhaltene PBS-Blut-Gemisch wurde in der zweiten Spritze aufgefangen und in ein Becherglas gegeben. Die Perfusor-Spritze, die sich an der Austrittsstelle des Blutes befand, wurde erneut mit PBS ohne Mg^{2+} und Ca^{2+} gefüllt, dreimal unter Druck durch den Filter gespült und anschließend in das Becherglas überführt. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt bis der Filter mit insgesamt 160 ml PBS ohne Mg^{2+} und Ca^{2+} ausgewaschen worden war. Das PBS-Blut-Gemisch, wurde zur Ficoll-Separation mononukleärer Blutzellen verwendet.

3.2.2 Ficoll-Separation mononukleärer Zellen aus Spenderblut

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Humane PBMC wurden aus dem PBS-Blut-Gemisch gewonnen. PBMC des Schweins wurden aus Vollblut isoliert, das zunächst mit 1 ml Heparin versetzt und mit TC199 im Verhältnis 1:3 verdünnt wurde. Das Heparin verhinderte die Gerinnung des Blutes, während die Verdünnung mit TC199 die Trennung im Dichtegradienten verbesserte. Zur Isolierung wurden 10 ml Ficoll 1077 (mit einer spezifischen Dichte von 1,077 g/ml bei 10°C) in Falcon-Röhrchen vorgelegt und in

einem Verhältnis von ca. 1:5 mit dem humanen oder porzinen Blut-Gemisch überschichtet. Dann wurde 30 min bei 400 x g zentrifugiert. Dabei kam es zur Trennung der verschiedenen Zelltypen in Abhängigkeit von der Dichte. Nach der Zentrifugation befanden sich die PBMC in der Interphase. Diese Phase wurde vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette abgenommen, in ein neues Falcon-Röhrchen überführt, mit TC199 verdünnt und für 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Befanden sich in dem Zellsediment noch Erythrozyten, wurden diese durch Lyse entfernt. Dazu wurde das Pellet in 10 ml 37°C warmem Erythrozyten-Lyse-Reagenz (150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃ und 0,01 % EDTA) resuspendiert und circa zwei Minuten inkubiert. Anschließend folgten zwei Waschschrte mit TC199 für 10 min bei 200 x g, um Reste des Lyse-Reagenzes sowie Ficollreste und Thrombozyten zu entfernen.

3.2.3 Isolierung humaner T-Lymphozyten aus PBMC mittels magnetischer Zellsortierung (MACS)

Die magnetische Zellsortierung (*MACS = magnetic cell sorting*) erlaubt die Separation von Zellsubpopulationen aus einer Gesamtpopulation. In Rahmen dieser Arbeit wurden humane Gesamt-T-Zellen oder CD4⁺ T-Zellen aus der gesamten Lymphozytenpopulation gesunder Blutspender isoliert, indem B-Zellen, NK-Zellen und Monozyten mit Hilfe von Antikörpern, an die magnetische Kugeln gebunden waren, in einem magnetischen Feld zurückgehalten wurden. Durch die negative Selektion sollte die Beladung der T-Zellen mit Antikörpern und somit eine mögliche Voraktivierung aufgrund der Antikörperbindung ausgeschlossen werden.

Zur Anreicherung von T-Zellen aus humanen PBMC wurden Monozyten (CD14⁺), NK-Zellen (CD56⁺) und B-Zellen (HLA-DR⁺) mittels *MACS* depletiert. Für die Gewinnung von CD4⁺ T-Zellen wurden außerdem CD8⁺ T-Zellen entfernt. Dazu wurden 5x10⁷ PBMC/ml mit einem Mix aus murinen anti-humanen Antikörpern inkubiert. Für eine Anreicherung von Gesamt-T-Zellen bestand dieser Antikörper-Mix aus 1 ml Kulturüberstand des CD56 mAk T199 und jeweils 10 µg/ml des CD14 mAk 3C10 und des HLA-DR mAk L243. Zur Anreicherung von CD4⁺ T-Zellen wurden dem Mix außerdem 20 µg/ml des CD8 mAk AICD8.1 zugesetzt. Nach einer 30 minütigen

Inkubation auf Eis wurde ungebundener Antikörper durch zwei Waschschriffe in TC199 für 10 min bei 200 x g entfernt. Anschließend wurden die Zellen in einem Volumen von 80 $\mu\text{l}/10^7$ Zellen MACS-Puffer (5 mM EDTA und 0,5 % BSA in PBS ohne Mg^{2+} und Ca^{2+}) aufgenommen und mit 20 $\mu\text{l}/10^7$ Zellen Ziege anti-Maus Ig versetzt. An diesen Sekundärantikörper waren magnetische Kugeln gebunden, durch die die mAk-gebundenen Zellen später im magnetischen Feld zurückhalten werden konnten. Nach 15-minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen erneut einmal gewaschen und in 500 μl MACS-Puffer aufgenommen. Die PBMC wurden auf eine für die Zellzahl geeignete MACS-Säule gegeben. Diese war zuvor im Vario-MACS[®] befestigt und den Herstellerangaben entsprechend mit MACS-Puffer equilibriert worden. Die gewünschte Zellpopulation wurde mit MACS-Puffer eluiert, während Antikörper-gebundene Zellen im magnetischen Feld zurückgehalten wurden. Zur Bestimmung der Reinheit der separierten Zellpopulationen wurden durchflußzytometrische Untersuchungen durchgeführt (siehe Abschnitt 3.7.1).

3.2.4 Isolierung primärer Endothelzellen des Schweins

Primäre Endothelzellen wurden aus Aortenstücken von Schweinen der Deutschen Landrasse gewonnen. Dazu wurden die Aortenstücke zunächst an einem Ende mit einer sterilen Aortenklemme verschlossen. Anschließend wurden sie mit 5 ml einer 37°C vorgewärmten, 0,05 %igen Collagenaselösung gefüllt und mit einer weiteren Klemme verschlossen. Darauf folgte eine 30 minütige Inkubation der Stücke bei 37°C in einem TC199-gefüllten Becherglas im Wasserbad, bevor die innere Aortenwand mit der Collagenaselösung gespült wurde. Das erhaltene Endothelzell-Collagenasegemisch wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit kaltem TC199 (10 min bei 200 x g), um die Endothelzellen von der Collagenase zu befreien. Die Endothelzellen wurden anschließend in 10 ml DMEM (versetzt mit 10 % inaktiviertem FCS, 50 U/ml Penicillin, 4 mM L-Glutamin, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin) aufgenommen und in einer kleinen Kulturflasche liegend bei 37°C und 10 % CO_2 Begasung kultiviert. Am folgenden Tag wurde das Medium abgegossen und durch frisches DMEM mit den Zusätzen und 60

$\mu\text{g/ml}$ ECGF ersetzt. Zur Aktivierung der primären porzinen Endothelzellen wurden ferner 8 pg/ml rekombinantes porzines IFN- γ zu der Kultur gegeben.

3.3 Herstellung und Markierung monoklonaler Antikörper

In dieser Arbeit wurden die porzin-spezifischen monoklonalen Antikörper 3a56 (CD45RC; Maus IgG₁), 74-11-10 (MHC Klasse-I; Maus IgG2_b) und MSA3 (MHC Klasse-II; Maus IgG2_a) sowie der human-spezifische mAk G28-5 (CD40; Maus IgG₁), der mit porzinem CD40 kreuzreagiert, eingesetzt. Diese mAk wurden aus Überständen von Hybridomkulturen aufgereinigt und für ihren Einsatz zur Zwei-Farben-Fluoreszenzanalyse direkt Fluoreszein-konjugiert (FITC) oder biotinyliert.

3.3.1 Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Hybridom-Kulturüberständen

Die Hybridomzellen wurden in KM bei 37°C und 5% CO_2 Begasung im Brutschrank kultiviert. Nach zwei bis drei Tagen wurde die Hybridomkultur bei $2000 \times g$ für 10 min herunterzentrifugiert. Die zellfreien Kulturüberstände, die die Antikörper enthielten, wurden gesammelt und mittels Schweinelymphozyten wöchentlich auf vorhandene bindungsfähige Antikörper durchflußzytometrisch untersucht. Standen zwei Liter Kulturüberstand mit bindungsfähigem Antikörper zur Verfügung, wurde mit der Antikörperaufreinigung begonnen. Sie fand maschinell in einer Äktaprime[®] Proteinaufreinigungsanlage nach Herstelleranweisung über eine Protein-G-Sepharose Säule statt. Dazu wurde der Kulturüberstand zunächst durch die Säule geleitet. Dabei wurde der Antikörper an der Protein-G-Sepharose zurückgehalten, die eine künstliche Protein-G Variante enthält, die unter physiologischen Salzkonzentrationen mit hoher Affinität an F_c-Fragmente von Immunglobulinen der IgG-Isotypen bindet. Anschließend wurde die Säule in Waschpuffer ($10 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ und $10 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7,0) gespült, um ungebundene Proteine, z.B. Rückstände von FCS aus der Kultur, zu entfernen. Zur Elution der Antikörper aus der Säule wurde ein 100 mM Glycin-HCl Puffer mit einem sauren pH von 2,7 verwendet. Im Anschluß wurde der pH-Wert des Eluates, das den Antikörper enthielt, zunächst mit Hilfe von 1 M Tris-HCl pH 9,0 neutralisiert und

anschließend mittels Gelfiltration über eine Sephadex PD-10 Säule in PBS umgepuffert. Dazu wurde die Säule mit 30 ml PBS equilibriert, bevor nacheinander jeweils 2 ml Antikörpersuspension durch 3 ml PBS eluiert wurden, bis die Antikörpersuspension vollständig umgepuffert worden war. Mittels einer Proteinbestimmung nach Bradford konnte im Anschluß die Antikörperkonzentration bestimmt werden, und mittels Durchflußzytometrie (siehe 3.7.1) wurde der aufgereinigte Antikörper auf seine Bindungsfähigkeit hin untersucht.

3.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Antikörperkonzentration wurde nach Bradford mit einem Protein-Assay-Reagenz von Bio-Rad durchgeführt, das Coomassie Brilliant Blue G-250 als Farbstoff enthält. Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf einem Farbumschlag nach Bindung des Coomassiefarbstoffes an Proteine. Die damit verbundene Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm kann photometrisch bestimmt werden.

Zur Proteinbestimmung wurde eine Verdünnungsreihe des aufgereinigten Antikörpers angesetzt. In Doppelansätzen wurden 100 µl Antikörper-Verdünnung unbekannter Konzentration 1:2 mit dem Protein-Assay-Reagenz, das zuvor 2:5 mit H₂O verdünnt worden war, luftblasenfrei gemischt. Als Standardprotein wurde eine Verdünnungsreihe mit humanem Immunglobulin G bekannter Konzentration, ebenfalls in Doppelansätzen, mitgeführt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 570 nm an einem ELISA-Plattenlesegerät gemessen. Die Konzentration des aufgereinigten Antikörpers konnte nun über die Standardkurve des Immunglobulin G errechnet werden.

3.3.3 Fluoreszein- und Biotinmarkierung aufgereinigter monoklonaler Antikörper

Aufgereinigte Antikörper, die zur Detektion von Zelloberflächenmolekülen auf Schweinelymphozyten mittels der Zwei-Farben-Fluoreszenzanalyse eingesetzt werden sollten, wurden vorher direkt Fluoreszein-konjugiert (FITC) oder biotinyliert. Für eine optimale Markierung wurden diese Antikörper in einer Amicon-Kammer auf eine

Konzentration von 5-10 mg/ml angereichert. Anschließend wurden die Antikörper über eine Sephadex PD-10 Säule (siehe 3.3.1) in Kopplungspuffer umgepuffert. Für die nachfolgende FITC-Markierung bestand der Kopplungspuffer aus 100 mM Na₂CO₃ und 100 mM NaCl, pH 9,0 und für die Biotinylierung aus 100 mM Na₃PO₄, pH 7,7.

Für die Biotinylierung wurden zunächst 25 mg/ml Biotin x-NHS in Dimethylformamid gelöst, und für die Fluoreszein-Konjugation wurde das Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) in 3 mg/ml in FITC-Kopplungspuffer gelöst. Die Menge der Stammlösungen, die zu Konjugation von Biotin bzw. von FITC zu den Antikörpern zugegeben werden mußte, errechnet sich folgendermaßen:

$$\frac{\text{mg Antikörper} \times 15^{1)} \times \text{MW}^{2)} \text{ Biotin/FITC}}{\text{MW Antikörper}} = \text{mg Biotin/FITC}$$

- 1) 15-facher molekularer Überschuss von Biotin bzw. FITC für die Markierung von IgG mAk (der molekulare Überschuß sollte bei beiden Markierungsmethoden zwischen 10 und 30 liegen)
- 2) MW = reaktive Molekülmasse; Biotin: 575,7; FITC:389; IgG: 150.000

Zur Biotinylierung wurden die Antikörper nach Zugabe der errechneten Biotinmenge für 60 min bei RT unter Schwenken inkubiert. Die FITC-Konjugation fand unter Lichtausschluss für 4 h bei RT unter Schwenken statt. Im Anschluß an die Inkubation wurden die markierten Antikörper durch eine erneute Gelfiltration über eine Sephadex PD-10 Säule von ungebundenem Biotin bzw. FITC befreit. Dabei wurde der biotinylierte Antikörper in 11 Fraktionen zu jeweils 1 ml aufgefangen, die im Photometer bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm (Nachweis von Proteinen) auf vorhandene Antikörper untersucht wurden. Die Fraktionen, die Antikörper enthielten, wurden zusammengeführt. Zur Aufreinigung FITC-konjugierter Antikörper, wurde die erste von zwei gelb angefärbten Fraktionen aufgefangen. Diese enthielt den FITC-markierten Antikörper, während die zweite gelbe Fraktion ungebundenes FITC enthielt, das, aufgrund von Interaktionen mit der Gelmatrix, verzögert durch die Säule lief. Die

erfolgreiche Konjugation der Antikörper wurde schließlich durchflußzytometrisch überprüft.

3.4 Stimulation von Lymphozyten

3.4.1 Antikörper-Beladung von Schweinelymphozyten

Schweinelymphozyten wurden aufgetaut und über Nacht kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen dreimal in TC199 gewaschen (200 x g, 10 min) und in einer Dichte von $2,5 \times 10^7$ Zellen/ml TC199 resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit einer sättigenden Antikörper-Konzentration versetzt. Diese Konzentration wurde zuvor über eine Dosis-Wirkungskurve der mittleren Fluoreszenzintensität für jeden verwendeten Antikörper einzeln durchflußzytometrisch bestimmt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen dreimal für 10 min bei 200 x g gewaschen. Danach wurde die Zellzahl bestimmt, und die Zellen wurden, abhängig von der anschließenden Untersuchung, in KM auf eine definierte Konzentration eingestellt. Folgende Experimente wurden mit Antikörper-behandelten Schweinelymphozyten durchgeführt: gemischte Lymphozytenkulturen, Induktion homotypischer Aggregation, Semiquantitative PCR, Zwei-Farbfluoreszenzanalyse zur Untersuchung der MHC Klasse-I, Klasse-II und CD40 Expression auf CD45RA positiven Schweinelymphozyten.

Zur Untersuchung tyrosinphosphorylierter Proteine mittels Westernblot wurden die porzinen Lymphozyten zunächst wie zuvor in einer Dichte von $2,5 \times 10^7$ Zellen/ml TC199 resuspendiert. Anschließend wurden 2×10^6 Zellen/Ansatz auf Eppendorfgefäße verteilt und für 20 min bei 37°C im Thermostaten inkubiert. So sollten optimale Bedingungen zur Einleitung von Signalkaskaden in den Lymphozyten geschaffen werden. Zur Stimulation der porzinen Lymphozyten wurde der Antikörper in einer sättigenden Konzentration zugegeben. Stimuliert wurde für die angegebene Zeit.

3.4.2 Gemischte Lymphozytenkultur (MLC)

Für eine spezifische Aktivierung isolierter humaner T-Zellen durch xenogene oder allogene Stimulatorzellen, wurden gemischte Lymphozytenkulturen (MLC = mixed lymphocyte culture) durchgeführt. Eine gerichtete Aktivierung von T-Zellen wurde erreicht, indem die Proliferationsfähigkeit der Stimulatorzellen durch eine Behandlung mit einer γ -Strahlenquelle verhindert wurde.

Zur Aktivierung von humanen T-Lymphozyten wurden porcine oder humane Lymphozyten als Stimulatorzellen eingesetzt. Schweinezellen wurden mit einer Energie von 30 Gy und humane Zellen mit 50 Gy bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit TC199 gewaschen und entweder zunächst mit Antikörpern vorbehandelt (siehe 3.4.1) oder direkt in die MLC eingesetzt. Pro Stimulationsansatz wurden 3×10^5 Stimulatorzellen mit gleicher Anzahl humaner T-Zellen in Rundbodenmikrotiterplatten in einem Volumen von 200 μ l Kulturmedium für die angegebene Zeit kultiviert. Als Negativkontrolle wurden humane T-Zellen alleine kultiviert und als Proliferationskontrolle wurden sie mit 1 μ g/ml des Mitogens PHA stimuliert. Die erfolgreiche Bestrahlung der Stimulatorzellen wurde durch eine fehlende proliferative Antwort auf eine mitogene Stimulation nachgewiesen. Dazu wurden die bestrahlten Schweinelymphozyten mit 2 μ g/ml ConA und die bestrahlten humanen Lymphozyten mit 1 μ g/ml PHA für die jeweils angegebene Zeit kultiviert. Anschließend wurde die Zytokinproduktion oder die Proliferation der T-Zellen bestimmt.

3.5 Bestimmung der Proliferation

Ein relatives Maß für die Proliferation stellt der Einbau von Tritium-markiertem Thymidin ($[^3\text{H}]\text{-TdR}$) im Rahmen der DNA-Synthese dar. Dieser findet in der S-Phase des Zellzyklus statt. Nach einer 4-tägigen gemischten Lymphozytenkultur wurde zu jedem Ansatz 1 μ Ci $[^3\text{H}]\text{-TdR}$, verdünnt in 50 μ l KM, gegeben. Es folgte eine weitere Inkubation für 16 h im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 Begasung. Die Zellen wurden anschließend mit einem Zellkultur-Sammler geerntet, wobei die DNA auf einer Glasfasermatte gesammelt wurde. Diese wurde im Trockenschrank bei 63°C für 60 min

getrocknet. Anschließend wurde die Matte in 4 ml einer Szintillatorflüssigkeit getränkt und in einer Plastikhülle verschweißt. Nun konnte die Auswertung in einem Flüssigkeits-Szintillator-Analysator erfolgen. Die inkorporierte Tritium-Menge wurde als Zählimpulse pro Minute (cpm = counts per minute) gemessen. Für einen Stimulationsansatz wurden die Mittelwerte der cpm aus drei Einzelproben bestimmt.

3.6 Nachweis von zytotoxischen Effektorzellen mittels ⁵¹Cr-Freisetzungstests

Durch ⁵¹Cr-Freisetzungstests werden Effektorzellen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Zielzellen spezifisch zu lysieren. Dabei werden Zielzellen mit einer radioaktiven Natriumchromatlösung (Na₂[⁵¹Cr]O₄) inkubiert und das ⁵¹Cr bindet an Membranproteine. Werden markierte Zellen lysiert, verlieren sie ihre Membranintegrität und geben Membranvesikel in den Kulturüberstand ab. Durch die Messung der Radioaktivität in diesem Überstand läßt sich die spezifische Lyse der Zielzellen bestimmen. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob humane Lymphozyten im Rahmen ihrer Aktivierung durch bestrahlte Schweinelymphozyten spezifische Effektorfunktionen ausbilden.

Zur Induktion von Effektorfunktionen wurden 1x10⁶/ml ruhende humane Lymphozyten für 6 Tage mit gleicher Anzahl bestrahlter Schweinelymphozyten in einer MLC aktiviert. Zur Untersuchung ihres Effektorpotentials dienten Schweinelymphozyten desselben Spenders, wie zur Aktivierung der humanen Lymphozyten. Diese Schweinelymphozyten wurden durch eine zweitägige Stimulation mit 2 µg/ml ConA aktiviert, um die Effizienz der anschließenden ⁵¹Chromierung zu steigern. Vor dem Markierungsvorgang wurden die Zielzellen dreimal mit TC199 gewaschen, um an der Zelloberfläche gebundenes FCS zu entfernen. Anschließend wurden 1-5x10⁶ Zielzellen in 300 µl TC199 aufgenommen und mit 100 µCi Na₂[⁵¹Cr]O₄-Lösung für 60 min bei 37°C in einem Wasserbad mit Schüttler inkubiert. Um ungebundenes ⁵¹Cr zu entfernen, wurden die Zellen dreimal mit TC199, das 5 % FCS enthielt, gewaschen. Dabei binden freie Chromradikale an das FCS. Im Anschluß wurden 1x10⁴ Zielzellen mit Effektorzellen in

unterschiedlichen Verhältnissen in 200 µl Medium in 96-Loch Rundbodenplatten im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach einer 4-stündigen Inkubation wurden die Ansätze kurz zentrifugiert, Aliquots von 25 µl Kulturüberstand pro Vertiefung abgenommen und in eine 96-Loch Platte überführt, in die 150 µl/Vertiefung β-Szintillationsflüssigkeit vorgelegt worden war. Anschließend wurden die Ansätze für 15 min auf einem Schüttler inkubiert bevor Na₂[⁵¹Cr]O₄-enthaltende Membranvesikel mittels eines Flüssigkeits-Szintillations-Analysators bestimmt wurden. Die spezifische lytische Aktivität der Effektorzellen berechnet sich nach folgender Formel:

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

Hierbei entspricht cpm_{exp} der gemessenen Isotop-Freisetzung in den Ansätzen mit Effektorzellen. Die maximale ⁵¹Cr-Freisetzung (cpm_{max}) entspricht der Aktivität des Überstandes aus Ansätzen, in denen die Zielzellen durch das Detergenz Triton x-100 vollständig lysiert wurden. Zur Bestimmung der Spontanfreisetzung ($\text{cpm}_{\text{spontan}}$) von ⁵¹Cr wurde der Überstand aus Ansätzen gemessen, in denen die Zielzellen mit Kulturmedium allein kultiviert wurden. Es wurden nur solche Versuche ausgewertet, in denen die Spontanfreisetzung nicht über 20 % der Maximallyse lag.

3.7 Durchflußzytometrische Analytik

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie lassen sich phänotypische und funktionelle Eigenschaften von Zellen untersuchen. Dabei lassen sich Zellpopulationen aufgrund ihres charakteristischen Streulichtverhaltens und der Bindung von fluorchrom-konjugierten Antikörpern an einzelne Moleküle auf der Zelloberfläche und innerhalb der Zelle mit einem Laserstrahl analysieren. Mit dieser Methode können einzelne Zellpopulationen aufgrund ihrer Zellgröße, ihrer Granularität sowie der Expression von bis zu vier verschiedenen Molekülen auf der Zelloberfläche und innerhalb der Zelle

analysiert werden. Ferner erlaubt die Durchflußzytometrie, durch die simultane Bindung von zwei Antikörpern mit verschiedenen Fluoreszenzintensitäten, die quantitative Analyse von definierten Proteinen aus Kulturüberständen.

3.7.1 Ein-Farbfluoreszenzanalyse

Bei der Ein-Farbfluoreszenzanalyse wurde ein Oberflächenmolekül über einen unmarkierten Primärantikörper und einen fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörper nachgewiesen. 5×10^5 Zellen/Vertiefung wurden in Rundbodenmikrotiterplatten ausgesät. Die Zellen wurden für 1 min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und die Zellen wurden in 100 µl Waschmedium (PBS mit 0,5 % BSA und 0,1 % NaN_3) resuspendiert. Es folgten drei Waschschrte. NaN_3 ist toxisch und setzt die Zellen unter physiologischen Streß. Um diesen möglichst gering zu halten, erfolgten alle weiteren Arbeitsschritte auf Eis. Nach den Waschschrten wurden 20 µl Intraglobin (humanes Immunglobulin G; 5 mg/ml) zu den Zellen gegeben. Dieses diente dem Abblocken unspezifischer Bindungen der Antikörper über F_c -Rezeptoren. Dann wurden 20 µl (je nach mAk ca. 0,5 µg) aufgereinigter Primärantikörper zugegeben. Nach Zugabe des Antikörpers folgte eine Inkubation für 20 min auf Eis. Darauf folgten drei Waschschrte für 1 min bei 200 x g, um nicht gebundenen Antikörper aus der Zellsuspension zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit einem fluorochrom-markierten Sekundärantikörper für 20 min auf Eis inkubiert. Diese Inkubation fand unter Lichtausschluß statt, um eine Veränderung des fluorochromen Verhaltens des Antikörpers zu verhindern. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen der Zellen entfernt. Anschließend wurden die Proben in 200 µl Waschmedium aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Es wurden 10000 Zellen/Ansatz im FACSCalibur bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm (Argon-Laser) analysiert.

3.7.2 Zwei-Farbfluoreszenzanalyse

Bei der Zwei-Farbfluoreszenzanalyse wurden in jedem Ansatz zwei Oberflächenantigene pro Zelle mittels Antikörper verschiedener Spezifität detektiert. Zur Unterscheidung der beiden Oberflächenantigene wurde ein Oberflächenantigen über

Fluoreszein (FITC) und das andere über Phycoerythrin (PE) nachgewiesen. Es wurden 5×10^5 Zellen/Vertiefung in Rundbodenmikrotiterplatten ausgesät. Die Zellen wurden für 1 min bei 200 x g zentrifugiert, der Überstand wurde abgeschüttet und die Zellen wurden in 100 μ l Waschmedium resuspendiert. Nach drei Waschschrritten wurden die Zellen mit 20 μ l Intraglobin (5 mg/ml) resuspendiert und gemeinsam mit ca. 0,5 μ g Primärantikörper, der das erste Oberflächenantigen detektiert, inkubiert. Nach 20-minütiger Inkubation wurde überschüssiger Antikörper durch zwei Waschschrritte herausgewaschen und die Zellen wurden mit einem FITC- oder PE-markierten Sekundärantikörper weitere 20 min unter Lichtausschluß inkubiert. Vor der Färbung des zweiten Oberflächenantigens wurden freie Epitope des sekundären Antikörpers durch die Zugabe von 10 μ l normalem Mausserum (NMS) in einer 1:2 Verdünnung für 20 min abgeblockt. So sollten unspezifische Bindungen zwischen dem Ziege anti-Maus Sekundärantikörper und dem zweiten murinen Primärantikörper verhindert werden. Ungebundenes NMS wurde durch dreimaliges zentrifugieren für 10 min bei 200 x g herausgewaschen. Nun folgte die Färbung des zweiten Oberflächenantigens mit sättigenden Mengen eines biotinylierten oder eines weiteren unmarkierten Antikörpers für 20 min unter Lichtausschluß. Ein zweiter unmarkierter Antikörper konnte nur unter der Voraussetzung verwendet werden, daß sich die Antikörper gegen die beiden Zelloberflächenmoleküle in ihren Isotypen unterschieden, weil sie anschließend über einen Isotyp-spezifischen FITC-markierten Sekundärantikörper detektiert werden mußten. Zur Detektion des zweiten Oberflächenantigens über biotinylierte Primärantikörper wurden die Zellen mit Phycoerythrin-konjugiertem Streptavidin (SA-PE) inkubiert. Für die anschließende Messung wurden die Zellen in 200 μ l Waschmedium resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt.

3.7.3 Bestimmung der Zytokinkonzentration aus dem Kulturüberstand

Mit Hilfe des *Cytokine Bead arrays* (CBA) ist es möglich Zytokine aus Kulturüberständen im Durchflußzytometer zu quantifizieren. In dieser Arbeit wurde die Konzentration der humanen Th1 Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2 sowie der Th2-Zytokine IL-4, IL-5, und IL-10 aus den Kulturüberständen allogener und xenogener Stimulationsansätze analysiert. Mit Hilfe dieses Tests konnten die angegebenen sechs verschiedenen

Zytokine gleichzeitig aus geringen Volumina Kulturüberstand bestimmt werden. Dabei binden Antikörper, an die Plastikkügelchen (beads) mit unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten gekoppelt sind, an die zu analysierenden Zytokine. Aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten der beads lassen sich die gebundenen Zytokine im FL3-Messbereich getrennt voneinander analysieren. Die Konzentration der einzelnen Zytokine wird über einen zweiten PE-konjugierten Antikörper im FL2-Messbereich bestimmt, da die Fluoreszenzintensität in diesem Bereich proportional zur Menge des Antikörper-Zytokin-Komplexes steigt. Durch das Mitführen eines Standards mit definierter Konzentration, kann die Konzentration der einzelnen Zytokine aus dem Kulturüberstand quantifiziert werden. Der Test wurde nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte durch eine spezielle *Cytokine Bead Array* Software.

3.7.4 Messung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels

Mit Hilfe von Ca^{2+} -bindenden Fluoreszenzfarbstoffen kann die Konzentration zytoplasmatischer Ca^{2+} -Ionen ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) bestimmt werden. In dieser Arbeit wurden die die Farbstoffe Fluo-3-Acetoxymethylester (AM) und Fura Red-Acetomethylester (AM) als Calcium-Indikatoren verwendet. Diese beiden Farbstoffe unterscheiden sich in ihrem Emissions- und Absorptionsspektrum, so liegt das Spektrum des ersten Farbstoffes im FL1- Messbereich und des zweiten Farbstoffes im FL3-Messbereich. Nach Bindung von Ca^{2+} -Ionen steigt die Fluoreszenzintensität von Fluo-3 an, während sich die Fluoreszenzintensität von Fura Red verringert. Da beide Farbstoffe bei einer Wellenlänge von 488 nm (Argonlaser) angeregt werden können, ermöglichen diese Eigenschaften die qualitative Analyse des zytoplasmatischen Ca^{2+} -Spiegels im Durchflußzytometer.

Die Zellen wurden zunächst in einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml mit 4 μM Fluo-3-AM und 10 μM Fura Red in Kulturmedium ohne FCS für 20 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Zelldichte im gleichen Medium auf 1×10^6 Zellen/ml verdünnt, und die Inkubation wurde um 40 min verlängert. Aufgrund ihrer Ladungsneutralität dringen die Fluoreszenzfarbstoffe durch die Zellmembran ins Innere

der Zelle ein. Im Zytosol werden die Derivate von Esterasen hydrolysiert und verbleiben nachfolgend in tetraanionischer Form in der Zelle zurück. Im Anschluß an die Inkubation wurden die Zellen zweimal mit Kulturmedium ohne FCS für 10 min bei 200 x g gewaschen, um nicht eingedrungenen Farbstoff zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml in Ca^{2+} -Puffer (25 mM Hepes, pH 7,2, 140 mM NaCl, 1,8 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 3 mM KCl, 10 mM D-Glucose) aufgenommen und unter Lichtausschluß 15 min inkubiert. Für die Messung wurden die Zellen in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/ml Ca^{2+} -Puffer in FACS-Röhrchen überführt. Zu Beginn der Messung wurde die Basisfluoreszenz für 60s aufgenommen. Zur Stimulation der Zellen wurde anschließend der Primärantikörper in sättigenden Mengen zu den Ansätzen gegeben. Nach 270 s wurde der kreuzvernetzende Sekundärantikörper GαM (20 µg/ml) hinzugefügt bevor 60 s vor dem Abschluß der Messung das Calcium-Ionophor Ionomycin als Positivkontrolle in die Ansätze pipettiert wurde. Dabei wurde die zeitabhängige Zunahme bzw. Abnahme der mittleren Fluoreszenzintensität bestimmt. Zur Auswertung der Messung wurde der Quotient aus den Fluoreszenzintensitäten der beiden Farbstoffe gebildet. Die Konzentration an intrazellulärem Calcium wurde über die mittlere Fluoreszenzintensität (mean) zeitabhängig gemessen.

