

Aus der
Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Bruno Reichart

Einfluss von Hypothermie und Kardioplegielösungen auf die
 α -Gal-Epitope auf porcinen Aortenendothelzellen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Miriam Keller

aus
München

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Bruno Reichart

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Jürgen Haas
Priv. Doz. Dr. Irmgard Bumeder

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. Paolo Brenner

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.2010

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1. | Einleitung | 4 |
| 1.1. | Transplantationsmedizin – aktuelle Situation | 4 |
| 1.2. | Geschichte der Xenotransplantation | 8 |
| 1.3. | Das α -Gal-Epitop und die Anti-Gal-Antikörper | 12 |
| 1.4. | Mechanismen der Xenotransplantatabstoßung | 13 |
| 1.4.1. | Hyperakute Abstoßung | 14 |
| 1.4.2. | Akut vaskuläre Abstoßung | 17 |
| 1.4.3. | Akut zelluläre Abstoßung | 19 |
| 1.4.4. | Chronische Abstoßung | 21 |
| 1.5. | Strategien zur Überwindung der Abstoßungsmechanismen | 22 |
| 1.5.1. | Akkommodation | 22 |
| 1.5.2. | Möglichkeiten der Antikörperelimination | 24 |
| 1.5.3. | Strategien zur Blockierung des Komplementsystems | 26 |
| 1.5.4. | Immunsuppressive Therapie und toleranz-induzierende Maßnahmen | 28 |
| 1.5.5. | Strategien zur Downregulation der α -Gal-Epitope | 29 |
| 2. | Eingliederung der Arbeit in die Xenotransplantationsforschung | 31 |
| 2.1. | Ischämiezeiten bei Xenotransplantation: Erfahrungen im Perfusionsmodell | 31 |
| 2.2. | Ziele der Arbeit | 31 |
| 3. | Material und Methoden | 33 |
| 3.1. | Entnahme und Transport der Schweineaorten | 33 |
| 3.2. | Gewinnung der porcinen Aortenendothelzellen | 34 |
| 3.2.1. | Medium L15 Leibovitz | 34 |
| 3.2.2. | Isolierung der porcinen Aortenendothelzellen | 35 |
| 3.3. | Zellkulturen | 37 |
| 3.3.1. | Anlegen der Zellkulturen | 37 |
| 3.3.2. | Pflege der Zellkulturen | 38 |
| 3.4. | Vitalitätsnachweis | 40 |
| 3.5. | Endothelzellnachweis | 40 |
| 3.5.1. | Morphologie | 41 |
| 3.5.2. | CD31-Nachweis | 41 |
| 3.6. | FACS | 42 |
| 3.6.1. | Anti-CD31- Antikörper für den Endothelzellnachweis | 42 |
| 3.6.2. | BS-I Isolectin B4 für den Nachweis der α -Gal-Epitope | 42 |
| 3.6.3. | Vorbereitung der Zellen für die FACS-Analyse | 43 |
| 3.6.4. | Messung | 47 |
| 3.6.5. | Auswertung | 50 |
| 3.7. | Auswahl geeigneter porciner Aortenendothelzellen für die Versuche | 52 |
| 3.7.1. | Frisch isolierte Aortenendothelzellen | 52 |
| 3.7.1.1. | Dispase und Kollagenase A | 53 |
| 3.7.1.2. | Problematik bei der Auswertung frisch isolierter Zellen | 53 |
| 3.7.2. | Vergleich von PAEC unterschiedlicher Passage und Behandlung mit Antikörpern | 54 |
| 3.7.3. | Vergleich von PAEC unterschiedlicher Passage mit BS-I Isolectin B4 | 56 |
| 3.7.3.1. | Primärkulturen | 57 |
| 3.7.3.2. | Gesplittete PAEC | 58 |
| 3.7.3.2.1. | Splitten der Zellen | 58 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 3.7.3.2.2. | PAEC I und PAEC II | 58 |
| 3.8. | Interindividuelle Unterschiede in der α -Gal-Expression | 59 |
| 3.9. | Versuchsdurchführung mit Dispase-Primärkulturen in verbundenen Stichproben | 60 |
| 3.10. | Versuchsgruppen | 62 |
| 3.10.1. | Versuchsreihe 1: Einfluss von Hypothermie auf die α -Gal-Epitope | 62 |
| 3.10.2. | Versuchsreihe 2: Einfluss von Kardioplegielösungen auf die α -Gal- Epitope | 63 |
| 3.11. | Kühlung | 65 |
| 3.12. | Wärmeinkubation | 65 |
| 3.13. | Inkubation der Zellen mit den Kardioplegielösungen | 66 |
| 3.14. | Statistische Auswertung | 66 |
| 4. | Ergebnisse | 67 |
| 4.1. | Zellmorphologie | 67 |
| 4.1.1. | Zellmorphologie nach ein-, vier- und sechsständiger Inkubation bei 38°C und 4°C | 67 |
| 4.1.2. | Zellmorphologie nach der Inkubation mit den Kardioplegielösungen | 68 |
| 4.2. | Vitalitätsnachweis | 69 |
| 4.2.1. | Vitalitätsnachweis nach ein-, vier- und sechsständiger Inkubation bei 38°C und 4°C | 69 |
| 4.2.2. | Vitalitätsnachweis nach der Inkubation mit den Kardioplegielösungen | 70 |
| 4.3. | CD31-Nachweis | 71 |
| 4.3.1. | CD31-Nachweis nach ein-, vier- und sechsständiger Inkubation bei 38°C und 4°C | 72 |
| 4.3.2. | CD31-Nachweis nach der Inkubation mit den Kardioplegielösungen | 73 |
| 4.4. | α -Gal-Nachweis | 74 |
| 4.4.1. | α -Gal-Nachweis nach ein-, vier- und sechsständiger Inkubation bei 38°C und 4°C | 75 |
| 4.4.2. | α -Gal-Nachweis nach der Einwirkung von Kardioplegielösungen | 79 |
| 4.4.2.1. | α -Gal-Nachweis nach vierständiger Inkubation in UW-Lösung | 79 |
| 4.4.2.2. | α -Gal-Nachweis nach vierständiger Inkubation in Bretschneider- Lösung | 80 |
| 5. | Diskussion | 83 |
| 5.1. | Der Ischämie-/Reperfusionsschaden | 83 |
| 5.2. | Maßnahmen zur Reduktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens | 85 |
| 5.3. | Vergleich von University of Wisconsin-Lösung und Bretschneider- Lösung | 87 |
| 5.4. | Diskussion der Ergebnisse dieser Studie | 88 |
| 5.4.1. | Einfluss der Kälte und der Kardioplegielösungen auf die PAEC | 88 |
| 5.4.2. | Einfluss der Kälte auf die α -Gal-Epitope | 91 |
| 5.4.3. | Einfluss der Kardioplegielösungen auf die α -Gal-Epitope | 92 |
| 5.5. | Funktionen des α -Gal-Epitops | 96 |
| 6. | Zusammenfassung | 98 |
| 7. | Literatur | 101 |

| | | |
|-----------|-------------------------|-----|
| 8. | Anhang | 127 |
| 8.1. | Abkürzungen | 127 |
| 8.2. | Materialien | 132 |
| 8.3. | Geräte | 136 |
| 8.4. | Abbildungsverzeichnis | 137 |
| 8.5. | Tabellenverzeichnis | 138 |
| 8.6. | Publikationsverzeichnis | 139 |
| 8.7. | Danksagung | 140 |
| 8.8. | Lebenslauf | 141 |

1. Einleitung

1.1. Transplantationsmedizin – aktuelle Situation

Die Transplantationsmedizin ist eine der Disziplinen in der Medizin, die auch in der Öffentlichkeit häufig im Zentrum von Diskussionen steht. Sie ist immer wieder Vorwürfen ausgesetzt. Die Problematik liegt dabei in der ethischen Debatte um den Hirntod oder aber auch in der Gefahr des Organhandels. Trotzdem ist die Transplantation von Organen zu einer der wichtigsten Therapiemöglichkeiten bei lebensbedrohlichen Erkrankungen geworden, zum Beispiel bei Leberversagen oder terminaler Herzinsuffizienz im Stadium NYHA IV. Dank großer Fortschritte in der Transplantationsmedizin in den letzten Jahrzehnten konnte das Langzeitüberleben nach Transplantation sowie die Lebensqualität transplantierter Patienten sehr verbessert werden. So liegt zum Beispiel die 1-Jahres-Überlebensrate nach Herztransplantation heute bereits bei ca. 80% (Eurotransplant 2010). Die Transplantation von Organen ist für schwer kranke Patienten oft die letzte Therapieoption und heute aus dem Klinikalltag nicht mehr wegzudenken.

Eines der größten Probleme allerdings, dem die Transplantationsmedizin derzeit gegenübersteht, ist die große Diskrepanz zwischen Spenderorganen und Patienten, die ein Organ benötigen. Dieses Missverhältnis ist zum einen in der abnehmenden Bereitschaft zur Organspende, zum anderen in der Zunahme der Patienten, die zur Transplantation akzeptiert werden, begründet. Die stetigen Fortschritte in den operativen und medikamentösen Verfahren bei Organtransplantation, und die damit einhergehende verbesserte Prognose nach Transplantation, hat zu einer erhöhten Nachfrage an Spenderorganen geführt. Die neuesten Zahlen aus dem Jahr 2008, die Eurotransplant veröffentlicht hat, zeigen ebenfalls keine Entlastung der Situation.

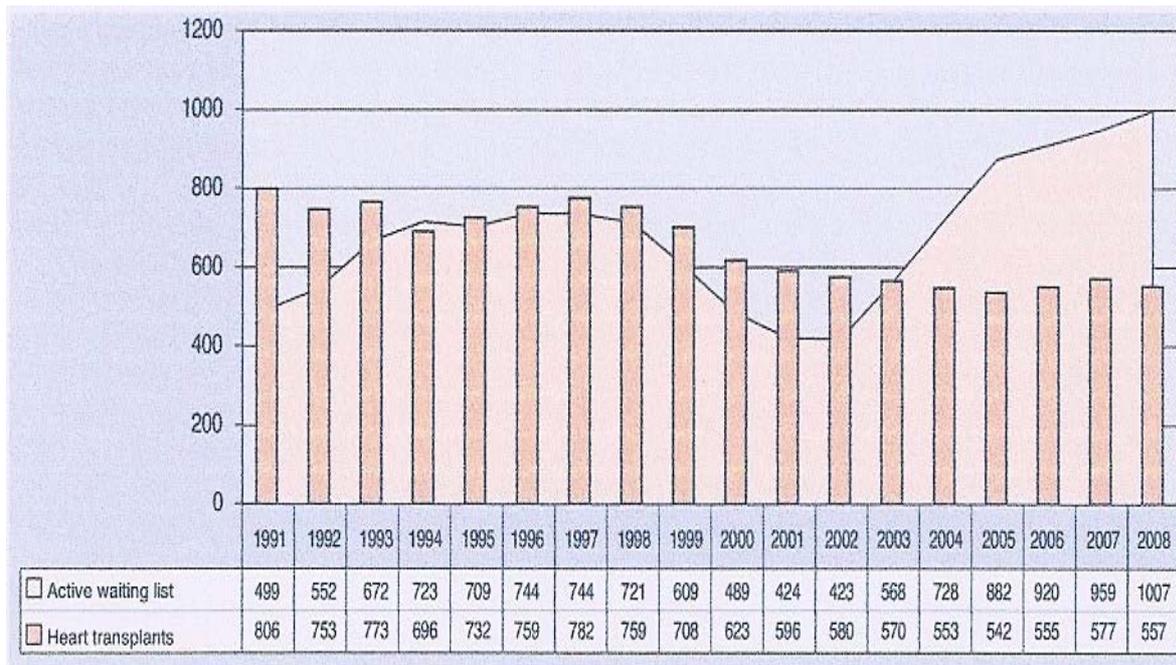


Abbildung 1: Aus dem Jahresbericht 2008 von Eurotransplant – Dynamik der Eurotransplant-Warteliste für Herztransplantationen und den durchgeführten Herztransplantationen zwischen 1991 und 2008. Ein zentrales Problem der Transplantationsmedizin ist die große Diskrepanz zwischen Spenderorganen und Patienten, die ein Organ benötigen.

Der Organmangel ist aber nicht nur auf Europa beschränkt, sondern hat sich in den letzten zehn Jahren weltweit zu einem großen Problem entwickelt (Abouna 2008).

Vor allem im Bereich der Herz- und Lungentransplantation zeigt sich wie gravierend der Organmangel ist. Es wird geschätzt, dass jährlich zehntausende Patienten von einer Herztransplantation profitieren könnten, allerdings können bislang nur weniger als 3500 Herztransplantationen weltweit durchgeführt werden (Adams 2000). Es versterben bis zu 25% der Patienten, die auf der Warteliste für eine Herztransplantation stehen (Eurotransplant 2010). Angesichts dieser Situation wird häufig schon von einer „organ shortage crisis“ (Abouna 2008) gesprochen. Die Herausforderung besteht nun darin, diese Krise zu überwinden und das Missverhältnis zwischen den zur Verfügung stehenden Spenderorganen und den benötigten Organen zu beseitigen.

Ein möglicher Lösungsansatz kann hierbei in der Steigerung der Spenderrate liegen. Dies kann zum Beispiel durch Veränderungen im Transplantationsgesetz erreicht werden. So wird zum einen in Ländern wie Deutschland, in denen noch die erweiterte Zustimmungslösung gilt, diskutiert die Widerspruchslösung einzuführen. Bei der Widerspruchslösung gilt jede Person nach ihrem Tod als potentieller Organspender, wenn sie zu Lebzeiten einer postmortalen Organentnahme nicht widersprochen hat. Eine Zustimmung der Angehörigen zur Organentnahme ist nicht notwendig. Durch die Einführung der Widerspruchslösung in Ländern

wie Spanien, konnte dort die Zahl an postmortalen Organspendern von 14/Million Einwohner auf 34/Million Einwohner pro Jahr erhöht werden. In diesen Ländern findet man die höchste Organspenderrate (Abouna 2008).

Zum anderen versucht man die Spenderrate zu erhöhen, indem man Aufklärungsprogramme in Schulen und anderen öffentlichen Einrichtungen durchführt oder das Thema Organspende in den Medien publik macht. Die Allgemeinbevölkerung, darunter vor allem die junge Generation, wird über Transplantationen, Hirntod und die Notwendigkeit der postmortalen Organspende aufgeklärt (Cantarovich 2002). Auch das so genannte „Donor Action Program“ will einen Beitrag leisten. Dabei handelt es sich um eine internationale Initiative der drei großen Transplantationsorganisationen *The Eurotransplant Foundation (NL)*, *Organizacion Nacional de Transplantes (ESP)* und *The Partnership for Organ Donation (USA)*. Das „Donor Action Program“ gibt den Krankenhäusern und vor allem den Mitarbeitern auf Intensivstationen Hilfen und Leitlinien an die Hand, um ihre Vorgehensweise bei der Identifikation von Organspendern genau zu analysieren und gegebenenfalls zu verbessern (Alonso 1999, Wight 1998). Derartige Aufklärungsprogramme zum einen für die allgemeine Bevölkerung und zum anderen für das medizinische Personal sollen dazu beitragen, die Organspenderrate um bis zu 53% zu steigern (Abouna 2008).

Neben den Anstrengungen, die Spenderbereitschaft zu erhöhen, müssen auch weitere Möglichkeiten angenommen werden, um die Lücke zwischen Organbedarf und Organangebot zu schließen. So werden die Spenderkriterien, d.h. die Kriterien, die die Zulassung eines Organs zur Organtransplantation regeln, immer weiter gefasst. So werden heute auch Spender höheren Alters, Diabetiker als Spender oder auch Spender mit langer Ischämiezeit akzeptiert. Noch vor wenigen Jahren hatte man diese Organe von der Transplantation ausgeschlossen, da man das Risiko eines primären Transplantatversagens oder einer primären Minderfunktion des Organs als zu hoch einschätzte (Abouna 2008, Müllhaupt 2008).

An anderen Optionen, dem Organmangel Herr zu werden, wird kontinuierlich gearbeitet. So werden neue chirurgische Techniken entwickelt, wie die Split-Liver-Technik oder es werden Lebendspende-Transplantationsprogramme ausgearbeitet (Müllhaupt 2008). Auch die Einführung eines kontrollierten Bezahlungssystems für den Spender wird diskutiert. Trotz all dieser Bemühungen, die Zahl an Spenderorganen zu erhöhen und Lösungen im Rahmen der Allotransplantation zu finden, wird die Diskrepanz zwischen Spenderorganen und Patienten, die ein Organ benötigen, nicht gänzlich beseitigt werden können.

Eine Möglichkeit, die das Problem des Organmangels gänzlich lösen könnte, ist die der Xenotransplantation. „Eine bedarfsgerechte Steigerung der Zahl von Transplantationen ist vermutlich nur mit Hilfe der Xenotransplantation zu erreichen“ (Deutsches Ärzteblatt 1999). Unter dem Begriff Xenotransplantation versteht man die Transplantation von lebenden Zellen, Geweben und Organen von einer Spezies auf eine andere. Tierorgane sollen in den Menschen transplantiert werden, um den Organmangel zu beheben.

Als geeignetes Organspendetier bietet sich das Schwein an. Das Schwein ähnelt in der Anatomie und Physiologie dem Menschen. Außerdem stehen Schweine in verschiedenen Größen und aufgrund der schnellen Vermehrungsrate auch in großer Anzahl zur Verfügung. Auch die günstigen Zuchtkosten, die geringere Gefahr der Übertragung pathogener Viren und ethische Aspekte haben schließlich dazu geführt, dass sich das Schwein als Spendertier in der Xenotransplantation etabliert hat und nicht, wie man annehmen möchte, die Primaten, die dem Menschen stammesgeschichtlich viel näher stehen.

Die Xenotransplantation könnte aber nicht nur die Lücke zwischen Organangebot- und Nachfrage schließen, sondern würde weitere Vorteile mit sich bringen: die Kriterien für Organempfänger könnten weiter gefasst werden, in Ländern, in denen aufgrund ethischer und kultureller Gründe die Allotransplantation von Mensch zu Mensch abgelehnt wird, könnte die Xenotransplantation eine neue Perspektive eröffnen, der Transplantationsablauf könnte genau geplant werden, der Organempfänger könnte präoperativ bestens vorbereitet werden, die Qualität der Organe wäre genauestens bekannt und die warmen und kalten Ischämiezeiten könnten minimal gehalten werden. Ein unschätzbare Vorteil wäre, dass man Patienten mit Autoimmunerkrankungen ein Organ transplantieren könnte, das der menschlichen Autoimmunantwort nicht unterliegt (Groth 2000).

Neben diesen zahlreichen medizinischen Vorteilen der Xenotransplantation könnte auch endlich das ethische Dilemma um die Organverteilung behoben werden: welchem Patienten steht das nächste Spenderorgan zu? Derzeit soll eine gerechte Verteilung thorakaler Spenderorgane basierend auf den Kriterien Erfolgsaussicht und Dringlichkeit erreicht werden (Bundesärztekammer, Richtlinien zur Organtransplantation). Ob dadurch tatsächlich eine gerechte Organallokation möglich ist, bleibt fraglich und wird immer wieder diskutiert. Denn auch Umfragen in der Bevölkerung, die die Kriterien der Organverteilung betreffen, geben keinen Anhalt dafür, was eine gerechte Organallokation ist. Sie zeigen vielmehr, dass jeder einzelne eine eigene Auffassung von dem Begriff der Fairness und der Gerechtigkeit hat und dass viele Faktoren in die Entscheidung einer gerechten Organallokation hineinspielen (Stahl

2008). Dank der Xenotransplantation könnten alle schwerkranken Patienten frühzeitig behandelt werden und das Problem der Organverteilung würde entfallen.

1.2. Geschichte der Xenotransplantation

Die Idee Tierorgane, -zellen oder -gewebe in den Menschen zu transplantieren ist keine Erfindung des 21. Jahrhunderts, sondern hat ihre Anfänge bereits im 16. Jahrhundert. Im 16. Jahrhundert wurden erste Gewebexenotransplantate übertragen, im 17. Jahrhundert folgten erste Xenotransfusionen und im 20. Jahrhundert versuchte man dann erstmals Tierorgane in den Menschen zu transplantieren. Betrachtet man die geschichtliche Entwicklung der Xenotransplantation, sieht man, dass gerade in den Anfängen der Transplantationsforschung die Abstoßungsproblematik, die durch eine Transplantation zwischen verschiedenen Spezies entsteht, gar nicht bedacht und richtig eingeschätzt wurde. In den ersten Transplantationsversuchen griff man sogar vermehrt auf Tierorgane zurück und verpflanzte weniger menschliche Organe.

Die Transplantation von tierischem Gewebe in den Menschen nahm ihren Anfang im 16. Jahrhundert. 1501 heilte ein iranischer Chirurg einen seiner Patienten, der an Osteomyelitis des Schädels litt, mittels einer Knochentransplantation. Das Spendertier hierbei war der Hund. Auch aus dem Jahr 1668 hat man Berichte über eine erfolgreiche Knochenübertragung zwischen Hund und Mensch. 1875 übertrug dann Houzé de l'Aulnoit in Frankreich erstmals Hauttransplantate, wobei ihm als Spendertiere Hasen dienten. Ein weiteres Beispiel für die Übertragung von Gewebexenotransplantaten aus der frühen Periode der Transplantationsforschung stammt aus dem Jahr 1893. Der Engländer Watson Williams versuchte Teile der Bauchspeicheldrüse eines Schafs in einen an Diabetes mellitus erkrankten 15-jährigen Jungen zu transplantieren. Der Patient verstarb am dritten postoperativen Tag (Deschamps 2005).

Auch kam man sehr früh auf die Idee, tierisches Blut in den Menschen zu transfundieren, und sah darin die Möglichkeit, verschiedenste Krankheiten zu heilen. Das erste Dokument, das den Versuch einer Xenotransfusion beschreibt, stammt aus dem Jahr 1667. Der Hofarzt des französischen Königs Ludwig XIV, übertrug einem 15-jährigem Patienten das Blut eines Lammes. Im selben Jahr versuchte auch der Londoner Arzt Richard Lower einen 22-jährigen Patienten durch die Transfusion von Lammblood zu heilen. Beide Xenotransfusionen waren erstaunlicherweise erfolgreich. Die Patienten wurden geheilt. Weitere Bemühungen Patienten durch die Übertragung von tierischem Blut zu kurieren, scheiterten allerdings meistens. (Deschamps 2005, Myhre 1990)

Erst 1816 postulierte der schottische Arzt John Henry Leacock, nachdem er einige gezielte Tierversuche an Hunden und Katzen durchgeführt hatte, dass für erfolgreiche Transfusionen der Spender und der Empfänger der gleichen Spezies angehören müssen (Schmidt 2002). Dennoch wurden im 19. Jahrhundert weltweit immer wieder Xenotransfusionen als mögliche Therapieoption angesehen. So sind sowohl aus Italien, Amerika als auch aus Deutschland Berichte über Xenotransfusionsversuche überliefert. Erst als Karl Landsteiner 1900 die Blutgruppen entdeckte, kam man davon ab, Tierblut in den Menschen zu transfundieren, und die Versuche mit Xenotransfusionen wurden eingestellt (Roux 2007).

Am Anfang des 20. Jahrhunderts wagte man sich schließlich daran, Tierorgane in den Menschen zu transplantieren. Die Möglichkeit der Organtransplantation, sowohl als Allotransplantat wie auch als Xenotransplantat, war streng gekoppelt an die neue Errungenschaft der vaskulären Anastomosierung. 1902 entwickelte der junge französische Chirurg Alexis Carrel die Technik, die es ermöglichte, Gefäße nach Durchtrennung ohne beträchtliche thrombotische oder embolische Komplikationen wieder miteinander zu verbinden (Toledo-Pereyra 2003). Carrel legte damit einen Grundstein für die kardiovaskuläre Chirurgie und die Transplantationsmedizin (Langer 2002).

Die ersten Organxenotransplantationen wurden in Frankreich unternommen. 1905 transplantierte Princeteau eine Hasenniere in ein Kind und 1906 versuchte sich Jaboulay an zwei heterotopen Nierentransplantationen. Zum einen verpflanzte Jaboulay eine Schweineniere in den Ellbogen einer 48-jährigen Patientin, zum anderen transplantierte er eine Ziegeniere in den Arm einer nephrektomierten Patientin. Letztere Transplantation wird häufig als erste wahre Xenotransplantation angeführt. Alle genannten Organtransplantationen missglückten, da es innerhalb von wenigen Stunden in Rahmen der Abstoßungsreaktion zur Thrombosebildung kam. Bis 1923 wurden dann immer wieder Xenotransplantationen durchgeführt, die allerdings ebenfalls nicht von Erfolg gekrönt waren. Als Folge wurde in den nächsten 40 Jahren die Xenotransplantationsforschung eingestellt.

1963 wagte sich dann Claude Hitchcock aus Minneapolis wieder an einen Xenotransplantationsversuch heran. Er transplantierte die Niere eines Pavians in eine Patientin. Auch Keith Reemtsma in New Orleans, Starzl in Denver, Hume in Richmond und Traeger in Lyon führten fast zeitgleich einige Nieren-Xenotransplantationen durch.

Am 23. Januar 1964 wurde dann erstmals in der Geschichte der Xenotransplantation eine Herztransplantation versucht. Der US-Amerikaner James Hardy transplantierte dem 68-jährigen Boyd Rush, der sich im kardiogenen Schock bei ischämischer Kardiomyopathie befand, das Herz eines Schimpansen. Das Affenherz wurde innerhalb von 90 Minuten

abgestoßen und der Patient verstarb. Zwar wurde damals das Fehlschlagen der Transplantation auf die relativ kleine Größe des Spenderorgans und den schlechten klinischen Zustand des Patienten geschoben, doch zeigten mikroskopische Untersuchungen postmortem typische Charakteristika einer hyperakuten vaskulären Abstoßung. Die Koronargefäße waren zu 90% thrombotisch verschlossen.

Am Ende der 60er Jahre folgten weitere Versuche, Herzen anderer Spezies in den Menschen zu transplantieren, die ebenfalls erfolglos verliefen. Außerdem kam als neues Organ in der Xenotransplantation die Leber hinzu. Aber auch die postoperativen Ergebnisse der Lebertransplantationen waren mit einem Überleben von bis zu maximal 14 Tagen enttäuschend.

Als dann im Dezember 1967 auch noch die erste Herz-Allotransplantation durch den bekannten südafrikanischen Chirurgen Christiaan Barnard realisiert wurde, konzentrierten sich in den nächsten Jahren die Anstrengungen in der Transplantationsmedizin wieder auf die Allotransplantation, die Übertragung von Organen von Mensch zu Mensch.

Im Jahr 1977 war es Christiaan Barnard, der sich wieder an kardiale Xenotransplantationen heran wagte und in zwei Fällen Affenherzen verpflanzte. Im ersten Fall handelte es sich um eine 25-jährige Patientin, die nach einem Aortenklappenersatz nicht mehr von der Herz-Lungen-Maschine genommen werden konnte. Ihr wurde das Herz eines 30 kg schweren Pavians in heterotoper Position implantiert. Nach 5 1/2 Stunden trat beim ursprünglichen Herz der Patientin Kammerflimmern auf und das Affenherz konnte alleine keine adäquate systemische Zirkulation aufrechterhalten, sodass die Patientin verstarb. Im zweiten Fall transplantierte Barnard einem 60-Jährigen, der ebenfalls nicht von der Herz-Lungenmaschine gelöst werden konnte, ein Schimpansenherz. Unter hohen Dosen Immunsuppressiva konnte die kardiale Funktion vier Tage erhalten werden. (Adams 2000, Barnard 1977)

1984 führte Leonard Bailey in Loma Linda in den USA die wohl bekannteste kardiale Xenotransplantation durch. Er transplantierte dem weiblichen Neugeborenen „Baby Fae“, das mit einem hypoplastischen Linksherzsyndrom geboren worden war, das Herz eines Pavians. Im Gegensatz zu den vorausgegangenen Xenotransplantationsversuchen wurde diese Operation genauestens vorbereitet. Es wurde eine präoperative immunologische Testung durchgeführt und aus einer Gruppe von sechs Affen der immunologisch am besten geeignete Pavian ausgewählt. Auch war diese Xenotransplantation die erste, bei der das neue, in der Allotransplantation den durchschlagenden Erfolg bringende Immunsuppressivum Cyclosporin A eingesetzt wurde. Trotz dieser guten Voraussetzungen verstarb Baby Fae am 20.

postoperativem Tag (Adams 2000, Berg 2002, Deschamps 2005, Jonasson 1985, Wallis 1984).

Einige in den 90 er Jahren realisierte Xenotransplantationsversuche scheiterten ebenfalls nach wenigen postoperativen Tagen (Adams 2000, Deschamps 2005).

| Jahr | Autor | Organ | Spenderspezies | Empfänger | Überleben |
|-------------|--------------------|--------------|-----------------------|------------------------------------|---------------------|
| 1906 | Jaboulay | Niere | Schwein | 48 jährige Frau | 3 Tage |
| 1906 | Jaboulay | Niere | Ziege | 50 jährige Frau | 3 Tage |
| 1910 | Unger | Niere | Makake | 21 jährige Frau | 32 Stunden |
| 1913 | Schonstadt | Niere | Affe | Junges Mädchen | 60 Stunden |
| 1923 | Neuhof | Niere | Lamm | ? | 9 Tage |
| 1963 | Hitchcock | Niere | Pavian | 65 jährige Frau | 4 Tage |
| 1963 | Reemtsma | Niere | Rhesusaffe | 43 jähriger Mann | 63 Tage |
| 1964 | Reemtsma | Niere | Schimpanse | 23 jährige Frau | 9 Monate |
| 1964 | Reemtsma | Niere | Schimpansen | 12 Patienten | 63-270 Tage |
| 1964 | Hardy | Herz | Schimpanse | 68 jähriger Mann | 90 Minuten |
| 1964 | Starzl | Niere | Pavian | 6 Patienten | 19-98 Tage |
| 1964 | Hume | Niere | Schimpanse | 1 Mann | 1 Tag |
| 1964 | Traeger | Niere | Schimpansen | 3 Patienten | < 49 Tage |
| 1966 | Cortesini | Niere | Schimpanse | 19 jähriger Mann | 31 Tage |
| 1968 | Ross | Herz | Schwein | 48jähriger Mann | 4 Minuten |
| 1968 | Cooley | Herz | Schaf | 48 jähriger Mann | 10 Minuten |
| 1969 | Marion | Herz | Schimpanse | junge Frau | „Quickly“ |
| 1969 | Starzl | Leber | Schimpanse | 28 Monate altes Kind | 9 Tage |
| 1970 | Leger | Leber | Pavian | 23 jährige Frau | 72 Stunden |
| 1970 | Giles & Starzl | Leber | Schimpanse | 7 Monate altes Kind | 26 Stunden |
| 1971 | Pouyet & Bérard | Leber | Pavian | 28 jährige Frau 34 jährige Frau | < 2 Tage < 2Tage |
| 1974 | Starzl | Leber | Schimpanse | 1 Kind | 14 Tage |
| 1977 | Barnard | Herz | Pavian | 25 jährige Frau | 5,5 Stunden |
| 1977 | Barnard | Herz | Schimpanse | 60 jähriger Mann | 4 Tage |
| 1984 | Bailey | Herz | Pavian | 14 Tage altes Baby | 20 Tage |
| 1992 | Religa u.Czaplicki | Herz | Schwein | 31 jähriger Mann | 23 Stunden |
| 1992 | Makowka | Leber | Schwein | 26 jährige Frau | 34 Stunden |
| 1992 | Starzl | Leber | Pavian | 35 jähriger Mann | 70 Tage |
| 1993 | Starzl | Leber | Pavian | 62 jähriger Mann | 26 Tage im Koma |
| 1996 | Baruah | Herz | Schwein | 32 jähriger Mann | 7 Tage |

Tabelle 1: Xenotransplantationen im 20. Jahrhundert

Auch heute im Jahr 2008, ca. 500 Jahre nach den ersten Gewebe-Xenotransplantationsversuchen, hat die Xenotransplantation noch keinen Einzug in den klinischen Alltag genommen. Die Abstoßungsproblematik bei der Transplantation zwischen Individuen verschiedener Spezies ist zu komplex. Doch hat sich in den letzten Jahren die Forschung auf dem Gebiet der Xenotransplantation stark intensiviert, nicht zuletzt weil die Mechanismen der Abstoßungsreaktionen vor allem die der hyperakuten Abstoßung besser verstanden werden.

Obwohl bis heute noch kein Xenotransplantat dauerhaft funktionsfähig war und früher oder später stets der Immunantwort des Empfängers unterlag, konnte dennoch gezeigt werden, dass es möglich ist, dass ein Tierorgan im menschlichen Körper funktioniert. So lebte zum Beispiel die 23-jährige Patientin, der Reemtsma 1964 die Nieren eines Schimpansen transplantierte, neun Monate mit dem Xenotransplantat (Reemtsma 1964).

Auch die Möglichkeit von Xenotransfusionen ist zu Beginn des 21. Jahrhunderts, nach einem Jahrhundert in Vergessenheit, wieder entdeckt worden. Arbeiten von Zhu 2000, Cooper 2003 oder Doucet 2004 zeigen, dass auch dieses Thema wieder konzentriert verfolgt wird.

1.3. Das α -Gal-Epitop und die Anti-Gal-Antikörper

Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R (α -Gal-Epitop) ist eine Kohlenhydratstruktur, die auf Glykolipiden und Glykoproteinen von Nicht-Primaten-Säugetieren und Neue-Welt-Affen exprimiert wird, aber nicht in Alt-Welt-Affen, Menschenaffen und Menschen vorkommt (Galili 1988 b, Macher 2008). Auf den Zellen von Mäusen, Ratten, Kaninchen, Schweinen, Kühen, Hunden, etc. wurden zum Teil $1 \times 10^6 - 30 \times 10^6$ Epitope / Zelle gefunden (Galili 2001). Die Synthese des α -Gal-Epitops erfolgt durch das Enzym α 1,3Galactosyltransferase. Die α 1,3Galactosyltransferase ist ein membran-gebundenes Typ 2 Protein mit einer Länge von ungefähr 370 Aminosäuren (Macher 2008), das im trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert ist (Galili 2001). Die α 1,3Galactosyltransferase benützt zur Synthese der α -Gal-Epitope N-Acetyllactosamin-Reste als Zucker-Akzeptor und UDP-Gal als Zucker-Donor:



Alt-Welt-Affen, Menschenaffen und Menschen besitzen keine α -Gal-Epitope, produzieren hingegen aber natürliche Anti-Gal-Antikörper. Bisläng ging man davon aus, dass diese circa 1% der zirkulierenden Immunglobuline ausmachen (Galili 2005, Macher 2008). Obukhova et

al. (2007) zeigten in ihrer Studie jedoch, dass eine große Menge dieser Antikörper nicht gegen Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R, sondern gegen Gal α 1-4GlcNAc gerichtet ist und legt damit nahe, dass die Konzentration an den zirkulierenden Anti-Gal-Antikörpern bislang überschätzt wurde.

Es wird angenommen, dass in der Evolutionsgeschichte zunächst alle Säugetiere das Gen für die α 1,3Galactosyltransferase exprimiert haben, dann aber durch die geographische Separation zwischen dem südamerikanischen und dem afrikanischen Kontinent die Altweltaffen einem selektiven Evolutionsdruck ausgesetzt waren, der vor ungefähr 20-25 Millionen Jahren zur Inaktivierung des α 1,3Galactosyltransferase-Gens führte. Sequenzanalysen des α 1,3Galactosyltransferase-Gens deckten auf, dass Deletionen zu dem Einbau eines vorzeitigen Stopp-Codons und zu der Expression eines gekürzten inaktiven Enzyms führten (Galili 2001, Macher 2008). Die Entstehung dieses Pseudo- α 1,3Galactosyltransferase-Gens in Altweltaffen, Menschenaffen und dem Menschen hatte den Verlust der immunologischen Toleranz gegenüber dem α -Gal-Epitop sowie das Auftreten der Anti-Gal-Antikörper zur Folge. Es gibt Hinweise, dass die Produktion der Anti-Gal-Antikörper auf der kontinuierlichen antigenen Stimulation durch Bakterien der normalen Darmflora basiert (Galili 1988, Galili 2005).

1.4. Mechanismen der Xenotransplantatabstoßung

Die historische Entwicklung der Xenotransplantation (siehe 1.2.), mit deren zahlreichen erfolglosen Versuchen, Tierorgane in den Menschen zu transplantieren, lässt schon die Komplexität der Abstoßungsmechanismen bei der Xenotransplantation erahnen. Grundsätzlich differenziert man zwischen einer konkordanten und einer diskordanten Xenotransplantation (Kemp 1994). Der Begriff der konkordanten Xenotransplantation beschreibt die Übertragung von Organen zwischen Spezies, die eine nahe stammesgeschichtliche Verwandtschaft aufweisen (z.B. Transplantation zwischen Affe und Mensch), während diskordante Xenotransplantation die Übertragung von Organen zwischen genetisch weit entfernten Spezies (z.B. Transplantation zwischen Schwein und Mensch) bedeutet (White 1992). Bei der diskordanten Xenotransplantation besitzt der Empfänger präformierte Antikörper, die gegen zelluläre Strukturen des Spenders gerichtet sind. Bei der konkordanten Xenotransplantation sind die Antikörper hingegen nicht vorhanden. Entsprechend verläuft auch die Abstoßungsreaktion: bei diskordanten Xenografts kommt es sehr früh zu einer humoralen Abstoßungsreaktion, während konkordante Xenografts erst verzögert einer Immunantwort des Empfängers unterliegen (Azimzadeh 1996).

Wie bereits in Punkt 1.1. erläutert, ist das Schwein das am besten geeignete Spendertier für den Menschen, wobei die Situation einer diskordanten Xenotransplantation vorliegt. Die Mechanismen der Transplantatabstoßung bei der diskordanten Xenotransplantation von vaskularisierten Organen lassen sich in die hyperakute Abstoßung (HAR), die akute vaskuläre Abstoßung (AVR), die akute zelluläre Abstoßung (ACXR) und die chronische Abstoßung (CR) gliedern.

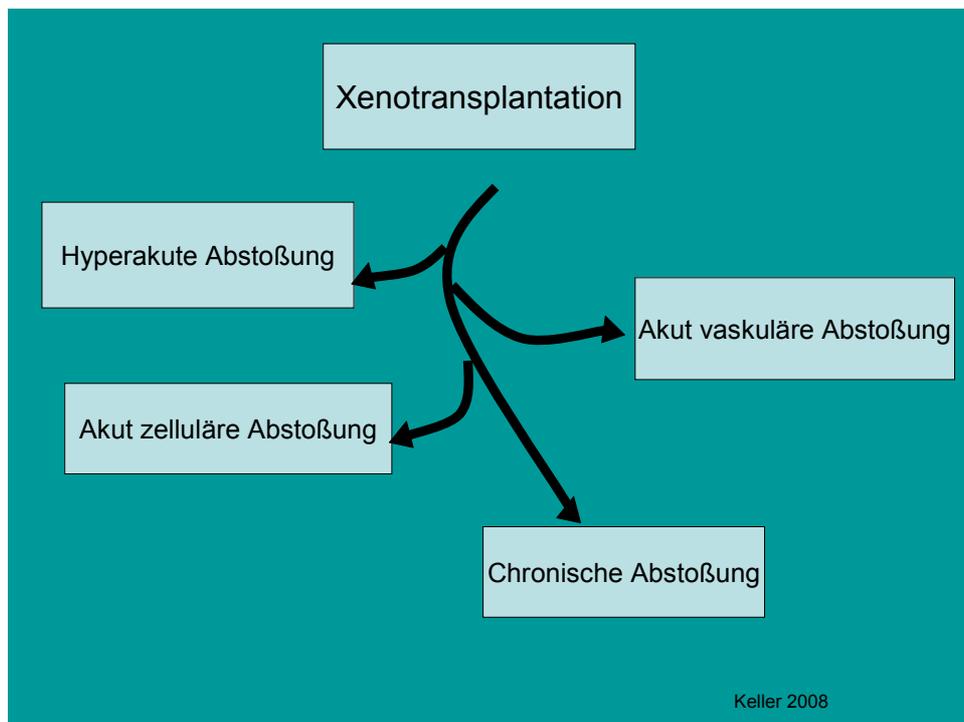


Abbildung 2: Mechanismen der Xenotransplantatabstoßung

1.4.1. Hyperakute Abstoßung

Die hyperakute Abstoßung beginnt unmittelbar nach der Reperfusion des Spenderorgans und führt innerhalb von Minuten bis Stunden zur Zerstörung des Transplantats (Parker 1996). Für die HAR sind die bereits oben erwähnten xenoreaktiven natürlichen Antikörper (XNA), die beim Empfänger schon zum Zeitpunkt der Transplantation vorhanden sind (Platt 1991), verantwortlich. Bei den Antikörpern handelt es sich hauptsächlich um Antikörper vom Typ Ig M (Lawson 1996, Parker 1996, Cozzi 2007), die spezifisch gegen das α -Gal-Epitop, eine Kohlenhydrat-Struktur auf Glycolipiden und Glycoproteinen (siehe 1.3.), gerichtet sind (Galili 1985, Galili 2001). Aber auch spezifisch gegen das α -Gal-Epitop gerichtete IgG- und IgA-Antikörper sind bei der HAR präsent (Galili 2005). Gebildet werden die XNA vor allem von in der Milz lokalisierten B-Zellen und in geringerem Ausmaß auch von Plasmazellen (Xu 2006). Die Bindung der XNA an die α -Gal Epitope führt zur Aktivierung des klassischen

Wegs der Komplementkaskade (Dalmasso 1992) und ist somit Voraussetzung für das Ablaufen der HAR.

Das Komplementsystem besteht aus mehr als 20 Proteinen, die kaskadenähnlich aktiviert werden. Es ist ein wichtiger pro-inflammatorischer Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Der Hauptsyntheseort für die Komponenten des Komplementsystems ist die Leber, aber es wurde gezeigt, dass auch zahlreiche extrahepatische Quellen für die Komplementfaktoren bestehen: Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Fettzellen, Epithelzellen und auch Endothelzellen (Thomas 2000). Man unterscheidet zwei Wege der Komplementaktivierung: den klassischen Weg und den alternativen Weg. Wie bereits oben angedeutet spielt bei der Xenotransplantation, vor allem bei der Transplantation zwischen Schwein und Primat, die Aktivierung über den klassischen Weg die entscheidende Rolle (Platt 1990, Lawson 1996).

Die Bindung der XNA an die α -Gal-Epitope auf den Endothelzellen aktiviert den Faktor C1 des Komplementsystems. C1 ist eine Protease, die C2 und C4 stimuliert, sodass sich in Folge der C4b2a-Komplex bildet. Dieser Komplex weist ebenfalls Proteaseaktivität auf und bewirkt durch limitierte Proteolyse die Stimulierung des Faktors C3 zu C3b. Der Faktor C3b bindet an den Komplex C4b2a und aktiviert durch Spaltung des Faktors C5 zu C5b das nächste Enzym in der Komplementkaskade. Der Faktor C5b leitet die Komplexbildung von C6, C7, C8 und C9 zum C5-9 Komplex ein. Häufig wird der C5-9Komplex auch als Membranangriffskomplex bezeichnet (Schmidt 2005). Der Membranangriffskomplex ist wahrscheinlich die Komponente des Komplementsystems, die für die klinischen und histopathologischen Bilder der HAR verantwortlich ist. Es gibt jedoch auch Hinweise, dass schon die Komplementkomplexe C5b67 und C5b678 eine HAR auslösen können (Platt 2001).

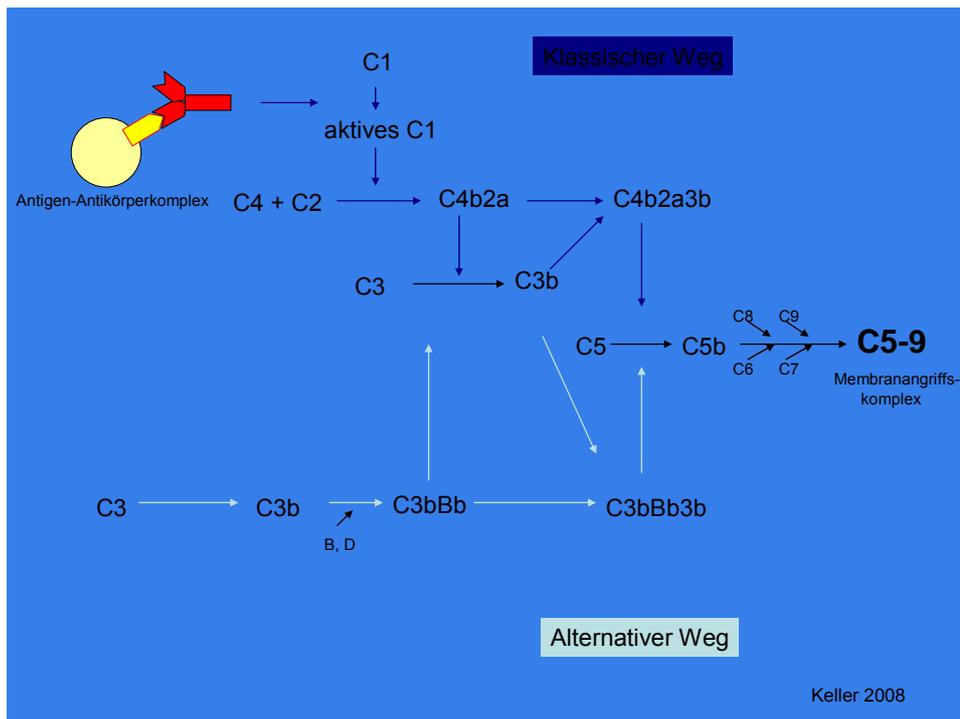


Abbildung 3: Das Komplementsystem

Sowohl in vitro als auch in vivo konnte die entscheidende Bedeutung der XNA und des Komplementsystems in der Pathogenese der hyperakuten Abstoßung nachgewiesen werden. So zeigten die abgestoßenen Organe Ablagerungen von IgM, C3, C4, C5 und C9 entlang der kleinen Blutgefäße (Dalmaso 1992). Die Tatsache, dass bei der Transplantation zwischen Schwein und Primat nach Entfernen der XNA mittels Plasmapherese oder Immunadsorption die hyperakute Abstoßung ausbleibt, bestätigt die These der Komplementaktivierung über den klassischen Weg und unterstreicht die Bedeutung des Zusammenwirkens von XNA und Komplement bei der HAR (Dalmaso 1992, Lawson 1996, Brenner 1999).

Bei der Xenotransplantation mit anderen Spender- und Empfängerspezies-Kombinationen wie zum Beispiel Meerschweinchen – Ratte oder Kaninchen – Ferkel kann das Komplementsystem jedoch auch über den alternativen Weg aktiviert werden (Lawson 1996, Dalmaso 1992). Durch spontane Hydrolyse des Faktors C3 bildet sich der Faktor C3b. Unter Mithilfe der Plasmaproteine B und D kommt es schließlich zur Bildung des Komplexes C3bBb3b, der proteolytische Funktion hat. Der Komplex spaltet C5 zu C5b und induziert somit die Bildung des Membranangriffskomplexes (Schmidt 2005).

Was sind nun die Folgen der Komplementaktivierung? Es kommt zu Komplementablagerungen, zur Endothelzellaktivierung vom Typ I und zur Schädigung der Endothelzellen. Im schlimmsten Fall kann es sogar zur Lyse der Endothelzellen kommen.

Gerade die Endothelzellaktivierung spielt eine zentrale Rolle in der Entstehung der HAR. Die aktivierten Endothelzellen weisen Veränderungen in Zellform und Zytoskelett auf. Folge ist die Zerstörung der endothelialen Integrität, einhergehend mit der Ausbildung von interzellulären Lücken (Saadi 1995). Außerdem verändert sich das Verhältnis der auf der Endothelzelloberfläche exprimierten Moleküle: antikoagulatorische Strukturen wie Thrombomodulin oder Heparansulfat-Proteoglykane werden herunterreguliert (Platt 1990, Ghebremariam 2005), während prokoagulatorische Moleküle wie platelet activating factor (PAF), tissue factor (TF), von Willebrand-Faktor und plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) vermehrt exprimiert werden (Ghebremariam 2005, Azimzadeh 1996). Die endotheliale Funktion kann nicht mehr aufrecht erhalten werden und es kommt konsekutiv zur Thrombozytenaktivierung, zur Thrombozytenaggregation und Koagulation (Cozzi 2007). Die korrelierenden histopathologischen Zeichen der HAR sind interstitielle Ödembildung, Einblutungen und Thrombosebildung (Rose 1991, Azimzadeh 1996).

1.4.2. Akut vaskuläre Abstoßung

Falls die HAR erfolgreich abgewendet werden kann, ist das Transplantat im Folgenden einer anderen Form von Abstoßungsreaktion ausgesetzt, die erstmals von Leventhal et al. beobachtet wurde und akute vaskuläre Abstoßung (AVR) genannt wird (Lawson 1996, Parker 1996). Manchmal findet man in der Literatur auch noch den Begriff der „delayed xenograft rejection“, also der verzögerten Transplantatabstoßung, der allerdings fälschlicherweise den Eindruck vermittelt, dass es sich bei der AVR um eine HAR handelt, die nur verspätet auftritt. Heute weiß man, dass die AVR unter Bedingungen auftreten kann, unter denen die HAR vollständig vermieden worden ist, oder auch in Fällen konkordanter Xenotransplantation existiert und somit einen eigenen Typus der Abstoßung darstellt (Lawson 1996).

Die AVR kann innerhalb von 24 Stunden nach Reperfusion auftreten und zerstört das Transplantat in einem Zeitraum von Tagen bis Wochen (Platt 2001, Cozzi 2007). Während, wie oben beschrieben, die HAR mit der schnellen Proteinsynthese unabhängigen Endothelzellaktivierung vom Typ I einhergeht, ist der Hauptmechanismus der AVR eine Endothelzellaktivierung vom Typ II (Bach 1996, Mollnes 2003). Die Endothelzellaktivierung vom Typ II findet etwas verzögert statt, da hierbei die Induktion der Gentranskription und die daraus resultierenden Proteinsynthese eine Rolle spielen (Bach 1996). Durch die Aktivierung der Endothelzellen kommt es zur Freisetzung von Zytokinen, Interleukinen und Chemokinen und zur Expression neuer Moleküle wie Adhäsionsmoleküle (z.B. E-Selectin, P-Selektin) und prokoagulatorischen Molekülen (z.B. TF, PAI-1) (Lawson 1996, Platt 2001, Mollnes 2003).

Die aus diesen Vorgängen resultierenden pathologischen Befunde sind denen, die bei HAR beobachtet werden, ähnlich: Thrombozytenaggregation, Thrombenbildung, Einblutungen, Ödembildung und Ischämiezeichen (Platt 2001, Cozzi 2007). Interessant hierbei ist, dass im Fall sehr rasch auftretender AVR das pathologische Bild der gestörten Mikrozirkulation mit interstitieller Hämorrhagie und Ödembildung dominiert, während das Bild bei einer sich allmählich entwickelnden AVR von intravaskulärer Thrombosebildung geprägt ist (Shimizu 2006).

Aber welche Faktoren überhaupt leiten nun die AVR ein? Man muss heute davon ausgehen, dass die Pathogenese der AVR multifaktoriell ist (Cozzi 2007), und zugeben, dass die exakten Mechanismen, die zur AVR führen noch nicht hundertprozentig verstanden sind. Zum einen kommt den xenoreaktiven Antikörpern wieder eine zentrale Rolle zu. Es gibt drei entscheidende Punkte, die nahe legen, dass natürliche sowie neugebildete xenoreaktive Antikörper mitbeteiligt sind. Erstens können in abgestoßenen Organen Immunglobulinablagerungen, d.h. Anti-Schwein-Antikörper nachgewiesen werden (Cozzi 2007), zweitens wird der Zeitpunkt des Auftretens der AVR durch das Entfernen der XNA durch Maßnahmen, wie zum Beispiel Immunadsorption, nach hinten verschoben (Parker 1996) und drittens konnte gezeigt werden, dass parallel zum Einsetzen der AVR die Synthese der Antikörper ansteigt (Chen 2000, Dehoux 2002). Bei den Antikörpern handelt es sich nach Lin et al. 2000 und McCurry et al. 1997 zum größten Teil erneut um Antikörper, die gegen das α -Gal-Epitop gerichtet sind. McCurry et al. konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass 70-95% der Antikörper α -Gal-spezifisch sind (McCurry et al 1997). Im Gegensatz zur HAR können aber auch sogenannte Anti-Non-Gal-Antikörper ihren Teil zur Entstehung der AVR beitragen (Baumann 2007, Saethre 2007, Cozzi 2007). Dieser Punkt wird auch durch die Arbeit von Kuwaki et al. 2005 gestützt, in der gezeigt wird, dass auch bei α 1,3-Galactosyltransferase-knock-out-Schweinen Prozesse einer AVR ablaufen.

Anfangs war man der Auffassung, dass das Komplementsystem nur bei der Entstehung der HAR beteiligt ist und keine Rolle bei der Initialisierung der AVR spielt. Diese Meinung wurde aber in den letzten zehn Jahren revidiert, da mehrere Tierversuche gegenteilige Daten lieferten. So berichten Loss et al. 2000, dass bei der Transplantation von hDAF-transgenen Schweinenieren in Cynomolgus-Affen während des Ablaufens der AVR die klassische Komplementkaskade aktiviert wird. Außerdem konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass bei einer Behandlung des Empfängers mit einem C1-Inhibitor die AVR abgewendet werden kann (Vangerow 2001), was ebenfalls die Beteiligung des Komplements an der AVR nahe legt. Erstaunlicherweise scheint das Komplement nicht auf direktem Weg die

prokoagulatorische Aktivität des Endothels zu erhöhen, sondern triggert die Transkription, die Synthese und die Freisetzung von IL-1 α . IL-1 α wiederum agiert als parakriner oder autokriner Faktor und aktiviert die Expression von Genen, deren Produkte prothrombotisch und proinflammatorisch wirken (Parker 1996, Lawson 1996, Platt 2001). Es ist wichtig zu erwähnen, dass das Komplementsystem bei der Entstehung der AVR beteiligt sein kann, aber nicht beteiligt sein muss. Während bei der HAR ja gerade das Zusammenwirken von XNA und Komplementsystem entscheidend ist, scheinen bei der AVR XNA auch alleine eine vollständige Abstoßung auslösen zu können (Palmetshofer 1998).

Außerdem gibt es Daten, die auf eine Mitbeteiligung zellulärer Abwehrmechanismen an dem Prozess der AVR schließen lassen. So sollen Makrophagen, T-Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK) die Entwicklung einer AVR verschlimmern (Chen 2004, Ashton-Chess 2003). Die Arbeit von Lin et al. aus dem Jahr 1997 beschreibt sogar, dass die zellulär vermittelte Immunantwort alleine ohne Anwesenheit von XNA die akute Abstoßung eines Xenotransplantats verursachen kann. Vor einigen Jahren wurde dann auch gezeigt, dass neutrophile Granulozyten bei der AVR mitwirken können, wobei eine direkte Interaktion mit dem Endothel zur Aktivierung der Abwehrzellen führt (Al-Mohanna 2005).

Zusammenfassend kann man zum jetzigen Zeitpunkt konstatieren, dass sowohl humorale als auch zellvermittelte Immunreaktionen eine Rolle in der Entstehung der AVR spielen. Der humoralen Komponente, häufig auch als „acute humoral xenograft rejection“ (AHXR) bezeichnet, wird dabei aber bislang die größere Bedeutung beigemessen.

1.4.3. Akut zelluläre Abstoßung

Dass nicht nur humorale Immunkomponenten für die Xenotransplantatabstoßung verantwortlich sind, wird schon in Punkt 1.4.2 angedeutet. So leisten T-Zellen, natürliche Killerzellen und Makrophagen ihren Beitrag zur Entstehung der AVR.

Man geht heute davon aus, dass nach Überwindung der HAR und AVR eine Form der Abstoßung abläuft, die alleine auf zellulären Mechanismen beruht und als akute zelluläre Abstoßung bezeichnet wird (ACR). Es wird angenommen, dass die ACR bei Xenotransplantation der zellulären Abstoßung bei Allotransplantation ähnelt (Ghebremariam 2005). Jedoch konnten bislang die genauen Mechanismen der ACR in vivo noch nicht im Detail untersucht werden, da die Transplantate in der Regel den früher auftretenden Abstoßungsreaktionen HAR und AVR unterliegen und nur in wenigen Fällen die zelluläre Beteiligung zu sehen ist.

Diese wenigen Fälle unterstützen aber stark die These der ACR, da die explantierten Organe multifokale zelluläre Infiltrate bestehend aus Makrophagen, NK, T- und B-Zellen zeigen (Cozzi 2007, Shimizu 2000). In den letzten Jahren hat man vor allem anhand von In-vitro-Analysen versucht, die Mechanismen der ACR zu beleuchten.

Zum einen scheinen T-Zellen eine große Bedeutung in der ACR haben. CD4⁺ Zellen wirken dabei als Mediatoren der Immunreaktion und aktivieren Makrophagen, CD8⁺ Zellen und B-Zellen (Shimizu 2006). Wie auch bei Allotransplantation erkennen CD4⁺ Zellen MHC II Antigene (Platt 2001), leiten über die Ausschüttung von Interleukinen (v.a. IL2) und Interferonen (v.a. IFN- γ) eine gezielte Immunantwort ein und führen dadurch zur direkten Zerstörung des Gewebes (Davila 2006). Im Gegensatz zur zellulären Abstoßung bei Allotransplantation, ist die xenogene Immunantwort nicht nur gegen MHC-Moleküle gerichtet, sondern bezieht eine große Anzahl von PAEC-Antigenen mit ein (Platt 2001). Nicht zu vergessen ist auch die positive Korrelation zwischen humoralen und zellulären Immunfaktoren. Antikörper und Komplement aktivieren Endothelzellen und antigenpräsentierende Zellen, diese wiederum verstärken die Antwort der CD4⁺ Zellen (Platt 2001). Andererseits scheint die Produktion der xenogenen Antikörper ihrerseits auch in gewissem Maße CD4⁺ Zell vermittelt abzulaufen (Chong 2000). Es wird angenommen, dass die CD4⁺ Lymphozyten die dominierende Rolle bei der ACR spielen (Davila 2006). Außerdem sind neben den CD4⁺ Lymphozyten auch CD8⁺ T-Zellen bei der zellulären Immunreaktion beteiligt, wenngleich unterschiedliche Angaben zur Häufigkeit vorliegen. Während Davila et al. 2006 die Beobachtung gemacht haben, dass die zellulären Infiltrate der abgestoßenen Organe hauptsächlich aus CD4⁺ T-Zellen bestehen und nur wenige CD8⁺ T-Zellen vorhanden sind, konnten Shimizu et al. ungefähr gleiche Anzahlen von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen in abgestoßenen Nierentransplantaten nachweisen. Jedenfalls ist davon auszugehen, dass CD8⁺ Zellen als Effektorzellen des zellulären Immunsystems gegenüber porcinen Endothelzellen eine starke Zytotoxizität aufweisen und direkt zur Zerstörung des Xenotransplantats beitragen (Tanemura 2008).

Auch Natürliche Killerzellen (NK) haben eine Bedeutung in der ACR. Es gibt Hinweise, dass sich NK-Zellen in Xenotransplantaten ansammeln, porcine Antigene erkennen und die Endothelzellen daraufhin schädigen (Platt 2001). Die zytotoxische Wirkung der NK-Zellen verursacht die Auflösung der endothelialen Integrität und bewirkt prokoagulatorische Veränderungen (Lawson 1996). Anfangs war man der Meinung, dass bei der NK-Zytotoxizität auch wieder α -Gal-Epitope die Auslöser sind. Baumann et al. (2004) konnten

jedoch zeigen, dass α -Gal-Epitope als Zielantigene für die NK-Immunantwort nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Es bleibt weiterhin unklar, inwieweit zelluläre Mechanismen alleine ohne Beteiligung humoraler Immunkomponenten zu einer kompletten Abstoßung eines Xenotransplantats führen können.

1.4.4. Chronische Abstoßung

Die chronische Abstoßungsreaktion (CR) ist bei Allotransplantation der häufigste Grund für das Versagen des Transplantats (Shimizu 2006). Hierbei ist die Ausbildung einer Transplantatvaskulopathie, die zu Ischämie oder Infarzierung des transplantierten Organs führt, der limitierende Faktor (Ghebremariam 2005). Man muss davon ausgehen, dass auch bei Xenotransplantation eine chronische Abstoßung in ähnlicher Weise abläuft. Erst in den letzten Jahren, in denen durch die Verwendung transgener Schweine (v.a. α -Gal-knockout Schweine) das Transplantatüberleben im Schwein-Pavian-Transplantationsexperiment stark verlängert werden konnte, wurden erstmals Anzeichen für das Ablaufen einer chronischen Transplantatabstoßung nachgewiesen (McGregor 2004, Kuwaki 2004, Kuwaki 2005). Die transplantierten Herzen zeigten eine thrombotische Mikroangiopathie einhergehend mit der Ausbildung von Thrombozyten-Fibrin-Thromben (Shimizu 2008).

Wie auch bei der Allotransplantation scheinen der CR bei der Xenotransplantation sowohl immunologische wie auch nicht-immunologische Prozesse zugrunde liegen. Nicht-immunologische Faktoren bei Allotransplantation beinhalten Ischämie-Reperfusionsschäden und vor allem Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie (Banasik 2006). Bei der Xenotransplantation spielen wahrscheinlich auch noch andere Punkte eine Rolle. So können molekulare Inkompatibilitäten im Koagulationssystem von Schweinen und (nicht) menschlichen Primaten den Prozess der CR beeinflussen (Sprangers 2008). Außerdem ist denkbar, dass die Unterschiede, die zwischen humaner und porciner Physiologie bestehen, wie Differenzen in der Körpertemperatur oder der Blutviskosität etc. (Ibrahim 2006), Auswirkungen auf die CR haben können (Sprangers 2008).

Inwieweit die CR ein Problem in der Xenotransplantation darstellt und welche Faktoren tatsächlich Gewicht in der Entstehung der CR haben, kann erst genauestens gesehen werden, wenn ein konstantes Langzeitüberleben der Organtransplantate erreicht wird.

1.5. Strategien zur Überwindung der Abstoßungsmechanismen

Die Beschreibung der einzelnen Abstoßungsreaktionen macht deutlich, welchen enormen Hindernissen man bei der Xenotransplantation gegenübersteht. Dennoch wurden in den letzten 20 Jahren beträchtliche Fortschritte in der Xenotransplantation erzielt. Nicht zuletzt durch das zunehmende Verständnis der einzelnen Abstoßungskomponenten konnten Strategien zur Überwindung oder Verzögerung der Organabstoßung entwickelt werden, die sich positiv auf das Langzeitüberleben auswirkten. Während 1986 in Paviane transplantierte Schweineherzen innerhalb von wenigen Minuten abgestoßen wurden, kann heute ein transplantiertes Schweineherz im Primaten 2-6 Monate überleben (Zhu 2007, Kuwaki 2005).

1.5.1. Akkommodation

Es wurden Situationen beobachtet, in denen das Transplantat nicht akut abgestoßen wurde, und die Transplantatfunktion trotz des Vorhandenseins der humoralen Immunkomponenten erhalten blieb. Unter speziellen Bedingungen erfolgt keine Zerstörung des Xenotransplantats, obwohl Antikörper und Komplement anwesend sind. Dieser Zustand wird Akkommodation genannt. Der Begriff wurde erstmals von Platt et al. im Jahr 1990 geprägt und soll deutlich machen, dass sich das Transplantat anscheinend an die Immunantwort des Empfängers „gewöhnen“ kann. Dieses Phänomen wurde zunächst bei der ABO-inkompatiblen Allotransplantation von Nieren beobachtet (Parker 1996). Die Transplantation ABO-inkompatibler Nieren ist möglich, wenn vor der Transplantation die Anti-A- oder Anti-B-Antikörper entfernt und die Antikörpervorräte geleert worden sind. Auch wenn das Komplementsystem intakt ist und die Antikörper später wieder neu gebildet werden, unterliegt das inkompatible Transplantat in diesem Fall keiner vaskulären Abstoßungsreaktion, sondern es resultiert ein verlängertes Transplantatüberleben (Chopek 1987). Ein ähnliches Phänomen konnte auch bei Xenotransplantationsversuchen beobachtet werden, allerdings nicht in derselben Häufigkeit wie bei der Allotransplantation (Platt 1990 a, Parker 1996). Hier ist die entscheidende Voraussetzung für die Entwicklung der Akkommodation die Depletion der XNA vor der Implantation des Xenotransplantats.

In den letzten Jahren hat man versucht das erstaunliche Phänomen der Akkommodation zu beleuchten und hat Erklärungsstrategien entwickelt, dennoch ist bis heute der genaue biologische Mechanismus, der zur Akkommodation führt, noch nicht gänzlich verstanden.

Es gibt Hinweise, dass die Antikörper, die einige Zeit nach der Depletion wieder in der Zirkulation auftreten, eine veränderte Spezifität und/oder Affinität sowie veränderte funktionelle Eigenschaften aufweisen (Platt 1990 a, Saadi 1998). Eine andere Möglichkeit die

Antikörper betreffend ist, dass es zu einem Klassenwechsel kommt. Hierbei ist ein Antikörperswitch in die Subklasse IgG2 mit einer quantitativen Dominanz dieser Klasse denkbar. Die non-zytolytischen Antikörper der Subklasse IgG2 lösen in viel geringerem Maße als andere Subklassen eine Aktivierung des Komplementsystems aus und konkurrieren zudem mit den anderen Subklassen um die Antigenbindungsstellen (Platt 1990 a, Saadi 1998, Mohiuddin 2003).

Eine andere mögliche Erklärung für den Prozess der Akkommodation kann sein, dass nicht die Antikörper, sondern die Antigene einen Wandel erfahren. So ist anzunehmen, dass Epitope, die eine zentrale Rolle bei der Xenograftabstoßung spielen wie das α -Gal-Epitop, einer Veränderung oder Modulation unterliegen, sodass auf diese Weise eine verminderte Antigen-Antikörper-Interaktion resultiert (Platt 1990 a).

Eine dritte Hypothese geht davon aus, dass Änderungen des Endothels die Akkommodation erklären. Zum einen ist denkbar, dass Endothelzellen in der Zeit während und kurz nach Implantation der Organe besonders empfindlich gegenüber der humoralen Immunantwort des Empfängers sind, da sie durch die Transplantation an sich, aber auch durch die Einwirkung von Preservationslösungen gestresst sind. Folge ist die Abstoßung des Organs. Im Falle der Akkommodation wird die Abstoßung zu diesem kritischen Zeitpunkt vermieden. Später dann, wenn die Antikörper zurückkehren, befinden sich die Endothelzellen in einem stabilen Zustand, in dem sie der humoralen Immunreaktion widerstehen können (Platt 1990 a).

Zum anderen wurde beobachtet, dass akkommodierte Organe eine Reihe so genannter „schützender Gene“ („protective genes“) exprimieren (Saadi 1998, Wang 2002). Unter diesen Begriff fallen Gene, deren Produkte den Vorgang der Apoptose und/oder die Aktivierung von NF- κ B, dem Schlüssel für die Hochregulierung entzündungsfördernder Gene, inhibieren. Zu den „schützenden Genen“ zählen bcl-2, bcl-xL, A20 und Hämoxxygenase (Bach 1997, Lin 1999). Die Theorie der „schützenden Gene“ wurde vor allem durch Beobachtungen an kardialen Xenotransplantaten aufgestellt. Tabata et al. konnten im Hamster-Ratten-Modell zeigen, dass die Akkommodation basierend auf „schützenden Genen“ auch bei Lungentransplantationen ablaufen und folgerten, dass Akkommodation ein Phänomen ist, das in allen Organen zu finden ist (Tabata 2003).

In vielen Arbeiten wird auch darauf hingewiesen, dass die Kontrolle über das Komplementsystem für den Zustand der Akkommodation notwendig ist. So ist die Inhibition des Membranangriffskomplexes z.B. durch den Cobra-Venom-Factor (CVF) ein wichtiger Schritt in der Einleitung der Akkommodation (Suhr 2007). Williams et al. (2004) berichten über ihre Erfahrungen im Schwein-Pavian-Modell und unterstützen die These, dass ein

kontrolliertes Komplementsystem zumindest Teilvoraussetzung für die Akkommodation ist. Im Gegensatz zu den abgestoßenen Schweineherzen, war bei den akkommodierten Herzen die Komplementkaskade unterbrochen und lief nur teilweise ab. Außerdem wiesen die akkommodierten Organe hohe Mengen an Heparansulfat und Syndecan-4-Phosphat auf, Strukturen, die maßgeblich an der Regulierung des Komplementes beteiligt sind. In den abgestoßenen Herzen waren diese Regulatoren nicht vorhanden (Williams 2004). Eine Hochregulierung komplement-regulierender Proteine setzt die komplement-vermittelte Abstoßungsreaktion außer Kraft und ermöglicht somit die Entwicklung der Transplantatakkommodation (Ding 2008).

Nach obigen Ausführungen ist ersichtlich, dass sowohl Mechanismen auf Seiten des Empfängers wie auch auf Seiten des Transplantats eine Rolle in dem Prozess der Akkommodation spielen. Wahrscheinlich ist es das Zusammenwirken aller Mechanismen, die Akkommodation erlauben. Es gibt jedoch Hinweise, dass Anpassungsprozesse des Empfängers, einhergehend mit niedrigen Antikörperspiegeln und einer geringen Anzahl an Antikörper-produzierenden B-1 Zellen, wichtiger sind (Komori 2008).

Es sind weitere Anstrengungen nötig, die genauen, zur Akkommodation führenden Mechanismen zu verstehen. Könnte das Erreichen der Transplantatakkommodation doch der Schlüssel für ein dauerhaftes Langzeitüberleben sein.

1.5.2. Möglichkeiten der Antikörperelimination

Die Entdeckung, dass xenoreaktive natürliche Anti- α -Gal-Antikörper für die HAR verantwortlich sind und auch eine bedeutende Rolle bei der AVR spielen, initialisierte Bemühungen, die Antikörper zu entfernen.

Zum einen stellt der Plasmaaustausch eine Möglichkeit dar, die Antikörpertiter des Empfängers zu reduzieren. Das Blut des Empfängers wird z.B. mittels Plasmapherese in Plasma und zelluläre Bestandteile zerlegt und anschließend das Plasma durch Albumin, Fresh Frozen Plasma (FFP) oder andere Volumenersatzmittel ersetzt. Diese Methode führte zu einem verlängerten, im Meerschweinchen-Ratten-Modell sogar zu einem 23-fach verlängerten Transplantatüberleben (Ghebremariam 2005). Nachteil dieser sehr unspezifischen Methode ist, dass auch wichtige Plasmaproteine und Immunglobuline entfernt werden mit der Konsequenz, dass die Abwehrlage des Empfängers stark reduziert und das Gerinnungssystem gestört wird (Ghebremariam 2005).

Zum anderen versucht man die Antikörper mittels xenogener Organperfusion zu eliminieren. Dabei wird vor der eigentlichen Transplantation eine isolierte Schweineleber, -milz oder -

niere mit dem Blut des Empfängertieres perfundiert (Henry 1994, Zhu 2007). Dieser Vorgang führt weitgehend zu einer Depletion der XNA und hat ein verlängertes Transplantatüberleben von wenigen Tagen zur Folge. Das Organ unterliegt allerdings schließlich der AVR, sobald die Antikörper nachgebildet werden (Zhu 2007).

Eine weitere Methode zur Entfernung der XNA aus dem Empfängerblut ist die extrakorporale Immunadsorption (IA). Bei der IA wird das Plasma des Empfängertieres präoperativ durch Glassäulen gepumpt, in denen die Immunglobuline durch an Matrix gebundene Antikörper herausgefiltert werden. Bei der antikörperbasierten IA fungieren polyklonale Schafantikörper, die an Sepharose gebunden sind, als Liganden und entfernen IgG, IgM, IgA sowie zirkulierende Immunkomplexe und Ig-Fragmente (Brenner 2000 b). Mit einer derartigen Immunadsorptionsbehandlung können pro Zyklus durchschnittlich 60-70% der Immunglobuline herausgefiltert werden (Brenner 2000 b). Sowohl im „Working-heart“-Perfusionsmodell als auch im heterotopen und orthotopen Tiermodell konnte die Effizienz dieser Methode gezeigt werden, wurden doch verlängerte Laufzeiten (Brenner 1999) bzw. verlängerte Transplantatüberleben beobachtet (Leventhal 1995, Brenner 2000a, Brenner 2000b, Brenner 2005).

Bei der antigenbasierten IA sind α -Gal-Epitope an eine Säulenmatrix gebunden und dienen als Liganden. Auf diese Weise werden spezifisch α -Gal-Antikörper aus dem Plasma entfernt. Auch diese Form der IA führt zu einer effizienten Antikörperreduktion (Kozlowski 1998, Watts 2000).

Die IA hat eine beinahe vollständige Depletion der Antikörper über einen Zeitraum von wenigen Tagen zur Folge und ermöglicht so das Überwinden der HAR. Allerdings kommt es früher oder später zu einem erneuten Auftreten von Antikörpern, was schließlich die AVR auslöst (Zhu 2007).

Eine andere Möglichkeit der Antikörperdepletion bzw. eine Möglichkeit zur Antikörperneutralisation ist die konstante oder intermittierende Infusion von synthetischen Gal-Oligosacchariden. Die XNA binden dabei an die intravenös infundierten Antigene und die resultierenden Antigen-Antikörperkomplexe werden über die Leber und die Nieren metabolisiert und ausgeschieden (Zhu 2007). In zahlreichen In-vitro- und In-vivo- Studien wurden zunächst verschiedene Oligosaccharide mit der terminalen Struktur α -Gal hinsichtlich ihrer Wirksamkeit miteinander verglichen. Als besonders effektiv stellten sich Gal-Oligosaccharide heraus, die mit Poly-L-Lysine (Teranishi 2003, Brandl 2005, Brandl 2007), Rinder-Serum-Albumin (Teranishi 2002, Gollackner 2003) oder Polyethylen-Glycol (Cooper 2003) konjugiert waren. Die Anwendung dieser Technik führte im Schwein-Pavian-Modell zu

einem verlängerten Transplantatüberleben (Romano 1999, Brandl 2005). Brandl et al. berichteten, dass in Kombination mit hDAF- transgenen Spendertieren das Ablauen der HAR gänzlich verhindert und die AVR hinausgezögert werden konnte.

1.5.3. Strategien zur Blockierung des Komplementsystems

Wie in Punkt 1.4.1. beschrieben, stellt das Komplementsystem neben den XNA die zweite notwendige Komponente bei der Entstehung der HAR dar. Aber auch bei der AVR kann das Komplementsystem beteiligt sein (siehe 1.4.2.). Daher setzte man auch Bemühungen daran, Strategien zu entwickeln, die das Komplementsystem inhibieren bzw. zur Komplementdepletion führen.

Einerseits setzt man lösliche Proteine ein, wie den C1-Inhibitor, den Cobra-Venom-Faktor (CVF), den löslichen Komplement-Rezeptor Typ 1 (sCR1) oder das Vaccinia-Virus-Komplement-Kontrollprotein (VCP).

Der C1-Inhibitor hemmt selektiv den klassischen Weg der Komplementkaskade und schützt auf diese Weise effektiv porcine Endothelzellen vor der Immunantwort durch humane Komplementfaktoren (Mollnes 2003, Vangerow 2001).

Der CVF ist ein 149 kDa schweres Glykoprotein, das sowohl in den klassischen wie auch in den alternativen Teil des Komplementsystems eingreift (Azimzadeh 1997), wobei der Angriffspunkt vor allem die C3/C5-Konvertase des alternativen Wegs ist (Ghebremariam 2005). Der CVF zeigt eine sehr starke Komplement-inhibierende Wirkung und kann eine HAR verhindern. Allerdings ist sein Einsatz nur beschränkt möglich, da es durch die Behandlung mit CVF zum einen zu einer gravierenden Aggregation von Abwehrzellen kommt und zum anderen die Gefahr besteht, dass CVF als körperfremdes Protein eine starke Immunreaktion auslöst (Ghebremariam 2005).

Wie auch der CVF kann der sCR1 sowohl die klassische wie auch die alternative Komplementkaskade beeinflussen und das Xenogtransplantatüberleben effizient verlängern (Azimzadeh 1997). Aber auch der Einsatz des sCR1 ist nicht auf die klinische Situation übertragbar, da der sCR1 in vivo nur eine limitierte Bioverfügbarkeit aufweist und eine kontinuierliche Infusion nötig macht. Außerdem besteht auch hier wieder das Problem, dass das körperfremde Protein eine unkontrollierbare Immunantwort provozieren kann (Ghebremariam 2005).

Ein vielversprechendes lösliches komplement-regulierendes Protein ist das Vaccinia-Virus-Komplement-Kontrollprotein (VCP). Das VCP wird aus einem DNA-Virus der Familie der

Poxviridae isoliert und weist komplement-modulierende Eigenschaften auf (Kotwal 1990). Das VCP reguliert dosisabhängig das Komplementsystem (Ghebremariam 2005), es bindet an die Komplementkomponenten C3b und C4b und beeinflusst so die beiden Wege des Komplementsystems. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das VCP die Antigen-Antikörper-Interaktion zwischen den XNA und den α -Gal-Epitopen hemmt (Al-Mohanna 2001, Mollnes 2003, Ghebremariam 2005) und zudem die Interaktionen zwischen den porcinen Endothelzellen und zytotoxischen Zellen blockiert (Al-Mohanna 2001). Der große Vorteil dieses Komplementregulators ist, dass er lange im Körper gehalten wird und daher auf eine kontinuierliche Infusion verzichtet werden kann (Ghebremariam 2005). Die lange Retentionszeit im Körper wird zum einen der Fähigkeit des VCP zugeschrieben, an Heparin auf den Endothelzellen zu binden, und zum anderen der Aufnahme des VCP in die Mastzellen, wo ebenfalls eine Bindung an die Heparin granula erfolgt (Jha 2003). Beide Punkte führen zu einer anhaltenden Freisetzung von VCP und verhindern die schnelle Eliminierung aus dem Körper.

Andererseits züchtet man transgene Schweine, die humane komplement-regulierende Proteine (CRP), wie Decay-accelerating-Factor (DAF), CD59, CD46 oder Membrane Cofactor Protein (MCP) exprimieren. CRP sind, wie schon der Name sagt, Regulatoren bzw. Inhibitoren des Komplementsystems, wobei man davon ausgeht, dass die CRP speziesspezifisch sind (Azimzadeh 1997, Mollnes 2003, Zhu 2007). Die porcinen CRP sind in der Lage, Schweinezellen vor der Immunantwort durch das porcine Komplementsystem zu schützen, aber eben nicht vor der Immunantwort durch das humane Komplementsystem. Es konnte sowohl im Perfusionsmodell wie auch in In-Vivo-Transplantationsversuchen mehrfach demonstriert werden, dass derartige transgene Nieren und Herzen vor der HAR geschützt sind (Schmoeckel 1996, Brenner 2005 b, Smolenski 2007). Bei der heterotopen Transplantation hCD46-transgener Schweineherzen in Paviane konnte ein mittleres Überleben von 96 Tagen erreicht werden (McGregor 2005). Die transgenen Nieren und Herzen unterliegen schließlich der AVR. In Ex-Vivo-Versuchen zur Lungentransplantation konnte gezeigt werden, dass auch hCD59- und hDAF-transgene Lungen ein signifikant verlängertes Überleben, eine verbesserte Oxygenierungsfunktion und einen verminderten pulmonaren Widerstand aufweisen als die Organe der Vergleichsgruppe (Pöling 2006).

Es gibt aber auch neue Daten, die die Speziesspezifität der CRP widerlegen. Diese Daten legen nahe, dass porcine CRP das humane Komplementsystem inhibieren können, wenn sie in einem Übermaß exprimiert sind, was folgern lässt, dass weniger die Qualität als die Quantität

der CRP entscheidend für die Regulation des Komplementsystems ist (Mollnes 2003, Zhu 2007).

1.5.4. Immunsuppressive Therapie und toleranz-induzierende Maßnahmen

Die medikamentöse immunsuppressive Therapie zielt darauf ab die zelluläre Immunantwort und damit die ACR und die zelluläre Komponente der AVR zu unterdrücken. Da die Antikörperproduktion ebenfalls T-Zell-abhängig abläuft, hemmt die Therapie mit Immunsuppressiva indirekt auch die AHXR.

Zunächst wurden in der Xenotransplantation die Immunsuppressiva eingesetzt, die man aus der Allotransplantation kannte: Calcineurininhibitoren (Cyclosporin A, Tacrolimus), Azathioprin und Kortikosteroide (z.B. McCurry 1997). Wie auch in der Allotransplantation setzte man auf eine Dreifachkombination der Immunsuppression als Erhaltungstherapie. Dann wurde das Cyclophosphamid, ein Immunsuppressivum, das einen hemmenden Effekt sowohl auf die T- wie auch die B-Zellen ausübt, mit positiven Resultaten hinzugenommen (Zhu 2007). Der Nachteil einer Therapie mit Cyclophosphamid jedoch ist das enge therapeutische Fenster und das häufige Auftreten von Nebenwirkungen (Schuurman 2005). Ein weiteres Immunsuppressivum, das zusammen mit Cyclosporin A und Kortikosteroiden Anwendung fand, war der Antimetabolit Mycophenolatmofetil (MMF). MMF wies im Vergleich zu Cyclophosphamid ein besseres Nutzen-Risiko-Profil auf (Zhu 2007). Allerdings konnte eine Dreifachimmunsuppression mit MMF alleine nicht vor der humoralen Immunantwort und dem komplement-vermittelten Transplantatversagen schützen (Minanov 1998). Brenner et al. konnten bei ihren Versuchen zur orthotopen Transplantation von hDAF-transgenen Schweineherzen in Paviane zeigen, dass eine Vierfachtherapie mit Cyclosporin A, Steroiden, MMF und Einzeldosen von Cyclophosphamid das Auftreten einer AVR verhindert. Allerdings sind die mit dieser starken Immunsuppression verbundenen Nebenwirkungen so erheblich, dass sie bei einer Übernahme dieses Schemas in die Klinik noch verbessert werden müssen (Brenner 2005 b). Im Folgenden wurden zahlreiche Regime mit den oben genannten Medikamenten angewendet und auch mit Maßnahmen wie der Splenektomie und der Bestrahlung des lymphatischen Systems kombiniert. Dennoch blieb der durchschlagende Erfolg aus. Auch andere Immunsuppressiva wie Antilymphozytenglobulin (Lambripts 1998, Asano 2003), Mycophenolatnatrium (Cozzi 2003), TOR-Inhibitoren (Sirolimus, Everolimus) (McGregor 2004), der monoklonalen Anti-CD20-Antikörper (Alwayn 2001) oder das aus der Onkologie bekannte Mitoxantron (Ashton-Chess 2004) konnten das Abflauen der AVR nicht gänzlich verhindern.

Positiv zeigte sich die Einführung der kostimulatorischen Blockade. Die Verwendung von Inhibitoren, die die kostimulatorische Interaktion zwischen CD40-Ligand und CD40 oder CD28 und B7 hemmen, erlauben eine Prävention der T-Zell-Aktivierung und der dadurch induzierten Antikörperbildung, ohne dass eine derart hohe Morbidität, wie sie mit oben beschriebener intensiver Pharmakotherapie verbunden ist, auftritt (Knosalla 2004). Die Kombination aus der Verwendung hDAF-transgener Schweineorgane, der kontinuierlichen Infusion von Gal-Oligosacchariden und der medikamentösen Erhaltungstherapie mit antihumanem CD154-Antikörper, MMF und Methylprednisolon hatte ein Transplantatüberleben bei heterotoper Xenotransplantation im Pavianmodell von mehreren Monaten zur Folge (Kuwaki 2004). Eine CD154 - Blockade alleine allerdings kann eine Produktion von Gal- und Non-Gal-Antikörpern auch nicht komplett verhindern, da weitere kostimulatorische Wege bestehen, die ausreichen, um eine AVR hervorzurufen (Wu 2005).

Eine andere Möglichkeit zur Toleranzinduktion ist das Chimären-Modell. Die Chimärenbildung kann durch Mischzelltransplantation oder durch die Transduktion von Knochenmarkszellen mit Virenvektoren, die das α 1,3-Galactosyltransferase-Gen exprimieren, erreicht werden. Im Ratte-Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass eine Chimärenbildung zusammen mit dem Einsatz eines Anti-CD40L-Antikörpers zu einer dauerhaften Akzeptanz kardialer Transplantate führt (Murakami 2006). Ein Jahr später demonstrierte die Studie von Fischer-Lougheed et al., dass die Chimärenbildung die Anti-Gal-Antikörper-Produktion nach der Immunisierung von Rhesus-Makaken mit porcinen Zellen hemmt (Fischer-Lougheed 2007). Wie ist die Toleranzinduktion durch Chimärenbildung zu erklären? Zum einen entstehen durch den Chimärismus eine Donor-spezifische T- und B-Zell-Toleranz (Ohdan 2001, Sykes 2005) sowie eine NK-Zellen-Anergie (Kawahara 2007) und zum anderen sollen Veränderungen in der Genexpression des Transplantats ablaufen, die das Organ vor der Immunantwort schützen. Vor allem die Down-Regulierung der Expression des α -Gal-Epitops soll eine entscheidende Rolle spielen (Doki 2008).

Das Chimären-Modell stellt derzeit eines der Verfahren dar, von dem man sich in Zukunft Erfolge in der Xenotransplantation erhofft, auch wenn man zugeben muss, dass es zunächst schwer erscheint, einen dauerhaften Chimärismus zu erreichen (Sprangers 2008).

1.5.5. Strategien zur Down-Regulation der α -Gal-Epitope

Eine Strategie zur Down-Regulation des α -Gal-Epitops beinhaltet den Einsatz von Galaktosidasen. Die α -Galaktosidase (Luo 1999, Ezzelarab 2005), aber vor allem die Endo- β -Galaktosidase C (Kobayashi 2001, Miki 2004) zeigte in Studien ihr Potential, α -Gal-Epitope

zu eliminieren. Bei dem Einsatz von Endo- β -Galaktosidase C ist man bislang noch auf eine intravenöse Gabe angewiesen. Nach Beendigung der intravenösen Gabe kommt es innerhalb von 24 Stunden zu einem erneuten Auftreten von α -Gal-Epitopen (Kobayashi 2001). Nachdem es bereits gelungen ist, Endo- β -Galaktosidase C-transgene Mäuse zu züchten, bei denen die Expression des α -Gal-Epitops drastisch reduziert ist (Watanabe 2008), wird das neue Ziel sein, transgene Schweine zu züchten, die die Endo- β -Galaktosidase C exprimieren. Bei α -Galaktosidase-transgenen Mäusen war die α -Gal-Expression nicht so stark reduziert wie bei Endo- β -Galaktosidase C-transgenen Tieren. Die Identifikation einer neuen α -Galaktosidase-Subfamilie 2008, eröffnet aber auch neue Perspektiven auf dem Gebiet der α -Galaktosidasen (Liu 2008).

Andere Strategien basieren auf dem Wissen, dass Kohlenhydratsstrukturen wie das α -Gal-Epitop von Glykosyltransferasen synthetisiert werden (siehe 1.3.). Zur Down-Regulation bzw. zur Manipulation dieser Kohlenhydratstrukturen bieten sich daher als Angriffspunkt die Glykosyltransferasen an.

Zum einen versucht man die α 1,3-Galactosyltransferase durch die Überexpression anderer Glykosyltransferasen kompetitiv zu inhibieren und so die α -Gal-Expression zu reduzieren. Es wurden porcine, für verschiedene Glykosyltransferasen wie die β -D-mannoside β -1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III), die α 1,2-Fucosyltransferase (α 1,2FT), die α 2,3-Sialyltransferase (α 2,3ST) oder die α 2,6-Sialyltransferase (α 2,6ST) transgene Zellen hinsichtlich der α -Gal-Expression untersucht. Die Überexpression der Glykosyltransferasen führt zwar zu einer signifikanten Reduktion der α -Gal-Epitope (50-80%), allerdings konnte keine vollständige Unterdrückung der α -Gal-Epitope erreicht werden (Koma 2000).

Zum anderen ist die Deletion des α 1,3-Galactosyltransferase-Gens eine Möglichkeit das hauptverantwortliche Antigen bei der Xenotransplantatabstoßung zu beseitigen bzw. drastisch zu reduzieren. 2001 konnte erstmals eine Generation heterozygoter α 1,3GT-knockout-Schweine (Lai 2001) und 2002 eine Generation homozygoter α 1,3GT-knockout-Schweine geboren werden (Phelps 2003). Durch die Transplantation von Organen homozygoter Knockout-Schweine konnte die HAR verhindert werden (Kuwaki 2005). Außerdem waren die typischen Charakteristika einer AVR geringer ausgeprägt (Kuwaki 2005) und ein vergleichbares Transplantatüberleben wie bei der Transplantation von hDAF-transgenen Organen war mit einer geringeren immunsuppressiven Therapie erreicht worden (Zhu 2007). Allerdings kam es innerhalb von zwei bis sechs Monaten zum ischämischen Transplantatversagen durch das Auftreten einer thrombotischen Mikroangiopathie (Kuwaki 2005, Shimizu 2008) (siehe 1.4.4.).

2. Eingliederung der Arbeit in die Xenotransplantationsforschung

Obwohl es bereits gelungen ist, α -Gal-knockout-Schweine zu züchten, darf das Interesse weitere Methoden zur Verminderung der α -Gal-Expression zu erforschen nicht auf Eis gelegt werden. Bei homozygoten α -Gal-knockout Tieren sind zwar beide Allele für die α 1,3Glykosyltransferase ausgeknockt, dennoch exprimieren diese Tiere Restmengen an α -Gal-Epitopen (Sharma 2003). Es wird angenommen, dass diese α -Gal-Epitope von dem Enzym iGb3-Synthase synthetisiert werden und ausschließlich auf Glycolipiden zu finden sind (Keusch 2000, Taylor 2003, Milland 2005). Die von der iGb3-Synthase produzierten α -Gal-Epitope wirken ebenfalls immunogen (Sandrin 2007) und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese α -Gal-Epitope auf das Überleben von Xenotransplantaten Einfluss nehmen.

2.1. Ischämiezeiten bei Xenotransplantation: Erfahrungen im Perfusionsmodell

Die Idee zu dieser Studie entstand in Folge von Xenotransplantationsversuchen, die im Jahr 1996 im Institut für Chirurgische Forschung, LMU / Herzchirurgie Klinikum Großhadern, München durchgeführt worden waren.

Im Working Heart-Perfusionsmodell wurde der Einfluss unterschiedlicher Ischämiezeiten (IZ) auf die HAR untersucht, da man davon ausging, dass längere Ischämiezeiten die HAR zusätzlich triggern. Erstaunlicherweise zeigten die Ergebnisse, dass bei längerer IZ (4 h) im Vergleich zu einer geringen IZ (< 1 h) die HAR vermindert abzulaufen schien. Die Herzen mit vierstündiger IZ liefen genauso lange wie Herzen mit einstündiger bzw. vierstündiger IZ und jeweils zusätzlicher Immunadsorptionsbehandlung. Die Pumpfunktion bei 4 h IZ war eingeschränkt, jedoch war keine größere Ödembildung zu sehen. Das Herz-Zeit-Volumen und der Schlag-Arbeits-Index waren bei vierstündiger IZ ebenfalls eingeschränkt, während der spezifische Koronarfluss verbessert war. Die XNA waren durch die längere IZ mindestens so gut aus dem Plasma entfernt worden wie nach der Anwendung des Immunadsorptionsverfahrens. Außerdem fielen die IgM- und IgA-Spiegel wie bei den Herzen mit Immunadsorptionsbehandlung ab. Passend zu diesen Beobachtungen wurden in der histologischen Untersuchung keine Anzeichen für das Ablaufen einer HAR sowie keine Immunglobulinablagerungen gefunden (Brenner 2000 a, Brenner 2003).

2.2. Ziele der Arbeit

Die Ergebnisse der oben beschriebenen Versuche führten zu der Annahme, dass die Kalt-Ischämiezeit zu Veränderungen der Endothelzelloberfläche, vor allem zu Veränderungen der

α -Gal-Epitope führt. Diese Veränderungen können durch einen der beiden Faktoren ausgelöst werden, die während der Kalt-Ischämiezeit auf die α -Gal-Epitope einwirken: die Hypothermie von 4°C oder die Kardioplegielösungen.

In dieser Studie sollen im Rahmen von In-vitro-Analysen diese beiden Faktoren untersucht und folgende Fragen beantwortet werden:

1. Hat der Faktor Kälte einen Einfluss auf die α -Gal-Epitope auf porcinen Endothelzellen?
2. Wie verhält sich die Anzahl an α -Gal-Epitopen bei unterschiedlichen Kältezeiten (1 h, 4 h, 6h)?
3. Haben die Kardioplegielösungen, die während der Kalt-Ischämiezeit als zweiter Faktor neben der Kälte auf die Organtransplantate wirken, einen Einfluß auf die α -Gal-Epitope?

3. Material und Methoden

3.1. Entnahme und Transport der Schweineaorten

Die Schweineaorten wurden von der Metzgerei Mair in Stetten (Landkreis Dachau bei München) bezogen. Bei den Schweinen handelte es sich um Deutsche Landschweine. Um keimfreie Aorten zu erhalten, wurden die benötigten Aortensegmente während des Schlachtvorgangs entnommen. Nach Eröffnung der Abdominal- und Thoraxhöhle wurde das thorakale Organpaket aus dem Situs gehoben und für die Präparation vorbereitet. Unter sterilen Verhältnissen erfolgte die Entnahme eines circa zehn Zentimeter langen Segmentes der Aorta descendens, Pars thoracica aortae; die Aorta wurde hierzu direkt am Übergang zum Aortenbogen im Bereich des Isthmus aortae abgesetzt.



a)



b)

Abbildung 4: a) Thorakales Organpaket und b) Entnahme des Aortensegmentes

Anschließend wurden die Aortensegmente in sterile Glasgefäße gelegt, die mit isotoner Kochsalzlösung (NaCl 0,9%, Braun, Melsungen, Deutschland) gefüllt waren. Der isotonen Kochsalzlösung war zusätzlich, um einer Verkeimung vorzubeugen, ein Prozent Amphotericin B, Penicillin und Streptomycin (APS, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) beigemischt. Es wurde darauf geachtet, dass die Aortensegmente frei in der NaCl/APS-Lösung schwimmen konnten bzw. gänzlich von der Flüssigkeit bedeckt waren.

Zum Transport wurden die Gefäße in eine Styroporkiste gestellt, die mittels Deckel fest verschlossen werden konnte. Um das Risiko einer bakteriellen oder mykotischen Besiedlung möglichst gering zu halten, wurden die Aorten nicht bei Raumtemperatur, sondern gekühlt transportiert. Mit Hilfe von Coolpacks wurde die Innenraumtemperatur der Styroporbox auf 8°C gehalten.

Die Transportzeit bis in das Institut für Chirurgische Forschung (Walter-Brendel-Zentrum) betrug etwa 45 Minuten.