3.8 Immunhistologische Färbung von Zelloberflächenmolekülen in Gefrierschnitten

Milz- und Herzpräparate wurden nach Schlachtung von unbehandelten Kontrollschweinen entnommen. Aus diesen Präparaten wurden Gefrierschnitte mit einer Schichtdicke von 5 µm am Kryostaten hergestellt. Die Schnitte wurden auf Objektträger gebracht, mit Aceton für 10 min fixiert und für 5 min unter einem Abzug getrocknet. Anschließend wurden die Präparate auf den Objektträgern mit einem Fettstift umrandet, um eine kontrollierte Färbung zu gewährleisten. Die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden in Feuchtkammern durchgeführt, um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern. Vor dem Nachweis der Oberflächenmoleküle mußten freie Bindungsstellen auf den Objekten blockiert werden, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Dazu wurden die Gewebeschnitte zunächst 1 min mit normalem Mausserum

(NMS; 1:2 in PBS) inkubiert, das im Anschluß abgeschüttet wurde. Anschließend konnten die Präparate mit dem Primärantikörper inkubiert werden. Dabei handelte es sich um den porzin-spezifischen monoklonalen CD45 Antikörper 2A5 (Maus IgG₁) und den human-spezifischen CD45 mAk AICD45.2 (Maus IgG₁) als Isotypkontrolle. Der mAk 2A5 wurde in einer Konzentration von 2,5 µg in 200 µl PBS/Färbung und der mAk AICD45.2 wurde in einer Konzentration von 10 µg in 200 µl PBS/Färbung eingesetzt. Nach einstündiger Inkubation wurde überschüssiger Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Im Anschluß wurden die Präparate mit einem Peroxidase-markierten Sekundärantikörper (GoM-POD) in einer 1:50 Verdünnung für 30 min inkubiert. Darauf folgten drei Waschschrte mit PBS bevor die Präparate mit 3-Amino-9-Carbazol (AEC), einem Substrat der Peroxidase, inkubiert werden konnten. Dafür wurde für jedes Experiment eine AEC-Gebrauchslösung frisch angesetzt und filtriert. Diese setzte sich aus einer AEC-Stammlösung (4 mg AEC in 1 ml Dimethylformamid) zusammen, die 1:4 mit einem 100 mM Natriumacetatpuffer pH 5,2 verdünnt wurde, bevor schließlich 1 µl H₂O₂/ml der Gebrauchslösung hinzugefügt wurde. Zur Entwicklung wurden die Präparate bei RT für 15 min mit der AEC-Gebrauchslösung inkubiert. Im Anschluß wurden die Präparate mit Leitungswasser gewaschen und mit Hämalaun gegengefärbt. Dazu wurden die Präparate für 30 s in eine Hämalaunlösung (1:5 in PBS) gestellt und anschließend mehrfach mit Leitungswasser gespült. Nun konnten sie mit Hilfe von Kaisers-Glyceringelantine luftblasenfrei eingedeckt werden. Angefärbte CD45 Moleküle wurden mikroskopisch (Olympus BX40) visualisiert, fotografiert und bearbeitet.

3.9 Induktion homotypischer Lymphozytenaggregate

Zur Untersuchung einer Antikörper-induzierten Aggregatbildung von Schweinelymphozyten wurden die Zellen wie zuvor beschrieben mit Antikörpern vorbehandelt (3.4.1). Anschließend wurden 5×10^5 Zellen in 200 µl KM aufgenommen und in 96-Loch Flachbodenplatten pipettiert. Es folgte eine 24-stündige Inkubation im Brutschrank bevor die Bildung von Aggregaten mittels invertierter Kontrast-Phasen Mikroskopie beobachtet und fotografiert wurde.

3.10 Lyse von Schweinelymphozyten

Zur Solubilisierung von Proteinen – insbesondere Membranproteinen – vor einer Gelelektrophorese werden detergenzhaltige Puffer eingesetzt. Das Ausmaß der Solubilisierung ist abhängig von dem verwendeten Detergenz und der eingesetzten Ionenkonzentration. Das Detergenz dringt als amphiphiles Molekül in die Phospholipidschichten der Membran ein, während die Ionenkonzentration die ionischen Wechselwirkungen zwischen den Proteinen beeinflusst. Für die Analyse einzelner Proteine, die ohne assoziierte Proteine möglichst sauber isoliert werden sollen, wurde das Detergenz NP-40 benutzt.

Um gewünschte Proteine in unbehandelten und mAk-stimulierten (siehe 3.4.1) porzinen Lymphozyten analysieren zu können, wurden sie zunächst lysiert. Dazu wurden 2×10^6 Zellen in 15 μ l eiskaltem Lysepuffer aufgenommen. Der Lysepuffer enthielt 1% NP-40, 150 mM NaCl pH 7,4, die Kinase-Phosphatase-Inhibitoren EDTA (5 mM), Na_3VO_4 (1 mM) und NaF (10 mM) sowie 1 mM des allgemeinen Proteinase-Inhibitor PMSF und 10 mM des Redoxreagenz IAA. Die Lyse der Zellen fand für 45 min bei 4°C auf Eis statt. Nach dieser Inkubation wurden die Ansätze für 15 min bei 4°C und 8000 x g zentrifugiert. Der Überstand, der die Proteine enthielt, wurde anschließend abgenommen und im Verhältnis 1:2 mit zweifach konzentriertem Laemmli-Probenpuffer verdünnt. Dieser enthielt 400 mM DTT zur Spaltung von Disulfidbrücken und 2 % SDS, ein denaturierendes Detergenz, das den Proteinen eine negative Ladungen verleiht, sowie 100 mM Tris-HCl pH 6,8 und 20 % Glycerin. Als Farbmarker wurde 0,2 mg/ml Bromphenolblau eingesetzt, dieser erlaubte die Beobachtung der Lauffront in der anschließenden Polyacrylamidgelelektrophorese. Zum Abschluß der Lyse wurden die Proteine für 5 min bei 97°C im Thermostaten denaturiert.

3.11 Polyacrylamidgelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen mit SDS (SDS-PAGE)

Die Analyse von Proteinen aus Zellysaten erfolgte durch die Auftrennung des Proteingemisches in einer diskontinuierlichen Gelelektrophorese, die modifiziert nach der von Laemmli entwickelten Methode durchgeführt wurde. Durch die Bindung des im Laemmli-Probenpuffer enthaltenen anionischen Detergenz SDS an die Aminosäuren der Proteine erhalten diese eine negative Nettoladung, die alle nativen Ladungen überdeckt und in etwa proportional zu der Masse der Proteine ist. Die verschiedenen SDS-Protein-Komplexe wandern im elektrischen Feld zur Anode, wobei sich ihre Beweglichkeit R_f ($R_f = \text{zurückgelegte Strecke des Proteins} / \text{zurückgelegte Strecke der Lauffront}$) linear proportional zum Logarithmus der relativen Molekülmasse verhält. Durch das Mitführen von Standardproteinen bekannte Größe kann anhand einer Eichgeraden das Molekulargewicht unbekannter Proteine bestimmt werden.

Die Polyacrylamidgele bestanden aus einem 12,5 % igen Trenngel mit einem 5 % igen Sammelgel (Acrylamid / Bisacrylamid: 30,8T / 2,6C). Das Trenngel setzte sich aus 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,04 % TEMED und 0,04 % APS zusammen. Das Sammelgel bestand aus 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,06 % TEMED und 0,08 % APS. Zunächst wurde das Trenngel gegossen, das unter Luftabschluß auspolymerisierte. Darauf wurde das Sammelgel gegossen, in das ein Probenkamm eingepaßt wurde. Nach der Polymerisation wurden die Geltaschen mit dem Lysat aus 2×10^6 Zellen gefüllt. Als Elektrodenpuffer diente ein Einpuffersystem. Dieser Puffer bestand aus 25 mM Tris-HCl pH 8,3 zum Puffern, 0,1 % SDS und 192 mM Glycin. Zum Sammeln der Proteine wurde eine Stromstärke von 30 mA angelegt. Für die darauf folgende Auftrennung der Proteine im Gel wurde die Stromstärke auf 40 mA erhöht. Diese Werte beziehen sich auf zwei Gele. Die Auftrennung wurde beendet, kurz bevor die Lauffront aus dem Gel lief.

3.12 Westernblot

Mittels dieser Methode wurden die durch eine vorangegangene SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf einen Flächenträger gebracht und anschließend durch spezifische Antikörper nachgewiesen.

3.12.1 Proteintransfer auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran)

Die negativ geladenen Proteine wurden mittels des semi-dry Blotverfahrens auf eine PVDF-Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm transferiert. Der Transfer erfolgte orthogonal zur Elektrophorese-Laufrichtung, dabei befand sich die Membran auf der der Anode zugewandten Seite des Gels. Das Transferpuffersystem war diskontinuierlich. Es bestand aus drei verschiedenen Puffern, mit denen insgesamt 6 Filterpapiere getränkt wurden. Auf die Graphitanode wurden zwei Lagen puffergetränktes Filterpapier gelegt. Der Puffer enthielt 300 mM Tris-HCl sowie 20 % Methanol und hatte einen pH-Wert von 10,4. Darauf wurden eine Lage Filterpapier und die Membran gelegt, die mit einem zweiten Puffer (25 mM Tris-HCl, 20 % Methanol, pH 10,4) getränkt waren. Darauf wurde das Gel gelegt, das zuvor in einem dritten Puffer äquilibriert worden war. Dieser bestand aus 25 mM Tris-HCl, 20 % Methanol und 40 mM ε-Aminocapronsäure und hatte einen pH-Wert von 9,4. Mit diesem Puffer wurden außerdem drei weitere Lagen Filterpapier getränkt, die als Abschluß auf das Gel gelegt wurden. Das Methanol diente dem Fixieren der Proteine auf der Membran. Danach wurden Luftblasen zwischen den Lagen mit einem angefeuchteten Roller entfernt, bevor darauf die Graphitkathode gelegt wurde. An das Transfersystem wurde eine Stromstärke von 0,8 mA/cm² angelegt. Die Transferzeit betrug 1:30 Stunden bei konstanter Stromstärke.

3.12.2 Proteinnachweis mittels Ponceau-S-Lösung

Nach dem Transfer wurden die Proteine auf der PVDF-Membran durch eine unspezifische Proteinfärbung reversibel angefärbt. Dazu wurden die Membranen drei Sekunden in 0,2 % ige Ponceau-S-Lösung getaucht. Danach waren alle transferierten Proteinbanden auf der Membran sichtbar. Dieser Nachweis diente der Kontrolle des

ordnungsgemäßen Transfers. Nach der Färbung wurde die Ponceau-S-Lösung mit PBS + 0,1 % Tween 20 wieder von der Membran entfernt.

3.12.3 Proteinnachweis mittels verstärkter Chemilumineszenz-Reaktion (ECL)

Die Chemilumineszenz ist eine chemische Reaktion, die in einer Lichtemission resultiert. Diese Reaktion läuft zwischen einem Enzym, hier der Meerrettich-Peroxidase und einem chemilumineszierenden Molekül, wie dem Luminol, in Gegenwart von H_2O_2 ab. Luminol entwickelt aufgrund seiner Oxidation durch Sauerstoff, das bei der Meerrettich-Peroxidase-katalysierten Spaltung von H_2O_2 entsteht, eine intensive Chemilumineszenz. Durch die Zugabe eines Verstärkers kann die Lichtemission intensiviert und verlängert werden. Die ablaufende Reaktion kann durch das Auflegen eines Röntgenfilms auf den Blot detektiert werden.

Vor dem spezifischen Nachweis der Proteine mittels verstärkter Chemilumineszenz-Reaktion mußten freie Bindungsstellen auf der Membran blockiert werden, um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu verhindern, die zu Hintergrundfärbungen geführt hätten. Für den Nachweis von tyrosinphosphorylierten Proteinen wurde die Membran für 1 Stunde bei RT in PBS mit 0,05 % Tween 20 (PBS-T) mit 0.1 % Casein abgeblockt. Zur Färbung von α -Aktin wurde hierfür ein Milchblockpuffer (PBS + 0,05 % Tween + 3 % Milchpulver) verwendet. Danach wurde die Membran entweder über Nacht mit dem biotinylierten Primärantikörper 4G10-bio (1:1000 in 0,1% Caseinblockpuffer), der Tyrosinphosphorylierungen detektiert, oder dem unmarkierten polyklonalen α -Aktin mAk AC-40 (1:1200 in 3% Milchblockpuffer) bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurde ungebundener Antikörper, durch dreimaliges Waschen für 10 min mit PBS-T entfernt. Zum Nachweis von tyrosinphosphorylierten Proteinen wurde die Membran nun für 1:30 h unter Schwenken mit den Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (1:10.000 in PBS-T) inkubiert. Zur Detektion von α -Aktin wurde die Membran unter den gleichen Bedingungen mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (G α M-POD; 1:15000 in PBS-T) inkubiert. Im Anschluß an die Inkubation folgten nochmals drei Waschschrte mit PBS-T für jeweils 10 min. Danach folgte eine 5-minütige Inkubation in frisch angesetzter Substratlösung

(ECL-Dura West Detection-Kit von Pierce; 1:3 mit H₂O verdünnt), die H₂O₂ und Luminol (2-Aminophthalsäurehydrazid) enthält. Die feuchte Membran wurde anschließend luftblasenfrei mit Klarsichtfolie umgeben und je nach Stärke der Reaktion 30 s bis 60 min (in Abhängigkeit des eingesetzten Primärantikörpers) auf einem Röntgenfilm exponiert.

3.12.4 „Strippen“ der PVDF-Membran

Zum Nachweis quantitativ gleicher Proteinmengen, war es notwendig, nach der Detektion tyrosinphosphorylierter Proteine, auf derselben Membran das housekeeping protein α -Aktin nachzuweisen. Bei einem housekeeping protein handelt es sich um ein Protein, dessen Menge immer nahezu unverändert bleibt. Bevor jedoch ein weiterer Proteinnachweis auf der Membran erfolgen kann, muß zunächst der gebundene Antikörper der ersten Färbung entfernt werden. Dies ist durch die Inkubation der Membran mit einem „Stripping“-Puffer (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS und 100 mM β -Mercaptoethanol) möglich. Durch das SDS können die niederaffinen Antigen-Antikörper-Komplexe getrennt werden, während die qualitativ stärkere Bindung der Proteine an die Membran bestehen bleibt. Das β -Mercaptoethanol wirkt zudem reduzierend und fördert die Trennung der Antikörper von ihren Epitopen.

Zur Lösung der Antigen-Antikörper-Komplexe wurde die Membran für 30 min bei 50 bis 70°C in „Stripping“-Puffer inkubiert. Im Anschluß wurde der gelöste Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS-T für 5 min aus dem System entfernt während die Bindung der transferierten Proteine durch diese Prozedur nicht beeinträchtigt wurde. Der Erfolg des „Strippens“ wurde durch die Zugabe von ECL-Substratlösung und anschließender Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm überprüft. Nun konnte auf der Membran ein weiterer Proteinnachweis mittels verstärkter Chemilumineszenz-Reaktion durchgeführt werden.

3.13 Analyse der Genexpression

Zur Untersuchung der CD40, CD80 und CD86 Genexpression in porzinen Lymphozyten, wurden die Zellen, wie zuvor beschrieben, mit porzin-spezifischen Antikörpern vorinkubiert (siehe 3.4.1). Anschließend wurden 3×10^6 Zellen/ml in 24-Loch-Platten kultiviert. Nach 24 h Stimulation wurde die Gesamt-RNA aus den Lymphozyten isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe spezifischer Primer in einer semiquantitativen PCR analysiert. Auf diese Weise konnte die porzine CD40, CD80 und CD86 mRNA-Expression von unstimulierten und mAk-stimulierten porzinen Lymphozyten miteinander verglichen werden.

3.13.1 Isolierung von RNA

Nach ihrer Stimulation wurden 3×10^6 Schweinelymphozyten/ml zweimal mit TC199 gewaschen, in 250 μ l H₂O aufgenommen und mit 750 μ l peqGold TriFast™ gut durchmischt und für 5 min bei RT lysiert. Anschließend wurde 200 μ l Chloroform zu den Ansätzen gegeben und bei RT für 5 min bei 12000 x g zentrifugiert. Dieser Schritt diente zur Auftrennung der Lysate in eine obere wässrige Phase, in der sich die RNA befindet, eine Interphase, die die DNA enthält und eine untere proteinhaltige Phase. Die RNA-haltige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Präzipitation der RNA mit Isopropanol in einem Verhältnis von 1:2 versetzt. Das Präzipitat wurde für 15 min bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert. Anschließend konnte der Überstand verworfen und das Präzipitat zweimal in 75 % igem Ethanol für 8 min bei 7000 x g und 4°C gewaschen werden, um Verunreinigungen zu entfernen. Die RNA konnte nun an der Luft getrocknet werden. Danach wurde das trockene Pellet in 15 μ l RNase-freiem H₂O bei 57°C gelöst. Im Anschluß wurde die Konzentration der gelösten RNA photometrisch aus die Extinktion (E) bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorption von Nukleinsäuren) bestimmt (1 OD = 40 μ l/ml bei einer Schichtdicke von 1 cm). Zur Abschätzung von Proteinkontaminationen wurde außerdem der Quotient aus den Extinktionen bei 260 nm und 280 nm (Absorption von Proteinen) bestimmt.

3.13.2 Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die weitere Untersuchung der Gen-Expression wurde die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben. Die Reverse Transkription wurde nach Herstelleranweisung mit dem Script RT[®] Reverse Transkription Kit von CloneTech[®] durchgeführt. Dazu wurden 1-5 µg mRNA mit 100 µg/ml Hexanukleotiden auf ein Volumen von 11 µl H₂O gebracht und für 10 min bei 70 °C denaturiert. Für die anschließende Synthese der cDNA wurde zu allen Proben eines Experimentes ein „Mastermix“ pipettiert.

Dieser bestand aus:

- 1 µl 5x First-Strand Puffer
- 2 µl 10 mM dNTPs
- 2 µl 100 mM DTT (Dithiothreitol)

Der Mastermix wurde gut durchmischt und zu den denaturierten mRNA/Hexanukleotid-Ansätzen gegeben. Zum Start der Reaktion wurde 1 µl der Reversen Transkriptase Power Script RT[®] zu jedem Ansatz zugegeben. Nach einer 50–90-minütigen Inkubation bei 42 °C wurde die Transkriptase durch Erhitzen bei 70 °C für 15 min inaktiviert.

Zum Vergleich der CD40, CD80 und CD86 Genexpression in ruhenden porzinen Lymphozyten nach ihrer Stimulation mit dem CD45RA mAk MIL13 wurde die zuvor generierte cDNA mit Hilfe der PCR amplifiziert. Die Amplifikation wurde in 30 µl umfassenden Reaktionsansätzen bestehend aus:

- 2,5 µl cDNA
- 2 µl 10 x PCR-Puffer
- 0,4 µl dNTPs (jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
- 10 µM 5'- und 3'-Primern
- 5 U/ml Taq-DNA-Polymerase

Die Sequenzen der Primer sind im Folgenden dargestellt:

β-Aktin PCR-Primer

Als interner Standard der RT-Reaktion wurden Primer für einen 556 Basenpaare langen Abschnitt des konstitutiv exprimierten Gens β-Aktin (housekeeping gene) gewählt. In der PCR wurde das folgende Primerpaar mit einer Primerbindungstemperatur von 67°C verwendet:

β-Aktin, vorwärts Primer: 5'-TAC GTG GCC ATC CAG GCC GTG C-3'

β-Aktin, rückwärts Primer: 5'-TGA TCT CCT TCT GCA TCC TGT CG-3'

CD40 PCR-Primer

Dieses Primerpaar amplifiziert in der PCR einen 869 Basenpaare langen Abschnitt der porzinen CD40 cDNA. Für das folgende Primerpaar wurde eine Primerbindungstemperatur von 69°C gewählt:

CD40, vorwärts Primer: 5'-ATG GTT CGT CTG CCT CTG AAG TGT C-3'

CD40, rückwärts Primer: 5'-CCG TGC CTC CAC GCT CCT GGC C-3'

CD58 PCR-Primer

Dieses Primerpaar amplifiziert in der PCR einen 773 Basenpaare langen Abschnitt der porzinen CD58 cDNA. Für das folgende Primerpaar wurde eine Primerbindungstemperatur von 69°C gewählt:

CD58, vorwärts Primer: 5'-AGG ACG AAC CGC AAT GGC ATC GGG-3'

CD58, rückwärts Primer: 5'-ACC AGT GGA TGC TGG TTC TGT GGG-3'

CD80 PCR-Primer

Dieses Primerpaar amplifiziert in der PCR einen 936 Basenpaare langen Abschnitt der porzinen CD80 cDNA. Für das folgende Primerpaar wurde eine Primerbindungstemperatur von 69°C gewählt:

CD80, vorwärts Primer: 5'-CCA TCC TCA TCA AGC AGA AGC CAT G-3'

CD80, rückwärts Primer: 5'-CAA TCT GTG TCC ATC GAT GCT CTA G-3'

CD86 PCR-Primer

Dieses Primerpaar amplifiziert in der PCR einen 978 Basenpaare langen Abschnitt der porzinen CD86 cDNA. Für das folgende Primerpaar wurde eine Primerbindungstemperatur von 64°C gewählt:

CD86, vorwärts Primer: 5'-ATG GGA CTG AGT AAC ATT CTC TTT G-3'

CD86, rückwärts Primer: 5'-TTA AAA ATC TGT AGT ACT GTT GTC ATC
TGA GG-3'

Nach einer anfänglichen Denaturierung für 5 min bei 94°C wurden im Amplifikationszyklus folgende Zeiten und Temperaturen verwendet: Die vorwärts und rückwärts Primer binden für 60 s bei der angegebenen Primerbindungstemperatur des jeweiligen Primerpaares an ihre komplementären Sequenzabschnitte, die das zu amplifizierende cDNA-Fragment flankieren. Darauf folgte die Elongation für 60 s, zu der die Temperatur auf 72°C erhöht wurde. Anschließend wurde der nächste Zyklus durch eine weitere Denaturierung für 30 s bei 94°C eingeleitet. Die für die einzelnen PCR-Produkte geeignete Zyklenzahl wurde in Vorversuchen bestimmt. Zur Amplifikation von β -Aktin wurde der Zyklus 25-mal wiederholt. Zur Amplifikation der CD40, CD58 und CD86 PCR-Produkte wurde der beschriebene Zyklus 30-mal wiederholt während die CD80 cDNA in 33 Zyklen amplifiziert wurde. Im Anschluß an diese Zyklen folgte eine 5-minütige finale Elongation bei 72°C.

3.13.3 Auftrennung von cDNA-Fragmenten durch Agarosegel-Elektrophorese

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurden 2 %ige Agarosegele verwendet. Dazu wurden 2 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer (0,04 M Tris, 0,11 % Essigsäure, 1 mM EDTA) durch Aufkochen gelöst und mit 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt. Nach Abkühlen der Gellösung auf etwa 60°C wurde sie auf einen Gelträger gegossen und mit einem Kamm versehen. Nach dem Aushärten wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine Elektrophoresekammer mit 600 ml 1x TAE-Puffer gelegt. In die Geltaschen wurden 10 µl PCR-Produkt mit 4 µl Auftragspuffer (0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol und 30 % Glycerol) pipettiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte für 1,5 h bei einer konstanten Spannung von 60 V. Die erfolgreiche Amplifikation vollständiger PCR-Produkte wurde über einen Vergleich ihres Molekulargewichts mit einer DNA-Basenleiter als Standard kontrolliert. Ansätze, die direkt miteinander verglichen werden sollten, wurden gemeinsam amplifiziert und ausgewertet, um artifizielle Variationen bei der Amplifikation zu minimieren. Nach ihrer Auftrennung wurden die PCR-Produkte mit Hilfe der Eagle-Eye Dokumentationsanlage visualisiert. Mittels der integrierten Software konnte die Fluoreszenzintensität der sichtbaren Banden nach der Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz bestimmt werden.

Die PCR-Produkte verschiedener Proben können nicht direkt miteinander verglichen werden, da eine photometrische Bestimmung der RNA-Isolate nicht zwischen intakter und degradierter Nukleinsäure unterscheiden kann und bei der Reversen Transkription Variationen zwischen den einzelnen Proben auftreten können. Um die Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Proben zu erreichen, wird ein sogenanntes housekeeping gene als interner Standard in der PCR mitgeführt. Wird das housekeeping gene in den zu vergleichenden Proben in der PCR in vergleichbarer Menge amplifiziert, können die zu analysierenden PCR-Produkte miteinander verglichen werden. In dieser Arbeit diente β -Aktin als Standard. Im Rahmen der Dokumentation der PCR-Produkte am Eagle-Eye wurde der Quotient aus dem Fluoreszenzsignal für das zu analysierende PCR-Produkt und dem β -Aktin als Maß der Genexpression gebildet. Da in der vorliegenden Arbeit die Linearität der PCR-Reaktion selbst nicht kontrolliert wurde, werden die Ergebnisse als semiquantitativ bezeichnet.

3.14 Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde mit Hilfe des Programmes SPSS (SPSS Inc. USA) durchgeführt. Die Annahme der gleichen Varianz der Daten wurde mit einem Levene Median Test durchgeführt. Nach Feststellung der gleichen Varianz wurde für den Vergleich eines Parameters zwischen zwei Gruppen der gepaarte Student's Test (t-Test) herangezogen. Die Tests wurden auf einem Signifikanzniveau von 5% Irrtumswahrscheinlichkeit durchgeführt, was bedeutet, daß $P < 0,05$ als signifikant betrachtet wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Induktion der T-Zellaktivierung durch humane und porcine Lymphozyten

Um Wirkungen von Antikörpern gegen Zelloberflächenmoleküle des Schweins für eine Immunmodulation der xenogenen humanen T-Zellaktivierung beurteilen zu können, war es zunächst erforderlich, geeignete *in vitro* Testsysteme zur Induktion der Aktivierungsprozesse zu etablieren. Als Grundlage für die Stimulation der T-Zellen wurde die gemischte Lymphozytenkultur (MLC) gewählt, in der Gesamt-T-Zellpopulationen oder CD4⁺ T-Zellen als Responder und bestrahlte Schweinelymphozyten als Stimulatoren eingesetzt wurden. Darauf aufbauend sollten Fragen zur Stärke und Variabilität der xenogenen T-Zellproliferation, zur Zytokinproduktion durch aktivierte humane T-Zellen und zur Ausbildung von zytotoxischen Effektorzellen untersucht werden.

4.1.1 Proliferation humaner T-Zellen nach allogener und xenogener Stimulation

Um einen Eindruck über die Stärke von *in vitro* ausgelösten xenogenen Immunantworten zu gewinnen, wurde die Proliferation humaner T-Zellen als Antwort auf bestrahlte Schweinelymphozyten bestimmt und mit der Proliferation nach allogener Stimulation verglichen. Dazu wurden $0,5 - 6 \times 10^5$ T-Zellen mit 3×10^5 xenogenen oder allogenen Lymphozyten für 4 Tage kultiviert. Anschließend wurde [³H]-Thymidin in die Kultur gegeben und nach weiteren 16 h wurde der Thymidin-Einbau in die T-Zellen als Maß für die Proliferation gemessen (Abb. 4.1). Die T-Zellproliferation konnte durch allogene und xenogene Stimulatorzellen induziert werden, dabei stieg die proliferative Antwort in Abhängigkeit der Anzahl eingesetzter Responder-T-Zellen an. In dem dargestellten Experiment wiesen die Schweinelymphozyten ein etwas geringeres stimulatorisches Potential auf als die humanen Lymphozyten.

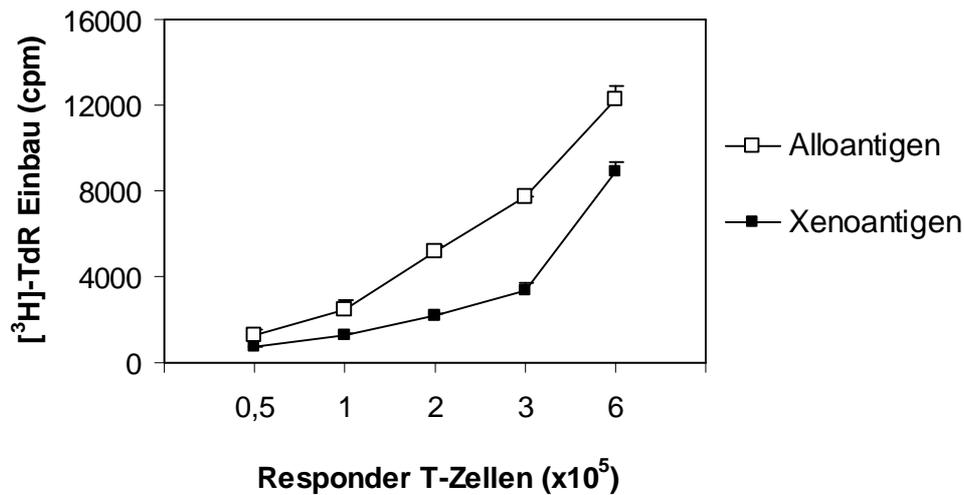


Abbildung 4.1: Induktion der humanen T-Zellproliferation durch Xenoantigen und Alloantigen

0,5 bis 6×10^5 frisch isolierte humane T-Zellen wurden gemeinsam mit 3×10^5 bestrahlten xenogenen Schweinelymphozyten (30 Gy) oder allogenen humanen Lymphozyten (50 Gy) kultiviert. Nach 4-tägiger Kultur wurde $[^3\text{H}]$ -Thymidin zugegeben und nach weiteren 16 h wurde der $[^3\text{H}]$ -TdR-Einbau in die humanen T-Zellen als Maß für die Proliferation bestimmt. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte aus Dreifachansätzen, gemessen in counts per minute (cpm) und deren Standardabweichung dar.

Auf der Basis des dargestellten Experimentes stellte sich die Frage, ob die porzinen Lymphozyten grundsätzlich ein geringeres Stimulatorpotential aufweisen als humane Lymphozyten und wie stark die T-Zellproliferation variiert. In Tabelle 4.1 ist die Proliferation humaner T-Zellen von fünf unterschiedlichen Blutspendern nach allogener und xenogener Stimulation zusammengefaßt. Die allogene T-Zellproliferation fiel in drei der fünf Experimente deutlich stärker aus als die xenogene T-Zellantwort. In einem weiteren Experiment unterschied sich die Intensität der Proliferation nach xenogener oder allogener Stimulation nur geringfügig und nur in einem der fünf Versuche proliferierten die T-Zellen stärker auf die xenogene Stimulation als auf die allogene Stimulation. Unter den hier eingesetzten experimentellen Bedingungen scheint die T-Zellantwort insgesamt auf Alloantigen etwas stärker auszufallen als die Reaktion auf Xenoantigen.

Tabelle 4.1: Vergleich der humanen T-Zellproliferation auf die Stimulation durch Alloantigen und Xenoantigen¹⁾

Experiment	Proliferation (cpm) auf		
	Medium	Alloantigen	Xenoantigen
1	147 ± 19 ²⁾	9677 ± 173	2446 ± 572
2	810 ± 54	16751 ± 723	22759 ± 2525
3	275 ± 58	32848 ± 2062	12992 ± 1988
4	223 ± 58	58304 ± 6033	25093 ± 3810
5	344 ± 108	95812 ± 6509	92941 ± 1358

¹⁾ 3×10^5 humane T-Zellen wurden mit gleicher Anzahl bestrahlter allogener oder xenogener Stimulatorzellen für 4 Tage kultiviert. Anschließend wurde den Ansätzen [³H]-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 16h wurde die Proliferation der T-Zellen über ihren [³H]-TdR-Einbau in cpm gemessen.

²⁾ Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen (cpm ± SD) aus Dreifachansätzen.

Die vorangegangenen Experimente geben keinen Aufschluß darüber, ob die dargestellte Variabilität der Proliferation auf die T-Zellen oder die xenogenen Stimulatoren zurückzuführen ist. Um einen Eindruck zu gewinnen, welche dieser Zellen die Reaktionsstärke der Proliferation beeinflussen, wurden T-Zellen aus dem Blut von drei Spendern isoliert und jeweils mit den Lymphozyten derselben zwei Schweine stimuliert. Abbildung 4.2 zeigt, daß die Stimulatorzellen beider Schweine proliferative T-Zellantworten induzieren konnten, wobei die Stimulatorzellen des zweiten Tieres die T-Zellen aller drei Spender stärker aktivierten als die Zellen des ersten Tieres. In geringerem Ausmaß variierte auch die Stärke der T-Zellproliferation zwischen den drei Blutspendern als Antwort auf ihre Stimulation durch die Lymphozyten desselben Tieres. Insgesamt weist dieser Vergleich darauf hin, daß die Herkunft der porzinen Stimulatorzellen die Intensität der Proliferation stärker beeinflußt als die Herkunft der T-Zellen.

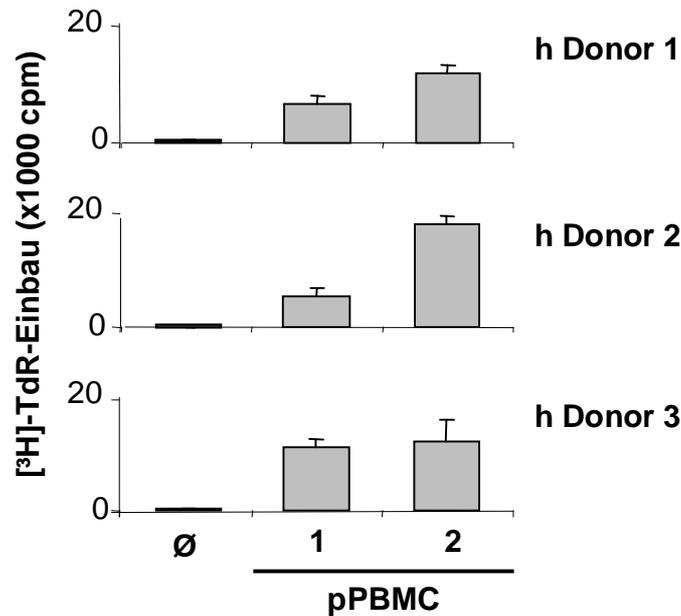


Abbildung 4.2: Stärke der humanen anti-porzinen T-Zellproliferation in Abhängigkeit des T-Zell- und Stimulatorzellspenders

3×10^5 humane T-Zellen von drei unterschiedlichen Spendern (h Donor) wurden mit Medium allein (\emptyset) und jeweils mit 3×10^5 bestrahlten xenogenen Stimulatorzellen (p PBMC) von zwei verschiedenen Spendertieren für 4 Tage kultiviert. Anschließend wurde den Ansätzen $[^3\text{H}]$ -Thymidin zugesetzt und nach weiteren 16 h wurde die Proliferation der T-Zellen über ihren $[^3\text{H}]$ -TdR-Einbau in cpm gemessen. Aus Dreifachansätzen wurden die Mittelwerte sowie deren Standardabweichungen bestimmt.