3.2. Gewinnung der porcinen Aortenendothelzellen

3.2.1. Medium L15 Leibovitz

Vor der Isolierung der Zellen musste ein geeignetes Medium ausgewählt werden. Wie aus der Literatur ersichtlich (Helgason 2005, Gloe 1999 oder Proulx 2007), verwenden viele Arbeitsgruppen als Wachstumsmedium für Endothelzellen das Medium DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium). Damit die Endothelzellen in dem Nährmedium DMEM gut wachsen, ist es notwendig, eine ideale Atmosphäre bereitzustellen: eine Temperatur von 37°C, eine adäquate Luftfeuchtigkeit und zusätzlich einen CO₂-Anteil in der Luft von 5 Prozent. Das heißt, es wäre notwendig gewesen CO₂ in den Brutschrank einzuleiten, um Luft mit konstant fünf prozentigem CO₂ zu erhalten. Im Rahmen dieser Studie wurde jedoch ein Teil der Zellkulturen über mehrere Stunden in eine Kühlbox gestellt (siehe 3.10.1 und 3.11.), in die es nicht möglich war CO₂ einzuleiten. Um identische Bedingungen für die Kulturen sowohl im Brutschrank als auch in der Kühlbox zu schaffen und den Kulturen auch in der CO₂ armen Atmosphäre gute Wachstums- und Nährstoffvoraussetzungen zu bieten, musste deshalb auf ein Medium ausgewichen werden, das ein Endothelzellwachstum ohne Einleitung von CO₂ ermöglichte. Ein Medium, das diese Voraussetzung erfüllt, ist das Medium L15 Leibovitz. Das Medium L15 Leibovitz wurde in den 60er Jahren für diesen Zweck entwickelt. Es erlaubt ein Zellwachstum bei freiem Gasaustausch mit der Atmosphäre und Zellwachstum in CO₂-freien Systemen. Im Medium L15 Leibovitz wirken freie basische Aminosäuren, vor allem L-Arginin, anstelle von Bikarbonat als Puffer. Außerdem ersetzen D-Galactose und Natriumpyruvat die Glucose, die man in anderen Medien findet. Diese Zusammensetzung hilft den physiologischen pH ohne Zusatz von CO₂ in der Luft zu kontrollieren (Leibovitz 1963).

Es wurde das Medium L15 Leibovitz der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) verwendet. Das Medium wurde in Pulverform geliefert, sodass das Flüssigmedium erst noch herzustellen war. Die Herstellung des Flüssigmediums erfolgte nach den Zubereitungsanweisungen des Herstellers Sigma-Aldrich. Das Medium wurde bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt und für maximal vier Wochen nach dem Ansetzen verwendet.

3.2.2. Isolierung der porcinen Aortenendothelzellen

Vor der dem eigentlichen Prozess der Zellisolierung wurden die Aortensegmente sorgfältig gespült. Dieser Vorgang war entscheidend, um einem späteren Pilzbefall und einer Verkeimung der Zellkulturen vorzubeugen. Als Spüllösung wurde NaCl (Braun, Melsungen, Deutschland) + 1% APS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) verwendet.

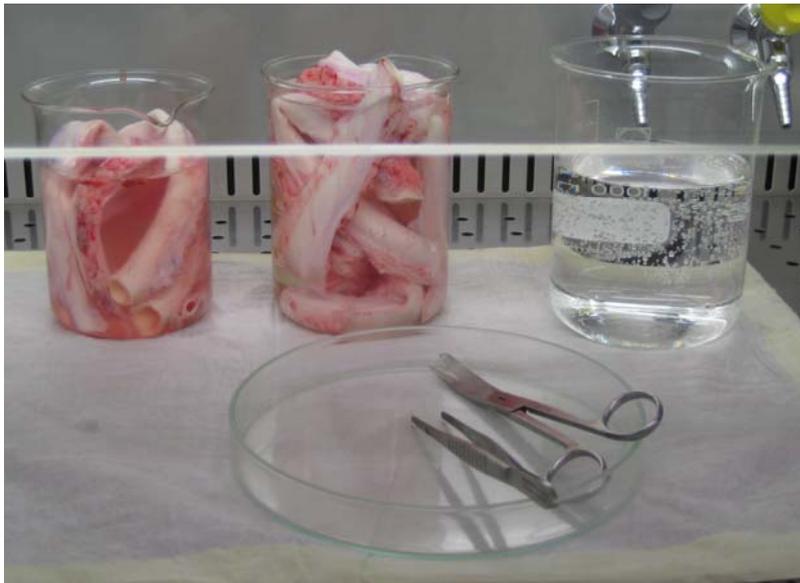


Abbildung 5: Sorgfältiges Spülen der Aorten in NaCl und APS

Im Anschluss an ein zweifaches Spülen wurden die Aorten mit Pinzette und Schere präpariert. Sowohl periaortales Bindegewebe als auch den Aorten anhaftende Lymphknoten wurden sorgfältig entfernt, bis die Tunica externa des Gefäßes freigelegt war. Bei der Präparation wurde darauf geachtet, dass die Aortenwand nicht verletzt wurde, damit eine Dichtigkeit der Aorta für den später zu erfolgenden enzymatischen Prozess gewährleistet war.

Nach vollendeter Präparation wurden die Aortensegmente in Längsrichtung auf der dorsalen Seite (Gefäßabgänge) eröffnet und erneut mit NaCl + 1% APS gespült. Daran anschließend wurden die Aorten mit nach oben gerichtetem Endothel in extra für diesen Zweck hergestellte Aluminiumblöcke eingespannt (siehe Abb. 6). Die Präparationsblöcke dienten als Rahmen, begrenzten die zu bearbeitende Endotheloberfläche und verhinderten das Auslaufen der Lösungen.



Abbildung 6: Zur Zelldissoziation wurden die Aortensegmente mit nach oben gerichtetem Endothel in Aluminiumblöcke eingespannt.

Zunächst wurde die Endothelfläche noch zweimal mit Hankscher Lösung (Apothek Innerstadt Universität München) + 4% APS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gespült. Zur Gewebedissoziation wurden zwei Milliliter Dispase (2,5 U/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) auf die Endothelfläche gegeben.

Im Anschluss wurden die Präparationsblöcke mit den eingespannten Aorten in Alufolie gewickelt und eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Nach dieser Stunde, in der das Enzym wirken und sich die Endothelzellen ablösen konnten, wurden die Zellen zur vollständigen Ablösung zusätzlich mechanisch gelöst. Dazu wurden zunächst 2 ml Medium L15 Leibovitz (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) auf die Endothelzelloberfläche aufgetragen und dann die Zellen mittels sterilem Gummispatel sehr vorsichtig abgeschabt. Die so aus enzymatischer und mechanischer Einwirkung erhaltene Zellsuspension wurde nun mit einer 5 ml-Pipette aufgenommen und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Um nur einen sehr geringen Zellverlust zu haben, wurden die Aortenendothelflächen nochmals mit 2 ml Medium L15 gespült und diese Suspension ebenfalls in das Falcon-Röhrchen überführt.

Abschließend wurden die Falcon-Röhrchen mit Medium L15 auf 10 ml aufgefüllt und die Röhrchen bei 1200 U und Raumtemperatur fünf Minuten (Zentrifuge: Heraeus Megafuge 1,0R) zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstands mit einer sterilen Pasteurpipette hatte man ein reines Zellpellet zur Verfügung.

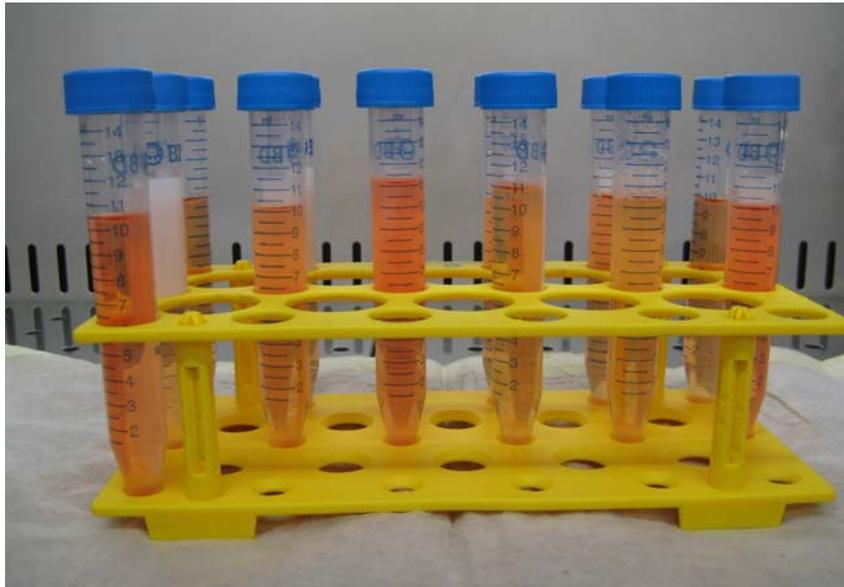


Abbildung 7: Nach der enzymatischen und mechanischen Zelldissoziation wurden die Endothelzellen mit Medium L15 Leibovitz aufgenommen und in Falcon-Röhrchen überführt.

3.3. Zellkulturen

3.3.1. Anlegen der Zellkulturen

Die porcinen Aortenendothelzellen wurden nach der Isolierung (siehe Punkt 3.2.) in Kultur genommen. Zu diesem Zweck wurden 10 ml Nährmedium mit einer sterilen 10 ml Pipette aufgenommen, das Nährmedium in das Falcon-Röhrchen mit dem frisch isolierten Zellpellet gegeben und Medium und Zellen mehrmals resuspendiert. Anschließend wurde das Gemisch aus Zellen und Nährmedium in eine Petrischale 100 x 20 mm pipettiert.

Die so erhaltenen Zellkulturen wurden in den Brutschrank gestellt und bei 37°C inkubiert. In den Brutschrank wurde kein CO₂ eingeleitet. Für die nötige Luftfeuchtigkeit sorgten zwei Edelstahlschalen gefüllt mit Aqua ad iniectabilia (Braun, Melsungen, Deutschland) auf dem Boden des Brutschranks. Aus Hygienegründen wurde das Wasser nicht direkt auf dem Boden des Brutschranks verteilt, sondern in die Schalen gegeben.

Als Nährmedium wurde Medium L15 Leibovitz (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) + 10% FCS (Fetales Kälberserum, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) + 1% APS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) verwendet.

Dem Medium wurde FCS zugegeben, da es eine Vielzahl an Proteinen, Aminosäuren, Spurenelementen und Hormonen enthält, die für das Kultivieren der Zellen und eine optimales Wachstum der Zellen notwendig sind.

Der Zusatz von 1% APS schützte die Zellkulturen vor Verkeimung. Amphotericin B, ein Antimykotikum vom Typ der Polyene, bindet an Sterole und stört die Membranstruktur der

Pilze. Die Wirkung von Amphotericin B ist gegen Pilze und Hefen gerichtet. Penicillin als Inhibitor der bakteriellen Zellwandsynthese und Streptomycin, ein Aminoglykosid, das die prokaryote Proteinsynthese hemmt, verhindern die Besiedlung der Zellkulturen mit Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien.

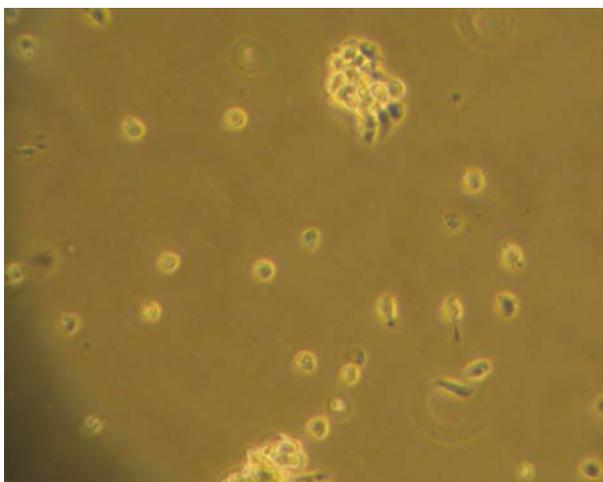


Abbildung 8: Zellkultur

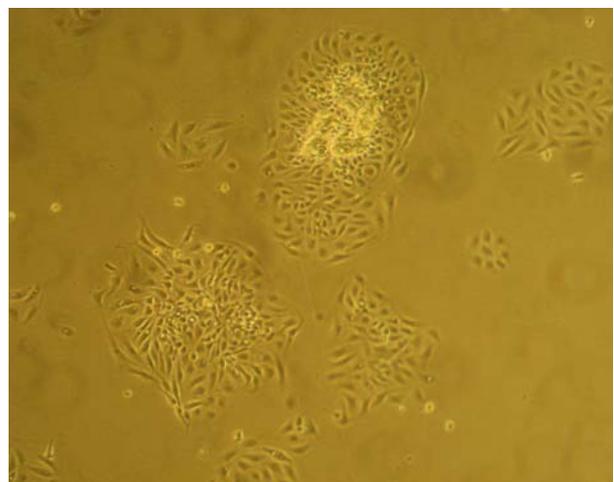
3.3.2. Pflege der Zellkulturen

Die Zellkulturen wurden täglich mikroskopisch begutachtet, gewaschen und mit neuen Nährstoffen versorgt.

Zunächst wurden die Kulturen unter dem Mikroskop kontrolliert, um zum einen eine Kontaminierung der Kulturen mit Pilzen und Bakterien frühzeitig zu erkennen und zum anderen die Vitalität der Zellen zu beurteilen und das Wachstum der Endothelzellen zu verfolgen.



a)



b)

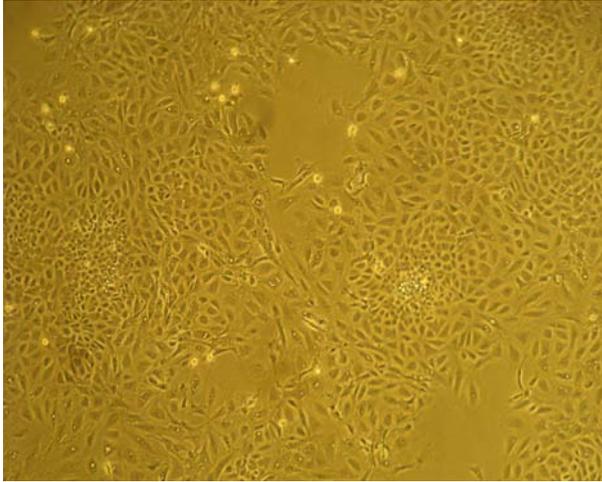


Abbildung 9: Primärkulturen Dispase a) am Tag 2, b) am Tag 4 und c) am Tag 6 nach Isolierung der porcinen Aortenendothelzellen.

c)

Anschließend wurde das alte Medium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen mit Hankscher Lösung (Apothekes Innenstadt Universität München) + 1 % APS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gespült. Nach kurzem Schwenken der Zellen in der Spülflüssigkeit wurde diese wieder abgesaugt. Dieser Spülvorgang ist möglich, weil sich Endothelzellen nach zwei bis vier Stunden in Kultur an den Boden der Petrischale anheften und so nur Keime, Zelltrümmer etc. ausgewaschen werden, die Zellen aber in der Petrischale zurückbleiben. Der Waschvorgang spielt vor allem in den ersten drei bis vier Tagen nach Isolierung der Zellen und Anlegen der Kulturen eine besonders wichtige Rolle, da gerade in diesem Zeitraum die Gefahr einer Verkeimung, vor allem einer mykotischen Besiedlung, sehr groß ist.

Direkt nach dem Entfernen der Waschlösung wurde wieder frisches Medium L15 Leibovitz + 10 % FCS + 1 % APS in die Petrischalen gegeben. Durch das tägliche Wechseln des Mediums wurden die Zellen regelmäßig mit neuen Nährstoffen versorgt und so ideale Wachstumsbedingungen geschaffen.

Hierbei sei erwähnt, dass alle Arbeiten mit den Zellkulturen, wie zum Beispiel das Waschen der Zellen und der Mediumwechsel, eine potentielle Kontaminationsquelle darstellen. Um eine Verunreinigung der Kulturen mit Bakterien oder Pilzen zu vermeiden, wurde auf strenge Hygienemaßnahmen geachtet. Grundsätzlich wurden bei Tätigkeiten mit den Zellkulturen immer keimfreie Einmalhandschuhe getragen, die Arbeitsflächen gründlich desinfiziert und sämtliche Arbeiten nur unter der Sterilbank durchgeführt. Jegliches Material, das in Kontakt mit den Zellen kam, war steril. Diese Hygienevorkehrungen hatten aber nicht nur den Sinn, einer Verkeimung und Verpilzung der Zellkulturen und einem daraus resultierenden Verlust

der Zellen vorzubeugen, sondern sollten auch die Kontamination der Kulturen mit Endotoxinen verhindern. Endotoxine können in die normale Zellproliferation und in das Zellwachstum eingreifen und zur Endothelzellaktivierung führen (Helgason 2005).

3.4. Vitalitätsnachweis

Zur Bestimmung der Zellvitalität, das heißt zur Bestimmung wie viele Zellen einer Zellkultur leben, wurde der Trypan-Blau-Ausschluss-Test herangezogen. Der Test basiert darauf, dass lebende Zellen eine intakte Zellmembran besitzen, die ein Eindringen von bestimmten Farbstoffen in die Zelle verhindert, während bei toten Zellen die Zellmembran diese Funktion nicht mehr erfüllt (Strober 2001). Bei diesem einfachen Test verwendet man Trypan Blau als Farbstoff, um die avitalen von den vitalen Zellen abzugrenzen.

Nach dem Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturschale mittels Accutase (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) wurden die Zellen mit 3 ml PBS minus (Apotheke Innenstadt Universität München) aufgenommen und in ein Polypropylenröhrchen gefüllt. Anschließend wurden 50 µl der Zellsuspension entnommen und auf einen Objektträger gegeben. Nun wurden die 50 µl Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit einer Trypan-Blau-Lösung vermischt und der Objektträger mit einem Deckplättchen abgedeckt. Es folgte die Auszählung von insgesamt hundert Zellen unter dem Mikroskop. Die vitalen Zellen waren durch ein klares Zytoplasma gekennzeichnet, während die avitalen Zellen Farbstoff aufnahmen und daher blau erschienen. Anhand der ausgezählten Zellen konnte die Vitalität bestimmt werden. Waren zum Beispiel unter den hundert Zellen fünf tote Zellen, konnte die Vitalität mit 95 % angegeben werden. Die Bestimmung der Vitalität erfolgte bei allen Zellkulturen der Versuchs- und Kontrollgruppen.

3.5. Endothelzellnachweis

Neben dem Nachweis einer hohen Vitalität musste gezeigt werden, dass es sich bei den für die Versuche verwendeten Zellen auch tatsächlich um Endothelzellen handelt.

Generell können zur Charakterisierung von Endothelzellen die Morphologie der Zellen und charakteristische Endothelzellmarker wie von Willebrand Faktor, CD31, CD34, vascular endothelial cadherin (VE-Cadherin) sowie vascular endothelial growth factor (VEGF) Rezeptoren 1 und 2 herangezogen werden. Auch der Nachweis einer starken Aufnahme von acetyliertem LDL in die Zellen kann zur Identifikation von kultivierten Endothelzellen angewendet werden (Helgason 2005).

In dieser Arbeit stützte man sich zur Charakterisierung der Endothelzellen zum einen auf die Zellmorphologie und zum anderen wies man den Endothelzellmarker CD31 mittels Durchflusszytometrie nach.

3.5.1. Morphologie

In vivo kleidet ein Monolayer aus Endothelzellen das Lumen der Blutgefäße aus. Auch in vitro wachsen Endothelzellen als Monolayer, der, sobald die Zellen vollständig konfluieren, charakteristischerweise ein Kopfsteinpflaster („cobblestone“) ähnliches Muster aufweist (Helgason 2005).

Die Zellkulturen wurden regelmäßig unter dem Mikroskop begutachtet, um die Zellmorphologie sowie das Konfluieren der Zellen zum „Kopfsteinpflasterrasen“ zu kontrollieren.

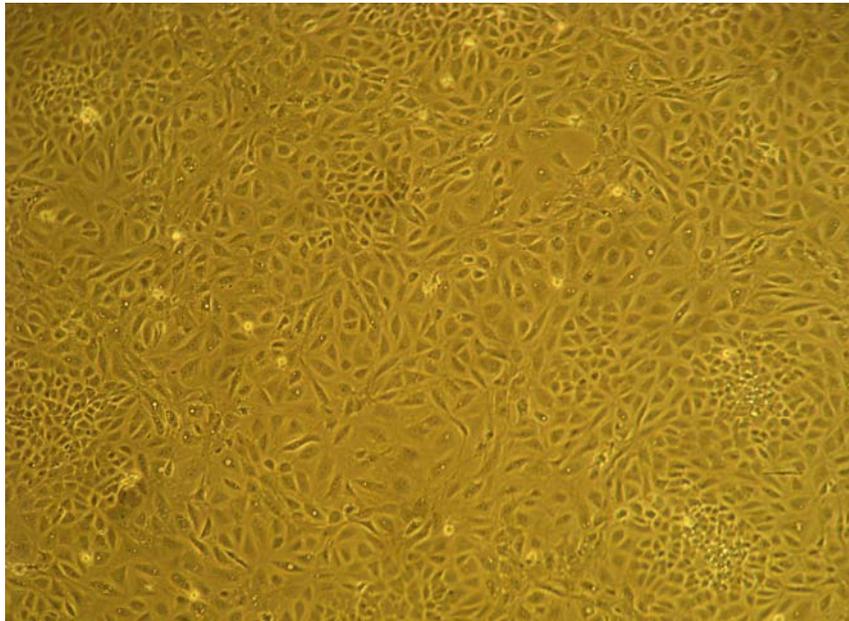


Abbildung 10: Monolayer aus Endothelzellen

3.5.2. CD31-Nachweis

CD31, auch bekannt als platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1), ist ein 130 kDa schweres transmembranöses Glycoprotein vom Typ I (Newman 2003). Es wird der Immunglobulingruppe der Zelladhäsionsmoleküle zugeordnet (Ilan 2003). CD31 ist ein Molekül, das wie in den letzten Jahren vermehrt erkannt wurde, vielseitige Aufgaben hat. Vor allem spielt CD31 eine wichtige Rolle in der Leukozyten-Endothelzell-Adhäsion und der Leukozyten-Transmigration (Goodman 2008). Außerdem übernimmt CD31 Aufgaben in der Organisation des Zytoskeletts, in der Regulation der Cateninverteilung und der Transkription sowie Aufgaben in der Kontrolle apoptotischer Ereignisse (Ilan 2003). Auch kommt dem

Molekül eine zentrale Rolle als Modulator des hämostatischen Systems zu, da es die Expression von tissue factor (TF) reguliert und somit die Thrombozytenfunktion und die Thrombenbildung verhindert (Zhang 2007).

Das CD31-Molekül wird nur auf Zellen des vaskulären Systems exprimiert. Es ist auf der Oberfläche von Thrombozyten, Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen zu finden (Ilan 2003, Newman 2003). CD31 ist auf den Endothelzellen an den Zell-zu-Zell-Grenzen sowie auf den dem Gefäßlumen zugewandten Arealen lokalisiert. CD31 wird von allen Endothelzellen in hohem Maße exprimiert und ist daher ein gerne verwendeter Endothelzellmarker (Ilan 2003).

Der CD31-Nachweis wurde in dieser Arbeit mittels Durchflusszytometrie geführt (siehe 3.6.). Der Endothelzellnachweis mittels Anti-CD31-Antikörper wurde gleichzeitig mit dem α -Gal-Nachweis bei allen Zellkulturen der Versuchs- und Kontrollgruppe durchgeführt, um die Sicherheit zu haben, dass es sich bei den untersuchten Zellen auch tatsächlich um Endothelzellen handelt.

3.6. FACS

3.6.1. Anti-CD31-Antikörper für den Endothelzellnachweis

Für den CD31-Nachweis wurde der Anti-CD31-Antikörper der Firma Serotec (Oxford, UK) herangezogen: **MCA 1746PE Mouse Anti-Pig CD31: RPE** (Clone: LCI-4; Isotype: IgG₁). Dieser Antikörper ist ein monoklonaler PE-Antikörper, der sich für durchflusszytometrische Untersuchungen eignet. Er ist gegen porcine CD31-Moleküle gerichtet. (Technical Data Sheet, Serotec).

Der PE- Antikörper wurde unverdünnt bei 4°C im Dunkeln gelagert.

3.6.2. BS-I Isolectin B4 für den Nachweis der α -Gal-Epitope

Die α -Gal-Epitope auf den porcinen Aortenendothelzellen wurden mit **FITC-konjugiertem BS-I Isolectin B4** der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) nachgewiesen. Lectine sind Proteine oder Glycoproteine, die Zellen agglutinieren und/oder Kohlenhydrate präzipitieren können. Das BS-I Isolectin B4 stammt von der Pflanze *Bandeiraea (Griffonia) simplicifolia*, die in Westafrika und Zentralafrika heimisch ist. BS-I Isolectin B4 weist eine Spezifität für α -Gal-Epitope auf und bindet nicht an β -galactosylierte Liganden (Wood 1979, Kirkeby 2001). BS-I Isolectin B4 eignet sich daher zur Untersuchung der Expression der xenoreaktiven α -Gal-Antigene. Der α -Gal-Nachweis mit BS-I Isolectin B4 wurde dem mit Antikörpern vorgezogen, da man zum einen in den Vorversuchen schlechte Erfahrungen mit der

Verwendung von Antikörpern gemacht hatte (siehe 3.7.2.) und zum anderen, wie aus der Literatur ersichtlich, die meisten Arbeitsgruppen sowohl bei der Durchflusszytometrie wie auch bei histologischen Färbungen auf das Isolectin zurückgreifen.

Vor der Versuchsdurchführung musste zunächst die Sättigungsdosis von BS-I Isolectin B4 gefunden werden, um die Ergebnisse aus der Versuchs- und der Kontrollgruppe auch miteinander vergleichen zu können. Es wurde eine Konzentrationsreihe von BS-I Isolectin B4 für Dispase-Primärkulturen vom Tag 6 erstellt. Die Sättigungsdosis lag bei 50 μl / 100 000 Zellen. Diese Menge wurde für die Hauptversuche übernommen.

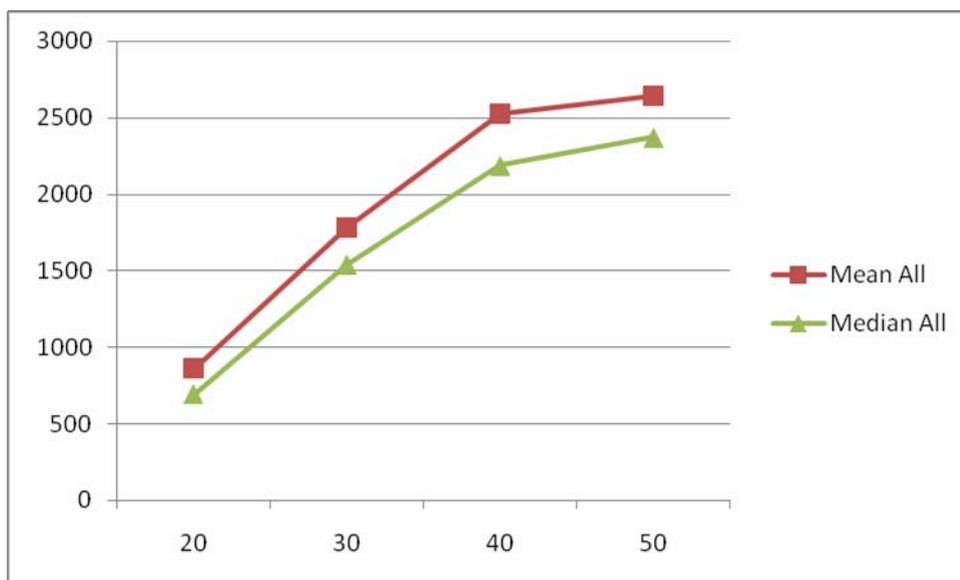


Abbildung 11: Sättigungskurve für BS-I Isolectin B4 bei einer Konzentration von 100 000 Zellen / 200 μl PBS.
x-Achse: Menge an BS-I Isolectin B4 in μl ; *y*-Achse: Mean bzw. Median in der FACS-Analyse

3.6.3. Vorbereitung der Zellen für die FACS-Analyse

Bevor die eigentliche Messung durchgeführt werden konnte, mussten die Endothelzellen erst für die Durchflusszytometrie vorbereitet und gefärbt werden.

Wie bereits in Punkt 3.3.2. erwähnt, liegt bei kultivierten Zellen die Situation vor, dass die Zellen nach wenigen Stunden in Kultur auf dem Boden der Kulturschalen anhaften. Um die Zellen nun mit dem BS-I Isolectin B4 inkubieren und eine FACS-Messung durchführen zu können, mussten die Zellen vom Boden der Kulturschale gelöst und eine Zellsuspension hergestellt werden, in der die Zellen als Einzelzellen vorliegen und keine Zellklumpen bilden. Dazu wurde zunächst das Medium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen mit 1 ml PBS minus (Apotheke Innenstadt Universität München) gespült. Das Schwenken der Zellen in dieser Pufferlösung führte zur Kugelbildung der Zellen und erleichterte den

nachfolgenden Ablöseprozess. Anschließend wurde die Lösung wieder entfernt und 1 ml Accutase (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) auf die Zellen gegeben.

Um die Zellen vom Boden der Petrischalen abzulösen, gibt es grundsätzlich drei Möglichkeiten: die mechanische Ablösung mittels Gummispatel, die Ablösung mittels Enzymen (Trypsin oder Accutase) oder die nicht-enzymatische Ablösung mittels einem EDTA-Puffer. Die rein mechanische Ablösung wurde abgelehnt, da dieses Verfahren häufig mit einer Zerstörung der Zellen und damit verbunden mit einer erhöhten Zelltod-Rate einhergeht. Die Bestimmung der Zellvitalität wäre aufgrund der Verfälschung nicht mehr möglich gewesen. Die Verwendung des Enzyms Trypsin für den Ablösungsprozess zur Vorbereitung der Zellen aufs FACS wurde ebenfalls abgelehnt, da bekannt ist, dass Trypsin zu Veränderungen der Zelloberfläche führt. Das Enzym Accutase, das sowohl proteolytische als auch kollagenolytische Aktivitäten aufweist, wurde bevorzugt. Accutase hat gegenüber Trypsin den Vorteil, dass es die Zellen wesentlich schonender von Zellkulturoberflächen ablöst und so Zellmatrixproteine intakt bleiben. Ein weiterer Vorteil von Accutase ist, dass auf eine Neutralisation des Enzyms verzichtet werden kann, da es automatisch zur Autodigestion des Enzyms kommt. Die Ablösung mit Accutase wurde der Ablösung mit einem EDTA-Puffer gegenübergestellt. Dazu wurden in den Vorversuchen zum einen Zellen mit Accutase und zum anderen Zellen mit einem selbst hergestellten nicht-enzymatischen Ablösepuffer (2 mM EDTA, 135 mM KCl, 15mM NaCitrat) abgelöst und hinsichtlich α -Gal-Expression miteinander verglichen. Die Verwendung des auf EDTA basierenden Puffers gilt generell als sehr schonendes Verfahren zur Zellablösung. Die Zellen, die mit dem Enzym Accutase behandelt worden sind, wiesen in unseren Versuchen allerdings erstaunlicherweise eine sehr viel höhere Anzahl an α -Gal-Epitopen auf, als die Zellen, die mit dem EDTA-Puffer abgelöst worden sind (siehe Abb. 12). Diese Ergebnisse zeigten, dass sich für diese Studie die Zellablösung mit Accutase am besten eignet. Daher wurde die enzymatische Ablösung mit Accutase für die Hauptversuche ausgewählt.

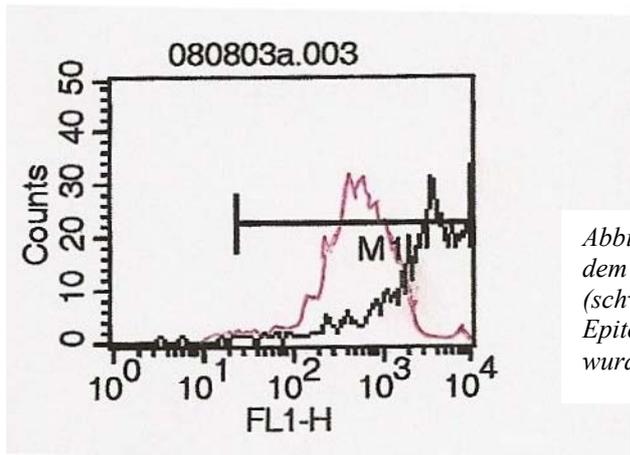


Abbildung 12: Die porcinen Aortenendothelzellen, die mit dem Enzym Accutase von der Kulturschale gelöst wurden (schwarz), wiesen eine sehr viel höhere Anzahl an α -Gal-Epitopen auf, als Zellen, die mit dem EDTA-Puffer gelöst wurden (rot).

Zur besseren Wirkung des Enzyms und zur schnelleren Ablösung der Zellen von der Zellkulturoberfläche wurde die Kulturschale nach dem Auftragen von Accutase wieder in den Brutschrank bei 37°C gestellt. Regelmäßig erfolgte die Kontrolle des Ablösungsprozesses unter dem Mikroskop. Um einer zu langen Einwirkzeit des Enzyms vorzubeugen wurde der enzymatische Ablösungsprozess auf maximal zehn Minuten beschränkt. Die Zellen, die sich in dieser Zeit noch nicht vom Boden der Kulturschale gelöst hatten, wurden nun mechanisch mit einem Zellspatel vorsichtig abgeschabt. Nach der vollständigen Ablösung der Zellen wurden diese mit 3 ml PBS minus aufgenommen und die Zellsuspension in ein 5 ml FACS-Röhrchen überführt.

Die FACS-Röhrchen mit der Zellsuspension wurden nun bei 1500 U und Raumtemperatur vier Minuten zentrifugiert (Zentrifuge: Hettich Universal 30RF), um ein reines Zellpellet zu erhalten und die Accutase auszuwaschen. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgegossen und die Zellen in 1 ml PBS minus resuspendiert. Es folgte die Bestimmung der Zellkonzentration mittels Coulter (Beckman Coulter, Coulter ACT 8, Fullerton, USA), sowie die Verdünnung der Zellsuspension auf $0,5 \times 10^6$ Zellen / ml.

Aus jeder Zellkultur wurden zwei Auswertungen gemacht, um von einer Kultur zwei Ergebnisse zu haben, die dann gemittelt werden konnten.

Für jede Auswertung mussten zwei Messungen durchgeführt werden: eine Messung zur Bestimmung der Autofluoreszenz der Zellen und eine Messung für den α -Gal-Nachweis. Die Autofluoreszenz ist das Fluoreszenzlicht, das die Zellen aufgrund ihrer eigenen Zusammensetzung emittieren. Die Bestimmung der Autofluoreszenz der Zellen galt als negative Kontrolle (siehe 3.6.5.). Zudem wurde eine Messung zum Nachweis der CD31-Expression durchgeführt.

Es wurden demnach pro Kultur fünf 5 ml FACS-Röhrchen (PP-Tube 5ml, Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich) vorbereitet und je 200 μ l der Zellsuspension (= 100 000 Zellen / FACS-Röhrchen) in die Röhrchen gegeben. Anschließend wurden je 50 μ l BS-I Isolectin B4 in die FACS-Röhrchen pipettiert, das als Messröhrchen für den α -Gal-Nachweis diente, und BS-I Isolectin B4 und Zellen gut resuspendiert. Außerdem wurden 20 μ l des Anti-CD31-Antikörpers in das Messröhrchen pipettiert, das für den CD31-Nachweis gedacht war. Die Zellen wurden nun eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln zur Färbung inkubiert.

Nach der einstündigen Inkubationszeit wurden das BS-I Isolectin B4 und der Anti-CD31-Antikörper mit PBS minus ausgewaschen.

Nun war der Vorbereitungsprozess abgeschlossen, die Zellen mit den fluoreszierenden Farbstoffen markiert und die Messung konnte durchgeführt werden.

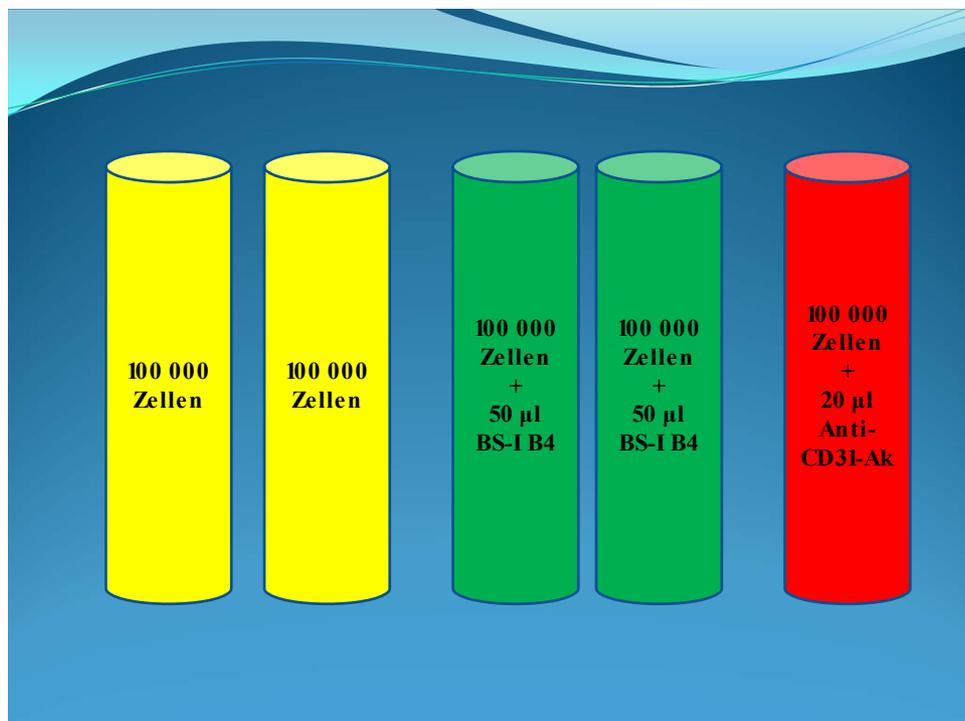


Abbildung 13: Färbung der porcinen Aortenendothelzellen für FACS mit FITC-konjugiertem BS-I Isolectin B4 und PE-konjugiertem Anti-CD31-Antikörper.

Wie oben beschrieben, wurden die Zellen zur Färbung eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Punkt weicht von den gängigen Protokollen zur Färbung der Zellen für die FACS-Analyse ab, bei denen die Zellen auf Eis bzw. bei 4°C im Kühlschrank inkubiert werden, um optimale Bedingungen für die Antigen-Isolectin-Bindung zu schaffen. Die Inkubation bei 4°C sollte vermieden werden, um etwaige zusätzliche Kälteeinflüsse auf die α -Gal-Epitope zu vermeiden. Vorversuche, bei denen ein Teil der Zellen aus einer Kultur mit

BS-I Isolectin B4 auf Eis und der andere Teil bei Raumtemperatur inkubiert wurden, zeigten, dass die Antigen-Isolectin-Bindung auch bei Raumtemperatur uneingeschränkt abläuft. Die Zellen, die mit dem Isolectin auf Eis inkubiert wurden, wiesen in diesen Versuchen sogar eine im Vergleich verminderte Anzahl von α -Gal-Epitopen auf (siehe Abb. 14). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die BS-I Isolectin B4 – Färbung bei Raumtemperatur durchgeführt und so Verfälschungen der Ergebnisse durch die einstündige Kühlung ausgeschlossen.

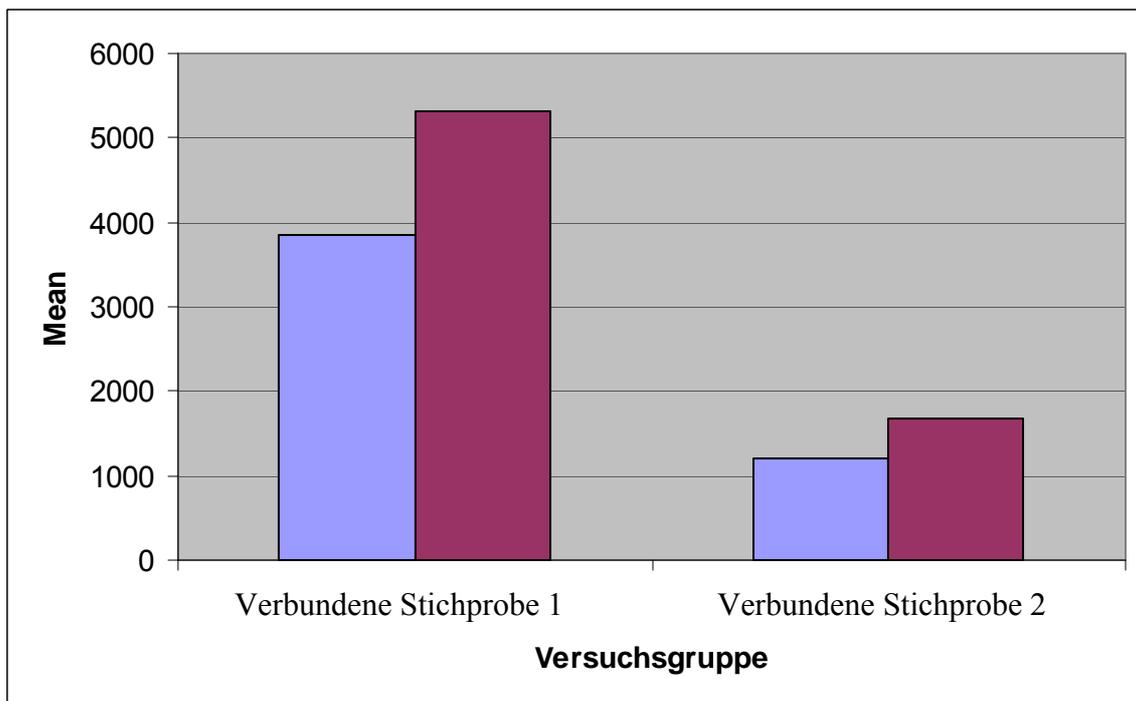


Abbildung 14: Ein Teil der Zellen aus einer Kultur wurden zur Färbung mit BS-I Isolectin B4 eine Stunde auf Eis gestellt und der andere Teil der Zellen dieser Kultur wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es gibt keine Hinweise, dass die Antigen-Antikörper-Bindung bei Raumtemperatur vermindert abläuft. Vielmehr zeigten die Zellen, die bei Raumtemperatur gefärbt wurden (rot) eine höhere Anzahl von α -Gal-Epitopen als die Zellen, die zur Färbung auf Eis gestellt wurden (blau).

3.6.4. Messung

Der CD31-Nachweis wie auch der α -Gal-Nachweis wurden mittels FACS (Fluorescence activated cell sorting) ermittelt. FACS (geschützter Handelsname der Firma Becton Dickinson) bzw. das Verfahren, das allgemein als Durchflusszytometrie bezeichnet wird, ermöglicht physikalische und molekulare Zelleigenschaften zu messen. Voraussetzung zur Messung mit einem Durchflusszytometer ist das Vorliegen der Probe als Einzelzellsuspension. Das Verfahren basiert darauf, dass die Zellen bei der Passage eines Laserstrahls optische Signale emittieren, die von Detektoren empfangen und über elektronische Schaltungen gemessen und quantifiziert werden. Die Zellen emittieren zum einen Streulichtsignale und zum anderen, falls sie zuvor mit einem Antikörper gefärbt

wurden, Fluoreszenzsignale. Bei den Streulichtsignalen werden zwei Formen unterschieden. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = forward scatter), das parallel zum einfallenden Laserstrahl gestreut wird, ist ein Maß für die Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = side scatter) wird im rechten Winkel zum Laserstrahl emittiert und ist ein Maß für die Granularität der Zelle. Durch Inkubation der Zellen mit Antikörpern, an die fluoreszierende Farbstoffe gebunden sind, können außerdem Oberflächenmerkmale untersucht werden. Die Zellen strahlen hierbei, wie bereits oben erwähnt, Fluoreszenzimpulse ab. Dabei gilt, dass die Emissionssignale proportional der Menge der auf dem Partikel gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe sind oder anders ausgedrückt, dass die Farbstoffmenge proportional der Anzahl der Antigen-Antikörper-Bindungsstellen ist. Für die Fluoreszenzmarkierung geeignet sind Farbstoffe, die von einer Wellenlänge von 488 nm angeregt werden können. Mögliche Fluoreszenzfarbstoffe zur Färbung sind Fluorescein-isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Fluorescein-diacetat (FDA), Propidiumiodid (PI) oder Acridinorange (AO). Es können verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig eingesetzt werden, wenn die Farbstoffe unterschiedliche Emissionsspektren aufweisen. Die Informationen, die über Vorwärtsstreulicht, Seitwärtsstreulicht und Fluoreszenzsignale geliefert werden, machen eine genaue Charakterisierung der Zellen und eine genaue Beschreibung der Zelleigenschaften möglich. Einziger Nachteil dieser Methode zur Analyse von Zellen ist, dass ausschließlich relative Werte geliefert werden und keine Aussage über absolute Werte getroffen werden kann (Raffael 1988).

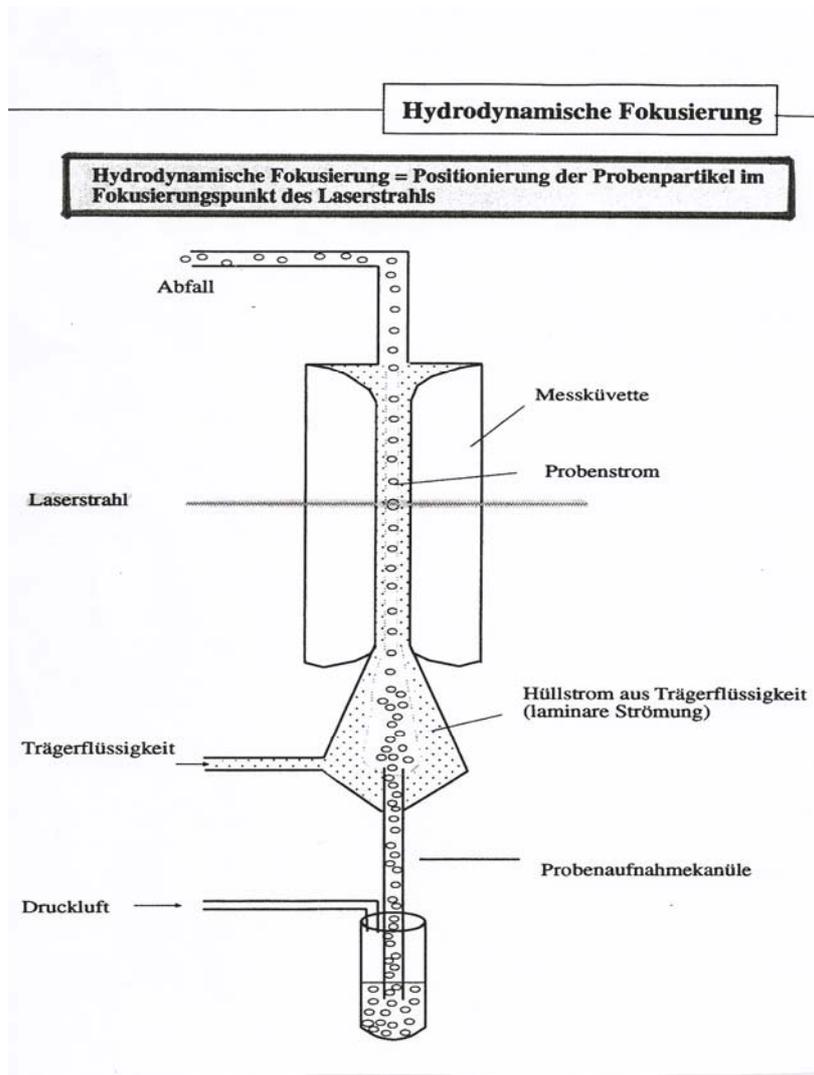


Abbildung 15: Schematischer Aufbau FACS (Becton Dickinson)

Durch Überdruck wird die Zellsuspension aus dem Probenröhrchen in eine Messkammer geleitet, wobei die Zellen durch eine Trägerflüssigkeit beschleunigt und von einer laminaren Strömung umgeben werden. Zur Analyse werden die Zellen durch hydrodynamische Fokussierung aneinandergereiht und einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Die Zellen geben bei der Passage des Laserstrahls Streulichtsignale ab, die Aussagen zu Zellgröße und intrazellulärer Granularität zulassen. Außerdem kommt es durch den Laserstrahl zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes, wodurch dieser zunächst auf ein höheres Energieniveau gehoben wird und dann unter Abgabe von Photonen wieder auf sein ursprüngliches Energieniveau zurückfällt. Die emittierte Photonenkonzentration wird durch einen Photodetektor registriert und verhält sich proportional zur Menge an Antigen-Antikörper-Bindungen pro Zelle.

In dieser Studie wurde ein FACSsort der Firma Becton Dickinson (Franklin Lake, USA) mit einem Argon-Laser benutzt. Als Trägerflüssigkeit wurde das FACSFlow von Becton Dickinson (Franklin Lake, USA) verwendet. Die Fluoreszenzanregung erfolgte bei 488 nm.

Die rote Fluoreszenz (FL2) des PE-Antikörpers zum CD31-Nachweis wurde bei 421 nm gemessen. Die Detektoreinstellung für die grüne Fluoreszenz (FL1) zum α -Gal-Nachweis betrug bei den gesamten Vorversuchen (siehe 3.7.2. und 3.7.3.) 371 nm. Für die Hauptversuche wurde die Detektoreinstellung für FL1 für eine bessere optische Anschaulichkeit auf 340 nm verändert. Die Fluoreszenz wurde logarithmisch verstärkt. Bei einer Messung wurden 5000 Zellen gezählt. Die Messergebnisse wurden in einem Aquisition Dot-Plot und je einem Aquisition Histogram-Plot für FL1 und FL2 aufgezeichnet. Als Software-Programm hierfür wurde Cellquest alias benutzt.

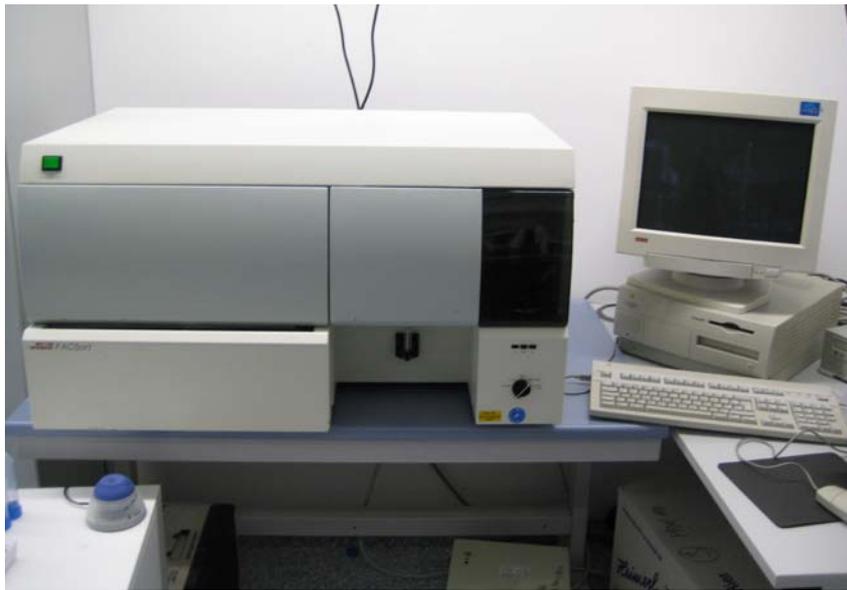


Abbildung 16: Das FACSsort der Firma Becton Dickinson am Institut für Chirurgische Forschung

3.6.5. Auswertung

Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit Cellquest alias, demselben Programm mit dem bereits die Messungen aufgezeichnet worden waren.

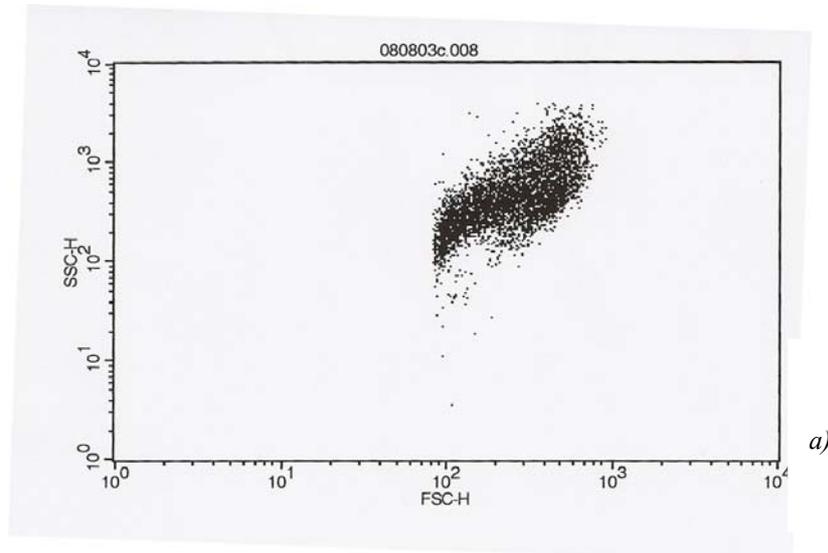
Zur Auswertung wurde als erstes eine Zweiparameterdarstellung erstellt. Bei der Zweiparameterdarstellung werden zwei Parameter miteinander korreliert und deren Intensitätsachsen gegeneinander aufgetragen. In das so entstandene Diagramm wird jeweils dort ein Punkt eingetragen, wo sich die Intensitätswerte schneiden. Ein Punkt entspricht dabei einer Zelle. Diese Art der Darstellung wird auch als Punktplot oder Dot-Plot bezeichnet. Für unsere Auswertung wurde ein Dot-Plot erstellt, bei dem auf der x-Achse das Vorwärtsstreulicht (Größe der Zelle) und auf der y-Achse das Seitwärtsstreulicht (Granularität) aufgetragen waren (siehe Abbildung 17a).

Es wurden alle gemessenen Zellen in die Auswertung einbezogen. Auf das Gating von Zellen wurde verzichtet.

Als Nächstes wurde je ein Histogramm-Plot für die Fluoreszenzanalysen FL1 und FL2 erstellt. Bei dem Histogramm-Plot handelt es sich um eine Einparameterdarstellung, bei der auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität und auf der y-Achse die Anzahl der Zellen dargestellt ist.

Wie bereits in Punkt 3.6.4. erläutert, wurden für jede Probe zwei Messungen durchgeführt. Nun wurde zunächst die negative Kontrolle zur Bestimmung der Autofluoreszenz im Histogramm-Plot aufgerufen und ein Marker gesetzt. Der Marker gab die höchste Fluoreszenzintensität an, die der Autofluoreszenz zugerechnet werden konnte. Jede Zelle mit einer höheren Fluoreszenzintensität wurde demnach als positiv betrachtet (siehe Abbildung 17b).

Anschließend wurde der Marker in die eigentliche Messung übernommen und ermöglichte so die prozentuelle Angabe der α -Gal- bzw. CD31-positiven und negativen Zellen (siehe Abbildung 17c). Neben der Anzahl der α -Gal-positiven und negativen Zellen wurde der Mean (= durchschnittliche Fluoreszenzintensität einer Zelle) der Zellen zur Auswertung herangezogen.



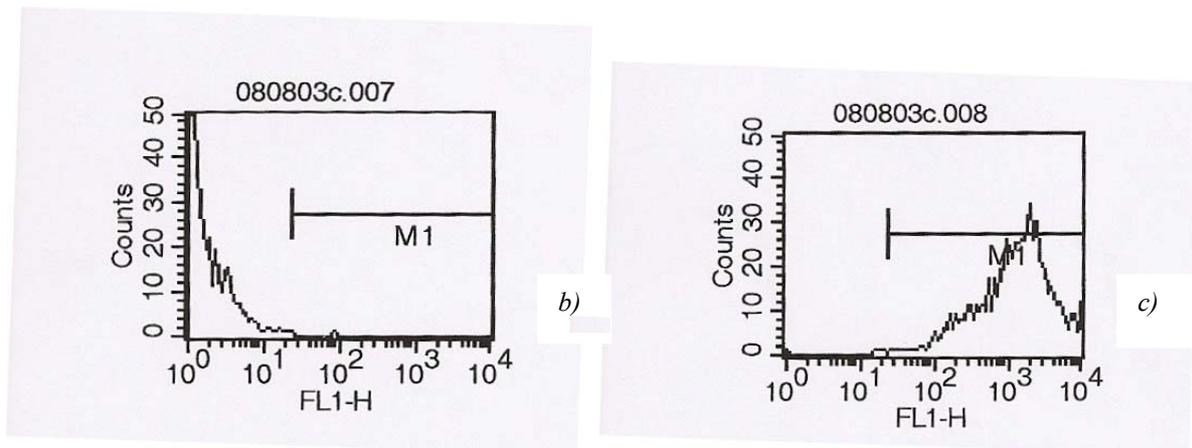


Abbildung 17: a) Dot-Plot zur Darstellung der Größe und der Granularität der Zellen; b) Histogramm-Plot – negative Kontrolle zur Bestimmung der Autofluoreszenz; c) Histogramm-Plot – eigentliche Messung: der Marker M1 wird von der Kontrollmessung in die eigentliche Messung übertragen.

3.7. Auswahl geeigneter porciner Aortenendothelzellen für die Versuche

Bevor die Hauptversuche realisiert werden konnten, mussten erst porcine Aortenendothelzellen gefunden werden, die sich hierfür eignen:

1. Es war zunächst die Aufgabe, PAEC zu züchten, die in einem solchen Maße α -Gal-Epitope exprimierten, dass ein möglicher temperaturabhängiger Effekt in den Versuchen auch signifikant nachweisbar war.
2. Außerdem mussten die zu untersuchenden Zellen eine hohe Vitalität aufweisen und aus reinen Endothelzellpopulationen stammen.
3. Die PAEC sollten zudem den Zellen in-vivo sehr ähnlich sein, um die Ergebnisse der Studie auf physiologische Bedingungen transferieren zu können.

Hierfür wurden Vorversuche durchgeführt, in denen porcine Aortenendothelzellen unterschiedlicher Behandlung und Passage miteinander verglichen wurden. Es wurden frisch isolierte Aortenendothelzellen, Primärkulturen, PAEC I, PAEC II und in Stickstoff konservierte Zellen gegenüber gestellt.

Die Ergebnisse der im Folgenden erläuterten Auswertungen werden als Mittelwerte \pm SEM (standard error of the mean) angegeben.

3.7.1. Frisch isolierte Aortenendothelzellen

Diese Studie sollte mit frisch isolierten Aortenendothelzellen durchgeführt werden, da es fast unmöglich ist, Zellen in Kultur dieselben Bedingungen und Voraussetzungen zu bieten, wie sie sie im Körper vorfinden. Die künstlichen Bedingungen in Zellkulturschalen entsprechen nie gänzlich den physiologischen Verhältnissen, daher sind die kultivierten Zellen

gezwungen, sich an die ihnen bereitgestellten Bedingungen anzupassen. Diese Anpassung kann dazu führen, dass sich bestimmte Zelleigenschaften ändern oder sogar verlorengehen.

3.7.1.1. Dispase und Kollagenase A

Außerdem war festzulegen, welches Enzym für die Isolierung der Endothelzellen verwendet werden sollte.

Grundsätzlich wird zur Isolierung porciner Aortenendothelzellen aus Aortensegmenten entweder das Enzym Kollagenase A oder das Enzym Dispase verwendet. Während die Kollagenase A aus *Clostridium histolyticum* Kulturen gewonnen wird, ist die Dispase eine Protease von *Bacillus polymyxa*. Zu Beginn der Versuchsreihe wurden ein Teil der Aorten mit Kollagenase A und ein Teil mit Dispase inkubiert, um die zwei Enzyme miteinander zu vergleichen.

Da in dieser Studie über den Einfluss von Hypothermie und Kardioplegielösungen auf die α -Gal-Epitope nicht auszuschließen war, dass die enzymatische Wirkung der Kollagenase A zu Veränderungen an den zu untersuchenden α -Gal-Epitopen führt, wurde die Kollagenase A mit dem zweiten möglichen Enzym, der Dispase verglichen. Das Enzym mit dem geringeren Einfluss auf die α -Gal-Epitope sollte erarbeitet werden.

Die Kollagenase A (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) spaltet in der Sequenz Pro-X-Gly-Pro spezifisch die X-Gly-Bindung, wobei X in der Regel eine neutrale Aminosäure ist. Sie ist im Gegensatz zu anderen Enzymen in der Lage tripelhelikales, natives Kollagen abzubauen (Harper 1980).

Die Dispase (Dispase II, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wies eine Enzymaktivität von 2,5 U/ml Hankscher Lösung auf. Die Dispase ist ein Metalloenzym, das zu den Amino-Endopeptidasen gezählt wird und das eine schonende Gewebsauflösung ohne Schädigung der Zellmembranen ermöglicht.

3.7.1.2. Problematik bei der Auswertung frisch isolierter Zellen

Die Entnahme der Aorten, deren Endothelzellen direkt nach der Gewinnung der Zellen analysiert werden sollten, erfolgte wie in Punkt 3.1. beschrieben. Allerdings wurden die Aorten nicht gekühlt, sondern bei Raumtemperatur transportiert, um den etwaigen Effekt einer Kühlung auf die α -Gal-Epitope auszuschließen. Da die Endothelzellen in diesem Fall noch am selben Tag untersucht wurden und die Zellen nicht in Kultur genommen wurden, war

das Risiko einer Verkeimung relativ gering und eine Kühlung der Aorten während des Transports nicht unbedingt notwendig.

Es wurden sechs Aorten mit Kollagenase A und sechs Aorten mit Dispase behandelt und die PAEC gewonnen (siehe 3.2.). Die frisch isolierten Zellen wurden direkt mit PBS aufgenommen und in die FACS-Röhrchen zur Vorbereitung für FACS (siehe 3.6.3.) und die anschließende FACS-Analyse (siehe 3.6.4. und 3.6.5.) übertragen.

Die Analyse der Zellen zeigte, dass sich die frisch isolierten Zellen nicht für die Versuche eigneten. Zum einen resultierten nur sehr geringe Zellzahlen. So waren bei der Durchflusszytometrie pro Probe im Durchschnitt nur 669 Zellen vorhanden (Mittelwert Kollagenase A: 703 Zellen / Auswertung; Mittelwert Dispase: 635 Zellen / Auswertung). Erstaunlicherweise waren bei der Coulter-Zählung vor der Inkubation der Zellen mit den fluoreszierenden Antikörpern ausreichende Zellzahlen gezählt worden (Mittelwert: $1,28 \times 10^6$ Zellen/ml). Es war davon auszugehen, dass es bei der Vorbereitung der Zellen für FACS zu Zellverlusten gekommen war. Es wurde deshalb versucht, die Zellverluste zu minimieren, indem mit verschiedenen FACS-Röhrchen gearbeitet wurde. Einige Auswertungen wurden mit Polystyren-FACS-Röhrchen (Falcon 5ml Polystyrene Round Bottom Tube, Becton Dickinson, Franklin Lake, USA) und einige Auswertungen mit Polypropylen-FACS-Röhrchen (PP-Tube 5ml, Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich) durchgeführt. Der Wechsel des Materials erzielte keine höheren Zellzahlen. Bei diesen geringen Zellzahlen war eine qualitativ hochwertige Zellanalyse nicht möglich.

Desweiteren zeigte sich, dass bei der Auswertung der frisch isolierten Zellen keine reinen Endothelzellpopulationen vorlagen, sondern Mischpopulationen. Bei dem in Punkt 3.2. beschriebenen Prozess der Zellisolierung wurden anscheinend nicht nur Endothelzellen gewonnen, sondern auch andere Zelltypen.

Vor allem aufgrund des Vorliegens von Mischpopulationen, aber auch aufgrund der geringen Zellzahlen, wurden Zellkulturen angelegt und kultivierte Zellen hinsichtlich ihrer α -Gal-Expression untersucht.

3.7.2. Vergleich von PAEC unterschiedlicher Passage und Behandlung mit Antikörpern

Es wurden Primärkulturen, die zum Teil mit Dispase und zum Teil mit Kollagenase A isoliert worden sind, sowie PAEC I und PAEC II und in Stickstoff konservierte Zellen miteinander verglichen. Zunächst wurde versucht, die α -Gal-Epitope mit einem Erstantikörper und einem Sekundärantikörper nachzuweisen. Der Erstantikörper Mouse anti-Rabbit Galactose, alpha 1,3 Galactose beta 1,4 GlcNAc-R (Type: Mab; Isotype: IgM; Clone No: 6D407) stammte von der

Firma USBiological (Swampscott, USA). Dieser Antikörper zeichnet sich dadurch aus, dass er sowohl synthetische als auch natürlich produzierte Kaninchen-, Mäuse-, Ratten- und Schwein- α -Gal-Epitope auf Glycoproteinen und Glycolipiden erkennt. Eine Kreuzreaktion mit β -Gal-Glycoproteinen ist ausgeschlossen. Der Sekundärantikörper Polyclonal Antibody to Mouse IgG, IgA, IgM [H&L] – FITC- (Host/Isotype: Goat; FITC-Molecular Weight 390 daltons; Absorption 495 nm; Emission 528 nm; Molar Ratio: 3.4) wurde über die Firma Acris Antibodies (Herford, Deutschland) bezogen. Es handelt sich um einen Katzen-Antikörper, der gegen sämtliche Mäuse- IgG-, -IgA- und -IgM -Moleküle gerichtet ist, und der mittels Immunoaffinitätschromatographie gewonnen wurde. Nach Herstellerangaben soll dieser Antikörper alle Maus-Isotypen und Kettenkombinationen erkennen und sich für die Durchflusszytometrie eignen. Gelagert wurde der Antikörper bei -20 °C. Um ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren des Antikörpers und negative Folgen dieses ständigen Temperaturwechsels auf den Antikörper zu vermeiden, wurde der Sekundärantikörper auf 10 μ l Aliquots verteilt und so eingefroren.

Es wurden aus insgesamt 79 Schweineaorten PAEC isoliert und 94 Zellkulturen unterschiedlicher Passage und Behandlung hinsichtlich α -Gal-Expression miteinander verglichen. Die α -Gal-Expression aller untersuchten Kulturen war sehr gering. Die höchste α -Gal-Expression zeigten die Dispase-Primärkulturen, bei denen im Mittel 46,05 % der Zellen α -Gal-positiv waren. Die geringste α -Gal-Expression wiesen die PAEC auf, die über 60 Tage in flüssigem Stickstoff konserviert waren. Diese Zellen waren im Mittel nur zu $7,02 \pm 0,64$ % α -Gal-positiv. Diese sehr geringen α -Gal-Expressionsraten waren sehr verwunderlich, da nach Literaturangaben das α -Gal-Epitop in großen Mengen (1×10^6 – 30×10^6 Epitope pro Zelle) auf den PAEC exprimiert wird (Galili 2001). Daher wurden im Folgenden verschiedene Schemata für die Vorbereitung der Zellen aufs FACS getestet, um sicherzugehen, dass kein technischer Fehler die geringe α -Gal-Expression bedingt. Doch weder das Aufnehmen der Zellen mit PBS plus statt mit PBS minus noch die Fixierung der Zellen mit Lysing solution (Becton Dickinson, Franklin Lake, USA) oder mit 3,7 % Formaldehyd brachte eine höhere α -Gal-Expression. Bei einer genauen Betrachtung der FACS-Auswertungen fiel auf, dass jeweils die Kontrolle (Autofluoreszenz der Zellen + Autofluoreszenz des Sekundärantikörpers) bereits eine starke Fluoreszenzintensität zeigte und dies eine Verfälschung der Resultate bedingen könnte. Daher wurde im Folgenden der Hintergrund mit BSA geblockt, was die Autofluoreszenz erstaunlicherweise aber nicht verminderte, sondern sogar noch verstärkte. Außerdem wurde erneut eine Verdünnungsreihe (1:10000 – 1:5000 – 1:2000 – 1:1000 – 1:600 – 1:400 – 1:200 – 1:100 – 1:50) des Sekundärantikörpers angelegt, um einen möglichen

Fehler in der Antikörperkonzentration zu beheben. Zwar war die Autofluoreszenz bei hohen Verdünnungen geringer, doch war die Sättigungsdosis bei den hohen Verdünnungen noch nicht erreicht. Eine zu hohe Dosierung des Sekundärantikörpers konnte auf diese Weise ausgeschlossen werden.

Nach diesen zahlreichen Versuchen lag der Verdacht nahe, dass einer der beiden Antikörper nicht funktionierte. Durch den Ersatz des bisher verwendeten Sekundärantikörpers durch einen PE-konjugierten goat anti-mouse Antikörper (BD Biosciences, San Jose, USA) konnte der Verdacht bestätigt und die Fehlerhaftigkeit des Sekundärantikörpers nachgewiesen werden (siehe Abb. 18).

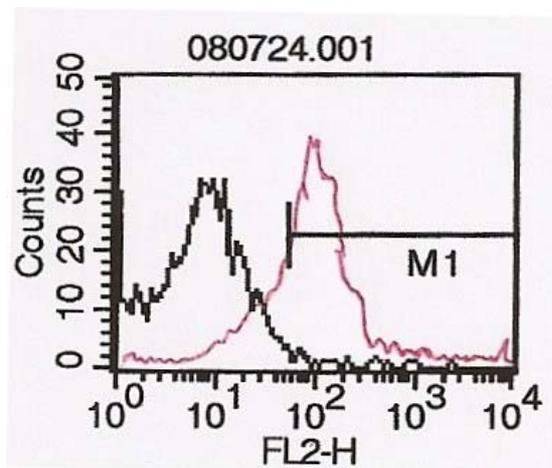


Abbildung 18: Um nachzuweisen, dass der Sekundärantikörper fehlerhaft ist, wurde der bisher verwendete FITC-konjugierte Sekundärantikörper gegen einen PE-konjugierten goat anti-mouse Antikörper ersetzt. Ähnlich wie bei der α -Gal-Färbung mit BS-I Isolectin B4 war nun ein hoher Prozentsatz an porcinen Aortenendothelzellen α -Gal positiv. Die schwarze Kurve zeigt die negative Kontrolle, die rote Kurve die α -Gal-Expression bei der Färbung der Zellen mit 5 μ l Erstantikörper und 25 μ l PE-konjugiertem Sekundärantikörper.

Aufgrund der Fehlerhaftigkeit des Sekundärantikörpers konnten die aus den Vorversuchen erhaltenen Ergebnisse zur α -Gal-Quantität nicht für statistische Auswertungen herangezogen worden, dennoch wurden mit diesen Versuchen erste Erfahrungen gesammelt: die Dispase-Primärkulturen zeigten im Vergleich zur Präparation mit Kollagenase A stets eine bessere Ausbeute und ein schnelleres Zellwachstum. Außerdem überzeugten die Dispase-Primärkulturen durch ein schönes morphologisches Zellbild, eine hohe Zellvitalität und einen ohne Ausnahme hohen CD31-Nachweis (> 90%). Diese Punkte führten dazu, dass bei den Versuchen mit BS-I Isolectin B4 die PAEC mit Dispase dissoziiert wurden.

3.7.3. Vergleich von PAEC unterschiedlicher Passage mit BS-I Isolectin B4

Nach der Entscheidung, die porcinen Aortenendothelzellen mit dem Enzym Dispase zu dissoziieren, musste festgelegt werden, aus welcher Passage (Primärkultur, PAEC I oder PAEC II) die Zellen für die Hauptversuche stammen sollten. In der Literatur gibt es bislang zwar Daten, die die Abhängigkeit der α -Gal-Expression vom Passagestadium auf porcinen Keratozyten und porcinen Endothelzellen der Cornea, beschreiben (Lee 2007), allerdings findet man keine definitiven Aussagen zur α -Gal-Expression auf kultivierten porcinen Aortenendothelzellen. Um das beste Passagestadium zu erkennen, wurden Primärkulturen (n

= 3), PAEC I (n = 3) und PAEC II (n = 3) hinsichtlich der α -Gal- und der CD31- Expression, der Vitalität und der Zellmorphologie verglichen. Dabei betrug die Detektoreinstellung des FACS für FL-1 371 nm. Die folgenden Ergebnisse der α -Gal-Expression sind als Mittelwerte \pm SEM (standard error of the mean) angegeben.

3.7.3.1. Primärkulturen

99,3 \pm 0,6 % der Zellen einer Primärkultur von Tag 6 waren α -Gal-positiv. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität einer Zelle lag bei 4537 \pm 55,51. Bei allen Kulturen wurde ein hoher Endothelzell-Nachweis erbracht. 97,05 \pm 2,1 % der untersuchten Zellen waren CD31-positiv. Ebenso zeigten die Primärkulturen eine hohe Zellvitalität von stets mehr als 90 %. Die Morphologie der Zellen war endothelzelltypisch und zeigte einen konfluierenden Monolayer mit „Kopfsteinpflaster“- Muster.

Außerdem wurden einige Kulturen bis Tag 12 gezüchtet, um die α -Gal-Expression der Primärkulturen bei langer Kulturzeit zu beobachten und Veränderungen in der α -Gal-Expression abhängig von der Kulturzeit zu erkennen. Die Primärkulturen von Tag 12 waren ebenfalls reine Endothelzellkulturen mit einem CD31 – Nachweis von 96,91 \pm 0,46 % und einem Vitalitätsnachweis von mindestens 90 %. 99,17 \pm 0,33 % der Zellen waren α -Gal-positiv, wobei die mittlere Fluoreszenzintensität einer Zelle 4945,07 \pm 176,68 betrug.

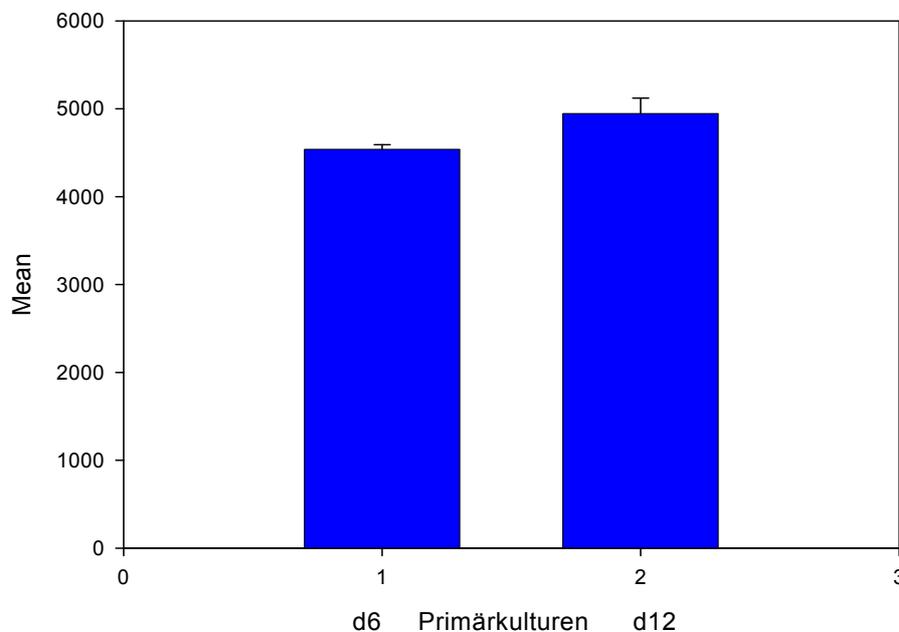


Abbildung 19: α -Gal-Nachweis in Abhängigkeit von der Kulturzeit.

Die Ergebnisse (siehe Abb. 19) machen deutlich, dass die α -Gal-Expression der Zellen einer Kultur nicht konstant ist, sondern im zeitlichen Verlauf schwankt.

3.7.3.2. Gesplittete PAEC

Der Vorgang des Zellsplittens ist eine Methode, die eine effiziente Vermehrung der porcinen Aortenendothelzellen ermöglicht und ein gängiges Verfahren in der Arbeit mit Zellkulturen darstellt.

3.7.3.2.1. Splitten der Zellen

Am Tag vier oder fünf nach Isolierung der Endothelzellen und Anlegen der Primärkulturen waren die Endothelzellen für eine erste Passage bereit. Ein zweites Splitten von PAEC I in PAEC II wurde nach sieben bis acht Tagen nach Anlegen der Primärkultur durchgeführt. Zunächst wurde das alte Medium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen mit circa 2 ml PBS minus (Apotheke Innenstadt Universität München) gewaschen. Nach Entfernen des PBS minus wurde 1 ml Trypsin (Trypsin-EDTA solution, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) auf die Zellen gegeben, um die Zellen vom Boden der Kulturschalen zu lösen. Um eine schnellere Wirkung des Enzyms zu erreichen, wurden die Kulturen kurz (ca. 2-3 Minuten) in einen 37°C warmen Brutschrank gestellt. Während dieser Zeit wurden 40 ml (10ml pro neuer Kultur) Medium L15 Leibovitz + 10% FCS + 1% APS in ein großes Falconröhrchen gefüllt. Nach mikroskopischer Kontrolle, dass sich auch wirklich alle Endothelzellen vom Boden der Petrischale gelöst haben, wurden 5 ml des Mediums entnommen und auf die Zellen gegeben. Nach gründlichem Resuspendieren von Medium und Zellen wurde das Gemisch mit einer 10 ml-Pipette aufgenommen und in das Falconröhrchen mit den restlichen 35 ml Medium repipettiert. Nach erneutem Resuspendieren von Zellen und Nährmedium wurden je 10 ml entnommen und damit neue Zellkulturen in Petrischale der Größe 100 x 20 mm angelegt.

Durch den Kontakt des Trypsins mit dem fetalen Kälberserum im Medium wurde die enzymatische Aktivität des Trypsins sofort gehemmt. Eine Zugabe weiterer Trypsin-hemmender Substanzen war daher nicht notwendig.

3.7.3.2.2. PAEC I und PAEC II

Die PAEC I wurden am zehnten Tag nach Zellisolierung ausgewertet. Auch die PAEC I wiesen eine Vitalität von über 90 % auf. Der Endothelzellnachweis war mit $97,04 \pm 0,54$ % ebenfalls positiv. $99,85 \pm 0,07$ % der Zellen trugen α -Gal-Epitope, wobei die mittlere Fluoreszenzintensität einer Zelle bei $5274,86 \pm 158,90$ lag.

Die PAEC II wurden am Tag 16 analysiert. Auch bei den zweimal gesplitteten Zellen konnte eine Zellvitalität von mehr als 90 % nachgewiesen werden. Morphologisch erinnerten die

PAEC II nicht mehr an Endothelzellen, allerdings konnten auf $99,03 \pm 0,19$ % der Zellen CD31 – Moleküle nachgewiesen werden. $99,83 \pm 0,066$ % der PAEC II waren α -Gal-positiv. Die mittlere Fluoreszenzintensität betrug $6350,65 \pm 253,13$.

Entgegen der Annahme, dass das Splitten der Zellen und eine lange Kulturzeit zu einer Abnahme der α -Gal-Epitope führt, zeigten diese Ergebnisse vielmehr das gesplittete porcine Aortenendothelzellen eine höhere α -Gal-Expression haben als die Zellen der Primärkulturen (siehe Abb.20). Diese Ergebnisse korrelieren mit den Untersuchungen von Lee et al., die zeigten, dass die Anzahl an α -Gal-Epitopen auf kultivierten porcinen Keratozyten sowie auf kultivierten porcinen Endothelzellen der kornealen Descemet-Membran mit dem Passagestadium zunimmt. Dass dies auch für porcine Aortenendothelzellen gilt, konnte hiermit in dieser Studie demonstriert werden.

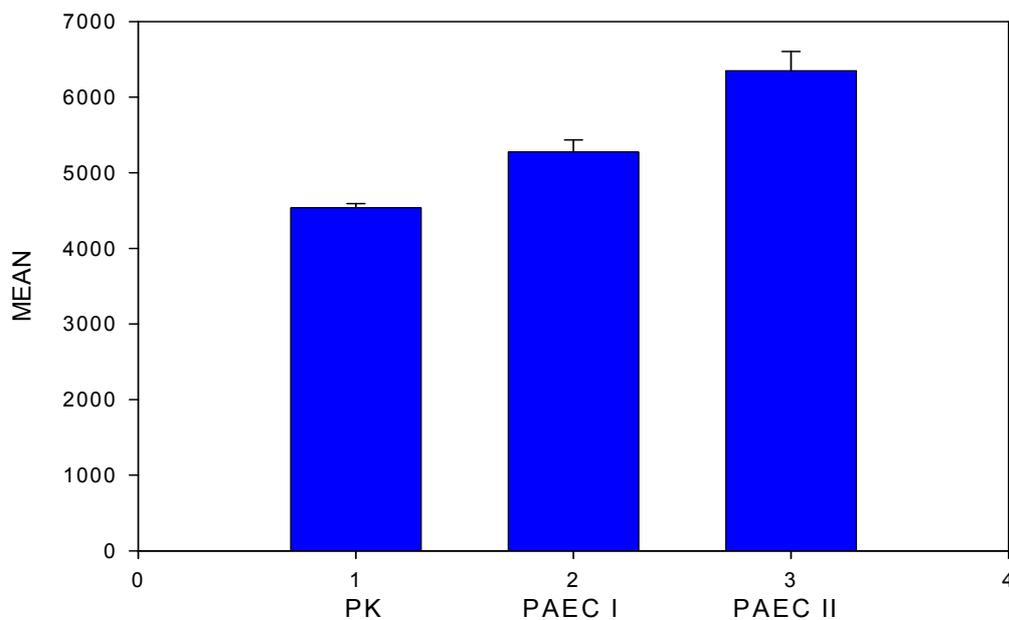


Abbildung 20: Passagenvergleich: Vergleich der α -Gal Expression porciner Aortenendothelzellen aus Primärkulturen (PK), einmal gesplitteten Zellen (PAEC I) und zweimal gesplitteten Zellen (PAEC II). Bei zunehmendem Passagestadium nimmt auch die α -Gal-Expression zu.

3.8. Interindividuelle Unterschiede in der α -Gal-Expression

Bereits in den Vorversuchen, bei denen der α -Gal-Nachweis mit den Antikörpern nachgewiesen wurde, gab es Hinweise, dass die α -Gal-Expression der einzelnen Aorten und damit der einzelnen Schweine trotz gleicher Präparation, gleicher Kultivierung und gleicher Analysetechnik sehr unterschiedlich war, die Anzahl der α -Gal-Epitope also zwischen den Individuen variierte. Daher wurden nochmals Dispase-Primärkulturen gezielt auf die

interindividuellen Unterschiede hin mit BS-I Isolectin B4 und FACS untersucht. Die Vermutungen aus den Vorversuchen wurden bestätigt (siehe Abb. 21).

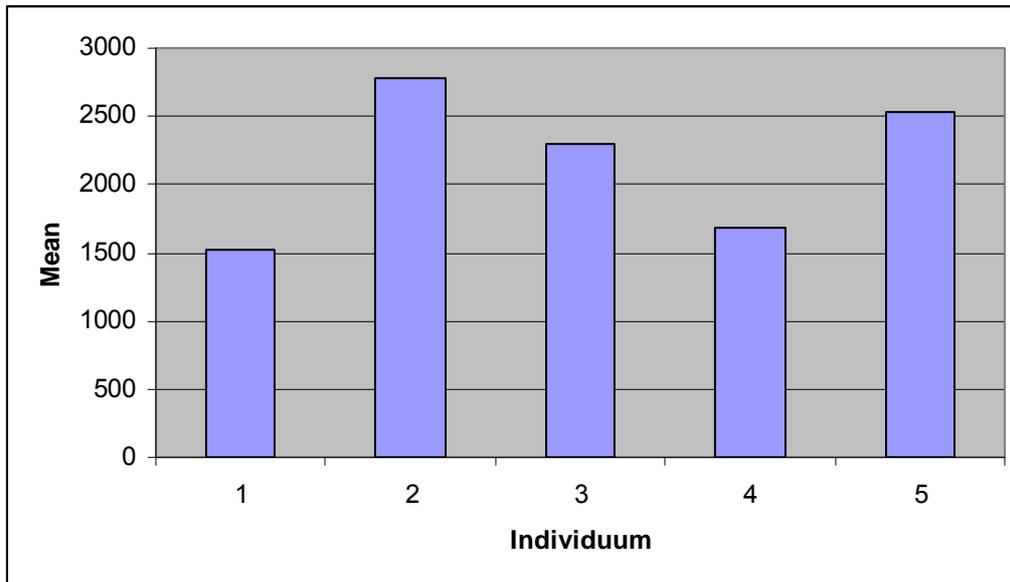


Abbildung 21: Interindividuelle Unterschiede in der α -Gal-Expression - Die PAEC von verschiedenen Schweinen zeigen in der FACS-Analyse sehr unterschiedliche Mean-Werte als Ausdruck einer sehr schwankenden individuellen α -Gal-Expression.

3.9. Versuchsdurchführung mit Dispase-Primärkulturen in verbundene Stichproben

Die beträchtlichen interindividuellen Unterschiede in der α -Gal-Expression führten dazu, dass der zunächst vorgesehene Plan, bei den Hauptversuchen unverbundene Stichproben miteinander zu vergleichen, geändert werden musste. War eine geringe Anzahl an α -Gal-Epitopen auf den PAEC der Versuchsgruppe tatsächlich Folge der Kälteeinwirkung oder handelte es sich dabei von vorneherein um PAEC eines Individuums, das nur in einem niedrigen Maße α -Gal-Epitope exprimiert? Um diese Frage beantworten und eine Signifikanz des Temperatureinflusses auf die α -Gal-Epitope nachweisen zu können, hätte eine derart große Anzahl an Aorten untersucht werden müssen, was die praktische Durchführbarkeit gesprengt hätte.

Um das Problem zu lösen, war man gezwungen, mit verbundenen Stichproben zu arbeiten. Es wurde nötig, eine Aorta so zu präparieren, dass man ausreichend Endothelzellen für das Anlegen von zwei Zellkulturen erhielt und, dass zwei Kulturen eines Individuums für die Hauptversuche zur Verfügung standen. Eine Kultur konnte dann als Versuchskultur und die andere als Kontrollkultur herangezogen werden. Die interindividuellen Unterschiede konnten dadurch ausgeblendet und eine Veränderung der α -Gal-Nachweisbarkeit konnte nur durch die unterschiedliche Behandlung erklärt werden.

Um es technisch zu ermöglichen, bei der Zellisolierung genügend PAEC für zwei Zellkulturen zu erhalten, mussten die Aluminiumblöcke zur Zelldissoziation (siehe 3.2.2.) so umgebaut werden, dass das 10 cm lange Aortensegment geteilt und die beiden so erhaltenen ca. 5 cm langen Aortenstücke in jeweils einen Block eingespannt werden konnten. Um dieses Vorgehen zu realisieren, wurden die Blöcke verkleinert, gleichzeitig aber die Dichtigkeit der Blöcke erhöht, sodass sich die Zellausbeute im Vergleich zu den alten Blöcken nicht veränderte. Dies ermöglichte das Anlegen zweier Zellkulturen aus einer Aorta.

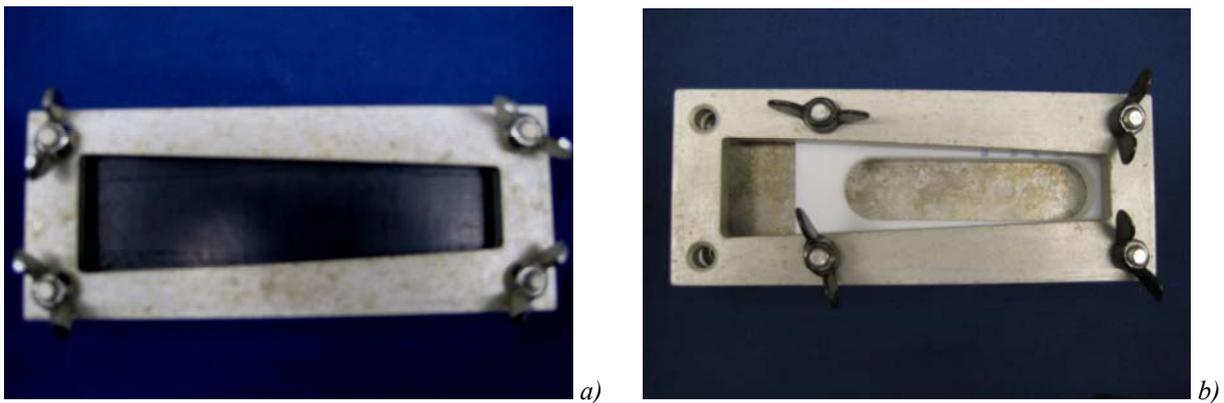


Abbildung 22: Zur Durchführung verbundener Stichproben mussten ausreichend Zellen für das Anlegen von zwei Zellkulturen gewonnen werden. Dazu wurden die alten Aluminium-Blöcke (a) entsprechend umgebaut: die Endothelzellfläche, aus der die Zellen dissoziiert werden, wurde durch die Einlage eines Inlays verkleinert, sodass die bereits 5cm lange Aortensegmente eingespannt werden konnten (b). Gleichzeitig erhöhte der Einbau eines Inlays die Dichtigkeit der Blöcke, wodurch die Zellausbeute im Vergleich zu den alten Blöcken erhalten blieb.

Wie bereits in Punkt 3.7.2. erläutert, wurden die Endothelzellen für die Hauptversuche aufgrund der positiven Erfahrungen in den Vorversuchen mit Dispase isoliert. Obwohl der Passagenvergleich zeigte, dass gesplittete Aortenendothelzellen eine höhere α -Gal-Expression aufweisen als die Zellen der Primärkulturen (siehe 3.7.3.), wurde in dieser Studie mit den Primärkulturen gearbeitet. Die Zellen aus den Primärkulturen zeigen eine ausreichende α -Gal-Expression und entsprechen noch am ehesten den Zellen in-vivo, da die Kulturzeit mit sechs Tagen relativ gering gehalten ist. Die PAEC I mit einer Kulturzeit von 10 Tagen und die PAEC II mit einer Kulturzeit von 16 Tagen haben sich bereits vermehrt an die Kulturbedingungen adaptiert und sind den Zellen in-vivo entfernter als die Zellen aus den Primärkulturen. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass durch das Passagieren eine Art Selektion der Zellen stattfindet und repräsentative Zellen der Originalpopulation verloren gehen. Außerdem zeigten die gesplitteten Zellen nicht mehr die Endothelzell-typische Morphologie (siehe 3.7.3.2.2.) und wurden auch deshalb für die Hauptversuche abgelehnt.

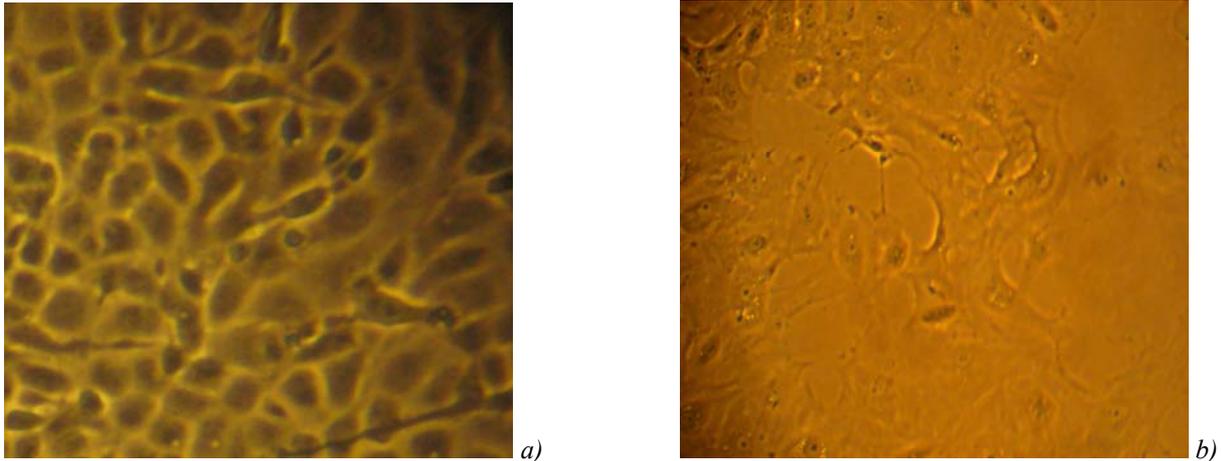


Abbildung 23: Morphologie der porcinen Aortenendothelzellen: a) Primärkultur Dispase an Tag 6 und b) PAEC II an Tag 14. Während die Zellen der Primärkulturen die typische Endothelzellmorphologie aufweisen, zeigen die Zellen aus den PAEC II - Kulturen kein Endothelzellaussehen mehr. Die PAEC II wachsen nicht im „cobblestone“-Muster, sondern sind abgeflacht, dilatiert und wirken gestresst.

Wie bereits in Punkt 3.7.3.1. gezeigt, verändert sich die α -Gal-Expression innerhalb der Primärkulturen in Abhängigkeit von der Kulturzeit. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden alle Auswertungen am Tag 6 ± 1 nach der Isolierung der porcinen Aortenendothelzellen durchgeführt. Zellkulturen, die am siebten Tag noch keinen konfluierenden Monolayer aus Endothelzellen aufwiesen, wurden verworfen. Auch die Sättigungsdosis für das BS-I Isolectin B4 war für Dispase-Primärkulturen am Tag 6 bestimmt worden (siehe 3.6.2.).

3.10. Versuchsgruppen

3.10.1. Versuchsreihe 1: Einfluss von Hypothermie auf die α -Gal-Epitope

Wie in Punkt 2 näher erläutert, sollte mit dieser Arbeit zum einen gezeigt werden, dass Kälte einen Einfluss auf die α -Gal-Epitope auf porcinen Aortenendothelzellen hat. Um dieser These nachzugehen, wurden porcine Aortenendothelzellen zweier Gruppen miteinander verglichen. In der Versuchsgruppe wurden die PAEC über einen bestimmten Zeitraum bei 4°C gekühlt, während in der Kontrollgruppe die PAEC über jeweils denselben Zeitraum bei 38°C inkubiert wurden. 38°C entsprechen der Körpertemperatur von Schweinen.

Da in der Transplantationsmedizin, eine Kryokonservierung bei 4°C Standard ist, legte man sich darauf fest, auch die PAEC auf 4°C zu kühlen.

Die PAEC wurden bei 38°C bzw. 4°C eine Stunde ($n=6$), vier Stunden ($n=6$) und sechs Stunden ($n=6$) inkubiert bzw. gekühlt, sodass insgesamt drei Versuchs- und drei Kontrollgruppen entstanden.