Nachdem gezeigt werden konnte, daß die humane anti-porzine T-Zellproliferation in dem gewählten Testsystem effektiv induziert werden kann, stellte sich vor dem Hintergrund, daß nach einer Transplantation die Empfänger- CD4^+ T-Zellen maßgeblich an der zellulären Organabstoßung beteiligt sind (33), die Frage, in welchem Umfang humane CD4^+ T-Zellen durch porzine Lymphozyten aktiviert werden können. Dazu wurden die Gesamt-T-Zellen und, nach Depletion von CD8^+ Zellen, CD4^+ T-Zellen aus dem Blut von drei Spendern isoliert, und die Proliferation dieser Zellen wurde als Antwort auf eine xenogene Stimulation miteinander verglichen.

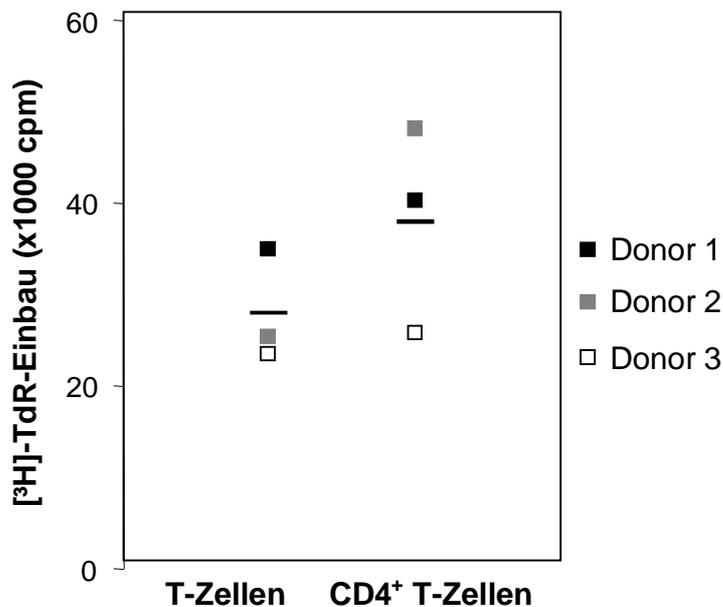


Abbildung 4.3: Vergleich der proliferativen Antwort von Gesamt-T-Zellen und daraus angereicherten CD4⁺ T-Zellen auf ihre Stimulation durch Xenoantigen

3×10^5 frisch isolierte humane Gesamt-T-Zellen (links) oder CD4⁺ T-Zellen (rechts) wurden mit 3×10^5 bestrahlten xenogenen Schweinelymphozyten (30 Gy) kultiviert. Nach 4-tägiger Kultur wurde [³H]-Thymidin zugegeben und nach weiteren 16 h wurde der [³H]-TdR-Einbau in humane T-Zellen bestimmt. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte, gemessen in counts per minute (cpm), von Dreifachansätzen aus drei unabhängigen Experimenten dar. Der Balken stellt die mittlere proliferative Antwort aus den drei gezeigten Einzelexperimenten dar.

Die angereicherten CD4⁺ T-Zellen aller drei Spender proliferierten stark als Antwort auf die xenogene Stimulation (Abb. 4.3). Im Durchschnitt erhöhte sich die Proliferation der CD4⁺ T-Zellpopulation um 40 % im Vergleich zu der Gesamt-T-Zellpopulation. Diese Experimente zeigen, daß CD4⁺ T-Zellen als Antwort auf ihre xenogene Stimulation stark aktiviert werden können und weisen darauf hin, daß diese Zellen auch in diesem experimentellen *in vitro* Testsystem bei der Induktion humaner anti-porziner Immunantworten eine bedeutende Rolle spielen.

4.1.2 Analyse von Effektorfunktionen nach T-Zellstimulation durch Xenoantigen

Die zuvor dargestellte Induktion der T-Zellproliferation weist auf funktionelle Kompatibilitäten zwischen humanen Zelloberflächenmolekülen und ihren Liganden auf der Seite der porzinen Lymphozyten hin. Diese Untersuchungen zeigen aber nicht, ob die Intensität der Stimulation ausreicht, um die Bildung von Effektorfunktionen zu induzieren, die nicht zwangsläufig mit einer proliferativen Antwort einhergeht. Um diese Frage zu klären, wurde die Zytokinproduktion der T-Zellen und die Bildung zytotoxischer T-Effektorzellen als Antwort auf die xenogene Stimulation untersucht.

4.1.2.1 Zytokinexpression nach allogener und xenogener Stimulation

Im Rahmen von T-Zellaktivierungsprozessen kommt es zur Freisetzung von Zytokinen, die die weitere Immunantwort beeinflussen, indem sie auf die Proliferation und die Differenzierung der T-Zellen selbst und weiterer Immunzellen einwirken. Um zu überprüfen, in welchem Umfang T-Zellen nach ihrer allogenen und xenogenen Aktivierung Zytokine produzieren, wurden die Konzentrationen der Th1-Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2 sowie der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 nach einer dreitägigen Stimulation durchflußzytometrisch im Zellkulturüberstand bestimmt (Abb. 4.4). Die Diagramme in der oberen Hälfte zeigen die Konzentrationen der Th1-Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2. IFN- γ wurde sowohl nach allogener als auch nach xenogener T-Zellstimulation in sehr hohen Konzentrationen nachgewiesen, wobei die T-Zellen nach xenogener Stimulation deutlich höhere Mengen IFN- γ produzierten als nach allogener Stimulation. IL-2 wurde ebenfalls nach der Aktivierung durch Xenoantigen vermehrt produziert, allerdings nicht in so großen Mengen wie IFN- γ . TNF- α konnte als einziges Th1-Zytokin in drei von vier Experimenten nach allogener T-Zellaktivierung in einer höheren Konzentration nachgewiesen werden.

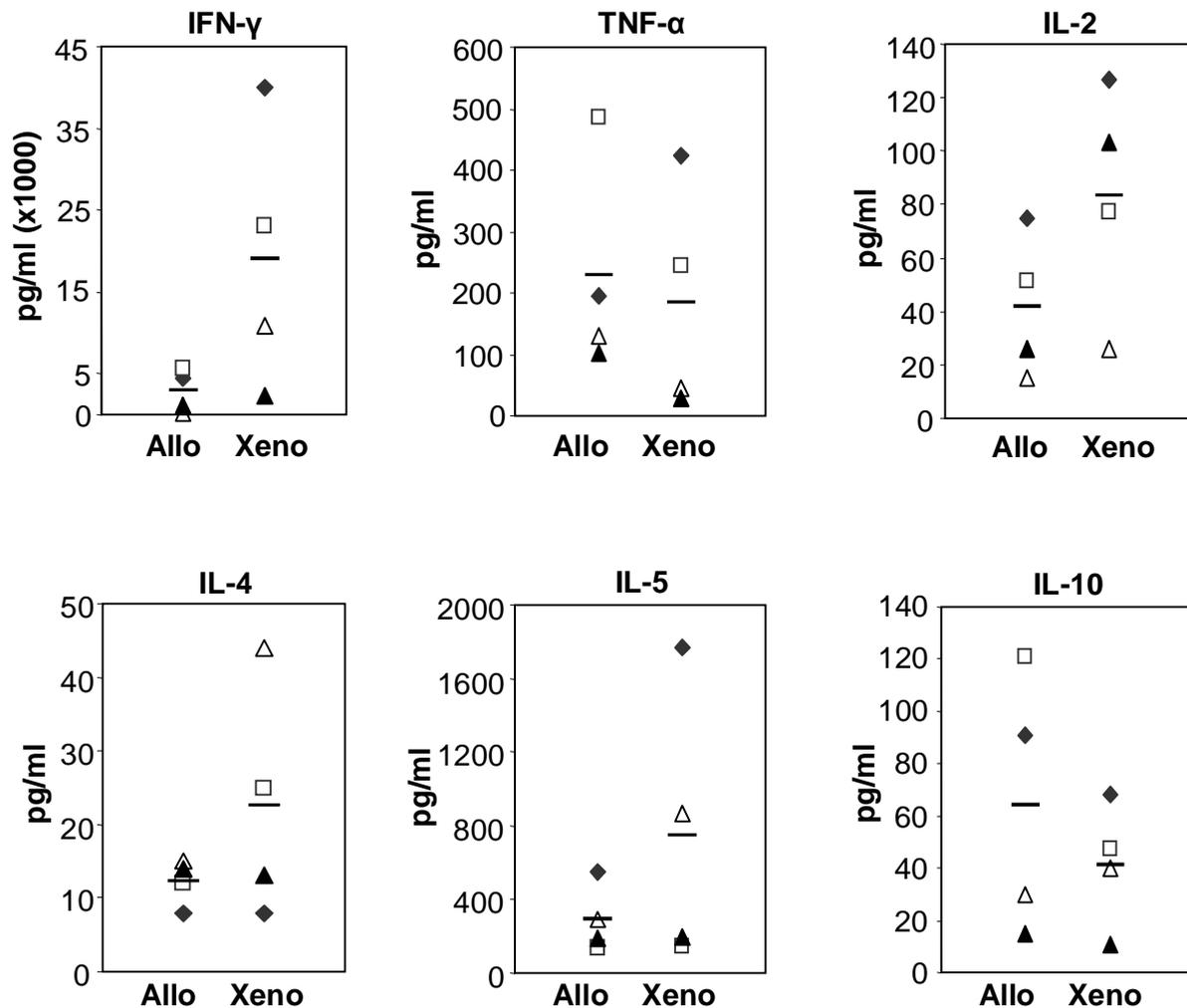


Abbildung 4.4: Vergleich der Zytokinproduktion nach allogener und xenogener T-Zellstimulation

3×10^5 humane T-Zellen wurden für drei Tage mit gleicher Anzahl bestrahlter humaner (Allo) oder porziner (Xeno) Stimulatorzellen aktiviert. Mit dem CBA Assay (*cytokine bead array*) wurden anschließend die Konzentrationen der Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5 und IL-10 im Kulturüberstand ermittelt. Dargestellt sind die Zytokin-Konzentrationen die aus 4 unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen T-Zellspendern ermittelt wurden. Die einzelnen Experimente sind durch verschiedene Symbole gekennzeichnet. In allen vier Versuchen wurden unterschiedliche Stimulatoren eingesetzt. Die Mittelwerte aus diesen Versuchen sind als Balken in den Diagrammen dargestellt.

In der unteren Bildhälfte sind die Konzentrationen der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 dargestellt. T-Zellen produzierten als Antwort auf beide Stimuli IL-4 Mengen, die in allen allogenen und zwei der vier xenogenen Ansätzen unterhalb des mitgeführten Standards (20 pg/ml) lagen. Dagegen wurde IL-5 nach allogener und xenogener T-Zellaktivierung

in sehr hohen Konzentrationen in den Kulturüberständen nachgewiesen. Der Vergleich zwischen der allogenen und xenogenen Stimulation zeigte, daß die T-Zellen nach xenogener Aktivierung IL-5 entweder in vergleichbarer oder erhöhter Menge produzierten. IL-10 war das einzige Th2-Zytokin, das in drei von vier Ansätzen nach der Allostimulation in erhöhter Konzentration nachgewiesen wurde. Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, daß bei der xenogenen T-Zellaktivierung deutlich stärkere Th1 Immunantworten ausgelöst werden als bei der allogenen Aktivierung. Dies zeigte sich insbesondere für die Freisetzung der Th1-Zytokine IFN- γ und IL-2.

Da verschiedene Zytokine in der Kombination Mensch/Schwein Spezies-übergreifend wirksam sind, wurde überprüft, ob das Testsystem human-spezifisch ist oder ob es durch Kreuzreaktionen mit porcinen Zytokinen beeinflusst wird. Dazu wurde untersucht, ob in den Kulturüberständen von ConA-aktivierten porcinen T-Zellen mit dem CBA-Kit durchflußzytometrisch Zytokine nachweisbar sind. Diese Kontrollexperimente ergaben keine Reaktivität der CBA-Methode mit den Überständen der aktivierten porcinen T-Zellen. Man kann daher davon ausgehen, daß in den oben dargestellten xenogenen Kokulturen ausschließlich die Zytokinproduktion der humanen T-Zellen gemessen wurde.

4.1.2.2 Bildung zytotoxischer Effektorzellen

Nachdem gezeigt werden konnte, daß humane T-Zellen als Antwort auf die xenogene Stimulation Zytokine sezernierten, stellte sich die Frage, ob sich zytotoxische Effektorfunktionen entwickeln. Zur Beantwortung dieser Frage wurden ^{51}Cr -Freisetzungstests durchgeführt, in denen humane Lymphoblasten nach sechstägiger Stimulation durch Xenoantigen als Effektorzellen eingesetzt wurden. Als Zielzellen dienten porcine ConA-aktivierte Lymphozyten. Zur Kontrolle wurden außerdem ruhende humane Lymphozyten als Effektorzellen mitgeführt.

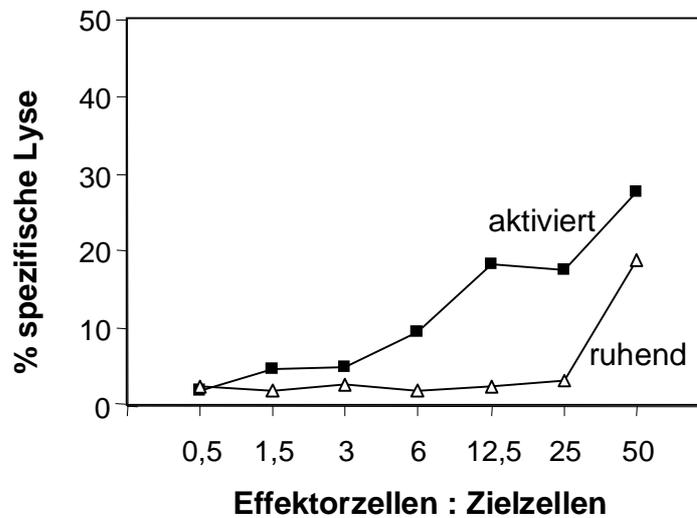


Abbildung 4.5: Spezifische Lyse porciner Zielzellen durch humane Lymphozyten

Humane Lymphozyten wurden für 6 Tage mit bestrahlten Schweinelymphozyten in einer MLC kultiviert und als Effektorzellen zur Lyse von ^{51}Cr -markierten Zielzellen desselben Spenders eingesetzt (geschlossene Quadrate). Als Kontrolle dienten ruhende humane Lymphozyten (offene Dreiecke). Nach 4 h wurde freigesetztes ^{51}Cr aus dem Kulturüberstand bestimmt, die Mittelwerte aus Dreifachansätzen gebildet und die spezifische Lyse berechnet (siehe 3.6).

Abbildung 4.5 zeigt, daß die aktivierten Effektorzellen porcine Lymphozyten in Abhängigkeit des Verhältnisses der Effektorzellen zu den Zielzellen lysieren konnten. Ruhende humane Lymphozyten lysierten die Zielzellen dagegen nur wenig effektiv. Vergleichbare Ergebnisse wurden in zwei weiteren Experimenten erzielt. Diese Daten weisen darauf hin, daß es im Rahmen der Aktivierung humaner T-Zellen durch porcines Xenoantigen nicht nur zur Proliferation und Zytokinproduktion kommt, sondern auch zur Ausbildung von zytotoxischen Effektorzellen.

4.2 Charakterisierung von T-Zellantworten nach einer Antikörper-vermittelten Blockade porciner Zelloberflächenmoleküle

Im vorangegangenen Abschnitt wurde beschrieben, daß humane T-Zellen *in vitro* vollständig durch Xenoantigen des Schweins aktiviert werden können. Dies spricht dafür, daß die Interaktionen zwischen dem humanen T-Zell-Rezeptor (TcR) und dem porcinen MHC-Peptid-Komplex („Signal 1“ der T-Zellaktivierung) sowie zwischen den kostimulatorischen Molekülen und ihren Liganden („Signal 2“) über diese Speziesbarriere hinweg funktionell sind. Vor diesem Hintergrund könnte die Möglichkeit zur Inhibition der humanen T-Zellaktivierung durch eine mAk-vermittelte Blockade dieser Interaktionen bestehen. Im Folgenden wurde daher untersucht, welchen Einfluß eine Blockade der TcR:MHC, CD40L:CD40 und CD28:CD80/86 Interaktionen auf die T-Zellproliferation hat.

4.2.1 Reaktionsmuster der Reagenzien auf porcinen und humanen Lymphozyten

Für die Beurteilung einer Antikörper-vermittelten Manipulation der xenogenen T-Zellproliferation, war es zunächst erforderlich das Reaktionsmuster der eingesetzten Reagenzien zu überprüfen (Abb.4.6). Die durchflußzytometrische Analyse zeigte, daß die verwendeten monoklonalen Antikörper gegen porcine MHC Klasse-I (74-11-10; Maus anti-porzin; IgG_{2a}) und Klasse-II (MSA3; Maus anti-porzin; IgG_{2b}) Moleküle ausschließlich Zielstrukturen auf Schweinelymphozyten detektierten und somit Spezies-spezifisch waren. Für die Bindung an porcine CD80 und CD86 sowie CD40 Moleküle stehen derzeit keine Spezies-spezifischen Reagenzien zur Verfügung. Diese Moleküle weisen aber hohe Sequenzhomologien zu ihren humanen Gegenstücken auf. Mit dem anti-humanen CD40 mAk G28-5 (Maus anti-human; IgG₁) und dem rekombinanten humanen (rhu) Fusionsprotein CTLA-4-Ig (human; IgG₁), das aus CTLA-4, dem physiologischen Liganden von CD80 und CD86 Molekülen und humanem Ig besteht, waren Reagenzien verfügbar, die mit den entsprechenden Molekülen auf Schweinelymphozyten kreuzreagierten. Ferner konnte gezeigt werden, daß diese

potentiellen Zielmoleküle unterschiedliche Expressionsmuster auf porzinen Lymphozyten aufwiesen. Während MHC Klasse-I auf allen Lymphozyten exprimiert wurden, konnten MHC Klasse-II, CD40 und CD80/86 Moleküle, wie erwartet nur auf Lymphozytensubpopulationen detektiert werden.

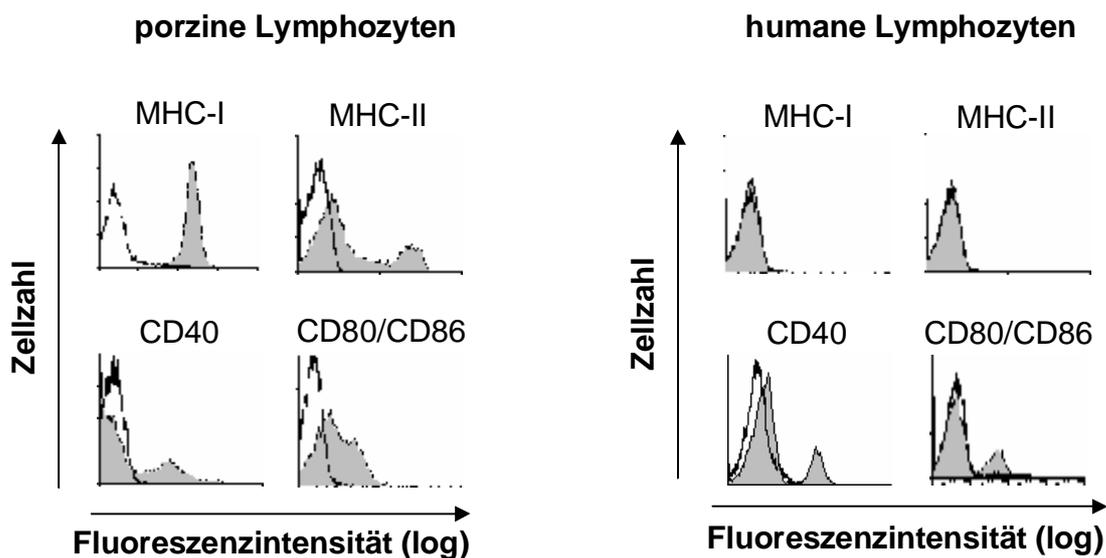


Abbildung 4.6: Antikörper-Reaktivität auf porzinen und humanen Lymphozyten

Zur Untersuchung der Spezies-Spezifität von Antikörpern gegen MHC Klasse-I (74-11-10) und Klasse-II (MSA3) Moleküle sowie CD40 (G28-5) und CD80/CD86 (rho CTLA-4-Ig) Moleküle wurde ihre Reaktivität auf 5×10^5 porzinen und humanen Lymphozyten über einen FITC-konjugierten Sekundärantikörper nachgewiesen. Die durchflußzytometrische Analyse wurde im FACSCalibur durchgeführt. Ausgefüllte Kurven zeigen die Reaktivitäten gebundener Antikörper. Unausgefüllte Kurven stellen als Negativkontrolle die Fluoreszenzintensität des Sekundärantikörpers dar.

4.2.2 Antikörper-vermittelte Blockade von „Signal 1“-erzeugenden Interaktionen

Zur Untersuchung der Effektivität einer Antikörper-vermittelten Blockade der „Signal 1“-induzierenden porzinen MHC Klasse-I und Klasse-II Moleküle wurden zwei unterschiedliche experimentelle Zugänge gewählt, in denen die Antikörper entweder direkt in die Kultur gegeben wurden oder die Stimulatorzellen vor der Kokultur mit diesen

Antikörpern vorinkubiert wurden. Neben der modulatorischen Fähigkeit der mAk sollte die Effizienz dieser beiden Testsysteme miteinander verglichen werden.

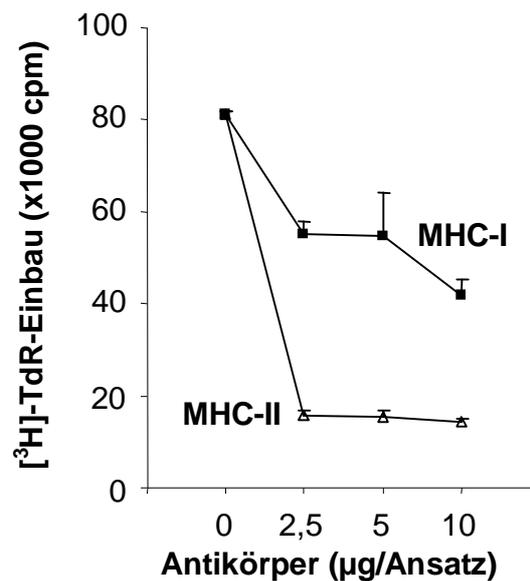


Abbildung 4.7: Reduktion der xenogenen humanen T-Zellproliferation in Anwesenheit von Antikörpern gegen porcine MHC Moleküle

3×10^5 humane T-Zellen wurden mit gleicher Anzahl bestrahlter porciner Stimulatorzellen für 4 Tage in Anwesenheit der angegebenen Konzentrationen des MHC Klasse-I mAk 74-11-10 (Maus anti-porzin; IgG_{2b}) und des MHC Klasse-II mAk MSA3 (Maus anti-porzin; IgG_{2a}) in der Kultur stimuliert. Anschließend wurde 1 µCi [³H]-Thymidin zu der Kultur gegeben und nach weiteren 16 h wurde die humane T-Zellproliferation über den [³H]-TdR Einbau bestimmt. Die Ergebnisse zeigen die mittlere Proliferation \pm der Standardabweichung aus Dreifachwerten (cpm \pm SD) eines Einzelexperimentes.

Abbildung 4.7 zeigt die humane anti-porzine T-Zellproliferation in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des MHC Klasse-I mAk 74-11-10 (Maus anti-porzin; IgG_{2a}) und des MHC Klasse-II mAk MSA3 (Maus anti-porzin; IgG_{2b}) in der Kultur. Die T-Zellproliferation wurde in Anwesenheit beider Antikörper dosisabhängig reduziert. Dabei wurde nach der Bindung von MSA3 an MHC Klasse-II Moleküle eine deutlich stärkere Reduktion der Proliferation festgestellt, die schon in der geringsten eingesetzten Konzentration von 2,5 µg mAk/Ansatz 81 % ausmachte. Vergleichbare

Resultate wurden in zwei weiteren Experimenten erzielt, in denen die maximale Reduktion der Proliferation zwischen 60 % und 80 % lag. Der MHC Klasse-I mAk 74-11-10 reduzierte die T-Zellaktivierung insgesamt weniger stark. Dieser Antikörper musste in deutlich höheren Dosen in die Kultur titriert werden, um eine Verminderung der Proliferation um maximal 51 % zu erreichen (10 µg/Ansatz). In weiteren Experimenten konnte eine vergleichbare Dosis-Wirkungskurve des mAk gezeigt werden, allerdings variierte die Stärke der 74-11-10-vermittelten Reduktion der T-Zellproliferation mit Maxima von 26 % bis 50 % zwischen den einzelnen Experimenten beträchtlich.

Nachdem gezeigt werden konnte, daß die Blockade der Interaktionen zwischen dem humanen TcR und porzinen MHC Molekülen die T-Zellproliferation effektiv reduzieren konnte, wurde in einer weiteren Versuchsreihe der Einfluß der Vorinkubation der Stimulatoren mit sättigenden Mengen der MHC mAk bestimmt (Abb. 4.8). Die linke Darstellung zeigt, daß die T-Zellproliferation durch MHC Klasse-I mAk-vorbehandelte porcine Lymphozyten nicht signifikant reduziert wurde. Insgesamt führte die Blockade der TcR:MHC-I Interaktionen in diesen Ansätzen nur zu einer milden Reduktion der Proliferation um 10 ± 5 %. Die Vorbehandlung der Schweinelymphozyten mit dem MHC Klasse-II mAk führte dagegen zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation um durchschnittlich 51 ± 14 % (Abb. 4.8 rechts). Um sicherzustellen, daß die beobachtete Reduktion der Proliferation in Anwesenheit der Antikörper nicht auf den Antikörper-Isotyp, sondern auf die Bindung der Antikörper an die porzinen Moleküle zurückzuführen ist, wurden anti-porcine CD4 und CD8 mAk in den Experimenten als Isotypkontrollen mitgeführt. Der CD4 mAk MIL17 weist, wie der MHC Klasse-I mAk 74-11-10, den IgG_{2a} Isotyp auf und der CD8 mAk MIL12 ist, wie der MHC Klasse-II mAk MSA3, vom IgG_{2b} Isotyp. Diese mAk konnten die T-Zellproliferation kaum beeinflussen.

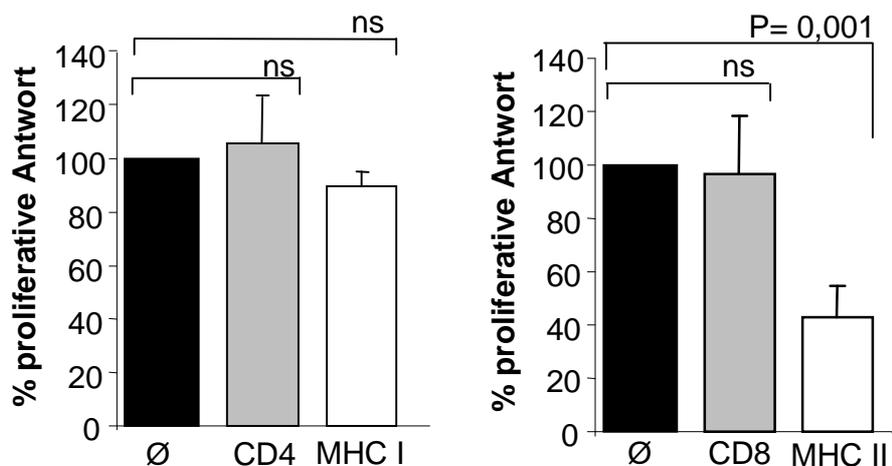


Abbildung 4.8: Modulation der xenogenen humanen T-Zellproliferation nach Vorbehandlung porziner Stimulatorzellen mit anti-porzinen CD4, CD8 und MHC Antikörpern

3×10^5 humane T-Zellen wurden mit gleicher Anzahl bestrahlter porziner Stimulatorzellen in gemischten Lymphozytenkulturen stimuliert. Die Stimulatorzellen blieben unbehandelt (\emptyset) oder wurden vor dem Einsatz in die MLC mit sättigenden Konzentrationen porzin-spezifischer mAk gegen MHC Klasse-I und CD4 (74-11-10 und MIL17; beide Maus IgG_{2b}) sowie gegen MHC Klasse-II und CD8 (MSA3 und MIL12; beide Maus IgG_{2a}) für 30 min auf Eis vorinkubiert. Nach 4-tägiger Kultur wurde 1 μ Ci [3 H]-Thymidin zu den Kulturen gegeben und nach weiteren 16 h wurde die humane T-Zellproliferation über den [3 H]-TdR Einbau bestimmt. Die Ergebnisse zeigen relative Proliferation \pm der Standardabweichung im Vergleich zur Proliferation ohne mAk-Vorbehandlung (100%) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

In den folgenden Experimenten wurde zur Testung von Antikörperwirkungen ausschließlich die Vorinkubationsmethode eingesetzt. Dies schien auch unter dem Aspekt den Vorteil zu haben, daß dadurch hohe Proteinkonzentrationen in der Kultur vermieden werden konnten, die möglicherweise einen unspezifischen Einfluß auf T-Zellreaktivität haben könnten.

4.2.3 Antikörper-vermittelte Blockade von „Signal 2“-erzeugenden Interaktionen

Zur weiteren Bearbeitung der Frage, ob humane anti-porzine T-Zellantworten durch eine Antikörper-vermittelte Blockade von Interaktionen zwischen humanen und porzinen Zelloberflächenmolekülen reduziert werden können, wurde die Wirkung der Blockade von „Signal 2“-induzierenden porzinen CD40 und CD80/CD86 Moleküle durch den CD40 mAk G28-5 (Maus anti-human; IgG₁) und das rhu Fusionsprotein CTLA-4-Ig (human; IgG₁) untersucht. Um mögliche Bindungen dieser kreuzreaktiven Reagenzien an humane Zelloberflächenmoleküle zu verhindern, wurden hier ausschließlich porzine Stimulatoren in die Kokultur eingesetzt, die mit den Reagenzien vorinkubiert worden waren (Abb. 4.9).

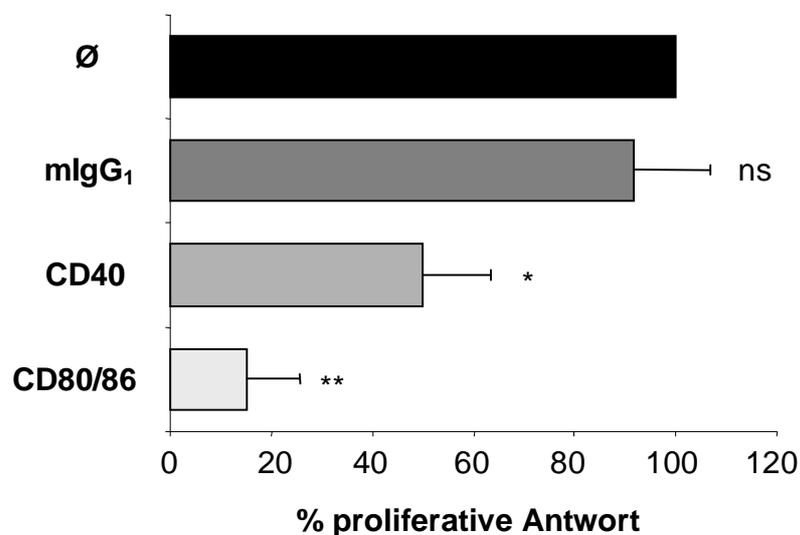


Abbildung 4.9: Vergleich der humanen anti-porzinen T-Zellproliferation nach Antikörperbindung an porzine CD40 und CD80/CD86 Moleküle

Jeweils 3×10^5 humane T-Zellen und bestrahlte porzine Lymphozyten wurden gemeinsam kultiviert. Die Stimulatoren blieben unbehandelt (\emptyset) oder wurden mit sättigenden Konzentrationen des CD40 mAk G28-5 (mIgG₁) und des Fusionsproteins CTLA-4-Ig (rhu IgG₁) für 30 min auf Eis vorinkubiert. Zur Kontrolle der Spezifität der Modulation wurde ein irrelevanter Antikörper des gleichen Isotyps (R73; mIgG₁) mitgeführt. Nach 4-tägiger Kultur wurde 1 μ Ci [³H]-Thymidin für 16 h zu den Ansätzen gegeben bevor der [³H]-TdR Einbau gemessen wurde. Die Ergebnisse sind als relative Proliferation \pm der Standardabweichung im Vergleich zur Proliferation ohne mAk-Vorbehandlung (100%) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Ns= nicht signifikant; *P<0,05, **P<0,01 für die dargestellte Versuchsgruppe im Vergleich zu humanen T-Zellen mit unbehandelten porzinen Stimulatorzellen.

Fehlte den T-Zellen bei ihrer xenogenen Stimulation das kostimulatorische Signal durch porcine CD40 und CD80/86 Moleküle, kam es zu einer Reduktion der Proliferation. Dabei inhibierte die Vorbehandlung der Stimulatoren mit dem CD40 mAk (IgG₁) die Proliferation durchschnittlich um 50 ± 13 % des Ausgangswertes. Nach der Bindung von CTLA-4-Ig an porcine CD80/86 Moleküle wurde die Proliferation noch effektiver inhibiert (85 ± 11 %). Der Isotyp-Kontroll Antikörper R73 (IgG₁) reduzierte die Proliferation nicht. Demnach kann die xenogene T-Zellaktivierung durch eine selektive Blockade kostimulatorischer Rezeptor:Ligand Interaktionen sehr effektiv inhibiert werden. Dies gilt insbesondere für die CTLA-4-Ig-vermittelte Blockade der CD28:CD80/86 Interaktionen auf der Seite der porcinen CD80/86 Moleküle.

4.2.4 Expressionsmuster immunmodulatorisch interessanter Zielmoleküle auf porcinen Endothelzellen

Ausgehend von der Überlegung, daß mögliche therapeutisch einzusetzende Antikörper nach ihrer Bindung an Oberflächenmoleküle auf porcinen Endothelzellen das humane Komplementsystem aktivieren dürften, wurde die Expression von MHC Molekülen sowie von CD40 und CD80/CD86 auf primären Endothelzellen des Schweins untersucht. Dazu wurde die Expression auf ruhenden und IFN- γ -aktivierten primären Endothelzellen durchflußzytometrisch untersucht (Abb.4.10). Die Histogramme in der oberen Reihe zeigen, daß ruhende porcine Endothelzellen ausschließlich MHC-Klasse-I Moleküle exprimierten. Erst nach einer IFN- γ -induzierten Aktivierung dieser Zellen konnten, neben MHC Klasse-I Molekülen, auch MHC Klasse-II Moleküle und die kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD80/CD86 detektiert werden. CD45 Moleküle waren dagegen weder auf ruhenden noch IFN- γ -aktivierten Endothelzellen des Schweins durchflußzytometrisch nachweisbar.

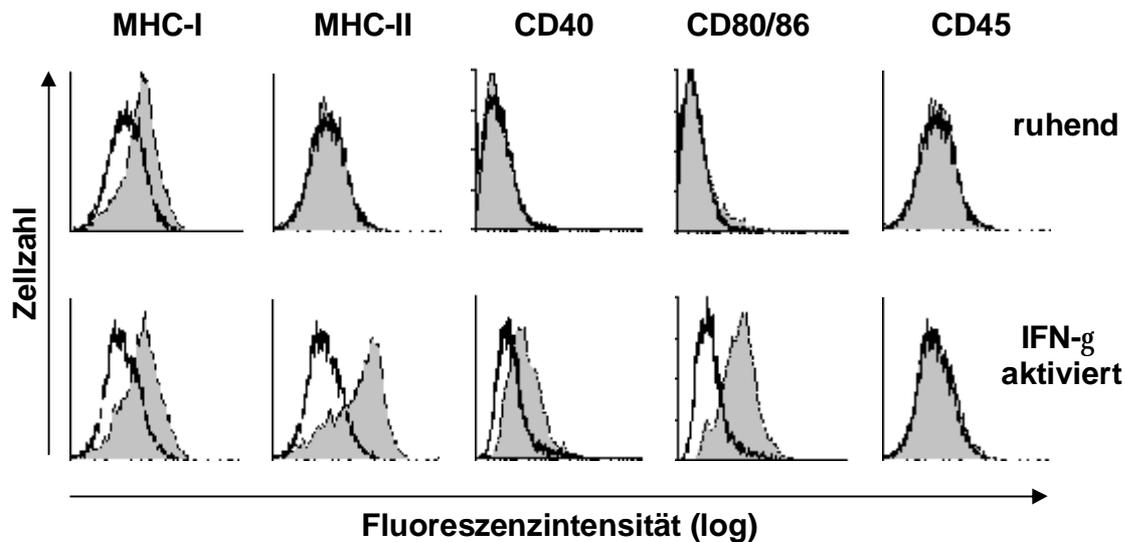


Abbildung 4.10: MHC Klasse-I, Klasse-II, CD40, CD80/86 und CD45 Expression auf ruhenden und IFN-g-aktivierten primären porzinen Endothelzellen

Ruhende und drei Tage IFN- γ behandelte primäre Endothelzellen des Schweins wurden mit unmarkierten Antikörpern gegen MHC Klasse-I, Klasse-II, CD40, CD80/86 und CD45 Moleküle inkubiert. Die Oberflächemoleküle wurden mittels eines FITC-markierten Sekundärantikörpers in FACSCalibur durchflußzytometrisch nachgewiesen. Die ausgefüllten Histogramme zeigen die Reaktivität der primären Antikörper und die ungefüllten Histogramme die Reaktivität des Sekundärreagens als Negativkontrolle.

Die fehlende CD45 Expression auf den ruhenden und kultivierten porzinen Endothelzellen wies darauf hin, daß diese Moleküle interessante Zielstrukturen für eine Antikörper-vermittelte Manipulation der humanen T-Zellaktivierung sein könnten. Um einen Eindruck zum *in vivo* Expressionsmuster von CD45 Molekülen auf Endothelien zu bekommen, wurden immunhistologische Färbungen an porzinen Herzschnitten durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden Milzschnitte untersucht, in denen CD45 positive Leukozyten vorhanden sein sollten. Mit Hilfe eines anti-porzinen CD45 mAk (Maus anti-porzin IgG₁) konnten in der oberen Bildhälfte von Abbildung 4.11 CD45 Moleküle auf den Lymphozyten innerhalb eines Milzpräparates, rot dargestellt, nachgewiesen werden. In der unteren Abbildung konnte die fehlende CD45 Expression auf porzinen Endothelzellen eines Herzblutgefäßes immunhistologisch bestätigt werden. Diese Färbungen waren spezifisch für den CD45 mAk, da ein Kontrollantikörper (Maus anti-human IgG₁) nicht mit porzinen Oberflächemolekülen innerhalb des Präparates reagieren konnte.

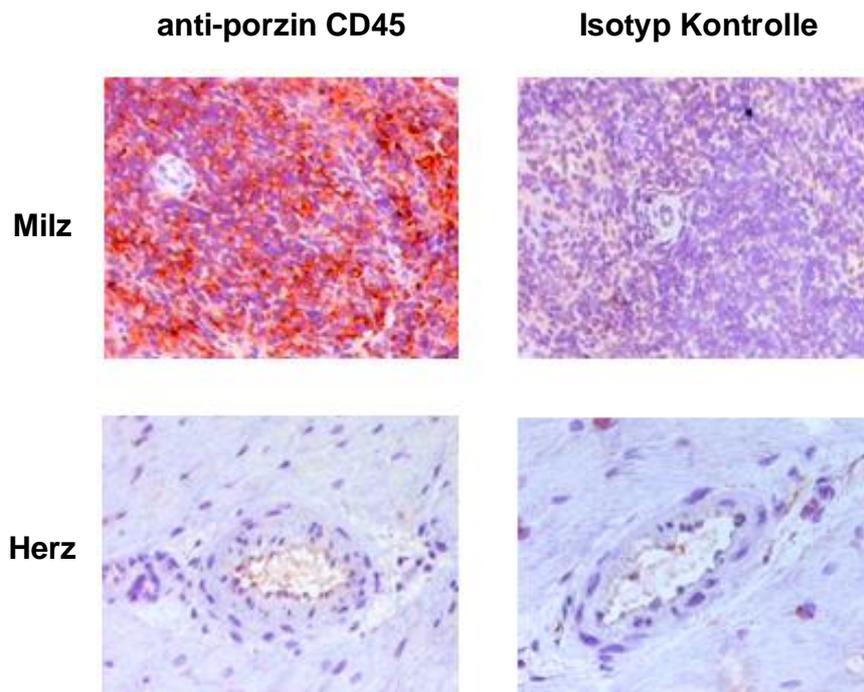


Abbildung 4.11: CD45 Expression auf porzinen Lymphozyten in der Milz und auf Endothelzellen im Herzen

Aus Milz und Herzpräparaten von „Deutsche Landrasse Schweinen“ wurden in einem Kryostaten Schnitte mit einer Dicke von 5 µm hergestellt. CD45 Moleküle innerhalb dieser Gefrierschnitte wurden mit einem porzin-spezifischen CD45common mAk (2A5, Maus IgG₁) über einer Peroxidase-markierte Sekundäntikörper (GαM-POD) mittels einer AEC-Lösung und anschließender Hämalaun-Färbung HRP nachgewiesen. Zur Kontrolle der spezifischen Bindung des mAk an porcine CD45 Moleküle wurde eine Isotypkontrolle mitgeführt. Dabei handelt es sich um den human-spezifischen CD45 mAk AICD45.2 (Maus IgG₁).

Diese Daten lassen sich dahingehend zusammenfassen, daß porcine CD45 Moleküle interessante Ziele für eine Antikörper-vermittelte Immunmodulation der humanen xenogenen T-Zellantwort darstellen könnten, da sie nicht auf Endothelzellen exprimiert werden. Monoklonale Antikörper gegen porcine MHC Klasse-II Moleküle sowie die kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD80/86, die die Proliferation sehr effektiv inhibierten, besitzen dagegen sehr wahrscheinlich nur einen eingeschränkten therapeutischen Nutzen, da sie nach Bindung an ihre Zielmoleküle auf Endothelzellen die Komplement-vermittelte Lyse des Endothels induzieren könnten.

4.3 Immunmodulation xenogener T-Zellantworten durch porzinspezifische CD45 Antikörper

Nachdem gezeigt werden konnte, daß porzine Endothelzellen keine CD45 Moleküle exprimieren, stellte sich die Frage, ob die Proliferation humaner T-Zellen nach der Bindung von CD45 Antikörpern an porzine Stimulatorzellen beeinflusst werden kann. CD45 Moleküle werden durch alternatives Spleißen variabler Exons in verschiedenen Isoformen auf allen Leukozyten exprimiert. Bei adulten Schweinen lassen sich die CD45 Isoformen AC, C und 0 nachweisen. Durch monoklonale Antikörper können die einzelnen Isoformen identifiziert und getrennt voneinander analysiert werden. So sind CD45common Antikörper gegen AC, C sowie 0 Moleküle gerichtet, CD45RA Antikörper gegen AC Moleküle und CD45RC Antikörper gegen AC und C Moleküle. Zur Untersuchung der modulatorischen Kapazität porziner CD45 mAk wurde die Proliferation und die Zytokinsynthese von T-Zellen als Antwort auf ihre Stimulation mit Schweinelymphozyten untersucht, die mit mAk gegen CD45common, CD45RA und CD45RC Moleküle vorinkubiert worden waren.

4.3.1 Reaktionsmuster von anti-porzinen CD45 Antikörpern auf porzinen und humanen Lymphozyten

Um die Fähigkeit der CD45 Antikörper zur Manipulation der xenogenen T-Zellaktivierung bewerten zu können, war es zunächst erforderlich, die Spezies-Spezifität und die Bindungskapazität der Antikörper durchflußzytometrisch zu charakterisieren. In Abbildung 4.12 sind die Reaktionsmuster der CD45common mAk K252.1E4, MAC323 und 2A5, der CD45RA mAk MIL13 und 3c3/9 sowie der CD45RC mAk 3a56 und MIL15 auf porzinen und humanen Lymphozyten dargestellt.

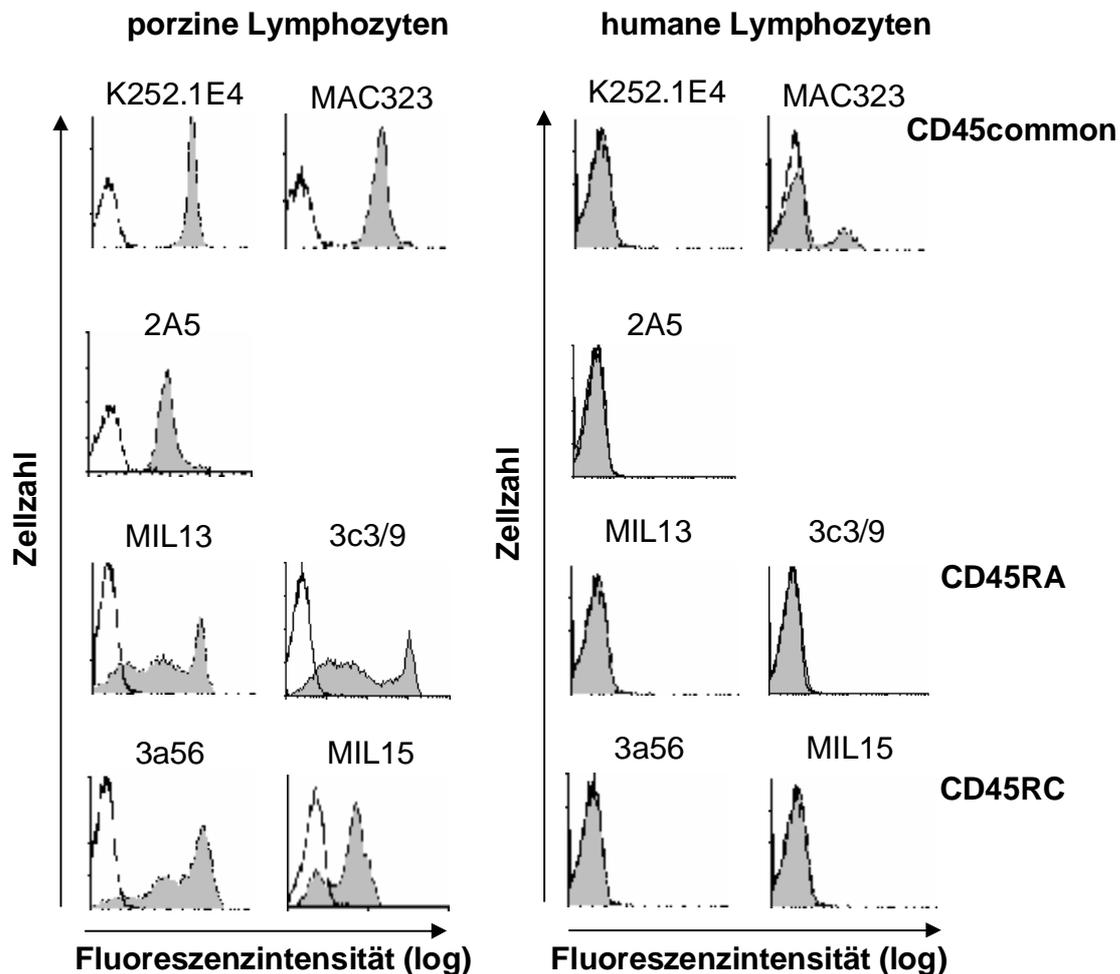


Abbildung 4.12: Reaktionsmuster anti-porziner CD45 mAk auf porzinen und humanen Lymphozyten

Die Reaktivität porzin-spezifischer CD45 mAk gegen alle Isoformen (K252.1E4, MAC323, 2A5), CD45RA (MIL13, 3c3/9) und CD45RC Isoformen (3a56, MIL15) wurde auf 5×10^5 humanen und porzinen Lymphozyten über einen FITC-konjugierten Sekundärantikörper durchflußzytometrisch nachgewiesen. Ausgefüllte Kurven zeigen die Reaktivitäten gebundener Antikörper. Unausgefüllte Kurven stellen die Fluoreszenzintensität des Sekundärantikörpers als Negativkontrolle dar.

Mit Ausnahme des CD45 mAk MAC323 detektierten alle untersuchten monoklonalen Antikörper ausschließlich porzine CD45 Moleküle. MAC323 reagierte außerdem mit Molekülen auf einer humanen Lymphozytensubpopulation, die nicht näher charakterisiert wurde. Die CD45common mAk K252.1E4, MAC323 und 2A5 reagierten

mit allen Lymphozyten. Sie wiesen vergleichbare Bindungskapazitäten auf. Die zwei CD45RA spezifischen mAk zeigten ebenfalls ein vergleichbares Reaktionsmuster. Mit diesen Antikörpern wurden die Lymphozyten in drei Populationen unterteilt, die keine bzw. in mittlerer oder hoher Dichte CD45RA Moleküle exprimierten. Eine vergleichbare Einteilung in drei Populationen wurde auch mit dem CD45RC mAk 3a56 beobachtet. Das Reaktionsmuster dieses mAk unterschied sich jedoch von dem CD45RC mAk MIL15, der nicht in der Lage war, die Lymphozyten in CD45RC mittel- und hochexprimierende Zellen zu unterteilen. Beide mAk reagierten jedoch mit einer vergleichbaren Anzahl Schweinelymphozyten. Dieser Unterschied könnte darauf zurückzuführen sein, daß MIL15 nicht in sättigenden Konzentrationen in die Experimente eingesetzt werden konnte, weil der mAk nur als Kulturüberstand zur Verfügung stand.

Die Beobachtung, daß die CD45RA und RC Antikörper MIL13 und 3a56 die porzinen Lymphozyten in drei Populationen mit unterschiedlicher CD45RA und CD45RC Expressionsdichte unterteilten, warf die Frage auf, inwiefern sich porcine B-Zellen, CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und Monozyten diesen Populationen zuordnen lassen. Dazu wurden Zwei-Farbfluoreszenzanalysen durchgeführt (Tab. 4.2).

Tabelle 4.2: Zwei-Farbfluoreszenzanalyse der CD45RA und CD45RC Expression auf porcinen Lymphozytensubpopulationen ¹⁾

CD45	mittlere Fluoreszenzintensität (MFI)			
	B-Zellen	CD4 ⁺ T-Zellen	CD8 ⁺ T-Zellen	Monozyten
RA	409 ± 65	157 ± 24	300 ± 63	80 ± 37
RC	75 ± 9	227 ± 11	156 ± 7	74 ± 31

¹⁾ Auf 5×10^5 porcinen Lymphozyten wurden CD45RA oder CD45RC Moleküle über die mAk MIL13 bzw. 3a56 mit Hilfe eines Isotyp-spezifischen FITC-konjugierten Sekundärantikörpers detektiert. CD4, CD14 Moleküle oder der B-Zell-Rezeptor wurden durch spezifische mAk gegen diese Moleküle über einen PE-konjugierten Sekundärantikörper durchflußzytometrisch nachgewiesen. Die mittlere Fluoreszenzintensität ± Standardabweichung wurde aus drei Experimenten errechnet.

Dabei konnte gezeigt werden, daß sich die Expressionsdichte zwischen CD45RA und CD45RC Molekülen auf den Lymphozytensubpopulationen unterschied. Besonders deutlich waren die Unterschiede bei den B-Zellen ausgeprägt, die in hoher Dichte CD45RA Moleküle exprimierten, während sie nur eine geringe CD45RC Expression aufwiesen. Auf CD8⁺ T-Zellen konnten CD45RA Moleküle ebenfalls in einer deutlich höheren Expressionsdichte nachgewiesen werden als CD45RC Moleküle. Dagegen war die mittlere Expressionsdichte von CD45RC Molekülen auf den porzinen CD4⁺ T-Zellen durchschnittlich etwa doppelt so hoch wie von CD45RA Molekülen. Monozyten exprimierten dagegen CD45RA und CD45RC Moleküle in geringer Dichte auf ihrer Zelloberfläche. Diese Untersuchungen zeigen, daß CD45RA Moleküle insbesondere auf porzinen B-Zellen stärker exprimiert werden als CD45RC Moleküle.

4.3.2 Modulation der Proliferation durch porzin-spezifische CD45 Antikörper

Zur Testung des modulatorischen Potentials porzin-spezifischer CD45 Antikörper wurden humane T-Zellen zunächst mit bestrahlten Stimulatorzellen kokultiviert, die mit dem CD45common mAk K252.1E4 vorbehandelt worden waren. Um auszuschließen, daß eine Antikörper-vermittelte Veränderung der T-Zellaktivierung durch die mAk-Bindung an die Fc-Rezeptoren (FcR) von humanen T-Zellen und NK-Zellen sowie von porzinen FcR-exprimierenden Zellen zurückzuführen ist, wurde der mAk R73 als Kontrolle mitgeführt. Dieser mAk stammt aus der gleichen Spezies und ist vom gleichen Isotyp wie der CD45 mAk.

In Tabelle 4.3 sind drei Experimente zusammengefaßt, in denen die Proliferation als Antwort auf unbehandelte, K252.1E4- und R73-behandelte Stimulatorzellen dargestellt ist. Hieraus geht hervor, daß der CD45 mAk, der ausschließlich an porzine CD45 Moleküle bindet, die T-Zellproliferation in geringem Maße reduzieren konnte. Der Kontrollantikörper beeinflusste die Proliferation nicht. Somit sollte die CD45 mAk-vermittelte Modulation der Proliferation auf eine spezifische Bindung an porzine CD45 Moleküle und nicht auf eine FcR-vermittelte Bindung zurückzuführen sein.

Tabelle 4.3: Einfluß des porzin-spezifischen CD45common mAk K252.1E4 auf die humane xenogene T-Zellproliferation ¹⁾

Exp.	Unbehandelt ²⁾	Behandlung mit Maus IgG ₁	
		K252.1E4 ³⁾	R73 ⁴⁾
1	16292 ± 1930 ⁵⁾	9439 ± 1193	17684 ± 2679
2	8266 ± 1408	6009 ± 1686	10069 ± 1359
3	13252 ± 2807	10544 ± 419	12846 ± 891

¹⁾ 3x10⁵ humane T-Zellen wurden mit 3x10⁵ bestrahlten porzinen Lymphozyten kultiviert. Nach 4-tägiger Kultur wurden die Kulturen mit 1 µCi [³H]-Thymidin versehen und nach weiteren 16 h wurde der [³H]-TdR Einbau gemessen.

^{2, 3, 4)} Humane T-Zellen wurden mit unbehandelten²⁾ porzinen Stimulatorzellen bzw. nach deren Vorinkubation mit dem anti-porzinen CD45 mAk K252.1E4 (IgG₁)³⁾ oder dem anti-Ratte TcR mAk R73 (IgG₁)⁴⁾ stimuliert.

⁵⁾ Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± der Standardabweichung (cpm ± SD) aus Dreifachansätzen angegeben.

Da die Bindung von CD45 mAk an porzine Zellen eine schwache aber reproduzierbare Wirkung auf die humane T-Zellaktivierung zu haben schien, stellte sich die Frage, ob anti-porzine CD45 mAk gegen unterschiedliche Isoformen stärkere Effekte zeigen. Parallel wurde geprüft, ob die anti-porzinen CD45 mAk tatsächlich nur xenogene Immunreaktionen inhibieren. Hierzu wurde parallel die allogene T-Zellproliferation als Antwort auf humane Stimulatorzellen bestimmt, die mit den porzin-spezifischen CD45 mAk vorbehandelt worden waren.

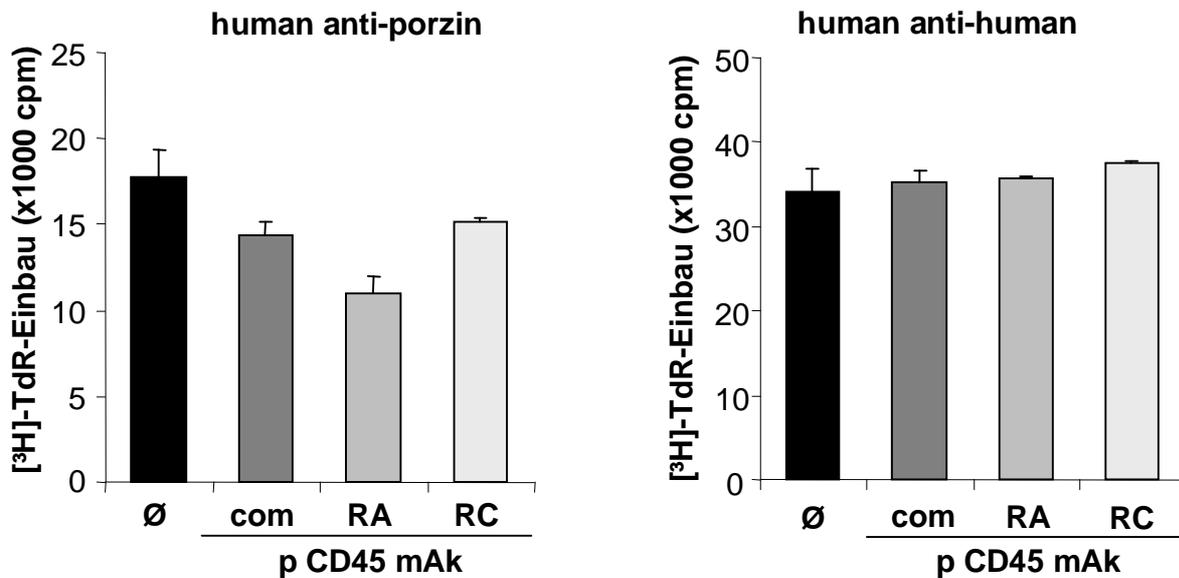


Abbildung 4.13: Einfluß der CD45 Antikörper Isoformspezifität auf die Modulation der humanen xenogenen und allogenen T-Zellproliferation

3×10^5 humane T-Zellen wurden mit gleicher Anzahl bestrahlter Stimulatorzellen in einer MLC kultiviert. Bei den Stimulatorzellen handelte es sich links um xenogene Schweinelymphozyten und rechts um allogene humane Lymphozyten. Vor Beginn der Stimulation wurden die Stimulatorzellen mit porzinspezifischen CD45 Antikörpern vorbehandelt. Dabei handelte es sich um den CD45common mAk K252.1E4, den CD45RA mAk MIL13 und den CD45RC spezifischen mAk MIL15. Nach 4 Tagen Kultur wurde $1 \mu\text{Ci}$ $[^3\text{H}]$ -Thymidin zu jedem Stimulationsansatz gegeben und nach weiteren 16 h wurde der $[^3\text{H}]$ -TdR-Einbau in die humanen T-Zellen als Maß für die Proliferation gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte aus Dreifachansätzen gemessen in counts per minute (cpm) und deren Standardabweichung dargestellt.

In Abbildung 4.13 ist links die xenogene Proliferation als Antwort auf unbehandelte sowie CD45common, CD45RA und CD45RC mAk-vorbehandelte Stimulatorzellen in einem Einzelexperiment dargestellt. Wie zuvor gezeigt (Abb. 4.12), binden diese Antikörper ausschließlich an porzine CD45 Moleküle. Der Vergleich zeigt, daß die xenogene Proliferation mit diesen mAk partiell reduziert werden konnte. In diesem Experiment wurde nur eine milde Reduktion der Proliferation in Anwesenheit des CD45common mAk K252.1E4 beobachtet. Dagegen wies der CD45RA mAk MIL13 eine etwas stärkere modulatorische Kapazität auf. Mit diesem mAk konnte die Proliferation um etwa 40 % reduziert werden. Die allogene Proliferation wurde dagegen durch die anti-porzinen mAk nicht beeinflusst (Abb. 4.13, rechts). Dies zeigt, daß die mAk die

T-Zellantworten Spezies-spezifisch nach ihrer Bindung an porcine CD45 Moleküle manipulieren. Außerdem weist die fehlende CD45 mAk-vermittelte Modulation der allogenen Proliferation modellhaft darauf hin, daß anti-porcine CD45 mAk nach einer Xenotransplantation Reaktionen des Empfängerimmunsystems gegen nominelles Antigen sehr wahrscheinlich nicht beeinflussen werden.

Vor dem Hintergrund, daß das modulatorische Potential der anti-porcinen CD45 Antikörper nur gering war, sollte die Reproduzierbarkeit der CD45 mAk-vermittelten Reduktion der Proliferation untersucht werden. Dazu wurden porcine Stimulatorzellen in einer Serie von Experimenten mit den verschiedenen CD45 mAk vorbehandelt.

Tabelle 4.4: Einfluß porzin-spezifischer CD45 mAk gegen verschiedene CD45 Isoformen auf die xenogene T-Zellproliferation ¹⁾

Spezifität	Antikörper	Isotyp (Maus)	% Inhibition der humanen xenogenen T-Zellproliferation
CD45common	K252.1E4	IgG ₁	27 ± 11 ** ²⁾
	MAC323	IgG _{2a}	15 ± 12
	2A5	IgG ₁	5 ± 1
CD45RA	MIL13	IgG ₁	44 ± 15 ***
	3c3/9	IgG ₁	5 ± 3
CD45RC	3a56	IgG ₁	31 ± 15 *
	MIL15	IgM	15 ± 1

¹⁾ 3x10⁵ humane T-Zellen wurden mit 3x10⁵ bestrahlten Antikörper-behandelten Schweinelymphozyten (30Gy) für 4 Tage kultiviert, bevor [³H]-Thymidin zu den Ansätzen gegeben wurde. Nach weiteren 16 h wurde die Proliferation der T-Zellen über ihren [³H]-TdR-Einbau gemessen.

²⁾ Die Ergebnisse sind dargestellt als % Inhibition errechnet aus der Differenz zwischen den cpm aus den Ansätzen mit unbehandelten Stimulatorzellen (100 %) und dem Verhältnis der cpm aus den Ansätzen mit CD45 mAk-behandelten zu den cpm mit unbehandelten Stimulatorzellen. Die Daten zeigen die mittlere Inhibition ± der Standardabweichung errechnet aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,005 für die dargestellte Versuchsgruppe im Vergleich zur Proliferation mit unbehandelten Stimulatorzellen.

In Tabelle 4.4 ist der Einfluß der verschiedenen CD45 mAk auf die xenogene T-Zellproliferation zusammengefaßt. Von den sieben untersuchten CD45 mAk konnten drei die xenogene humane T-Zellproliferation signifikant reduzieren. Dabei handelte es sich um den CD45common mAk K252.1E4, den CD45RA mAk MIL13 und den CD45RC mAk 3a56. Hier bestätigte sich die Beobachtung aus Abbildung 4.13, daß der CD45RA mAk MIL13 das insgesamt stärkste modulatorische Potential besitzt. Ferner zeigten diese Untersuchungen, daß verschiedene Antikörper, die die gleichen CD45 Isoformen erkennen, die Proliferation unterschiedlich stark beeinflussen. So reduzierte der CD45RA mAk MIL13 die T-Zellproliferation um etwa 30-50 %, während der zweite CD45RA mAk 3c3/9 die Proliferation nicht reduzieren konnte. Auch die drei getesteten CD45common mAk beeinflussten die Proliferation unterschiedlich stark. So reduzierte K252.1E4 die Proliferation zwischen 15-40 %, während der 2A5 die T-Zellantwort nicht modulieren konnte. Der kreuzreaktive CD45common mAk MAC323 beeinflusste die Proliferation nur leicht. Dieser Effekt sollte nicht auf seine Kreuzreaktivität zurückzuführen sein, da die Stimulatoren in den Experimenten mit den Antikörpern vorinkubiert worden waren. Auch die anti-porzinen CD45RC mAk 3a56 und MIL15 modulierten die Proliferation unterschiedlich stark. Während 3a56 die Proliferation um maximal 45 % inhibieren konnte, wurden nur milde Effekte mit MIL15 beobachtet. Zusammengefasst weisen die Daten darauf hin, daß sowohl die detektierte CD45 Isoform als auch das Epitop eine Rolle dabei spielt, wie stark ein porziner CD45 Antikörper die humane T-Zellantwort vermindern kann.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde außerdem überprüft, ob die Effekte der anti-porzinen CD45 mAk durch die Verwendung von CD4⁺ T-Zellen als Responder weiter gesteigert werden können. Dabei wurden jedoch keine deutlichen Unterschiede in der CD45 mAk-vermittelten Inhibition der Proliferation von CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu den Gesamt-T-Zellen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Vor diesem Hintergrund wurden alle weiteren Experimente mit Gesamt-T-Zellpopulationen durchgeführt. Auf diese Weise wurden auch Interaktionen zwischen humanen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bei der *in vitro* Aktivierung berücksichtigt, die die T-Zellantworten möglicherweise beeinflussen können.

Um zu prüfen, ob sich die Effekte der CD45 mAk verstärken lassen, wurde die T-Zellproliferation nach der Vorbehandlung der porzinen Stimulatoren mit mehreren CD45 mAk unterschiedlicher Isoformspezifität untersucht. Die CD45 mAk-vermittelte partielle Inhibition der Proliferation wurde hierdurch jedoch nicht stärker reduziert als nach der Stimulation der T-Zellen in Anwesenheit einzelner CD45 mAk (Daten nicht gezeigt).