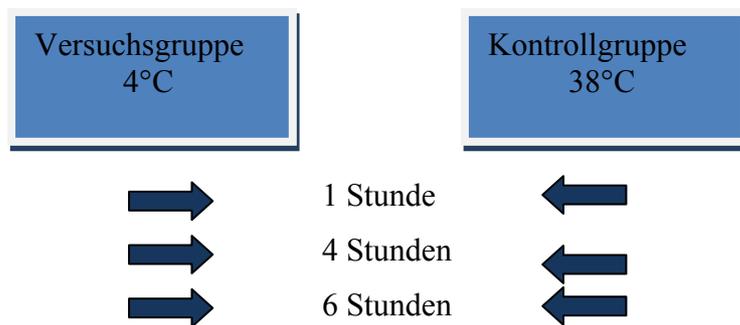


Abbildung 24 : Versuchsaufbau zur Untersuchung des Einflusses von Hypothermie auf die α -Gal-Epitope

Warum wurden gerade Versuchsgruppen mit Kühlzeiten von einer, vier und sechs Stunden ausgewählt? Die Kühlung über eine Stunde sollte zeigen, wie sich die α -Gal-Epitope nach einer kurzen Kühlphase verhalten bzw. ob eine kurzzeitige Kühlung bereits Effekte auf den α -Gal-Nachweis hat. Der α -Gal-Nachweis nach vier Stunden interessierte, da die derzeitige Ischämietoleranz des Herzens bei eben diesen vier Stunden liegt. Eine Ischämiezeit von mehr als vier Stunden bei orthotoper Herztransplantation geht mit einem stark erhöhten Risiko eines frühen Transplantatversagens einher (Berchtold 2006).

Hinsichtlich der Weiterentwicklung der Kardioplegie- und Preservationstechniken und der möglichen Verlängerung der Ischämiezeiten bei Herztransplantation wurde die α -Gal-Quantität auch bei sechsstündiger Kühlung der PAEC untersucht. Im Weiteren ist die Kühlung der PAEC auch für die Xenotransplantation der Organe Leber, Pankreas und Niere interessant. Die Ischämietoleranz beträgt bei Leber und Pankreas in etwa 12 Stunden und bei der Niere sogar bis zu 36 Stunden (Berchtold 2006). Für diese Organe wäre eine sechsstündige kalte Ischämie bei der Xenotransplantation ebenfalls möglich.

3.10.2. Versuchsreihe 2: Einfluss von Kardioplegielösungen auf die α -Gal-Epitope

Bei der Organtransplantation werden die Organe nicht nur auf 4°C gekühlt, sondern zeitgleich mit Preservationslösungen perfundiert und konserviert. Daher interessierte neben der Frage welchen Einfluß die Kälte auf die α -Gal-Epitope hat, ebenfalls die Frage, inwieweit die Preservationslösungen die α -Gal-Epitope während der kalten Ischämiezeit beeinflussen.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde eine zweite Versuchsreihe gestartet, bei der die PAEC der Versuchsgruppe in einer Kardioplegielösung bei 4 °C über vier Stunden gekühlt wurden. Als Kontrollgruppe wurden PAEC herangezogen, die ohne Kardioplegielösung über vier Stunden bei 4 °C gekühlt wurden. Die Versuche wurden zum einen mit University of

Wisconsin (UW)-Lösung (ViaSpan®, Bristol-Myers Squibb, München, Deutschland) (n=4) und zum anderen mit Bretschneider-Lösung (Custodiol®, Dr.Franz Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein, Deutschland) (n=4) durchgeführt.

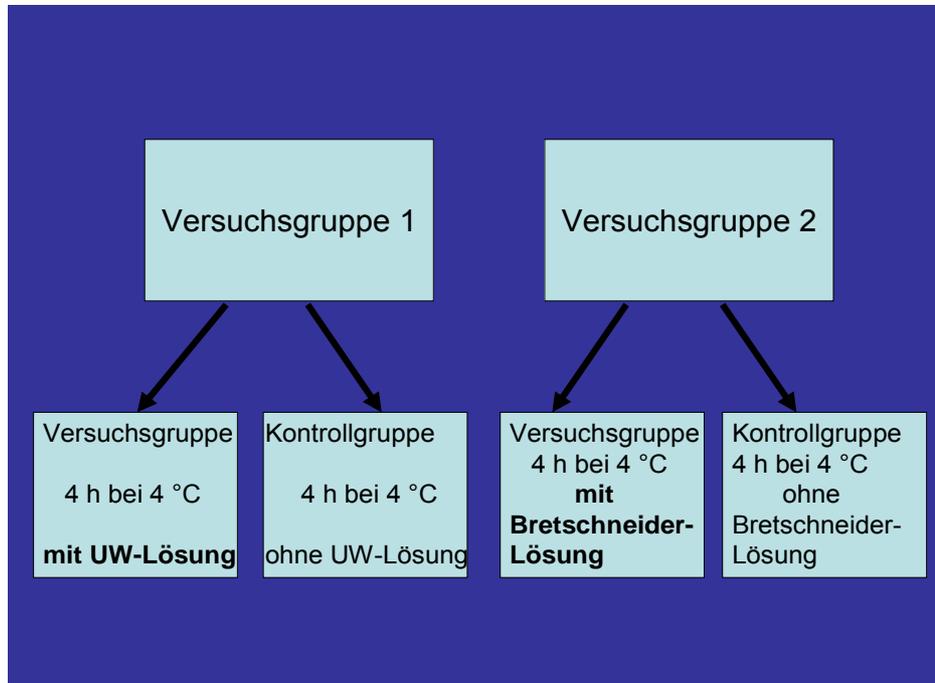


Abbildung 25: Versuchsaufbau zur Untersuchung des Einflusses der Kardioplegielösungen UW-Lösung und Bretschneider-Lösung auf die α -Gal-Epitope

Wie in Punkt 2.1. beschrieben, basiert die Idee zu dieser Studie auf Erfahrungen, die im Rahmen von Perfusionsversuchen an unserem Institut gemacht wurden. Bei den damaligen Versuchen wurde als Kardioplegielösung die University of Wisconsin (UW)-Lösung verwendet. Die UW-Lösung ist eine intrazelluläre Lösung, die von Wahlberg, Southard und Belzer an der Universität von Wisconsin für die Pankreastransplantation entwickelt wurde. Heute gehört die UW-Lösung zu den Standardpreservationslösungen in der Nieren-, Leber-, Lungen- und Herztransplantation. Die genaue Zusammensetzung der Lösung ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Heute wird bei den Xenotransplantationsversuchen vor allem mit Bretschneider-Lösung gearbeitet, da bei der Verwendung von Bretschneider-Lösung in der Xenotransplantation weniger arrhythmische Komplikationen aufgetreten sind. Die Bretschneider-Lösung ist ebenfalls eine intrazelluläre Lösung, die zunächst als Kardioplegielösung für die intraoperative Myokardprotektion entwickelt wurde, heute aber auch als Preservationslösung in der Transplantationsmedizin verwendet wird (Zusammensetzung siehe Tabelle 2).

| <u>UW-Lösung</u> | | <u>Bretschneider-Lösung</u> | |
|------------------------------|--------------|------------------------------------|--------------|
| Poly(O-2-hydroxyethyl)stärke | 50,000 g | Natriumchlorid | 0,8766 g |
| Lactobionsäure | 35,830 g | Kaliumchlorid | 0,6710 g |
| Kaliumhydroxid-Lösung 56 % | 14,500 g | Magnesiumchlorid-6H ₂ O | 0,8132 g |
| Natriumhydroxid-Lösung 40 % | 3,679 g | Histidinhydrochlorid-Monohydrat | 3,7733 g |
| Adenosin | 1,340 g | Histidin | 27,9289 g |
| Allopurinol | 0,136 g | Tryptophan | 0,4085g |
| Kaliumhydrogenphosphat | 3,400 g | Mannitol | 5,4651g |
| Magnesiumsulfat-Heptahydrat | 1,230 g | Calciumchlorid-2H ₂ O | 0,0022 g |
| Raffinose-Pentahydrat | 17,830 g | Kaliumhydrogen-2-oxopentandioat | 0,1842 g |
| Glutathion | 0,922 g | | |
| Osmolalität | 320mosmol/kg | Osmolalität | 310mosmol/kg |

Tabelle 2: Zusammensetzung der UW-Lösung (ViaSpan®) und der Bretschneider-Lösung (Custodiol®) (1 Liter).

3.11. Kühlung

Zur Kühlung der porcinen Aortenendothelzellen wurden die Zellkulturen dem 37°C warmen Brutschrank entnommen und direkt in eine Kühlbox gestellt. Die Kühlung bei 4° C erfolgte in einer Kompressor-Kühlbox der Firma Waeco, die mittels elektronischer Temperaturregelung exakt auf eine Innenraumtemperatur von 4° C einstellbar war. Die Kulturschalen wurden genau in die Mitte der Kühlbox gestellt, da sich nach Herstellerangaben, die auf dem Display der Kühlbox angezeigte Temperatur auf die Mitte des Innenraums bezieht. Außerdem wurde zur Sicherstellung, dass die Zellen auch wirklich bei 4°C gekühlt wurden, regelmäßig die Temperatur in der Mitte der Kühlbox mit einem manuellen Quecksilberthermometer bestimmt. Abweichungen von ± 1° C wurden dabei in Kauf genommen.

Je nach Versuchsgruppe erfolgte die Kühlung bei 4°C eine, vier oder sechs Stunden.

3.12. Wärmeinkubation

Die porcinen Aortenendothelzellen der Kontrollgruppe wurden über den definierten Zeitraum bei 38°C inkubiert. Die den Zellkulturen der Versuchsgruppe entsprechenden Kulturen, d.h. jeweils die zweiten Zellkulturen eines Individuums, wurden dafür dem 37°C warmen Brutschrank entnommen und direkt in einen auf 38°C geheizten Brutschrank gestellt. Um den

Zellkulturen der Kontrollgruppe ähnliche atmosphärische Bedingungen zu bieten wie den Zellkulturen der Versuchsgruppe, wurde der Brutschrank trocken betrieben. Außerdem wurde auf die Einleitung von CO₂ verzichtet und so wie in der Kühlbox eine CO₂-arme Atmosphäre geschaffen.

Je nach Versuchsgruppe erfolgte die Wärmeinkubation bei 38°C eine, vier oder sechs Stunden.

3.13. Inkubation der Zellen mit den Kardioplegielösungen

Nachdem die Zellkulturen, deren Zellen mit den Kardioplegielösungen behandelt werden sollten, dem Brutschrank entnommen worden waren, wurde das alte Medium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt, das restliche Medium kurz mit 2 ml der Kardioplegielösung ausgespült und anschließend 10 ml der UW-Lösung bzw. der Bretschneider-Lösung in die Kulturschalen gegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen über vier Stunden bei 4°C in der Kühlbox (vergleiche 3.11.)

Die Zellkulturen der Kontrollgruppe wurden ohne Kardioplegielösung über vier Stunden bei 4°C inkubiert.

3.14. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm SEM (standard error of the mean) angegeben. In den Diagrammen werden ebenfalls die Mittelwerte dargestellt, wobei der SEM als senkrechter Balken aufgezeigt ist. Die Ergebnisse der Untersuchungsreihe zum Einfluss der Hypothermie auf die α -Gal-Epitope wurden hinsichtlich der Variablen Zellvitalität, CD31- und α -Gal-Nachweis mithilfe einer Two Way Repeated Measure ANOVA miteinander verglichen. Die Ergebnisse der Kontroll- und Versuchsgruppen zur Untersuchung des Einflusses der Kardioplegielösungen UW-Lösung und Bretschneider-Lösung auf den α -Gal-Nachweis wurden hinsichtlich Zellvitalität, CD31- und α -Gal-Nachweis jeweils mit dem Paired t-test für verbundene Stichproben verglichen. Als Computerprogramm wurde für die statistische Auswertung SigmaStat 3.0 herangezogen. Ein Unterschied wurde als statistisch signifikant betrachtet, wenn $p < 0,05$ war. Die Diagramme wurden mit dem Programm SigmaPlot 9.0 erstellt.

4. Ergebnisse

4.1. Zellmorphologie

Die Betrachtung der Zellmorphologie diente vor allem dem Endothelzellnachweis (siehe 3.5.1.). Alle Zellkulturen, die als Kontroll- oder Versuchskulturen herangezogen wurden, wiesen den für Endothelzellen typischen „Kopfsteinpflasterrasen“ auf. Zum anderen wurden die Zellkulturen zusätzlich noch nach der Versuchsdurchführung mikroskopisch betrachtet. Dies lieferte Hinweise darüber, ob die jeweilige Behandlung zu Veränderungen des Endothelzellmonolayers und der Zellmorphologie führt.

4.1.1. Zellmorphologie nach ein-, vier- und sechsstündiger Inkubation bei 38°C und 4°C

Die Zellen der Kontrollgruppen, die über 1 h, 4h und 6h bei 38°C inkubiert worden sind, weisen keine Veränderungen in ihrer Morphologie auf. Die Temperaturänderung von 37°C (Temperatur der Zellkultivierung) auf 38°C (Schweinekörpertemperatur) führt zu keiner Veränderung der Zellform und Zellgröße. Weiterhin bilden die PAEC den für Endothelzellen typischen „Kopfsteinpflasterrasen“ (siehe Abb. 26).

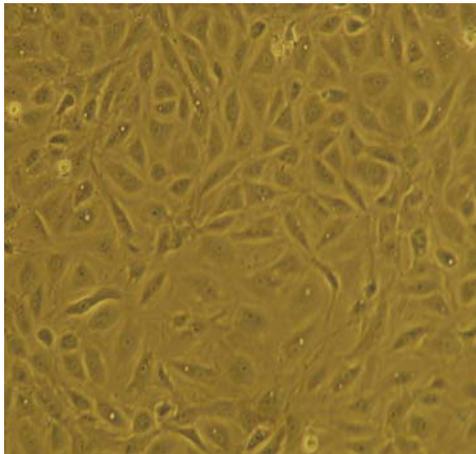
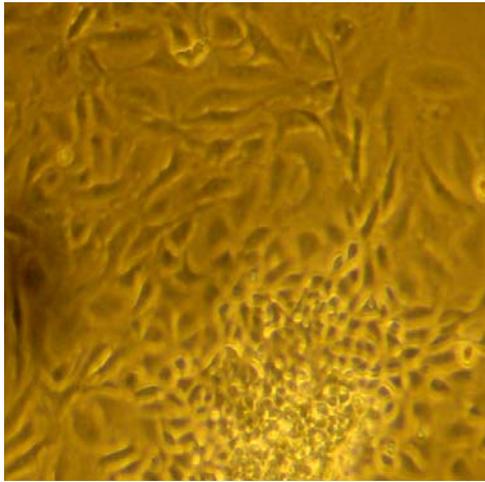


Abbildung 26: Die PAEC, die über 1h, 4h und 6h bei 38°C inkubiert wurden, zeigen keine Veränderung der Zellmorphologie gegenüber der Inkubation bei 37°C. Das morphologische Bild ist weiterhin von dem für Endothelzellen typischen Kopfsteinpflasterrasen geprägt.

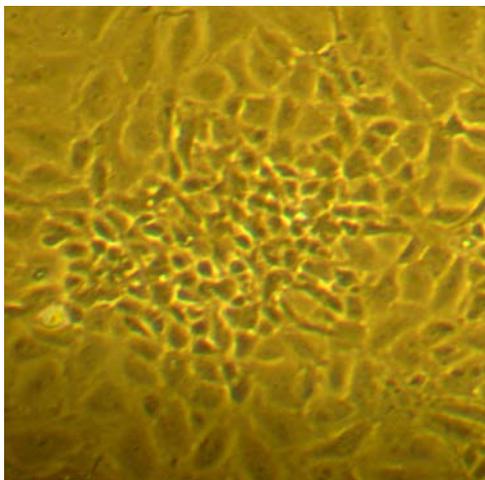
Die PAEC, die als Versuchsgruppen über 1h, 4h und 6h bei 4°C gekühlt wurden, zeigen im Vergleich eine veränderte Morphologie. Die Zellen reagieren durch den Kälte-Einfluß teilweise mit Zellschrumpfung und „Kugelbildung“ (siehe Abb. 27). Die „Kugelbildung“ lässt die Zellen vor allem nach sechsstündiger Kälteinkubation unter dem Mikroskop plastischer erscheinen (siehe Abb. 27c), führt aber nicht zu einem Ablösen der Zellen vom Boden der Petrischalen. Diese Veränderungen in der Zellmorphologie zeigen sich bereits nach der einstündigen Kälteexposition bei 4°C. Eine verlängerte Inkubationszeit bei 4°C von 4h oder 6h führt zu keinen weiteren Veränderungen. Mikroskopisch können weder nach einstündiger, vierstündiger oder sechsstündiger Kälteeinwirkung Hinweise für eine kältebedingte

Schädigung der Zellen gefunden werden. So ist weder eine vermehrte Vakuolenbildung, noch das Auftreten interzellulärer Lücken zu sehen.

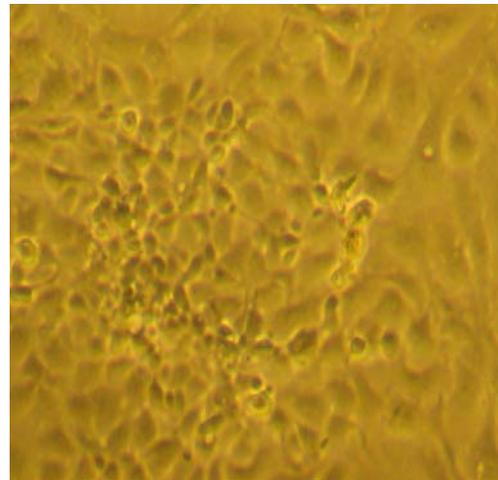


a)

Abbildung 27: Die PAEC reagieren auf die Kälte zum Teil mit Zellschrumpfung und Kugelbildung. Es gibt allerdings mikroskopisch keine Hinweise für eine kältebedingte Schädigung der Zellen. a) Zellen nach einstündiger Inkubation bei 4°C, b) nach vierstündiger Inkubation bei 4°C und c) nach sechsstündiger Inkubation bei 4°C.



b)



c)

4.1.2. Zellmorphologie nach der Inkubation mit den Kardioplegielösungen

Die PAEC, die über 4h bei 4°C bedeckt von einer Kardioplegielösung inkubiert worden sind, zeigen in etwa dieselbe Morphologie wie die Zellen, die bei 4°C ohne Kardioplegielösung gekühlt worden sind (siehe 4.1.1). Auch diese Zellen weisen das Bild einer Zellverkleinerung und „Kugelbildung“ auf. Mikroskopisch können weder Hinweise für eine vermehrte Zellschädigung durch die Kardioplegielösung noch für einen besonders protektiven Effekt durch den Einfluß der Lösungen gefunden werden. Dabei besteht zwischen den Zellen, die mit UW-Lösung und denen, die mit Bretschneider-Lösung inkubiert worden sind, kein Unterschied.

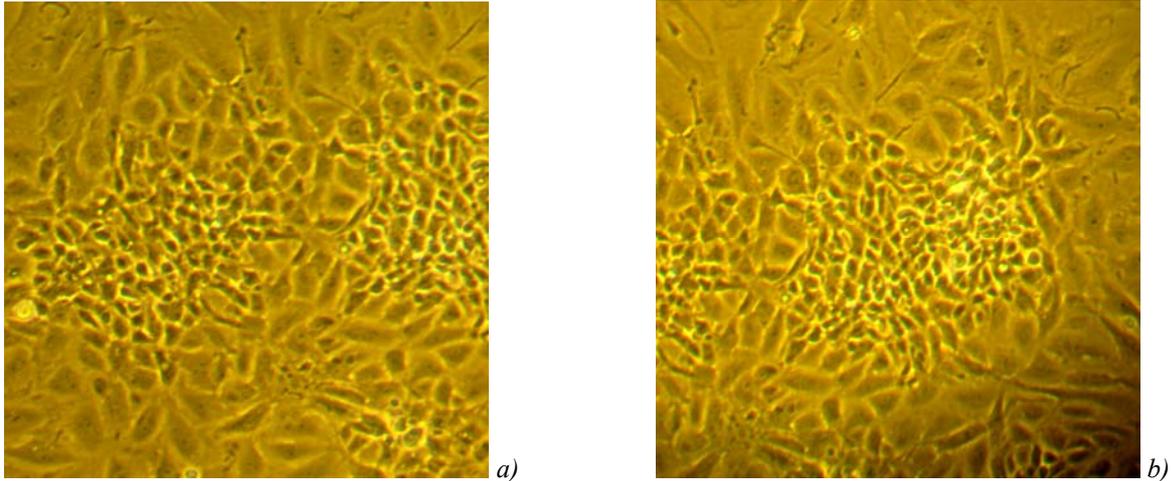


Abbildung 28: Zellmorphologie nach vierstündiger Inkubation bei 4°C mit a) UW-Lösung und b) Bretschneider-Lösung.

4.2. Vitalitätsnachweis

Bei allen Zellkulturen der Versuchs- und Kontrollgruppen wurde die Zellvitalität mittels Trypan-Blau-Ausschlusstest bestimmt. Dies sollte den Nachweis erbringen, dass der α -Gal-Nachweis bei vitalen Zellen bestimmt wurde und nicht tote Zellen und Zelltrümmer untersucht wurden. Zum anderen ermöglichte dies zusätzlich, den Einfluss der Behandlung (Kälteexposition, Exposition gegenüber den Kardioplegielösungen) auf die Vitalität der Zellen zu beobachten.

4.2.1. Vitalitätsnachweis nach ein-, vier- und sechsständiger Inkubation bei 38°C und 4°C

Der Vitalitätsnachweis der untersuchten Zellkulturen ist stets hoch und zeigt damit, dass vitale Zellen und keine Zelltrümmer für die Auswertungen herangezogen wurden. Doch können Unterschiede in der Vitalität zwischen den Kulturen der Kontrollgruppen und den Kulturen der Versuchsgruppen gesehen werden.

Die Vitalität aller Zellkulturen der Kontrollgruppen, die über 1h, 4h oder 6 h bei 38°C inkubiert wurden, zeigen einen sehr hohen Vitalitätsnachweis von mindestens 91 %. Dabei bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kontrollgruppen.

Die Vitalität der Zellen, die eine Stunde bei 4°C gekühlt wurden, ist $94,3 \pm 1,65$ %, die der Zellen, die vier Stunden gekühlt wurden beträgt $95,83 \pm 1,87$ % und die der Zellen, die über sechs Stunden bei 4°C gekühlt wurden, liegt bei $88,83 \pm 3,30$ %. Es ist auffällig, dass der Vitalitätsnachweis der 6h-Gruppe unter 90 % liegt und dadurch von der 1h- und 4h-Gruppe differiert. Der Unterschied hinsichtlich der Vitalität zwischen der 4h-Gruppe und der 6h-Gruppe kann hierbei als signifikant betrachtet werden.

Der Vitalitätsnachweis der Kontrollgruppen (38°C) liegt stets über dem der Versuchsgruppen (4°C). Dieser Unterschied in der Vitalität, der zwischen den 38°C-Kulturen und den 4°C-Kulturen besteht, ist signifikant.

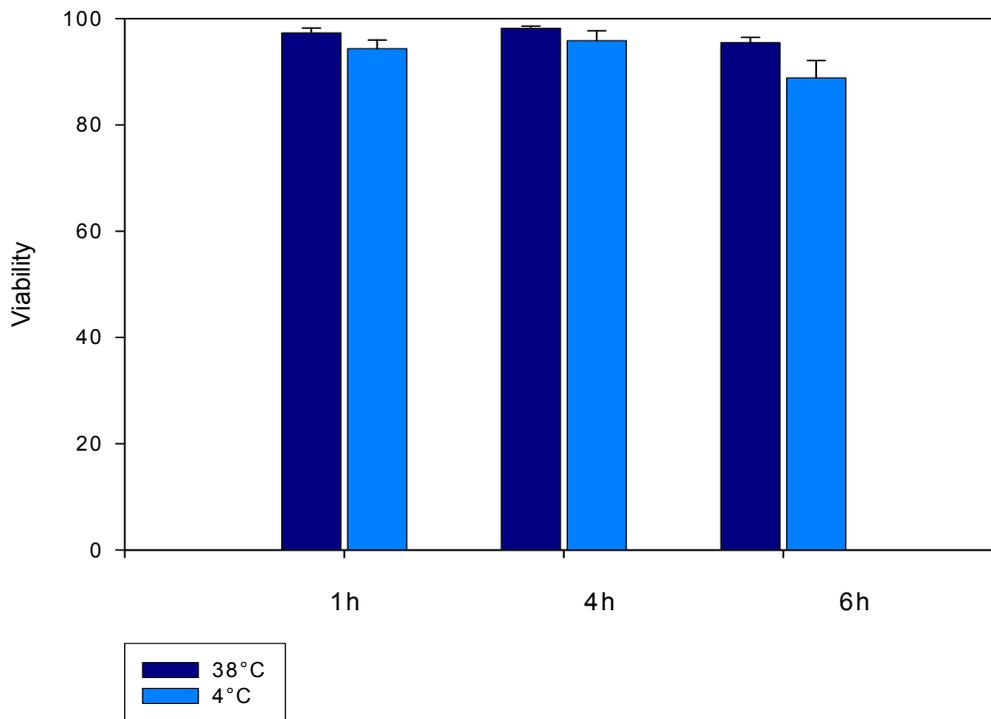


Abbildung 29: Zellvitalität (Viability) nach ein-, vier-, sechsständiger Inkubation – Vergleich bei 38°C und 4°C; Alle Zellkulturen, die der Kontroll- wie auch die der Versuchsgruppen, weisen eine hohe Vitalität auf.

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass es nach der Kälteeinwirkung statistisch zwar zu einer signifikanten Reduktion der Vitalität kommt, doch ist selbst nach einer sechsständigen Kälteexposition der PAEC bei 4°C der Anteil an vitalen Zellen mit $88,83 \pm 3,30$ % sehr hoch.

4.2.2. Vitalitätsnachweis nach der Inkubation mit den Kardioplegielösungen

Auch die Zellkulturen, die für die Untersuchungen mit den Kardioplegielösungen herangezogen wurden, zeigen hohe Vitalitäts-Werte. Der Nachweis, dass bei den Experimenten mit vitalen Zellen gearbeitet wurde, wurde damit erbracht. Dennoch sind hier wiederum Unterschiede zwischen den jeweiligen Kontroll- und Versuchsgruppen auffällig.

Die Zellkulturen, die unter dem Zusatz von UW-Lösung über 4h bei 4°C inkubiert worden sind, haben einen Vitalitätsnachweis von $91,25 \pm 0,48$ %. Die PAEC der dazugehörigen verbundenen Stichprobe (4 h bei 4°C ohne UW-Lösung) haben einen Vitalitätsnachweis von $91,50 \pm 0,65$ %.

Der Anteil an vitalen Zellen der Kulturen, die mit der Bretschneider-Lösung über 4 h auf 4°C gekühlt worden sind, beträgt $93,00 \pm 1,0$ %, der Anteil der Kontrollgruppe ohne Bretschneider-Lösung $89,00 \pm 1,23$ %.

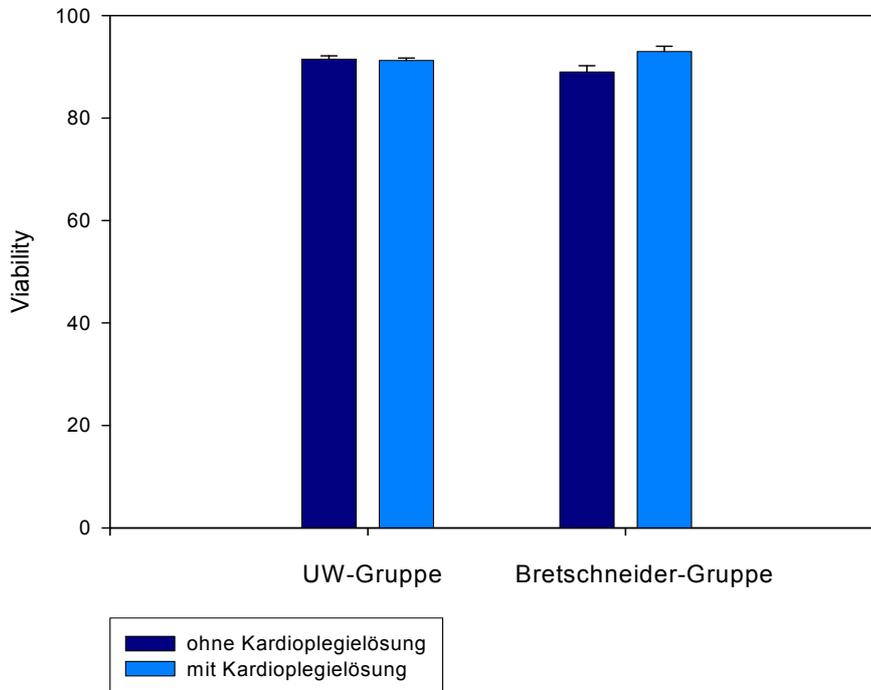


Abbildung 30: Vergleich der Zellvitalität (Viability) nach der Inkubation der PAEC bei 4°C über 4h unter dem Zusatz der Kardioplegielösungen UW-Lösung und Bretschneider-Lösung und den jeweiligen Kontrollzellkulturen, die der Kälte ohne Zusatz der Kardioplegielösungen ausgesetzt waren.

Die Vitalität der PAEC, die mit UW-Lösung beschichtet worden sind, ist annähernd gleich der der Kontrollgruppe ohne UW-Lösung. Bei der Behandlung der Zellen mit Bretschneider-Lösung besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe. Da die Kontrollgruppen bei einem direkten Vergleich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zellvitalität aufweisen, kann daraus geschlossen werden, dass die Bretschneider-Lösung bei vierstündiger Inkubation bei 4°C einen positiven Effekt auf die Zellvitalität hat und in dieser Konstellation der UW-Lösung überlegen ist.

4.3. CD31-Nachweis

Bei allen Zellkulturen der Kontroll- und Versuchsgruppen wurde mittels FACS die relative Anzahl an CD31-Molekülen untersucht. Der Nachweis des CD31-Moleküls als Endothelzellmarker (siehe 3.5.2.) garantiert, dass es sich bei den untersuchten Zellen tatsächlich um Endothelzellen handelt.

4.3.1. CD31-Nachweis nach ein-, vier- und sechsstündiger Inkubation bei 38°C und 4°C

Der CD31-Nachweis der Kontrollgruppen ist mit stets mehr als 90 % hoch positiv und zeigt damit, dass es sich bei den untersuchten Zellkulturen der Kontrollen um fast reine Endothelzellkulturen handelt.

Auffälligerweise zeigen die Zellkulturen der Versuchsgruppen, die gegenüber 4°C exponiert waren, einen geringeren CD31- Nachweis als ihre Kontrollkulturen. Der CD31-Nachweis der einzelnen Kulturen der einstündigen Versuchsgruppe schwankt zwischen 88,06 % und 95,06 % ($91,49 \pm 0,97$), der der Kulturen der vierstündigen Versuchsgruppe zwischen 77,64 % und 92,72 % ($84,66 \pm 2,14$) und der CD31-Nachweis der sechsstündigen Versuchsgruppe zwischen 84,30 % und 95,92 % ($90,25 \pm 1,75$). Von den insgesamt 18 untersuchten Paaren haben in 16 Fällen die Kontrollzellkulturen einen höheren Anteil an CD31-positiven Zellen als die jeweils dazugehörigen verbundenen Stichproben der Versuchsgruppe. Dieser Unterschied, der zwischen den bei Wärme (38°C) und den bei Kälte (4°C) inkubierten Zellen auftritt, ist statistisch signifikant.

1 h

4 h

6 h

| 38°C | 4°C | 38°C | 4°C | 38°C | 4°C |
|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| 95,60 | 92,40 | 90,74 | 77,64 | 90,02 | 89,10 |
| 97,00 | 91,46 | 95,08 | 92,72 | 96,58 | 95,92 |
| 93,26 | 88,06 | 90,68 | 86,50 | 94,54 | 86,92 |
| 95,60 | 89,90 | 90,90 | 86,46 | 93,72 | 84,30 |
| 94,26 | 92,08 | 90,40 | 80,64 | 97,00 | 92,66 |
| 91,06 | 95,06 | 92,46 | 83,98 | 91,36 | 92,62 |

Tabelle 3: CD31-Nachweis: Es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied in der CD31-Quantität zwischen den Zellen der Versuchs- und Kontrollgruppen. Bei den Zellen, die bei 38°C inkubiert wurden, zeigen im FACS durchschnittlich 5,85 % mehr CD31-Moleküle als die Zellen, die einer Temperatur von 4°C exponiert waren.

Vergleicht man den CD31-Nachweis der PAEC, die über 1h, 4h und 6h bei 4°C inkubiert wurden, miteinander, so besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der einstündigen und der vierstündigen Versuchsgruppe, sowie zwischen der vierstündigen und sechsstündigen Versuchsgruppe. Zwischen der einstündigen und der sechsstündigen kann allerdings kein signifikanter Unterschied beschrieben werden.

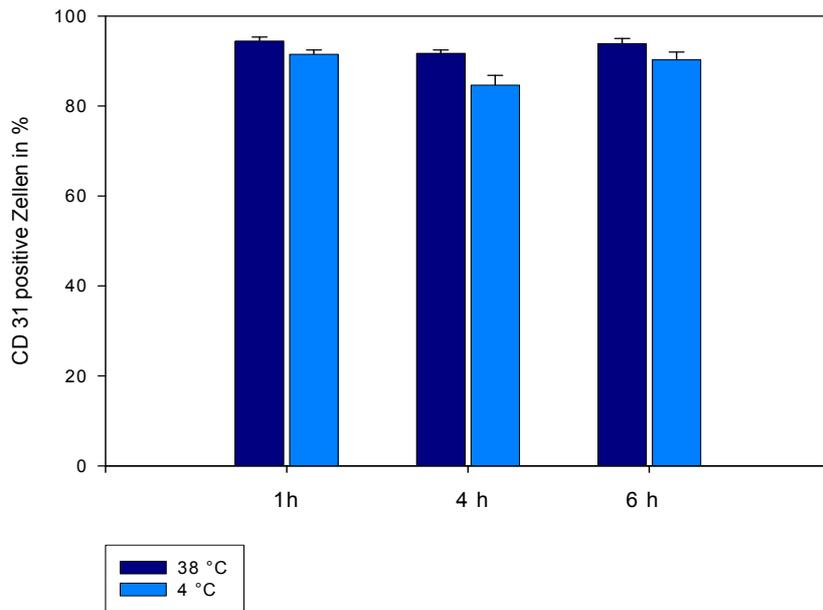
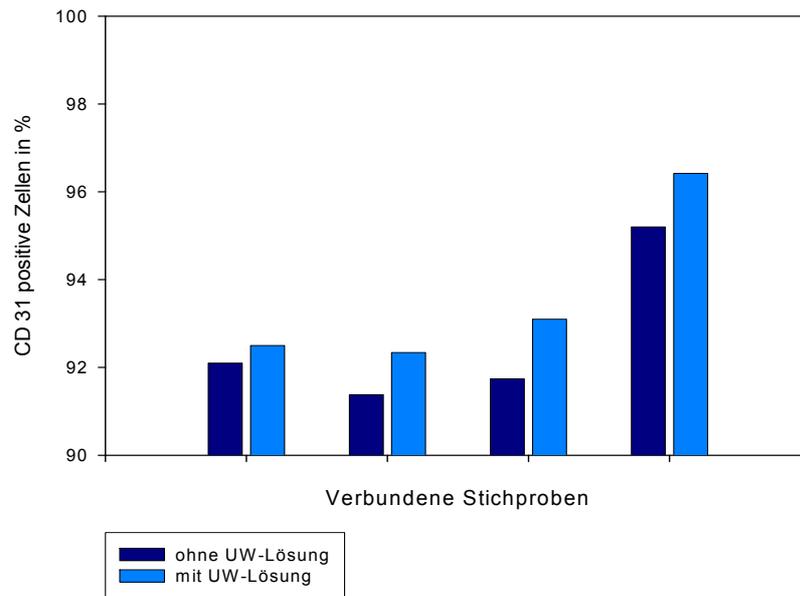


Abbildung 31: CD31-Nachweis auf PAEC nach ein-, vier- und sechsständiger Inkubation bei 4°C und 38°C.

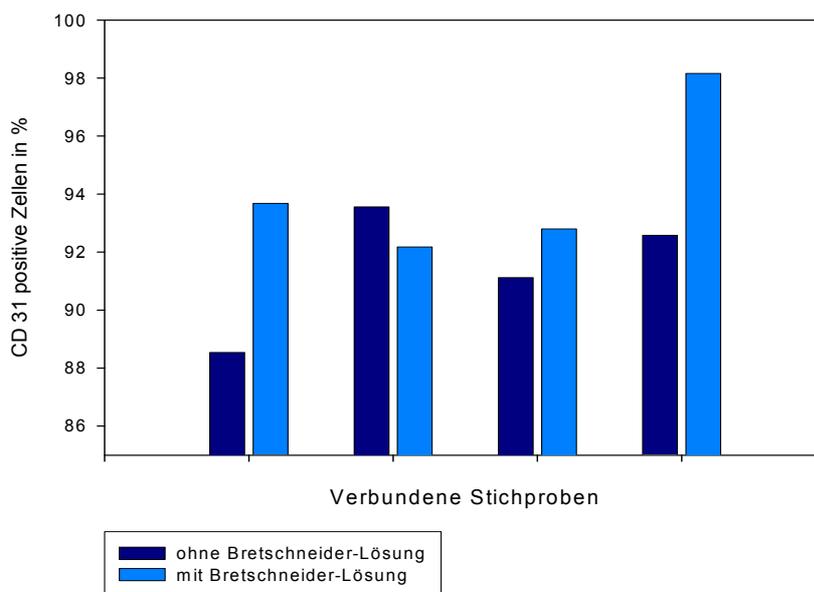
4.3.2. CD31-Nachweis nach der Inkubation mit den Kardioplegielösungen

Auch bei den Zellkulturen, die für die Experimente mit den Kardioplegielösungen verwendet wurden, handelt es sich um fast reine Endothelzellkulturen. In dieser Versuchsreihe wurden als Kontrollen Zellkulturen herangezogen, die über 4h bei 4°C ohne den Zusatz von Kardioplegielösungen gekühlt wurden. Diese Kulturen hatten jeweils einen Anteil an CD31-positiven Zellen von mindestens 88,54 % ($92,03 \pm 0,68$). Die Zellkulturen, die mit UW-Lösung über 4h bei 4°C inkubiert wurden, hatten jeweils mindestens 92,34 % ($93,59 \pm 0,96$) und die Zellkulturen mit Bretschneider-Behandlung jeweils mindestens 92,18% ($94,21 \pm 1,35$) CD31- positive Zellen.

Bei dem Vergleich der jeweiligen Kontrollgruppe mit der dazugehörigen Versuchsgruppe zeigt sich ein signifikanter Unterschied im CD31-Nachweis bei der Behandlung der Zellen mit UW-Lösung, aber kein signifikanter Unterschied bei der Behandlung mit Bretschneider-Lösung.



a)



b)

Abbildung 32: CD31-Nachweis auf PAEC nach vierstündiger Inkubation bei 4°C mit und ohne Zusatz von UW-Lösung bzw. Bretschneider-Lösung. Es besteht ein signifikanter Unterschied im CD31-Nachweis bei der Behandlung der Zellen mit UW-Lösung (a), aber kein signifikanter Unterschied bei der Behandlung mit Bretschneider-Lösung (b). Es muss allerdings betont werden, dass bei allen Zellkulturen mit einem Anteil an CD31 positiven Zellen von mindestens 88,54 % eine sehr hoher CD31-Nachweis erbracht wurde.

4.4. α -Gal-Nachweis

Die bisher beschriebenen Daten sind vor allem zur Sicherung der Methodik wichtig. Die Ergebnisse über den α -Gal-Nachweis hingegen sind die Zieldaten dieser Studie. Als statistische Größe wird jeweils die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (Mean) einer Zelle herangezogen. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zur Anzahl der Antigen-Antikörper-

Bindungsstellen und damit zur Anzahl der α -Gal-Epitope (siehe 3.6.4.). Außerdem wird auf den Anteil der α -Gal-positiven PAEC eingegangen.

4.4.1. α -Gal-Nachweis nach ein-, vier- und sechsständiger Inkubation bei 38°C und 4°C

Fast alle untersuchten porcinen Aortenendothelzellen, sowohl die der Versuchsgruppen als auch die der Kontrollgruppen, tragen α -Gal-Epitope auf ihrer Oberfläche. Die PAEC der einstündigen Kontrollgruppe sind zu $99,21 \pm 0,46$ %, die der vierständigen Kontrollgruppe zu $99,69 \pm 0,11$ % und die der sechsständigen Kontrollgruppe zu $99,66 \pm 0,07$ % α -Gal-positiv. Zwischen den Kontrollgruppen und den jeweiligen Versuchsgruppen bestehen in der Anzahl α -Gal-positiver Zellen keine signifikanten Unterschiede. Auch fast alle PAEC, die einer Temperatur von 4°C ausgesetzt waren, zeigen α -Gal-Epitope auf ihrer Oberfläche. Der Anteil α -Gal-positiver Zellen liegt bei den PAEC, die 1 h bei 4°C gekühlt waren, bei $99,75 \pm 0,09$ %, bei den PAEC, die 4 h bei 4°C gekühlt waren, bei $98,58 \pm 1,16$ % und bei den PAEC, die 6 h bei 4°C gekühlt waren, bei $98,90 \pm 0,66$ %. Auch bei der Betrachtung der einzelnen Versuchsgruppen miteinander kann kein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden.

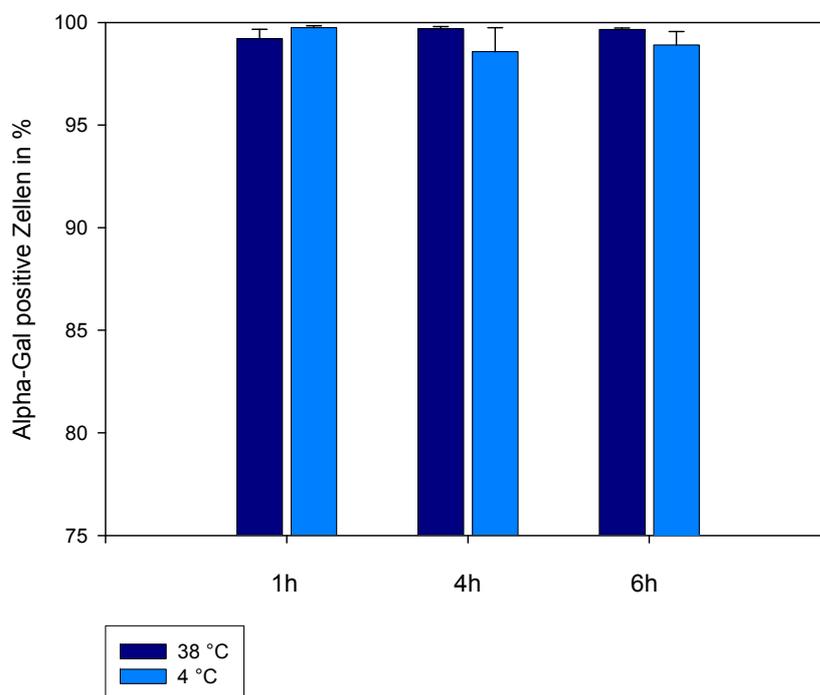


Abbildung 33: Einfluss der Hypothermie auf den Anteil α -Gal-positiver PAEC.

Im Weiteren wurde als Maß für die α -Gal-Quantität die durchschnittliche Fluoreszenzintensität einer Zelle (Mean) herangezogen. Doch auch hier kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchs- und Kontrollgruppen nachgewiesen werden.

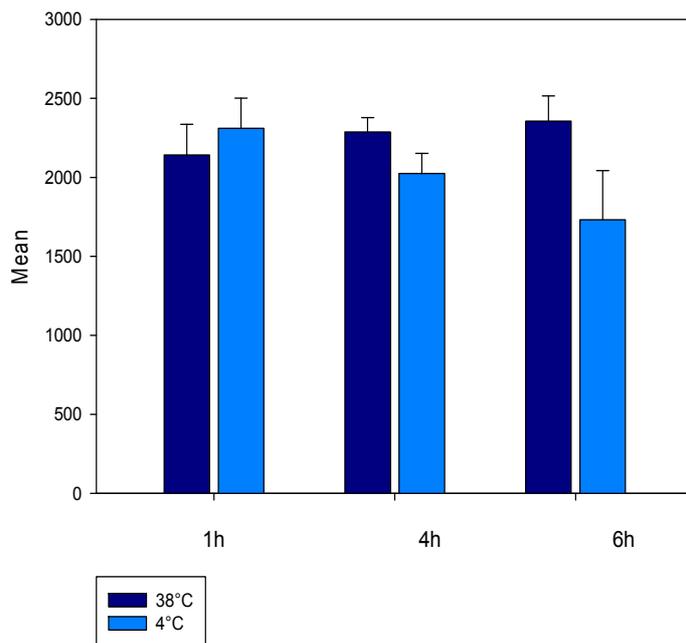
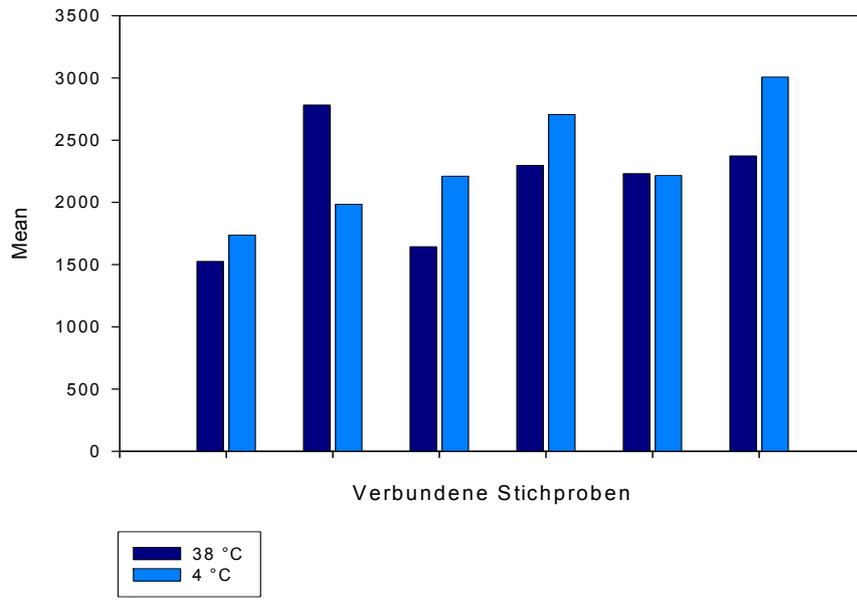


Abbildung 34: Einfluss der Hypothermie auf die α -Gal-Menge pro Zelle: Die Hypothermie von 4°C hat keinen signifikanten Einfluss auf die α -Gal-Epitope. In der FACS-Analyse besteht kein signifikanter Unterschied in den Mean-Werten zwischen einer Exposition der PAEC gegenüber 4°C oder 38°C.

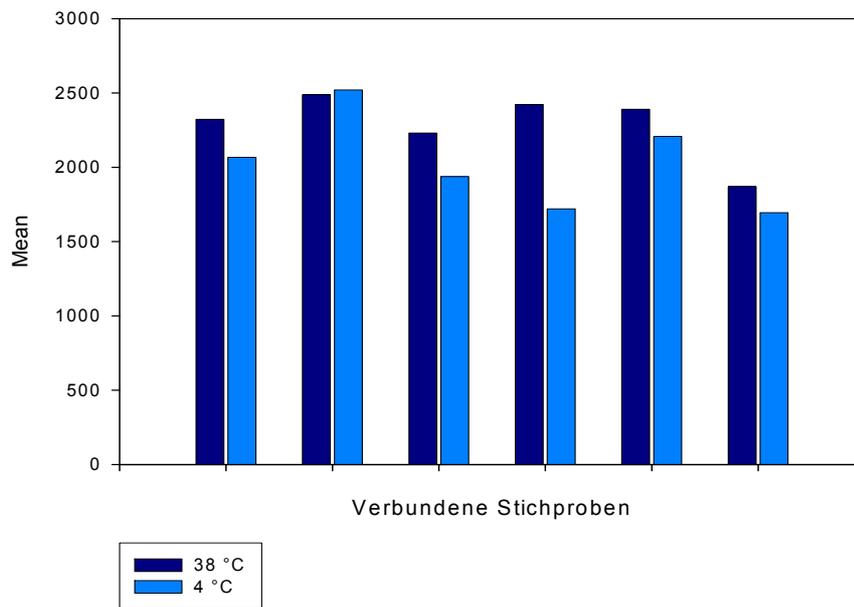
Der Mean der einstündigen Versuchsgruppe beträgt $2310,36 \pm 191,03$, der Mean der dazugehörigen Kontrollgruppe $2142,04 \pm 193,48$. Der Mean der PAEC, die über 4h bei 4°C inkubiert wurden, liegt bei $2024,44 \pm 127,88$ und der der PAEC der Kontrollgruppe bei $2287,06 \pm 90,92$. Der Mean der sechsständigen Versuchsgruppe beträgt $1731,45 \pm 311,07$ und der Mean der dazugehörigen Kontrollgruppe $2355,93 \pm 159,41$.