Für verschiedene Oberflächenmoleküle, die intrazelluläre Signale induzieren können, ist bekannt, daß ihre Aktivität durch eine Kreuzvernetzung *in vitro* gesteigert werden kann. Da die Proteintyrosinphosphatase CD45 ein transmembranes Zelloberflächen-molekül ist, das ebenfalls intrazelluläre Signale auslösen kann, stellte sich die Frage, ob eine Kreuzvernetzung von CD45 Molekülen auf den porzinen Stimulatorzellen die Proliferation stärker reduziert als die Bindung von löslichen CD45 Antikörpern. Dazu wurden die Stimulatorzellen zunächst mit dem CD45RA mAk MIL13 vorinkubiert. Die Stimulation der T-Zellen mit diesen Zellen erfolgte anschließend in Flachbodenplatten, an die ein G α M mAk gekoppelt war, der die CD45 mAk kreuzvernetzt. Zum Vergleich wurden T-Zellen parallel mit CD45RA mAk-vorinkubierten Zellen in Abwesenheit des Kreuzvernetzers (löslich) stimuliert.

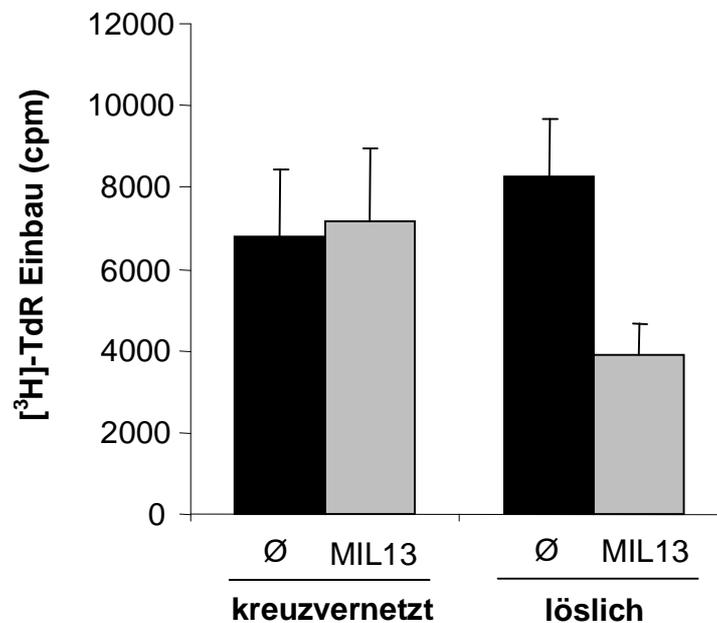


Abbildung 4.14: Inhibition der xenogenen T-Zellproliferation durch lösliche aber nicht durch immobilisierte anti-porzine CD45RA mAk

3×10^5 humane T-Zellen wurden mit gleicher Anzahl bestrahlter porziner PBMC stimuliert. Die Stimulatorzellen blieben unbehandelt (Ø) oder wurden mit dem CD45RA mAk MIL13 vorinkubiert. Die T-Zellen wurden mit unbehandelten oder MIL13-vorinkubierten porzinen Zellen in GaM-gekoppelten (kruzvernetzt) oder unbehandelten (löslich) 96-Loch Flachbodenplatten kokultiviert. Nach 4 Tagen wurde die Proliferation durch die Messung des [³H]-TdR Einbaus gemessen. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte aus Dreifachansätzen gemessen in counts per minute (cpm) und deren Standardabweichung dar.

In Abbildung 4.14 ist zu sehen, daß die Proliferation nach der Kreuzvernetzung porziner CD45RA Moleküle auf den Stimulatorzellen nicht reduziert werden konnte. Dagegen wurde die Proliferation in Anwesenheit des löslichen MIL13 in diesem Experiment um etwa 50 % reduziert. Dieser überraschende Befund weist darauf hin, daß die Bindung des löslichen MIL13 und die Kreuzvernetzung des Antikörpers Signale verschiedener Qualität in den porzinen Lymphozyten auslösen, die das Potential dieser Zellen, humane T-Zellen zu aktivieren anscheinend unterschiedlich beeinflussen.

4.3.3 CD45 Antikörper-vermittelte Regulation der humanen Zytokinproduktion

Nachdem gezeigt werden konnte, daß T-Zellen nach ihrer Stimulation durch Xenoantigen verschiedene Zytokine produzieren (4.1.3), stellte sich die Frage, ob die Stimulation humaner T-Zellen durch MIL13-vorbehandelte Schweinelymphozyten die Produktion dieser Zytokine beeinflusst. Zur Beantwortung dieser Frage wurde die Produktion der Th1-Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2 sowie der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 nach einer dreitägigen Stimulation der T-Zellen mit MIL13-behandelten Stimulatorzellen durchflußzytometrisch bestimmt.

Tabelle 4.5: Zytokin-Konzentrationen nach der T-Zellstimulation durch MIL13-behandelte Schweinelymphozyten¹⁾

Behandlung der Stimulatoren	humane Zytokine im Kulturüberstand (pg/ml)					
	IFN- γ	TNF- α	IL-2	IL-5	IL-4	IL-10
Ø	40000	423	127	1770	n.d. ²⁾	68
MIL13	2906	147	199	1682	15	14
R73	24041	306	241	1779	18	53

¹⁾ 3×10^5 humane T-Zellen wurden für drei Tage mit gleicher Anzahl bestrahlter unbehandelter und MIL13-vorbehandelter porziner Stimulatorzellen aktiviert. Mittels CBA Assay wurde anschließend gleichzeitig die Konzentration der humanen Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5 und IL-10 durchflußzytometrisch aus den Kulturüberständen ermittelt.

²⁾ n.d.= nicht detektierbar

In Tabelle 4.5 ist die Zytokinproduktion von T-Zellen als Antwort auf ihre Stimulation mit unbehandelten Stimulatorzellen, und nach deren Behandlung mit MIL13 oder dem Kontrollantikörper R73 aus einem Einzelexperiment dargestellt. Im Vergleich zur Zytokinfreisetzung nach der Stimulation mit unbehandelten Schweinelymphozyten, produzierten die T-Zellen nach ihrer Stimulation in Anwesenheit von MIL13 deutlich

reduzierte Mengen IFN- γ , TNF- α und IL-10. Dagegen veränderte sich die Produktion von IL-2 und IL-5 nur geringfügig. IL-4 wurde in diesem Experiment entweder gar nicht oder in kaum nachweisbaren Konzentration gemessen. Insgesamt konnten in diesem Experiment die markantesten Effekte für die IFN- γ und TNF- α Produktion nachgewiesen werden. Es war jedoch auch eine Modulation der Zytokinproduktion durch den Kontrollantikörper R73 zu beobachten. So produzierten T-Zellen nach ihrer Aktivierung durch R73-behandelte Stimulatorzellen ebenfalls verminderte Mengen IFN- γ und TNF- α . Eine mögliche Erklärung ist, daß die Bindung dieses Antikörpers an porcine Fc-Rezeptoren die Zytokinproduktion der T-Zellen beeinflussen kann. Dennoch sollten die beobachteten Effekte durch den anti-porzinen CD45RA mAk nicht völlig unspezifisch sein, da der Kontrollantikörper die Produktion von IL-5 und IL-10 kaum beeinflusste.

Zur weiteren Bewertung der mAk-vermittelte Reduktion der Zytokinproduktion, wurde in diesem Experiment parallel die proliferative Antwort der T-Zellen auf unbehandelte und mAk-behandelte Stimulatorzellen bestimmt (Abb.4.15).

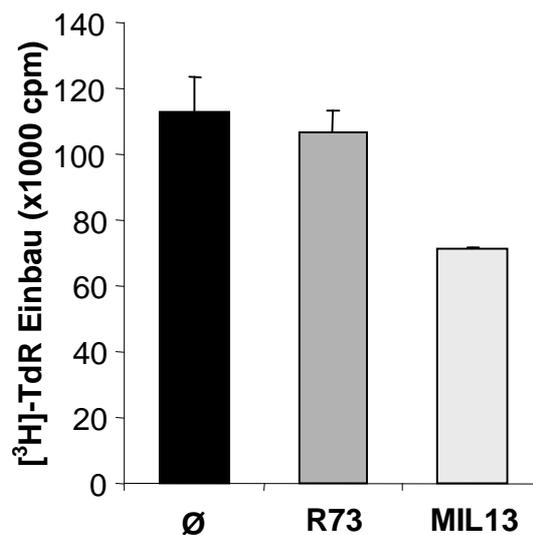


Abbildung 4.15: Effekte von MIL13 und R73 auf die xenogene T-Zellproliferation

3×10^5 humane T-Zellen wurden mit 3×10^5 bestrahlten porcinen Lymphozyten kultiviert, die unbehandelt waren, oder mit dem CD45RA mAk MIL13 bzw. dem Kontrollantikörper R73 (Maus anti-Ratte TcR; IgG₁) vorinkubiert worden waren. Nach 3-tägiger Kultur wurden die Kulturen mit 1 μ Ci [³H]-Thymidin versehen und nach weiteren 16 h wurde der [³H]-TdR Einbau gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm der Standardabweichung (cpm \pm SD) aus Dreifachansätzen angegeben.

Dabei zeigte sich, daß die Proliferation durch die Behandlung der Stimulatoren mit dem CD45RA mAk um etwa 40 % reduziert wurde. Der Kontrollantikörper beeinflusste die proliferative T-Zellantwort dagegen nicht. Der Befund, daß der Kontrollantikörper die Zytokinproduktion aber nicht die Proliferation beeinflusste, weist darauf hin, daß der durchflußzytometrische Nachweis der Zytokine sensitiver ist, als die Bestimmung der Proliferation. Vergleichbare Effekte der Antikörper auf die Zytokinproduktion und die Proliferation konnten für MIL13 in zwei weiteren Experimenten und für den Kontrollantikörper in einem weiteren Experiment gezeigt werden.

In Abbildung 4.16 ist die relative Produktion von IFN- γ und TNF- α nach der T-Zellaktivierung mit unbehandelten und MIL13-behandelten Zellen von drei Experimenten dargestellt. In diesen Experimenten wurde eine durchschnittliche Verminderung der IFN- γ Konzentration um 80 bis 95 % nach der xenogenen T-Zellaktivierung in Anwesenheit von MIL13 nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Stimulation der T-Zellen mit unbehandelten Stimulatoren wurde die TNF- α Konzentration in den Stimulationsansätzen mit MIL13 um 50 bis 70 % reduziert. Die T-Zellproliferation wurde in diesen Versuchen durch MIL13 um etwa 40 bis 50 % reduziert.

Zusammengefaßt weisen diese Daten darauf hin, daß humane T-Zellen mit einer verminderten Proliferation auf eine Stimulation mit CD45RA mAk (MIL13)-behandelten porzinen Stimulatorzellen reagieren. Dies scheint mit einer verminderten Produktion der Th1-Zytokine IFN- γ und TNF- α einherzugehen. Einschränkend muß jedoch festgestellt werden, daß bei den Auswirkungen der CD45 mAk-Behandlung auf die Zytokinproduktion, neben der Bindung der Antikörper an porzine CD45 Moleküle, Effekte des Fc-Teils der Antikörper eine Rolle spielen könnten.

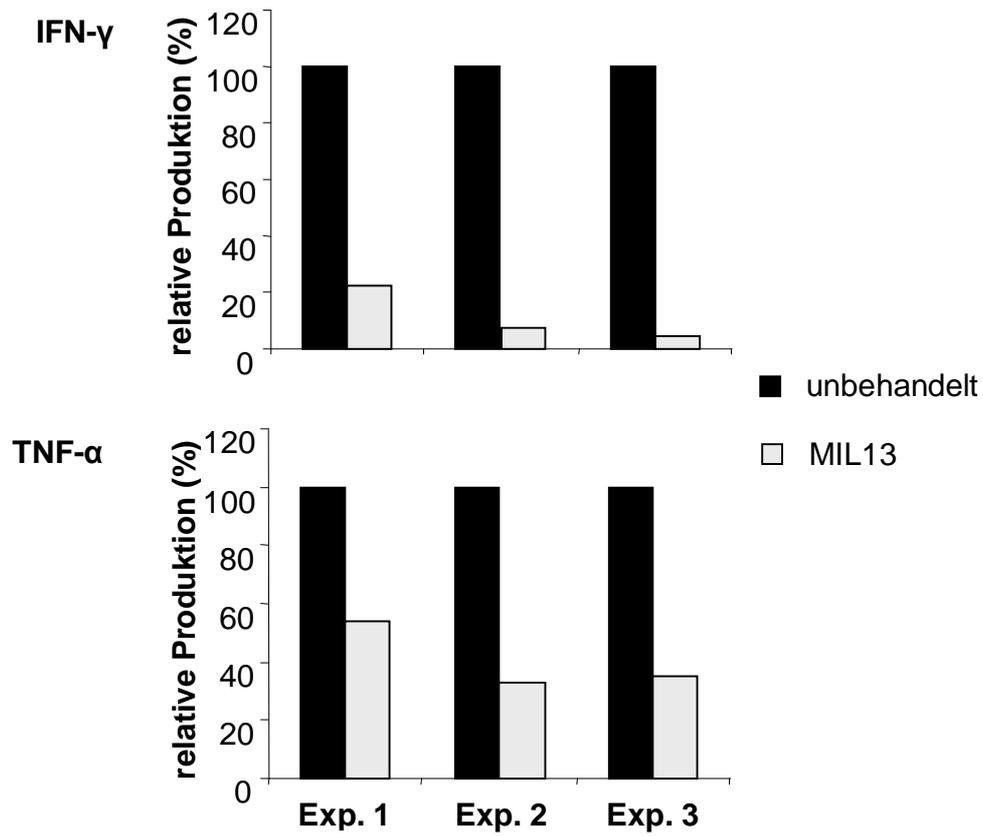


Abbildung 4.16: IFN- γ und TNF- α Produktion nach T-Zellaktivierung durch porcine MIL13-vorbehandelte Stimulatoren

3×10^5 humane T-Zellen wurden für drei Tage mit gleicher Anzahl bestrahlter porciner Lymphozyten aktiviert, die entweder unbehandelt blieben oder mit MIL13 vorbehandelt worden waren. Aus den Kulturüberständen dieser Stimulationsansätze wurden anschließend die Konzentrationen der Zytokine IFN- γ und TNF- α durchflußzytometrisch ermittelt.

4.4 CD45RA mAk-vermittelte Modulation der stimulatorischen Kapazität porziner Lymphozyten

Mit dem Befund einer CD45 mAk-vermittelten Reduktion im xeno-stimulatorischen Potential porziner Zellen, stellte sich die Frage nach den hierfür verantwortlichen Mechanismen. Hier bieten sich grundsätzlich zwei Möglichkeiten an: Durch die Bindung des Antikörpers könnten Interaktionen zwischen den porzinen CD45 Molekülen und ihren Liganden auf der Seite der humanen T-Zellen blockiert werden. Außerdem ist es möglich, daß die Bindung des Antikörpers an CD45 Moleküle transmembrane Signale induziert, die das stimulatorische Potential der porzinen Lymphozyten reduzieren. Einen ersten Hinweis, daß die Bindung von mAk an porzine CD45 Moleküle intrazelluläre Signale auslöst, resultierte aus der vorangegangenen Beobachtung, daß die Bindung von löslichem CD45RA mAk im Gegensatz zu seiner Kreuzvernetzung die xenogene T-Zellproliferation partiell inhibieren konnte. Vor diesem Hintergrund, wurde der Frage nachgegangen, ob CD45 Antikörper Signalkaskaden in porzinen Lymphozyten auslösen können, die ihr stimulatorisches Potential modulieren. Dazu wurden frühe Signaltransduktionsereignisse und zelluläre Konsequenzen nach der Bindung von MIL13 an porzine Lymphozyten untersucht.

4.4.1 Einfluß von MIL13 auf die Induktion früher Aktivierungsprozesse in porzinen Lymphozyten

Die Phosphorylierung verschiedener Proteine an Tyrosinresten stellt eines der frühesten Ereignisse der Lymphozytenaktivierung dar. Ausgehend von der Vorstellung, daß CD45 eine bedeutende Rolle bei der Regulation dieser Prozesse spielt, stellte sich die Frage, ob sich das Tyrosinphosphorylierungsmuster in porzinen Lymphozyten nach der Bindung von MIL13 an CD45RA Moleküle verändert. Dazu wurden Zellysate von unbehandelten und von einer bis fünf Minuten MIL13-stimulierten porzinen Lymphozyten hergestellt. Anschließend wurden mittels Western-Blot-Analyse tyrosinphosphorylierte Proteine durch den mAk 4G10 detektiert (Abb.4.17 oben). Zur Kontrolle der Spezifität

wurde die gleichmäßige Proteinbeladung über das *housekeeping protein* α -Aktin nachgewiesen (Abb.4.17 unten).

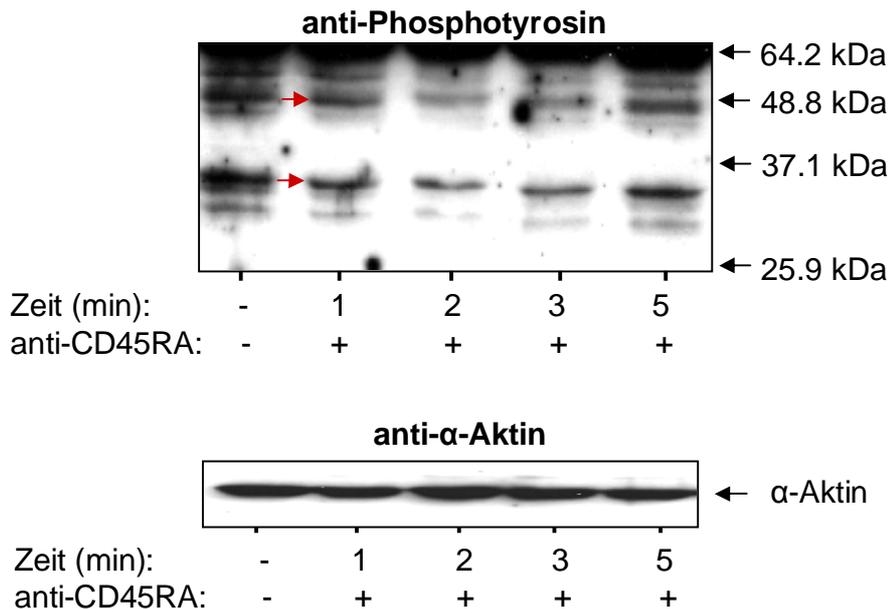


Abbildung 4.17: Tyrosinphosphorylierungen von Schweinelymphozyten nach Bindung des CD45RA mAk MIL13

2×10^6 Schweinelymphozyten pro Ansatz wurden alleine oder mit dem CD45RA mAk MIL13 bei 37°C stimuliert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen in einem NP-40-haltigen Puffer lysiert. Die Lysate wurden unter reduzierenden Bedingungen in einem 12,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine auf PVDF-Membran transferiert. Im oberen Bild ist ein Ausschnitt aus einem Western-Blot dargestellt, in dem tyrosinphosphorylierte Proteine mit dem anti-Phosphotyrosin-mAk 4G10 bio über HRP in einer ECL-Reaktion nachgewiesen wurden. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinbeladung wurde die Membran gestrippt und α -Aktin Proteine wurden über den mAk in einer ECL-Reaktion nachgewiesen (unten).

In unstimulierten porzinen Lymphozyten konnten tyrosinphosphorylierte Proteine nachgewiesen werden. Innerhalb einer Minute nach der Bindung von MIL13 wurden Proteine um 45 kDa und 20 kDa dephosphoryliert. Nach einer weiteren Minute Stimulation wurde eine Verstärkung dieser Dephosphorylierung beobachtet. Anschließend wurden diese Proteine wieder phosphoryliert, bis das Tyrosinphosphorylierungsmuster fünf Minuten nach der Bindung des Antikörpers wieder

in etwa dem Muster unstimulierter Zellen entsprach. Um auszuschließen, daß die dargestellten Unterschiede auf eine ungleichmäßige Proteinbeladung der einzelnen Proben zurückzuführen ist, wurde die Membran anschließend gestrippt und mit dem *house-keeping protein* α -Aktin angefärbt (Abb. 4.16, unten). Mit Hilfe von α -Aktin konnten gleichmäßige Proteinmengen in allen Proben nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis führte zu dem Schluß, daß die Bindung von MIL13 transmembrane Signale in den Lymphozyten auslösen kann, die mit einer Veränderung des Tyrosinphosphorylierungsmusters verschiedener Proteine einhergeht. Vergleichbare Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten erzielt.

Ein weiteres Ereignis der frühen Lymphozytenaktivierung stellt der Anstieg des intrazellulären Calcium-Spiegels dar. Zur weiteren Untersuchung der Auswirkungen der MIL13 Bindung, wurde die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration durchflußzytometrisch untersucht. Die Stimulation der Zellen erfolgte zunächst mit löslichem MIL13 während der Messung. Anschließend wurden die CD45RA Moleküle durch Zugabe von G μ M kreuzvernetzt. Die Fähigkeit der Zellen, ihren intrazellulären Calcium-Spiegel zu erhöhen, wurde durch das Calcium-Ionophor Ionomycin überprüft. In Abbildung 4.18 ist dargestellt, daß der CD45RA mAk MIL13 weder in löslicher Form noch nach seiner Kreuzvernetzung in der Lage war, die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in den Lymphozyten zu erhöhen. Die Zugabe von Ionomycin, als Positivkontrolle zeigte, daß die Zellen generell in der Lage waren Calcium aufzunehmen.

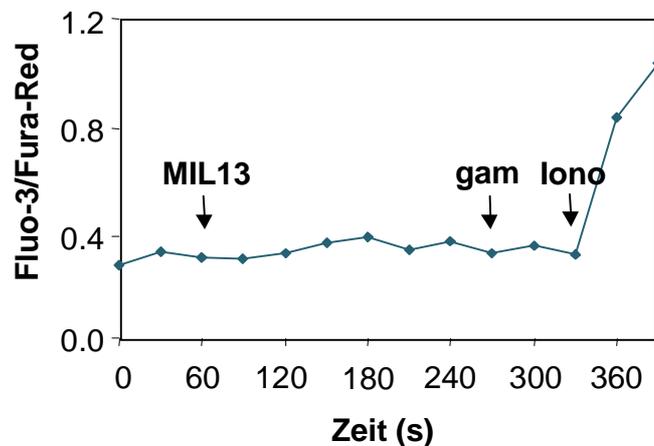


Abbildung 4.18: Einfluß der CD45RA mAk Bindung auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in porzinen Lymphozyten

Schweinelymphozyten wurden mit den Farbstoffen Fluo-3 und Fura-Red beladen. Die Mobilisierung der Ca^{2+} -Ionen wurde durchflußzytometrisch bestimmt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde zunächst der CD45RA mAk MIL13 (Verdünnung 1:10) zu der Messung gegeben. Anschließend wurden CD45 Moleküle über GaM (20 μ g/ml) kreuzvernetzt. Vor Beendigung der Messung wurde die Ca^{2+} -Konzentration nach Zugabe von Ionomycin bestimmt.

Der Befund, daß die Bindung des CD45RA mAk MIL13 zu einem veränderten Phosphorylierungsmuster in den porzinen Zellen führte, warf die Frage auf, ob die Bindung des Antikörpers zelluläre Konsequenzen für die Lymphozyten haben könnte. Da CD45 Moleküle eine Rolle bei der Regulation des Adhäsionsverhaltens von T-Zellen und Makrophagen zugeordnet werden konnte (89, 90), stellte sich die Frage, ob der CD45RA mAk die Aggregation porziner Lymphozyten beeinflussen kann. Innerhalb von 24 Stunden nach Bindung des CD45RA mAk MIL13 konnten porzine Lymphozytenaggregate nachgewiesen werden (Abb.4.19). Erste kleinere Aggregate wurden bereits nach 4-stündiger Kultur der Antikörper-gebundenen Zellen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Nach der Vorinkubation der Lymphozyten mit dem porzinspezifischen MHC Klasse-I mAk 74-11-10 konnte keine Aggregatbildung induziert werden. Somit ist es unwahrscheinlich, daß die Bildung der Aggregate auf eine Kreuzvernetzung der Lymphozyten über CD45 Moleküle und F_c -Rezeptoren zurückzuführen ist, sondern, daß der CD45RA mAk Signale auslöst, die das Adhäsionsverhalten der Zellen verändern.

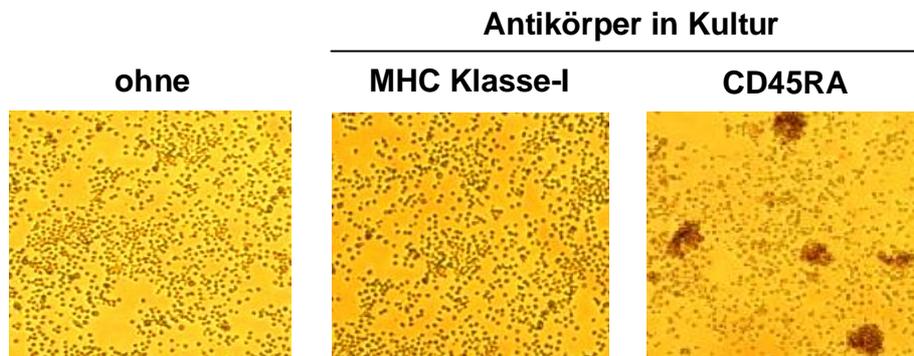


Abbildung 4.19: Induktion von Zellaggregaten durch die Bindung des CD45RA mAk MIL13 an Schweinelymphozyten

5×10^5 Lymphozyten wurden alleine und nach der Vorbehandlung mit sättigenden Mengen des MHC Klasse-I Antikörpers 74-11-10 oder des CD45RA mAk MIL13 für 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Ansätze mit einem Zeiss Invertoskop fotografiert (10-fache Vergrößerung)

Neben der Aktivierung von Lymphozyten ist CD45 auch an der Regulation des Lymphozytenüberlebens beteiligt. Die genauen Mechanismen hierfür sind derzeit noch nicht bekannt. Dabei scheinen einige Antikörper, aber auch das Galectin-1, nach ihrer Bindung an CD45 Moleküle Apoptose in Lymphozyten induzieren zu können (91, 92). Um auszuschließen, daß die CD45 mAk-vermittelte Reduktion des stimulatorischen Potentials der porzinen Zellen auf die Induktion von Apoptose und einer damit einhergehenden Depletion der Zellen zurückzuführen ist, wurden die Antikörper auf ihre Fähigkeit zur Induktion von Apoptose untersucht. Dazu wurden die Lymphozyten mit den CD45 Antikörpern vorbehandelt, für 16 h Stunden kultiviert und anschließend mit Annexin V-FITC gefärbt. Die durchflußzytometrische Analyse der Zellen zeigte, daß weder die Bindung der CD45 Antikörper allein noch deren Kreuzvernetzung Apoptose in den Zellen induzieren konnte (Daten nicht gezeigt).

4.4.2 Einfluß von MIL13 auf die Expression porciner Zelloberflächenmoleküle

Der Befund, daß die Bindung des CD45RA mAk an porcine Lymphozyten die Aggregation porciner Lymphozyten induziert, warf die Frage auf, ob der Antikörper die Expression von Adhäsionsmolekülen auf diesen Zellen beeinflusst. Dazu wurde die mRNA Expression für das Adhäsionsmolekül CD58 (LFA-3) im Verhältnis zur β -Aktin mRNA Expression in ruhenden Schweinelymphozyten und nach ihrer 24-stündigen Stimulation mit pokeweed-Mitogen (PWM) oder MIL13 mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt.

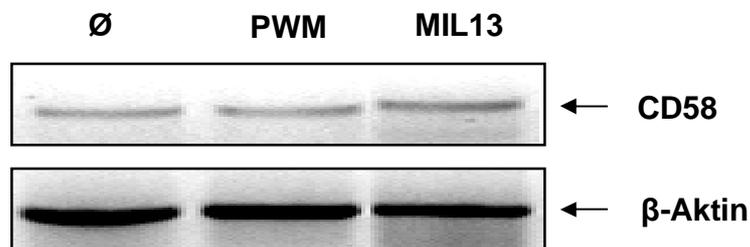


Abbildung 4.20: Einfluß von MIL13 auf die Expression der CD58 mRNA in porcinen Lymphozyten

Schweinelymphozyten wurden allein, in Anwesenheit von pokeweed-Mitogen (PWM) oder nach Vorbehandlung mit dem CD45RA mAk MIL13 für 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, mRNA wurde isoliert und die spezifischen CD58 Transkripte mittels RT-PCR amplifiziert.

In ruhenden Lymphozyten konnte konstitutive Transkription von CD58 nachgewiesen werden (Abb. 4.20). Durch die Stimulation der Zellen mit PWM und mit MIL13 blieb die Genexpression für CD58 nahezu unverändert. Vergleichbare Resultate wurden für die Zelloberflächenexpression eines weiteren Adhäsionsmoleküls, dem CD54 (ICAM-1) auf MIL13-stimulierten Lymphozyten mit Hilfe einer durchflußzytometrischen Zweifarbfloreszenzanalyse erhoben (Daten nicht gezeigt).

Da die stimulatorische Fähigkeit antigenpräsentierender Zellen durch die Expression von kostimulatorischen Molekülen reguliert wird, stellte sich außerdem die Frage, ob die

Bindung des CD45RA mAk die Expression dieser Moleküle beeinflusst. Dazu wurde die Expression von CD40, CD80 und CD86 wie zuvor beschrieben, auf der mRNA-Ebene bestimmt und mit der β -Aktin mRNA Expression verglichen.

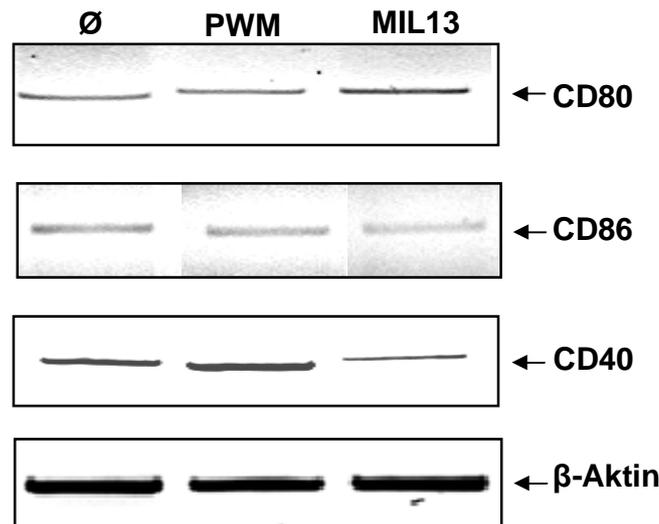


Abbildung 4.21: Einfluß von MIL13 auf die Expression von CD40, CD80 und CD86 mRNA in porzinen Lymphozyten

Schweinelymphozyten wurden allein, in Anwesenheit von pokeweed-Mitogen (PWM) oder nach Vorbehandlung mit dem CD45RA mAk MIL13 für 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, mRNA wurde isoliert und die spezifischen Transkripte für CD80, CD86 und CD40 mittels RT-PCR amplifiziert.

Dabei zeigte sich, daß in ruhenden porzinen Lymphozyten die Gene für CD80, CD86 und CD40 exprimiert werden, deren Transkripte sich mittels RT-PCR darstellen lassen (Abb. 4.21). Die Stimulation der Zellen mit PWM beeinflusste die Expression von CD80 und CD86 nicht. Dagegen führte sie zu einer leichten Steigerung der CD40 mRNA-Synthese. Die Expression von CD80 und CD86 wurde auch durch den CD45RA mAk MIL13 nicht beeinflusst. Interessanterweise kam es jedoch nach der Stimulation der Lymphozyten zu einer Herunterregulation der CD40 mRNA Expression im Verhältnis zur β -Aktin mRNA Expression.

Zur Bestätigung dieses Phänomens wurde die Expression der CD40 mRNA im Verhältnis zur β -Aktin mRNA in MIL13 stimulierten Lymphozyten weiterer Schweine untersucht. In dem Balkendiagramm (Abb.4.22) ist zusammengefaßt, daß die CD40 mRNA Expression der Lymphozyten nach ihrer Stimulation mit PWM, im Vergleich zu den unbehandelten porzinen Zellen, um etwa 40 % anstieg. Nach der Stimulation mit den CD45RA mAk wurde in zwei Experimenten eine deutlich verminderte der CD40 mRNA Konzentration und in einem Experiment eine leichte Reduktion der CD40 mRNA Expression nachgewiesen. Diese Reduktion der CD40 mRNA Synthese war MIL13-spezifisch, da die Stimulation der Lymphozyten mit einem porzin-spezifischen CD4 mAk die CD40 mRNA Expression nicht beeinflußte.

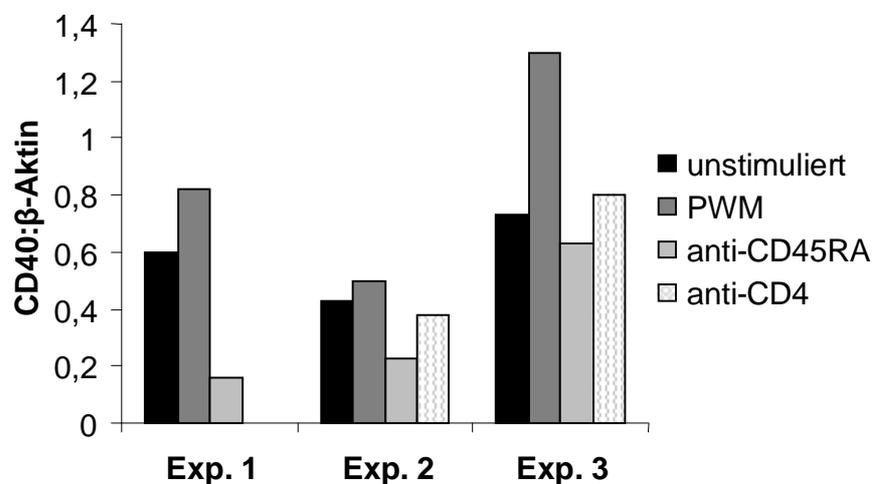


Abbildung 4.22: CD40 mRNA Expression in unbehandelten Lymphozyten und nach Stimulation mit PWM oder CD45RA und CD4 mAk

Schweinelymphozyten wurden allein, in Anwesenheit von pokeweed-Mitogen (PWM) oder nach Vorbehandlung der Zellen mit den mAk MIL13 (CD45RA) und MIL12 (CD4) kultiviert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert, mRNA wurde isoliert und die CD40 und β -Aktin mRNA Expression wurde über eine semiquantitative RT-PCR bestimmt. In dem Balkendiagramm ist die relative Menge der CD40 mRNA im Verhältnis zur β -Aktin mRNA aus drei unabhängigen Experimenten für unbehandelte, PWM und MIL13 stimulierte Lymphozyten dargestellt sowie für einen irrelevanten porzin-spezifischen CD4 Kontrollantikörper.

Nach dem überraschenden Befund der MIL13-abhängigen Verminderung der CD40 mRNA Expression, stellte sich die Frage, ob es auch zu einer reduzierten Proteinexpression von CD40 Molekülen auf der Zelloberfläche der MIL13-behandelten Schweinezellen kommt. Da es bekannt ist, daß CD45 Moleküle an der Aktivierung von B-Zellen über MHC Klasse-II Moleküle beteiligt sind (93) und CD45RA Moleküle in hoher Dichte auf porzinen B-Zellen exprimiert werden (Tab. 4.2) wurde ferner die Expression von MHC Klasse-II Molekülen auf diesen Zellen bestimmt. Dazu wurden unbehandelte und MIL13-vorinkubierte Lymphozyten für drei Tage kultiviert. Anschließend wurde die CD40 und MHC Klasse-II Expression auf CD45RA exprimierenden porzinen Lymphozyten durchflußzytometrisch bestimmt (Abb.4.23). Die Dotplots in der linken Bildhälfte zeigen die CD40 und MHC Klasse-II Expression auf unbehandelten und MIL13-stimulierten CD45RA⁻ porzinen Lymphozyten. Da diese Zellen keine CD45RA Moleküle auf ihrer Zelloberfläche exprimierten, wurde die CD40 und MHC Klasse-II Expression in Anwesenheit von MIL13, wie zu erwarten, kaum beeinflusst. Auf der Zelloberfläche der stark CD45RA exprimierenden CD45RA⁺⁺-Lymphozyten wurde die CD40 und die MHC Klasse-II Expression jedoch innerhalb von drei Tagen nach Bindung des Antikörpers deutlich reduziert. Die mittlere Fluoreszenzintensität für CD40 Moleküle verminderte sich in diesem Experiment von 76 auf 48 und für MHC Klasse-II Moleküle von 545 auf 306 Fluoreszenzeinheiten. Die Stimulation der Schweinelymphozyten mit einem anti-porzinen CD4 mAk beeinflusste die MHC Klasse-II Expression nicht. Die ungewöhnliche CD4⁺ Zellpopulation, die MHC Klasse-II Moleküle exprimiert, sind CD4⁺CD8⁺ T-Zellen, die beim Schwein im peripheren Blut vorkommen und im Ruhezustand MHC Klasse-II Moleküle exprimieren (94).

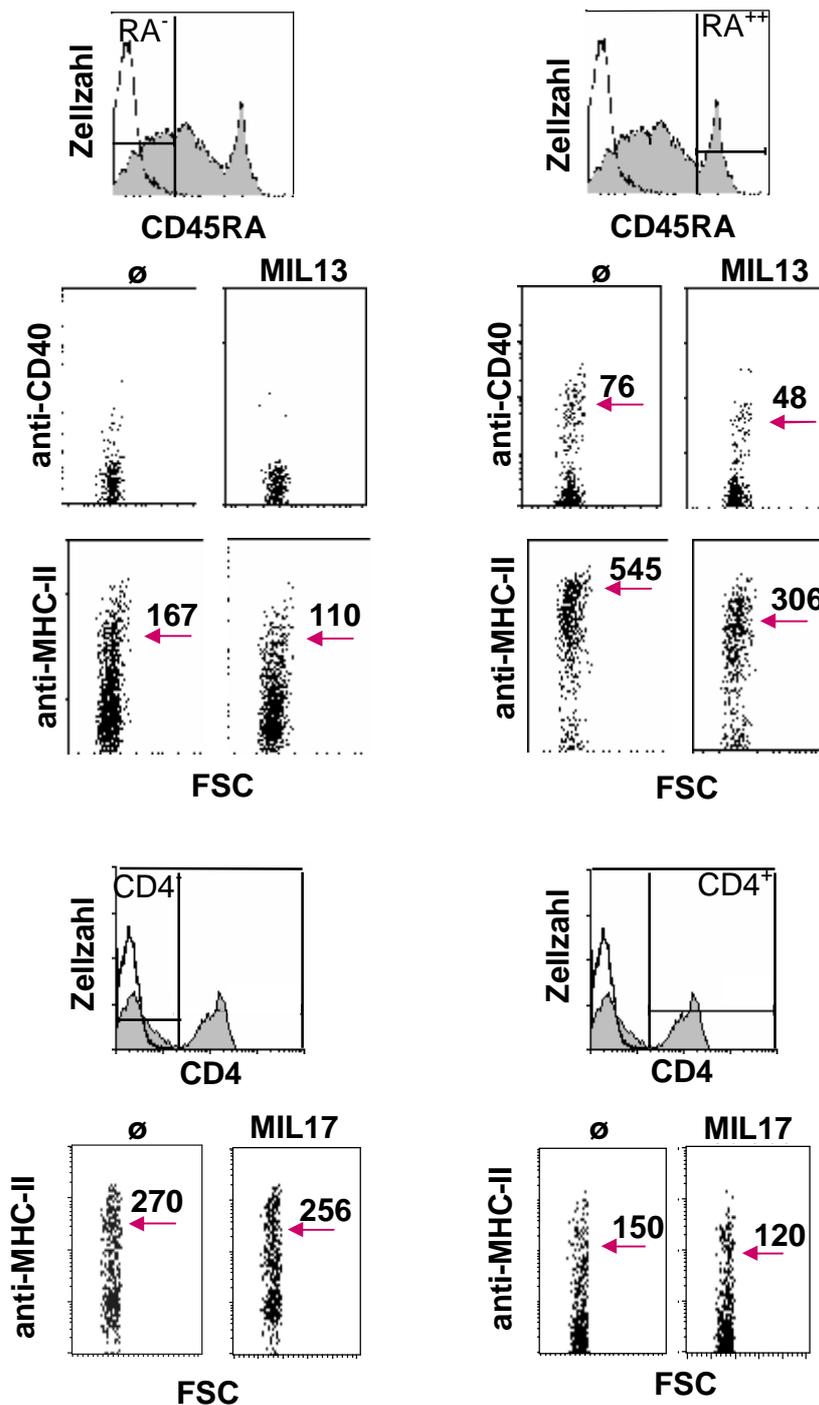


Abbildung 4.23: CD40 und MHC Klasse-II Expression CD45RA⁺ Lymphozyten

Schweinelymphozyten wurden mit sättigenden Mengen MIL13 und MIL12 vorbehandelt. Anschließend wurde ungebundener mAk aus der Kultur herausgewaschen und die 5×10^5 Zellen wurden in 200 μ l RPMI in 96-Loch Rundbodenplatten kultiviert. Nach 72 h wurde die Expression von CD40 und MHC Klasse-II Molekülen über biotinylierte mAk sowie von CD45RA⁻ und CD45RA⁺ Zellen, sowie CD4⁻ und CD4⁺ Zellen mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper durchflußzytometrisch untersucht.

Zur Bestätigung wurden weitere Experimente durchgeführt, in denen die CD40 und MHC Klasse-II Expression auf CD45RA⁺⁺ Lymphozyten untersucht wurde. Um zu gewährleisten, daß die gezeigte Modulation der CD40 und MHC Klasse-II Expression für MIL13 spezifisch und nicht auf das Testsystem zurückzuführen ist, wurde außerdem die mittlere Fluoreszenzintensität der MHC Klasse-I Expression auf den porzinen CD45RA⁺⁺ Zellen bestimmt.

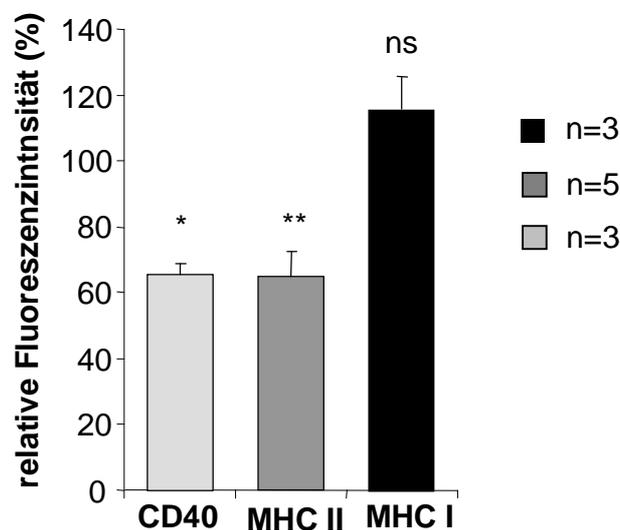


Abbildung 4.24: MHC Klasse-I, Klasse-II und CD40 Expression auf MIL13-stimulierten CD45RA⁺⁺ Lymphozyten

5x10⁵ Schweinelymphozyten blieben unbehandelt oder wurden mit sättigenden Mengen MIL13 vorinkubiert. Nach 72 h Kultur wurde die Expression von CD40 und MHC Klasse-II und MHC Klasse-I Molekülen über biotinylierte mAk und die Expression von CD45RA Molekülen mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper durchflußzytometrisch untersucht. Dargestellt ist die relative Fluoreszenzintensität von MHC Klasse-I, Klasse-II und CD40 Molekülen auf CD45RA⁺⁺ Zellen, ermittelt aus fünf (MHC-II; MHC-I) und drei (CD40) unabhängigen Experimenten ± der Standardabweichung im Vergleich zur Expression der Moleküle ohne mAk-Vorbehandlung (100%). Ns= nicht signifikant; *P<0,05; **P<0,01 für die dargestellte Versuchsgruppe im Vergleich zu unbehandelten porzinen Stimulatorzellen.

In Abbildung 4.24 ist die relative Fluoreszenzintensität von CD40, MHC Klasse-II und Klasse-I Molekülen auf porcinen CD45RA⁺⁺ Lymphozyten aus mindestens drei Experimenten dargestellt. Während die mittlere Expressionsdichte von CD40 und MHC

Klasse-II Molekülen auf den MIL13 behandelten CD45RA⁺⁺ Lymphozyten, im Vergleich zu unbehandelten Zellen, innerhalb von drei Tagen abnahm, wurde die MHC Klasse-I Expression leicht hochreguliert. Die Fluoreszenzintensität der CD40 Moleküle wurde in Anwesenheit von MIL13 auf CD45RA⁺⁺ Zellen durchschnittlich um 34 % reduziert. Eine vergleichbare Reduktion wurde für MHC Klasse-II Moleküle auf den CD45RA⁺⁺ Lymphozyten nach ihrer Vorbehandlung mit MIL13 beobachtet.

5 Diskussion

Die *in vitro* Stimulation humaner T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen des Schweins führt zu einer vollständigen Aktivierung der T-Zellen und zur Ausbildung von Effektorfunktionen. Dies zeigt, daß die „Signal 1“-induzierenden Interaktionen zwischen dem humanen T-Zell-Rezeptor und porzinen MHC Molekülen sowie die „Signal 2“-induzierenden kostimulatorischen Interaktionen, wie z.B. CD28:CD80/86 und CD40L:CD40, zwischen den Spezies funktionell sind. Für eine mögliche klinische Xenotransplantation könnte die Blockade dieser Interaktionen ein interessanter Ansatz zur Verhinderung der T-Zellaktivierung und sogar zur Entwicklung von Transplantattoleranz sein. Mit Hilfe von Antikörpern, die selektiv gegen porzine Zelloberflächenmoleküle gerichtet sind, könnte sich nach einer klinischen Xenotransplantation darüber hinaus die einzigartige Möglichkeit einer Immunsuppression bieten, die systemisch verabreicht wird, ihre Wirkung jedoch Organspezifisch entfaltet. Immunantworten des Empfängers gegen bakterielles oder virales Antigen würden im Rahmen einer solchen Therapie nicht beeinflußt werden.

Mit dem Ziel einer detaillierten Charakterisierung des immunmodulatorischen Potentials von porzin-spezifischen Antikörpern wurde in der vorliegenden Arbeit gefragt, welche Konsequenzen die Antikörperbindung an unterschiedliche porzine Zelloberflächenmoleküle für die humane T-Zellaktivierung hat. Es konnte gezeigt werden, daß nicht nur die Bindung von Antikörpern an porzine MHC und kostimulatorische Moleküle, wie CD40 oder CD80/86, zur Inhibition der T-Zellaktivierung führt, sondern auch mAk gegen porzine CD45 Moleküle die T-Zellaktivierung partiell reduzieren können. Die hier durchgeführten Untersuchungen zur Modulation der xenogenen T-Zellaktivierung durch anti-porzine CD45 mAk weisen darauf hin, daß die gefundenen Effekte nicht auf einer Blockade zwischen porzinen CD45 Molekülen und ihren Liganden auf den humanen T-Zellen beruhen sondern auf eine Induktion von Signalprozessen nach der mAk-Bindung zurückzuführen sind. In der folgenden Diskussion wird zunächst darauf eingegangen, in welchem Umfang Schweinelymphozyten *in vitro* humane T-Zellantworten induzieren können (5.1). Daran schließt sich die Diskussion über die Effektivität und die Eignung von Antikörpern gegen

unterschiedliche porzine Zielstrukturen zur Manipulation der humanen T-Zellaktivierung an (5.2). Ferner werden mögliche Mechanismen diskutiert, durch die CD45 mAk das Potential der porzinen Lymphozyten zur T-Zellaktivierung reduzieren und deren Relevanz für die Xenotransplantation (5.3).

5.1 Induktion humaner T-Zellantworten durch porzines Xenoantigen

Bevor die Wirksamkeit von anti-porzinen Antikörpern zur Manipulation humaner T-Zellantworten gegen porzines Xenoantigen untersucht wurde, war es zunächst von Interesse, die Stärke der T-Zellaktivierung, ausgelöst durch Schweinelymphozyten, zu bestimmen und mit der allogenen Aktivierung durch humane Lymphozyten zu vergleichen. Bei der Kokultur humaner T-Zellen mit bestrahlten Schweinelymphozyten wurden proliferative T-Zellantworten, insbesondere von CD4⁺ T-Zellen, induziert (Abb. 4.1; Abb. 4.3). Diese Antworten fielen im Vergleich zu der allogenen Proliferation zumeist etwas weniger stark aus (Tab. 4.1). Die Schwankungen in der Intensität der Proliferation, die unabhängig von der Stimulation durch allogene oder xenogene Lymphozyten zwischen den verschiedenen Experimenten beobachtet wurden, lassen sich durch Heterogenitäten zwischen den peripheren Blutlymphozyten der individuellen humanen und porzinen Spender erklären. Im Einklang mit einer Reihe publizierter Daten verdeutlichen diese Beobachtungen, daß humane T-Zellen nach ihrer Konfrontation mit porzinen Stimulatorzellen sehr effektiv aktiviert werden können, und daß diese xenogenen Immunreaktionen in ihrer Intensität durchaus mit allogenen T-Zellantworten vergleichbar sind (5, 95, 96). Entsprechend sollten nach einer Transplantation eines Schweineorgans in den Menschen effektive zelluläre Abstoßungsreaktionen, vor allem mit der Beteiligung der CD4⁺ T-Zellen des Empfängers, erwartet werden.

CD4⁺ T-Zellen können zu zwei unterschiedlichen Subpopulationen von T-Helferzellen (Th-Zellen) differenzieren, die sich in ihrer Zytokinproduktion unterscheiden und auf unterschiedliche Weise Immunantworten beeinflussen. So produzieren Th1-Zellen proinflammatorische Zytokine und fördern zelluläre Immunantworten, während Th-2 Zellen Zytokine produzieren, die bevorzugt humorale Immunantworten induzieren. Um

einen Eindruck zu bekommen, in welchem Umfang T-Zellen nach ihrer *in vitro* Aktivierung durch porcine oder allogene humane Lymphozyten Zytokine freisetzen, und ob sich die Zytokinmuster zwischen der allogenen und xenogenen Stimulation unterscheiden, wurde die Produktion der Th1 Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2 sowie der Th2 Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 bestimmt und miteinander verglichen. Es zeigte sich, daß T-Zellen nach ihrer Aktivierung durch Alloantigen und Xenoantigen IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-5 und IL-10 sezernierten. Verglichen mit der allogenen Stimulation produzierten T-Zellen, die durch Xenoantigen aktiviert worden waren, deutlich größere Mengen an IFN- γ und IL-2, während sie vergleichbare oder geringere Mengen an IL-5, IL-10 und TNF- α produzierten (Abb. 4.4). Dieser Befund weist darauf hin, daß eine xenogene T-Zellaktivierung starke proinflammatorische Th1 Antworten auslöst, die *in vivo* mit starken zellulären Abstoßungsreaktionen xenogener Transplantate verbunden sein könnten.

Der Nachweis von komplexen Zytokinmustern nach der Stimulation humaner T-Zellen mit Allo- oder Xenoantigenen wirft die Frage auf, auf welche Weise diese Zytokine Reaktionen gegen ein Transplantat beeinflussen können. IL-2 reguliert die klonale Expansion von Th1 Zellen, CD8⁺ T-Zellen und der NK-Zellaktivität. Außerdem beeinflussen IFN- γ und IL-2 die Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen zu zytotoxischen Effektorzellen. Vor diesem Hintergrund war es von Interesse zu untersuchen, ob diese Zellen im Rahmen ihrer Stimulation mit porcinen Lymphozyten zytotoxische Effektorfunktionen entwickeln können. Der Befund, daß humane Lymphozyten nach ihrer Aktivierung durch xenogene Stimulatorzellen in der Lage waren, porcine Lymphozyten spezifisch zu lysieren (Abb. 4.5), zeigt, daß humane Lymphozyten im Rahmen einer Aktivierung durch Xenoantigen in der Tat ein zytotoxisches Effektorpotential ausbilden. Da IFN- γ und IL-2 in höheren Konzentrationen nach der xenogenen T-Zellaktivierung produziert wurden, ist es denkbar, daß zytotoxische Reaktionen gegen Xenotransplantate stärker ausfallen als solche gegen Allotransplantate.

TNF- α fördert die Aktivierung antigenpräsentierender Zellen, indem es die Expression von MHC Klasse-II und kostimulatorischen Molekülen sowie Adhäsionsmolekülen

induziert bzw. steigert. Es ist bekannt, daß humanes TNF- α über die Speziesbarriere hinweg beim Schwein wirksam ist und auf porzinen APCs die Expression dieser Moleküle ebenfalls induzieren kann (41, 43). Darüber hinaus besteht beim Schwein die Besonderheit, daß humanes TNF- α die Expression von MHC Klasse-I und Klasse-II Molekülen, kostimulatorischen Molekülen und Adhäsionsmolekülen auch auf porzinen Endothelzellen induziert (97). *In vitro* können diese aktivierten porzinen Endothelzellen als antigenpräsentierende Zellen fungieren, die humane T-Zellen effektiv aktivieren (98-100). Porzine Endothelzellen, die durch TNF- α aktiviert wurden, können nicht nur als APCs dienen, sie stellen auch einen Angriffspunkt für die humane NK-Zell-medierte Lyse *in vitro* dar, da sie das Adhäsionsmolekül E-Selektin exprimieren, das mit humanen NK-Zellen interagieren kann (101). Diese Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß die Freisetzung von TNF- α nach der Stimulation der humanen T-Zellen mit Xenoantigenen die Immunogenität des Transplantates steigern könnte.

Die hier beschriebenen *in vitro* Befunde weisen darauf hin, daß die starke Produktion der Th1 Zytokine mit proinflammatorischen Immunantworten einhergehen und damit zu heftigen Abstoßungsreaktionen vaskularisierter xenogener Organe *in vivo* beitragen dürfte. Eine *in vivo* Beurteilung humaner zellulärer Abstoßungsreaktionen nach einer Transplantation porziner Organe in den Menschen ist derzeit natürlich nicht möglich. Einen Eindruck, wie zelluläre Abstoßungsreaktionen *in vivo* ablaufen können, verschaffen verschiedene Kleintiermodelle der Xenotransplantation. Hier bieten sich insbesondere Modelle an, in denen die Empfängertiere selber keine T-Zellen in der Peripherie besitzen und zur Untersuchung von zellulären Abstoßungsreaktionen mit isolierten Zellsubpopulationen rekonstituiert werden. In *nude* Ratten, die aufgrund eines abnormen Thymusstroma keine reifen T-Zellen besitzen, wurden xenogene Hamsterherzen nach der Rekonstitution der Ratten mit syngenen CD4⁺ T-Zellen ohne weitere Hilfe durch zytotoxische Effektorzellen effektiv abgestoßen. Die CD4⁺ T-Zellen induzierten die Bildung von xenoreaktiven IgG Antikörpern durch die B-Zellen des Empfängers und setzten nach ihrer Infiltration in das Transplantat die Th1 Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2 frei (102). Einen Eindruck über die zellulären humanen Abstoßungsreaktionen gegen porzines Xenoantigen erlaubt die Transplantation von porzinem Gewebe in SCID Mäuse (*severe combined immunodeficiency*), die keine

T-Zellen besitzen und mit humanen peripheren Blutlymphozyten (PBMC) rekonstituiert werden. Vor ihrer Rekonstitution akzeptierten diese Tiere spontan porcine Herzerterien und Hautgewebe. Auch nach ihrer Rekonstitution mit humanen PBMC kam es zu keiner Schädigung des xenogenen Gewebes. Erst nach einer zusätzlichen Verabreichung von humanem TNF- α wurde eine Infiltration humaner CD3⁺CD45R0⁺ T-Zellen in das porcine Transplantat und eine damit einhergehende Schädigung beobachtet. Dabei wurde gezeigt, daß die TNF- α Gabe zur Induktion der E-Selektinexpression auf dem porcinen Endothel notwendig ist, die die Transmigration der humanen T-Zellen in das Transplantat fördert (103-105). Untersuchungen mit RAG^{-/-} Mäusen („*recombinase-activating gene-deficient*“), die weder T-Zellen noch B-Zellen generieren können, zeigen, daß diese Mäuse nach ihrer Rekonstitution mit humanen Lymphozyten, die *in vitro* durch bestrahlte Schweinelymphozyten aktiviert worden waren, porcines Hautgewebe effektiv ohne weitere Gabe von Zytokinen abstießen (106). Diese *ex vivo* aktivierten humanen Lymphozyten waren in der Lage, die porcinen Endothelzellen zu aktivieren und so die Transmigration der humanen proinflammatorischen Zellen in das Transplantat zu fördern. Wie in dem xenogenen Rattenmodell spielen auch hier die transferierten CD4⁺ T-Zellen eine bedeutende Rolle bei der Induktion der Abstoßungsreaktionen (33, 107). Insgesamt verdeutlichen diese Modelle, daß die Zytokine, die von den aktivierten T-Zellen produziert werden, einen deutlichen Einfluß auf den Abstoßungsprozeß des xenogenen Gewebes ausüben.

5.2 Modulation humaner T-Zellantworten durch Antikörper gegen porcine Zelloberflächenmoleküle

Die hier dargestellten *in vitro* Untersuchungen zeigten, daß porcine Stimulatorzellen das Potential besitzen, humane T-Zellen effektiv zu aktivieren. Diese Untersuchungen spiegeln wirksame Interaktionen zwischen dem humanen T-Zellrezeptor (TcR) und porcinen MHC-Molekülen über diese Speziesbarriere hinweg wider. Daraus ergab sich die Frage, ob Antikörper gegen porcine MHC-Moleküle die T-Zellproliferation inhibieren können. Um diese Überlegung zu prüfen, wurden humane T-Zellen mit bestrahlten Schweinelymphozyten in Anwesenheit porcinspezifischer MHC Klasse-I oder Klasse-II

Antikörper stimuliert. Diese Untersuchungen zeigten, daß die *in vitro* Blockade der TcR:MHC Klasse-II Interaktionen zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation führte, während die Antikörperbindung an porcine MHC Klasse-I Moleküle die T-Zellaktivierung nur wenig beeinflusste (Abb. 4.8). Aus diesen Daten kann der Schluß gezogen werden, daß die Blockade von TcR:MHC-II Interaktionen durch mAk gegen porcine MHC Klasse-II Moleküle eine effektive Strategie zur Inhibition der Proliferation humaner T-Zellen darstellt.

Beim Einsatz von mAk zur Immunmodulation geht man üblicherweise davon aus, daß die Wirkungen der Antikörper aufgrund einer spezifischen Bindung an das von ihnen erkannte Antigen zustande kommen. Da in den hier beschriebenen Experimenten keine F(ab)₂ Fragmente sondern komplette Antikörper eingesetzt worden sind, war jedoch auch zu überprüfen, ob die Bindung des Antikörper F_c-Fragmentes an F_c-Rezeptoren bei den beobachteten Phänomenen eine Rolle spielt. Dazu wurden in den Experimenten zur mAk-vermittelten Modulation der xenogenen humanen T-Zellreaktivität Isotypkontrollen mitgeführt. Diese Antikörper hatten keinen Einfluß auf die xenogene proliferative T-Zellantwort aber einen gewissen Effekt auf die Zytokinproduktion der aktivierten T-Zellen (Abb. 4.8, Tab. 4.3, Tab. 4.5).

Im Gegensatz zu den hier dargestellten schwachen Auswirkungen einer Blockade der TcR/MHCI-Interaktionen beobachteten DerSimonian et al. (108) in Anwesenheit des anti-porzinen MHC Klasse-I mAk, der auch in dieser Arbeit eingesetzt wurde, eine deutliche Reduktion der humanen anti-porzinen CD8⁺ T-Zellantwort *in vitro*. Diese Diskrepanz könnte darauf zurückzuführen sein, daß in der vorliegenden Arbeit, im Gegensatz zu der Arbeit von DerSimonian, nicht mit reinen CD8⁺ T-Zellpopulationen gearbeitet wurde. Die Beobachtung, daß xenogene T-Zellreaktionen durch die Blockade von TcR:MHC-II Interaktionen *in vitro* signifikant reduziert werden können, steht dagegen im Einklang mit publizierten Daten. So wurde gezeigt, daß die xenogene CD4⁺ T-Zellproliferation in Anwesenheit anti-porziner MHC-DR und -DQ mAk vollständig inhibiert wird (109). Eine weitere Möglichkeit zur Verhinderung einer Interaktion des humanen TcR mit porcinen MHC Klasse-II Molekülen bietet das Einschleusen des MHC Klasse-II Transaktivators CIITA in porcine APCs, der die Zelloberflächenexpression von

MHC Klasse-II Molekülen verhindert. *In vitro* Untersuchungen zeigten, daß CIITA-transfizierte porcine Endothelzellen eine deutlich reduzierte Fähigkeit zur Aktivierung humaner CD4⁺ T-Zellen aufwiesen (110, 111). Diese Strategie unterstreicht die Notwendigkeit der TcR:MHC-II Interaktionen zur Induktion proliferativer T-Zellantworten und weist darauf hin, daß eine mAk-vermittelte Blockade von TcR:MHCII Interaktionen oder die Generierung von CIITA-transgenen Schweinen interessante Konzepte zur Verhinderung von T-Zell-vermittelten Abstoßungsreaktion nach einer klinischen Xenotransplantation darstellen könnten.

Neben MHC Molekülen könnten kostimulatorische Moleküle ebenfalls effektive Zielstrukturen darstellen. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde die humane anti-porcine T-Zellproliferation nach einer Blockade der kostimulatorischen CD154:CD40 oder CD28:CD80/86 Interaktionen bestimmt. Diese Untersuchungen zeigten, daß die Induktion der Proliferation nach der Bindung eines anti-humanen CD40 mAk, der auch an porcine CD40 Moleküle bindet, an die porcinen Stimulatorzellen signifikant reduziert wurde. Darüber hinaus wurde nach der Bindung des Fusionsproteins CTLA-4-Ig an porcine CD80/86 Moleküle eine nahezu komplette Inhibition der Proliferation erreicht (Abb. 4.9). Diese Daten lassen den Schluß zu, daß humane anti-porcine T-Zellantworten bei einer kostimulatorischen Blockade, insbesondere der CD28:CD80/86 Interaktionen, effektiv inhibiert werden können.

Eine schwache Proliferation bei der primären Immunantwort in Abwesenheit des kostimulatorischen Signals kann ein Anzeichen dafür sein, daß T-Zellenergie erzeugt worden ist. Anergie Zellen sollten durch „third-Party“ Antigen, nicht aber durch das Antigen restimulierbar sein, das zur primären Aktivierung verwendet wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage der Anergieerzeugung nicht weiter verfolgt. Es ist aber bekannt, daß eine Kostimulationsblockade häufig mit Anergie einhergeht. Für die humane anti-porcine T-Zellaktivierung konnte gezeigt werden, daß die Blockade von CD28:CD80/86 Interaktionen durch CTLA-4-Ig bei der primären *in vitro* Stimulation T-Zellenergie induzieren konnte, während die Blockade der CD154:CD40 Interaktionen durch einen Antikörper gegen humane CD154 Moleküle dazu nicht in der Lage war (112). Vergleichbare Ergebnisse wurden bei der *in vitro* Restimulation humaner T-Zellen

durch Alloantigen erzielt, die bei der primären Stimulation in Anwesenheit von mAk gegen CD80 und CD86 Moleküle oder von mAk gegen CD40 Moleküle aktiviert worden waren. Darüber hinaus konnte bei diesen *in vitro* Untersuchungen gezeigt werden, daß T-Zellen, denen das Signal über die CD28:CD80/86 Interaktionen fehlt aber ein wirksames Signal über die CD154:CD40 Interaktionen bekommen, zwar nur schwach proliferieren aber IL-2 produzieren und ein zytotoxisches Effektorpotential aufweisen. Erst durch die zusätzliche Blockade von CD40 Molekülen ließ sich auch die IL-2 Produktion und das zytotoxische Potential der Zellen inhibieren (113-115). Diese Daten machen es wahrscheinlich, daß eine kombinatorische Blockade von CD40, CD80 und CD86 Molekülen benötigt wird, um die Reaktivität der T-Zellen vollständig zu inhibieren und T-Zellenergie zu induzieren.

Antikörper gegen kostimulatorische Moleküle, die auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden, können ihre Wirkung nach einer Allo- und Xenotransplantation auf unterschiedliche Weise entfalten. Nach einer Allotransplantation binden die verabreichten Antikörper an APCs des Empfängers und an APCs des Spenders, die mit dem transplantierten Organ in den Empfänger gelangen. In *in vivo* Klein- und Großtiermodellen der Allotransplantation konnte gezeigt werden, daß das Überleben verschiedener Organe durch eine kombinatorische Blockade der CD28:CD80/86 und CD40:CD154 Interaktionen auf der Seite der APCs des Empfängers und des Spenders effektiv verlängert und sogar Transplantattoleranz induziert wurde (6, 61, 64). Nach einer Xenotransplantation bietet sich dagegen die Möglichkeit, die kostimulatorischen Rezeptor:Ligand Interaktionen durch Spezies-spezifische Antikörper selektiv auf der Seite der APCs des Empfängers oder des Spenders zu manipulieren. So konnte nach der Verabreichung von Antikörpern gegen CD80/86 und CD40 Moleküle des Empfängers das Überleben porziner Inselzellen deutlich verlängert werden (68). Durch eine mAk-vermittelte Manipulation der antigenpräsentierenden Zellen des Empfängers ist es denkbar, daß nicht nur die Immunantworten des Empfängers gegen das Transplantat manipuliert werden, sondern auch Immunantworten gegen nominelles (z.B. virales und bakterielles) Antigen. Dagegen würde eine Therapie mit Antikörpern, die ausschließlich gegen Zelloberflächenmoleküle auf den APCs des Spenders gerichtet sind, selektiv Immunantworten gegen das Transplantat manipulieren, nicht aber

Immunantworten gegen nominelles Antigen. Daß auch diese Strategie das Überleben xenogener Transplantate erfolgreich verlängern kann, zeigten Lechler et al. (70). Sie immunisierten zunächst Mäuse mit porzinen OVA-CD86-Peptiden, die daraufhin Antikörper gegen porzines CD86 produzierten. Nach der Bestimmung des Antikörpertiters wurden porzine Inselzellen unter die Nierenkapsel der Mäuse transplantiert, welche in Abhängigkeit der Stärke der Antikörperproduktion akzeptiert wurden. Diese Untersuchung zeigt, daß die Inhibition der T-Zellaktivierung durch die Blockade von kostimulatorischen Molekülen seitens der Spender-APCs das Überleben des xenogenen Gewebes ebenfalls verlängern kann.