Zur Verdeutlichung der Ergebnisse werden in Abbildung 35 die einzelnen verbundenen Stichproben gegenübergestellt. Auffällig ist alleine der Meßwert der ersten Stichprobe in der 6h-Gruppe. Der Mean der bei 4°C gekühlten Zellen dieser Stichprobe ist 369,15, während der Mean der entsprechenden bei 38°C inkubierten Zellen bei 2635,27 liegt. Dies entspricht einer 85,99 % igen Reduktion der α -Gal-Menge im FACS. Diese Reduktion ist allerdings in den anderen Stichproben nicht reproduzierbar.

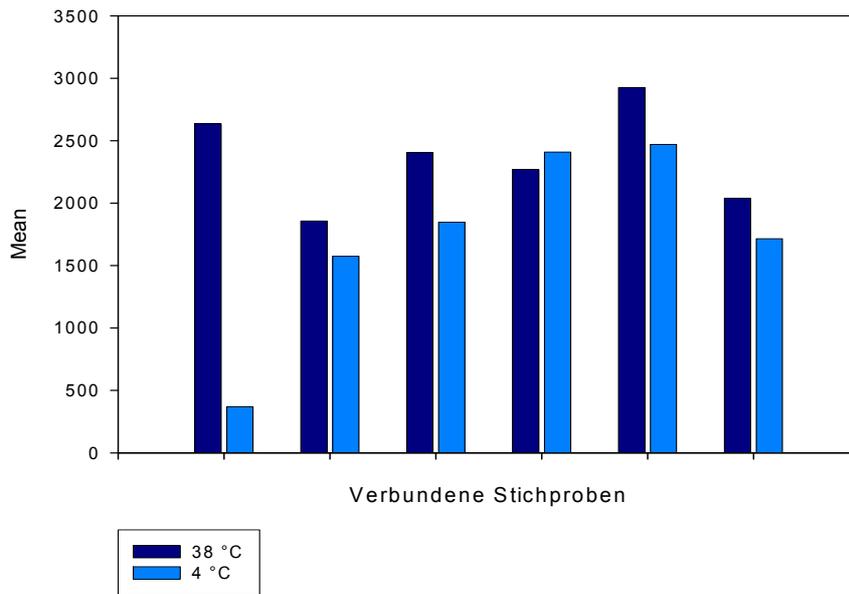
Wie bereits oben erwähnt, besteht statistisch kein signifikanter Unterschied im α -Gal-Nachweis zwischen den Zellen, die einer Temperatur von 4°C und denen, die einer Temperatur von 38°C exponiert waren. Auch bei verlängerter Kälteinkubation (6h vs 4h vs 1h) war keine signifikante Reduktion der α -Gal-Epitope nachzuweisen.



a)



b)



c)

Abbildung 35: Die Abbildungen a-c gehen auf die einzelnen Ergebnisse der Untersuchung zum Einfluss der Hypothermie auf die α -Gal-Epitope ein. Abbildung a) gibt die Ergebnisse der verbundenen Stichproben bei einstündiger Inkubation bei 4°C und 38°C wieder. Abbildung b) demonstriert die Ergebnisse bei vierstündiger Inkubation der PAEC bei 4°C und 38°C und Abbildung c) stellt die Ergebnisse bei sechsstündiger Inkubation der PAEC bei 4°C und 38°C dar.

Zwischen den Versuchs- und Kontrollgruppen bestehen keine signifikanten Unterschiede im α -Gal-Nachweis in der FACS-Analyse.

4.4.2. α -Gal-Nachweis nach der Einwirkung von Kardioplegielösungen

4.4.2.1. α -Gal-Nachweis nach vierstündiger Inkubation in UW-Lösung

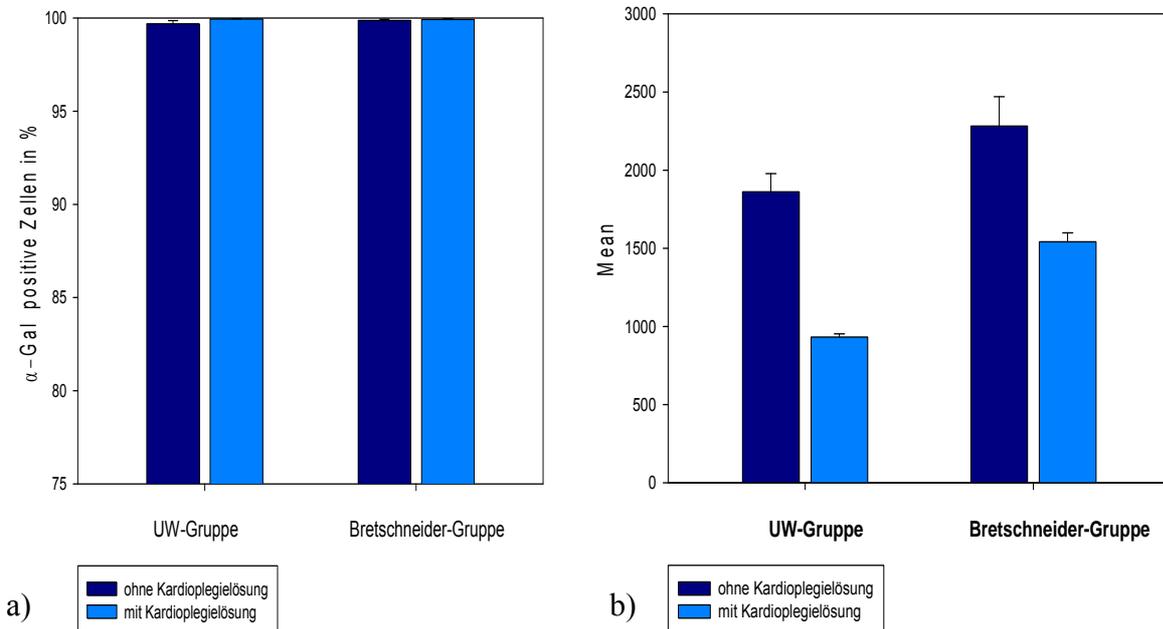


Abbildung 36: Einfluss der Kardioplegielösungen UW-Lösung und Bretschneider-Lösung auf die α -Gal-Epitope. a) Weder die UW- noch die Bretschneider-Lösung hat einen signifikanten Einfluss auf den Anteil α -Gal-positiver Zellen. Annähernd auf allen untersuchten PAEC können α -Gal-Epitope nachgewiesen werden. b) Die Behandlung der PAEC mit den Kardioplegielösungen führt aber zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl an α -Gal-Epitopen auf den einzelnen Zellen. Die UW-Lösung reduziert dabei die α -Gal-Epitope hoch signifikant um 50% ($P=0,006$). Die Bretschneider-Lösung reduziert die α -Gal-Epitope signifikant um 32% ($P=0,011$).

Die PAEC, die über 4 h bei 4°C unter dem Zusatz von UW-Lösung gekühlt wurden, sind zu $99,95 \pm 0,01$ % α -Gal-positiv. Auf allen PAEC können damit α -Gal-Epitope nachgewiesen werden. Die Zellen der Kontrollgruppe (4h bei 4°C ohne UW-Lösung) exprimieren ebenfalls zu beinahe 100 % ($99,69 \pm 0,17$ %) α -Gal-Epitope. Es besteht somit kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der α -Gal-positiven Zellen zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe.

Bei der Betrachtung der Mean-Werte stößt man allerdings auf einen hoch signifikanten Unterschied zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe ($P=0,006$). Der Mean der Zellen, die mit UW-Lösung behandelt wurden, beträgt $931,65 \pm 20,44$. Die Zellen der Kontrollgruppe hingegen weisen mit einem Mean von $1861,17 \pm 116,29$ eine weitaus höhere durchschnittliche Fluoreszenzintensität auf. Diese Unterschiede werden auch bei dem Vergleich der Mean-Werte der verbundenen Stichproben unterstrichen (siehe Abb. 37).

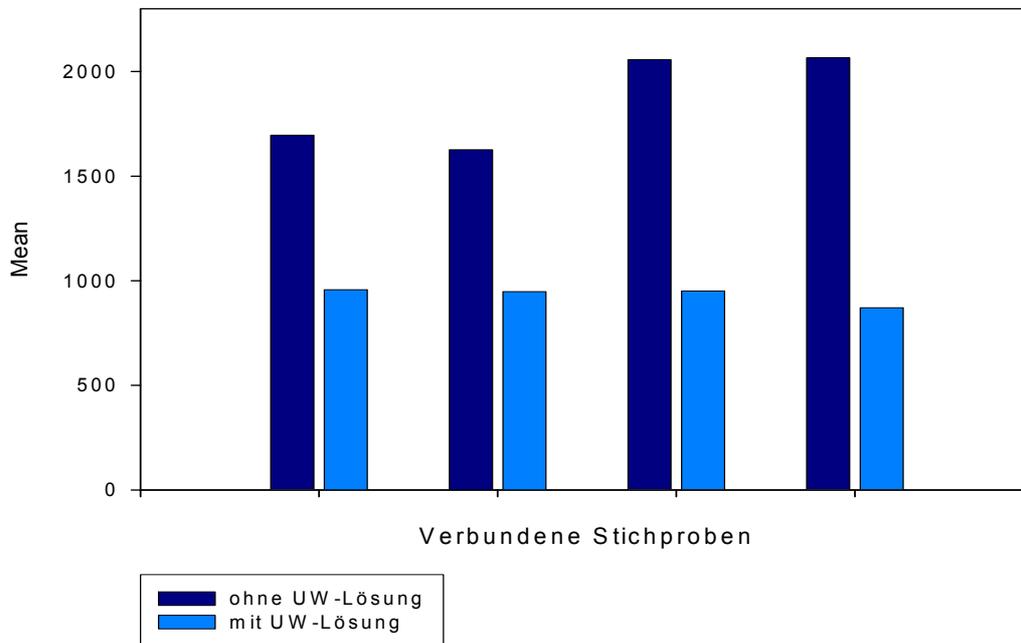


Abbildung 37: Verbundene Stichproben zur Untersuchung des Einflusses von UW-Lösung auf die α -Gal-Epitope. Es besteht ein hoch signifikanter Unterschied im α -Gal-Nachweis zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe.

Die Behandlung der PAEC mit der UW-Lösung führt zu einer hoch signifikanten Reduktion des Means im FACS und damit zu einer hoch signifikanten Reduktion der α -Gal-Nachweisbarkeit um 50%.

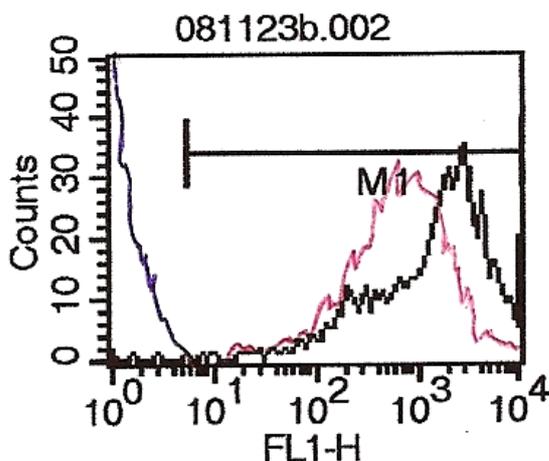


Abbildung 38: Einfluss von UW- Lösung auf die α -Gal-Epitope.

Die blaue Kurve stellt die Autofluoreszenz der PAEC dar, die schwarze Kurve ist die Messung der PAEC, die ohne UW-Lösung gekühlt wurden und die rote Kurve zeigt die PAEC der Versuchsgruppe, die unter dem Zusatz von UW-Lösung über 4h bei 4°C gekühlt wurden.

Die Behandlung der PAEC mit UW-Lösung führt zu einer hoch signifikanten Reduktion der α -Gal-Epitope in der FACS-Analyse um 50%.

4.4.2.2. α -Gal-Nachweis nach vierstündiger Inkubation in Bretschneider-Lösung

Die PAEC, die über 4 h bei 4°C unter dem Zusatz von Bretschneider-Lösung gekühlt wurden, sind zu $99,92 \pm 0,04$ % α -Gal-positiv. Auch hier können wieder auf allen PAEC der

Versuchsgruppe α -Gal-Epitope nachgewiesen werden. Es exprimieren auch die Zellen der Kontrollgruppe (4h bei 4°C ohne Bretschneider-Lösung) wiederum zu fast 100 % ($99,87 \pm 0,06$ %) α -Gal-Epitope auf ihrer Oberfläche. Es bestehen auch bei dieser Versuchsanordnung keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der α -Gal-positiven Zellen zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe.

Die Zellen, die mit Bretschneider-Lösung behandelt wurden, zeigen einen durchschnittlichen Mean von $1541,27 \pm 57,77$. Die PAEC hingegen, die ohne dem Zusatz der Bretschneider-Lösung gekühlt wurden, weisen einen Mean von $2281,51 \pm 187,97$ auf. Die Behandlung mit der Kardioplegielösung führt zu einer Reduktion der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität um 32%. Der Unterschied zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe ist statistisch signifikant ($P=0,011$).

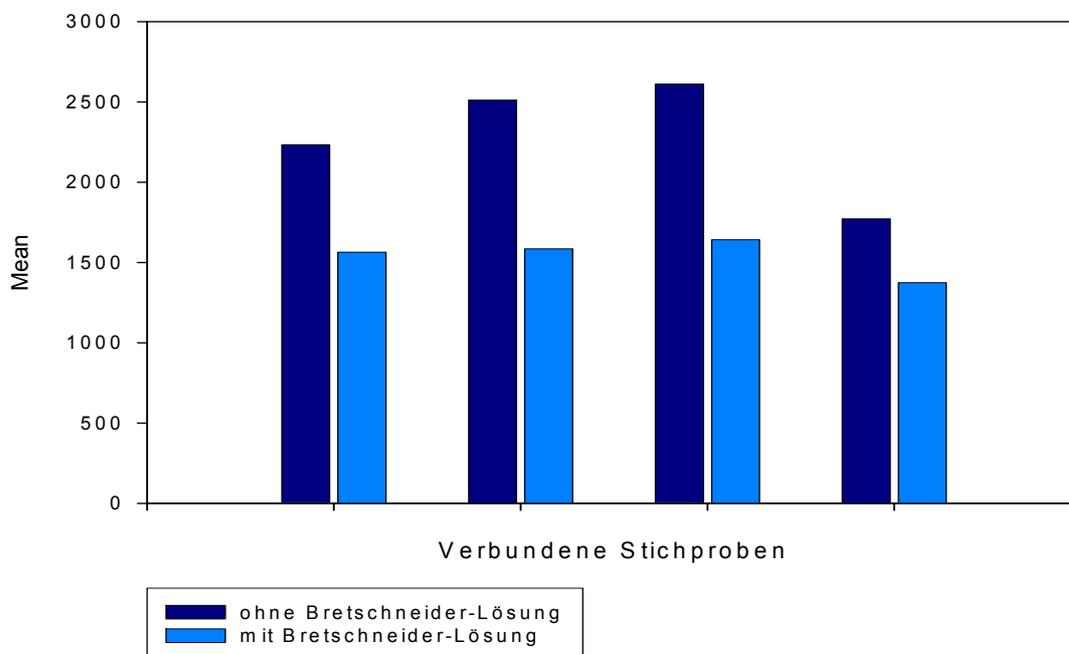


Abbildung 39: Verbundene Stichproben zur Untersuchung des Einflusses von Bretschneider-Lösung auf die α -Gal-Epitope. Es besteht ein signifikanter Unterschied im α -Gal-Nachweis zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe.

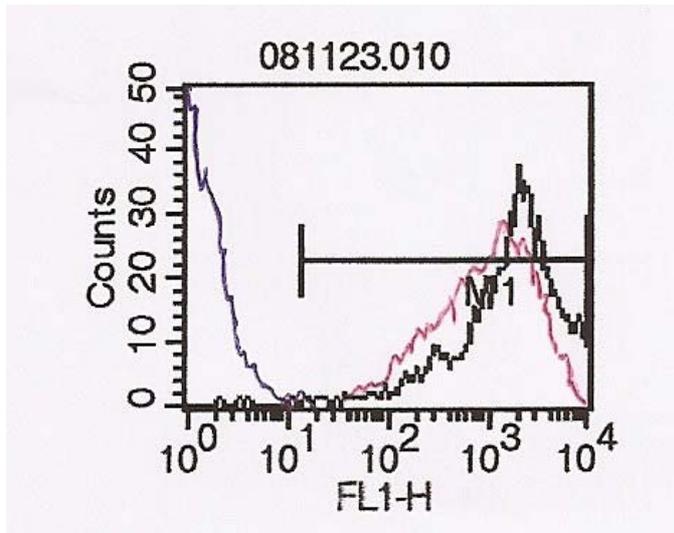


Abbildung 40: Einfluss von Bretschneider-Lösung auf die α -Gal-Epitope.

Die blaue Kurve stellt die Autofluoreszenz der PAEC dar, die schwarze Kurve ist die Messung der PAEC, die ohne Bretschneider-Lösung gekühlt wurden und die rote Kurve zeigt die PAEC der Versuchsgruppe, die unter dem Zusatz von Bretschneider-Lösung über 4h bei 4°C gekühlt wurden.

Die Behandlung der PAEC mit Bretschneider-Lösung führt zu einer signifikanten Reduktion der α -Gal-Epitope in der FACS-Analyse um 32%.

5. Diskussion

Zunächst soll an dieser Stelle auf die Pathophysiologie des Ischämie-/Reperfusionsschadens eingegangen werden, um die Problematik des Ischämie-/Reperfusionsschadens noch einmal zu verdeutlichen. Bei der Diskussion der Ergebnisse, in deren Rahmen verschiedene Kalt-Ischämiezeiten untersucht wurden, muss diese Problematik stets bedacht werden.

Außerdem sollen die beiden zentralen Maßnahmen, die zur Reduktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens in der Transplantationsmedizin angewandt werden, beleuchtet werden: Die Hypothermie und die Applikation von Kardioplegielösungen sowie der Einfluss dieser beiden Faktoren auf die α -Gal-Epitope steht im Focus dieser Studie.

5.1. Der Ischämie-/Reperfusionsschaden

Sowohl bei der Allotransplantation, wie auch bei der Xenotransplantation erleiden die Spenderherzen einen Ischämie-/Reperfusionsschaden. Dieser führt zu einer myozytären Zellschädigung bis hin zum Zelltod und ist mit Hauptursache für die primäre Transplantatdysfunktion.

Bereits nach wenigen Sekunden, in denen die Organe der Kalt-Ischämie ausgesetzt sind, kommt es zu metabolischen und funktionellen Veränderungen des Zellmilieus. Die Ischämie führt so zum Beispiel zu einer gestörten transmembranen Ionenbalanz, einer Reduktion des oxidativen Metabolismus, einer verminderten ATP-Produktion, einer Verminderung der Kreatinphosphatreserven und zu einer zunehmenden Gewebsazidose (siehe Tabelle 4) (Hearse 1998). Diese Veränderungen sind initial reversibel, gehen aber bei einer zunehmenden Ischämiedauer in einen irreversiblen Zustand über, der zwangsläufig zu Zelltod und Gewebsnekrose führt. Dies bedeutet, dass mit der Zunahme der Ischämiezeit der Anteil an Myozyten steigt, die irreversibel geschädigt sind und der Anteil an Myozyten, die nach erfolgter Reperfusion wieder die Myokardfunktion aufnehmen können, abnimmt. Diese Ausführungen machen deutlich, dass eine möglichst frühe Reperfusion für das Überleben ischämischen Myokardgewebes notwendig ist.

Doch auch die Reperfusion selbst führt zur Myozytenschädigung. In der Reperfusionsphase kommt es durch das Einströmen von warmem Blut zu einer erneuten Zufuhr von Sauerstoff und Substraten, die in diesem Fall eine Inflammation auslösen und zu einer weiteren Myozytenschädigung führen (Brenner 2003). Vor allem trägt eine gestörte Kalzium-Homöostase verbunden mit einer veränderten Kalzium-Sensitivität der kontraktilen Proteine (Hearse 1998) und das Auftreten von freien Sauerstoffradikalen und oxidativem Stress (Bolli 1988) zu der Zellschädigung während der Reperfusionsphase bei. Die Myozytenschädigung,

die durch die Reperfusion bedingt ist, ist großteils reversibel. Sie zeigt sich klinisch in dem sogenannten „Myocardial stunning“, einer kontraktiven Dysfunktion, die nach der Reperfusion trotz fehlender Nekrose besteht und von vorübergehender Dauer ist. Das Herz erholt sich nach Tagen von diesem Kontraktilitätsdefizit (Hearse 1991). Eine andere Form des reversiblen Reperfusionsschaden ist das Auftreten von Rhythmusstörungen wie Kammerflimmern während der frühen Reperfusionsphase. Diese Arrhythmien werden ebenfalls als ein Ausdruck reversibler Zellschädigung gewertet, da sie oft selbst limitierend sind oder elektrisch konvertiert werden können (Hearse 1998). Ob die Reperfusion auch zu einer letalen Schädigung der Myozyten führen kann, wird seit jeher sehr kontrovers diskutiert, wie der Bericht von K. Przyklenk über eine Umfrage unter Experten zu diesem Thema deutlich macht (Przyklenk 1997).

| <u>Sekunden</u> | <u>Minuten</u> | <u>Stunden</u> |
|--|---|---|
| Akutes Kontraktilitätsversagen Reduktion des mitochondrialen oxidativen Stoffwechsels Gestörte transmembrane Ionenbalanz Akkumulation von NADH Verminderte ATP-Produktion Verminderung der Kreatinphosphat-Reserven Leakage an Kalium ST-Segment-Veränderungen Akkumulation von Na ⁺ u. Cl ⁻ Katecholaminfreisetzung Stimulation der Adenylatzyklase Stimulation der Glykogenolyse Nettoverbrauch von hochenergetischem Phosphat | Akkumulation von Protonen, CO ₂ u. anorganischen Phosphaten Stimulation der Phosphofruktokinase-Aktivität Anstieg des glykolytischen Flusses Intrazelluläre Azidose Blockade des mitochondrialen Elektronentransports Unterdrückung der Fettsäureoxidation Verbrauch an Glykogen Anstieg der LDH u. GPDH-Aktivität Zunehmende Erschöpfung der Energiereserven Zunehmendes zelluläres Ödem Leakage an Mg-Ionen Hemmung der Glykolyse Geringe ultrastrukturelle Veränderungen wie mitochondriale Schwellung Möglicher Beginn der Kontraktur | Lysosomale Veränderungen Aktivierung von Hydrolasen und Lipoproteinlipasen Verlust der mitochondrialen Atmungskettenkontrolle Unspezifische EKG-Veränderungen Strukturelle Veränderungen in Mitochondrien und Myofibrillen Verlust mitochondrialer Komponenten Verlust von Makromolekülen in den Lymphraum und das Interstitium Membranzerstörung Enzym-Leakage Zelluläre Autolyse |

Tabelle 4: Auswirkung der Ischämie auf die myokardiale Zelle eines allogenen/xenogenen Herztransplantats (nach Hearse 1998). Die zeitlichen Übergänge sind hierbei als fließend anzusehen.

Neben der myozytären Schädigung durch die Ischämie-/Reperfusionereignisse kommt es auch zu einem pathologischen Geschehen am Transplantatgefäßendothel, das keinesfalls zu vernachlässigen ist. Im Rahmen des Ischämie-/Reperfusionsgeschehens wird am Gefäßendothel eine akute Entzündungsreaktion ausgelöst. Dabei fungieren freie Sauerstoffradikale (Granger 1993, Laude 2004) und oxidativer Stress (Lange 2008) als Trigger. In der Ischämiephase kommt es zu einer Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, ELAM-1 oder VCAM-1 an den Gefäßendothelzellen (Brenner 2003, Lange 2008) sowie zu einer Freisetzung von Zytokinen und einer Komplementaktivierung (Monsinjon 2001), was in die Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten mündet (Vinten-Johansen 2004). In der Reperusionsphase folgen anschließend die Leukozytenadhäsion, die Leukozytentransmigration, das Freisetzen von proteolytischen Enzymen wie sauren Hydrolasen und Elastasen aus neutrophilen Granulozyten, eine vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen und eine weitere Produktion von Zytokinen (Vinten-Johansen 2004). Eines dieser Zytokine, das eine besonders bedeutende Rolle im Ischämie-/Reperusionsgeschehen spielt, ist TNF- α . TNF- α induziert die Aktivierung der Xanthin-Oxidase und der NAD(P)H-Oxidase und bewirkt damit wiederum die Bildung von neuen Sauerstoffradikalen (Zhang 2006, Durán 2008). Der gesamte Mechanismus führt schließlich zu einer endothelialen Dysfunktion mit fehlender Möglichkeit einer adäquaten Vasodilatation. Die Pathogenese des Ischämie-/Reperusionschaden ist aufgrund ihrer Komplexität noch nicht gänzlich aufgeschlüsselt und wirft weiterhin viele Fragen auf.

5.2. Maßnahmen zur Reduktion des Ischämie-/Reperusionschadens

In den obigen Ausführungen wird deutlich, dass eine entscheidender Punkt zur Erhaltung einer guten Transplantatfunktion die Minimierung des Ischämie-/Reperusionschaden ist. Die beste Möglichkeit dazu ist eine sehr frühe Reperfusion. Ist diese nicht möglich, müssen Maßnahmen ergriffen werden, die zu einer Verlangsamung der Entstehung des Ischämieschadens führen und die die Schwelle für den Übergang von dem reversiblen zum irreversiblen Zellschaden hinauszögern. In der Transplantationsmedizin werden zur myokardialen Protektion zwei Prinzipien angewandt: die Hypothermie und die Applikation von Kardioplegielösungen.

Die Hypothermie führt zu einer Reduktion der Stoffwechselfvorgänge und zu einer Minimierung des Energieumsatzes (Brenner 2003). Dabei gehorchen die Enzymsysteme mathematisch dem Vant Hoff'schen Gesetz: pro 10°C Temperaturabfall reduziert sich die Enzymaktivität um das 1,5 bis 2,0 fache (Jahania 1999). Neben der Reduktion der

metabolischen Aktivität übt die Hypothermie zudem einen stabilisierenden Effekt auf die Zellmembranen aus (Brenner 2003) und verlangsamt die Lyse der Zellorganellen wie der Lysosomen (Jahania 1999). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Hypothermie die ischämiebedingt gesteigerte Gefäßpermeabilität vermindert (Fischer 1999) und die ischämischbedingte Endothelzellaktivierung verzögert (Johnson 1995, Haddix 1996).

Zur Kühlung der Organe werden verschiedene Verfahren angewandt. In der Klinik hat sich die Kaltlagerung der Organe bei 4°C durchgesetzt. Ein andere Möglichkeit ist die Perfusionskühlung, bei der kontinuierlich eine kalte Perfusionslösung in das Gefäßsystem des Organs infundiert wird. Dieses aufwendigere Verfahren hat in Tierversuchen Vorteile gezeigt, wie die Reduktion der Laktatakkumulation, (Nutt 1991, Oshima 2005, Rosenbaum 2008), konnte sich im klinischen Alltag bislang aber nicht durchsetzen.

Die zweite Säule zur Reduktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens ist die Anwendung von Kardioplegielösungen bzw. Preservationslösungen. In dieser Arbeit wird vor allem der Begriff Kardioplegielösung benützt, da bei der Herztransplantation in der Regel ein und dieselbe Lösung für die Kardioplegie und die Organpreservation verwendet wird. Die Kardioplegielösungen reduzieren den Ischämie-/Reperfusionsschaden, da sie folgende Funktionen erfüllen: erstens ermöglichen sie durch die Reduktion des transmembranösen Kaliumgradienten einen schnellen Herzstillstand (Jahania 1999, Brenner 2003), zweitens minimieren sie den Fluss der intrazellulären Ionen entsprechend dem Konzentrationsgradienten in den Extrazellulärraum und drittens enthalten die Lösungen Substanzen, die der Erhaltung der Energieproduktion (z.B. Glukose, Aminosäuren), der Azidosevermeidung (Puffer wie Bicarbonat, Phosphate, Histidin), der Membranstabilisierung (z.B. Steroide, Procain, Calciumantagonisten) und der Ödemvermeidung (z.B. Mannitol) dienen (Yang 2005).

Je nach ihrem Ionengehalt werden intrazelluläre und extrazelluläre Kardioplegielösungen unterschieden. Intrazelluläre Lösungen wie die UW-Lösung, die Roe-Lösung, oder die Collins-Lösung haben eine Natriumkonzentration < 70 mmol/L und eine Kaliumkonzentration zwischen 30 und 125 mmol/L. Die extrazellulären Lösungen hingegen wie die Celsior-Lösung oder die St. Thomas Hospital-Lösung haben eine Natriumkonzentration ≥ 70 mmol/L und eine Kaliumkonzentration zwischen 5 und 30 mmol/L (Jahania 1999).

5.3. Vergleich von University of Wisconsin-Lösung und Bretschneider-Lösung

In dieser Studie zur Untersuchung des Einflusses der Kardioplegielösungen auf die α -Gal-Epitope wurden die beiden Kardioplegielösungen UW-Lösung und Bretschneider-Lösung getestet. Bei beiden Lösungen handelt es sich um intrazelluläre Lösungen, die beide Standardlösungen für die Kardioplegie und Organpreservation darstellen. Im Folgenden sollen kurz die beiden Lösungen miteinander verglichen werden, um bei der Diskussion der Ergebnisse dieser Studie, darauf Bezug nehmen zu können.

Die UW-Lösung wurde ursprünglich als Lösung für die Transplantation, vor allem die Pankreastransplantation konzipiert (Wahlberg 1986). Die Bretschneider-Lösung hingegen wurde primär für die Kardioplegie entwickelt, wurde schließlich aber auch in mehr und mehr Transplantationszentren als Preservationslösung bei der Transplantation von Leber, Niere, Pankreas, Herz und Lunge eingesetzt (Yang 2005). Dies führte dazu, dass zahlreiche Studien zum Vergleich dieser beiden Lösungen angelegt wurden, um die bessere Lösung für die Organpreservation zu finden.

Bei der Nierentransplantation konnten keine signifikanten Unterschiede in der Organkonservierung mit UW-Lösung oder Bretschneider-Lösung hinsichtlich dem Transplantatüberleben (Lynch 2008) und dem Patientenüberleben (Agarwal 2006, Lynch 2008) nachgewiesen werden. Gleiche Ergebnisse lieferten Studien zur Transplantation von Darmsegmenten (Mangus 2008). Bei der Lebertransplantation zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede in dem Transplantat- und Patientenüberleben, allerdings traten bei der Preservation mit UW-Lösung mehr arterielle Komplikationen auf als in der Bretschneider-Vergleichsgruppe (Rayya 2008). Bei der Pankreastransplantation scheint die UW-Lösung überlegen. So weisen die Organe, die mit UW-Lösung behandelt wurden ein längeres Transplantatüberleben als die Organe der Bretschneider-Vergleichsgruppe auf (Stewart 2008). Bei dem Vergleich der beiden Lösungen in der Herztransplantation sind die Ergebnisse nicht ganz so eindeutig. Zum Teil liefern die Studien sogar widersprüchliche Resultate. Während Reichenspurner et al. über eine Gleichwertigkeit der beiden Lösungen hinsichtlich der postoperativen kardialen Funktion in der humanen Allotransplantation berichten (Reichenspurner 1994), beschreiben Ku et al. bei der Transplantation von Rattenherzen bessere Ergebnisse in der kardialen Funktion bei der Organpreservation mit Bretschneider-Lösung (Ku 1997). Bei sehr langen Ischämiezeiten > 4 h soll die Organpreservation mit der UW-Lösung klare Vorteile hinsichtlich der kardialen Funktion, der klinischen Ergebnisse und der hämodynamischen Erholung bieten (Human 1993, Reichenspurner 1994). Bei dem Vergleich der beiden Lösungen hinsichtlich arrhythmischer Komplikationen, schneidet die

Bretschneider-Lösung besser ab. Zwar besteht kein Unterschied in der Inzidenz von Arrhythmien während der Reperfusionphase, doch treten in der postoperativen Phase weniger Arrhythmien bei der Organpreservation mit Bretschneider-Lösung auf (Careaga 2001). Unterschiedliche Meinungen bestehen vor allem bei der Frage, welche Lösung Vorteile hinsichtlich der Erhaltung endothelialer Strukturen und Funktionen bietet. Saitoh et al. beschreiben in ihrer Studie mit Rattenherzen einen besseren Schutz der Koronargefäße mit Bretschneider-Lösung (Saitoh 2000). Auch Yang et al. postulieren entsprechend ihrer Studie an porcinen Koronargefäßen einen Vorteil der Bretschneider-Lösung hinsichtlich der EDHF-vermittelten endothelialen Funktion (Yang 2004). Stringham et al. hingegen zeigen in ihrer Studie, dass die UW-Lösung trotz ihres hohen Kaliumgehalts scheinbar zu keiner vermehrten endothelialen Zellschädigung führt, sondern vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich des Transplantatüberlebens und der kardialen Transplantatvaskulopathie aufweist (Stringham 1999). Andere Studien beschreiben sogar Vorteile in der Endothelprotektion durch die UW-Lösung (Trieb 1997, Eberl 1999). So soll die UW-Lösung die endothelialen Strukturen im Vergleich zur Bretschneider-Lösung besser bewahren und nur in einem sehr geringen Maß zu Veränderungen der Mitochondrien, des endoplasmatischen Retikulums, der Zellkerne und des Zytoskeletts führen (Eberl 1999).

Derzeit finden beide Kardioplegielösungen in der Klinik Anwendung, wobei die Entscheidung, mit welcher Lösung gearbeitet wird, abhängig vom Transplantationszentrum bzw. vom Ex-/und Implantateur ist.

5.4. Diskussion der Ergebnisse dieser Studie

5.4.1. Einfluss der Kälte und der Kardioplegielösungen auf die PAEC

Wie bereits erwähnt, sind die Hypothermie bei 4°C und die Applikation von Kardioplegielösungen Maßnahmen, die den myozytären Ischämie-/Reperfusionsschaden mildern und so überhaupt die Organtransplantation ermöglichen. Während diese beiden Prinzipien zur Protektion der Myozyten beitragen, haben sie gleichzeitig einen schädigenden Effekt für die Endothelzellen, der zusätzlich den ischämisch bedingten Endothelzellschaden aggraviert. Dieser kontroverse Effekt liegt in der unterschiedlichen Struktur und Funktion der kardialen Myozyten und Endothelzellen begründet (Yang 2005).

Kälte an sich führt zu einer Endothelzellschädigung (Jamieson 2008). So bedingt sie zum Beispiel eine vermehrte Mikrovillifusion, Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung und führt auf diese Weise schließlich zum Verlust der Zell-Zell-Verbindungen (Parolari 2002).

Auch die Kardioplegielösungen, vor allem die hyperkaliämischen Lösungen sollen die Endothelzellen negativ beeinflussen. Dieser Punkt wird allerdings kontrovers diskutiert, wie bereits bei der Erörterung der Vor- und Nachteile der hyperkaliämischen UW-Lösung, aufgezeigt wurde (siehe 5.3.). So sollen die hyperkaliämischen Kardioplegielösungen zu einer Abnahme der endothelial-vermittelten Vasodilatation führen, indem sie die Konzentration von endothelium-dependent hyperpolarization factor (EDHF) und endothelium-dependent nitric oxide (EDNO) vermindern (Jahania 1999, Yang 2005).

In dieser Studie dient die Kontrolle der Zellmorphologie, der Zellvitalität und des CD31-Nachweises vor allem der Validierung der Methodik, sie lässt aber auch Schlüsse über eben genannte Effekte der Hypothermie und der Kardioplegielösungen zu.

Weder nach ein- und vierstündiger, noch nach sechsstündiger Kälteexposition sind im Lichtmikroskop Hinweise auf eine Endothelzellschädigung nachweisbar. Diese Ergebnisse stimmen mit Morphologiestudien von Hildago und seinen Kollegen überein, die eine Toleranz der Endothelzellen gegenüber einer dreistündigen Exposition von 4°C beschreiben (Parolari 2002). Entsprechend unserer Ergebnisse zur Zellmorphologie scheinen die PAEC auch eine vier – und sechsstündige Kälteexposition zu tolerieren. Die Inkubation der Zellen mit den Kardioplegielösungen UW-Lösung und Bretschneider-Lösung haben ebenfalls keine morphologischen Veränderungen der Zellen als Folge.

Hinsichtlich der Vitalität bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Zellen, die bei 4°C und bei 38°C inkubiert wurden. Setzt man die Vitalität in Abhängigkeit mit der Dauer der Kälteexposition, sieht man sehr hohe Vitalitätsnachweise von über 90 % bei Inkubationszeiten bis zu vier Stunden und eine Vitalitätsabnahme unter die 90 %-Hürde bei sechsstündiger Kälteexposition. Allerdings ist der durchschnittliche Vitalitätsnachweis der sechsstündigen Versuchsgruppe mit $88,83 \pm 3,30$ immer noch sehr hoch, sodass keinesfalls von einer starken Reduktion der Vitalität zu sprechen ist.

Die Zellen, die mit UW-Lösung oder Bretschneider-Lösung über 4 h bei 4°C inkubiert wurden, zeigen ebenfalls eine sehr hohe Vitalität. Während zwischen der Versuchsgruppe mit UW-Behandlung und der dazugehörigen Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede gesehen werden, besteht zwischen der Inkubation der Zellen mit und ohne Bretschneider-Lösung ein signifikanter Unterschied. Die Zellen mit Bretschneider-Behandlung weisen eine höhere Vitalität auf als die Zellen der Kontrollgruppe. Diese Beobachtungen lehnen sich an Erfahrungen aus den 80er Jahren an, die eine Heterogenität der verschiedenen Kardioplegielösungen in ihrer Zelltoxizität zeigen. Die Bretschneider-Lösung ist dabei eine Lösung, die die Zellvitalität bewahrt und den Anteil der vitalen Zellen nicht reduziert

(Parolari 2002). Die UW-Lösung demonstriert in unserer Studie keine besondere Schutzfunktion hinsichtlich der Vitalität, genausowenig aber kann ein negativer Einfluss auf die Vitalität beschrieben werden. Es muss konstatiert werden, dass entsprechend der Ergebnisse dieser Studie, die Kardioplegielösungen UW-Lösung und Bretschneider-Lösung bei vierstündiger Inkubation zu keiner Verminderung der Endothelzellvitalität führen, die Bretschneider-Lösung sogar protektive Eigenschaften zeigt.

Als dritter Marker für die Endothelzellschädigung wurde der CD31-Nachweis herangezogen, da diese mit einer Reduktion der CD31-Moleküle einhergeht (Dragun 2001). Die einzelnen Funktionen des Zelladhäsionsmoleküls CD31 wurden bereits in Punkt 3.5.2. beschrieben. Dass ein geringerer CD31-Nachweis nach Kälteexposition tatsächlich auf die Behandlung der Zellen zurückzuführen und nicht mit dem Vorliegen von unreinen, gemischten Zellkulturen zu erklären ist, kann aus Ergebnissen unserer Vorversuche geschlossen werden. Im Rahmen der Vorversuche (siehe 3.7.) wurden circa 50 Zellkulturen auf die C31-Expression hin untersucht. Alle diese Zellkulturen, die wie die Zellkulturen der Versuchsgruppen behandelt wurden, waren reine Endothelzellkulturen ($> 90\%$ CD 31 positiven Zellen). Ein gehäuftes zufälliges Auftreten unreiner Kulturen ausnahmslos in der Versuchsgruppe mit Kälteexposition erscheint sehr unwahrscheinlich.

Obwohl alle Kontroll- und Versuchsgruppen einen hohen CD31-Nachweis erbringen, können signifikante Unterschiede zwischen der Inkubation der Zellen bei 4°C oder 38°C gesehen werden. Bei dem direkten Vergleich der verbundenen Stichproben zeigen die Kontrollgruppen in 16 von 18 Fällen eine höheren CD31-Nachweis als die Versuchsgruppen. Die Unterschiede in der CD31-Quantität sind mit durchschnittlich $5,58\%$ als gering zu bewerten. Die Ergebnisse lassen zwar auf eine Schädigung der Endothelzellen durch die Hypothermie schließen, doch muss betont werden, dass diese sehr gering ist. Eine Korrelation zwischen der Dauer der Kälteinkubation und dem CD31-Nachweis kann nicht gefunden werden.

Anders als bei dem Nachweis der Zellvitalität besteht beim CD31-Nachweis ein signifikanter Unterschied zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe bei UW-Behandlung, aber kein signifikanter Unterschied bei der Bretschneider-Behandlung. Der Anteil an CD31-positiven Zellen mit UW-Behandlung ist stets höher als der Anteil in der verbundenen Stichprobe, was auf einen protektiven Effekt der UW-Lösung hinweist. Aber auch hier muss wiederum betont werden, dass alle Zellkulturen, auch die der Kontrollgruppe einen hohen CD31-Nachweis zeigen und daher keine schwerwiegenden Aussagen für eine gravierende Endothelzellschädigung- oder protektion durch die UW-Lösung oder Bretschneider-Lösung abgeleitet werden können.

Zusammenfassend kann geurteilt werden, dass die porcinen Aortenendothelzellen in vitro selbst eine sechsstündige Hypothermie gut tolerieren. Die Bretschneider-Lösung, wie auch die hyperkaliämische UW-Lösung führen bei vierstündiger Exposition ebenfalls zu keiner gravierenden Endothelzellschädigung, sondern zeigen sogar teils protektive Effekte hinsichtlich Zellvitalität und CD31-Nachweis.

5.4.2. Einfluss der Kälte auf die α -Gal-Epitope

In den Perfusionsversuchen, die 1996 im Institut für Chirurgische Forschung der LMU durchgeführt worden waren, konnten positive Effekte der Kalt-Ischämiezeit auf die hyperakute Xenotransplantatabstoßung gezeigt werden. Die Herzen mit vierstündiger IZ liefen genauso lange wie Herzen mit einstündiger bzw. vierstündiger IZ und jeweils zusätzlicher Immunadsorptionsbehandlung (siehe auch 2.1.) (Brenner 2000 a, Brenner 2003). Allerdings konnten mit der damaligen Studie keine definitiven Aussagen darüber gemacht werden, welcher Faktor der Kalt-Ischämiezeit diese Ergebnisse verursacht. In dieser Studie wurde nun zum einen der Faktor Kälte isoliert untersucht, um seinen Einfluss auf die α -Gal-Epitope zu beleuchten.

Alle PAEC der Kontrollgruppen, die bei 38°C inkubiert worden waren, exprimieren α -Gal-Epitope. Dies schließt sich an die bereits häufig gezeigte Erkenntnis an, dass annähernd alle porcinen Endothelzellen (z.B. Rayat 1998) zu einem hohen Maße α -Gal-Epitope exprimieren (Galili 1998, Galili 2001). Aber auch alle PAEC, die über 1h, 4h oder 6h einer Temperatur von 4°C exponiert waren, tragen α -Gal-Epitope auf ihrer Oberfläche. Die Kälte führt damit zu keiner Reduktion der α -Gal-positiven Zellen. Auch können keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der α -Gal-Epitope pro Zelle zwischen den Kontroll- und Versuchsgruppen nachgewiesen werden. Die Hypothermie von 4°C zeigt weder nach einer Stunde, vier Stunden noch sechs Stunden einen signifikanten α -Gal-Epitop-reduzierenden Effekt. Auffällig alleine ist der erste Messwert der sechsstündigen Versuchsgruppe, der eine Reduktion der α -Gal-Epitope nach sechsstündiger Kälteexposition um 85,99 % zeigt. Diese enorme Abnahme der Anzahl α -Gal-Epitope nach der Kühlung der Zellen bei 4°C ist einmalig und kann bei den anderen Stichproben dieser Gruppe nicht reproduziert werden. Er muss als einmaliger Ausrutscher gewertet werden. Eine sechsstündige Kalt-Ischämiezeit als mögliche Therapieoption der HAR alleine auf dem Vorliegen dieses Wertes basierend zu postulieren, wäre in Anbetracht des myokardialen Ischämie-/Reperfusionsschadens (siehe 5.1.) unverantwortlich.

Zusammenfassend muss gesagt werden, dass die Kälte keinen Einfluss auf die α -Gal-Nachweisbarkeit hat. Die Theorie, dass Kälte zu Veränderungen der Xenoantigene führt, muss aufgrund der Ergebnisse dieser Studie abgelehnt werden.

5.4.3. Einfluss der Kardioplegielösungen auf die α -Gal-Epitope

Wenn die Kälte keinen Einfluss auf die α -Gal-Epitope zeigt, kann der zweite Faktor, der während der kalten Ischämiezeit auf die α -Gal-Epitope wirkt nämlich die Kardioplegielösungen die Ergebnisse der Perfusionsversuche erklären?

Auch bei der Untersuchung des Einflusses der Kardioplegielösungen auf die α -Gal-Epitope wurde zum einen der Anteil α -Gal-positiver PAEC und zum anderen die durchschnittliche Fluoreszenzintensität einer Zelle, die direkt proportional der Anzahl von α -Gal-Epitopen auf einer Zelle ist, betrachtet. Auch nach einer vierstündigen Kühlung der PAEC mit UW-Lösung oder Bretschneider-Lösung zeigen sich keine Unterschiede zwischen den jeweiligen Versuchs- und Kontrollgruppen hinsichtlich des Anteils an α -Gal-positiven PAEC. Auch nach dem Einwirken der Kardioplegielösungen besitzen alle PAEC α -Gal-Epitope. Doch kann auf den PAEC, die mit einer Kardioplegielösung inkubiert wurden, eine signifikant geringere Anzahl an α -Gal-Epitopen pro Zelle nachgewiesen werden als in der Kontrollgruppe. Die Behandlung mit UW-Lösung führt zu einer hoch signifikanten Reduktion des α -Gal-Nachweises um 50 %. Die Bretschneider-Kardioplegie führt zu einer signifikanten α -Gal-Reduktion um 32 % im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Bretschneider-Lösung. Beide Kardioplegielösungen reduzieren somit die Anzahl der α -Gal-Epitope pro Zelle signifikant und können damit die Ergebnisse der Perfusionsversuche aus dem Jahr 1996 erklären.

Auffällig ist, dass in der UW-Gruppe stets eine Reduktion des Mean im FACS auf ca. 900 stattfindet. Dies lässt Vermutungen zu, ob nicht eine Art Grenze in der Anzahl der α -Gal-Epitope besteht, die durch die Einwirkung der UW-Lösung nicht unterschritten werden kann. Eine bestimmte Anzahl an α -Gal-Epitopen scheint gegenüber einer vierstündigen UW-Behandlung resistent und kann nicht eliminiert werden. Ob diese Grenze durch eine verlängerte Inkubationszeit unterschritten werden kann, sollte in weiteren Studien untersucht werden.

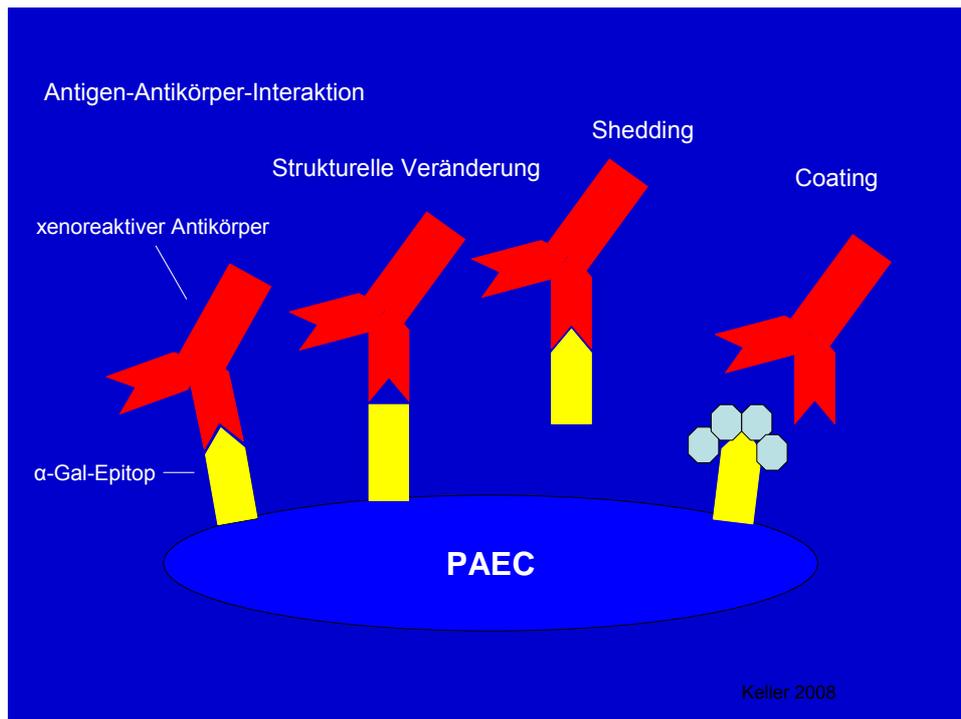


Abbildung 41 : Die Behandlung der PAEC mit UW- oder Bretschneider-Lösung führt zu einer signifikanten Reduktion des α -Gal-Nachweises im FACS. Dieses Ergebnis kann durch eine strukturelle Veränderung der α -Gal-Epitope, ein Ablösen der Epitope (shedding) oder dem Mechanismus des „coating“ erklärt werden.

In weiteren Studien ist ebenfalls zu klären, zu welchen Veränderungen an den α -Gal-Epitopen die Kardioplegielösungen genau führen. Die Theorien, die bereits nach den Perfusionsversuchen aufgestellt wurden, müssen hier beibehalten werden. Zum einen ist denkbar, dass die Kardioplegielösungen eine strukturelle Veränderung der α -Gal-Epitope induzieren und so eine Antigen-Antikörper-Bindung unmöglich machen. Zum anderen besteht die Möglichkeit des „sheddings“, also ein durch die Kardioplegielösung verursachtes Ablösen der α -Gal-Epitope von den Endothelzellen. Ein solches „shedding“ wurde bereits im Blutgruppensystem nachgewiesen. Blutgruppenantigene, vor allem das Lewis-Antigen, lösen sich bei verlängerter kalter IZ von der Oberfläche der Erythrozyten ab. Bei Vorliegen dieses Phänomens könnten die abgelösten α -Gal-Epitope als freie Haptene fungieren und zusätzliche XNA im Perfusat binden und eliminieren. Dies könnte man sich zusätzlich therapeutisch zu Nutzen machen: die abgelösten α -Gal-Epitope könnten isoliert und aufbereitet werden und schließlich dem Organempfänger direkt vor Reperfusion injiziert werden. Die injizierten α -Gal-Epitope könnten dann unmittelbar nach dem Start der Reperfusion die xenoreaktiven Antikörper binden. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass die injizierten α -Gal-Epitope ein größeres Potential hätten die xenogene Abstoßung zu minimieren als die synthetisch hergestellten Gal-Oligosaccharide (siehe 1.5.2.).

Eine dritte Möglichkeit in Anbetracht der Kardioplegielösungen als α -Gal-reduzierender Faktor ist ein „coating“ der Antigene. Bestandteile der Kardioplegielösungen wie Zucker können zu einer Beschichtung der α -Gal-Epitope führen und so eine direkte Interaktion mit den Antikörpern verhindern. Eine interessante Frage bei diesem Mechanismus wäre, von welcher Dauer das „coating“ ist.

Auch wenn die Hemmung der Antigen-Antikörperreaktion durch den Mechanismus des „coating“ nur von begrenzter Dauer wäre, könnte ein positiver therapeutischer Effekt aus einer vierstündigen Ischämiezeit mit Kardioplegielösung gezogen werden. Eine Theorie, die nicht zuletzt für die Erklärung des Phänomens der Akkomodation herangezogen wird (siehe 1.5.1.), beinhaltet eine besondere Sensibilität der Endothelzellen gegenüber der humoralen Immunantwort des Empfängers während und kurz nach der Transplantation. Kann eine Antigen-Antikörperreaktion in dieser sensiblen Phase vermieden werden, umgeht man die HAR und AVR. Später befinden sich die Endothelzellen in einem stabilen Zustand und sind daher gegenüber der humoralen Immunantwort resistent (Platt 1990 a).

Um die exakte Wirkungsweise der Kardioplegielösungen auf die α -Gal-Epitope zu identifizieren müssen weitere Studien durchgeführt werden: z.B. ELISA-Tests des Überstands mit der Frage nach gelösten α -Gal-Epitopen.

Es soll erwähnt werden, dass es bei den Versuchsreihen zum Einfluss der Kardioplegie zu keinen variierenden Resultaten kam. Die Ergebnisse waren konstant und stets reproduzierbar. Dies ist mit eine wichtige Voraussetzung, wenn man die „Behandlung“ von Xenotransplantaten mit Kardioplegielösungen als Therapieoption gegen die HAR und AVR in Betracht zieht.

Zwar eliminieren die Kardioplegielösungen die α -Gal-Epitope nicht gänzlich, doch führt die Behandlung etwa mit UW-Lösung zu einer Reduktion der α -Gal-Epitope auf 50%. Es gibt neue Studien, die zeigen, dass es bei nicht vaskularisierten Organen nur dann zu einer Antigen-Antikörperreaktion in Form einer HAR bzw. AVR kommt, wenn eine bestimmte Schwelle an α -Gal-Expression überschritten ist. Bei einer α -Gal-Expression unter dieser Schwelle zeigen sich die Organe gegenüber der Antikörperantwort resistent (Murray-Segal 2008). Diese Studien sowie die Erfahrungen im Perfusionsmodell (Brenner 2000 a, Brenner 2003), in dem die HAR bei vierstündiger Ischämiezeit vermieden werden konnte, legen nahe, dass es sich bei vaskularisierten Organen ähnlich verhalten könnte. Die Preservation der Xenotransplantate über 4h bei 4°C in einer Kardioplegielösung könnte eine Möglichkeit sein, die α -Gal-Quantität auf den Endothelzellen unter diese Schwelle zu drücken.

Natürlich kann das Argument der α -Gal-knockout-Tiere angeführt werden. Für was noch α -Gal-Epitop-reduzierende Maßnahmen im Zeitalter der α -Gal-knockout-Schweine? Doch wie bereits in Punkt 2 genauer erläutert, exprimieren die Organe der α -Gal-knockout-Schweine über andere Glykosyltransferasen Restmengen an α -Gal-Epitopen (Sharma 2003, Milland 2005, Sandrin 2007). Hier könnte die in dieser Studie beschriebene Behandlung der Organe mit Kardioplegielösung zu einer Eliminierung dieser Restmengen beitragen.

Bei dem Vergleich der Kardioplegielösungen UW-Lösung und Bretschneider-Lösung hinsichtlich ihrer Wirkung auf die α -Gal-Epitope, zeigt die UW-Lösung größere Effekte. Die UW-Lösung ist der Bretschneider-Lösung hinsichtlich ihrer Potenz, α -Gal-Epitope zu reduzieren, überlegen. Nach der Behandlung der Endothelzellen mit UW-Lösung sind nur noch die Hälfte der α -Gal-Epitope nachweisbar. Bei der Behandlung der Zellen mit Bretschneiderlösung geht im Vergleich nur jedes dritte α -Gal-Epitop verloren. Angesichts der Studienlage zum Vergleich der UW-Lösung und der Bretschneider-Lösung hinsichtlich Transplantatfunktion, Transplantatüberleben, Patientenüberleben und Komplikationsrate (siehe 5.3.), die bislang keine der beiden Lösungen eindeutig favorisiert, muss der UW-Lösung in der Xenotransplantation der Vorzug gegeben werden. Dennoch müssen auch noch weitere Kardioplegielösungen hinsichtlich ihres Einflusses auf die α -Gal-Epitope untersucht werden. Dabei sollten vor allem die Celsior- und Perfadex-Lösung getestet werden. Die Celsior-Lösung ist ebenfalls eine gängige Kardioplegielösung in der Herztransplantation, der aufgrund ihrer niedrigen Kaliumkonzentration als extrazelluläre Lösung besondere Endothelprotektive Eigenschaften nachgesagt werden. Die Perfadex-Lösung, die vor allem bei Lungentransplantationen eingesetzt wird, ist durch ihre kolloidalen Komponenten gekennzeichnet und könnte sich daher vielversprechend in der Minimierung der Abstoßungsreaktionen zeigen, falls der Mechanismus des „coating“ die verminderte Antigen-Antikörper-Interaktion im FACS bedingt.

Die Kardioplegielösungen als therapeutische Option einzusetzen, bedeutet allerdings gleichzeitig eine Akzeptanz einer verlängerten Ischämiezeit und damit eines erhöhten Ischämie-/Reperfusionsschadens (siehe 5.1.). In dieser Studie wurde die Preservation bei vierstündiger Hypothermie untersucht. Eine vierstündige Kalt-Ischämie stellt für Organe wie Leber, Pankreas und Niere mit relativ langer Ischämietoleranzgrenze (Pankreas, Leber 12 Stunden, Nieren bis zu 36 Stunden) eine zu verantwortende Ischämiezeit dar, bei der Herztransplantation allerdings bedeutet die vierstündige Ischämie die Ischämietoleranzgrenze (Berchtold 2006). Es liegen keine Daten dazu vor, ob bereits eine zwei- oder dreistündige Preservation mit den Kardioplegielösungen zu einer gleichwertigen Reduktion der α -Gal-

Epitope führt. Doch selbst wenn eine vierstündige Ischämiezeit für den Effekt der Kardioplegielösungen notwendig ist, kann dies in Anbetracht neuer Methoden und Strategien zur Reduktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens bei der Organtransplantation und zur Verlängerung der Ischämietoleranz der einzelnen Organe eine therapeutische Option darstellen. Zum einen wurden neue Preservationslösungen entwickelt. So wurde zum Beispiel im Tiermodell gezeigt, dass eine in Frankreich neu entwickelte Preservationslösung (CRMBM-Lösung) gegenüber Celsior-Lösung Vorteile hinsichtlich Myokard- und Endothelprotektion hat (Desrois 2008). Ob diese Lösung auch einen günstigen Effekt auf die α -Gal-Epitope zeigt, wäre zu testen. Zum anderen wurde im Experiment ausprobiert, den gängigen Preservationslösungen Zusätze beizumengen, die die Konservierung der Herzen bei Transplantation verbessern. So kann der Zusatz von CO freisetzenden Molekülen (CO-RMs) (Musameh 2007) oder der Zusatz von zellgängigen Eisen-Chelatbildnern (Radovits 2008, Wille 2008) die Preservationsbedingungen optimieren. Auch eine kontrollierte Reperfusion und die Postkonditionierung der Organe können dazu beitragen, die Konservierungszeiten zu verlängern (Martin 2003, Lauzier 2007, Tapuria 2008). Eine Verlängerung der Ischämietoleranz des Herzens auf sechs Stunden in naher Zukunft ist daher nicht unwahrscheinlich. Dieser Ausblick bietet für die Anwendung der Kardioplegielösungen als Therapieoption zur Vermeidung der HAR und VAR zusätzlich neue Perspektiven.

Nicht zuletzt implizieren die Ergebnisse dieser Studie auch ökonomische Aspekte: Wenn eine verlängerte IZ zu keiner Aggravierung der xenogenen Abstoßungsreaktionen führt, sondern sich sogar positiv auf die Abstoßungsreaktionen auswirkt, dann ermöglicht dies in der klinischen Praxis einen Transport der Xenotransplantate über längere Distanzen. Als Folge müssten nur ein Minimum an teuren Zuchtzentren für Organspendetiere gebaut werden, von denen aus bei Bedarf auch weiter entfernte Transplantationszentren mit Xenotransplantaten versorgt werden könnten.

5.5. Funktionen des α -Gal-Epitops

Die α -Gal-Epitope sind hauptverantwortlich für die Abstoßungsreaktionen bei der Xenotransplantation (siehe 1.4.) und stehen daher auch in dieser Studie im Focus. Aus diesem Grund soll abschließend noch kurz auf die Funktionen der α -Gal-Epitope eingegangen werden, die bei der Diskussion um α -Gal-knockout-Schweine und um weitere Ansätze zur Eliminierung der α -Gal-Epitope stets zu kurz kommen.

Die Inaktivierung des α 1,3Galactosyltransferase-Gens bei Altweltaffen in der Evolutionsgeschichte (siehe 1.3.) legte zunächst nahe, dass die α -Gal-Epitope keine

biologische Rolle besitzen und nicht für das Überleben essenziell sind. Die Beobachtung jedoch, dass es bei α -Gal-knockout-Mäusen vermehrt zu Fehlbildungen und Erkrankungen kommt, lässt eine biologische Rolle der α -Gal-Epitope vermuten. Es konnte gezeigt werden, dass α -Gal-knockout-Mäuse an Katarakten (Sørensen 2008) und einer gestörten Glukosetoleranz sowie einer verminderten Insulinsensitivität (Dahl 2006) leiden. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass den α -Gal-Epitopen eine biologische Rolle in der Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktion zukommt (Macher 2008).

Dass die Inaktivierung des α 1,3Galactosyltransferase-Gens trotz seiner biologischen Relevanz nicht mit einem Untergang der Altweltaffen verbunden war, lässt sich damit erklären, dass parallel zu der Inaktivierung des Gens andere Glykosyltransferasen aufgetreten sind, deren Produkte die Funktionen der α -Gal-Epitope übernahmen (Macher 2008).

Außerdem stellen die α -Gal-Epitope eine Barriere für Zoonose dar (Kim 2007). α -Gal-Epitope auf Viren, die sich in α -Gal-positiven Zellen vermehren, können an Anti- α -Gal-Antikörper in humanem Serum binden, was eine Aktivierung der Komplementkaskade und schließlich eine Inaktivierung der Viren zur Folge hat (Rother 1995, Kim 2007). Viren hingegen, die von α -Gal-knockout Tieren stammen und keine α -Gal-Epitope besitzen, scheinen resistent gegenüber der Inaktivierung durch humanes Serum zu sein (Kim 2007). Dieser Schutzfunktion der α -Gal-Epitope kommt nicht zuletzt bei der klinischen Xenotransplantation eine entscheidende Rolle zu. Bei der Transplantation eines Xenotransplantats besteht ein nicht unerhebliches Risiko der Zoonose oder der Übertragung pathogener Organismen. Die mögliche Übertragung porciner endogener Retroviren (PERVs), die in dem Genom aller Schweine als Provirus zu finden sind, ist dabei besonders Besorgnis erregend (Kim 2007, Mattiuzzo 2008). Gerade bei der Transplantation von α -Gal-knockout Organen muss nach obigen Erläuterungen mit einem erhöhten Infektionsrisiko gerechnet werden.

Ein andere Frage hinsichtlich der Funktion der α -Gal-Epitope ist, ob die α -Gal-Epitope in allen Spezies die gleiche biologische Bedeutung haben. Speziesanalysen zeigten, dass die α -Gal-Expression zwischen den Spezies sehr variiert. So wurde auf Schweinenieren eine 500-fach höhere α -Gal-Konzentration gefunden als auf Mäusenieren. Auch die Schweineherzen, -lebern und -lungen zeigten eine 10 bis 100-fach höhere α -Gal-Expression als die entsprechenden Mäuseorgane (Tanemura 2000). Geht man davon aus, dass die Anzahl an α -Gal-Epitopen die biologische Bedeutung dieser widerspiegelt, zeigt dies, dass nicht in jeder Spezies die biologische Funktion der α -Gal-Epitope gleichbedeutend ist.

6. Zusammenfassung

Die Organtransplantation ist zu einer der wichtigsten Therapiemöglichkeiten bei der terminalen Herzinsuffizienz geworden. Eines der größten Probleme in der Transplantationsmedizin ist allerdings die Diskrepanz zwischen den zur Verfügung stehenden Spenderorganen und den Patienten, die ein Organ benötigen. Der vielversprechendste Lösungsansatz zur Beseitigung dieses Missverhältnisses ist die Xenotransplantation, die Verwendung z.B. von Schweinen als Organspender.

Bei der Xenotransplantation besteht allerdings als Hauptproblem die immunologische Barriere. Die Mechanismen der Transplantatabstoßung bei der diskordanten Xenotransplantation von vaskularisierten Organen lassen sich in die hyperakute Abstoßung (HAR), die akute vaskuläre Abstoßung (AVR), die akute zelluläre Abstoßung (ACXR) und die chronische Abstoßung (CR) gliedern. Vor allem die HAR und die AVR sowie die Suche nach Maßnahmen zur Vermeidung dieser zwei Abstoßungsformen stehen derzeit im Focus der Xenotransplantationsforschung. Sowohl bei der HAR als auch bei der AVR binden präformierte xenoreaktive Antikörper des Empfängers an α -Gal-Epitope, die auf Glykolipiden und Glykoproteinen von Nicht-Primaten-Säugetieren und Neue-Welt-Affen ubiquitär exprimiert werden. Diese humorale Immunreaktion führt im Rahmen der HAR innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden und im Rahmen der AVR innerhalb von 24 Stunden zur Organdysfunktion. Alle Maßnahmen zur Überwindung der HAR und AVR zielen daher darauf ab, einerseits die xenoraktiven Antikörper (z.B. Immunadsorption, Infusion synthetischer Gal-Oligosaccharide) zu reduzieren und andererseits eine Modifikation der Transplantatoberfläche vor allem der α -Gal-Epitope (z.B. hDAF transgene Schweine, α -Gal-knockout Schweine) zu erreichen. Auch in dieser Studie steht das α -Gal-Epitop als hauptverantwortliches Antigen in der Xenotransplantation und die Modifikation der α -Gal-Epitope im Focus.

Die Studie basiert auf Erfahrungen im Perfusionsmodell, die ein Überwinden der HAR alleine durch eine verlängerte Ischämiezeit (IZ) von vier Stunden beschreiben: Herzen, die einer langen IZ von 4 h ausgesetzt waren, zeigten keine histopathologischen Zeichen einer HAR. Die Perfusionszeit dieser Herzen war signifikant länger als die der Herzen mit kurzer IZ und die hämodynamische Funktion dieser Herzen war bis zu einer Perfusionszeit von 6 h stabil, während sich die hämodynamischen Parameter der Herzen mit kurzer IZ bereits nach zwei Stunden stark verschlechterten.

Ziel dieser Studie war es, in einem In-vitro-Modell den Einfluss von Hypothermie und Kardioplegielösungen (beides Faktoren, die während der kalten Ischämiezeit auf die Organe wirken) auf die α -Gal-Epitope zu untersuchen und eine Erklärung für die Ergebnisse der Perfusionsversuche zu finden.

Im Rahmen von Vorversuchen wurden porcine Aortenendothelzellen (PAEC) ausgewählt, die die Anforderungen für die Experimente erfüllten. Als am geeignetsten zeigten sich die PAEC aus Dispase-Primärkulturen am Tag 6 ± 1 .

Zur Untersuchung des Einflusses der Hypothermie auf die α -Gal-Epitope wurden Zellkulturen über 1h, 4h und 6h bei 4°C inkubiert (je $n=6$). Als Kontrolle wurde Zellkulturen herangezogen, die über die entsprechenden Zeiträume bei 38°C inkubiert wurden (je $n=6$). Zum Ausgleich interindividueller Unterschiede handelte es sich bei der jeweiligen Versuchs- und Kontrollzellkultur um verbundene Stichproben.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde der Einfluss der Kardioplegielösungen UW-Lösung und Bretschneider-Lösung auf die α -Gal-Epitope untersucht. Dazu wurden Zellkulturen mit UW-Lösung oder Bretschneider-Lösung über 4h bei 4°C inkubiert (je $n=4$). Als Kontrolle wurden Zellkulturen herangezogen, die über 4h bei 4°C ohne Kardioplegielösung inkubiert wurden (je $n=4$). Wiederum wurde hier mit verbundenen Stichproben gearbeitet.

Nach der entsprechenden Behandlung wurden die PAEC mit BS-I Isolectin B4 gefärbt und der FACS-Analyse zugeführt. Außerdem wurde zur Validierung der Methodik und zur Feststellung, ob die jeweilige Behandlung zu einer Endothelzellschädigung führt, die Zellmorphologie, die Zellvitalität und die CD31-Expression bestimmt.

Die Ergebnisse zur Zellmorphologie, Zellvitalität und CD31-Expression zeigen eine Toleranz der porcinen Aortenendothelzellen in vitro selbst gegenüber einer sechsstündigen Hypothermie. Allerdings kann kein signifikanter Einfluss der Hypothermie von 4°C auf die α -Gal-Epitope nachgewiesen werden.

Die Studie zeigt aber eine signifikante Reduktion der nachweisbaren α -Gal-Epitope durch die Behandlung der PAEC mit UW-Lösung oder Bretschneider-Lösung. Hierbei zeigt sich die UW-Lösung der Bretschneider-Lösung überlegen: Die UW-Behandlung führt zu einer Reduktion der α -Gal-Epitope pro Zelle um durchschnittlich 50% ($P=0,006$), die Bretschneider-Behandlung um durchschnittlich 32 % ($P=0,011$). Die Bretschneider-Lösung wie auch die UW-Lösung verursacht bei vierstündiger Exposition keine gravierende Endothelzellschädigung.

Dieser die α -Gal-Epitope reduzierende Effekt der Kardioplegielösungen erklärt die Ergebnisse der Perfusionsversuche und kann ein neues Therapiekonzept zur Vermeidung der initialen Xenotransplantatabstoßung darstellen. Die Ergebnisse dieser Studie empfehlen hierbei die Verwendung der UW-Lösung als Kardioplegie- und Preservationslösung bei Xenotransplantationen. Doch müssen dieser Therapieoption stets die Nachteile, die durch den Ischämie-/Reperfusionsschaden entstehen, gegenübergestellt werden. Weiterhin unklar bleibt, zu welchen Veränderungen an den α -Gal-Epitopen die Kardioplegielösungen genau führen. Denkbar ist eine strukturelle Modifikation, ein „shedding“ oder „coating“ der α -Gal-Epitope. Der genaue Mechanismus muss noch in weiteren Studien geklärt werden.

7. Literatur

- 1) Abouna G.M. Organ shortage crisis: Problems and possible solutions. *Transpl Proc.* 2008; 40: 34-38
- 2) Adams DH, Chen RH, Kadner A. Cardiac xenotransplantation: Clinical experience and future direction. *Ann Thorac Surg.* 2000; 70: 320-326
- 3) Agarwal A, Murdock P, Fridell JA. Comparison of histidine-tryptophan ketoglutarate solution and University of Wisconsin solution in prolonged cold preservation of kidney allografts. *Transplantation.* 2006; 81: 480-482
- 4) Al-Mohanna F, Parhar R, Kotwal GJ. Vaccinia virus complement control protein is capable of protecting xenoendothelial cells from antibody binding and killing by human complement and cytotoxic cells. *Transplantation.* 2001; 71: 796-801
- 5) Al-Mohanna F, Saleh S, Parhar RS, Khabar K, Collison K. Human neutrophil gene expression profiling xenogeneic encounter with porcine aortic endothelial cells: the occult role of neutrophils in xenograft rejection revealed. *J Leukoc Biol.* 2005; 78: 51-61
- 6) Alonso M, Fernández M, Mataix R, Rincón MD, Corrales JA, Burgos R, Miranda B. Donor Action in Spain : a program to increase organ donation. *Transpl Proc.* 1999; 31: 1084-1085
- 7) Alwayn IPJ, Xu Y, Basker M, Wu C, Buhler L, Lambrigts D, Treter S, Harper D, Kitamura H, Vitetta ES, Abraham S, Awwad M, White-Scharf ME, Sachs DH, Thall A, Cooper DK. Effects of specific anti-B and/or anti-plasma cell immunotherapy on antibody production in baboons: depletion of CD20- and CD22-positive B cells does not result in significantly decreased production of anti- α Gal antibody. *Xenotransplantation.* 2001; 8: 157-171

- 8) Asano M, Gundry SR, Izutani H, Cannarella SN, Fagoaga O, Bailey LL. Baboons undergoing orthotopic concordant cardiac xenotransplantation surviving more than 300 days: effect of immunosuppressive regimen. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003; 125: 60-69
- 9) Ashton-Chess J, Meurette G, Karam G, Petzold T, Minault D, Naulet J, Tesson L, Plat M, Anegon I, Soulillou JP, Blancho G. The study of mitoxantrone as a potential immunosuppressor in transgenic pig renal xenotransplantation in baboons: comparison with cyclophosphamide. *Xenotransplantation.* 2004; 11: 112-122
- 10) Ashton-Chess J, Roussel JC, Manez R, Ruiz C, Moreau A, Cozzi E, Minault D, Soulillou JP, Blancho G. Cellular participation in delayed xenograft rejection of hCD55 transgenic pig hearts by baboons. *Xenotransplantation.* 2003; 10: 446-453
- 11) Azimzadeh A, Meyer C, Ravanat C, Cazenave JP, Wolf P. Xenograft rejection: molecular mechanisms and therapeutic prospects. *Hematol Cell Ther.* 1997; 38: 331-343
- 12) Bach FH, Ferran C, Candinas D, Miyatake T, Koyamada N, Mark W, Hechenleitner P, Hancock WW. Accommodation of xenografts: Expression of "protective genes" in endothelial and smooth muscle cells. *Transpl Proc.* 1997; 29: 56-58
- 13) Bach FH, Winkler H, Ferran C, Hancock WW, Robson SC. Delayed xenograft rejection. *Immunology Today.* 1996; 17: 379-384
- 14) Banasik M, Klinger M. Chronic allograft nephropathy- immunologic and nonimmunologic factors. *Ann Transplant.* 2006; 11: 7-10
- 15) Barnard CN, Wolpowitz A, Losman JG. Heterotopic cardiac transplantation with a xenograft for assistance of the left heart in cardiogenic shock after cardiopulmonary bypass. *S Afr Med J.* 1977; 52: 1035-1038

- 16) Baumann BC, Forte P, Hawley RJ, Rieben R, Schneider MKJ, Seebach JD. Lack of Galactose- α -1,3-Galactose expression on porcine endothelial cells prevents complement-induced lysis but not direct xenogeneic NK cytotoxicity. *J Immunol.* 2004; 172: 6460-6467
- 17) Baumann BC, Stussi G, Huggel K, Rieben R, Seebach JD. Reactivity of human natural antibodies to endothelial cells from Gal[α](1,3)Gal-deficient pigs. *Transplantation.* 2007; 83: 193-201
- 18) Berchtold R. *Chirurgie.* 5. Auflage 2006, Urban & Fischer Verlag
- 19) Berg A. Pediatric heart transplantation: a clinical overview. *Crit Care Nurs Q.* 2002; 25: 79-87
- 20) Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, Lai EK, McCay PB. Demonstration of free radical generation in stunned myocardium of intact dogs with the use of the spin trap α -phenyl N-tert-butyl nitron. *J Clin Invest.* 1988; 82: 476-485
- 21) Brandl U, Erhardt M, Michel S, Jöckle H, Burdorf L, Bittmann I, Rössle M, Mordstein V, Brenner P, Hammer C, Reichart B, Schmoeckel M. Soluble Gal α (1,3)Gal conjugate combined with hDAF preserves morphology and improves function of cardiac xenografts. *Xenotransplantation.* 2007; 14: 323-32
- 22) Brandl U, Michel S, Erhardt M, Brenner P, Bittmann I, Rössle M, Baschnegger H, Bauer A, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B. Administration of GAS914 in an orthotopic pig-to-baboon heart transplantation model. *Xenotransplantation.* 2005; 12: 134-141
- 23) Brenner P. Einfluß von Immunadsorption auf xenogene Abstoßungsmechanismen im Perfusionsmodell und bei der Xenotransplantation von Landrasse- und hDAF-transgenen Schweineherzen in Primaten. 2003. Habilitationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universität München.

- 24) Brenner P, Hinz M, Huber H, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Meiser B, Hammer C, Reichart B. The influence of antibody and complement removal with a Ig-Therasorb column in a xenogeneic working heart model. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1999; 15: 672-679
- 25) Brenner P, Hinz M, Huber H, Schmoeckel M, Reichenspurner H, Meiser B, Hammer C, Reichart B. Influence of ischemic time on hyperacute xenograft rejection of pig hearts in a working heart perfusion model with human blood. *Transpl Int.* 2000 a; 13: S494-S503
- 26) Brenner P, Reichenspurner H, Schmoeckel M, Wimmer C, Rucker A, Eder V, Meiser B, Hinz M, Felbinger T, Hammer C, Reichart B. Prevention of hyperacute xenograft rejection in orthotopic xenotransplantation of pig hearts into baboons using immunoabsorption of antibodies and complement factors. *Transpl Int.* 2000 b; 13: S508-S517
- 27) Brenner P, Reichenspurner H, Schmoeckel M, Wimmer C, Rucker A, Eder V, Meiser B, Hinz M, Felbinger T, Müller-Höcker J, Hammer C, Reichart B. Ig-Therasorb immunoapheresis in orthotopic xenotransplantation of baboons with landrace pig hearts. *Transplantation.* 2000 c; 69: 208-214
- 28) Brenner P, Schmoeckel M, Wimmer C, Eder V, Rucker A, Felbinger T, Uchita S, Hinz M, Brandl U, Meiser B, Reichenspurner H, Hammer C, Reichart B. Mean xenograft survival of 14.6 days in a small group of hDAF-transgenic pig hearts transplanted orthotopically into baboons. *Transpl Proc.* 2005 a; Vol. 37: 472-476
- 29) Brenner P, Schmoeckel M, Wimmer C, Rucker A, Eder V, Uchita S, Brandl U, Hinz M, Felbinger T, Meiser B, Hammer C, Reichenspurner H, Reichart B. Combination of hDAF-transgenic pig hearts and immunoabsorption in heterotopic xenotransplantation of immunosuppressed baboons. *Transpl Proc.* 2005 b; 37: 483-486
- 30) Bundesärztekammer, Stellungnahme des Wissenschaftlichen Beirates der Bundesärztekammer zur Xenotransplantation. *Dtsch Ärztebl.* 1999; 96: 28-29

- 31) Bundesärztekammer, Richtlinien zur Organtransplantation gemäß §16 Abs.1 Nr.2 und 5 TPG
- 32) Cantarovich F. The organ shortage: a social paradox to be reversed. *Transpl Proc.* 2002; 34: 3031-3034
- 33) Careaga G, Salazar D, Téllez S, Sánchez O, Borrayo G, Argüero R. Clinical impact of histidine-ketoglutarate-tryptophan (HTK) cardioplegic solution on the perioperative period in open heart surgery patients. *Arch Med Res.* 2001; 32: 296-299
- 34) Chen D, Cao R, Guo H, Chen G, Wang X, Shen S, Chen S. Pathogenesis and pathology of delayed xenograft rejection in pig-to-rhesus monkey cardiac transplantation. *Transpl Proc.* 2004; 36: 2480-2482
- 35) Chen RH, Kadner A, Mitchell RN, Adams DH. Mechanism of delayed rejection in transgenic pig-to-primate cardiac xenotransplantation. *J Surg Research.* 2000; 90: 119-125
- 36) Chong AS, Ma L, Yin D, Shen J, Blinder L, XiuLong X, Williams JW, Byrne G, Diamond LE, Logan JS. Non-depleting anti CD4, but not anti-CD8 antibody induces long-term survival of xenogeneic and allogeneic hearts in alpha1,3-galactosyltransferase knockout (GT-Ko) mice. *Xenotransplantation.* 2000; 7: 275-283
- 37) Chopek MW, Simmons RL, Platt JL. ABO-incompatible kidney transplantation: initial immunopathologic evaluation. *Transpl Proc.* 1987; 19: 4553-4557
- 38) Cooper DKC. Porcine red blood cells as a source of blood transfusion in humans. *Xenotransplantation.* 2003 a; 10: 383-386
- 39) Cooper DKC. Clinical xenotransplantation – how close are we? *Lancet.* 2003 b; 362: 557-559
- 40) Cozzi E, Seveso M, Hutabba S, Fabris S, Cavicchioli L, Ancona E. An update on xenotransplantation. *Vet Res Commun.* 2007; 31: 15-25

- 41) Cozzi E, Vial C, Ostlie D, Farah B, Chavez G, Smith KGC, Bradley JR, Thiru S, Davies HFS, Wallwork J, White DJG, Goddard M, Friend PJ. Maintenance triple immunosuppression with cyclosporine A, mycophenolate sodium and steroids allows prolonged survival of primate recipients of hDAF porcine renal xenografts. *Xenotransplantation*. 2003; 10: 300-310
- 42) Dahl K, Buschard K, Gram DX, d'Apice AJ, Hansen AK. Glucose intolerance in a xenotransplantation model: studies in alpha-gal knockout mice. *APMIS*. 2006; 114: 805-811
- 43) Dalmaso AP, Vercellotti GM, Fischel RJ, Bolman RM, Bach FH, Platt JL. Mechanism of complement activation in the hyperacute rejection of porcine organs transplanted into primate recipients. *Am J Pathol*. 1992; 140: 1157-1165
- 44) Davila E, Byrne GW, LaBreche PT, McGregor HCJ, Schwab AK, Davies WR, Rao VP, Oi K, Tazelaar HD, Logan JS, McGregor CGA. T-cell responses during pig-to-primate xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2006; 13: 31-40
- 45) Dehoux J-P, de la Parra B, Latinne D, Bazin H, Gianello P. Characterization of baboon anti-porcine IgG antibodies during acute vascular rejection of porcine kidney xenograft. *Xenotransplantation*. 2002; 9: 338-349
- 46) Deschamps JY, Roux FA, Saï P, Gouin E. History of xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2005; 12 : 91-109
- 47) Desrois M, Caus T, Belles PM, Dalmaso C, Lan C, Cozzone PJ, Bernard M. Limitation of myocardial and endothelial injury of the rat heart graft after preservation with Centre de Résonance Magnétique Biologique et Médicale (CRMB) solution. *Transpl Int*. 2008; 21: 276-283
- 48) Ding JW, Zhou T, Ma L, Yin D, Shen J, Ding CPY, Tang IY, Byrne GW, Chong AS. Expression of complement regulatory proteins in accommodated xenografts induced by anti- α -Gal IgG1 in a rat-to-mouse model. *Am J Transplant*. 2008; 8: 32-40

- 49) Doki T, Mello M, Mock D, Evans JM, Kearns-Jonker M. Intragraft gene expression profile associated with the induction of tolerance. *BMC Immunology*. 2008; 9: 5
- 50) Doucet J, Gao ZH, MacLaren LA, McAlister VC. Modification of xenoantigens on porcine erythrocytes for xenotransfusion. *Surgery*. 2004; 135 : 178-186
- 51) Dragun D, Hoff U, Park JK, Qun Y, Scheider W, Luft FC, Haller H. Prolonged cold preservation augments vascular injury independent of renal transplant immunogenicity and function. *Kidney Int*. 2001; 60: 1173-1181
- 52) Durán WN. The double-edge sword of TNF- α in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008; doi:10.1152/ajpheart.01050.2008
- 53) Eberl T, Salvenmoser W, Rieger G, Gorny I, Heiß V, Kumpitsch B, Gnaiger E, Margreiter R. Ultrastructural analysis of human endothelial cells after hypothermic storage in organ preservation solutions. *J Surg Res*. 1999; 82: 253-260
- 54) Eurotransplant International Foundation 2010; www.eurotransplant.nl
- 55) Ezzelarab M, Cooper DKC. Reducing Gal expression on pig organ – a retrospective review. *Xenotransplantation*. 2005; 12: 278-285
- 56) Fischer S, Renz D, Wiesnet M, Schaper W, Karliczek GF. Hypothermia abolishes hypoxia-induced hyperpermeability in brain microvessel endothelial cells. *Mol Brain Res*. 1999; 74: 135-144
- 57) Fischer-Lougheed JY, Tarantal AF, Shulkin I, Mitsuhashi N, Kohn DB, Lee CC, Kearns-Jonker M. Gene therapy to inhibit xenoantibody production using lentiviral vectors in non-human primates. *Gene Ther*. 2007; 14: 49-57
- 58) Galili U. The α -gal epitope (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R) in xenotransplantation. *Biochimie*. 2001; 83: 557-563

- 59) Galili U. The α -gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol.* 2005; 83: 674-686
- 60) Galili U, LaTemple DC, Radic MZ. A sensitive assay for measuring [alpha]-gal epitope expression on cells by a monoclonal anti-gal antibody. *Transplantation.* 1998; 65: 1129-1132
- 61) Galili U, Macher BA, Buehler J, Shohet SB. Human natural anti- α -galactosyl IgG II. The specific recognition of $\alpha(1 \rightarrow 3)$ -linked galactose residues. *J Exp Med.* 1985; 162: 573-582
- 62) Galili U, Mandrell RE, Hamadeh RM, Shohet SB, Griffiss JM. Interaction between human natural anti-alpha-galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora. *Infect Immun.* 1988 a; 56: 1730-1737
- 63) Galili U, Shohet SB, Kobrin E, Stults CL, Macher BA. Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem.* 1988 b; 263: 17755-17762
- 64) Ghebremariam YT, Smith SA, Anderson JB, Kahn D, Kotwal GJ. Intervention strategies and agents mediating the prevention of xenorejection. *Ann N. Y. Acad Sci.* 2005; 1056: 123-143
- 65) Gloe T, Riedmayr S, Sohn H-Y, Pohl U. The 67kDa laminin-binding protein is involved in shear stress-dependent endothelial nitric-oxide synthase expression. *J Biol Chem.* 1999; 274: 15996-16002
- 66) Gollackner B, Knosalla C, Houser S, Mauiyyedi S, Bühler L, Kawai T, Duggan M, Sachs DH, Awwad M, Cooper DK. Pig kidney transplantation in baboons treated intravenously with a bovine serum albumin-Gal α 1-3Gal conjugate. *Xenotransplantation.* 2003; 10: 606-614

- 67) Goodman RS, Kirton CM, Oostingh GJ, Schön MP, Clark MR, Bradley JA, Taylor CJ. PECAM-1 polymorphism affects monocyte adhesion to endothelial cells. *Transplantation*. 2008; 85: 471-477
- 68) Granger DN, Kvietys PR, Perry MA. Leukocyte-endothelial cell adhesion induced by ischemia and reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol*. 1993; 71: 67-75
- 69) Groth CG. Why Xenotransplantation? *Transpl Proc*. 2000; 32: 833
- 70) Haddix TL, Pohlman TH, Noel RF, Sato TT, Boyle EM, Verrier ED. Hypothermia inhibits human E-selectin transcription. *J Surg Res*. 1996; 176-183
- 71) Harper E. Collagenases. *Ann Rev Biochem*. 1980; 49: 1063-1078
- 72) Hearse DJ. Stunning: a radical re-view. *Cardiovas Drugs Therapy*. 1991; 5: 853-876
- 73) Hearse DJ. Myocardial protection during ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem*. 1998; 186: 177-184
- 74) Helgason CD, Miller CL. Basic cell culture protocols. *Methods in molecular biology*. 2005; Volume 290. Third Edition. Humana Press.
- 75) Henry ML, Han LK, Davies EA, Sedmak DD, Ferguson RM. Antibody depletion prolongs xenograft survival. *Surgery*. 1994; 115: 355-361
- 76) Human PA, Holl J, Vosloo S, Hewitson J, Brink JG, Reichensperner H, Boehm D, Rose AG, Odell JA, Reichart B. Extended cardiopulmonary preservation: University of Wisconsin solution versus Bretschneider's cardioplegic solution. *Ann Thorac Surg*. 1993; 55: 1123-30
- 77) Ibrahim Z, Busch J, Awwad M, Wagner R, Wells K, Cooper DKC. Selected physiologic compatibilities and incompatibilities between human and porcine organ systems. *Xenotransplantation*. 2006; 13: 488-499

- 78) Ilan N, Madri JA. PECAM-1: old friend, new partners. *Curr Opin Cell Biol.* 2003; 15: 515-524
- 79) Jahania MS, Sanchez JA, Narayan P, Lasley RD, Mentzer RM. Heart preservation for transplantation: principles and strategies. *Ann Thorac Surg.* 1999; 68: 1983-1987
- 80) Jamieson RW, Friend PJ. Organ reperfusion and preservation. *Front Biosci.* 2008; 13:221-235
- 81) Jha P, Smith SA, Justus DE, Kotwal GJ. Prolonged retention of vaccinia virus complement control protein following IP injection: implications in blocking xenorejection. *Transpl Proc.* 2003; 35: 3160-3162
- 82) Johnson M, Haddix T, Pohlman T, Verrier ED. Hypothermia reversibly inhibits endothelial cell expression of E-selectin and tissue factor. *J Cardiac Surg.* 1995; 429-435
- 83) Jonasson O, Hardy MA. The case Baby Fae. *JAMA.* 1985; 254: 3358-3359
- 84) Kawahara T, Rodriguez-Barbosa J-I, Zhao Y, Zhao G, Sykes M. Global unresponsiveness as a mechanism of natural killer cell tolerance in mixed xenogeneic chimeras. *Am J Transplant.* 2007; 7: 2090-2097
- 85) Kemp E, Hellerström C. Xenograft. *Nord Med.* 1994; 109: 335-337
- 86) Keusch JJ, Manzella SM, Nyame KA, Cummings RD, Baenzinger JU. Expression cloning of a new member of the ABO blood group glycosyltransferases, iGb3 synthase, that directs the synthesis of isoglobo-glycosphingolipids. *J Biol Chem.* 2000; 275: 308-314
- 87) Kim NY, Jung W-W, Oh Y-K, Chun T, Park H-Y, Lee H-T, Han I-K, Yang JM, Kim YB. Natural protection from zoonosis by alpha-gal epitopes on virus particles in xenotransplantation. *Xenotransplantation.* 2007; 14: 104-111

- 88) Kirkeby S, Moe D. Binding of Griffonia simplicifolia 1 isolectin B4 (GS1 B4) to alpha-galactose antigens. *Immunol Cell Biol.* 2001; 79: 121-127
- 89) Kobayashi T, Yokoyama I, Liu D, Nagasaka T, Ogawa H, Muramatsu H, Kadomatsu K, Morozumi K, Takeuchi O, Oikawa T, Shimano Y, Uchida K, Takagi H, Muramatsu T, Nakao A. Enzymatic digestion of α -Gal antigens in pig organs by in vivo infusion of Endo- β -Galactosidase C. *Transpl Proc.* 2001; 33: 3855-3856
- 90) Koma M, Miyagawa S, Honke K, Ikeda Y, Koyota S, Miyoshi S, Matsuda H, Tsuji S, Shirakura R, Taniguchi N. Reduction of the major xenoantigen on glycolosphingolipids of swine endothelial cells by various glycosyltransferases. *Glycobiology.* 2000; 10: 745-751
- 91) Komori K, Fuchimoto Y, Morikawa Y, Obara H, Kawachi S, Tanabe M, Hoshino K, Shimazu M, Matsuzaki Y, Kitajima M. The role of graft and host accommodation in a hamster-to-rat cardiac transplantation model. *Transplantation.* 2008; 85: 112-117
- 92) Kotwal GJ, Isaacs SN, McKenzie R. Inhibition of the complement cascade by the major secretory protein of vaccinia virus. *Science.* 1990; 250: 827-829
- 93) Kozlowski T, Ierino FL, Lambrigts D, Foley A, Andrews D, Awwad M, Monroy R, Cosimi AB, Cooper DKC, Sachs DH. Depletion of anti-Gal α 1-3Gal antibody in baboons by specific alpha-Gal immunoaffinity columns. *Xenotransplantation.* 1998; 5: 122-131
- 94) Ku K, Oku H, Alam MS, Saitoh Y, Nosaka S, Nakayama K. Prolonged hypothermic cardiac storage with histidine-tryptophan-ketoglutarate solution: comparison with glucose-insulin-potassium and University of Wisconsin Solutions. *Transplantation.* 1997; 64: 971-975

- 95) Kuwaki K, Knosalla C, Dor FJMF, Gollackner B, Tseng Y-L, Houser S, Mueller N, Prabharasuth D, Alt A, Moran K, Cheng J, Behdad A, Sachs DH, Fishman JA, Schuurman HJ, Awwad M, Cooper DKC. Suppression of natural and elicited antibodies in pig-to-baboon heart transplantation using a human anti-human CD154 mAb-based regimen. *Am J Transpl.* 2004; 4: 363-372
- 96) Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJ, Shimizu A, Houser SL, Sanderson TM, Lancos CJ, Prabharasuth DD, Cheng J, Moran K, Hisashi Y, Mueller N, Yamada K, Greenstein JL, Hawley RJ, Patience C, Awwad M, Fishman JA, Robson SC, Schuurman HJ, Sachs DH, Cooper DK. Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat Med.* 2005; 11:29-31
- 97) Lai L, Kolber-Simonds D, Park K-W, Cheong H-T, Greenstein JL, Im G-S, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. Production of α -1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science.* 2002; 295: 1089-1092
- 98) Lambrigts D, Van Calster P, Xu Y, Awwad M, Neethling FA, Kozlowski T, Foley A, Watts A, Chae SJ, Fishman J, Thall AD, White-Scharf ME, Sachs DH, Cooper DK. Pharmacologic immunosuppressive therapy and extracorporeal immunoadsorption in the suppression of anti-alphaGal antibody in the baboon. *Xenotransplantation.* 1998; 5: 274-283
- 99) Lange V, Renner A, Sagstetter MR, Lazariotou M, Harms H, Gummert JF, Leyh RG, Elert O. Heterotopic rat heart transplantation (Lewis to F344): early ICAM-expression after 8 hours of cold ischemia. *J Heart Lung Transplant.* 2008; 27: 1031-1035
- 100) Langer RM, Kahan BD. Alexis Carrel's Legacy: Visionary of vascular surgery and organ transplantation. *Transpl Proc.* 2002; 34: 1061-1065
- 101) Laude K, Richard V, Thuillez C. Coronary endothelial cells: a target of ischemia reperfusion and its treatment? *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2004; 97: 250.254