Trotz dieser viel versprechenden Datensituation könnte eine therapeutische Anwendung von Antikörpern gegen porzine MHC Moleküle sowie CD40 und CD86 Moleküle nach einer Transplantation vaskularisierter Organe problematisch sein, da porzine Endothelzellen diese Moleküle konstitutiv bzw. nach ihrer Aktivierung auf der Zelloberfläche exprimieren (Abb. 4.10). Folglich könnten Antikörper nach ihrer Bindung an MHC, CD40 und CD86 Moleküle auf den porzinen Endothelzellen, durch die gleichen Mechanismen wie präformierte Antikörper das Komplementsystem sowie die NK-Zellen des Empfängers aktivieren, die Lyse des Endothels medieren (116). Vor dem Hintergrund dieser Problematik wäre es vorteilhaft porzin-spezifische Antikörper für eine Immunmodulation einzusetzen, die nicht auf dem porzinen Endothel exprimiert werden. Eine Kategorie von Antikörpern, die diese Voraussetzungen erfüllen, sind Antikörper gegen CD45 Moleküle. Diese Moleküle werden ausschließlich auf Leukozyten exprimiert aber nicht auf Endothelzellen (Abb. 4.11).

Die Testung von sieben CD45 Antikörpern gegen unterschiedliche CD45 Isoformen zeigte, daß die Reaktionsstärke der humanen T-Zellantwort nach der Bindung von fünf der eingesetzten Antikörper an CD45 Moleküle auf porzinen Stimulatorzellen tatsächlich partiell inhibiert wurde. Darunter befanden sich drei Antikörper, die die Proliferation um durchschnittlich 25 % bis 50 % reduzierten. Bei diesen Antikörpern handelte es sich um den CD45common mAk K252.1E4, der alle CD45 Isoformen erkennt, den CD45RC mAk 3a56, der an die Isoformen CD45AC und CD45C bindet und den CD45RA-spezifischen Antikörper MIL13, der ausschließlich die CD45AC Isoform

detektiert (Tab. 4.4). Von diesen mAk besaß der CD45RA Antikörper MIL13 das stärkste inhibitorische Potential. Da diese drei Antikörper aus der Maus stammen, den gleichen Isotyp aufweisen und sich in ihrer Wirksamkeit unterscheiden, lassen diese Untersuchungen den Schluß zu, daß die Bindung der CD45 Antikörper an bestimmte Isoformen eine Rolle für die Stärke der Modulation spielt. Dabei scheinen Antikörper gegen die Exon A exprimierende Region der CD45 Moleküle das stärkste modulatorische Potential zu besitzen. Der Vergleich der CD45 mAk MIL13 und 3c3/9, die beide die CD45RA Isoform erkennen aber sehr wahrscheinlich gegen zwei unterschiedliche Epitope gerichtet sind, zeigte, daß diese beiden mAk eine unterschiedliche Wirkung auf die xenogenen T-Zellproliferation haben. Dies weist zudem darauf hin, daß das Epitop, an das der CD45 mAk bindet sehr wahrscheinlich ebenfalls eine Rolle für die modulatorische Wirksamkeit der mAk spielen. Unterstützt wird die Überlegung dadurch, daß beide CD45RA mAk aus der Maus stammen und vom IgG₁ Isotyp sind. Dies gilt auch für einen Vergleich zwischen den CD45common mAk K252.1E4 und 2A5.

Eine Ursache für die Isoform-abhängige Wirkung der CD45 mAk könnte das Expressionsmuster der CD45 Isoformen auf den Lymphozytensubpopulationen sein. Um diese Überlegung zu überprüfen, wurde die Expressionsdichte von CD45RA und CD45RC Molekülen auf porzinen B-Zellen, Monozyten sowie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen untersucht (Tab. 4.2). Dabei zeigte sich, daß CD45RA Moleküle in hoher Dichte auf B-Zellen und CD8⁺ T-Zellen exprimiert werden, während CD45RC Moleküle in höherer Dichte auf CD4⁺ T-Zellen exprimiert werden. Auf Monozyten werden sowohl CD45RA als auch CD45RC Moleküle in geringer Dichte exprimiert. Beim Schwein erfüllen nicht nur B-Zellen und Monozyten eine Funktion als APCs, sondern auch periphere CD8⁺ T-Zellen. Sie exprimieren im Ruhezustand MHC Klasse-II Moleküle und können *in vitro* effektiv allogene MHCII⁺ T-Zellen aktivieren (117, 118). Dieser Befund zeigt, daß die Zielstrukturen des CD45RA mAk MIL13 auf Zellen exprimiert werden, die ein stimulatorisches Potential aufweisen.

Die Bedeutung des Epitops und der CD45 Isoform für die Wirkungen verschiedener CD45 Antikörper ist auch *in vivo* bekannt. In Mausmodellen konnte das Überleben

verschiedener Organe nach einer Allo- und Xenotransplantation durch die Verabreichung des CD45RB mAk MB23G2 erfolgreich verlängert werden, während andere CD45 Antikörper, die alle CD45 Isoformen oder ein anderes Epitop der CD45RB Isoform erkennen, das Überleben des Transplantates nicht beeinflussten (78, 79, 119). Nähere Untersuchungen ergaben, daß der mAk MB23G2 ein Neuraminidase-sensitives Epitop auf CD45RB Molekülen erkennt (78). Es bleibt zu prüfen, ob das modulatorische Potential des porzin-spezifischen CD45RA Antikörpers MIL13 ebenfalls auf die Bindung an bestimmte Zuckerstrukturen zurückzuführen ist.

5.3 Wirkmechanismen des porzin-spezifischen CD45RA Antikörpers MIL13

Der Befund, daß die Behandlung von porzinen Stimulatorzellen mit bestimmten CD45 Antikörpern eine verminderte Reaktionsstärke humaner T-Zellen nach sich zieht, führte zu der Frage nach den möglichen Mechanismen dieser Immunmodulation. Dabei sind grundsätzlich zwei Mechanismen denkbar: zum Einen eine Blockade von kostimulatorischen Rezeptor:Ligand Interaktionen und zum Anderen die Induktion einer Signalkaskade.

Die Expression eines Liganden für porzine CD45 Moleküle auf der Zelloberfläche der humanen T-Zellen ist die Voraussetzung dafür, daß CD45 mAk Rezeptor:Ligand Interaktionen zwischen humanen T-Zellen und porzinen Lymphozyten blockieren. Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe mit der porzinen Zelllinie STE („swine testis epithelioid“), die mit porzinen CD45 Molekülen transfiziert worden war, zeigten, daß diese Zellen nicht in der Lage waren, die proliferative Antwort humaner CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten STE Zellen zu steigern. Außerdem führte die Bindung von Antikörpern an die CD45 Moleküle auf den transfizierten STE Zellen zu keiner Reduktion der CD4⁺ T-Zellproliferation, wie es für eine Blockade kostimulatorischer Rezeptor:Ligand Interaktionen zu erwarten ist (120). Diese Untersuchungen weisen darauf hin, daß humane T-Zellen keinen Liganden für porzine

CD45 Moleküle exprimieren. Somit sollten anti-porzine CD45 mAk keine kostimulatorischen Rezeptor:Ligand Interaktionen blockieren.

Die Proteintyrosinphosphatase CD45 ist ein Transmembranprotein, dessen intrazelluläre Region eine Phosphataseaktivität aufweist. Nach der Bindung von Antikörpern an CD45 Moleküle verändert sich die Phosphataseaktivität des Moleküls, die durch die Dephosphorylierung von Tyrosinresten verschiedener Proteine intrazelluläre Signalkaskaden beeinflussen kann. Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob sich das Tyrosinphosphorylierungsmuster in den porzinen Lymphozyten nach Bindung des anti-porzinen CD45RA Antikörpers MIL13 verändert. Es zeigte sich, daß die Bindung von MIL13 eine transiente Dephosphorylierung von Tyrosinresten verschiedener intrazellulärer Proteine induziert (Abb. 4.17). Dies weist darauf hin, daß nach der Bindung des Antikörpers an CD45RA Moleküle transmembrane Signale in die Zellen weitergeleitet werden.

Dieser Befund führte zu der Frage, welche Konsequenzen die Induktion transmembraner Signale durch CD45 mAk für die Zellen hat. Eine Möglichkeit ist, daß die Bindung von CD45 Antikörpern Apoptose in den Zellen induziert und das stimulatorische Potential folglich durch eine teilweise Verminderung der Anzahl porziner Stimulatorzellen reduziert wird. Dies konnte für die anti-porzinen CD45 mAk jedoch nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Die Beobachtung, daß die Bindung des CD45RA mAk zu einer Veränderung des Tyrosinphosphorylierungsmusters in den Zellen führte, warf die Frage auf, ob die Antikörperbindung auf zellulärer Ebene Konsequenzen hat. Mikroskopisch konnte nach der Bindung des CD45RA mAk die Bildung starker Lymphozytenaggregate beobachtet werden, wohingegen der porzin-spezifische MHC Klasse-I Antikörper keine Lymphozytenadhäsion induzieren konnte (Abb. 4.19). Nach der mAk-vermittelten Kreuzvernetzung von CD45RA Molekülen wurde keine Ausbildung von Zellaggregaten beobachtet (Daten nicht gezeigt). Vor dem Hintergrund, daß die Proliferation nach einer Stimulation der T-Zellen mit porzinen Lymphozyten, deren CD45 Moleküle durch mAk kreuzvernetzt worden waren, nicht reduziert wurde (Abb. 4.14), weisen diese Daten

darauf hin, daß eine CD45 mAk-vermittelte Induktion der Zelladhäsion eine Rolle bei der Modulation des stimulatorischen Potentials der porzinen Zellen spielen könnte.

Die Beobachtung, daß porzine Lymphozyten nach der Bindung des löslichen CD45RA mAk Aggregate bilden, die möglicherweise für die Modulation des stimulatorischen Potentials der Zellen notwendig sind, führte zu der Frage, ob das Expressionsmuster von Adhäsionsmolekülen auf porzinen Lymphozyten nach der Bindung des CD45 mAk verändert wird. In den hier durchgeführten Experimenten wurden nur marginale Unterschiede in der Expression der Adhäsionsmoleküle CD58 und CD54 auf mRNA- bzw. Proteinebene nachgewiesen (Abb.4.20). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß die Expression der Adhäsionsmoleküle nicht erhöht wird, sondern daß CD45 Moleküle nach der mAk-Bindung in die Kontaktregionen der Zelladhäsion einwandern können und dort die Adhäsion beeinflussen, wie dies für humane T-Zellen beschrieben wurde (90).

Die Expressionsdichte der „Signal 1“-induzierenden MHC-Moleküle sowie der „Signal 2“-induzierenden kostimulatorischen Moleküle beeinflußt das stimulatorische Potential von antigenpräsentierenden Zellen. So induzieren APCs, die MHC Klasse-II sowie CD40 und CD80/86 Moleküle in hoher Dichte auf ihrer Zelloberfläche exprimieren starke immunogene T-Zellantworten, während Zellen, die diese Moleküle in geringer Dichte exprimieren, nur schwache T-Zellantworten hervorrufen, die sehr wahrscheinlich sogar zur T-Zelltoleranz führen können (121). Vor diesem Hintergrund wurde der Frage nachgegangen, ob die Stimulation porziner antigenpräsentierender Zellen mit dem CD45RA mAk MIL13 die Expression verschiedener kostimulatorischer und MHC Moleküle beeinflussen kann. Molekularbiologische Untersuchungen zeigten, daß porzine Stimulatorzellen nach der Bindung des CD45RA mAk weniger CD40 auf mRNA Ebene exprimierten, während die Expression für CD80 und CD86 nicht beeinflußt wurde (Abb. 4.21, Abb. 4.22). Die verminderte CD40 Expression spiegelte sich auch auf der Zelloberfläche der porzinen Zellen wider (Abb.4.23, Abb.4.24). Außerdem führte die Stimulation der Zellen mit dem CD45RA mAk MIL13 zu einer deutlichen Reduktion der MHC Klasse-II Expression (Abb. 4.24). Diese MIL13 induzierte Reduktion der

MHC Klasse-II und CD40 Expression könnte folglich mit einer Verminderung des stimulatorischen Potentials porziner antigenpräsentierender Zellen einhergehen.

Die Beobachtung, daß die humane anti-porzine T-Zellproliferation nach der Blockade der CD40:CD154 sowie MHC Klasse-II:TcR Interaktionen durch mAk gegen porzine CD40 und MHC Klasse-II Moleküle signifikant reduziert wurde (Abb. 4.8; Abb. 4.9), weist darauf hin, daß diese Interaktionen für die T-Zellaktivierung wichtig sind. Somit könnte die verminderte CD40 und MHC Klasse-II Expression auf den porzinen Stimulatorzellen eine Ursache dafür sein, daß die CD45RA mAk-behandelten porzinen Zellen die humane Proliferation partiell inhibierten. Dabei könnte insbesondere die geringe CD40 Expression die stimulatorische Fähigkeit der Zellen beeinflussen. CD40 Moleküle sind bedeutende Regulatoren der stimulatorischen Kapazität von APCs. So wird auf APCs, nach der Induktion von CD154:CD40 Interaktionen, die Expression von CD80/CD86 und MHC Klasse-II Molekülen sowie von verschiedenen Adhäsionsmolekülen hochreguliert (122). Mit Hilfe von CD154^{-/-} Mäusen konnte gezeigt werden, daß die B-Zellen dieser Tiere aufgrund der fehlenden Stimulation über CD40 nicht in der Lage waren, ihre CD80/86 Expression zu regulieren und infolgedessen keine effektiven T-Zellantworten induzieren konnten (123).

Antigenpräsentierende Zellen kontrollieren die Differenzierung von T-Helferzellen zu proinflammatorischen Th1- und immunregulatorischen Th2-Zellen. Während Th1 Antworten mit der Induktion der Organabstoßung in Verbindung gebracht werden, fördern Th2 Antworten das Überleben des Transplantates und die Induktion bzw. die Aufrechterhaltung von Toleranz gegenüber dem Transplantat. Bei der Regulation dieser Antworten spielt die Zytokinproduktion dieser Zellen eine wichtige Rolle. Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob humane T-Zellen nach der Aktivierung durch MIL13-behandelte porzine Stimulatorzellen ein anderes Th1/Th2 Zytokinmuster produzieren als T-Zellen, die mit unbehandelten porzinen Zellen aktiviert wurden. Es zeigte sich, daß T-Zellen nach der Stimulation in Anwesenheit von MIL13 stark reduzierte Mengen IFN- γ und TNF- α produzierten (Abb. 4.16). Die signifikante Verminderung der IFN- γ und TNF- α Produktion nach der T-Zellaktivierung durch MIL13-behandelte porzine Zellen könnte dazu führen, daß die T-Zellreaktionen in

Richtung immunregulatorische Th2 Antworten verlagert und so proinflammatorische zelluläre Immunantworten gegen das Xenoantigen reduziert werden. Bei einer möglichen klinischen Verabreichung des CD45RA mAk MIL13 könnte sich eine Steigerung der Th2 Zytokinproduktion im Verhältnis zur Produktion von Th1 Zytokinen positiv auf das Überleben des Xenotransplantates auswirken.

Welchen Einfluß könnte dieses ungewöhnliche Zytokinmuster, das humane T-Zellen zeigen, nach Aktivierung durch CD45RA mAk-behandelte porcine Stimulatorzellen, auf das Schicksal eines Xenotransplantates haben? Hier fällt zunächst die sehr geringe IFN- γ Produktion auf, die zwei Konsequenzen mit sich bringen könnte. Zum Einen fördert IFN- γ das zytotoxische Potential von CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen, die effektiv porcine Zielzellen lysieren können. Somit könnte die verminderte IFN- γ Produktion der T-Zellen mit einem reduzierten zytotoxischen Potential humaner CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen einhergehen. Darüber hinaus ist es bekannt, daß die Empfindlichkeit aktivierter T-Zellen gegenüber dem aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD) und dem programmierten Zelltod (Apoptose) in Anwesenheit geringer IFN- γ Konzentrationen gefördert wird. Dies könnte bedeuten, daß die geringe IFN- γ Produktion außerdem zu einer erhöhten Depletion aktivierter humaner T-Effektorzellen führt. Dieser Mechanismus der IFN- γ -induzierten Depletion aktivierter T-Zellen ist sehr wahrscheinlich für die Induktion einer Transplantattoleranz notwendig. So verglich die Arbeitsgruppe um Lakkis (124, 125) das Überleben allogener Herz- und Hauttransplantate von IFN- γ ^{+/+} Mäusen in IFN- γ ^{+/+} und IFN- γ ^{-/-} Empfängertieren nach einer Blockade der CD154:CD40 und CD28:CD80/86 Interaktionen. Sie zeigten, daß das Überleben der Allotransplantate nur in IFN- γ ^{+/+} Mäusen verlängert werden konnte und daß eine zusätzliche Verabreichung eines neutralisierenden mAk gegen IFN- γ die Induktion des Langzeitüberlebens der Transplantate auch in den IFN- γ ^{+/+} Mäusen verhinderte.

Die Immunogenität von antigenpräsentierenden Zellen könnte durch die verminderte TNF- α Produktion der humanen T-Zellen nach Aktivierung durch MIL13-behandelte Schweinelymphozyten ebenfalls beeinflusst werden. Ausgehend von den vorangegangenen Überlegungen (5.1) ist es denkbar, daß eine reduzierte TNF- α

Produktion mit einer verminderten Expressionsdichte von MHC Molekülen, kostimulatorischen Molekülen sowie Adhäsionsmolekülen auf humanen sowie porzinen antigenpräsentierenden Zellen einhergeht und diese Zellen ein geringes stimulatorisches Potential aufweisen. Da die Expression des Adhäsionsmoleküls E-Selektin, das die Transmigration von Lymphozyten durch das Endothel fördert und einen Angriffspunkt für NK-Zellen darstellt, durch TNF- α reguliert wird, könnte eine verminderte Produktion dieses Zytokins außerdem die Transmigration proinflammatorischer humaner Zellen durch das Endothel in das Transplantat *in vivo* erschweren und eine NK-vermittelte Lyse des porzinen Endothels vermindern.

Humane T-Zellen produzierten nach der Stimulation mit MIL13-behandelten porzinen Lymphozyten etwas mehr IL-2 als nach der Stimulation mit unbehandelten Zellen. IL-2 kann, wie IFN- γ , die Depletion von Effektorzellen fördern, da es die Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber AICD und Apoptose erhöht (65, 126). Auf diese Weise könnte das IL-2 eine Eliminierung von xenoreaktiven T-Zellen unterstützen, die für eine Induktion von Toleranz gegenüber dem Transplantat notwendig ist. Kürzlich wurde außerdem postuliert, daß die wichtigste Funktion des IL-2 die Aktivierung und Expansion von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) ist (127, 128). Das regulatorische Potential dieser Zellen ist entscheidend an der Aufrechterhaltung der T-Zelltoleranz nach einer Allotransplantation beteiligt (52). Erste Untersuchungen in der Xenosituation zeigten, daß humane regulatorische T-Zellen Antworten xenogener T-Effektorzellen *in vitro* ebenfalls effektiv supprimieren können (129). In diesem Zusammenhang könnte die leichte Erhöhung der IL-2 Produktion die Induktion von Langzeitüberleben xenogener Transplantate *in vivo* unterstützen. Es sollte aber nicht vernachlässigt werden, daß die erhöhte IL-2 Produktion möglicherweise auf das *in vitro* Testsystem zurückzuführen ist. Bei der Stimulation mit bestrahlten Schweinelymphozyten regulieren die humanen T-Zellen ihre IL-2 Sekretion über autokrine Mechanismen, da ihnen hier keine T-Zellwachstumsfaktoren zur Verfügung stehen sollten, die von APCs produziert werden. *In vivo* ist die T-Zellproliferation dagegen sehr wahrscheinlich stärker von IL-15 abhängig, das von den antigenpräsentierenden Zellen freigesetzt wird (130).

Die Beobachtung, daß humane T-Zellen nach der Aktivierung mit CD45RA mAk-behandelten porzinen Stimulatorzellen eine verminderte Th1 Zytokinproduktion aufwiesen, warf auch die Frage auf, inwiefern diese das Überleben xenogener Transplantate *in vivo* beeinflussen könnte. Es sind verschiedene Kleintiermodelle der Allo- und Xenotransplantation beschrieben, in denen das Überleben verschiedener transplantierte Organe nach Verabreichung von Antikörpern verlängert oder sogar Toleranz gegenüber dem Transplantat induziert werden konnte. So konnte das Überleben xenogener porziner Inselzellen in Mäusen nach Verabreichung des CD45RB mAk MB23G2 mit einer stark verminderten Freisetzung der Th1-Zytokine IL-2 und IFN- γ sowie der Th2- Zytokine IL-4 und IL-10 in Verbindung gebracht werden (85, 86). Eine Transplantattoleranz konnte in diesen xenogenen Mausmodellen jedoch nicht induziert werden. Im allogenen Mausmodell konnte nach der Transplantation von Inselzellen und Nieren nach Verabreichung des CD45RB mAk Toleranz induziert werden, die mit einer Dominanz von Th2 über Th1 Zytokinen einherging (80). Diese Gewichtung in der Zytokinproduktion zugunsten von Th2 Zytokinen wird sehr wahrscheinlich erst im späteren Verlauf T-Zell-vermittelter Immunantworten gegen das Transplantat induziert. So beobachteten Onodera et al. (55) in einem allogenen Rattenmodell nach Herztransplantation, daß die Toleranzinduktion nach Verabreichung eines CD4 mAk zunächst mit einer markanten Reduktion der Th1- und Th2-Zytokinexpression einherging und erst bei der Aufrechterhaltung der Toleranz durch eine Übergewichtung von Th2-Zytokinen charakterisiert war. Da sich die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Untersuchungen auf die Induktionsphase xenogener T-Zellantworten beschränkten, wäre es möglich, daß die Antworten auf die MIL13-behandelten Stimulatorzellen in einer späteren Aktivierungsphase mit einem Shift der Zytokinproduktion von Th1 nach Th2 einhergehen könnte.

Auf dem Weg zur klinischen Xenotransplantation müssen noch eine Reihe von physiologischen und insbesondere immunologischen Hürden überwunden werden, die deutlich komplexer sind als bei einer Allotransplantation. Dennoch bietet die Xenotransplantation im Vergleich zur Allotransplantation zwei wesentliche Vorteile. So besteht zum Einen in der Xenosituation die Möglichkeit, das Schwein als Organspender gentechnisch zu verändern. Darüber hinaus sollte es bei einer Transplantation von

porzinen Zellen oder Organen in den Menschen möglich sein, mit Hilfe von Spezies-spezifischen Antikörpern eine Immunsuppression einzusetzen, die ausschließlich gegen das transplantierte Gewebe gerichtet ist. Dieses Konzept wurde in der vorliegenden Arbeit modellhaft *in vitro* geprüft. Die erhobenen Daten sprechen dafür, daß mAk gegen kostimulatorische und MHC Moleküle des Schweins die humane T-Zellreaktivität gegen porzines Xenoantigen effektiv inhibieren können. Eine Verabreichung dieser mAk hätte aber den Nachteil, daß die mAk an ihre Zielstrukturen auf porzinen Endothelzellen binden und somit eine Komplement-/NK-Zell-vermittelte Zerstörung vaskularisierter Xenotransplantate fördern könnten. Demgegenüber könnten mAk gegen porzine CD45 Moleküle die xenogene humane T-Zellreaktivität reduzieren, ohne Immunreaktionen des Empfängers gegen das Endothel des Transplantates zu beeinflussen. Die hier beschriebenen *in vitro* Daten zeigen natürlich nur die grundsätzliche Möglichkeit einer Antikörpertherapie nach Xenotransplantation auf und geben Hinweise auf die Mechanismen, durch die hierbei die xenogene humane T-Zellreaktivität vermindert werden könnte. Vor einer möglichen klinischen Anwendung sind deshalb selbstverständlich weitere Testungen dieses Konzeptes *in vivo* erforderlich, wofür zunächst Kleintiermodelle und später auch Primatenmodelle der Xenotransplantation in Frage kommen dürften.

6 Zusammenfassung

Humane T-Zellen lassen sich *in vitro* effektiv durch antigenpräsentierende Zellen (APC) des Schweins aktivieren. Dies weist darauf hin, daß funktionelle Interaktionen sowohl zwischen porzinen MHC Molekülen und dem humanen T-Zell-Rezeptor („Signal 1“ der T-Zellaktivierung) als auch zwischen porzinen kostimulatorischen Molekülen (z.B. CD40, CD80/86) und den zugehörigen Liganden auf humanen T-Zellen („Signal 2“ der T-Zellaktivierung) möglich sind. Die Blockade dieser Interaktionen mittels Spezies-spezifischer monoklonaler Antikörper (mAk) gegen die porzinen Moleküle sollte im Falle einer klinischen Xenotransplantation selektiv die T-Zellreaktivität des Empfängers gegen das Transplantat vermindern, ohne dessen Reaktion gegen nominelles Antigen zu beeinträchtigen. Um dieses Konzept modellhaft zu überprüfen, wurde untersucht, welche Auswirkungen die Bindung anti-porziner Antikörper an Stimulatorzellen des Schweins auf deren Fähigkeit hat, humane T-Zellen *in vitro* zu aktivieren.

Eine Blockade von „Signal 1“-erzeugenden Interaktionen durch mAk gegen porzine MHC Klasse-II Moleküle und von „Signal 2“-liefernden Bindungen durch anti-porzine CD40 und CD80/86 mAk führte zu einer markanten Verminderung der humanen T-Zellreaktivität gegen porzines Xenoantigen. T-Zellreaktionen gegen Alloantigen und Mitogene wurden durch diese Reagenzien nicht beeinträchtigt. Da porzine MHC Klasse-II, CD40 und CD80/86 Moleküle nicht nur auf typischen APCs (z.B. B-Zellen, Monozyten) sondern auch auf Endothelzellen nachgewiesen wurden, sind sie als Zielstrukturen für eine Antikörper-vermittelte Immunmodulation nur bedingt geeignet. Es wurden daher ebenfalls die Wirkungen von Antikörpern gegen porzine CD45 Moleküle getestet, die ausschließlich auf Leukozyten exprimiert werden. Die Bindung insbesondere von CD45RA mAk an porzine Stimulatorzellen löste intrazelluläre Signalprozesse aus und reduzierte die Expressionsdichte von MHC Klasse-II und CD40 Molekülen. Humane T-Zellen reagierten auf anti-CD45 mAk-behandelte Stimulatorzellen mit bis zu 50 % reduzierter Proliferation, die mit einer stark verminderten Produktion der Th1 Zytokine IFN- γ und TNF- α einherging.

Aus diesen Daten wird der Schluß gezogen, daß sich CD45 Antikörper für eine Immunmodulation der humanen anti-porzinen T-Zellreaktivität eignen könnten, ohne daß es zur Schädigung des Transplantatendothels kommen sollte. Da tolerogene T-Zellantworten häufig von einer verminderten Th1 Zytokinproduktion begleitet werden, ist darüber hinaus zu diskutieren, ob CD45 mAk-behandelte porzine APCs die Induktion tolerogener T-Zellantworten fördern können.

7 Literatur

1. Byrne, G. W., K. R. McCurry, M. J. Martin, S. M. McClellan, J. L. Platt, and J. S. Logan. 1997. Transgenic pigs expressing human CD59 and decay-accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement-mediated damage. *Transplantation* 63:149.
2. Forte, P., L. Pazmany, U. B. Matter-Reissmann, G. Stussi, M. K. Schneider, and J. D. Seebach. 2001. HLA-G inhibits rolling adhesion of activated human NK cells on porcine endothelial cells. *J. Immunol.* 167:6002.
3. Matsunami, K., S. Miyagawa, R. Nakai, M. Yamada, and R. Shirakura. 2002. Modulation of the leader peptide sequence of the HLA-E gene up-regulates its expression and down-regulates natural killer cell-mediated swine endothelial cell lysis. *Transplantation* 73:1582.
4. Tadaki, D. K., A. Williams, K. P. Lee, A. D. Kirk, and D. M. Harlan. 2003. Porcine CD80: cloning, characterization, and evidence for its role in direct human T-cell activation. *Xenotransplantation* 10:252.
5. Yamada, K., D. H. Sachs, and H. DerSimonian. 1995. Human anti-porcine xenogeneic T cell responses. *J. Immunol.* 155:5249.
6. Kirk, A. D., D. M. Harlan, N. N. Armstrong, T. A. Davis, Y. Dong, G. S. Gray, X. Hong, D. Thomas, J. H. Fechner Jr., and S. J. Knechtle. 1997. CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94:8789.
7. Calne, R. Y. 1970. Organ transplantation between widely disparate species. *Transplant. Proc.* 2:437.
8. Auchincloss Jr, H., and D. H. Sachs. 1998. Xenogeneic transplantation. *Annu. Rev. Immunol.* 16:433.
9. Sandrin, M., and I. F. McKenzie. 1994. Gal alpha (1,3)Gal, the major xenoantigen(s) recognised in pigs by human natural antibodies. *Immunol. Rev.* 141:169.
10. Galili, U., S. B. Shohet, E. Kobrin, C. L. Stults, and B. A. Macher. 1988. Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *J. Biol. Chem.* 263:17755.
11. Galili, U., and K. Swanson. 1988. Gene sequences suggest inactivation of alpha-1,3-galactosyltransferase in catarrhines after the divergence of apes from monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 88:7401.

12. Galili, U., R. E. Mandrell, R. M. Hamadeh, S. B. Shoheit, and J. M. Griffiss. 1988. Interaction between human natural anti-alpha-galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora. *Infect. Immunol.* 56:1730.
13. Bach, F. H. 1998. Xenotransplantation: problems and prospects. *Annu. Rev. Med.* 49:301.
14. Dalmaso, A. P., G. M. Vercellotti, R. J. Fischel, R. M. Bolman, F. H. Bach, and J. L. Platt. 1992. Mechanism of complement activation in the hyperacute rejection of porcine organs transplanted into primate recipients. *Am. J. Pathol.* 140:1157.
15. Dalmaso, A. P., G. M. Vercellotti, J. L. Platt, and F. H. Bach. 1991. Inhibition of complement-mediated endothelial cell cytotoxicity by decay-accelerating factor. Potential for prevention of xenograft hyperacute rejection. *Transplantation* 52:530.
16. Alwayn, I. P., M. Basker, L. H. Buhler, and D. K. C. Cooper. 1999. The problem of anti-pig antibodies in pig-to-primate xenografting: current and novel methods of depletion and/or suppression of production of anti-pig antibodies. *Xenotransplantation* 6:157.
17. Katopodis, A. G., R. G. Warner, R. O. Duthaler, M. B. Streiff, A. Bruelisauer, O. Kretz, B. Dorobek, E. Persohn, H. Andres, A. Schweitzer, G. Thoma, W. Kinzy, V. F. J. Quesniaux, E. Cozzi, H. F. S. Davies, R. Manez, and D. J. White. 2002. Removal of anti-Gal{alpha}1,3Gal xenoantibodies with an injectable polymer. *J. Clin. Invest.* 110:1869.
18. Tseng, Y.-L., K. Kuwaki, F. J. M. F. Dor, A. Shimizu, S. L. Houser, Y. Hisashi, K. Yamada, S. C. Robson, M. Awwad, H. J. Schuurman, D. H. Sachs, and D. K. C. Cooper. 2005. Alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pig heart transplantation in baboons with survival approaching 6 month. *Transplantation* 80:1493.
19. Yamada, K., K. Yazawa, A. Shimizu, T. Iwanaga, Y. Hisashi, M. Nuhn, P. O'Malley, S. Nobori, P. A. Vagefi, C. Patience, J. A. Fishman, D. K. C. Cooper, R. J. Hawley, J. L. Greenstein, H. J. Schuurman, M. Awwad, M. Sykes, and D. H. Sachs. 2005. Marked prologation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue. *Nat. Med.* 11:32.
20. Kuwaki, K., Y.-L. Tseng, F. J. M. F. Dor, A. Shimizu, S. L. Houser, T. M. Sanderson, C. J. Lancos, D. D. Prabharasuth, J. Cheng, K. Moran, Y. Hisashi, N. Mueller, A. Yamada, J. L. Greenstein, R. J. Hawley, C. Patience, M. Awwad, J. A. Fishman, S. C. PRobson, H. J. Schuurman, D. H. Sachs, and D. K. C. Cooper. 2005. Heart transplantation in baboons using alpha-1,3 galactosyltransferase gene-knockout gigs as donors: initial experience. *Nat. Med.* 11:2931.