- 102) Lauzier B, Sicard P, Bouchot O, Delemasure S, Menetrier F, Moreau D, Vergely C, Rochette L. After four hours of cold ischemia and cardioplegic protocol, the heart can still be rescued with postconditioning. *Transplantation*. 2007; 84: 1474-82
- 103) Lawson JH, Platt JL. Molecular barriers to xenotransplantation. *Transplantation*. 1996; 62: 303-310
- 104) Lee HI, Kim MK, Oh JY, Ko JH, Lee HJ, Wee WR, Lee JH. Gal α (1-3)Gal expression of the cornea in vitro, in vivo and in xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2007; 14: 612-618
- 105) Leibovitz A. The growth and maintenance of tissue-cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. *Am J Hyg*. 1963; 78: 173-180
- 106) Leventhal JR, John R, Fryer JP, Witson JC, Derlich JM, Remiszewski J, Dalmaso AP, Matas AJ, Bolman RM. Removal of baboon and human antiporcine IgG and IgM natural antibodies by immunoadsorption. Results of in vitro and in vivo studies. *Transplantation*. 1995; 59: 294-300
- 107) Leventhal JR, Matas AJ, Sun LH, Reif S, Bolman RM, Dalmaso AP, Platt JL. The immunopathology of cardiac xenograft rejection in the guinea pig-to-rat model. *Transplantation*. 1993; 56 :1-8
- 108) Lin SS, Hanaway M, Gonzalez-Stawinski GV, Lau CL, Parker W, Davis RD, Byrne GW, Diamond LE, Logan JS, Platt J. The role of anti-Gal(α)1-3Gal antibodies in acute vascular rejection and accommodation of xenografts. *Transplantation*. 2000; 70: 1667-1674
- 109) Lin Y, Soares MP, Sato K, Takigami K, Csizmadia E, Smith N, Bach FH. Accommodated xenografts survive in the presence of anti-donor antibodies and complement that precipitate rejection of naive xenografts. *J Immunol*. 1999; 163: 2850-2857

- 110) Lin Y, Vandeputte M, Waer M. Contribution of activated macrophages to the process of delayed xenograft rejection. *Transplantation*. 1997; 64: 1677-1683
- 111) Liu QP, Yuan H, Bennett EP, Levery SB, Nudelman E, Spence J, Pietz G, Saunders K, White T, Olsson ML, Henrissat B, Sulzenbacher G, Clausen H. Identification of a GH110 subfamily of alpha 1,3-galactosidases: novel enzymes for removal of the alpha 3Gal xenotransplantation antigen. *J Biol Chem*. 2008; 283: 8545-8554
- 112) Loss M, Vangerow B, Schmidtko J, Kunz R, Jalali A, Arends H, Przemec M, Rückholt H, Leuwer M, Kaup FJ, Rensing S, Cozzi E, White DJG, Klemphauer J, Winkler M. Acute vascular rejection is associated with systemic complement activation in a pig-to-primate kidney xenograft model. *Xenotransplantation*. 2000; 7: 186-196
- 113) Luo Y, Wen J, Luo C, Cummings RD, Cooper DK. Pig xenogeneic antigen modification with green coffee bean alpha-galactosidase. *Xenotransplantation*. 1999; 6: 238-248
- 114) Lynch RJ, Kubus J, Chenault RH, Pelletier SJ, Campbell DA, Englesbe MJ. Comparison of histidine-tryptophan ketoglutarate and University of Wisconsin preservation in renal transplantation. *Am J Transplant*. 2008; 8: 567-573
- 115) Macher BA, Galili U. The Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc-R (α -Gal) epitope: A carbohydrate of unique evolution and clinical relevance. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008; 1780: 75-88
- 116) Mangus RS, Tector AJ, Fridell JA, Kazimi M, Hollinger E, Vianna RM. Comparison of histidine-tryptophan ketoglutarate solution and University of Wisconsin solution in intestinal and multivisceral transplantation. *Transplantation*. 2008; 86: 298-302
- 117) Martin J, Yerebakan C, Goebel H, Benk C, Krause M, Derjung G, Lutter G, Siegenthaler M, Beyersdorf F. Viability of the myocardium after twenty-four-hour heart conservation – a preliminary study. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2003; 51: 196-203

- 118) Mattiuzzo G, Scobie L, Takeuchi Y. Strategies to enhance the safety profile of xenotransplantation minimizing the risk of viral zoonoses. *Curr Opin Organ Transplant*. 2008; 13: 184-188
- 119) McCurry KR, Parker W, Cotterell AH, Weidner BC, Lin SS, Daniels LJ, Holzkecht ZE, Byrne GW, Diamond LE, Logan JS, Platt JL. Humoral responses to pig-to-baboon cardiac transplantation: implications for the pathogenesis and treatment of acute vascular rejection and for accommodation. *Human Immunology*. 1997; 58: 91-105
- 120) McGregor CG, Davies WR, Oi K, Teotia SS, Schirmer JM, Risdahl JM, Tazelaar HD, Kremers WK, Walker RC, Byrne GW, Logan JS. Cardiac xenotransplantation: Recent preclinical progress with 3-month median survival. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005; 130: 844-851
- 121) McGregor CG, Teotia SS, Byrne GW, Michaels MG, Risdahl JM, Schirmer LM, Tazelaar HD, Walker RC, Logan JS. Cardiac xenotransplantation: progress toward the clinic. *Transplantation*. 2004; 78: 1569-1575
- 122) Miki Y, Maruyama S, Liu D, Kobayashi T, Sato F, Shimizu H, Kato S, Sato W, Morita Y, Yuzawa Y, Muramatsu T, Matsuo S. In vivo gene transfer of endo- β -galactosidase C removes α Gal antigen on erythrocytes and endothelial cells of the organs. *Xenotransplantation*. 2004; 11: 444-451
- 123) Milland J, Christiansen D, Sandrin MS. α 1,3-Galactosyltransferase knockout pigs are available for xenotransplantation: Are glycosyltransferases still relevant? *Immunol Cell Biol*. 2005; 83: 687-693
- 124) Minanov OP, Artrip JH, Szabolcs M, Kwiatkowski PA, Galili U, Itescu S, Michler RE. Triple immunosuppression reduces mononuclear cell infiltration and prolongs graft life in pig-to-newborn baboon cardiac xenotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998; 115: 998-1006

- 125) Mohiuddin MM, Ogawa H, Yin DP, Shen J, Galili U. Antibody-mediated accommodation of heart grafts expressing an incompatible carbohydrate antigen. *Transplantation*. 2003; 75: 258-262
- 126) Mollnes TE, Fiene AE. Perspectives on complement in xenotransplantation. *Molecular Immunology*. 2003; 40: 135-143
- 127) Monsinjon T, Richard V, Fontaine M. Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: strategies to inhibit complement. *Fundam Clin Pharmacol*. 2001; 15: 293-306
- 128) Müllhaupt B, Dimitroulis D, Gerlach JT, Clavien PA. Hot topics in liver transplantation: Organ allocation – extended criteria donor – living donor liver transplantation. *J Hepatolog*. 2008; doi:10.1016/j.jhep.2008.01.013
- 129) Murakami M, Ito H, Harada E, Enoki T, Sykes M, Hamano K. Long-term survival of xenogeneic heart grafts achieved by costimulatory blockade and transient mixed chimerism. *Transplantation*. 2006; 82: 275-281
- 130) Murray-Segal L, Gock H, Cowan PJ, d'Apice AJ. Anti-Gal antibody-mediated skin graft rejection requires a threshold level of Gal expression. *Xenotransplantation*. 2008; 15: 20-26
- 131) Musameh MD, Green CJ, Mann BE, Fuller BJ, Motterlini R. Improved myocardial function after cold storage with preservation solution supplemented with a carbon monoxide-releasing molecule (CORM-3). *J Heart Lung Transplant*. 2007; 26: 1192-1198
- 132) Myhre BA. The first recorded blood transfusions: 1656 to 1668. *Transfusion*. 1990; 30: 358-362
- 133) Newman PJ, Newman DK. Signal Transduction pathways mediated by PECAM-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 953-964

- 134) Nutt MP, Fields BL, Belzer FO, Southard JH. Comparison of continuous perfusion and simple cold storage for rabbit heart preservation. *Transpl Proc.* 1991; 23: 2445-2446
- 135) Obukhova P, Rieben R, Bovin N. Normal human serum contains high levels of anti-Gal α 1-4GlcNAc antibodies. *Xenotransplantation.* 2007; 14: 627-635
- 136) Ohdan H, Yang YG, Swenson KG, Kitamura H, Sykes M. T cell and B cell tolerance to GAL α 1,3GAL-expressing heart xenografts is achieved in alpha1,3-galactosyltransferase-deficient mice by nonmyeloablative induction of mixed chimerism. *Transplantation.* 2001; 71: 1532-1542
- 137) Oshima K, Takeyoshi I, Mohara J, Tsutsumi H, Ishikawa S, Matsumoto K, Morishita Y. Long-term preservation using a new apparatus combined with suppression of pro-inflammatory cytokines improves donor heart function after transplantation in a canine model. *J Heart Lung Transplant.* 2005; 24: 802-608
- 138) Palmetshofer A, Galili U, Dalmaso AP, Robson SC, Bach FH. [alpha]-galactosyl epitope-mediated activation of porcine aortic endothelial cells: type II activation. *Transplantation.* 1998; 65: 971-978
- 139) Parker W, Saadi S, Lin SS, Holzknrecht ZE, Bustos M, Platt JL. Transplantation of discordant xenografts: a challenge revisited. *Immunology Today.* 1996; 17: 373-378
- 140) Parolari A, Rubini P, Cannata A, Bonati L, Alamanni F, Tremoli E, Biglioli P. Endothelial damage during myocardial preservation and storage. *Ann Thorac Surg.* 2002; 73: 682-690
- 141) Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen S-H, Mall S, Specht SM, Polejaeva IA, Monahan JA, Jobst PM, Sharma SB, Lamborn AE, Garst AS, Moore M, Demetris AJ, Rudert WA, Bottino R, Bertera S, Trucco M, Starzl TE, Dai Y, Ayares DL. Production of α 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science.* 2003; 299: 411-414

- 142) Platt JL. The immunological hurdles to cardiac xenotransplantation. *J Card Surg.* 2001; 16: 439-447
- 143) Platt JL, Bach FH. The barrier to xenotransplantation. *Transplantation.* 1991; 52: 937-947
- 144) Platt JL, Vercellotti GM, Dalmaso AP, Matas AJ, Bolman RM, Najarian JS, Bach FH. Transplantation of discordant xenografts: a review of progress. *Immunology Today.* 1990 a; 11: 450-456
- 145) Platt JL, Vercellotti GM, Lindman BJ, Oegema TR Jr., Bach FH, Dalmaso AP. Release of heparan sulfate from endothelial cells. Implications for pathogenesis of hyperacute rejection. *J Exp Med.* 1990 b; 171: 1363-1368
- 146) Pöling J, Oezkur M, Kogge K, Mengel M, Niemann H, Winkler M, Haverich A, Wiebe K. Hyperacute rejection in ex-vivo-perfused porcine lungs transgenic for human complement regulatory proteins. *Transplant Int.* 2006; 19: 225-232
- 147) Proulx S, Bourget JM, Gagnon N, Martel S, Deschambeault A, Carrier P, Giasson CJ, Auger FA, Brunette I, Germain L. Optimization of culture conditions for porcine corneal endothelial cells. *Mol Vis.* 2007; 13: 524-533
- 148) Przyklenk K. Lethal myocardial "reperfusion injury": The opinions of good men. *J Thromb Thrombolysis.* 1997; 4: 5-6
- 149) Radovits T, Lin LN, Zotkina J, Koch A, Rauen U, Köhler G, Karck M, Szabó G. Endothelial dysfunction after long-term cold storage in HTK organ preservation solutions: effects of iron chelators and N-alpha-acetyl-L-histidine. *J Heart Lung Transplant.* 2008; 27: 208-216.
- 150) Raffael A. Grundlagen der analytischen Durchflusszytometrie. Aus dem Handbuch Durchflusszytometrie, Becton Dickinson, 1988.

- 151) Rayat GR, Rajotte RV, Elliott JF, Korbitt GS. Expression of Gal α (1,3)Gal on neonatal porcine islet β -cells and susceptibility to human antibody/complement lysis. *Diabetes*. 1998; 47: 1406-1411
- 152) Rayya F, Harms J, Martin AP, Bartels M, Hauss J, Fangmann J. Comparison of histidine-tryptophan ketoglutarate solution and University of Wisconsin solution in adult liver transplantation. *Transpl Proc*. 2008; 40:891-894
- 153) Reemtsma K, McCracken BH, Schlegel JU et al. Heterotransplantation of the kidney: Two clinical experiences. *Science*. 1964; 143: 700-702
- 154) Reichenspurner H, Russ C, Wagner F, Überfuhr P, Nollert G, Weinhold C, Reichart B. Comparison of UW versus HTK solution for myocardial protection in heart transplantation. *Transpl Int*. 1994; 7 Suppl 1: 481-484
- 155) Romano E, Neethling FA, Nilsson K, Kosanke S, Shimizu A, Magnusson S, Svensson L, Samuelsson B, Cooper DK. Intravenous synthetic alphaGal saccharides delay hyperacute rejection following pig-to-baboon heart transplantation. *Xenotransplantation*. 1999; 6: 36-42
- 156) Rose AG, Cooper DK, Human PA, Reichenspurner H, Reichart B. Histopathology of hyperacute rejection of the heart: experimental and clinical observations in allografts and xenografts. *J Heart Lung Transplantation*. 1991; 10: 223-234
- 157) Rosenbaum DH, Peltz M, DiMaio JM, Meyer DM, Wait MA, Merritt ME, Ring WS, Jessen ME. Perfusion preservation versus static preservation for cardiac transplantation: effects on myocardial function and metabolism. *J Heart Lung Transplant*. 2008; 27: 93-99
- 158) Rother RP, Fodor WL, Springhorn JP, Birks CW, Setter E, Sandrin MS, Squinto SP, Rollins SA. A novel mechanism of retrovirus inactivation in human serum mediated by anti-alpha-galactosyl natural antibody. *J Exp Med*. 1995; 182: 1345-1355

- 159) Roux FA, Sai P, Deschamps JY. Xenotransfusions, past and present. *Xenotransplantation*. 2007; 14 : 208-216
- 160) Saadi S, Platt JL. Transient perturbation of endothelial integrity induced by natural antibodies and complement. *J Exp Med*. 1995; 181: 21-31
- 161) Saadi S, Platt JL. Minireview immunology of xenotransplantation. *Life Sciences*. 1998; 62: 365-387
- 162) Saethre M, Baumann BC, Fung M, Seebach JD, Mollness TE. Characterization of natural human anti-non-Gal antibodies and their effect on activation of porcine Gal-deficient endothelial cells. *Transplantation*. 2007; 84: 244-250
- 163) Saitoh Y, Hashimoto M, Ku K, Kin S, Nosaka S, Masumura S, Nakayama K. Heart preservation in HTK solution: role of coronary vasculature in recovery of cardiac function. *Ann Thorac Surg*. 2000; 107-112
- 164) Sandrin M.S. Gal knockout pigs: Any More Carbohydrates. *Transplantation*. 2007; 84: 8-9
- 165) Schmidt RF, Lang F, Thews G. *Physiologie des Menschen*. Springer. 2005; 29. Auflage, S.541
- 166) Schmidt PJ, Leacock AG. Forgotten transfusion history: John Leacock of Barbados. *BMJ*. 2002; 325: 1485-1487
- 167) Schmoeckel M, Nollert G, Shahmohammadi M, Young VK, Chavez G, Kasper-König W, White DJ, Müller-Höcker J, Arendt RM, Wilbert-Lampen U, Hammer C, Reichart B. Prevention of hyperacute rejection by human decay accelerating factor in xenogeneic perfused working hearts. *Transplantation*. 1996; 62: 729-734
- 168) Schuurman H-J, Smith HT, Cozzi E. Tolerability of cyclophosphamide and methotrexate induction immunosuppression in nonhuman primates. *Toxicology*. 2005; 213: 1-12

- 169) Sharma A, Naziruddin B, Cui C, Martin MJ, Xu H, Wan H, Lei Y, Harrison C, Yin J, Okabe J, Mathews C, Stark A, Adams C, Houtz J, Wiseman BS, Byrne GW, Logan J. Pig cells that lack the gene for [alpha]1-3galactosyltransferase express low levels of the gal antigen. *Transplantation*. 2003; 75: 430-436
- 170) Shimizu A, Hisashi Y, Kuwaki K, Tseng Y-L, Dor FJMF, Houser SL, Robson SC, Schuurman HJ, Cooper DKC, Sachs DH, Yamada K, Colvin RB. Thrombotic microangiopathy associated with humoral rejection of cardiac xenografts from α 1,3-Galactosyltransferase gene-knockout pigs in baboons. *Am J Pathol*. 2008; 172: 1471-1481
- 171) Shimizu A, Meehan SM, Kozlowski T et al. Acute humoral xenograft rejection: Destruction of the microvascular capillary endothelium in pig-to-nonhuman primate renal grafts. *Lab Invest*. 2000; 80: 815
- 172) Shimizu A, Yamada K. Pathology of renal xenograft rejection in pig to non-human primate transplantation. *Clin Transplant*. 2006; 20: 46-52
- 173) Shiraishi M, Oshiro T, Nozato E, Nagahama M, Taira K, Nomura H, Sugawa H, Muto Y. Adenovirus-mediated gene transfer of triple human complement regulating proteins (DAF, MCP and CD59) in the xenogeneic porcine-to-human transplantation model. Part II: xenogeneic perfusion of the porcine liver in vivo. *Transpl Int*. 2002; 15: 212-219
- 174) Smolenski RT, Forni M, Maccherini M, Bacci ML, Slominska EM, Wang H, Fornasari P, Giovannoni R, Simeone F, Zannoni A, Frati G, Suzuki K, Yacoub MH, Lavitrano M. Reduction of hyperacute rejection and protection of metabolism and function in hearts of human decay accelerating factor (hDAF)-expressing pigs. *Cardiovasc Res*. 2007; 73: 143-152
- 175) Sørensen DB, Dahl K, Ersbøll AK, Kirkeby S, d'Apice AJ, Hansen AK. Aggression in cataract-bearing alpha-1,3-galactosyltransferase knockout mice. *Lab Anim*. 2008; 42: 34-44

- 176) Sprangers B, Waer M, Billiau AD. Xenotransplantation: Where are we in 2008? *Kidney International*. 2008; doi: 10.1038/ki.2008.135
- 177) Stahl JE, Tramontano AC, Swan JS, Cohen BJ. Balancing urgency, age and quality of life in organ allocation decisions – what would you do?: a survey. *J Med Ethics*. 2008; 34: 109-115
- 178) Stewart ZA, Cameron AM, Singer AL, Dagher NN, Montgomery RA, Segev DL. Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate (HTK) is associated with reduced graft survival in pancreas transplantation. *Am J Transplant*. 2008; 9: 217-221
- 179) Stringham JC, Love RB, Welter D, Canver CC, Mentzer RM Jr. Does University of Wisconsin solution harm the transplanted heart? *J Heart Lung Transplant*. 1999; 18: 587-596
- 180) Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*. 2001; DOI: 10.1002/0471142735
- 181) Suhr BD, Black SM, Guzman-Paz M, Matas AJ, Dalmaso AP. Inhibition of the membrane attack complex of complement for induction of accommodation in the hamster-to-rat heart transplant model. *Xenotransplantation*. 2007; 14: 572-579
- 182) Sykes M, Shimizu I, Kawahara T. Mixed hematopoietic chimerism for the simultaneous induction of T and B cell tolerance. *Transplantation*. 2005; 79: S28-S29
- 183) Tabata T, de Perrot M, Keshavjee S, Liu M, Downey GP, Waddell TK. Accommodation after lung xenografting from hamster to rat. *Transplantation*. 2003; 75:607-612
- 184) Tanemura M, Galili U. Differential expression of α -Gal epitopes on pig and mouse organs. *Transpl Proc*. 2000; 32: 843

- 185) Tanemura M, Saga A, Kawamoto K, Manabe N, Machida T, Dequchi T, Sawa Y, Nishida T, Ito T. Pig cellular FLICE-like inhibitory protein (c-FLIP) overexpressing in pig xenograft cells induces resistance to human CD8(+) cytotoxic T lymphocyte-mediated xenocytotoxicity. *Transpl Proc.* 2008; 40: 559-563
- 186) Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Abu Amara M, Seifalian AM, Davidson BR. Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury – a review. *J Surg Res.* 2008; 150: 304-330
- 187) Taylor SG, McKenzie IF, Sandrin MS. Characterization of the rat alpha(1,3)galactosyltransferase: evidence for two independent genes encoding glycosyltransferases that synthesize Galalpha(1,3)Gal by two separate glycosylation pathways. *Glycobiology.* 2003; 13: 327-337
- 188) Teranishi K, Alwayn IPJ, Bühler L, Gollackner B, Knosalla C, Huck J, Duthaler R, Katopodis A, Sachs DH, Schuurman H-J, Awwad M, Cooper DKC. Depletion of anti-Gal antibodies by the intravenous infusion of Gal type 2 and 6 glycoconjugates in baboons. *Xenotransplantation.* 2003; 10: 357-367
- 189) Teranishi K, Gollackner B, Bühler L, Knosalla C, Correa L, Down JD, White-Scharf ME, Sachs DH, Awwad M, Cooper DK. Depletion of anti-gal antibodies in baboons by intravenous therapy with bovine serum albumin conjugated to gal oligosaccharides. *Transplantation.* 2002; 73: 129-139
- 190) Thomas A, Gasque P, Vaudry D, Gonzalez B, Fontaine M. Expression of a complete and functional complement system by human neuronal cells in vitro. *International Immunology.* 2000; 12: 1015-1023
- 191) Toledo-Pereyra LH, Lopez-Neblina F. Xenotransplantation: a view to the past and an unrealized promise to the future. *Exp Clin Transplant.* 2003; 1: 1-7

- 192) Trieb K, Eberl T, Steger M, Öfner D, Steinlechner R, Gnaiger E, Schröcksnadel H, Grubeck-Loebenstein, Margreiter R. Apoptosis is involved in endothelial cell damage during preservation and influenced by organ storage solutions. *Transpl Proc.* 1997; 29: 416-418
- 193) Vangerow B, Hecker JM, Lorenz R, Loss M, Przemeck M, Appiah R, Schmidtko J, Jalali A, Rueckoldt H, Winkler M. C1-Inhibitor for treatment of acute vascular xenograft rejection in cynomolgus recipients of h-DAF transgenic porcine kidneys. *Xenotransplantation.* 2001; 8: 266-272
- 194) Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Research.* 2004; 481-497
- 195) Wahlberg JA, Southard JH, Belzer FO. Development of a cold storage solution for pancreas preservation. *Cryobiology.* 1986; 23: 477-482
- 196) Wallis C. Baby Fae loses her battle. *Time*, 26.11.1984
- 197) Wang N, Lee JM, Tobiasch E, Csizmadia E, Smith NR, Gollackes B, Robson SC, Bach FH, Lin Y. Induction of xenograft accommodation by modulation of elicited antibody responses. *Transplantation.* 2002; 74: 334-345
- 198) Watanabe S, Misawa M, Matsuzaki T, Sakurai T, Muramatsu T, Yokomine T, Sato M. Production and characterization of transgenic mice systemically expressing Endo- β -galactosidase C. *Glycobiology.* 2008; 18: 9-19
- 199) Watts A, Foley A, Awwad M, Treter S, Oravec G, Buhler L, Alwayn IP, Kozlowski T, Lambrigts D, Gojo S, Basker M, White-Scharf ME, Andrews D, Sachs DH, Cooper DK. Plasma perfusion by apheresis through a Gal immunoaffinity column successfully depletes anti-Gal antibody: experience with 320 aphareses in baboons. *Xenotransplantation.* 2000; 7: 181-185
- 200) White DJ. Transplantation of organs between species. *Int Arch Allergy Immunol.* 1992; 98: 1-5

- 201) Wight C, Cohen B, Beasley C, Miranda B, Deblander G. Donor Action: a systematic approach to organ donation. *Transpl Proc.* 1998; 30: 2253-2254
- 202) Wille T, de Groot H, Rauen U. Improvement of the cold storage of blood vessels with a vascular preservation solution. Study in porcine aortic segments. *J Vasc Surg.* 2008; 47: 422-431
- 203) Williams JM, Holzkecht ZE, Plummer TB, Lin SS, Brunn GJ, Platt JL. Acute vascular rejection and accommodation: divergent outcomes of the humoral response to organ transplantation. *Transplantation.* 2004; 78: 1471-1478
- 204) Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer. Stellungnahme zum Thema „Xenotransplantation“. *Deutsches Ärzteblatt* 96, 1999, Heft 28-29, Seite A-1920
- 205) Wood C, Kabat EA, Murphy LA, Goldstein IJ. Immunochemical studies of the combining sites of the two isolectins, A4 and B4, isolated from *Bandeiraea simplicifolia*. *Arch Biochem Biophys.* 1979; 198: 1-11
- 206) Wu G, Pfeiffer S, Schröder C, Zhang T, Nguyen BN, Lea W, Kelishadi S, Atkinson JB, Schuurman HJ, White J, Azimzadeh AM, Pierson RN 3rd. Co-stimulation blockade targeting CD154 and CD28/B7 modulates the induced antibody response after a pig-to-baboon cardiac xenograft. *Xenotransplantation.* 2005; 12: 197-208
- 207) Xu Y, Yang Y-G, Ohdan H, Ryan D, Harper D, Wu C, Kruger-Grey HS, Thall AD, Awwad M, Sykes M. Characterization of anti-Gal antibody-producing cells of baboons and humans. *Transplantation.* 2006; 81: 940-948
- 208) Yang Q, He G-W. Effect of cardioplegic and organ preservation solutions and their components on coronary endothelium-derived relaxing factors. *Ann Thorac Surg.* 2005; 80:757.e1-13

- 209) Yang Q, Zhang R-Z, Yim APC, He G-W. Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate solution maximally preserves endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated function during heart preservation: comparison with University of Wisconsin solution. *J Heart Lung Transplant*. 2004; 23: 352-359
- 210) Zhang JJ, Kelm RJ, Biswas P, Kashgarian M, Madri JA. PECAM-1 modulates thrombin-induced tissue factor expression on endothelial cells. *J Cell Physiol*. 2007; 210: 527-537
- 211) Zhang C, Xu X, Potter BJ, Wang W, Kuo L, Michael L, Bagby GJ, Chilian WM. TNF-alpha contributes to endothelial dysfunction in ischemia/reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26: 475-480
- 212) Zhou CY, McInnes E, Copeman L, Langford G, Parsons N, Lancaster R, Richards A, Carrington C, Thompson S. Transgenic pigs expressing human CD59, in combination with human membrane cofactor protein and human decay-accelerating factor. *Xenotransplantation*. 2005; 12: 142-148
- 213) Zhu A. Introduction to porcine red blood cells: implications for xenotransfusion. *Semin Hematol*. 2000; 37: 143
- 214) Zhu X, Dor FJMF, Cooper DKC. Pig-to-non-human primate heart transplantation: Immunologic progress over 20 years. *J Heart Lung Transplant*. 2007; 26: 210-218

8. Anhang

8.1. Abkürzungen

| | |
|----------------|---|
| A20 | Zinkfinger-Protein, das die NF- κ B Aktivität hemmt |
| ACXR | Acute cellular xenograft rejection (akute zelluläre Xenograftabstoßung) |
| α -Gal | Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R |
| α 1,2FT | α 1,2-Fucosyltransferase |
| α 1,3GT | α 1,3-Galactosyltransferase |
| α 2,3ST | α 2,3-Sialyltransferase |
| α 2,6ST | α 2,6-Sialyltransferase |
| AHXR | Acute humoral xenograft rejection (akut humorale Abstoßung) |
| AO | Acridinorange |
| APS | Amphotericin B, Penicillin, Streptomycin |
| AVR | Acute vascular rejection (akut vaskuläre Abstoßung) |
| bcl-2 | B-cell lymphoma 2; antiapoptotisches Protein |
| bcl-xL | B-cell lymphoma xL; antiapoptotisches Protein |
| C 1 | Komplementfaktor 1 |
| CD4+ Zellen | T-Zellen, die den Corezeptor CD4+ tragen; T-Helferzellen |
| CD8+ Zellen | T-Zellen, die den Corezeptor CD8+ tragen; cytotoxische T-Zellen |
| CD28 | akzessorischer Rezeptor bei der T-Zell-Aktivierung |
| CD31 | Endothelzellmarker, auch häufig als PECAM-1 bezeichnet |

| | |
|--------|--|
| CD34 | Endothelzellmarker |
| CD40 | Protein auf antigenpräsentierenden Zellen |
| CD40L | CD 40 Ligand, akzessorischer Rezeptor bei der T-Zell-Aktivierung |
| CD46 | Komplement-regulierendes Protein |
| CD59 | Komplement-regulierendes Protein |
| CO-RMs | Carbon monoxide-releasing molecules; CO freisetzende Moleküle |
| CR | Chronic rejection (chronische Abstoßung) |
| CRP | Complement-Regulating Protein (Komplement-regulierendes Protein) |
| CVF | Cobra-Venom-Faktor |
| DAF | Decay-accelerating-Factor |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle's medium |
| EDHF | Endothelium-derived hyperpolarizing factor |
| EDNO | Endothelium-dependent nitric oxide |
| ELAM-1 | Endothelial leucocyte adhesion molecule |
| ELISA | Enzyme linked immuno sorbens assay |
| FACS | Fluorescence activated cell sorting; Durchflusszytometrie |
| FCS | Fetal Calf Serum (fetales Kälberserum) |
| FDA | Fluorescein-diacetat |
| FFP | Fresh Frozen Plasma |
| FITC | Fluorescein-isothiocyanat |

| | |
|---------------|---|
| FL1 | grüne Fluoreszenz im FACS ; Fluoreszenz des FITC |
| FL2 | rote Fluoreszenz im FACS; Fluoreszenz des PE |
| FSC | Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht) |
| GnT-III | β -D-mannoside β -1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III |
| HAR | Hyperacute rejection (hyperakute Abstoßungsreaktion) |
| HCl | Chlorwasserstoff; Salzsäure |
| hDAF | human Decay-Accelarating-Factor |
| IA | Immunadsorption |
| ICAM-1 | Intercellular adhesion molecule |
| IL-1 α | Interleukin 1 α |
| IZ | Ischämiezeit |
| LDL | Low density lipoproteins |
| MCP | Membrane Cofactor Protein |
| Mean M1 | Mittlere Fluoreszenzintensität einer Zelle |
| MHC II | Major Histocompatibility Complex II |
| MMF | Mycophenolatmofetil |
| NaCl | 0,9%-Natrium-Chlorid-Lösung |
| NaOH | Natriumhydroxid |

| | |
|-----------|---|
| NF-κB | Nuclear Factor-kappa B; Transkriptionsfaktor zur Regulierung von Genen, die für die angeborene und erworbene Immunantwort wichtig sind. |
| NK | Natürliche Killerzellen |
| NYHA IV | Klassifikation der Herzinsuffizienz nach der New York Heart Association; Stadium IV: Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit selbst bei geringer körperlicher Belastung oder bereits in Ruhe; Dyspnoe bereits in Ruhe |
| PAEC | Porcine Aortenendothelzellen |
| PAEC I | einmal gesplittete porcine Aortenendothelzellen |
| PAEC II | zweimal gesplittete porcine Aortenendothelzellen |
| PAF | Platelet Activating Factor |
| PAI-1 | Plasminogen Activator Inhibitor |
| PBS | Phosphate-buffered saline |
| PBS minus | Phosphate-buffered saline minus; Natriumchlorid Lösung 0,81% in Phosphatpuffer |
| PE | Phycoerythrin |
| PECAM-1 | Plateled endothelial cell adhesion molecule; Endothelzellmarker; CD 31 |
| PI | Propidiumiodid |
| sCR1 | löslicher Komplement-Rezeptor 1 |
| SSC | Side Scatter (Seitwärtsstreulicht) |
| TF | Tissue Factor |

| | |
|---------------|---|
| TNF- α | Tumor Nekrose Faktor alpha |
| TOR-Inhibitor | Target of Rapamycin-Inhibitor |
| UW-Lösung | University of Wisconsin-Lösung |
| VCAM-1 | Vascular cell adhesion molecule |
| VCP | Vaccinia Virus Complement Control Protein |
| VE-Cadherin | Vascular Endothelial - Cadherin |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| XNA | xenoreaktive natürliche Antikörper |

8.2. Materialien

| | |
|--------------------------------------|--|
| Accutase: | PAA Laboratories (Pasching, Österreich) |
| Anti- α -Gal Antikörper: | Mouse anti-Rabbit Galactose, alpha 1,3 Galactose beta 1,4 GlcNAc-R, USBiological (Swampscott, USA) |
| Anti-CD31 Antikörper: | Mouse Anti Pig CD 31:RPE, MCA1746PE, AbD Serotec (Oxford, UK) |
| Anti-Mouse IgG, IgA, IgM Antikörper: | Polyclonal Antibody to Mouse IgG, IgA, IgM –FITC, Acris Antibodies (Herford, Deutschland) |
| Anti-Mouse Ig Antikörper: | PE labeled goat anti-mouse Ig, BD Biosciences(San Jose, USA) |
| APS: | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| Aqua ad iniectabilia: | Braun (Melsungen, Deutschland) |
| BS-I Isolectin B4, FITC conjugate: | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| Coulterflüssigkeit: | Beckman Coulter AC T PAK Reagent Kit (Fullerton, USA) |
| Dispase: | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| FACS-Trägerflüssigkeit: | Becton Dickinson FACSFlow (Franklin Lake, USA) |

| | |
|---------------------------------|--|
| FACS-Röhrchen: | Falcon 5ml Polystyrene Round Bottom Tube, Becton Dickinson (Franklin Lake, USA) |
| FACS-Röhrchen: | PP-Tube 5ml, Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich) |
| Falcon-Röhrchen klein: | Falcon 15ml Polypropylene Conical Tube, Becton Dickinson (Franklin Lake, USA) |
| Falcon-Röhrchen groß: | Falcon 50ml Polypropylene Conical Tube, Becton Dickinson (Franklin Lake, USA) |
| FCS: | Biochrom AG (Berlin, Deutschland) |
| Filter: | Cellulose acetate filter 0,2 µm, Sartorius (Göttingen, Deutschland) |
| Handschuhe: | Sempercare/Sempermed (Clearwater, USA) examination gloves powderfree |
| Hanksche Lösung ohne Phenolrot: | Apotheke Innenstadt Universität München <i>Zusammensetzung:</i> Natriumchlorid 8,0g Kaliumchlorid 0,4g Magnesiumsulfat-Heptahydrat 0,13g Magnesiumchlorid-Hexahydrat 0,07g Calciumchlorid-Dihydrat 0,13g di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat 0,15g Kaliumdihydrogenphosphat 0,06g Glucose-Monohydrat 0,06g Natriumhydrogencarbonat 0,3g Wasser f. Inj. zu 1000g |

| | |
|--------------------------------|---|
| HTK-Lösung nach Bretschneider: | Custodiol ®, Dr.Franz Köhler Chemie GmbH (Alsbach-Hähnlein, Deutschland) |
| Kollagenase A: | Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland) |
| Kulturschalen klein: | Falcon Zellkulturschalen 60x15 mm, Becton Dickinson (Franklin Lake, USA) |
| Kulturschalen groß: | Falcon Zellkulturschalen 100x20 mm, Becton Dickinson (Franklin Lake, USA) |
| Lysingsolution: | BD FACS (Franklin Lake, USA) |
| Medium L15 Leibovitz: | Sigma-Aldrich (St.Louis, USA) |
| NaCl 0,9%: | Braun (Melsungen, Deutschland) |
| Objektträger: | 76x26mm, Menzel (Braunschweig, Deutschland) |
| Pasteurpipetten: | Pasteurpipetten aus Glas für den Einmalgebrauch, Brand (Wertheim, Deutschland) |
| PBS-: | Apotheke Innenstadt Universität München <i>Zusammensetzung:</i> Natriumchlorid: 8,1g di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat 0,862g Kaliumdihydrogenphosphat 0,248g Wasser f. Inj. zu 1000ml |

| | |
|------------------|---|
| PBS+: | <p>Eigene Herstellung</p> <p><i>Zusammensetzung:</i></p> <p>Natriumchlorid 8,0g</p> <p>Kaliumchlorid 0,2g</p> <p>Magnesiumchlorid 0,04g</p> <p>Kaliumdihydrogenphosphat 0,2g</p> <p>di-Natriumhydrogenphosphat 1,15g</p> <p>Calciumchlorid 0,1g</p> <p>Aqua ad iniectabilia zu 1000ml</p> |
| Pipetten: | <p>Serological Pipet, Falcon BD (Franklin Lake, USA)</p> <p>1 ml: Kat.Nr. 356521</p> <p>5 ml: Kat.Nr. 356543</p> <p>10 ml: Kat.Nr. 356551</p> |
| Pipettenspitzen: | <p>0,5-20 µl Eppendorf (Hamburg, Deutschland)</p> <p>2-200 µl Eppendorf (Hamburg, Deutschland)</p> <p>1000 µl Sarstedt (Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland)</p> |
| Reaktionsgefäße: | <p>Reaktionsgefäße 2,0 ml, Biozym (Hess. Oldendorf, Deutschland)</p> |
| Trypsin: | <p>Trypsin-EDTA solution, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)</p> |
| UW-Lösung: | <p>ViaSpan ®, Bristol-Myers Squibb GmbH & Co (München, Deutschland)</p> |

8.3. Geräte

| | |
|----------------------|--|
| Brutschrank 1: | Heraeus CO ₂ -Auto-Zero |
| Brutschrank 2: | Heraeus CO ₂ -Auto-Zero |
| Coulter: | Beckman Coulter, Coulter ACT 8 |
| Durchflusszytometer: | FACSort Becton Dickinson |
| Kühlbox: | Kompressor-Kühlbox Waeco (Emsdetten, Deutschland), 31l, Temperaturbereich +10°C bis - 18°C mit elektronischer Temperaturregelung, dreistufiger Batteriewächter |
| Magnetrührer: | Heidolph, Typ MR 80, U/min 60-1100 |
| Mikroskop 1: | Leitz, Fluovert FU |
| Mikroskop 2: | Zeiss, Axioskop 40 |
| pH-Meter: | Radiometer Copenhagen, PHM 82 Standard |
| Sterilbank: | Steril-VHB; LAF-Geschwindigkeit 0,40m/s, Abluftvolumen 349m ³ /h |
| Waage: | Scaltec SBC32; Max 120g, Min 0,01g, d=0,0001g, e=0,001g |
| Wasserbad: | Haake SWB25 |
| Zentrifuge 1: | Heraeus Megafuge 1,0R |
| Zentrifuge 2: | Hettich Universal 30RF |

8.4. Abbildungsverzeichnis

| | | |
|---------------|--|----|
| Abbildung 1: | Dynamik der Eurotransplant-Warteliste für Herztransplantationen und den durchgeführten Transplantationen | 5 |
| Abbildung 2: | Mechanismen der Xenotransplantatabstoßung | 14 |
| Abbildung 3: | Das Komplementsystem | 16 |
| Abbildung 4: | Thorakales Organpaket und Entnahme des Aortensegmentes | 33 |
| Abbildung 5: | Spülen der Aorten in NaCl und APS | 35 |
| Abbildung 6: | Zelldissoziation in Aluminiumblöcken | 36 |
| Abbildung 7: | Falcon-Röhrchen mit Zellpellet | 37 |
| Abbildung 8: | Zellkultur | 38 |
| Abbildung 9: | Morphologie der Primärkulturen an Tag 2, 4 und 6 | 38 |
| Abbildung 10: | Monolayer aus Endothelzellen | 41 |
| Abbildung 11: | Sättigungskurve für BS-I Isolectin B4 | 43 |
| Abbildung 12: | α -Gal-Nachweis bei der Ablösung der Zellen mit Accutase versus EDTA- Puffer | 45 |
| Abbildung 13: | Schema: Färbung der PAEC | 46 |
| Abbildung 14: | α -Gal-Nachweis bei der Inkubation der Zellen zur Färbung bei Kälte versus Raumtemperatur | 47 |
| Abbildung 15: | Schematischer Aufbau FACS | 49 |
| Abbildung 16: | Das FACSsort am Institut für Chirurgische Forschung | 50 |
| Abbildung 17: | Auswertung der FACS-Messungen mittels Dot-Plot und Histogramm-Plot | 51 |
| Abbildung 18: | Nachweis der Fehlerhaftigkeit des Sekundärantikörpers | 56 |
| Abbildung 19: | α -Gal-Nachweis in Abhängigkeit von der Kulturzeit | 57 |
| Abbildung 20: | Passagenvergleich | 59 |
| Abbildung 21: | Interindividuelle Unterschiede in der α -Gal-Expression | 60 |
| Abbildung 22: | Verleich der alten und neuen Aluminiumblöcke für die Zelldissoziation | 61 |
| Abbildung 23: | Morphologie der PAEC aus Primärkulturen und gesplitteten Kulturen | 62 |
| Abbildung 24: | Versuchsaufbau zur Untersuchung des Einflusses von Hypothermie auf die α -Gal-Epitope | 63 |
| Abbildung 25: | Versuchsaufbau zur Untersuchung des Einflusses der Kardioplegielösungen UW-Lösung und Bretschneider-Lösung auf die α -Gal-Epitope | 64 |
| Abbildung 26: | Zellmorphologie: Kontrollgruppen bei ein-, vier-, sechsständiger Inkubation bei 38°C | 67 |
| Abbildung 27: | Zellmorphologie: Versuchsgruppen bei ein-, vier-, sechsständiger Kühlung bei 4°C | 68 |
| Abbildung 28: | Zellmorphologie nach Inkubation der Zellen mit UW- oder Bretschneider – Lösung | 69 |
| Abbildung 29: | Zellvitalität nach ein-, vier-, sechsständiger Inkubation bei 4°C und 38°C | 70 |
| Abbildung 30: | Zellvitalität nach Inkubation der Zellen mit UW- oder Bretschneider – Lösung | 71 |
| Abbildung 31: | CD31-Nachweis nach ein-, vier-, sechsständiger Inkubation bei 4°C und 38°C | 73 |

| | | |
|---------------|---|----|
| Abbildung 32: | CD31-Nachweis nach Inkubation der Zellen mit UW- und Bretschneider – Lösung | 74 |
| Abbildung 33: | Einfluss der Hypothermie auf den Anteil α -Gal-positiver PAEC | 75 |
| Abbildung 34: | Einfluss der Hypothermie auf die α -Gal-Menge pro Zelle | 76 |
| Abbildung 35: | Verbundene Stichproben der Untersuchung des Einflusses von Hypothermie auf die α -Gal-Epitope | 77 |
| Abbildung 36: | Einfluss der Kardioplegielösungen UW-Lösung und Bretschneider-Lösung auf die α -Gal-Epitope | 79 |
| Abbildung 37: | Verbundene Stichproben zur Untersuchung des Einflusses von UW-Lösung auf die α -Gal-Epitope | 80 |
| Abbildung 38: | FACS-Darstellung: Einfluss von UW-Lösung auf die α -Gal-Epitope | 80 |
| Abbildung 39: | Verbundene Stichproben zur Untersuchung des Einflusses von Bretschneider-Lösung auf die α -Gal-Epitope | 81 |
| Abbildung 40: | FACS-Darstellung: Einfluss von Bretschneider-Lösung auf die α -Gal-Epitope | 82 |
| Abbildung 41: | Mögliche Wirkmechanismen der Kardioplegielösungen auf die α -Gal-Epitope | 93 |

8.5. Tabellenverzeichnis

| | | |
|------------|---|----|
| Tabelle 1: | Xenotransplantationen im 20. Jahrhundert | 11 |
| Tabelle 2: | Zusammensetzung der UW-Lösung (ViaSpan®) und der Bretschneider-Lösung (Custodiol®) | 65 |
| Tabelle 3: | CD31-Nachweis nach ein-, vier- und sechsständiger Inkubation der Zellen bei 4°C und 38°C | 72 |
| Tabelle 4: | Auswirkung der Ischämie auf die myokardiale Zelle eines allogenen/xenogenen Herztransplantats | 84 |

8.6. Publikationsverzeichnis

Vorträge

Brenner P, Keller M, Bauer A, Schmoeckel M, Reichart B. Impact of hypothermia and cardioplegic solutions on the α -Gal epitopes on porcine aortic endothelial cells. Joint meeting IPITA-IXA 2009; Venedig, Italien 12.-16.10.2009

Brenner P, Keller M, Beiras A, Schmoeckel M, Reichart B. Can hypothermia and cardioplegic solutions prevent hyperacute xenograft rejection by influencing the α -Gal epitopes on porcine aortic endothelial cells? 39. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Stuttgart, Deutschland 14.-17.02.2010

Paper

P Brenner, M Keller, A Beiras, M Schmoeckel, B Reichart. Can hypothermia and cardioplegic solutions prevent hyperacute xenograft rejection by influencing the α -Gal epitopes on porcine aortic endothelial cells? Thorac cardiovasc surg 2010; 58
DOI: 10.1055/s-0029-1247058

Miriam Keller, Andres Beiras-Fernandez, Michael Schmoeckel, Bruno Reichert, Paolo Brenner. Influence of hypothermia and cardioplegic solutions on expression of α -Gal epitope on porcine aortic endothelial cells. Experimental and Clinical Transplantation 2010; 3: 250-257

8.7. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Bruno Reichart für das Überlassen des Themas. Außerdem danke ich Herrn PD Dr. Paolo Brenner für die gute Betreuung während der gesamten Arbeit. Mein Dank gilt außerdem den medizinisch technischen Assistentinnen des Walter-Brendel-Zentrums, die mich in die Arbeit mit den Zellkulturen und in die FACS-Analyse eingeführt haben, sowie Herrn Dr. Peters für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Insbesondere danke ich jedoch der Metzgerei Mair in Stetten bei Dachau, die mir mehr als hundert Schweineaorten für die Experimente zur Verfügung stellte und damit die Untersuchungen in diesem Ausmaß überhaupt ermöglichte.

Abschließend gilt mein Dank auch meiner Familie, die mich während der Versuche wie auch während des gesamten Studiums stets unterstützte.

8.8 Lebenslauf

Name: Keller

Vorname: Miriam

Geburtsdatum: 27.07.1983

Geburtsort: München, Deutschland

Eltern: Anneliese Keller, geb. Dunkl, Lehrerin
Harold Keller, Angestellter

Schulbesuch: Grundschule an der Rotbuchenstraße, München, Sept. 1990 – Juli 1994
Albert-Einstein-Gymnasium, München, September 1994 – Juni 2003
Abitur im Juni 2003 (Durchschnittsnote 1,1)

Studium: Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Studienbeginn: Oktober 2003
Physikum: August 2005
2. Staatsexamen: November 2009

Praktika: Pflegepraktikum Juli 2003, Internistische Klinik Dr. Müller, München
Pflegepraktikum September 2003, Orthopädische Klinik München
Pflegepraktikum September 2004, Internistische Klinik Dr. Müller, München

Oktober 2004 – August 2006: OP-Assistenz Orthopädie, Krankenhaus Barmherzige Brüder, München

Famulatur in der Kardiologie, März 2006, Hospital Manacor, Spanien
Famulatur in der Orthopädie/Traumatologie, 16.08.-15.09.06, Hospital Manacor, Spanien
Famulatur in der Notaufnahme, März 2007, Hospital Manacor, Spanien
Famulatur in der Inneren Medizin, 13.08.- 09.09.07 Internistische Klinik Dr. Müller, München
Praktisches Jahr in der Allgemeinchirurgie, 18.08.-12.10.08, Krankenhaus Martha-Maria, München-Solln
Praktisches Jahr in der Herzchirurgie, 13.10.-7.12.08 Universitäts-Klinikum Großhadern, München
Praktisches Jahr in der Anästhesiologie, 8.12.-29.03.09, Universitäts-Klinikum Großhadern, München
Praktisches Jahr in der Inneren Medizin, 30.03.-19.07.09 Kantonsspital Glarus, Schweiz

Beruf: Seit Januar 2010 Assistenzärztin in der Herzchirurgie, BHZ Vogtareuth

Sprachkenntnisse: Latein, Englisch, Französisch, Spanisch

Sonstiges: Ausbildung zum Betreuer im Reitsport 1999
Ausbildung zum Übungsleiter Snowboard beim Deutschen Skiverband, 2002