21. Pilewski, J. M., R. A. J. Panettieri, L. R. Kaiser, and S. M. Albelda. 1994. Expression of endothelial cell adhesion molecules in human bronchial xenografts. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 150:795.
22. Holgerson, J., C. Ehrnfelt, E. Hauzenberger, and L. Serrander. 2002. Leukocyte endothelial cell interactions in pig to human organ graft rejection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87:407.
23. Dawson, J. R., A. C. Vidal, and A. M. Malyguine. 2000. Natural killer cell-endothelial cell interactions in xenotransplantation. *Immunol. Res.* 22:165.
24. Matter-Reissmann, U. B., P. Forte, M. K. Schneider, L. Filgueira, P. Groscurth, and J. D. Seebach. 2002. Xenogeneic human NK cytotoxicity against porcine endothelial cells is perforin/granzyme B dependent and not inhibited by Bcl-2 overexpression. *Xenotransplantation* 5:325.
25. Watier, H., J. M. Guillaumin, I. Vallée, G. Thibault, Y. Gruel, Y. Lebranchu, and P. Bardos. 1996. Human NK cell-mediated direct and IgG-dependent cytotoxicity against xenogeneic porcine endothelial cells. *Transpl. Immunol.* 4:293.
26. Dehoux, J. P., B. de la Parra, D. Latinne, H. Bazin, and P. Gianello. 2002. Characterization of baboon anti-porcine IgG antibodies during acute vascular rejection of porcine kidney xenograft. *Xenotransplantation* 9:338.
27. Seebach, J. D., C. Comrack, S. Germana, C. LeGuern, D. H. Sachs, and H. DerSimonian. 1997. HLA-Cw3 expression on porcine endothelial cells protects against xenogeneic cytotoxicity mediated by a subset of human NK cells. *J. Immunol.* 159:3655.
28. Forte, P., B. C. Baumann, E. H. Weiss, and J. D. Seebach. 2005. HLA-E Expression on Porcine Cells: Protection from Human NK Cytotoxicity Depends on Peptide Loading. *Am. J. Transplant.* 5:2085.
29. Forte, P., U. B. Matter-Reissmann, M. Strasser, M. K. Schneider, and J. D. Seebach. 2000. Porcine aortic endothelial cells transfected with HLA-G are partially protected from xenogeneic human NK cytotoxicity. *Hum. Immunol.* 61:1066.
30. Baumann, B. C., M. K. Schneider, B. G. Lilienfeld, M. A. Antsiferova, D. M. Rhyner, R. J. Hawley, and J. D. Seebach. 2005. Endothelial cells derived from pigs lacking gal-alpha(1,3)gal: no reduction of human leukocyte adhesion and natural killer cell cytotoxicity. *Transplantation* 79:1067.
31. Benda, B., N. Lycke, M. Holstad, and O. Korsgren. 2000. Delayed type hypersensitivity-associated cytokines in islet xenotransplantation: limited efficacy of interleukin-2- and tumor necrosis factor-alpha-blockade in interferon-gamma receptor-deficient mice. *Xenotransplantation* 7:206.

32. Krook, H., A. Hagberg, Z. Song, U. Landegren, L. Wennberg, and O. Korsgren. 2002. A distinct Th1 immune response precedes the described Th2 response in islet xenograft rejection. *Diabetes* 51:79.
33. 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.
34. 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.
35. Lechler, R. I., O. A. Garden, and L. A. Turka. 2003. The complementary roles of deletion and regulation in transplantation tolerance. *Nat. Rev.* 3:147.
36. Maher, S. E., K. Karmann, W. Min, C. C. W. Hughes, J. S. Pober, and A. L. M. Bothwell. 1996. Porcine endothelial CD86 is a major costimulator of xenogeneic human T cells. *J. Immunol.* 157:3838.
37. Rogers, N. J., I. M. Jackson, W. J. Jordan, M. A. Hawadle, A. Dorling, and R. I. Lechler. 2003. Cross-species costimulation: relative contributions of CD80, CD86, and CD40. *Transplantation* 75:2068.
38. Simon, A. R., A. N. Warrens, and M. Sykes. 1999. Efficacy of adhesive interactions in pig-to-human xenotransplantation. *Immunol. Today* 20:323.
39. 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.
40. Rollins, S. A., S. P. Kennedy, A. J. Chodera, E. Elliott, G. B. Zavoico, and L. A. Matis. 1994. Evidence that activation of human T cells by porcine endothelium involves direct recognition of porcine SLA and costimulation by porcine ligands for LFA-1 and CD2. *Transplantation* 57:1709.
41. Watier, H., I. Vallée, G. Thibault, A.-C. Lalmanach, M. Lacord, Y. Gruel, Y. Lebranchu, H. Salmon, and P. Bardos. 1994. Effect of human inflammatory cytokines on porcine endothelial cell MHC molecule expression: Unique role for TNF- α in MHC class-II induction. *Transplant. Proc.* 26:1152.
42. Vallée, 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 a HLA-restricted, IL-10-sensitive, indirect presentation pathway but also depends on endothelial-specific costimulatory factors. *J. Immunol.* 161:1652.
43. Rushworth, S. A., C. A. Bravery, and S. Thompson. 2001. Human CD154 induces activation of porcine endothelial cells and up-regulation of MHC class II expression. *Transplantation* 72:127.

44. Andres, A., C. Toso, D. Bosco, P. Bucher, J. Oberholzer, Z. Mathe, G. Mai, T. Wekerle, T. Berney, and L. H. Buhler. 2005. Phylogenetic disparity influences the predominance of direct over indirect pathway of antigen presentation in islet xenotransplantation. *Transplant. Proc.* 37:463.
45. Samstein, B., and J. L. Platt. 2001. Xenotransplantation and tolerance. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 356:749.
46. Xie, L., W. Shi, and P. Guo. 2003. Roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in corneal transplantation. *Transplantation* 76:1556.
47. Klose, R., E. Kemter, T. Bedke, I. Bittmann, B. Kessler, R. Endres, K. Pfeffer, R. Schwinzer, and E. Wolf. 2005. Expression of biologically active human TRAIL in transgenic pigs. *Transplantation* 80:222.
48. Schwartz, R. H. 1990. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248:1349.
49. Schwartz, R. H. 1997. T cell clonal anergy. *Curr. Opin. Immunol.* 9:351.
50. Rothstein, D. M., and M. H. Sayegh. 2003. T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. *Immunol. Rev.* 196:85.
51. Taams, L., M. Vukmanovic-Stejic, M. Salmon, and A. Akbar. 2003. Immune regulation by CD4+CD25+ regulatory T cells: implications for transplantation tolerance. *Transpl. Immunol.* 11:277.
52. Wood, K. J., and S. Sakaguchi. 2003. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat. Rev.* 3:199.
53. Waldman, H., and S. Cobbold. 1998. How do monoclonal antibodies induce tolerance? A role for infectious tolerance? *Annu. Rev. Immunol.* 16:619.
54. Cobbold, S., and H. Waldman. 1998. Infectious tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* 10:518.
55. Onodera, K., W. W. Hancock, E. Graser, M. Lehmann, M. H. Sayegh, T. B. Strom, H.-D. Volk, and J. W. Kupiec-Weglinski. 1997. Type 2 helper T cell-type cytokines and the development of "infectious" tolerance in rat cardiac allograft recipients. *J. Immunol.* 158:1572.
56. Sayegh, M. H., E. Akalin, W. W. Hancock, M. E. Russel, C. B. Carpenter, P. S. Linsley, and L. A. Turka. 1995. CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *J. Exp. Med.* 181:1869.
57. Glennie, M. J., and P. W. M. Johnson. 2000. Clinical trials of antibody therapy. *Immunol. Today* 21:403.

58. Pearson, T. C., D. Z. Alexander, K. J. Winn, P. S. Linsley, R. P. Lowry, and C. P. Larsen. 1994. Transplantation tolerance induced by CTLA4-Ig. *Transplantation* 57:1701.
59. Lenschow, D. J., Y. Zeng, K. S. Hathcock, L. A. Zuckerman, G. Freeman, and J. R. Thistlethwaite. 1995. Inhibition of transplant rejection following treatment with anti-B7-2 and anti-B7-1 antibodies. *Transplantation* 60:1171.
60. Zheng, X. X., M. H. Sayegh, X. G. Zheng, Y. Li, P. S. Linsley, R. Peach, F. Borriello, T. B. Strom, A. H. Sharpe, and L. A. Turka. 1997. The role of donor and recipient B7-1 (CD80) in allograft rejection. *J. Immunol.* 159:1169.
61. Hancock, W. W., M. H. Sayegh, X. Zheng, R. Peach, P. S. Linsley, and L. A. Turka. 1996. Costimulatory function and expression of CD40 ligand, CD80, and CD86 in vascularized murine cardiac allograft rejection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93:13967.
62. Kirk, A. D., L. C. Burkly, D. S. Batty, R. E. Baumgartner, J. D. Berning, K. Buchanan, J. H. Fechner Jr., R. L. Germond, R. L. Kampen, N. B. Patterson, S. J. Swanson, D. K. Tadaki, C. N. TenHoor, L. White, S. J. Knechtle, and D. M. Harlan. 1999. Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nat. Med.* 5:686.
63. Kirk, A. D., D. K. Tadaki, A. Celniker, D. S. Batty, J. D. Berning, J. O. Colonna, F. Cruzata, E. A. Elster, G. S. Gray, R. L. Kampen, N. B. Patterson, P. Szkulut, S. J. Swanson, H. Xu, and D. M. Harlan. 2001. Induction therapy with monoclonal antibodies specific for CD80 and CD86 delays the onset of acute renal allograft rejection in non-human primates. *Transplantation* 72:377.
64. Larsen, C. P., E. T. Elwood, D. Z. Alexander, S. C. Ritchie, R. Hendrix, C. Tucker-Burden, H. R. Cho, A. Aruffo, D. Hollenbaugh, P. S. Linsley, K. J. Winn, and T. C. Pearson. 1996. Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* 381:434.
65. Li, Y., X. C. Li, X. Zheng, A. D. Wells, L. A. Turka, and T. B. Strom. 1999. Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat. Med.* 5:1298.
66. Haanstra, K. G., J. Ringers, E. A. Sick, S. Ramdien-Murli, E.-M. Kuhn, L. Boon, and M. Jonker. 2003. Prevention of kidney allograft rejection using anti-CD40 and anti-CD86 in primates. *Transplantation* 75:637.
67. Bucher, P., M. Gang, P. Morel, Z. Mathe, D. Bosco, N. Pernin, T. Wekerle, T. Berney, and L. H. Buhler. 2005. Transplantation of discordant xenogeneic islets using repeated therapy with anti-CD154. *Transplantation* 79:1545.

68. Safley, S. A., L. M. Kapp, C. Tucker-Burden, B. Hering, J. A. Kapp, and C. J. Weber. 2005. Inhibition of cellular immune responses to encapsulated porcine islet xenografts by simultaneous blockade of two different costimulatory pathways. *Transplantation* 79:409.
69. Gollackner, B., S. K. Goh, I. Qawi, L. H. Buhler, C. Knosalla, S. Daniel, E. Kaczmarek, M. Awwad, D. K. C. Cooper, and S. C. Robson. 2004. Acute vascular rejection of xenografts: roles of natural and elicited xenoreactive antibodies in activation of vascular endothelial cells and induction of procoagulant activity. *Transplantation* 77:1735.
70. Rogers, N. J., V. Mirenda, I. M. Jackson, A. Dorling, and R. I. Lechler. 2000. Costimulatory blockade by the induction of an endogenous xenospecific antibody response. *Nat. Immunol.* 1:163.
71. Zuckermann, F. A., C. Peavey, W. M. Schnitzlein, D. Schabacker, R. Husmann, H. Yang, A. Saalmuller, and J. K. Lunney. 1998. Definition of the specificity of monoclonal antibodies against porcine CD45 and CD45R: report from the CD45/CD45R and CD44 subgroup of the Second International Swine CD Workshop. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 60:367.
72. Trowbridge, I. S., and M. L. Thomas. 1994. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu. Rev. Immunol.* 12:85.
73. Fraser, J. D., D. Straus, and A. Weiss. 1993. Signal transduction events leading to T-cell lymphokine gene expression. *Immunol. Today* 14:357.
74. Young, J. L., J. M. Ramage, J. S. Gaston, and P. C. L. Beverly. 1997. In vitro responses of human CD45R0brightRA- and CD45R0-RAbright T cell subsets and their relationship to memory and naive T cells. *Eur. J. Immunol.* 27:2383.
75. Do, H.-T., W. Baars, K. Borns, A. Windhagen, and R. Schwinzer. 2006. The 77C->G mutation in the human CD45 (PTPRC) gene leads to increased intensity of TCR signaling in T cell lines from healthy individuals and patients with multiple sclerosis. *J. Immunol.* 176:931.
76. Tchillian, E. Z., and P. C. L. Beverly. 2006. Altered CD45 expression and disease. *Trends Immunol.* 27:146.
77. Hermiston, M. L., X. Zheng, and A. Weiss. 2003. CD45: A critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21:107.
78. Lazarovits, A., S. Poppema, Z. Zhang, M. Khandaker, C. Le Feuvre, S. K. Singhal, B. Garcia, N. Ogasa, A. M. Jevnikar, M. J. White, G. Singh, C. R. Stiller, and R. Zhong. 1996. Prevention and reversal of renal allograft rejection by antibody against CD45RB. *Nature* 380:717.

79. Auersvald, L. A., D. M. Rothstein, S. C. Oliveira, C. Q. Khuong, H. Onodera, A. Lazarovits, and G. P. Basadonna. 1997. Indefinite islet allograft survival in mice after a short course of treatment with anti-CD45 monoclonal antibodies. *Transplantation* 63:1355.
80. Basadonna, G. P., L. A. Auersvald, C. Q. Khuong, X. Zheng, N. Kashio, D. Zekzer, M. Minozzo, H.-Y. Qian, L. Visser, A. Diepstra, A. Lazarovits, S. Poppema, T. B. Strom, and D. M. Rothstein. 1998. Antibody-mediated targeting of CD45 isoforms: a novel immunotherapeutic strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95:3821.
81. Fecteau, S., G. P. Basadonna, A. Freitas, C. E. Ariyan, M. H. Sayegh, and D. M. Rothstein. 2001. CTLA-4 up-regulation plays a role in tolerance mediated by CD45. *Nat. Immunol.* 2:58.
82. Ariyan, C. E., P. R. O. Salvalaggio, S. Fecteau, S. Deng, L. Rogozinski, D. Mandelbrot, A. H. Sharpe, M. H. Sayegh, G. P. Basadonna, and D. M. Rothstein. 2003. Cutting edge: transplantation tolerance through enhanced CTLA-4 expression. *J. Immunol.* 171:5673.
83. Sho, M., K. Kishimoto, H. Harada, M. Livak, A. Sanchez-Fueyo, A. Yamada, X. Zheng, T. B. Strom, G. P. Basadonna, M. H. Sayegh, and D. M. Rothstein. 2005. Requirements for induction and maintenance of peripheral tolerance in stringent allograft models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102:13230.
84. Salvalaggio, P. R. O., G. Camirand, C. E. Ariyan, S. Deng, L. Rogozinski, G. P. Basadonna, and D. M. Rothstein. 2006. Antigen exposure during enhanced CTLA-4 expression promotes allograft tolerance in vivo. *J. Immunol.* 176:2292.
85. Sutherland, R. M., B. S. McKenzie, Y. Zhan, A. J. Corbett, A. Fox-Marsh, H. M. Georgiou, and L. C. Harrison. 2002. Anti-CD45RB antibody deters xenograft rejection by modulating T cell priming and homing. *Int. Immunol.* 14:953.
86. Visser, L., S. Poppema, B. De Haan, P. Klok, J. Van Der Leij, A. Van Den Berg, and P. De Vos. 2004. Prolonged survival of rat islet xenografts in mice after CD45RB monotherapy. *Transplantation* 77:386.
87. Zhang, Z., A. Lazarovits, Z. Gao, B. Garcia, J. Jiang, J. Wang, J.-J. Xing, D. J. White, and R. Zhong. 2000. Prolongation of xenograft survival using monoclonal antibody CD45RB and cyclophosphamide in rat-to-mouse kidney and heart transplant models. *Transplantation* 69:1137.
88. Wang, C., K. A. Hosiawa, B. Garcia, J. B. Shum, P. Dutartre, D. J. Kelvin, and R. Zhong. 2003. Attenuation of acute xenograft rejection by short-term treatment with LF15-0195 and monoclonal antibody against CD45RB in a rat-to-mouse cardiac transplantation model. *Transplantation* 75:1475.

89. Roach, T., S. Slater, M. Koval, L. White, E. D. Cahir McFarland, M. Okumura, M. L. Thomas, and E. Brown. 1997. CD45 regulates Src family member kinase activity associated with macrophage integrin-mediated adhesion. *Curr. Biol.* 7:408.
90. Arroyo, A. G., M. R. Campanero, P. Sanchez-Mateos, J. M. Zapata, M. A. Ursa, M. A. del Pozo, and F. Sanchez-Madrid. 1994. Induction of tyrosine phosphorylation during ICAM-3 and LFA-1-mediated intercellular adhesion, and its regulation by the CD45 tyrosine phosphatase. *J. Cell. Biol.* 126:1277.
91. Gregori, S., P. Mangia, Bacchetta R., T. Tresoldi, K. Kolbinger, C. Traversari, C. M. Carballido, J. E. de Vries, U. Korthäuer, and M.-G. Roncarolo. 2005. An anti-CD45RO/RB monoclonal antibody modulates T cell responses via induction of apoptosis and generation of regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 201:1293.
92. Perillo, N. L., K. E. Pace, J. J. Seilhamer, and L. G. Baum. 1995. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 378:736.
93. Greer, S. F., J. Lin, C. H. Clarke, and L. B. Justement. 1998. Major histocompatibility class II-mediated signal transduction is regulated by the protein-tyrosine phosphatase CD45. *J. Biol. Chem.* 273:11970.
94. Saalmuller, A., F. Weiland, and M. J. Reddehase. 1991. Restig porcine T lymphocytes expressing class II major histocompatibility complex. *Immunobiol* 183:102.
95. Murray, A. G., M. M. Khodadoust, J. S. Pober, and A. L. M. Bothwell. 1994. Porcine aortic endothelial cells activate human T cells: direct presentation of MHC antigens and costimulation by ligands for human CD2 and CD28. *Immunity* 1:57.
96. 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.
97. Choi, J., D. R. Enis, K. P. Koh, S. L. Shiao, and J. S. Pober. 2004. T lymphocyte-endothelial cell interactions. *Annu. Rev. Immunol.* 22:683.
98. Batten, P., M. H. Yacoub, and M. L. Rose. 1996. Effect of human cytokines (IFN-gamma, TNF-alpha, IL-1beta, IL-4) on porcine endothelial cells: induction of MHC and adhesion molecules and functional significance of these changes. *Immunology* 87:127.
99. Bravery, C. A., P. Batten, M. H. Yacoub, and M. L. Rose. 1995. Direct recognition of SLA- and HLA-like class II antigens on porcine endothelium by human T cells results in T cell activation and release of Interleukin-2. *Transplantation* 60:1024.

100. Coleman, T. S., H. K. Pittman, S. M. Purser, C. E. Haisch, and K. M. Verbanac. 2001. Human T-cell-porcine endothelial cell interactions induce human Th1 cytokines and porcine activation markers. *J. Surg. Res.* 97:184.
101. Tsuyuki, S., J. A. Horvath-Arcidiacono, and E. T. Bloom. 2001. Effect of redox modulation on xenogeneic target cells: the combination of nitric oxide and thiol deprivation protects porcine endothelial cells from lysis by IL-2-activated human NK cells. *J. Immunol.* 166:4106.
102. Lin, Y., M. P. Soares, K. Sato, K. Takigami, E. Csizmadia, J. Anrather, and F. H. Bach. 1999. Rejection of cardiac xenografts by CD4⁺ or CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* 162:1206.
103. Sultan, P., A. G. Murray, J. M. McNiff, M. I. Lorber, P. W. Askenase, A. L. Bothwell, and J. S. Pober. 1997. Pig but not human interferon-gamma initiates human cell-mediated rejection of pig tissue in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94:8767.
104. 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.
105. Tereb, D. A., N. C. Kirkiles-Smith, K. R.W., Y. Wang, R. D. Rudic, J. S. Schechner, M. I. Lorber, A. L. Bothwell, J. S. Pober, and G. Tellides. 2001. Human T cells infiltrate and injure pig coronary artery grafts with activated but not quiescent endothelium in immunodeficient mouse hosts. *Transplantation* 71:1622.
106. Sawada, T., P. DellaPelle, J. Seebach, D. Sachs, R. Colvin, and J. Iacomini. 1997. Human cell-mediated rejection of porcine xenografts in an immunodeficient mouse model. *Transplantation* 63:1331.
107. Friedman, T., R. Smith, R. Colvin, and J. Iacomini. 1999. A critical role for human CD4⁺ T-cells in rejection of porcine islet cell xenografts. *Diabetes* 48:2340.
108. DerSimonian, H., L. Pan, C. Yartko, A. Rodrigue-Way, E. Johnson, and A. S. B. Edge. 1999. Human anti-porcine T cell responses: Blocking with anti-class I antibody leads to hyporesponsiveness and a switch in cytokine production. *J. Immunol.* 162:6993.
109. Bonenfant, C., I. Vallée, J. Sun, A. Brossay, G. Thibault, J. M. Guillaumin, Y. Lebranchu, P. Bardos, J. E. Butler, and H. Watier. 2003. Analysis of human CD4 T lymphocyte proliferation induced by porcine lymphoblastoid B cell lines. *Xenotransplantation* 10:107.

110. Yun, S., K. Gustafsson, and J. W. Fabre. 1998. Suppression of human anti-porcine T-cell immune responses by major histocompatibility complex class II transactivator constructs lacking the amino terminal domain. *Transplantation* 66:103.
111. Yun, S., M. L. Rose, and J. W. Fabre. 2000. The induction of major histocompatibility complex class II expression is sufficient for the direct activation of human CD4⁺T cells by porcine vascular endothelial cells. *Transplantation* 69:940.
112. Lee, R. S., K. Yamada, K. L. Womer, E. P. Pillsbury, K. S. Allison, A. E. Marolewski, D. Geng, A. D. Thall, J. S. Arn, D. H. Sachs, M. H. Sayegh, and J. C. Madsen. 2000. Blockade of CD28-B7, but not CD40-CD154, prevents costimulation of allogeneic porcine and xenogeneic human anti-porcine T cell responses. *J. Immunol.* 164:3434.
113. Koenen, H. J. P. M., and I. Joosten. 2000. Blockade of CD86 and CD40 induces alloantigen-specific immunoregulatory T cells that remain anergic even after reversal of hyporesponsiveness. *Blood* 95:3153.
114. Koenen, H. J. P. M., M. T. Hartog den, S. Heerkens, E. Fasse, A. Ortiz-Buijsse, R. J. J. Neerven van, P. J. Simons, I. Joosten, and L. Boon. 2004. A novel bispecific antihuman CD40/CD86 fusion protein with T-cell tolerizing potential. *Transplantation* 78:1429.
115. Van Gool, S. W., J. Vermeiren, K. Rafiq, K. Lorré, M. de Boer, and J. L. Ceuppens. 1999. Blocking CD40-CD154 and CD80/CD86-CD28 interactions during primary allogeneic stimulation results in T cell anergy and high IL-10 production. *Eur. J. Immunol.* 29:2367.
116. Rieben, R., and J. D. Seebach. 2005. Xenograft rejection: IgG₁, complement and NK cells team up to activate and destroy the endothelium. *Trends Immunol.* 26:2.
117. Saalmuller, A., F. Weiland, and M. J. Reddehase. 1991. Resting porcine T lymphocytes expressing class II major histocompatibility complex. *Immunobiol.* 183:102.
118. Saalmuller, A., and S. Maurer. 1994. Major histocompatibility antigen class II expressing resting porcine T lymphocytes are potent antigen-presenting cells in mixed leukocyte culture. *Immunobiol* 190:23.
119. Lazarovits, A., S. Poppema, M. J. White, and J. Karsh. 1992. Inhibition of alloreactivity in vitro by monoclonal antibodies directed against restricted isoforms of the leukocyte-common antigen (CD45). *Transplantation* 54:724.
120. Plege, A. 2005. Rolle von kostimulatorischen Rezeptor-Ligand-Interaktionen bei der Reaktivität humaner T-Zellen gegen porcines Xenoantigen. *Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Universität Hannover.*

121. Barratt-Boyes, S. M., and A. W. Thomson. 2005. Dendritic cells: tools and targets for transplant tolerance. *Am. J. Transplant.* 12:2807.
122. Grewal, I. S., and R. A. Flavell. 1998. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 16:111.
123. Lumsden, J. M., J. A. Williams, and R. J. Hodes. 2003. Differential requirements for expression of CD80/86 and CD40 on B cells for T-dependent antibody responses in vivo. *J. Immunol.* 170:781.
124. Konieczny, B. T., Z. Dai, E. T. Elwood, S. Saleem, P. S. Linsley, F. K. Baddoura, C. P. Larsen, T. C. Pearson, and F. G. Lakkis. 1998. IFN-gamma is critical for long-term allograft survival induced by blocking the CD28 and CD40 ligand T cell costimulation pathways. *J. Immunol.* 160:2059.
125. Taha Hassan, A., Z. Dai, B. T. Konieczny, G. H. Ring, F. K. Baddoura, L. H. Abou-Dahab, A. A. El-Sayed, and F. G. Lakkis. 1999. Regulation of alloantigen-mediated T cell proliferation by endogenous interferon-gamma. *Transplantation* 68:124.
126. Wells, A. D., X. C. Li, Y. Li, M. C. Walsh, X. Zheng, Z. Wu, G. Nunez, A. Tang, M. H. Sayegh, W. W. Hancock, T. B. Strom, and L. A. Turka. 1999. Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance. *Nat. Med.* 5:1303.
127. Malek, T. R., and A. L. Bayer. 2004. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat. Rev.* 4:665.
128. Antony, P. A., and N. P. Refisto. 2005. CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells, immunotherapy of cancer, and Interleukin-2. *J. Immunother.* 28:120.
129. Porter, C. M., and E. T. Bloom. 2005. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory cells suppress anti-porcine xenogeneic responses. *Am. J. Transplant.* 5:2052.
130. Li, X. C., G. Demirci, S. Ferrari-Lacraz, C. Groves, A. J. Coyle, T. R. Malek, and T. B. Strom. 2001. IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo. *Nat. Med.* 1:114.

Bisherige wissenschaftliche Tätigkeit

Manuskripte

1. **Bedke T.**, Baars W., Schwinzer R.
(2003) Modulation of human anti-pig T cell responses by porcine specific antibodies. *Annals of Transplantation* **8** (3):32-8.
2. Klose R., Kempter E., **Bedke T.**, Bittmann I., Endres R., Pfeffer K., Schwinzer R., Wolf E.
(2005) Expression of biologically active human TRAIL in transgenic pigs. *Transplantation* Jul 27; **80**(2):222-30.
3. Karacsonyi C., **Bedke T.**, Hinrichsen N., Schwinzer R., Lindner R.
(2005) MHC II molecules and invariant chain reside in membranes distinct from conventional lipid rafts. *J Leukoc Biol.* Nov.;78(5):1097-105

Publizierte Abstracts

4. **Bedke T.**, Baars W., Schwinzer R.
(2002) Modulation of human anti-pig T cell responses by species-specific antibodies. *Immunobiology* 206:269
33. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Immunologie, Marburg. (Poster)
5. **Bedke T.**, Baars W., Saalmüller A., and Schwinzer R.
(2003) Porcine CD45 molecules as targets for the modulation of human anti-pig T cell responses. *Immunobiology* 208:250.
34. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Immunologie, Berlin. (Poster)
6. Schwinzer R. and **Bedke T.**
(2003) Modulation of human anti-pig T cell responses by monoclonal antibodies directed to porcine CD45 molecules. *Xenotransplantation* 10:506.
Seventh Congress of the International Xenotransplantation Association, Glasgow, Schottland. (Vortrag)

7. **Bedke T.**, Baars W., Borns K., and Schwinzer S.
 (2004) Treatment of porcine stimulatory cells with anti-CD45 monoclonal antibodies reduces their capacity to activate human T cells. *Immunobiology* 209:436.
 Joint Annual Meeting of the German and Dutch Societies of Immunology (JAMI), Maastricht, Niederlande. (Vortrag)
8. Klose R., Hofmann A., Kempter E., **Bedke T.**, Keßler B., Ewerling S., Bittmann I., Schwinzer R., Pfeifer A., Wolf E.
 (2005) Use of lentiviral vectors for combination of transgeneic strategies to facilitate pig-to-primate xenotransplantation. *Xenotransplantation* 12:401.
 Eighth Congress of the International Xenotransplantation Association, Götheborg, Schweden. (Poster)
9. **Bedke T.**, Baars W., Borns K., and Schwinzer S.
 (2005) Anti-CD45RA treated pig stimulatory cells trigger diminished proliferation of human T cells and alter the balance of Th1/Th2 cytokines. *Immunobiology* 210:505.
 Joint Annual Meeting of the German and Scandinavian Societies of Immunology, Kiel. (Vortrag)

Vorträge/Posterpräsentationen

10. **Bedke T.**, Baars W., and Schwinzer R.
 (2003) Immunmodulation mit anti-porzinen CD45 Antikörpern.
 1. Treffen des Arbeitskreises Transplantationsimmunologie der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Hannover. (Vortrag)
11. **Bedke T.**, Baars W., and Schwinzer R.
 (2004) Targeting of pig CD45 molecules for the modulation of human anti-porcine T cell responses.
 2. Treffen des Arbeitskreises Transplantationsimmunologie der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Berlin. (Vortrag)

- 12. Bedke T., Baars W., Borns K., and Schwinzer R.**
(2004) Inhibition of human anti-pig T cell responses by monoclonal antibodies to porcine CD45 molecules.
XX International Congress of the Transplantation Society, Wien, Österreich.
(Poster)
- 13. Bedke T., Baars W., Borns K., and Schwinzer R.**
(2005) Targeting of pig CD45 molecules for the modulation of human anti-porcine T cell responses.
3. Treffen des Arbeitskreises Transplantationsimmunologie der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Würzburg.
(Vortrag)
- 14. Bedke T., Baars W., Borns K., and Schwinzer R.**
(2005) Targeting of pig stimulatory cells with anti-CD45RA mAb downregulates MHC class-II and costimulatory molecules and reduces the capacity to activate human T cells.
9th Basic Science Symposium of the Transplantation Society, La Baule, Frankreich.
(Poster)
- 15. Bedke T., Baars W., Borns K., and Schwinzer R.**
(2006) Anti-CD45RA treatment of pig APC: A strategy to induce tolerogenic human T cell responses?
4. Treffen des Arbeitskreises Transplantationsimmunologie der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Regensburg.
(Vortrag)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Tanja Bedke
Geburtstag 11. November 1974
Geburtsort Westerstede
Familienstand ledig

Schulbildung

August 1995

Erlangung der allgemeinen Hochschulreife auf dem Gymnasium in Westerstede

Hochschulstudium

Oktober 1995 – März 1998

Grundstudium der Biologie an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

April 1998 – Mai 2001

Hauptstudium der Biologie an der Universität Hannover
Diplomarbeit zu dem Thema:
„Einfluß eines varianten Expressionsmusters der Protein-Tyrosinphosphatase Isoform CD45RA auf die T-Zell-Rezeptor-vermittelte Aktivierung humaner T-Zellen“
im Transplantationslabor der Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. R. Schwinzer

Promotion

seit Juni 2001

wissenschaftliche Mitarbeiterin im Transplantationslabor der Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie der MHH mit dem Ziel der Promotion

Danksagung

Sehr herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. R. Schwinzer für die Bereitstellung dieser interessanten Fragestellung und seiner intensiven theoretischen Betreuung bedanken. Seine Art Wissenschaft mitreißend zu vermitteln und seine ständige Diskussionsbereitschaft haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. W. Müller möchte ich mich für die Bereitschaft zur Übernahme des Referates und seine freundliche Unterstützung bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. K. Wonigeit für die freundliche Bereitstellung von Reagenzien und des gut ausgestatteten Arbeitsplatzes in dem von ihm geleiteten Transplantationslabor bedanken.

Vielen Dank den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Schwinzer für die gute Zusammenarbeit und freundschaftliche Atmosphäre. Insbesondere möchte ich W. Baars und K. Borns für ihre Unterstützung bei der praktischen Durchführung bedanken. Allen Diplomanden und Doktoranden, die mich begleitet haben, danke ich recht herzlich für ihre Hilfsbereitschaft bei experimentellen und wissenschaftlichen Problemen.

Ich möchte mich ebenfalls sehr herzlich bei Herrn Dr. J. Hundrieser für seine Geduld bei der Beantwortung meiner Fragen zu molekularbiologischen Problemen und für die kritische Durchsicht dieser Arbeit bedanken.

Ein großes Dankeschön an alle Mitarbeiter des Instituts für das allseits hilfsbereite und freundliche Arbeitsklima, das mir die gemeinsame Arbeit leicht gemacht hat.

Meiner Familie: Danke für Eure Liebe und Unterstützung!

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, Transregio-Forschergruppe „Xenotransplantation“ gefördert (FOR 535).

